UNIWERSYTET
WARMIŃSKO-MAZURSKI
W OLSZTYNIE

WYDZIAŁ NAUKI O ŻYWNOŚCI

Dziedzina: Nauki ścisłe i przyrodnicze

Dyscyplina: Nauki biologiczne

mgr Grzegorz Wołąkiewicz

Rozprawa doktorska

Detekcja α-defensyn metodami wzmocnionej fluorescencji na powierzchni nanocząstek metalu szlachetnego w diagnostyce infekcji okołoprotezowych.

Detection of α-defensins using surface-enhanced fluorescence methods on noble metal nanoparticles in the diagnosis of periprosthetic joint infections.

Praca wykonana w Katedrze Fizyki i Biofizyki

Promotor: dr hab. Mariusz Szabelski, prof. UWM
Katedra Fizyki i Biofizyki, Wydział Nauki o Żywności
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Promotor pomocniczy: dr n. med. Marek Gojło
Oddział Kliniczny Chirurgii Urazowo-Ortopedycznej i Chirurgii Kręgosłupa
Wojewódzki Szpital Specjalistyczny w Olsztynie

Olsztyn, 2024

Praca realizowana w ramach programu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego pn. „Doktorat wdrożeniowy” DWD/4/80/2020

Spis treści

Alfabetyczny spis skrótów 5
Streszczenie 7
Summary 8
1. Wstęp 9
1.1. Zjawisko wzmocnionej fluorescencji na powierzchni nanocząstek metalu 11
1.2. Charakterystyka nanocząstek srebra w zastosowaniach plazmonicznych 16
1.2.1. Morfologia nanocząstek srebra 16
1.2.2. Syntezy nanocząstek srebra 20
1.2.2.1. Metody fizyczne 20
1.2.2.2. Metody chemiczne 22
1.2.2.3. Metody biologiczne 25
1.3. Zastosowanie nanocząstek srebra w medycynie 27
1.3.1. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe 27
1.3.2. Właściwości przeciwnowotworowe 28
1.3.3. Badania nad toksycznością nanocząstek srebra 29
1.4. Nanocząstki srebra w biosensorach 30
1.4.1. Biosensory SERS 30
1.4.2. Biosensory LSPR 31
1.4.3. Biosensory MEF 33
1.5. Selektywne wzbudzanie fluoroforów metodą TIRF 34
1.5.1. Podstawy TIRF 35
1.5.2. Przykładowy układ TIRF 37
1.5.3. TIRF na powierzchni metalu 39
1.6. Infekcje okołoprotezowe 40
1.6.1. Skala i przyczyny występowania infekcji 40
1.6.2. Postępowanie kliniczne 43
1.6.3. Biomarkery 45
1.6.3.1. Markery oznaczane w krwi 45
1.6.3.2. Markery oznaczane w płynie stawowym 47
1.6.4. Międzynarodowe zalecenia w diagnostyce zakażeń okołoprotezowych 49
1.7. Rola alfa-defensyn w diagnostyce zakażeń okołoprotezowych 52
1.7.1. Charakterystyka alfa-defensyn 53
1.8. Metody i testy do wykrywania obecności alfa-defensyn w płynie stawowym 54
1.8.1. Zasada działania testów ELISA 55

1.8.2. Test Synovasure Alpha Defensin ELISA Test 58
1.8.3. Zasada działania testów immunochromatograficznych 61
1.8.4. Test Synovasure Alpha Defensin Lateral Flow Test 63
1.8.5. Badania nad nowymi testami na obecność alfa-defensyn 68
2. Cel, zakres i znaczenie badań 72
3. Materiały i metody badawcze 74
3.1. Synteza nanowarstw srebra 75
3.1.1. Protokół syntezy srebrnych nanowysp 75
3.1.2. Badania stabilności nanowarstw srebra w różnych warunkach otoczenia 78
3.1.3. Badania właściwości nanowarstwy srebra na powierzchni szkła. 79
3.2. Określenie właściwości fizykochemicznych znaczników fluorescencyjnych związanych z badanymi białkami 81
3.2.1. Wybór znaczników fluorescencyjnych i białek do badań. 81
3.2.2. Właściwości wybranych znaczników fluorescencyjnych związanych z przeciwciałami 83
3.2.2.1. Znakowanie przeciwciał wybranymi fluoroforami 83
3.2.2.2. Właściwości spektralne znaczników fluorescencyjnych związanych z przeciwciałami 87
3.2.3. Badania wiązań alfa-defensyna - przeciwciało w roztworach 89
3.2.3.1. Znakowanie alfa-defensyn, charakterystyka spektralna 90
3.2.3.2. Badania odziaływania przeciwciało – alfa-defensyna 91
3.2.3.3. Badanie dynamiki wiązań przeciwciało – alfa-defensyna 92
3.3. Układ pomiarowy wykorzystywany do testu detekcji alfa-defensyn 93
3.4. Opracowanie procedury testu obecności alfa-defensyn na biosensorze 97
3.5. Zastosowanie biosensora do oceny ilościowej alfa-defensyn 101
3.5.1. Badania czułości metody dla różnych stężeń alfa-defensyn w buforze fosforanowym 101
3.5.2. Badania możliwości wykorzystania metody do wykrywania alfa-defensyn w płynie stawowym 102
3.5.3. Wyznaczenie krzywej kalibracyjnej testu AD-MEF, wykorzystywanej do oceny ilościowej alfa-defensyn w próbkach płynu stawowego 104
3.6. Testy AD-MEF i AD-LF obecności alfa-defensyn w płynie stawowym pobranym od pacjentów 105
4. Wyniki badań i dyskusja 109
4.1. Synteza nanowarstw srebra 109
4.1.1. Badania stabilności nanowarstw srebra w różnych warunkach otoczenia 109
4.1.2. Badania właściwości nanowarstwy srebra na powierzchni szkła 112

4.2. Określenie właściwości fizykochemicznych znaczników fluorescencyjnych związanych z badanymi białkami 118
4.2.1. Charakterystyka spektroskopowa badanych fluoroforów po związaniu z przeciwciałami 118
4.2.2. Badania wiązań alfa-defensyna - przeciwciało w roztworach 125
4.2.2.1. Charakterystyka spektralna wyznakowanych alfa-defensyn 125
4.2.2.2. Badania odziaływania przeciwciało – alfa-defensyna 126
4.2.2.3. Badanie dynamiki wiązań przeciwciało – alfa-defensyna 130
4.3. Opracowanie procedury testu obecności alfa-defensyn na biosensorze 134
4.4. Zastosowanie biosensora do oceny ilościowej alfa-defensyn 141
4.4.1. Badania czułości metody dla różnych stężeń alfa-defensyn w buforze fosforanowym 141
4.4.2. Badania możliwości wykorzystania metody do wykrywania alfa-defensyn w płynie stawowym 144
4.4.3. Wyznaczenie krzywej kalibracyjnej testu AD-MEF, wykorzystywanej do oceny ilościowej alfa-defensyn w próbkach płynu stawowego 147
4.5. Badanie obecności alfa-defensyny w płynie stawowym testami AD-MEF i AD-LF. Ocena wartości predykcyjnej testów 153
5. Wnioski 174
6. Bibliografia 176
7. Spis rysunków, wykresów i tabel 192
7.1. Spis rysunków 192
7.2. Spis wykresów 193
7.3. Spis tabel 195

Alfabetyczny spis skrótów

A/H1N1 - wirus grypy typu A (H1N1),
AD – alfa-defensyna,
AD594 - znacznik DyLight 594 związany z alfa-defensyną,
AD-ELISA - immunoenzymatyczny test medyczny „Synovasure Alpha Defensin ELISA Test", oparty na metodzie ELISA,
AD-LF - immunochromatograficzny test medyczny Synovasure Alpha Defensin Lateral Flow Test,
AD-MEF - test na obecność alfa-defensyn metodą wzmocnionej fluorescencji na powierzchni nanowarstwy srebra opracowany w pracy,
AgNP / AuNP - nanocząstki srebra / złota,
ALTR - niepożądany odczyn tkankowy (ang. adverse local tissue reactions),
anty-AD / anty-CRP – przeciwciała skierowane przeciwko alfa-defensynom / CRP,
AUC - pole powierzchni pod krzywą (ang. area under the curve),
BSA - albumina bydlęca (ang. bovine serum albumin),
CNS - gronkowce koagulazo-ujemne (ang. coagulase-negative staphylococci),
CRP - białko C-reaktywne (ang. C-Reactive Protein),
CTAB - bromek heksadecylotrimetyloamoniowy,
DMSO - dimetylosulfotlenek,
EBJIS - Europejskie Towarzystwo Zakażeń Kości i Stawów (ang. European Bone and Joint Infection Society),
ELISA - test immunoenzymatyczny (ang. enzyme-linked immunosorbent assay),
EPR - efekt zwiększonej przepuszczalności i retencji (ang. enhanced permeation and retention effect),
EPS - zewnątrzkomórkowe substancje polimeryczne (ang. extracellular polymeric substances),
FDA - Agencja Żywności i Leków Stanów Zjednoczonych Ameryki Północnej (ang. Food and Drug Administration),
FRET - zjawisko bezpromienistego rezonansowego transferu energii (ang. Förster resonance energy transfer),
HNP - peptydy ludzkich neutrofili (ang. human neutrophil peptides),
HPIV - wirus paragrypy (ang. human parainfluenza virus),
HSV - wirus opryszczki zwykłej (ang. herpes simplex virus),
ICM 2018 - International Consensus Meeting, konsensus międzynarodowej grupy ekspertów w diagnostyce zakażeń okołoprotezowych, wydane w 2018 r. (Shahi, Kheir i in., 2017), polski przekład opublikowany w 2021 r. (Parvizi i Gehrke, 2021),
IDSA - Amerykańskie Towarzystwo Chorób Zakaźnych (ang. Infectious Diseases Society of America),
IgG488 - znacznik DyLight 488 związany z przeciwciałem skierowanym przeciwko alfa-defensynom,
IgG594 - znacznik DyLight 594 związany z przeciwciałem skierowanym przeciwko alfa-defensynom,

IgG650 - znacznik DyLight 650 związany z przeciwciałem skierowanym przeciwko alfa-defensynom,
LSPR - zjawisko zlokalizowanego powierzchniowego rezonansu plazmonowego (ang. localized surface plasmon resonance),
MALDI-TOF MS - metoda spektrometrii mas z desorpcją/jonizacją laserową i analizą czasu przelotu (ang. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry),
MEF - wzmocniona fluorescencja na powierzchni metalu (ang. metal enhanced fluorescence),
MSIS - MusculoSkeletal Infection Society, rekomendacje stowarzyszenia w diagnostyce zakażeń okołoprotezowych,
msLFIA - multipleksowy test immunochromatograficzny (ang. multi-target lateral flow immunoassay strip),
NADH - dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy,
NFZ - Narodowy Fundusz Zdrowia,
NLR - stosunek neutrofili do limfocytów w surowicy (ang. neutrophil to lymphocyte ratio),
NP - nanocząstki (ang. Nanoparticle),
NPV - ujemna wartość predykcyjna (ang. negative predictive value),
OB - odczyn Biernackiego,
OECD - Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (ang. Organization for Economic Co-operation and Development),
PBS - bufor fosforanowy (ang. phosphate buffered saline),
PCV - polichlorek winylu,
PEG - glikol polietylenowy (ang. poliethylene glycol),
PEI - polieteroimid,
PJI - zakażenie okołoprotezowe (ang. periprosthetic joint infection),
PMN% - odsetek granulocytów wielojądrzastych (ang. polymorphonuclear leukocytes),
PPV - dodatnia wartość predykcyjna (ang. positive predictive value),
PVP - poliwinylopirolidon,
RDE - teoria inżynierii przejść promienistych (ang. radiative decay engineering),
SERS - wzmacniana powierzchniowo spektroskopia Ramana (ang. Surface Enhanced Raman Spectroscopy),
SIF - nanowyspy srebra na powierzaniach (ang. silver island fillms),
TIR - zjawisko całkowitego wewnętrznego odbicia (ang. Total Internal Reflection),
TIRFM - mikroskopia fluorescencyjna całkowitego wewnętrznego odbicia (ang. Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy),
TMB - tetrametylobenzydyną,
TIRF - fluorescencja wykorzystująca zjawisko całkowitego wewnętrznego odbicia (ang. Total Internal Reflection Fluorescence),
WBC - liczba białych krwinek (ang. white blood cell count),
WZW-B - wirusowe zapalenie wątroby typu B.

Streszczenie

Zakażenia okołoprotezowe (PJI) stanowią jedno z najpoważniejszych powikłań po alloplastyce dużych stawów. Mimo że odsetek przypadków septycznych, w porównaniu do ogólnej liczby tych zabiegów jest stosunkowo niski, to problem dotyczy coraz większej grupy osób starszych, cierpiących na dysfunkcje stawów, które utrudniają normalne funkcjonowanie. W konsekwencji rośnie liczba zabiegów endoprotezoplastyki i związanych z nimi powikłań. Wyniki badań laboratoryjnych, pomimo ustalonych standardów diagnostyki zakażeń okołoprotezowych są często niejednoznaczne. Z uwagi na trudności w izolacji patogenów, diagnoza opiera się na markerach stanów zapalnych. Jednym z najnowszych biomarkerów stosowanych w diagnostyce PJI jest alfa-defensyna, której obecność w płynie stawowym powiązano z naturalną odpowiedzią organizmu na infekcję. Ograniczaniem w powszechnym oznaczaniu alfa-defensyny jest dostęp do dwóch komercyjnych testów. W pracy zaproponowano nową metodę oznaczana alfa-defensyn w płynie stawowym, opartą na immunosensorze, umożliwiającym detekcję peptydów z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał wychwytujących i potwierdzających, wyznakowanych różnymi fluoroforami. W ramach badań dobrano znaczniki, które po związaniu z białkami scharakteryzowano spektroskopowo pod kątem wykorzystania zjawiska bezpromienistego transferu energii. Dzięki immobilizacji znakowanych przeciwciał na powierzchni sensora pokrytego nanowyspami srebra stworzono efektywny biosensor, umożliwiający detekcję we wzmocnionej fluorescencji. Opracowany układ pomiarowy oparty na prostej konstrukcji umożliwia selektywne wzbudzenie i rejestrację emisji fluorescencji, potwierdzającej obecność antygenu. Badania wykazały możliwość detekcji alfa-defensyn w szerokim zakresie stężeń. Walidacja testu na próbkach płynu pobranego od pacjentów z podejrzeniem PJI wskazała równoważność opracowanego testu z medycznym testem immunochromatograficznym, a ocena kliniczna występowania infekcji w badanej grupie pacjentów, potwierdziła wysoką czułość zaproponowanego testu w predykcji PJI.

Słowa kluczowe: fluorescencja, biosensor, alfa-defensyny, zakażenia okołoprotezowe

Summary

Periprosthetic joint infections (PJI) is one of the most serious complications after toral joint arthroplasty. Although the percentage of septic cases relative to the overall number of these procedures is relatively low, the issue affects an increasing number of elderly individuals suffering from joint dysfunction, which hinders normal functioning. Consequently, the number of arthroplasty procedures and related complications is on the rise. Despite established standards for the diagnosis of periprosthetic joint infections, laboratory test results are often inconclusive. Due to difficulties in isolating pathogens, diagnosis relies on inflammatory markers. One of the newest biomarkers used in PJI diagnostics is alpha-defensin, whose presence in synovial fluid has been linked to the body's natural response to infection. However, the widespread use of alpha-defensin testing is limited by the availability of only two commercial tests. This study proposes a new method for detecting alpha-defensin in synovial fluid, based on an immunosensor that enables peptide detection using specific capture and confirmation antibodies, labeled with different fluorophores. The study involved selecting markers, which, after binding to proteins, were spectroscopically characterized with respect to their use in the phenomenon of Förster resonance energy transfer (FRET). By immobilizing the labeled antibodies on the surface of a sensor coated with silver island films, an efficient biosensor was created, allowing detection through enhanced fluorescence. The developed measurement system, based on a simple design, enables selective excitation and fluorescence emission detection to confirm antigen presence. The studies demonstrated the possibility of detecting alpha-defensin over a wide range of concentrations. Validation of the test on fluid samples from patients with suspected PJI showed equivalence of the developed test with the commercial immunochromatographic test. Clinical evaluation of infection occurrence in the studied patient group confirmed the high sensitivity of the proposed test in predicting PJI.

Keywords: fluorescence, biosensor, alpha-defensin, periprosthetic joint infections

1. Wstęp

Zakażenie okołoprotezowe jest jednym z najczęstszych powikłań po zabiegach endoprotezoplastyki stawu biodrowego oraz kolanowego i jednocześnie najtrudniejszym w diagnostyce i leczeniu. Pomimo braku danych na temat liczby przypadków septycznych w Polsce, zgodnie z piśmiennictwem światowym szacowana ilość powikłań, spowodowanych infekcjami stanowi od 1 do 4% wszystkich wykonanych zabiegów (Izakovicova i in., 2019). Zakażenie okołoprotezowe odpowiada za 15% niepowodzeń endoprotezoplastyki stawu biodrowego (Bozic, Kurtz, Lau, Ong, Vail i Berry, 2009) i 25% stawu kolanowego (Bozic, Kurtz, Lau, Ong, Chiu i in., 2009). Ilość zabiegów z roku na rok rośnie. W 2022 roku ze środków NFZ sfinansowano wykonanie ponad 100 tysięcy operacji tego typu, notując przyrost rok do roku o około 20% (NFZ, 2024). Wraz ze wzrostem ilości zabiegów, rośnie ilość powikłań, które z kolei wymagają kompleksowego postępowania medycznego i chirurgicznego. Leczenie często prowadzi do wymiany endoprotezy, co wiąże się ze znacznymi kosztami, obciążeniem dla pacjenta i systemu opieki zdrowotnej. Wczesne wykrycie infekcji umożliwia podjęcie właściwego leczenia, które daje szansę na zachowanie implantu. Warunkiem do tego jest przeprowadzenie szybkiej i jednoznacznej diagnostyki. Standardowe badania laboratoryjne, często nie pozwalają na postawienie właściwej diagnozy, z uwagi na specyficzne dla tego zakażenia, tworzenie się biofilmu bakteryjnego na powierzchni implantu. Utrudnia on izolację i identyfikację patogenu, a w konsekwencji, uniemożliwia stwierdzenie infekcji. Z tego powodu badania naukowe skupiły się na poszukiwaniu niezawodnych biomarkerów zakażeń okołoprotezowych. Najnowsze międzynarodowe zalecenia, dotyczące standardów diagnostyki zakażeń okołoprotezowych (Parvizi i Gehrke, 2021; McNally i in., 2021), włączyły w panel zalecanych badań testy nowego biomarkera, alfa-defensyny. Ekspresja tego peptydu jest specyficzną odpowiedzią neutrofili na infekcyjne stany zapalne stawów. Obecność alfa-defensyn w płynie stawowym została skorelowana z występowaniem infekcji okołoprotezowych, a liczne badania wskazały na wysoką zdolność predykcyjną tego markera w procesie diagnostyki. Problemem jest mała ilość testów wykonywanych rutynowo w szpitalach (Schindler i in., 2023). Związane jest to z pewnymi ograniczeniami, finansowymi lub technicznymi w dostępności do testów na obecność alfa-defensyn w płynie stawowym. Obecnie na rynku są dwa komercyjne, medyczne

testy, wytwarzane przez jednego producenta. Oba oparte są na detekcji alfa-defensyn w relacji antygen-przeciwciało. Pierwszy wykorzystujący metodę ELISA wymaga wysłania próbki do certyfikowanego laboratorium poza granicę Polski. Drugi, szybki test immunochromatograficzny, umożliwia wykonanie diagnostyki na miejscu, jednak jego powszechne zastosowanie jest znacząco ograniczone ze względu na wysokie koszty pojedynczej analizy.

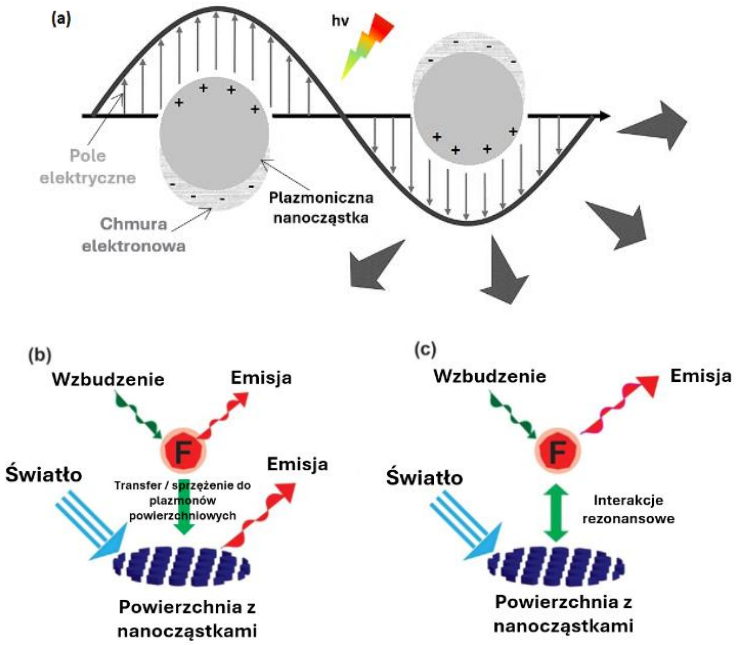
Z uwagi na potrzebę stworzenia czułego i dostępniejszego testu na obecność alfa-defensyn, rozpatrywano możliwość wykorzystania w tym celu immunosensora, opartego na relacji antygen (alfa-defensyna) – przeciwciało (wyznakowane fluoroforem). Słuszność metody detekcji opartej na fluorescencji potwierdza fakt, że jest ona wielokrotnie czulsza niż metody absorpcyjne (Gryczyński i Gryczyński, 2019). Dodatkowo w wielu badaniach aplikacyjnych, pokazano możliwość użycia nanocząstek metali szlachetnych do tworzenia czułych biosensorów w testach diagnostycznych. (Aslan, Gryczyński i in., 2005; X. Wang i in., 2010; Z. Chen i in., 2012). Ze względu na wyjątkowe właściwości optyczne nanocząstek, można przewidywać, że umieszczenie ich warstwy na biosensorze będzie skutkowało zwiększeniem sygnału detekcji, poprzez krótkozasięgowe oddziaływania pomiędzy znacznikiem a nanocząstkami metalu, w zjawisku wzmocnionej fluorescencji. Badania wykazały, że układy o takich konstrukcjach mogą skutecznie i selektywnie wychwytywać antygeny z bardzo zróżnicowanych próbek biologicznych, zachowując wysoką czułość detekcji, nawet przy bardzo małych stężeniach biomarkerów (Malicka i in., 2003; Aslan, Gryczyński i in., 2005; Aslan, Wu i in., 2007).

1.1. Zjawisko wzmocnionej fluorescencji na powierzchni nanocząstek metalu

Wzmocniona fluorescencja na powierzchni metalu MEF (ang. metal enhanced fluorescence), po raz pierwszy została opisana w latach 70. XX wieku, zaadaptowana później jako technologia detekcji, a w ostatnich latach doceniona ze względu na pojawienie się nanostruktur plazmonicznych. Za nanocząstki uznaje się struktury, których przynajmniej jeden wymiar wynosi między 1 nm a 100 nm. Dostępność nanocząstek metali w stosowaniach MEF, pozwoliło na zwiększenie czułości i poprawę selektywności detekcji fluoroforów. Badania te były wcześniej ograniczone z uwagi na różne wydajności kwantowe czy fotostabilność znaczników, jak również właściwości autofluorescencyjne samych badanych próbek (Aslan, Gryczyński i in., 2005).

Za występowanie wzmocnionej fluorescencji na powierzchni metalu (MEF) odpowiadają głównie zjawiska zlokalizowanego powierzchniowego rezonansu plazmonowego (LSPR, ang. localized surface plasmon resonance), sprzężenie plazmonowe oraz mechanizmy opisane w teorii inżynierii przejść promienistych (RDE, ang. radiative decay engineering), (Jeong i in., 2018). Są to główne, najczęściej opisywane zjawiska wyjaśniające MEF, jednak dokładne mechanizmy, nadal są przedmiotem debaty, w wielu pracach doświadczalnych.

Zjawisko LSPR związane jest z oddziaływaniem światła o określonej częstotliwości z oscylującymi elektronami (plazmonami), na powierzchni nanocząstek metalu. W wyniku tego oddziaływania dochodzi do kolektywnej oscylacji elektronów i zjawiska rezonansowego wzbudzenia chmury elektronowej. Zjawisko jest konsekwencją ograniczenia pola elektrycznego wokół nanometrowej metalowej kuli, której promień jest mniejszym od długości fali padającego światła (Louis i Pluchery, 2012). Na powierzchni powstaje silne, lokalne pole elektromagnetyczne, które w sąsiedztwie fluoroforu wpływa na jego optyczne właściwości, prowadząc do wyższej intensywności emisji (Rysunek 1a). Wykazano, że silniejsze pole elektryczne jest rejestrowane wokół nanostruktur o ostrych krawędziach i rogach, co bezpośrednio wpływa na poziom wzmocnienia fluorescencji znacznika w pobliżu nanocząstki metalu (M. Zheng i in., 2015).



Rysunek 1. Mechanizmy fluorescencji wzmacnianej przez metal: (a) zlokalizowanego powierzchniowego rezonansu plazmonowego (LSPR) na nanocząstkach metalicznych, (b) efekt sprzężenia plazmonów wynikający z oddziaływań bezpromienistych, (c) zjawisko mechanizmów przejść promienistych, Opracowane na podstawie (Jeong i in., 2018)

Zjawisko LSPR można opisać, definiując przekrój absorpcji i rozpraszania nanocząstki metalu. Suma tych przekrojów, zwana przekrojem tłumienia lub absorpcji, oznacza efektywność nanocząstki do wychwytywania fotonów (Mulvaney, 1996; Rycenga i in., 2011):

$$C_{ext} = \frac{24\pi^2 \cdot R^2 \cdot \varepsilon_m^{3/2}}{\lambda} \left[\frac{\varepsilon_i}{(\varepsilon_r + 2\varepsilon_m)^2 + \varepsilon_i^2} \right] \quad (1)$$

gdzie C_{ext} – przekrój tłumienia nanocząstki
R- promień
ε_m – względna przenikalność dielektryczna ośrodka otaczającego nanocząstkę
ε_r, ε_i – funkcja dielektryczna rzeczywista i urojona nanocząstki
λ – długość fali

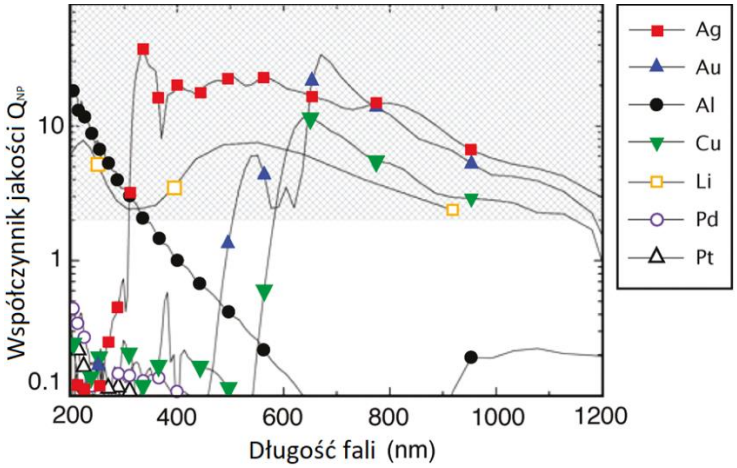
Zdolność nanocząstki metalu do tworzenia plazmonu powierzchniowego zależy w dużym stopniu od jej przenikalności dielektrycznej ε, składającej się z części rzeczywistej (ε_r) i urojonej (ε_i), z których obie zmieniają się w zależności od długości fali wzbudzenia (λ). Gdy mianownik wyrażenia w nawiasie kwadratowym, równania (1) zbliża się do zera, przekrój jest bardzo duży, przy silnej absorpcji i rozpraszaniu dla określonej częstotliwości. Jest to warunek wystąpienia zjawiska rezonansu, dla którego ε_r powinna wynosić około $-2\varepsilon_m$, natomiast ε_i być bliskie zeru. Warunki te są niemożliwe do spełnienia dla typowych dielektryków i są osiągalne tylko dla niektórych metali.

Innym istotnym parametrem charakteryzującym nanocząstki w zastosowaniach plazmonicznych jest siła (lub tłumienie) plazmonów powierzchniowych, opisywana za pomocą współczynnika jakości Q_{NP} (Le Ru i Etchegoin, 2009):

$$Q_{NP} = \frac{\omega \cdot (d\varepsilon_r/d\omega)}{2\varepsilon_i^2} \quad (2)$$

gdzie ω – częstotliwość fali światła

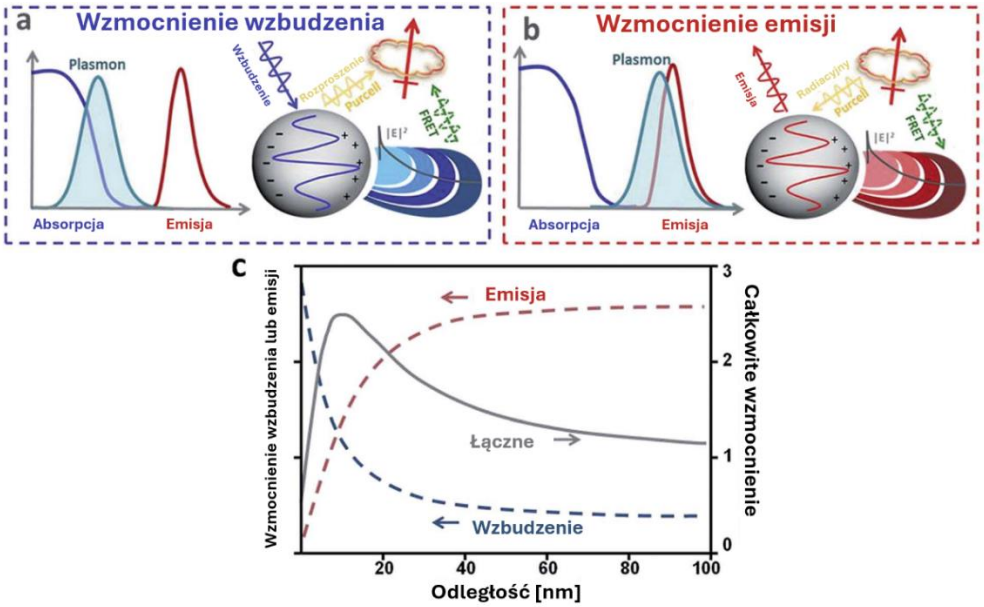
Duże wartości współczynnika Q_{NP} oznaczają zdolność do wytwarzania silnych plazmonów powierzchniowych. Z tego powodu współczynnik ten dla nanocząstek w zastosowaniach plazmonicznych powinien być większy niż 10 w dobranych zakresach długości fal (Rysunek. 2).



Rysunek 2 Wartości współczynnika jakości nanocząstek metali na powierzchni styku metalu z powietrzem (Ag- srebro, Au- złoto, Al- aluminium, Cu-miedź, Li- lit, Pd-pallad, Pt- platyna). Opracowane na podstawie (Mulvaney, 1996; Rycenga i in., 2011).

Na MEF ma wpływ nie tylko silne pole elektromagnetyczne wokół metalu, ale również charakterystyka spektralna nanocząstek i fluoroforu (m.in. absorpcja, emisja czy zdolność rozpraszania). Dlatego drugim istotnym zjawiskiem związanym z MEF jest sprzężenie plazmonowe, wynikające z bezpromienistego oddziaływania między fluoroforem i plazmonem. Wzmocnienie fluorescencji jest konsekwencją nakładania się widm plazmonów z widem absorpcji znacznika. W zależności od stopnia ich nakładania inne zjawisko będzie odpowiadało za transfer energii. Przy małych odległościach między obiektami (ok. 10 nm), dominuje proces transferu energii przez cząsteczki w zjawisku bezpromienistego rezonansowego transferu energii FRET, ang. Förster resonance energy transfer, (Demir i in., 2017). Z tego powodu zbyt mała odległość pomiędzy donorem i akceptorem spowoduje wygaszenie fluorescencji z uwagi na bezpromienisty transfer energii z fluoroforu do nanocząstki metalu (Knoblauch i

Geddes, 2019). Przy większych odległościach, tj. między 10 a 50 nm, wzmocnienia emisji jest tłumaczone efektem Purcella, związanym ze zmianą gęstości stanów wokół emitera w obecności nanocząstki metalu. Efekt ten może prowadzić do większego prawdopodobieństwa przejść emisyjnych fluoroforu i wzmocnienia sygnały fluorescencji. Jak pokazano na Rysunek 3a, 3b, gdy widmo plazmonu pokrywa się z absorpcją fluoroforu, możliwe jest wzmocnienie wzbudzenia, natomiast gdy pik plazmonu nakłada się na emisję znacznika, możliwe jest wzmocnienie emisji. Oba te procesy silnie zależą od odległości (Rysunek 3c).



Rysunek 3. Schemat przedstawiający procesy w MEF. (a) – gdy plazmon pokrywa się z absorpcją fluoroforu, możliwe jest wzmocnienie wzbudzenia poprzez oddziaływania w bliskim polu, FRET lub rozpraszanie, (b) Jeśli plazmon pokrywa się z emisją fluoroforu, możliwe jest wzmocnienie emisji poprzez efekt Purcella lub FRET. (c) - wzmocnienie wzbudzenia (niebieska linia) znacząco spada wraz z odległością, podczas gdy wzmocnienie emisji (czerwona linia) jest wygaszane przy małych odległościach, by następnie szybko rosnąć. Łączne wzmocnienie fotoluminescencji, równe iloczynowi wzmocnieniu emisji i wzbudzenia, osiąga szczyt w zakresie 10–30 nm. Opracowane na podstawie (M. Li i in., 2015).

Trzecie zjawisko wpływające na występowanie MEF związane jest z tzw. inżynierią procesów promienistych (RDE), w której poprzez zmianę szybkości przejść promienistych i bezpromienistych oraz gęstości stanów wokół fluoroforu, można kontrolować wzmocnienie emisji (Ray i in., 2008). Szybkość przejść promienistych (szybkość emisji fluorescencji) wzrasta w obecności nanocząstek metalu, prowadząc do zmniejszania czasów życia fluoroforu. Związane jest to z mechanizmem powrotu ze stanu wzbudzonego do stanu podstawowego. Fluorofory w małej odległości od powierzchni nanocząstek metalu są poddane większej liczbie cykli wzbudzenia i emisji,

zanim zmieni się ich wydajność kwantowa i upłynie czas życia fluorescencji. Dlatego w zjawisku MEF efekt ten będzie powodował zwiększenie jasności i wydajności kwantowej fluoroforu, jednocześnie zmniejszając jego czas życia. Bliskie odległości między obiektami ułatwiają bezpromienisty transfer energii z nanocząstek do fluoroforów, umożliwiając ich wzbudzanie. Wzbudzone fluorofory mogą przekazywać swoją energię do plazmonów powierzchniowych, co skutkuje zwiększoną szybkością zaniku i intensywnością emisji z układu metal-fluorofor. Poprawia to zarówno intensywność fluorescencji, jak i fotostabilność cząsteczki lub fluoroforu, z uwagi na krótszy czas w stanie wzbudzonym. W związku z tym interakcja między fluoroforem a nanocząstkami metalu może prowadzić do wygaszania fluorescencji lub jej wzmocnienia, w zależności od wielu parametrów. Na szybkość przejść promienistych i bezpromienistych fluoroforów można wpływać poprzez precyzyjny dobór struktur metalicznych, odpowiednie nałożenie widm plazmonów z pasmem emisji znacznika oraz poprzez kontrolę odległości między obiektami. Trudno jest osiągnąć jedynie zwiększenie emisji ze względu na fakt, że plazmony powierzchniowe mają szerszy zakres rozpraszania i absorpcji w porównaniu z fluoroforami.

Uogólniając omawiane zjawiska, można przyjąć, że wygaszanie dominuje przy separacji rzędu kilku nanometrów, które przechodzi w duże wzmocnienie (10–1000 razy) w zakresie od 10 do 50 nm. W dalszej kolejności następuje zwrot w stronę normalnej emisji fluorescencji, w miarę dalszego zwiększania się odległości między nanostrukturami. Ocenia się, że optymalną dla uzyskania wzmocnienia, odległością między fluoroforem a powierzchnią nanocząstek metalu jest przedział między 5 a 90 nm, przy założeniu, że średnice nanocząstek będą dużo mniejsze niż długość fali światła wzbudzającego (Louis i Pluchery, 2017). Wynika to ze złożoności interakcji między fluoroforami a powierzchnią metalu, w efekcie których z jednej strony dochodzi do wzrostu intensywności fluorescencji, poprawy fotostabilności z uwagi na krótsze czasy życia, zwiększenia wydajności kwantowej, oraz zmniejszenia poziomu tła sygnału, a z drugiej strony pogarsza się trwałości analitu (Lakowicz, 2006). Z tego powodu konieczne jest zachowanie równowagi w doborze warunków w celu uzyskania oczekiwanego efektu wzmocnienia fluorescencji i selektywność detekcji.

1.2. Charakterystyka nanocząstek srebra w zastosowaniach plazmonicznych

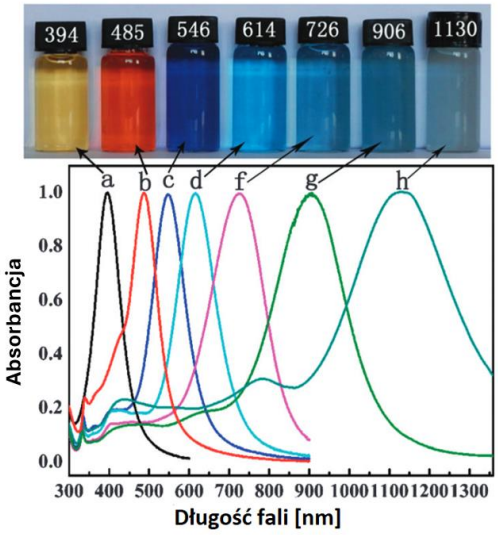
Nanocząstki wykorzystywane do zastosowań plazmonicznych, w tym MEF, syntetyzowane są z metali szlachetnych jak: złoto, srebro platyna, tytan, jak również z miedzi, aluminium czy kobaltu. Dobór materiału w istotny sposób wpływa na intensywność wzmocnienia fluorescencji, fotostabilność czy odporność fluoroforów na fotodegradację. Nanocząstki srebra (AgNP) i złota (AuNP) są powszechnie stosowane do wzmacniania fluorescencji z uwagi na wysoki współczynnik jakości Q_{NP} (Rysunek 2) oraz szeroki zakres długości fali światła od widzialnego do bliskiej podczerwieni, pozwalający na uzyskanie pożądanego rezonansu plazmonowego (Rysunek 4). Platyna i pallad charakteryzują się niskim współczynnikiem jakości i wysokim tłumieniem plazmonów powierzchniowych, co znacząco ogranicza ich stosowanie w MEF (Tittl i in., 2011). Lit natomiast pomimo cech sprzyjających tworzeniu się plazmonów powierzchniowych jest rzadko stosowany z uwagi na wysoką reaktywność i skomplikowaną syntezę (Rycenga i in., 2011). Niestabilność i toksyczność nanostruktur miedzi to również dwa główne problemy dla upowszechnienia stosowania tego metalu w zastosowaniach bioinżynieryjnych. Nie bez znaczenia w wyborze nanocząstek do zastosowań aplikacyjnych, ma również fakt, że srebro charakteryzuje się najwyższą przewodnością cieplną i elektryczną ze wszystkich metali oraz jest najtańszym metalem szlachetnym.

1.2.1. Morfologia nanocząstek srebra

Zjawiska plazmoniczne w obecności AgNP mogą być modelowane poprzez zmianę: rozmiaru, kształtu, jednorodności, odległości między nanocząstkami czy sposobu pokrywania ich na powierzchni. Istotnym efektem zmniejszenia rozmiaru nanocząstki jest wzrost stosunku powierzchni do objętości, w porównaniu z atomami lub cząsteczkami tego samego materiału, co znalazło istotne zastosowania w medycynie (Ullah Khan i in., 2018).

Rozmiary nanocząstek (NP) wpływają na stosunek rozpraszania do absorpcji światła oraz zakres występowania plazmonów powierzchniowych, charakteryzowanych przez ilość pasm LSPR, ich pozycję czy wielkość (Wiley i in., 2006). Gdy promień nanocząstki (R) jest znacznie mniejszy niż długość fali światła, przekroje czynne na

rozpraszanie i absorpcję są proporcjonalne odpowiednio do R^6 i R^3. W efekcie dla małych cząstek (R < 30 nm) absorpcja dominuje nad rozpraszaniem. Z drugiej strony, większe NP mogą bardziej efektywnie rozpraszać światło, co nie jest bez znaczenia z uwagi na fakt, że sygnał rozpraszania z AgNP o rozmiarze 50 nm jest równoważny intensywności emisji z około 10^6 fluoroforów (Yguerabide i Yguerabide, 1998). Ogólnie w małych NP występują tylko wzbudzenia dipolowe, podczas gdy w większych cząstek możliwe są zarówno dipolowe, jak i kwadrupolowe. To powoduje, że dla sfery AgNP o średnicy ok. 30 nm obserwowany będzie tylko jeden silny pik LSPR, podczas gdy tą samą nanocząstkę o średnicy 60 nm charakteryzują dwa pasma LSPR (K. L. Kelly i in., 2003). W praktyce wykazano, że związek między pozycją piku LSPR a długością krawędzi nanokostek jest mniej więcej liniowy, co pozwala łatwo monitorować i kontrolować rozmiar AgNP podczas syntez (Skrabalak i in., 2007). Wzrost rozmiaru nanocząstek, jak również ich agregacja, powodują przesunięcia pasma LSPR w kierunku wyższych długości fali. Wynika to z faktu, że wraz ze wzrostem rozmiaru, zwiększa się separacja ładunków na nanokuli, prowadząc do niższej częstotliwości kolektywnej oscylacji elektronów, a tym samym do przesunięcia pasma w kierunku czerwieni (Loiseau i in., 2019).

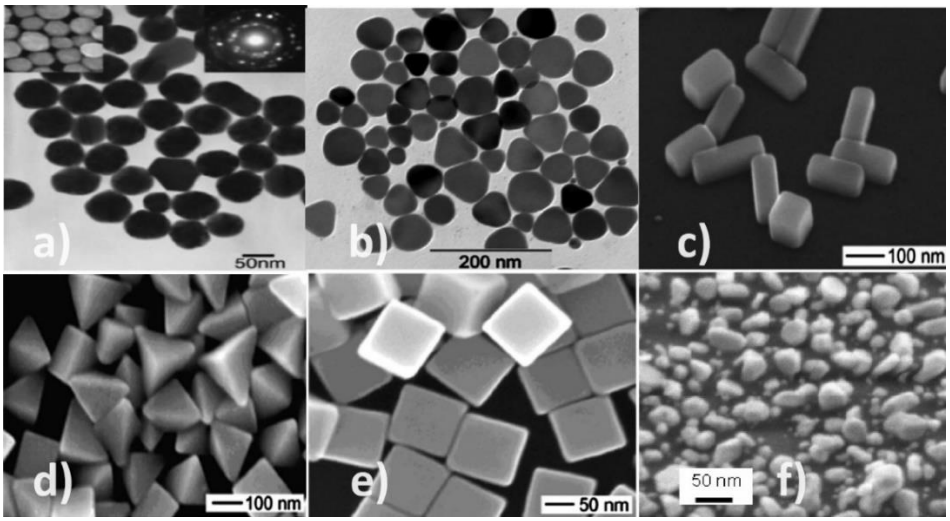


Rysunek 4. Widma absorpcji nanocząstek srebra (a) oraz koloidów nanopłytek srebra (b-h). Wartości u góry odpowiadają długości fali pozycji piku LSPR. Opracowane na podstawie (Tan i in., 2013).

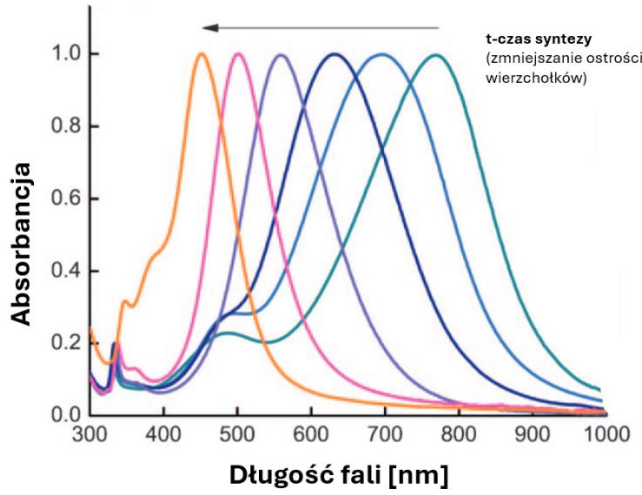
Kształt nanocząstek jest kolejnym istotnym czynnikiem wpływającym na ich właściwości plazmoniczne i spektralne. Od momentu, gdy sferyczne nanocząstki i metaliczne nanowyspy zaczęto powszechnie stosować do tworzenia powierzchni wzmacniających fluorescencję, pojawiły się badania aplikacyjne nad wykorzystaniem

ich w obrazowaniu biologicznym, czy projektowaniu różnych sensorów (Szmaciński i in., 2013). Konsekwencją tego były kolejne doświadczenia, skupiające się na opracowaniu nowych metody syntezy nanocząstek. Miały one na celu optymalizację charakterystyki spektralnej w zakresie zwiększenia wzmocnienia i wydajności MEF. W ten sposób, wykorzystując różne materiały, opracowano nanocząstki o kształtach nanopryzmatów, nanoszcześcianów, piramid, nanodrutów czy nanotrójkątów. Zdjęcia mikroskopowe przykładowych AgNP o różnych kształtach przedstawiono na Rysunku 5, w tym wykorzystywane w rozprawie doktorskiej nanowyspy srebra (Rysunek 5 f). Anizotropowe struktury, ze względu na swoje ostrzejsze krawędzie i wierzchołki, powodują powstawanie silniejszych lokalnych efektów LSPR, w tym lokalnego pola elektromagnetycznego (Sugawa i in., 2015). Można to zaobserwować w narożnikach lub sferoidach AgNP, gdzie skoncentrowane światło w nanometrowych objętościach, prowadzi do znaczącego zwiększenia intensywności lokalnego pola elektromagnetycznego, nawet 1000 razy silniejszego niż dla struktur sferycznych (Huang i in., 2010). Cechy strukturalne takich NP pozwalają na dostrajanie charakterystyki LSPR w szerokim zakresie długości fal światła, poprzez zmianę stosunku ich wymiarów. Na Rysunku 6 pokazano eksperymentalne widma LSPR, dla trójkątnych AgNP, których ostre krawędzie były redukowane, poprzez wydłużanie czasu syntezy (Zeng i in., 2010). Pozycja szczytu podstawowego pasma LSPR przesuwa się znacząco od 800 do 400 nm podczas skracania narożników nanotrójkątów. Zmiany kształtu NP mogą wpływać na zwiększenie współczynnika wzmocnienia efektu MEF (Badshah i in., 2018), definiowanego jako stosunek intensywności fluorescencji na powierzchni pokrytej NP do sygnału na powierzchni szkła, rejestrowanych w tych samych warunkach eksperymentalnych i określonej długości fali. Anizotropowe NP umożliwiają uzyskanie znaczącego, ponad stukrotnego wzmocnienia fluorescencji w ich pobliżu, co daje im duży potencjał aplikacyjny w tworzeniu czułych biosensorów MEF (Geddes i in., 2003).

Chociaż kształt i rozmiar nanocząstek można łatwo kontrolować w procesach syntezy, które zostaną omówione w dalszej części pracy, to już kontrola odległości między NP stanowi duże wyzwanie. Gdy nanostruktury zbliżają się do siebie, ich właściwości plazmoniczne mogą ulec znacznym zmianom, które są efektem silnego sprzężenia pomiędzy plazmonami powierzchniowymi NP podczas wzbudzenia.



Rysunek 5. Przykładowe zdjęcia wykonane techniką elektronowej mikroskopii emisyjnej i skaningowej mikroskopii elektronowej nanocząstek srebra o różnych kształtach: a) nanosfery, b) nanopryzmaty, c) nanopręty, d) piramidy, e) nanosześciany, f) nanowyspy srebra SIF (ang. silver island films). Opracowane na podstawie (Fu i in., 2010; Khodashenas i Ghorbani, 2019).



Rysunek 6. Widma absorpcji trójkątnych AgNP w roztworach po syntezie redukującej ostrość ich wierzchołków. Opracowane na podstawie (Zeng i in., 2010).

Przy małych odległościach między NP, interakcja ta prowadzi do powstania plazmonów szczelinowych (Nordlander i in., 2004). Powoduje to skoncentrowanie pola elektrycznego w szczelinie, co skutkuje jego silnym zlokalizowaniem i wzmocnieniem, określanym powszechnie jako „gorące punkty” (ang. hot-spot). Jest ono bardzo czułe na szerokość szczeliny i zazwyczaj największe, gdy struktury są niezwykle blisko siebie (~1 nm). Istnieje również bezpośrednia korelacja między obszarem „gorących punktów”, a jego wzmocnieniem. Obszary z najwyższym wzmocnieniem, występują bowiem na powierzchni niemal tak dużej, jak poszczególne molekuły (Dieringer i in.,

2007). Zjawisko szczelinowych plazmonów jest widoczne w przesunięciu pasma LSPR w kierunku długofalowym, w stosunku do pasma pojedynczej nanokuli. Zakres przesunięcia maleje w miarę zwiększania szerokości szczeliny, między krawędziami NP i zanika przy większych odległościach ~10 nm (Funston i in., 2009). Występowanie takich lokalnych wzmocnień może zmieniać właściwości emisji światła fluoroforów, zwiększając szybkość absorpcji optycznej i intensywność fotoluminescencji (Bakker i in., 2008).

1.2.2. Syntezy nanocząstek srebra

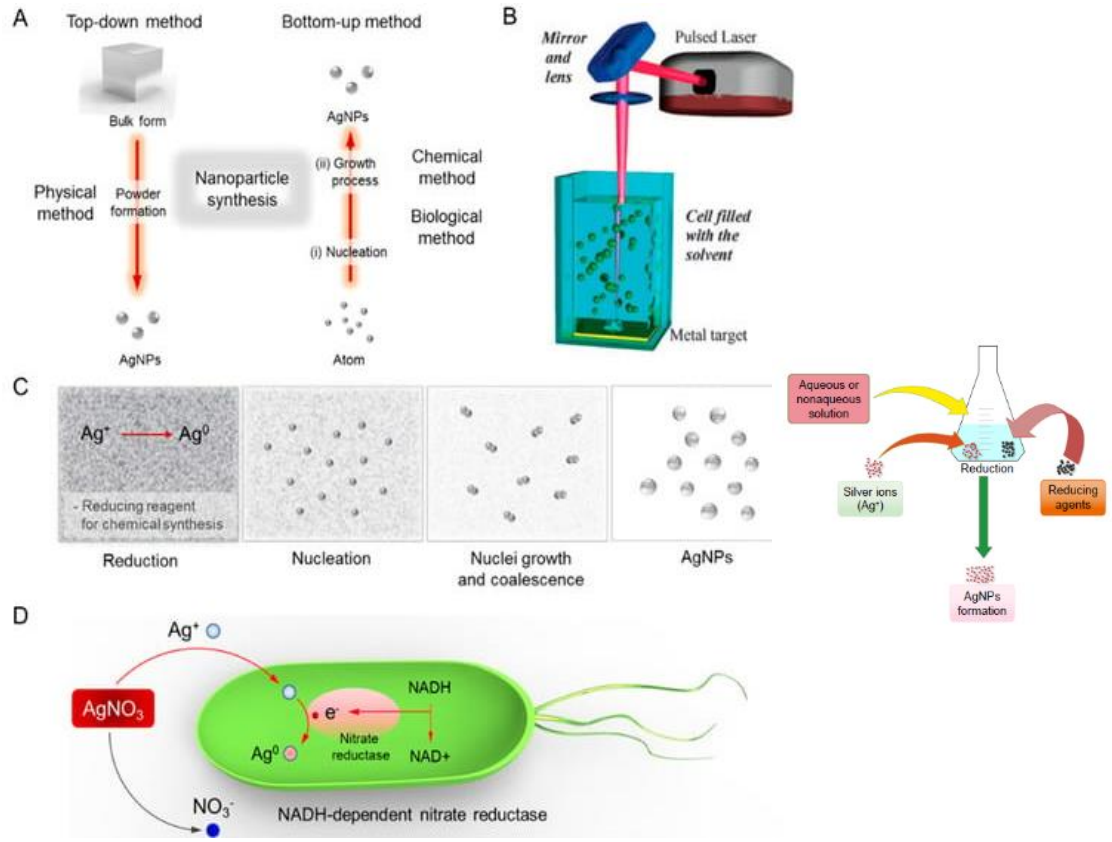
Nanocząstki srebra syntetyzuje się, stosując dwie strategie, określane jako „z góry do dołu" (ang. top – down), np. poprzez zmniejszanie wymiarów oraz „z dołu do góry" (ang. bottom-up), poprzez otrzymywanie większych rozmiarów łącząc ze sobą atomy lub cząsteczki. Natomiast metody syntez AgNP dzieli się na: fizyczne, chemiczne i biologiczne tzw. zielonej syntezy (Rysunek 7 A). W zależności od oczekiwanego rozmiaru, kształtu, wydajności procesu czy bezpieczeństwa biologicznego, metody te można modyfikować, w celu osiągnięcia określonych właściwości AgNP.

1.2.2.1. Metody fizyczne

Pierwsza strategia „z góry do dołu" związana jest z fizyczną metodą otrzymywania nanocząstek. Polega na wyodrębnieniu grupy atomów z materiału nierozdrobnionego, przy użyciu sił fizycznych, na drodze mielenia, cięcia czy ścierania. W metodzie tej wykorzystuje się oprócz energii mechanicznej, również energię elektryczną (techniki wyładowań łukowych), świetlną (ablacji laserowej) oraz termiczną, w syntezie z wykorzystaniem kondensacji parowej (Ju-Nam i Lead, 2008). Podczas procesu mielenia, szybkie zderzenia pomiędzy twardymi ceramicznymi lub wykonanymi ze stali nierdzewnej kulkami, powodują wytworzenie wysokiego ciśnienia, które mieli metal do bardzo drobnych proszków, uzyskując NP (Khayati i Janghorban, 2012). W przypadku metody ablacji laserowej metalowy cel absorbuje energię wiązki laserowej o wysokiej mocy, po czym następuje nukleacja oraz wzrost cząstek metalicznych podczas procesu chłodzenia plazmowego, by ostatecznie zsyntezować nanocząsteczki srebra-Rysunek 7 B (Amendola i Meneghetti, 2009). W technice kondensacji parowej wyróżnia się dwa procesy: rozpylanie i parowanie. Rozpylanie polega na bombardowaniu materiału powłokowego wysoką energią

elektryczną, aby odparować atomy lub cząsteczki, które mogą zostać osadzone na podłożu. W procesie parowania materiał powłokowy zostaje podgrzewany do punktu wrzenia w warunkach próżniowych, a następnie odparowywany materiał unosi się w komorze próżniowej i kondensuje na podłożu.

Dzięki metodom fizycznym można uzyskać czyste, pozbawione dodatków chemicznych nanocząsteczki, o jednolitej dystrybucji rozmiarów (między 10 a 100 nm). Wydajność syntezy może być wysoka, pod warunkiem stosowania stabilizatorów, zapobiegających procesowi agregacji AgNP i tworzenia cząstek o dużych rozmiarach, co wpływa na ograniczenia w ich zastosowaniu. Niemniej jednak metody fizyczne są wysoko kosztochłonne i czasochłonne, wymagają skomplikowanego sprzętu i dużej ilości energii do przeprowadzenia syntezy. Ponadto trudno jest w nich kontrolować kształt i strukturę powierzchni uzyskiwanych nanocząstek.



Rysunek 7. Metody syntezy nanocząsteczek srebra (AgNP). (A) strategie „z góry do dołu-top down" i „z dołu do góry – bottom-up", (B) metoda syntezy fizycznej, (C) metoda syntezy chemicznej, (D) prawdopodobne mechanizmy zielonej syntezy. Opracowane na podstawie (Lee i Jun, 2019).

1.2.2.2. Metody chemiczne

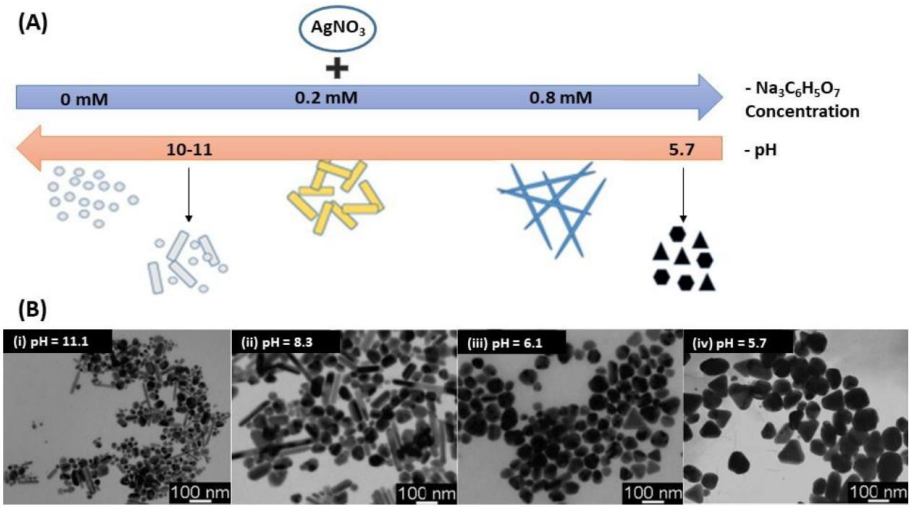
Strategia „z dołu do góry” polega na redukcji jonów srebra pochodzących z prekursora np. soli srebra $AgNO_3$, tworząc jądra, zarodki, które następnie ulegają wzrostowi do nanocząstek. Oprócz prekursora standardowymi reagentami w tej metodzie są: czynniki redukujące, opłaszczające (stabilizatory) i rozpuszczalniki.

Metoda chemiczna jest najczęściej stosowana do szybkiego uzyskiwania nanocząsteczek o różnych rozmiarach i kształtach jak nanokulki, nanopręty, nanodruty, nanokostki. Zmieniając warunki syntezy, w tym rodzaj czynnika redukującego, jego relację do prekursora, dodając czynniki stabilizujące, modyfikując temperaturę reakcji, pH roztworu czy prędkość mieszania oraz czas syntezy można wpływać na kształt i powierzchnię syntetyzowanych AgNP.

Redukcja chemiczna jest niezawodną metodą syntetyzowania AgNP w wodzie lub roztworach organicznych. Proces polega na redukcji jonów srebra (Ag^+), pochodzących z soli srebra do srebra elementarnego (AgNP), poprzez transfer elektronów w określonych warunkach (Iravani i in., 2014). Powstawanie nanocząsteczek srebra można podzielić na dwa etapy: nukleację i wzrost (Rysunek 7 C). Podczas syntezy stężenie srebra w roztworze szybko wzrasta powyżej krytycznego poziomu przesycenia, co wywołuje „wybuchową nukleację” i wytrącanie. W wyniku wytrącania tworzą się jądra, a charakter powtarzalności procesu nukleacji, promuje ciągłe powstawanie nowych zarodków. W miarę ich tworzenia, stężenie srebra spada poniżej krytycznego poziomu przesycenia. Po nukleacji dalsza obecność srebra powoduje wzrost jąder i tworzenie nanocząsteczek o większych rozmiarach (Naik i in., 2019).

Źródłem wolnych elektronów w tym procesie są substancje redukujące takie jak: glukoza ($C_6H_{12}O_6$), borowodorek sodu (borowodorek), askorbinian sodu ($C_6H_7NaO_6$), cytrynian sodu ($Na_3C_6H_5O_7$). Słabsze reduktory jak cytrynian sodu umożliwiają syntezę większych AgNP, z lepszą kontrolą ich kształtu i rozmiarów. Silniejsze reduktory jak borowodorek sodu, sprzyjają syntezom małych, silnie monodyspersyjnych AgNP (Evanoff i Chumanov, 2005). Alternatywnymi do azotanu srebra prekursorami, mogą być amoniak srebra, odczynnik Tollensa (Dondi i in., 2012), siarczan srebra (X. Li i in., 2013) czy chloran srebra (Zielińska i in., 2009). Rodzaje i stosunek prekursorów oraz reduktorów, jak również temperatura i pH roztworu, mogą wpływać na charakterystykę AgNP. Dlatego cały proces syntezy chemicznej AgNP można kontrolować, zmieniając

składniki i dostosowując parametry reakcji. Wykazano bowiem, że zmiana pH roztworu, w którym jako reduktora i stabilizatora użyto cytrynianu wpływała na kształt uzyskiwanych AgNP (Rysunek 8). Przy wysokim pH uzyskano roztwór z mieszaniną cząstek kulistych i pręcikowych, podczas gdy przy niskim pH dominującymi kształtami były formy trójkątne i wielokątne (Dong i in., 2009). Fakt ten potwierdziły inne badania chemicznej syntezy z zastosowaniem kwasu askorbinowego jako reduktora i cytrynianu w roli stabilizatora. Uzyskano więcej cząstek kulistych, przy wyższym pH, a ponadto wykazano, że rozmiar nanocząsteczek zmieniał się w zależności od wartości pH. Synteza mniejszych AgNP była możliwa ze względu na zwiększoną aktywność redukującą cytrynianu lub kwasu askorbinowego przy wyższym pH, co z kolei zmniejszało liczbę jąder (zarodków) aktywnych w procesie syntezy (Qin i in., 2010). Badania te również wykazały, że rodzaj reduktora wpływa na kształt AgNP z powodu zależności szybkości redukcji prekursora (Ag^+) od pH.



Rysunek 8. Synteza chemiczna AgNP z wykorzystaniem cytrynianu. A) warunki eksperymentalne wpływające a kształt syntetyzowanych nanocząstek, B) Obrazy TEM syntetyzowanych AgNP w zależności od pH roztworu syntezy (pH=11.1, 8.3, 6.1, 5,7). Opracowane na podstawie (Dong i in., 2009).

Istotnym elementem syntezy chemicznej jest również temperatura. Wykazano, przeprowadzając badania w warunkach od 0 do 55 °C, że niska temperatura znacznie spowolnia tworzenie jąder i wzrost, co wydłuża proces redukcji prekursorów. Natomiast w wyższych temperaturach od 17 do 55 °C, szybkość reakcji, podobnie jak i rozmiar nanocząsteczek, wzrastają wraz ze wzrostem temperatury (X. C. Jiang i in., 2010).

W syntezach chemicznych zazwyczaj stosuje się stabilizatory, w celu poprawy stabilności nanocząstek w roztworze oraz dla zapewnienia odpowiedniej odległości

między AgNP, zapobiegając w ten sposób ich agregacji. Najczęściej stosowanym stabilizatorami są, poliwinylopirolidon (PVP), bromek heksadecylotrimetyloamoniowy (CTAB), cytrynian, celuloza czy chitozan. W zależności od obecności w stabilizatorach grup aminowych lub kraśnych, można kontrolować ładunek na powierzchni nanocząstek powierzchni AgNP. Stosując natomiast niejonowe czynniki stabilizujące, można zwiększyć hydrofilowość metalu. Można w ten sposób, wykorzystując konkretne związki opłaszczające, nadawać powierzchni nanocząstek odpowiedni ładunek. Dzięki obecności grup kwaśnych (siarczanowych, karboksylowych) w substancjach stabilizujących, powierzchnia nanocząstek zyskuje ładunek ujemny. Z kolei grupy aminowe (bromek heksadecylotrimetyloamoniowy – CTAB, cystamina, PEI) nadają im ładunek dodatni. Dość często stosuje się także niejonowe czynniki stabilizujące zwiększające hydrofilowość powierzchni metalu (Bensebaa, 2013).

Metoda chemiczna wykorzystywana jest również do osadzania nanocząstek srebra na powierzchniach, mogących stanowić bazę dla układów sensorycznych. Metoda syntezy nanowysp srebra, SIF (ang. Silver Island Fillms), wykorzystywana w tej pracy, była kluczowa w badaniach nad zjawiskiem MEF. Wykazały one znaczące zwiększenie intensywności emisji fluoroforów w optymalnej odległości od powierzchni SIF (Lakowicz, 2001). Synteza SIF jest szybka i stosunkowo tania. Nie wymaga skomplikowanych urządzeń laboratoryjnych ani dużej ilość składników do syntetyzowania SIF. W wyniku syntezy otrzymywane są powierzchnie, zawierające nieregularne, osadzone losowo wyspy srebra o rozmiarach ok. 50–200 nm (Aslan, Leonenko i in., 2005), Rysunek 5 F. Prekursorem w tej syntezie jest azotan srebra, natomiast najczęściej stosowanym reduktorem – glukoza. Innym wykorzystywanym reduktorem jest formaldehyd w roztworze zasadowym. Synteza z jego użyciem wymaga dłuższego czasu (około dwóch godzin, zamiast kilku minut), a uzyskiwane powierzchnie charakteryzują się mniejszą jednorodnością i zagęszczeniem wysp srebra, niż w syntezach, gdzie jako reduktor stosowano glukozę (Kowalska i in., 2020). Istotnym parametrami procesu tworzenia SIF są czas i temperatura reakcji. Zmieniając je, można kontrolować gęstość srebrnych wysp na powierzchni. Pomimo tego trudno jest uzyskać powtarzalne powierzchnie, o identycznym rozkładzie wysp tj. o tych samych rozmiarach czy gęstościach SIF. Fakt ten wpływa na właściwości optyczne, które należy kontrolować poprzez pomiary spektroskopowe położenia pasm LSPR dla każdego syntetyzowanego podłoża z SIF. Maksimum tego pasma dla SIF w syntezach z

glukozą wynosi około 430 nm, niemniej jednak, w każdym przypadku charakteryzują się one bardzo szerokimi widmami absorpcji, wpływając na właściwości optyczne fluoroforów, w szerokim zakresie, obejmującym cały zakres widzialny i dochodzącym do bliskiej podczerwieni.

Metoda chemiczna syntezy AgNP może być wspomagana zewnętrznymi źródłami energii, takimi jak metody fotochemiczne, elektrochemiczne, mikrofalowe czy sonochemiczne. Pierwsze z nich wykorzystywane są do syntetyzowania AgNP na powierzchniach jak folie polimerowe czy szkło. Podczas tego procesu są one naświetlane światłem o określonej intensywności, długości fali i czasie ekspozycji. W ten sposób w obszarze luminescencyjnym roztworu wytwarzane są zredukowane wolne rodniki i jony uwodnione, które mogą bezpośrednio redukować jony srebra do AgNP na powierzchni (Zaarour i in., 2014). Metoda nie wymaga szkodliwych środków redukujących i może być przeprowadzana w warunkach temperatury pokojowej. Ponadto jej reakcje łatwo zahamować lub osłabić, przerywając naświetlanie. W metodach elektrochemicznych zasada syntezy jest podobna, nukleacja i wzrost AgNP zachodzą prawie jednocześnie, pod wpływem zewnętrznego pola elektrycznego. Na rozmiar otrzymywanych AgNP wpływ mają rodzaje elektrod i elektrolitów, stężenia rozpuszczalników i prekursora oraz natężenie prądu. Metoda wspomagana mikrofalami polega na szybkim podgrzewaniu prekursora srebra za pomocą mikrofal. Jej główną zaletą jest wysoka wydajność konwersji energii, oszczędność czasu, co umożliwia stosowana jej w produkcji AgNP na dużą skalę (Serpone i Horikoshi, 2013).

1.2.2.3. Metody biologiczne

Chociaż opisana wcześniej metoda chemicznej syntezy AgNP jest niezawodna, wydajna, łatwo kontrolowalna, to niektóre odczynniki w niej wykorzystywane mogą być szkodliwe. Fakt ten może ograniczać zastosowanie w aplikacjach medycznych syntetyzowanych w ten sposób AgNP. W związku z tym zaproponowano alternatywną metodę syntezy biologicznej, tzw. zielonej syntezy, opierającej się na makrocząsteczkach w bakteriach, grzybach czy algach, takich jak enzymy, celuloza, egzopolisacharydy oraz na składnikach organicznych w ekstraktach roślinnych, jak enzymy, alkohole, alkaloidy, flawonoidy, chinony, czy związki fenolowe (Pantidos, 2014).

W syntezach biologicznych do redukcji soli prekursora używa się naturalnych roślin, bakterii, grzybów, alg lub drożdży, dzięki czemu, nie ma konieczności stosowania silnych środków redukujących, oraz rygorystycznych warunków syntez jak wysokie pH czy temperatura. Co więcej, możliwość kontroli kształtu i rozmiaru syntetyzowanych AgNP w trakcie syntezy i wysoka rozpuszczalność oraz stabilność w wodzie, umożliwiają zwiększenie skali ich produkcji. To powoduje, że są metodami mogącymi mieć zastosowanie zarówno w branży naukowej, jak i komercyjnej (Tarannum i in., 2019). AgNP mogą być uznawane za "produkt uboczny" mechanizmu odporności mikroorganizmów na wolne jony Ag+. Synteza mediowana przez rośliny może redukować Ag^+ do srebra metalicznego za pomocą grup funkcyjnych takich jak O-H i =C-H zawartych w składnikach organicznych i ich pochodnych w ekstraktach z części roślin.

Zdolność bakterii do przetrwania w ekstremalnym środowisku, bogatym w srebro może przyczyniać się do akumulacji AgNP. W zależności od lokalizacji rozmieszczenia nanocząsteczek AgNP mogą być syntetyzowane wewnątrzkomórkowo lub zewnątrzkomórkowo. Różne substancje organiczne w bakteriach są używane jako środki redukujące. Jedną z nich jest enzym, reduktaza azotanowa (NADH), która może przyczepiać się do powierzchni jąder. Uczestniczy ona w łańcuchu transportu elektronów, tworząc miniaturowe środowisko redukujące przez przenoszenie atomów wodoru. Enzym NADH jest nośnikiem elektronów i prowadzi do tworzenia NAD+. Elektrony są przechwytywane przez jony srebra (Ag+), które następnie zostają zredukowane do AgNP (Ali i in., 2019) - Rysunek 7 D.

Aktywne substancje organiczne w glonach, takie jak węglowodany, polisacharydy, enzymy, białka, witaminy, mogą być używane jako reduktory do formowania AgNP o kontrolowanym rozmiarze i kształcie, w tym sfer, trójkątów, kostek, prętów, drutów czy heksagonów. Aminokwasy, białka i siarczanowane polisacharydy, w ekstraktach z glonów mogą również działać jako stabilizatory lub czynniki osłaniające w biosyntezie AgNP. Badania nad wieloma glonami, w tym zielenicami właściwymi, brunatnicami, czy czerwonymi algami (rhodophyceae) wykazały ich wysoką przydatność w zielonej syntezie AgNP (Khanna i in., 2019). W przypadku syntez, w których mediatorem są glony, należy uwzględnić kilka istotnych czynników jak stosunek prekursora do ekstraktu, czas inkubacji czy temperaturę (Aboelfetoh i in., 2017).

Techniki zielonej syntezy mają wiele zalet, wśród których wymienić można brak szkodliwej chemii, małe wymagania w zakresie zasobów energii i brak odpadów wpływających na środowisko naturalne. Z tego powodu syntezy biologiczne uważane są za najczystsze syntezy AgNP. Metoda ta ma duży potencjał do powszechnego zastosowania w produkcji AgNP do określonych rozwiązań aplikacyjnych. Prace badawcze nad optymalizacją zielonych syntez nadal trwają. Obecnie uważa się, że możliwości produkcyjne AgNP tą metodą na dużą skalę są ograniczone, z uwagi na dłuższy niż w metodach chemicznych czas trwania reakcji syntezy, spowodowany stosunkowo powolnym procesem redukcji (Z. Zheng i in., 2022). Ponadto ekstrakcja i oczyszczanie związków bioaktywnych w celu otrzymania nanocząstek o wysokiej czystości, z roślin lub drobnoustrojów, może być czasochłonnym i technicznym wyzwaniem.

1.3. Zastosowanie nanocząstek srebra w medycynie

1.3.1. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe

Właściwości przeciwdrobnoustrojowe złota, miedzi, cynku czy tytanu są powszechnie znane, jednak szczególne cechy w tym zakresie przypisuje się nanocząstkom srebra (Bruna i in., 2021). Zakłada się, że AgNP mogą uczestniczyć w reakcjach prowadzących do powstawania wolnych rodników (reaktywne formy tlenu), które wraz z jonami srebra wywołują cytotoksyczność w komórkach bakteryjnych, głównie w mechanizmie niszczenia ścian komórkowych bakterii i uszkadzania ich struktury DNA. Wykazano wysoką skuteczność przeciwbakteryjną AgNP w szerokim spektrum zarówno baterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych (Mazur i in., 2020). Zauważono przy tym silniejsze działanie naprzeciwko bakteriom Gram-ujemnym, co może być spowodowane różnicą w grubości ściany komórkowej między tymi bakteriami (Chatterjee i in., 2015). Dlatego też AgNP są często wykorzystywane jako antybakteryjny dodatek do opatrunków, czy ortopedycznych syntetycznych rusztowań kostnych (Marsich i in., 2013).

Właściwości antybakteryjne AgNP mogą również zależeć od ich rozmiaru, kształtu, stężenia czy czasu ekspozycji. Im mniejszy rozmiar AgNP, tym lepsza aktywność antybakteryjna, zwłaszcza gdy rozmiar jest mniejszy niż 10 nm (Jiraroj i in., 2014). Wydłużając czas leczenia nanocząstkami srebra, można znacząco wzmocnić

efekt antybakteryjny, poprzez akumulację nanocząstek i jonów srebra, prowadząc do wyższej śmiertelność bakterii. Porównując aktywność sferycznych, trójkątnych i sześciennych AgNP, wykazano, że nanocząstki o sferycznych kształtach, z uwagi na większy stosunek powierzchni do objętości, charakteryzują się skuteczniejszym kontaktem na większej powierzchni, przez co wykazują lepszy efekt antybakteryjny. Rzadko natomiast obserwowana jest oporność bakterii na AgNP, co jest ich dużą zaletą, w kontekście do coraz częściej występującego zjawiska oporności na antybiotykoterapię, ograniczającego możliwości terapeutyczne.

Podkreślane są również przeciwgrzybiczne i przeciwwirusowe właściwości AgNP, między innymi w stosunku do wirusów zapalenia wątroby typu B (WZW-B), paragrypy (HPIV), opryszczki zwykłej (HSV) czy wirusa grypy A/H1N1, (Malachová i in., 2011; Yao i in., 2012; Mori i in., 2013).

1.3.2. Właściwości przeciwnowotworowe

Wiele badań wykazało potencjał przeciwnowotworowy nanocząstek srebra i złota, wynikający z powstawania reaktywnych form tlenu wewnątrz komórek rakowych. W ostatnich latach szeroko badano terapeutyczne właściwości nanocząstek srebra zarówno in vitro, jak i in vivo, wykazując ich skuteczne działanie przeciwko między innymi rakowi piersi, płuc, szyjki macicy, nosogardzieli, prostaty czy glejakom (Takáč i in., 2023). Działanie przeciwnowotworowe AgNP jest zależne od ich kształtu, rozmiaru i ładunku powierzchniowego. Im mniejszy rozmiar cząstek, tym wyższa aktywność biologiczna, dlatego syntetyzowane są bardzo małe nanocząstki srebra, osiągające rozmiary dziesiątych części nanometra. Ich silne działanie w terapii onkologicznej może być wzmacniane dłuższym czasem ekspozycji i wyższą dawką nanocząstek (Wang i in., 2019). AgNP powodują niszczenie struktury komórek nowotworowych, powstawanie reaktywnych form tlenu w ich wnętrzu, uszkodzenia DNA, inaktywację enzymów oraz regulację szlaków sygnalizacyjnych. Wskazano również, że AgNP mogą zmniejszać inwazyjność i zdolność do przerzutów komórek nowotworowych (Hashemi Goradel i in., 2017). Same komórki rakowe natomiast, z uwagi na efekt zwiększonej przepuszczalności i retencji EPR (ang. enhanced permeation and retention effect), preferencyjnie absorbują bardzo małe nanocząstki, co w połączeniu ze słabym drenażem limfatycznym, pozwala kumulować AgNP w tkance nowotworowej (Maeda i

in., 2001). To z kolei może być wykorzystywane do celowanego dostarczania leków przeciwnowotworowych za pomocą AgNP.

1.3.3. Badania nad toksycznością nanocząstek srebra

Charakterystyczny dla AgNP, duży stosunek powierzchni do objętości, może prowadzić do zwiększonego uwalniania jonów srebra (Ag^+) w tkankach prawidłowych, powodując ich potencjalną toksyczność. Badania na modelach zwierzęcych wykazały, że w wyniku wchłonięcia AgNP przez skórę, inhalację, iniekcję czy spożycie, może dochodzić do migracji i ich kumulacji w układzie oddechowym, nerwowym, wątrobowo-żółciowym czy rozrodczym. Małe nanocząstki z łatwością przenikają do organizmu i przekraczają bariery biologiczne, jak krew-mózg czy bariera krew-jądro, mogąc w ten sposób indukować cytotoksyczność. Badania na modelach wykazały, że nagromadzone AgNP w płucach może powodować zapalenie płuc i astmę, a ich obecność w układzie rozrodczym, wpływać na obniżenie płodności (Seiffert i in., 2015; Ong i in., 2016).

Jednak potencjalną toksyczność AgNP można kontrolować lub nawet wyeliminować, poprzez modyfikację ich powierzchni i zwiększenie stabilności (Kunzmann i in., 2011). W celu poprawy bezpieczeństwa stosowania AgNP stosuje się metody powlekania nanocząstek związkami organicznymi jak: cytrynian, PVP (poliwinylopirolidon), Tween 80, chitozan, polimery lub tworząc obiekty typu rdzeń – otoczka (ang. „core-shell”).

Związki organiczne pokrywające AgNP przeciwdziałają ich agregacji, dzięki czemu uzyskiwane są wyższe intensywności pierwotnego piku absorpcji i większe populacje monodyspersyjnych cząstek. Jednak z uwagi na zbyt grubą powłokę (ok. 150nm) nie znajdują zastosowania w biosensorach plazmonicznych, gdzie dystans jest krytycznym parametrem jakościowym (Gunsolus i in., 2015). Polimery o dużej masie cząsteczkowej i wysokiej gęstości usieciowania mają tendencję do zwiększania stabilności koloidalnej. Przykładem jest poli(tlenek etylenu), PEG (ang. ang. polyethylene glycol), neutralny, hydrofilowy i biokompatybilny polimer, który poprawia dyspersję w warunkach fizjologicznych i zapobiega agregacji nanocząstek (Tejamaya i in., 2012). Chitozan, często stosowany z uwagi na wysoką biokompatybilność, zapewnia AgNP nie tylko wysoką dyspersyjność i stabilność, ale

ma również właściwości formujące, wpływając na uzyskiwane różnych kształtów cząstek od sferycznych po trójkątne.

W obiektach typu „core-shell” rdzeniem jest AgNP, której powierzchnię pokrywa się krzemionką (SiO_2) czy ditlenkiem tytanu (TiO_2). W przypadku powłok krzemionkowych, ich właściwości są dobrze poznane, zarówno pod względem poprawy stabilności chemicznej, koloidalnej, jak i obniżania toksyczności NP. Ochronna powłoka z krzemionki ma ograniczony wpływ na zdolności biosensoryczne, o ile grubość warstwy nie przekracza kilku nanometrów. Nanocząstki $Ag@SiO_2$ nie wykazują dodatkowych efektów wzmacniania odpowiedzi plazmonicznej, natomiast mają zdolność dostrajania energii plazmonowych, co może być stosowane w rozwoju biosensorów (Guerrero-Martínez i in., 2010). Chcąc wykorzystywać AgNP wewnątrz organizmu, konieczne jest opracowanie nanocząstek o wysokiej biokompatybilności i systematyczne badania ich potencjalnej toksyczności. Takich cech nie przypisuje się na przykład nanocząstkom złota, z uwagi na pogląd, że charakteryzują się wysoką biodostępnością, dlatego są one częściej wykorzystywane do aplikacji in vivo. Natomiast w przypadku zastosowań poza ludzkim ciałem, na przykład jako sensory plazmoniczne, AgNP konsekwentnie wykazują lepszą wydajność niż AuNP (Rycenga i in., 2011).

1.4. Nanocząstki srebra w biosensorach

Omawiane w poprzednich częściach, unikalne cechy nanocząstek srebra, pozwoliły na zastosowanie ich w projektowaniu licznych biosensorów, wykorzystujących zjawiska plazmonowe, zarówno do detekcji bez znaczników, jak i opartej na znacznikach, gdzie wzmocniony sygnał wypływa na poprawę czułości i specyficzności testów.

1.4.1. Biosensory SERS

Nanocząstki srebra mogą być używane jako ekonomiczne podłoża do wzmacnianej powierzchniowo spektroskopii Ramana (SERS, ang. Surface Enhanced Raman Spectroscopy). Jest to niewymagająca znaczników, spektroskopowa technika detekcji w czasie rzeczywistym, wykorzystująca wzmocnienie sygnału Ramana cząsteczki zaadsorbowanej lub pozostającej w niewielkiej odległości od podłoża SERS. AgNP i ich połączenia z materiałami, takimi jak czipy krzemowe lub materiały

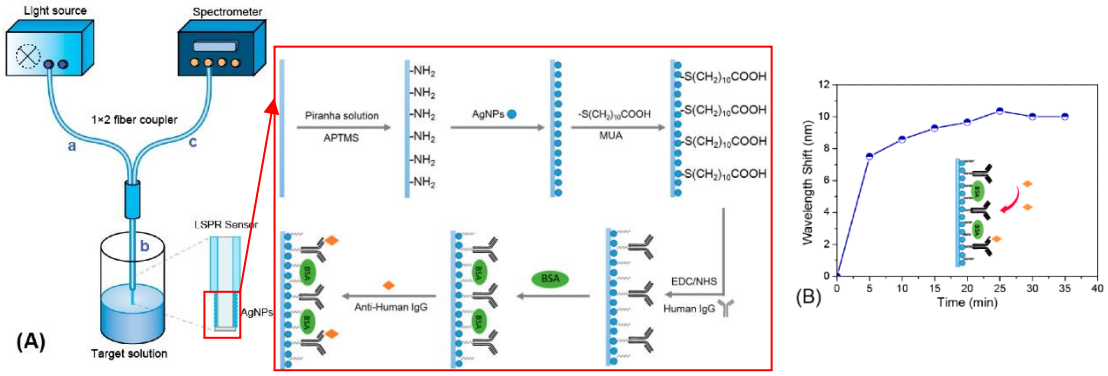
węglowe, są ze względu na wysoką refleksyjność optyczną, idealnymi aktywnymi powierzchniami SERS. Rozmiar, kształt, skład i chropowatość powierzchni wpływają na pasmo plazmonowe, a tym samym na wydajność SERS (Wu, 2011). AgNP wykorzystywane są do tworzenia biosensorów wykrywających enzymy, patogeny (Meng i in., 2018), markery komórek nowotworowych (Pang i in., 2019) czy glukozę we krwi. Zaproponowano na przykład wykorzystanie nanokompozytów zawierających srebro w biosensorze do elektrochemicznego wykrywania acetylocholinoesterazy, enzymu uważanego za marker narażenia na pestycydy. Obecność AgNP poprawiła przewodnictwo elektryczne oraz biokompatybilność nanokompozytów, dostosowując metodę detekcji do aktywności i stabilności wykrywanych enzymów (Y. Jiang i in., 2018). Nanocząstki srebra posłużyły również do stworzenia wysokoczułego, nieenzymatycznego sensora do wykrywania glukozy. Właściwości przewodzące, porowatość nanocząstek i ich duże powierzchnie czynne zwiększyły liczbę miejsc interakcji między AgNP, elektrodą i glukozą, przyspieszając transfer elektronów i poprawiając w ten sposób czułość biosensora (Anderson i in., 2017).

Przygotowanie odpowiedniego podłoża SERS jest również wyzwaniem, z uwagi na skomplikowane, kosztochłonne procedury wytwarzania, wpływające na jakość wzmocnienia oraz stabilność sygnału SERS, co w konsekwencji może prowadzić do niższej powtarzalności wyników i niedokładności w ilościowym oznaczaniu analitu (He i in., 2019). Z tego powodu bardzo trudno jest opracować ostateczny sensor SERS, który mógłby zostać wykorzystywany jako produkt dla końcowego użytkownika.

1.4.2. Biosensory LSPR

Biosensory oparte na zjawisku zlokalizowanego powierzchniowego rezonansu plazmonowego, wykorzystują fakt, że w wyniku związania się biologicznego analitu z powierzchnią NP, dochodzi do zmiany współczynnika załamania światła na jej powierzchni, co z kolei, przesuwa pasmo LSPR. Zmiana częstotliwości LSPR jest zależna od kształtu i składu nanocząstki. Srebro, mające największą, ujemną rzeczywistą stałą dielektryczną spośród wszystkich materiałów plazmonicznych, jest najbardziej wrażliwe na zmiany lokalnego współczynnika załamania. W wielu zastosowaniach, biosensory oparte na AgNP mają przewagę nad innymi nanocząstkami z uwagi na charakterystyczne, wąskie pasmo rezonansu plazmonowego w szerokim zakresie widzialnym oraz wysoki molowy współczynnik absorpcji (Loiseau i in., 2019).

W badaniu nad biosensorem LSPR opartym na zmianie współczynnika załamania światła wykazano, że w wyniku interakcji między sferycznymi nanocząstkami srebra i złota pokrytych biocytyną z awidyną, dochodzi do przesunięcia pasma LSPR, które dla AgNP było 5 razy większe dla niż dla AuNP (Lismont i Dreesen, 2012). Zwiększenie czułość detekcji sensora LSPR osiągnięto również po osadzaniu AgNP na światłowodzie (Rysunek 9). Powierzchnia AgNP została pokryta przeciwciałami, a proces wiązania antygen – przeciwciało był optycznie monitorowany w czasie rzeczywistym. Dzięki tej metodzie uzyskano czułość detekcji znacznie wyższą niż dla koloidalnych zawiesin AgNP (J. Chen i in., 2015).



Rysunek 9. Schemat biosensora LSPR opartego na światłowodzie. (A), zmiana przesunięcia długości fali maksimum LSPR w trakcie procesu wiązania przeciwciał na powierzchni biosensora w czasie 35 min (B). Na podstawie (J. Chen i in., 2015).

Coraz częściej wykorzystuje się nanocząstki, w tym AgNP, w testach „w miejscu opieki" (ang. point-of-care), polegających na wykonywaniu badań przy pacjencie, czyli w środowisku z ograniczonymi zasobami diagnostycznymi, jak gabinet lekarski czy oddział ratunkowy. Tego typu testy wymagają prostych i szybkich narzędzi do odczytu wyniku, jednak bez rezygnacji z laboratoryjnej jakości oznaczeń.

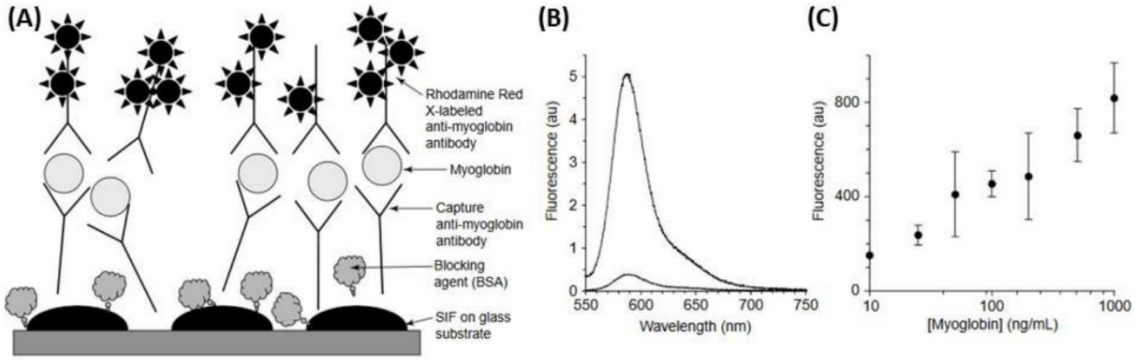
Zaproponowano biosensor typu „w miejscu opieki" wspomagany smartfonem do wykrywania mocznika w celu codziennego monitorowania pacjentów z chorobami nerek i wątroby. Podstawą systemu detekcji jest kolorymetryczne wykrywanie mocznika oparte na produkcji AgNP, zintegrowane z systemem analizy obrazu za pomocą smartfona. Poprzez ureazę mocznik był hydrolizowany do NH_3 i CO_2, aktywując kwas taninowy, który jest wrażliwy na pH, oraz redukując jony Ag^+ do AgNP. Ze względu na pasmo LSPR, AgNP emitują żółty kolor: jakość koloru, związana z pozycją i intensywnością LSPR, zależy od liczby wytworzonych cząsteczek. Współczynnik RGB określany za pomocą oprogramowania smartfona wykazał liniową

korelację ze stężeniem mocznika, dzięki czemu określono granicę wykrywalności wynoszącą 2168 mM dla mocznika w próbkach moczu ludzkiego (Choi i in., 2021).

Inny biosensor wykorzystujący matrycę ze srebrnych nanotrójkątów funkcjonalizowanych białkiem ACE2 (konwertazy angiotensyny typu II) jako platformę detekcji LSPR, został zaproponowany do detekcji SARS-CoV-2. Pomiarów dokonywano za pomocą przenośnego spektrofotometru UV-Vis, rejestrując liniowe przesunięcie długości fali LSPR w stosunku do logarytmu stężenia białka kolca wirusa CoV NL63. Granice wykrywalności dla białka kolca, wirusa CoV NL63 w buforze oraz ślinie wyniosły odpowiednio 0,83 pM, 391 PFU/ml i 625 PFU/ml, przy czasie detekcji mniejszym niż 20 minut, co przedstawiono jako skuteczną alternatywę dla szybkich testów antygenowych (Yang i in., 2022).

1.4.3. Biosensory MEF

Zjawisko wzmocnionej fluorescencji na powierzchni srebrnych nanowysp, wykorzystano do stworzenia testu immunoenzymatycznego (w formacie „kanapki") do wykrywania mioglobiny, markera uszkodzenia komórek mięśnia sercowego. Na szkiełkach mikroskopowych zsyntetyzowano AgNP w formie srebrnych wysp, następnie przyłączono do szklanych powierzchni przeciwciała wychwytujące mioglobiny. Po wychwycie antygenu przez przeciwciała inkubowano próbkę z przeciwciałami anty-mioglobiny, znakowanymi fluoroforem Rhodamine Red-X o maksimum wzbudzenia emisji 560/580 nm (Rysunek 10 A). Wykazano w ten sposób nawet 15-krotny wzrost intensywności fluorescencji w pobliżu nanocząstek, w stosunku do sygnału z samego szkła (Rysunek 10 B). Dodatkowo biosensor umożliwił detekcję mioglobiny w stężeniach w zakresie 10–1000 ng/ml - Rysunek 10 C (Aslan, Gryczyński i in., 2005). Metoda wykorzystania nanowysp srebra w teście immunoenzymatycznym, zaprezentowana w tym badaniu, stanowiła podstawę do opracowania koncepcji testu w ramach badań prowadzonych w tej pracy doktorskiej.



Rysunek 10. Schemat immunoenzymatycznego testu kanapkowego z wykorzystaniem powierzchni pokrytej wyspami nanosrebra (SIF). - (A); (B) emisja fluorescencji przeciwciała potwierdzającego (anty-mioglobiny) znakowanego Rhodamine Red-X, przyłączonego do unieruchomionej mioglobiny, dla określonego stężenia mioglobiny (100 ng/ml) na SIF i na szkle oraz (C) przy różnych stężeniach mioglobiny na SIF. Opracowane na podstawie (Aslan, Gryczyński i in., 2005).

Innym, praktycznym wykorzystaniem tych sensorów, było zaproponowanie testu hybrydyzacji DNA z wykorzystaniem MEF z tiolowanymi oligonukleotydami, na podłożu szklanym z SIF. Zastosowanie AgNP poprawiło czułość wykrywania DNA, zwiększając liczbę wykrytych fotonów na jedną cząsteczkę fluoroforu ponad dziesięciokrotnie (Malicka i in., 2003). Nanocząstki srebra otoczone krzemionką (AgNP@SiO_2) zostały natomiast wykorzystane do stworzenia innego biosensora opartego na MEF. Uzyskano w ten sposób od 3 do 5-krotne wzmocnienie fluorescencji z koloidów AgNP z powłokami SiO_2, znakowanych cyjaniną. Zauważono również, że obecność zewnętrznej powłoki redukuje wygaszanie, występujące w bardzo bliskiej odległości między metalem a fluoroforem, oraz zapewnia szerokie możliwości przyłączania do niej innych biomolekuł. Wskazano również na możliwość wykorzystania AgNP@SiO_2 jako platformy detekcji opartej na MEF w roztworach (Aslan, Wu i in., 2007).

1.5. Selektywne wzbudzanie fluoroforów metodą TIRF

Ważnym, z punktu widzenia założeń badawczych rozprawy doktorskiej jest fluorescencja wykorzystująca zjawisko całkowitego wewnętrznego odbicia (TIRF, ang. Total Internal Reflection Fluorescence). Metoda ta umożliwiającą bowiem, selektywne wzbudzanie fluoroforów w środowisku wodnym, w bardzo bliskiej odległości od płaskiej powierzchni (< 100 nm). Samo zjawisko całkowitego wewnętrznego odbicia (TIR, ang. Total Internal Reflection) było stosowane już w latach 60. XX wieku, w

spektroskopii absorpcyjnej w zakresie widzialnym i podczerwieni (Harrick i Beckmann, 1974). Kolejnym krokiem było wykorzystanie TIR w połączeniu ze spektroskopią fluorescencyjną, do budowy różnych interfejsów detekcyjnych. Ostatecznie w latach 80. XX wieku, zaproponowano połączenie TIR, fluorescencji i mikroskopii, co okazało się kluczowe dla badań w biologii komórki i biochemii (Axelrod, 1981).

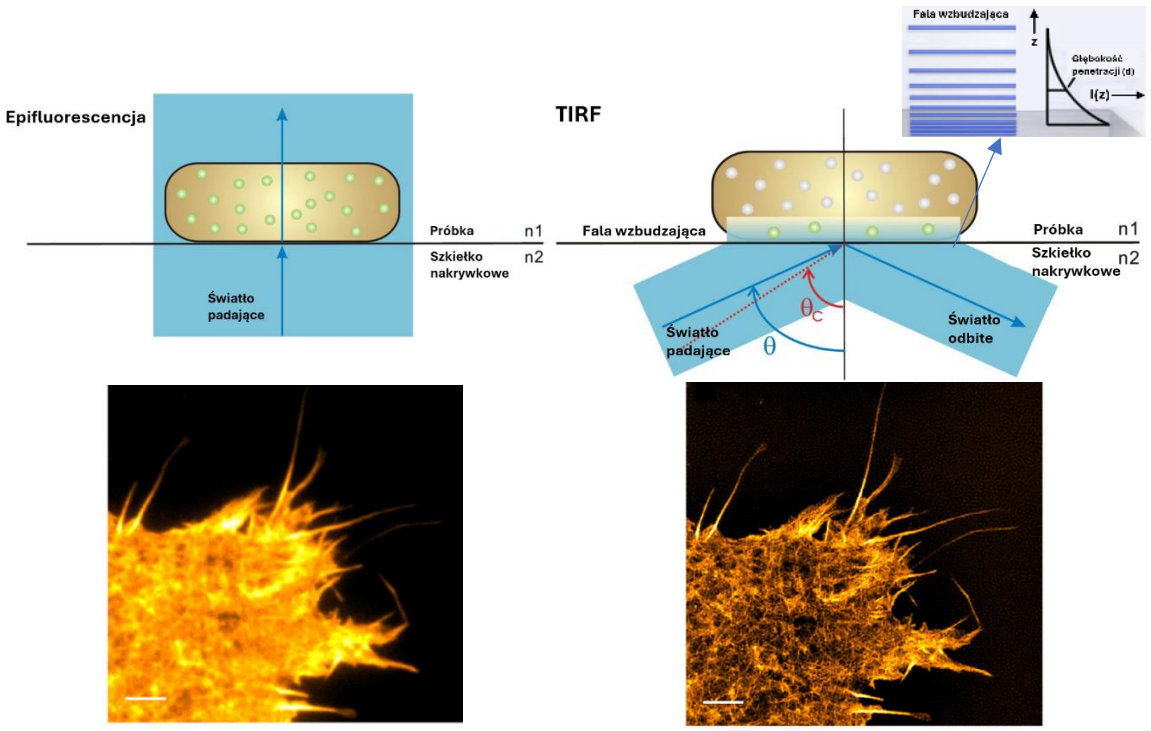
Technika TIRF ma szczególne znaczenie w mikroskopii fluorescencyjnej, gdzie jej wykorzystanie znacząco poprawia jakość uzyskiwanych obrazów. Wynika to z faktu, że w klasycznej mikroskopii fluorescencyjnej, fluorofory związane i niezwiązane, na przykład z błonami komórkowymi badanych preparatów, pozostają w stanie równowagi. W efekcie uzyskiwany obraz będzie pochodził z nałożenia się emisji obu form znaczników. Brak selektywności wzbudzenia powoduje spadek kontrastu obrazu, a przy wysokich sygnałach tła, wręcz uniemożliwia zobrazowanie badanego obiektu. Natomiast w mikroskopii fluorescencyjnej całkowitego wewnętrznego odbicia (TIRFM, ang. Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy) możliwe jest uzyskanie obrazów o szerokim polu, z nieostrych płaszczyzn, o bardzo wysokim stosunku sygnału do szumu (Axelrod, Thompson i Burghardt, 1983).

1.5.1. Podstawy TIRF

Za każdym razem, gdy światło napotka granicę dwóch przezroczystych ośrodków, o różnych współczynnikach załamania światła, zostanie częściowo załamane, a częściowo odbite. Zjawisko TIRF występuje, gdy wiązka światła laserowego, pada na układ składający się z dwóch ośrodków: o wyższym współczynniku załamania (zazwyczaj szkło, n_2) oraz o niższym współczynniku załamania (jak roztwór próbki, n_1) pod kątem większym niż kąt graniczny (θ_c) dla TIR. (Rysunek 11, TIRF)
Kąt graniczny można zdefiniować:

$$\theta_c = sin^{-1}\left(\frac{n_1}{n_2}\right) \tag{3}$$

Aby spełnić warunek TIR, stosunek n_1/n_2, musi być mniejszy od jedności. Dla kątów padania $\theta < \theta_c$ większość światła przechodzi do ośrodka o niższym współczynniku załamania (próbka), przy kącie załamania definiowanym zgodnie z prawem załamania światła (Snella). Natomiast gdy światło pada pod kątem $\theta > \theta_c$, zostanie ono całe odbite z powrotem do ciała stałego.



Rysunek 11. Przykład wzbudzenia przez całą próbkę (epifluorescencja) oraz selektywnego wzbudzenia (TIRF) w mikroskopii fluorescencyjnej. W pierwszym przypadku emisja następuje ze wszystkich fluoroforów w komórce (zielone kółka), w drugim, mikroskopii TIRFM, światło wzbudzające jest całkowicie wewnętrznie odbijane od powierzchni szkiełko nakrywkowe/próbka pod kątem granicznym (θ_c). Gdy światło pada pod większym kątem (θ) od granicznego, po stronie próbki powstaje krótkozasięgowa fala wzbudzająca *I(z)* fluorofory w określonej odległości od powierzchni. Pod schematami przykładowe zdjęcia komórek COS-7 wyznakowanych LifeAct GFP w technice mikroskopii fluorescencyjnej (epifluorescencja) oraz w mikroskopii TIRF. Opracowane na podstawie (Chiu i Leake, 2011; Young i in., 2016).

Część energii padającego światła przenika przez ośrodek, tworząc w roztworze próbki elektromagnetyczną falę zanikającą o długości fali równej pierwotnej wiązce światła. Rozchodzi się ona równolegle do powierzchni szkła. Intensywność powstającego w ten sposób pola zanikającego *I(z)* charakteryzuje się wykładniczym zanikiem wraz ze wzrostem odległości od powierzchni (z), osiągając maksimum przy samej powierzchni, zgodnie z równaniem:

$$I(z) = I_o e^{-z/d} \tag{4}$$

$$d = \frac{\lambda_0}{4\pi}(n_1^2 sin^2\theta - n_2^2)^{-1/2} \tag{5}$$

gdzie,
I_0 – intensywność pola zanikającego na powierzchni,
d- głębokość penetracji fali wzbudzeniowej,
λ_0- długość fali światła padającego

Głębokość d jest niezależna od polaryzacji padającego światła i maleje wraz ze wzrostem kąta θ, definiuje obszar, w którym fluorofory są skutecznie wzbudzane przez falę zanikającą.

Powstająca fala zanikająca ma taką samą częstotliwość jak światło padające, z tego powodu fluorofory w jej obrębie nie są wzbudzane oddziaływaniem z fotonami, ale w wyniku oddziaływania z polem elektromagnetycznym. Głębokość penetracji fali wynosi ok. 100 - 200 nm, co wpływa na poprawę selektywności przestrzennej detekcji.

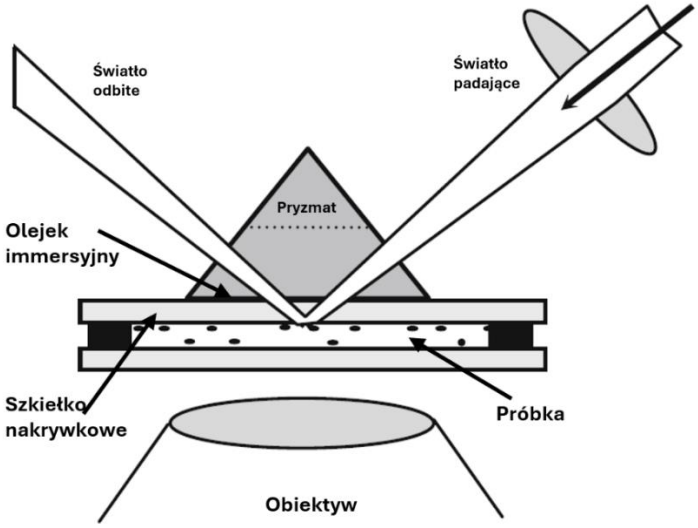
Wydawać by się mogło, że emisja z fluoroforu wzbudzonego przez pole zanikające, podąża za wykładniczym spadkiem intensywności, w zależności od odległości od powierzchni (z), zgodnie z równaniem (4). Nie jest tak jednak do końca, co wynika z faktu, że emisja fluorescencji w pobliżu dielektrycznego ośrodka jest anizotropowa, a stopień anizotropii zależy od z (Mertz, 2000). Jedną z przyczyn anizotropii emisji jest częściowe odbicie od ośrodka i w konsekwencji interferencja optyczna pomiędzy bezpośrednimi i odbitymi wiązkami emisji. Inną, bardziej subtelną przyczyną, jest interakcja fluoroforu z materiałem powierzchni i emisja światła rozchodzącego się pod dużymi kątami w materiale o wyższym współczynniku załamania n_2 (podłoże szklane). Im bliżej powierzchni znajduje się fluorofor, tym większa część emitowanego przez niego światła przenika do podłoża. Efekt wychwytu emisji bliskiego pola fluoroforu może stanowić podstawę powierzchniowo selektywnego wykrywania i obrazowania fluorescencji (Axelrod, 2001).

1.5.2. Przykładowy układ TIRF

Dostępnych jest wiele układów optycznych umożliwiających zastosowanie zjawiska TIRF. Niektóre wykorzystują mikroskopowe obiektywy o wysokiej aperturze, zarówno do oświetlania, jak i do obserwacji emisji, inne używają pryzmatu do kierowania światła w stronę interfejsu TIR z osobnym obiektywem lub detektorem do obserwacji (pomiaru) emisji. Przy TIRF opartym na obiektywie mała część światła padającego na próbkę pochodzi od światła rozproszonego w obiektywie. Również niewielka część rejestrowanej fluorescencji, pochodzi z luminescencji wewnętrznych elementów obiektywu. TIRF oparty na pryzmacie unika tych problemów, zapewnia „czystszą" fluorescencję, oraz lepiej eliminuje tło od fluoroforów niezwiązanych. Wymaga jednak doboru odpowiedniego obiektywu (detektora) i indywidualnego

podejścia do konstrukcji układu optycznego. Przykładowy schemat ustawienia TIRF opartego na pryzmacie przedstawiono na Rysunku 12.

Pryzmat używany do dostarczenia światła do układu, wraz ze znajdującym się nad nim szkiełkiem nakrywkowym, muszą być dopasowane pod względem współczynnika załamania światła. Oba mogą być wykonane ze zwykłego szkła optycznego, chyba że oczekiwane są krótsze głębokości penetracji, wynikające z konieczności zastosowania wyższych współczynników załamania. Pomiędzy pryzmatem a szkiełkiem zapewnia się optyczne sprzężenie, dzięki warstwie olejku immersyjnego, gliceryny lub cykloheksanolu. We wszystkich metodach opartych na pryzmacie, plamka TIRF powinna być skupiona w szerokości nie większej niż pole widzenia detektora. Im jest ona większa, tym większe rozpraszanie światła i możliwość rejestracji autofluorescencji z warstwy oleju immersyjnego, między pryzmatem a szkiełkiem. Kąt padania natomiast powinien przekraczać kąt graniczny, o co najmniej kilka stopni, ponieważ przy wartościach bardzo bliskich kątowi krytycznemu, komórki rzucają zauważalny „cień" wzdłuż ich powierzchni.



Rysunek 12. Schemat mikroskopu TIR w układzie z pryzmatem nad próbką. Komora próbki wypełniona buforem składa się z dolnego czystego szkiełka nakrywkowego, pierścienia dystansowego i szkiełka z komórkami odwróconego tak, aby komórki były skierowane w dół. Górna powierzchnia szkiełka nakrywkowego z komórkami styka się z pryzmatem przez warstwę oleju immersyjnego. Próbkę można przesuwać, zachowując kontakt optyczny. Opracowane na podstawie (Axelrod, 2022).

1.5.3. TIRF na powierzchni metalu

Gdy pomiędzy warstwą szła i próbki umieszczona zostanie cienka warstwa metalu, to przy określonym kącie padania (θ_p) dojdzie do powstania plazmonów powierzchniowych (SP), w efekcie czego intensywność pola zanikającego jest o rząd wielkości wyższa, niż intensywność padającej wiązki światła. Jeśli zewnętrzna siła (taka jak nałożone pole elektromagnetyczne) jest idealnie dopasowana do naturalnej częstotliwości oscylacji elektronów, zostaną one wprowadzone w duży rezonans. Dla filmu aluminiowego, złotego lub srebrnego na powierzchni szkło/woda, θ_p jest większy od kąta granicznego θ_p dla klasycznego TIR.

Rozwiązanie oparte na wzbudzaniu TIRF na szklanej powierzchni, pokrytej cienką warstwę metalowego filmu, daje kilka potencjalnych korzyści eksperymentalnych. Po pierwsze jak podkreślano w rozdziale o MEF, warstwa metalu prawie całkowicie tłumi fluorescencję w bardzo bliskiej odległości od powierzchni (do 10 nm). Efekt ten praktycznie zanika w odległości 100 nm, dlatego TIR na szklanej powierzchni pokrytej metalem, może być wykorzystany do selektywnego wzbudzania fluoroforów w zakresie odległości 20 – 200 nm (Burghardt i in., 2006). Po drugie zauważono, że wiązka światła nie musi być skolimowana, aby wywołać TIR, gdy pada na powierzchnię w układzie szkło/nanometrowa warstwa aluminium/woda. Światło padające pod kątem SP wywołuje silną falę zanikającą, a część światła o zbyt niskim lub wysokim kącie padania, powoduje zaniedbywalne wzbudzenia w środowisku wodnym próbki. Fakt ten może ułatwić ustawienie TIR z konwencjonalnym źródłem światła w warunkach eksperymentalnych, szczególnie że jak zauważono, warstwa metalu powoduje silną polaryzację fali zanikającej, niezależnie od czystości polaryzacji samego źródła (Axelrod, 2022). Istotną zaletą takich układów jest również możliwość detekcji zmiany kąta plazmonów powierzchniowych, wykorzystywane w biosensorach LSRP. Kąt ten jest silnie wrażliwy na zmianę współczynnika załamania po stronie obszaru o niskiej gęstości. Dlatego w próbce, o przestrzennie zmieniającym się współczynniku załamania (jak komórka przylegająca do powierzchni), będą miejsca wykazujące silniejsze rozpraszanie świata, czyli sprzyjające zjawisku powstawania plazmonów, oraz takie, które tych cech nie posiadają (Zhang i in., 2006).

TIRF w układzie szkło/nanowarstwa metalu/próbka może być również wykorzystywany do tworzenia biosensorów immunologicznych do detekcji z

powierzchni. Argumentem za takim zastosowaniem jest zdolność tych układów do selektywnego wykrywania wiązania z cząsteczką powierzchniową, przy jednoczesnym ograniczeniu sygnału tła z objętości próbki. To z kolei daje możliwość wykorzystywania do budowy biosensorów opartych na TIRF, prostych detektorów spektrometrycznych lub cyfrowych kamer. Dlatego też zdecydowano o wykorzystaniu tego zjawiska w zaproponowanym w rozprawie doktorskiej teście obecności alfa-defensyn metodą MEF. Prosty układ pomiarowy kompensowany selektywną metodą wzbudzenia może wpływać na poprawę stosunku sygnału do szumu. Biosensory wykorzystujące TIRF są nadal rozwijane, w zakresie poprawy czułości, zdolności jednoczesnej i wielokrotnej detekcji, jak również selektywności czy szybkości detekcji (Aslan, Gryczyński i in., 2005; Tschmelak i in., 2006; Staiano i in., 2009; Nakahara i in., 2013; Bruce i in., 2023).

1.6. Infekcje okołoprotezowe

1.6.1. Skala i przyczyny występowania infekcji

Choroby zwyrodnieniowe stawów biodrowych i kolanowych uznawane są powoli za choroby cywilizacyjne. Coraz dłuższe życie, prowadzi do naturalnego i postępującego zużycia powierzchni stawowych. Zgodnie z danymi Światowej Organizacji Zdrowia, w latach 2000 - 2019 średnia długość życia wzrosła o pond 6 lat (Global Health Observatory, 2024). Duży wpływ na procesy zwyrodnieniowe może mieć również niezdrowy styl życia, w tym nadmierna otyłość, jak również uwarunkowania genetyczne czy choroby współistniejące, w tym reumatoidalne zapalenie stawów. W przypadku braku efektów terapii zachowawczej jedną z najczęściej stosowanych metod leczenia z wyboru, jest chirurgiczny zabieg endoprotezoplastyki stawu. Polega on na całkowitej wymianie zniszczonego chorobą stawu lub jego elementów i zastąpieniu ich sztucznym implantem. Jest to skomplikowana operacja ortopedyczna, sprawiająca pacjentom wiele cierpienia i problemów, z uwagi na trudną rekonwalescencję i potencjalne powikłania po zabiegu. Ilość tego rodzaju operacji na całym świecie rośnie. W Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej, modele na podstawie danych z lat 2000-2014 przewidują, że ilość pierwotnych alloplastyk stawu biodrowego wzrośnie o 71%, do 635 000 zabiegów rocznie, natomiast kolanowego o 85%, do 1,26 miliona zabiegów rocznie, do 2030 roku

(Sloan i in., 2018). Nie ma co prawda danych predykcyjnych dla Polski, ale również tu obserwowany jest wyraźny wzrost ilości wykonywanych zabiegów endoprotezoplastyki. Na podstawie danych o zabiegach alloplastyk stawów biodrowych w krajach OECD, Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (ang. Organization for Economic Co-operation and Development) ilość tego typu operacji w 2015 r. wynosiła 112 na każde 100 tys. mieszkańców, co klasyfikowało Polskę na 28. pozycji wśród 34 raportowanych krajów OECD. Jednak już 2019 r. odnotowano wzrost do poziomu 179 operacji, przekraczając średnią 174 dla wszystkich krajów OECD. Skutkowało to awansem Polski na 19. pozycję z 35 raportowanych krajów OECD ("Hip and knee replacement", 2021). Natomiast według danych NFZ (Narodowy Fundusz Zdrowia), w 2022 r. wykonano ponad 105 tys. zabiegów endoprotezoplastyk, co w porównaniu do 2021 r. oznaczało wzrost rok do roku o prawie 16,5% dla stawu biodrowego i 26,8% dla stawu kolanowego (NFZ, 2024).

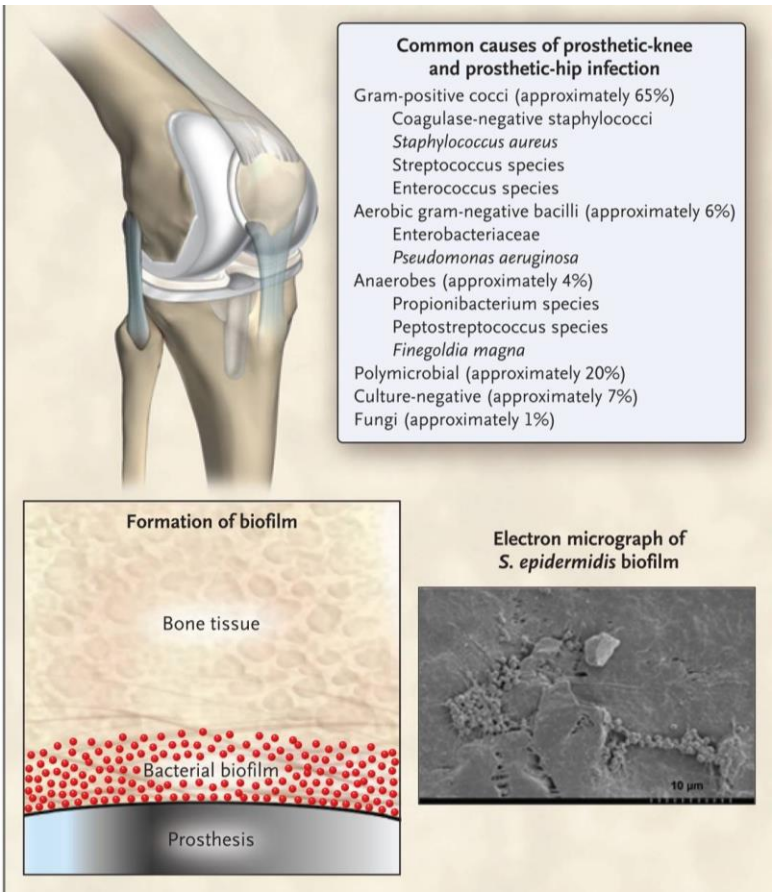
Wraz ze wzrostem wykonywanych operacji, rośnie ilość powikłań. Zakażenie okołoprotezowe (PJI, ang. periprosthetic joint infection) to jedno z poważniejszych w leczeniu komplikacji po zabiegach endoprotezoplastyki dużych stawów (biodrowych i kolanowych). Wymaga szybkiej diagnostyki, wdrożenia właściwego leczenia, w celu uniknięcia konieczności wymiany implantu i kolejnych zabiegów chirurgicznych. Brak właściwej diagnozy lub bardzo późne zdiagnozowanie PJI może prowadzić do śmierci pacjenta.

Nie ma dostępnych danych o ilości powikłań septycznych w Polsce. Szacuje się jednak, że w krajach rozwiniętych odsetek PJI wynosi 1-4% wszystkich wykonywanych zabiegów (Izakovicova i in., 2019). Górna granica tego przedziału ryzyka odnosi się do zabiegów rewizyjnych, czyli reoperacji wykonywanych z powodu stwierdzenia powikłań. Inne badania wskazują, że ryzyko ponownego zakażenia po interwencji chirurgicznej z powodu PJI wynosi odpowiednio 7,6% i 8,8% w przypadku operacji rewizyjnych jednoetapowych i dwuetapowych (Rowan i in., 2018). Zauważono również, że w przypadku całkowitej wymiany stawu kolanowego u 1.63% pacjentów dochodzi do infekcji w ciągu dwóch pierwszych lat od operacji.

Zakażenie okołoprotezowe wywoływane jest głównie przez bakterie Gram-dodatnie, jak gronkowce złociste (łac. staphylococcus aureus), czy gronkowce koagulazo-ujemne (CNS, ang. coagulase-negative staphylococci), które stanowią nawet 60% wszystkich PJI. Bakterie Gram-ujemne, enterokoki i paciorkowce, odpowiadają

natomiast za 10%, a grzyby za 1% PJI (Del Pozo i Patel, 2009; Lamagni, 2014; Chisari i in., 2022). Istnieją dwie podstawowe, patogenetyczne koncepcje PJI. Pierwsza zakłada, że PJI jest związane z operacją, podczas której niewielka liczba bakterii kontaminuje implant i tworzy biofilm (Rysunek 13), pomimo właściwie funkcjonującego układu odpornościowego pacjenta i stosowanej farmakoterapii przeciwdrobnoustrojowej. Druga zakłada, że bakterie wnikają do sterylnej przestrzeni stawowej w procesie bakteriemii, powstałej w dowolnie odległym procesie infekcyjnym, w innej części ciała (Gemmel i in., 2012). Proces tworzenia biofilmu można w przybliżeniu podzielić na cztery etapy. W pierwszym, adhezji, komórki planktonowe przyłączają się do powierzchni implantu. W drugiej fazie unieruchamiania następuje tworzenie wczesnego biofilmu, poprzez przejście od fenotypu planktonowego do fenotypu biofilmowego, z niewielkimi agregatami bakterii i produkcją substancji zewnątrzkomórkowych (EPS, zewnątrzkomórkowe substancje polimeryczne, ang. extracellular polymeric substances). W trzecim etapie tworzy się dojrzały biofilm, poprzez konsolidację klastrów bakteryjnych w mikrośrodowiska o unikalnych gradientach pH i specyficznym sposobie komunikacji między bakteriami w tzw. sygnalizacji wykrywania kworum (ang. quorum sensing). W ostatnim etapie może dochodzić do uwalniania wybranych komórek i agregatów do otaczającego środowiska (Staats i in., 2021). Może to skutkować tworzeniem się biofilmu w innych miejscach lub doprowadzić do zakażeń ogólnoustrojowych. O ile komórki planktonowe są stosunkowo podatne na obronę immunologiczną gospodarza i terapię antybiotykami, o tyle bakterie tworzące biofilm mają ograniczoną mobilność i pozostają na endoprotezie (McConoughey i in., 2014).

Tworzenie biofilmu jest zależne od wielu czynników związanych zarówno z rodzajem patogenu, jak i samym organizmem pacjenta (Lovati i in., 2016; Vidlak i Kielian, 2016). Proces ten może się zacząć w ciągu kilku godzin od kontaktu drobnoustroju z implantem, by w ciągu kolejnych 2 do 6 tygodni, doprowadzić do dojrzałej postaci biofilmu (Veerachamy i in., 2014; Thompson i in., 2017).



Rysunek 13. Tworzenie biofilmu na powierzchni endoprotezy, patogeny najczęściej wywołujące PJI. Opracowane na podstawie (Del Pozo i Patel, 2009).

1.6.2. Postępowanie kliniczne

Infekcje okołoprotezowe mogą prowadzić do obluzowania protezy, wywoływać ropne procesy zapalne, a w chorobie postępującej, doprowadzić również do zniszczenia kości, w miejscu styku z implantem (Szczęsny i in., 2005). Fakt tworzenia się bakteryjnych barier na endoprotezie jest niezwykle istotny, ponieważ uważa się, że w około 65% przypadków przyczyną PJI, jest występowanie biofilmu na przestrzeni stawowej (Gbejuade i in., 2014). Jego tworzenie znacząco utrudnia diagnostykę, która powinna doprowadzić do izolacji i identyfikacji patogenu powodującego infekcję. Standardowym postępowaniem jest wykonanie punkcji i posiewu z płynu stawowego, ale czułość tego badania jest bardzo zróżnicowana i waha się od 45% do 100% (Tsitko i in., 2022). Biofilm nie tylko ogranicza łatwe wyizolowanie bakterii np. z płynu stawowego, ale również stanowi naturalną barierę, obniżającą skuteczność farmakoterapii. W przypadku wytworzenia biofilmu na powierzchni implantu samo

podanie pacjentowi antybiotyku uznaje się za nieskuteczne i skutkujące jedynie opóźnieniem w postawieniu właściwej diagnozy (Białecki i in., 2017).

Wczesna i szybka diagnoza PJI pozwala na przeprowadzenie interwencji chirurgicznej, dającej możliwość zachowania implantu przez pacjenta. W trakcie zabiegu wykonywane jest oczyszczanie stawu, wymiana ruchomych części implantu i szczotkowanie pozostałych elementów endoprotezy. Podejmuje się decyzję o zastosowaniu empirycznej antybiotykoterapii, a następnie celowanej, w zależności od wyników badań laboratoryjnych. Skuteczność takiego schematu leczenia jest wysoka w przypadku, gdy od pojawienia się objawów u pacjenta do podjęcia terapii nie minie więcej niż 7 dni (Parvizi i Gehrke, 2021).

W przypadku późnej diagnozy PJI leczenie jest bardziej skomplikowane, wieloetapowe i znacząco obciążające dla pacjenta. Polega na całkowitym usunięciu endoprotezy i pozostawieniu stawu wiszącego lub zastosowaniu spacera z antybiotykiem, wykonanego z kostnego cementu. Dopiero po kilkukrotnym wykonaniu badań mikrobiologicznych płynu stawowego i uzyskaniu negatywnych wyników oraz ustabilizowaniu parametrów zapalnych u pacjenta, można przystąpić do kolejnego etapu, czyli implementacji endoprotezy rewizyjnej. Leczenie wieloetapowe trwa od kilku tygodni do kilku miesięcy i wymaga stosowania długotrwałej antybiotykoterapii.

W innych schematach leczenia stosowanych przez niektóre ośrodki wykonuje się procedury jednoetapowe, z całkowitą wyminą implantu. Zaletą tej metody jest krótszy czas leczenia, obniżenie kosztów oraz zmniejszenie dodatkowej chorobowości i odsetka umieralności związanych z operacją. Należy jednak podkreślić, że obecnie brakuje badań randomizowanych, wykazujących wyższość jednoetapowego leczenia nad rutynowo stosowanym podejściem dwuetapowym w eradykacji PJI (Zahar i in., 2019; Maale i in., 2020; Parvizi i Gehrke, 2021; Lindberg-Larsen i in., 2021; Blom i in., 2022).

Rozpoznanie infekcji okołoprotezowych jest utrudnione z powodu niejednoznacznych wyników badań mikrobiologicznych i laboratoryjnych oraz często występujących skąpych objawów klinicznych. Odczuwany przez pacjenta ból, pojawiające się obrzęki, krwiaki, czy podwyższone parametry zapalne w badaniach diagnostycznych, są podobne do objawów miejscowego PJI, ale mogą być mylone z naturalną reakcją organizmu we wczesnym okresie po zabiegu chirurgicznym.

Natomiast objawy PJI, które pojawiają się wiele miesięcy lub lat po operacji, mogą być trudne do odróżnienia od aseptycznego obluzowania implantu, wynikającego z reakcji zapalnej na produkty degradacji polietylenu (Kim i Cho, 2021). Badania obrazowe jak zdjęcia radiograficzne, tomografia komputerowa, ultrasonografia czy rezonans magnetyczny mogą być pomocne w ukierunkowaniu chirurga do postawienia diagnozy, ale na ich podstawie nie można jednoznacznie stwierdzić PJI (Arvieux i Common, 2019).

1.6.3. Biomarkery

Obecnie uważa się, że w przypadku podejrzenia infekcji okołoprotezowej lekarz nie powinien polegać na pojedynczym teście, w celu potwierdzenia lub wykluczenia PJI. Zbadano wiele markerów o różnym stopniu predykcyjności PJI, które można podzielić na dwie grupy: markery z krwi (surowicy i/lub osocza) oraz z płynu stawowego.

1.6.3.1. Markery oznaczane w krwi

Badania laboratoryjne markerów stanów zapalnych z surowicy są łatwo dostępne i tanie, przez co odgrywają istotną rolę w początkowej diagnostyce w kierunku PJI. Z uwagi na często występujące nieswoiście podwyższone poziomy niektórych z nich, związane ze schorzeniami współistniejącymi, wyniki tych badań powinny być interpretowane w połączeniu z innymi testami i ogólnym obrazem klinicznym pacjenta (Sigmund i in., 2021).

Najczęściej wykonywanymi badaniami z krwi są: szybkość sedymentacji erytrocytów, OB (odczyn Biernackiego) oraz stężenie CRP w surowicy (białko C-reaktywne, ang. C-Reactive Protein). Chociaż uważane są za bardzo użyteczne w diagnostyce PJI, badania wykazują na szerokie zakresy wartości czułości (CRP -62%-100%, OB - 33%-95%) i swoistości (CRP – 64%-96%, OB – 60%-100%), (Sigmund i in., 2021). Wynika to z faktu, że są ogólnymi wskaźnikami stanów zapalnych, na które mogą mieć wpływ infekcje niezwiązane z PJI, choroby autoimmunologiczne czy nowotworowe. Ich poziomy często pozostają w normie w przypadkach PJI wywołanych przez drobnoustroje o niskiej wirulencji, dlatego niskie poziomy OB i CRP nie mogą prowadzić do wykluczenia infekcji okołoprotezowej (Pérez-Prieto i in., 2017). Dodatkowe trudności interpretacyjne pojawiają się przy

podwyższonych wartościach CRP i OB w okresie bezpośrednio po zabiegu operacyjnym.

Coraz częściej stosowym markerem, oznaczanym zarówno w pełnej krwi, jak i w osoczu, jest stężenie D-dimerów. To produkty rozpadu fibryny, powstające w procesie krzepnięcia krwi, które u zdrowych osób wykrywane są w śladowych ilościach. Odkąd stężenie D-dimerów zastosowano jako marker infekcji u pacjentów z sepsą (Rodelo i in., 2012), przeprowadzono wiele badań nad korelacją poziomu D-dimerów z PJI (C. Li i in., 2020). Stwierdzono między innymi, że nie ustępują badaniom CRP i OB w diagnozowaniu PJI, wykazując wysoką czułość (81%) i swoistość (82%). Czułość diagnostyczna tego markera jest jeszcze wyższa (94%), w przypadkach infekcji wywołanych przez powolnie rozwijające się patogeny (Tarabichi i in., 2023). D-dimery zostały włączone niedawno do międzynarodowych zaleceń dotyczących standardów diagnostyki PJI, które zostaną omówione w dalszej części rozdziału (Parvizi i Gehrke, 2021). Najnowsze badania wskazują jednak, że należy ostrożnie interpretować wyniki stężenia D-dimerów u pacjentów z zaburzeniami nadkrzepliwości, ponieważ progi diagnostyczne mogą być wyższe dla tej grupy chorych (Cutter i in., 2023). Inne badania wykazały istotne różnice w dokładności testów D-dimerów, z uwagi na znaczącą zmienność wartości progowych, w zależności od rodzaju próbki (surowica lub osocze) (Pannu i in., 2020; Grzelecki i in., 2020).

Kolejnym markerem PJI oznaczanym w osoczu krwi jest fibrynogen, białko wykorzystywane jako wskaźnik zaburzenia krzepliwości krwi, który jest również istotnym elementem obrony organizmu przed infekcjami bakteryjnymi. W opracowaniu przeglądowym, na podstawie opublikowanych badań, stwierdzono, że czułość i swoistość oceny fibrynogenu w diagnostyce PJI, wynosi odpowiednio 79% i 73% (Xu, Xie i in., 2021). Są to wartości gorsze niż w przypadku opisywanych wcześniej D-dimerów, jednak w szczególnych przypadkach diagnostyki przed zabiegami rewizyjnymi, fibrynogen w osoczu wykazywał wysoką czułość 93,8%, a w połączeniu z CRP równie wysoką swoistość 93,5% (Xu, Liu i in., 2022). Wnioski z badań nad tym markerem nie powalają na stwierdzenie, że może być samodzielnie stosowany do jednoznacznego potwierdzenia lub wykluczenia infekcji, jednak jest uznawany za ważny, pomocniczy marker w diagnostyce pacjentów z podejrzeniem PJI.

Potencjalnie użytecznym markerem w diagnostyce PJI jest Interleukina 6 (IL-6) oznaczana w surowicy krwi. Jest to cytokina sygnałowa, odgrywająca istotną rolę w

mechanizmach obronnych organizmu, stymuluje różnicowanie limfocytów B, co aktywuje limfocyty T oraz reguluje syntezę białek ostrej fazy: CRP i fibrynogenu. W metaanalizie opracowanej na podstawie 30 badań, oceniających przydatności IL-6 w diagnostyce PJI, podkreślono jej wysoką łączną czułość i swoistość, odpowiednio 0,76 i 0,88 w wykrywaniu PJI. Dokładany poziom odcięcia IL-6 nie jest ustalony, a wartości czułości i specyficzności testu podawane w badania, opierając się na różnych poziomach odcięcia (J. Li i in., 2022). Z tego powodu ocena wyłącznie poziomu IL-6 w surowicy może być wyzwaniem.

Obiecującym markerem w diagnostyce PJI jest stosunek neutrofili do limfocytów w surowicy (NLR, ang. neutrophil to lymphocyte ratio). Względny wzrost liczby neutrofili i spadek liczby limfocytów w zakażeniach bakteryjnych sugeruje, że stosunek neutrofili do limfocytów w surowicy może być wykorzystany jako biomarker w diagnostyce PJI. Obecnie przydatność diagnostyczna NLR w diagnostyce PJI jest ograniczona, z uwagi na wysoki odsetek wyników fałszywie ujemnych. Z tego powodu podkreślana jest potrzeba większej liczby badań nad określeniem poziomu NLR w korelacji z PJI (Yu i in., 2020; Sigmund i in., 2021). Pomocnym w diagnostyce PJI, ale również wymagającym dalszych badań klinicznych jest współczynnik albuminowo-globulinowy, czyli stosunek albuminy do globuliny w surowicy. Obecnie oceniany jest jako potencjalnie wartościowy biomarker diagnostyczny w PJI, którego wyniki predykcyjne są porównywalne z badaniami OB i CRP (R. Wang i in., 2023).

Uznaje się natomiast, że powszechnie stosowane do oceny występowania stanu zapalnego w organizmie: liczba białych krwinek (WBC, ang. white blood cell count) oraz odsetek granulocytów wielojądrzastych (PMN%, ang. polymorphonuclear leukocytes) oznaczane z krwi, odgrywają niewielką rolę w diagnostyce PJI, z uwagi na ograniczone różnicowanie i małą ilość badań (Toossi i in., 2012).

1.6.3.2. Markery oznaczane w płynie stawowym

Płyn stawowy wytwarzany jest przez błonę maziową wyścielającą wewnętrzną powierzchnię torebki stawowej. Prawidłowy płyn jest zazwyczaj bezbarwny lub słomkowożółty, a zmiana jego barwy od żółtej do brunatnej występuje z reguły w stanach zapalnych. Składa się z elementów osocza, które z krwi transportowane są do przestrzeni stawowych oraz substancji wytwarzanych w samym stawie. Główną różnicą między płynem stawowym, a innymi płynami ustrojowymi jest wysokie stężenie kwasu

hialuronowego, produkowanego przez komórki błony maziowej. Obecność tego kwasu powoduje, wysoką lepkość płynu, dzięki czemu doskonale chroni stawy, zapewniając amortyzację i smarowanie ruchomych powierzchni. Inną funkcją pływu stawowego jest wspomaganie transportu substancji odżywczych do chrząstki stawowej oraz usuwanie metabolitów. W płynie tym, oprócz licznych komórek monocytów czy limfocytów, można zidentyfikować różne biomarkery przydatne w diagnostyce PJI. Istotną rolę w tej grupie markerów odgrywa alfa-defensyna, która została szczegółowo opisana w dalszej części monografii.

O ile ocenę WBC i PMN% w przypadku badań z krwi uznaje się za mało istotną w diagnostyce PJI, o tyle określanie ich stężenia w płynie stawowym jest bardzo cennym i uznanym narzędziem diagnostycznym. W badaniu oceniającym ponad stu pacjentów poddanych zabiegom rewizyjnym stawu kolanowego lub biodrowego porównano pięć markerów płynu stawowego. Wskazano, że liczba WBC w płynie stawowym charakteryzowała się najwyższą przydatnością diagnostyczną, natomiast drugim istotnym markerem był odsetek PMN% (Diniz i in., 2023). Określone zostały progi diagnostyczne dla WBC (>3000 komórek/µl) i PMN% (>80%) w płynie stawowym i włączono je do zaleceń w diagnostyce PJI (Parvizi i Gehrke, 2021). Należy jednak ostrożnie intepretować wyniki stężenia obu markerów w płynie stawowym, ponieważ wykazano, że mogą być zaniżone w przypadku stosowania antybiotykoterapii przed procesem diagnostycznym (Shahi, Deirmengian i in., 2015). Innymi czynnikami ograniczającymi ocenę ilościową i jakościową tych markerów są: obecność krwi w płynie, zapalenia stawów, obecność ropy, dna moczanowa czy mała objętość pobranego płynu.

Rutynowo zaleca się również ocenę stężenia CRP w płynie stawowym. Badania wykazały, że oznaczanie CRP w płynie stawowym jest bardziej skuteczne w przewidywaniu PJI niż badanie stężenie tego markera w surowicy (Parvizi, Jacovides i in., 2011). Wyniki kolejnych doświadczeń doprowadziły do uznania podwyższonego CRP w płynie stawowych (> 6,9 mg/l) za czynnik prognostyczny PJI, co skutkowało włączeniem oceny tego biomarkera do zaleceń standardów diagnostycznych PJI (Parvizi i Gehrke, 2021). Najnowsze badania, przeprowadzane zgodnie z tymi zaleceniami, określiły czułość testu CRP w płynie stawowym na poziomie 74,5%, przy swoistości wynoszącej 98% w ocenie pacjentów z podejrzeniem PJI, potwierdzając

jednocześnie wyższość oceny stężenia CRP w płynie stawowym w stosunku do oznaczeń w surowicy (Baker i in., 2022).

Innym markerem w diagnostyce PJI wykrywanym w płynie stawowym jest esteraza leukocytarna. To enzym wydzielany przez aktywowane neutrofile, kierowane do miejsc występowania infekcji. Esterazę leukocytarną, można wykryć za pomocą kolorymetrycznych testów paskowych, uzyskując szybki odczyt dzięki reakcjom wywołującym zmianę koloru. Jest powszechnie stosowanym testem w badaniach moczu, ze względu na bardzo niski koszt, wygodną formę i łatwą dostępność. Z uwagi na analizę kolorymetryczną, są czułe na obecność krwi w płynie, co powoduje konieczność odwirowywania próbki przed testem (Y. Chen i in., 2019). W największym badaniu, na podstawie 659 próbek płynu stawowego, oceniono przydatność pasków esterazy leukocytarnej w diagnostyce PJI, wykazując czułość i swoistość tej metody wynoszącą odpowiednio 75% i 90,9% (Shahi, Tan i in., 2017). Podkreślano jednocześnie brak dobrze zdefiniowanej wartości granicznej dla tego testu. To jednak nie wykluczyło go z zaleceń standardów postępowania w diagnostyce PJI (Parvizi i Gehrke, 2021).

Jednym z najnowszych markerów stanu zapalnego wykorzystywanym w diagnostyce PJI jest kalprotektyna, białko układu odporności wrodzonej. Jest uwalniana przez neutrofile i makrofagi w mechanizmie obronnym przeciwko infekcjom bakteryjnym. Wskazywana jest jako potencjalny biomarker zdolny do samodzielnego przewidywania PJI w diagnostyce przedoperacyjnej ze względu na wysoką czułość i swoistość - 95% (Tang i in., 2022). Jednak, żeby tak się stało, niezbędna jest większa ilość badań potwierdzających niezawodność kalprotektyny w diagnostyce PJI.

1.6.4. Międzynarodowe zalecenia w diagnostyce zakażeń okołoprotezowych

Nie istnieje jedno, powszechnie przyjęte kryterium diagnostyczne dla PJI, a proponowane różne definicje, były często ze sobą sprzeczne. Z tego powodu grupa naukowców i lekarzy, składająca się z 400 ekspertów z 51 krajów całego świata skupionych wokół MSIS (ang. Musculoskeletal Infection Society), opracowała rekomendacje w diagnostyce PJI. Prace zespołu doprowadziły do publikacji tzw.

konsensusów ICM (ang. International Consensus Meeting), standaryzujących diagnostykę PJI.

Przez lata najczęściej stosowaną klasyfikacją diagnostyczną PJI były kryteria opracowane przez ekspertów MSIS w 2011 r. i 2013 r. (Parvizi, Zmistowski i in., 2011; Parvizi i Gehrke, 2014). W konsensusie MSIS 2013 określono dwa główne kryteria diagnostyczne dla PJI. Pierwszym jest konieczność wyizolowania tego samego patogenu, z co najmniej dwóch próbek płynu stawowego lub tkanek, drugim stwierdzenie obecności przetoki komunikującej się z endoprotezą. Spełnienie jednego z nich powala na postawienie diagnozy PJI. Jeśli żadne z tych kryteriów nie jest spełnione, należy stosować kryteria pomocnicze. W przypadku zaleceń MSIS 2013, do prawidłowej diagnozy PJI konieczne było spełnienia co najmniej trzech z nich. Obejmowały one ocenę poziomu CRP i OB z krwi oraz odsetka granulocytów (PMN%>70%) i liczby leukocytów w płynie stawowym (>2000 komórek/µl). Innymi badaniami pomocniczymi były: pozytywny wynik oceny histopatologicznej tkanki okołoprotezowej oraz dodatni wyniku posiewu, określany jako izolację pojedynczego drobnoustroju z pojedynczej próbki płynu stawowego lub tkanki.

Pomimo jasnych kryteriów diagnostycznych, rozpoznanie PJI nadal było utrudnione z powodu niejednoznacznych wyników badań laboratoryjnych, szczególne u pacjentów z przewlekłą infekcją. Badania mikrobiologiczne płynu stawowego często przynoszą zarówno fałszywie dodatnie, jak i fałszywie ujemne wyniki (Dandé i in., 2020). Występowanie przewlekłych chorób zapalnych jak toczeń rumieniowaty układowy, zesztywniające zapalenie kręgosłupa, czy reumatoidalne zapalenie stawów oraz zakażenia układów pokarmowego, moczowego czy oddechowego, mogą prowadzić do uzyskiwania wyników fałszywie dodatnich przy ocenie poziomów CRP i OB (Covey i Albright, 1987; Pérez-Prieto i in., 2017). Natomiast na fałszywie ujemne wyniki mogą wpływać patogeny o niskiej wirulencji, wywołujące PJI oraz ocena stężenia CRP i OB w trakcie antybiotykoterapii (Shahi, Deirmengian i in., 2015).

Z tego powodu rekomendacje MSIS z 2013 r. wymagały modyfikacji, co nastąpiło w 2018 r., dzięki wynikom wieloośrodkowego badania, w którym oceniono zdolność predykcyjną każdego z kryteriów PJI, oraz możliwość rozszerzenia algorytmu diagnostycznego o nowe biomarkery (Parvizi, Tan i in., 2018). W zaleceniach znalazły się nowe testy, korelujące PJI z podwyższonym stężeniem D-dimerów w osoczu oraz stężeniem CRP i obecnością alfa-defensyn w płynie stawowym. Wyniki tego badania

doprowadziły do opublikowania zmodyfikowanej wersji konsensusu ICM 2018, w którym poszczególne kryteria pomocnicze przestały być traktowane równorzędnie, o czym świadczy wprowadzanie kategoryzacji testów, poprzez zaproponowany system punktacji (polskie wydanie konsensusu ICM 2018 - Parvizi i Gehrke, 2021). Jak wynika z Tabeli 1 aby potwierdzić PJI, na podstawie najnowszych kryteriów pomocniczych, należy uzyskać co najmniej 6 punktów, co w przypadku niektórych badań oznacza pozytywny wynik już z dwóch testów proponowanych w konsensusie ICM 2018. Należy zauważyć, że włączona w kryteriach alfa-defensyna znajduje się w grupie najwyżej punktowanych testów w diagnostyce PJI. Drugi nowy biomarker PJI, poziom D-dimerów w osoczu, uznano wówczas za nadrzędny nad innymi markerami z krwi, z uwagi na wysoką czułość (89,5%) i swoistość (92,8%) na poziomie odcięcia określonym w konsensusie ICM 2018 (Shahi, Kheir i in., 2017). Jak podkreślono we wcześniejszym opisie D-dimerów, najnowsze badania wykazują jednak istotne ograniczenia w stosowaniu tego markera w diagnostyce PJI. Niemniej jednak zaproponowany w konsensusie ICM 2018, algorytm diagnostyczny predykcji PJI wykazał znacząco większą czułość w porównaniu z zaleceniami MSIS z 2013 r. (97,7% vs 86,9%), przy tej samej swoistości (99,5%) dla obu algorytmów.

Wkrótce po zaleceniach ICM 2018, opublikowano europejskie zalecenia w diagnostyce PJI, EBJIS 2021 (McNally i in., 2021). Kryteria potwierdzające PJI z zaleceń EBJIS 2021, zestawiono w Tabeli 1. W zaleceniach zdefiniowano również kryteria niejednoznacznej diagnozy PJI, przy których infekcję można uznać za prawdopodobną i mało prawdopodobną. Według europejskiego systemu klasyfikacji, do potwierdzenia PJI wystarczy jeden pozytywny wynik wymienionych w rekomendacji testów. Załączono jednak kilka uwag warunkujących taki sposób interpretacji testów. Po pierwsze należy ostrożnie interpretować wyniki testów oceny leukocytów w płynie stawowym i badań histologicznych, u pacjentów we wczesnym okresie pooperacyjnym, lub u których stwierdzono w wywiadzie aktywną chorobę zapalną stawów, dnę moczanową, metalozę, czy złamanie okołoprotezowe. Natomiast test na obecność alfa-defensyny nie powinien być wykonywany w przypadku ostrego zapalenia stawów, niepożądanego odczynu tkankowego (ALTR; ang. adverse local tissue reactions), metalozy, dny moczanowej, czy krwiaków. Zalecana jest także szczególna uwaga w analizie badań mikrobiologicznych próbek pobranych śródoperacyjnie w przypadku stosowania antybiotykoterapii i rozważenie zlecenia badań molekularnych.

Musculoskeletal Infection Society (ICM) 2018	European Bone and Joint Infection Society (EBJIS) 2021
(spełnienie jednego z warunków głównych lub decyzja na podstawie warunków pomocniczych) *Główne:* I. Obecność przetoki komunikującej się z protezą lub II. Wyizolowanie tego samego patogenu (bakterii) w posiewie z co najmniej dwóch różnych próbek tkanki próbek płynu pobranych ze stawu w okolicy protezy przed operacją *Pomocnicze w diagnostyce przedoperacyjnej:* Badania z krwi: 1. Ocena CRP (> 10 mg/l) lub D-dimer (>860 ng/ml) w surowicy – 2pkt. 2. Ocena OB z surowicy (> 30 mm/h) – 1pkt. Badania z płynu stawowego: 3. Ocena poziomu leukocytów (> 3000 kom./µl) lub leukocyte esterase (++) – 3pkt. 4. Pozytywny wynik testu na obecność α-defensyn – 3pkt. 5. Ocena odsetka granulocytów w rozmazie płynu stawowego (> 80 %) – 2pkt. 6. Ocena CRP (> 6,9 mg/l) – 1pkt. Decyzja: ≥6 – infekcja, 2-5 – możliwa infekcja, 0-1 – brak infekcji. *Pomocnicze w diagnostyce śródoperacyjnej:* 1. Ilość punktów z etapu diagnostyki przedoperacyjnej …. 2. Pozytywny wynik histologiczny: 5 i więcej neutrofili w 5 i więcej polu widzenia mikroskopu o powiększeniu x 400 w badaniu tkanki okołoprotezowej) – 3pkt. 3. Obecność ropnej wydzieliny – 3pkt. 4. Dodatni wynik posiewu – 2pkt. Decyzja: ≥6 – infekcja, 4-5 – nierozstrzygający, ≤3 – brak infekcji.	(spełnienie jednego z warunków potwierdza zakażenie) 1. Obecność przetoki komunikującej się z protezą. 2. Wyizolowanie tego samego patogenu (bakterii) w posiewie z co najmniej dwóch różnych próbek tkanki próbek płynu, pobranych ze stawu w okolicy protezy w trakcie zabiegu. 3. Pozytywny wynik histologiczny: 5 i więcej neutrofili w 5 i więcej polach widzenia mikroskopu o powiększeniu x 400, lub widoczna obecność mikroorganizmu. 4. Badanie mikrobiologiczne po sonikacji implantu: > 50 CFU/ml dowolnego organizmu. Badania z płynu stawowego: 5. Ocena poziomu leukocytów (> 3000 kom./µl) 6. Ocena odsetka granulocytów w rozmazie płynu stawowego (> 80 %). 7. Pozytywny wynik testu immunoenzymatycznego lub immunochromatograficznego na obecność α-defensyn.

Tabela 1. Kryteria diagnostyki PJI. Opracowane na podstawie (McNally i in., 2021, Parvizi i Gehrke, 2021). Dla zaleceń EBJIS 2021, wymieniono jedynie kryteria potwierdzające PJI. Oznaczenia: leukocyte esterase – test paskowy esterazy leukocytów, wynik ++; CFU (ang. colony-forming unit).

1.7. Rola alfa-defensyn w diagnostyce zakażeń okołoprotezowych

Ze względu na potrzebę poszukiwania nowych markerów, które mogłyby samodzielnie przewidywać infekcje okołoprotezowe, w badaniu przeprowadzonym przez Deirmengiana i in. (2014b) oznaczono 16 potencjalnych biomarkerów PJI w

płynie stawowym pobranym od pacjentów, oceniając konieczność wykonania zabiegów rewizyjnych u 95 pacjentów po endoprotezoplastyce stawów kolanowych i biodrowych. Wyniki dla alfa-defensyny, białka zwiększającego przepuszczalność błony zewnętrznej o bakteriobójczym działaniu (BPI; ang. bactericidal / permeability-increasing protein), elastazy neutrofilowej 2, lipokaliny związanej z żelatynazą neutrofili oraz laktoferyny wykazały 100% czułość i swoistość testów przy poziomach odcięcia odpowiednio 4,8; 2,2; 2,0; 2,2; 7,5 μg/ml. Spośród wielu zaproponowanych biomarkerów w diagnostyce PJI, szczególne nadzieje wiązano z alfa-defensywami, dlatego szybko opracowano i skomercjalizowano pierwszy test diagnostyczny.

1.7.1. Charakterystyka alfa-defensyn

Alfa-defensyny (ozn. AD) należą do grupy peptydów przeciwdrobnoustrojowych, które dzieli się na podgrupy, ze względu na ich strukturę, sekwencję aminokwasów oraz liczbę mostków dwusiarczkowych. Według klasyfikacji Brodgena defensyny zalicza się do anionowych i kationowych peptydów, o strukturze stabilizowanej przez mostki dwusiarczkowe, znajdujące się pomiędzy resztami cysteinowymi (Brogden, 2005). U ssaków wyróżnić można defensyny α-, β-, θ-, z których pierwsze dwie grupy występują u ludzi, natomiast trzecia u małp. Do tej pory opisano sześć alfa-defensyn u ludzi. Obejmują one peptydy ludzkich neutrofili: HNP-1, HNP-2, i HNP-3 (ang. human neutrophil peptides), które występują w dużych ilościach w ziarnistościach neutrofili i różnią się od siebie tylko pierwszym aminokwasem (Mansour i in., 2014). Czwarta AD, HNP-4, stanowi mniej niż 1% całkowitej ilości defensyn w neutrofilach i ma odmienną sekwencję od HNP 1-3. Pozostałe dwie AD, HNP-5 i 6, są syntetyzowane głównie przez komórki Panetha w jelicie cienkim.

Defensyny neutrofilowe są bardzo małe, mają masę około 3,4 kDa, charakteryzują się trzema mostkami dwusiarczkowymi i mają podobną do wszystkich defensyn konformację, o trzypasmowej strukturze β kartki, z pętlą łączącą pasma (Lehrer i Lu, 2011). Mechanizm niszczenia drobnoustroju przez defensyny związany jest z przyłączaniem się peptydów do błony komórkowej patogenu, w oddziaływaniu elektrostatycznym. Powodują one destabilizację błon komórkowych, zaburzenia w regulacji osmotycznej, gradientu pH oraz potencjału błonowego, prowadząc do śmierci komórki. Innym mechanizmem przeciwdrobnoustrojowym jest zdolność peptydów do przekraczania bariery błony i gromadzenia się wewnątrz komórek patogenu, prowadząc

do zahamowania syntezy kwasów nukleinowych lub blokując aktywności niektórych enzymów (Brogden, 2005). Alfa-defensyny w swojej aktywności przeciwko bakteriom Gram-ujemnym, Gram-dodatnim oraz w działaniu przeciwgrzybicznym i przeciwwirusowym są skuteczne przy stężeniach między 1 a 100 μg/ml (Ganz, 2004). Zauważono, że ich efektywność przeciwdrobnoustrojowa jest różna, w zależności od patogenu. HNP-2 wykazuje najsilniejszą aktywność bakteriobójczą przeciwko gronkowcowi złocistemu, w przeciwieństwie do HNP-4, który taką zdolność ma najmniejszą. Natomiast w przypadku pałeczki okrężnicy (łac. escherichia coli), to HNP-4 wykazuje lesze działanie przeciwbakteryjne niż HNP-1 i HNP-3 (Ericksen i in., 2005). Defensyny są uwalniane przez układ odpornościowy człowieka w odpowiedzi na stan zapalny. Szacuje się, że codziennie w organizmie powstaje około $2x10^9$ neutrofili na każdy kilogram masy ciała, co daje porcję około 10 mg defensyn. Ich stężenie rośnie w miejscach tworzenia się procesów zapalnych, a w przypadku infekcji układowych, również w surowicy krwi. W przypadku zakażeń okołoprotezowych poziom detekcji alfa-defensyn w płynie stawowym jest niezależny od patogenu wywołującego PJI (Deirmengian, Kardos, Kilmartin, Gulati i in., 2015).

1.8. Metody i testy do wykrywania obecności alfa-defensyn w płynie stawowym

Obecnie dostępne są dwa komercyjne testy medyczne, pozwalające na wykrycie AD w płynie stawowym. Pierwszym jest immunoenzymatyczny test „Synovasure Alpha Defensin ELISA Test", opracowany przez firmę CD Diagnostics, Claymont, DE, USA, obecnie Zimmer Biomet Diagnostics. Wykonanie tego testu jest możliwe jedynie w akredytowanym przez producenta laboratorium. Na terenie Europy próbkę należy dostarczyć do laboratorium w Niemczech lub Wielkiej Brytanii. Z tego powodu uzyskanie wyniku możliwe jest w ciągu 24-48 godzin. W diagnostyce przedoperacyjnej fakt może nie stanowić istotnego problemu, jednak ogranicza możliwości diagnostyczne w trakcie zabiegów chirurgicznych. Z tego powodu opracowano i skomercjalizowano drugi typ testu na obecność AD w płynie stawowym, śródoperacyjny immunochromatograficzny test Synovasure Alpha Defensin Lateral Flow Test (Zimmer Biomet Diagnostics, Winterthur, Szwajcaria). Umożliwia on binarny odczyt wyniku w ciągu 10 - 20 minut od pobrania płynu stawowego (Zimmer Biomet, 2024c).

Na rynku dostępne są również gotowe zestawy do oznaczania poziomu HNP 1-3 metodą ELISA, jak HNP1-3, Human, ELISA kit, (Hycult Biotech, Holandia), które są przeznaczane jedynie do celów naukowych, co uniemożliwia ich zastosowanie w diagnostyce pacjentów pod kątem PJI.

W dalszej części rozdziału opisane zostaną metody, leżące u podstawy działania obu komercyjnych testów oraz ocena przydatności komercyjnych testów na obecność AD w diagnostyce PJI.

1.8.1. Zasada działania testów ELISA

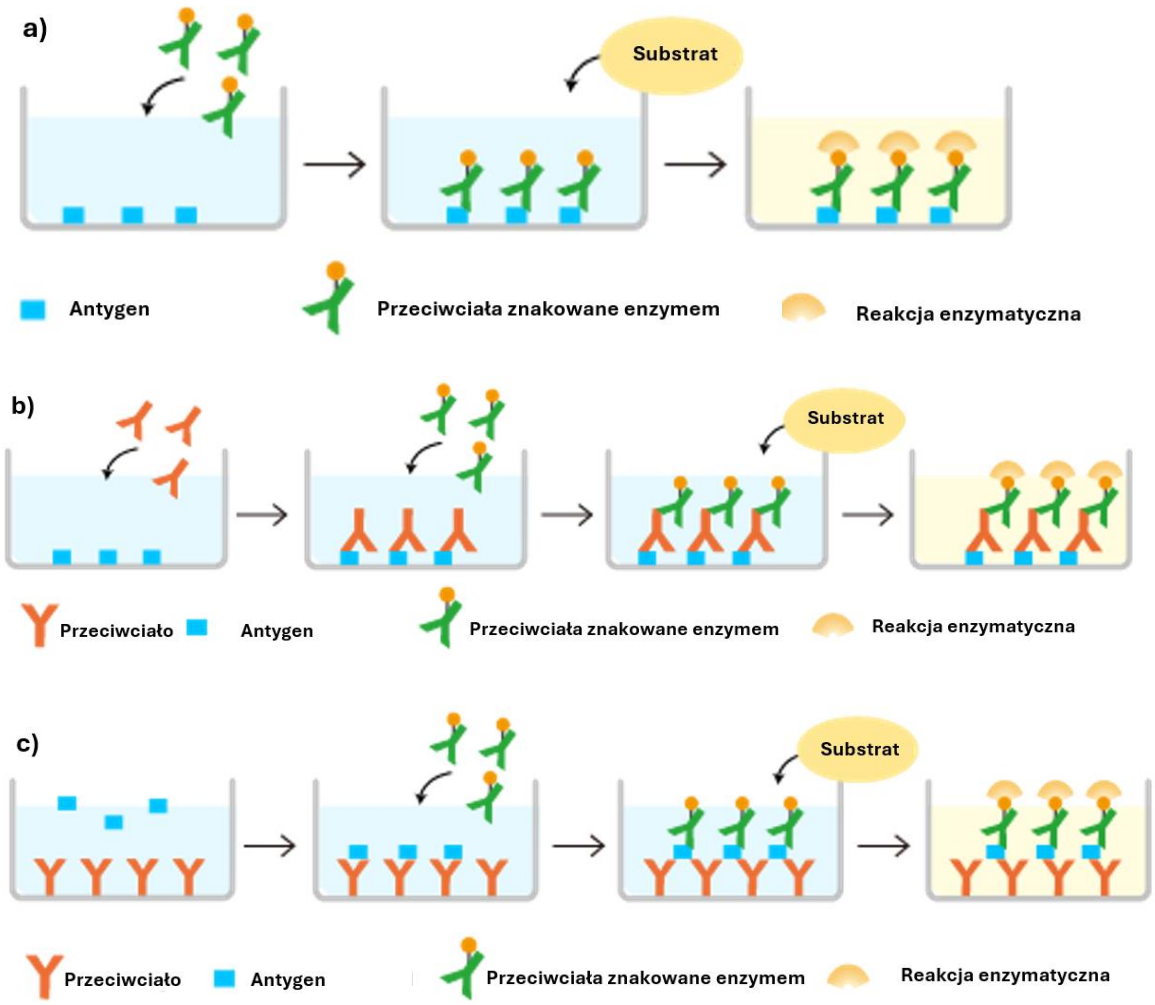
Immunoenzymatyczny test ELISA (ang. enzyme-linked immunosorbent assay) służy do wyrywania i ilościowego oznaczania białek. Jest powszechnie wykorzystywany w badaniach naukowych oraz laboratoriach diagnostycznych. Podstawą tego testu jest tworzenie się wiązań pomiędzy antygenami i skierowanym przeciwko nim przeciwciałom. Powstanie wiązania jest następnie wykrywane poprzez barwną reakcję, dzięki przyłączonym do przeciwciał enzymom i dobranych do nich substratów. Intensywność barwy rejestrowana jest spektrofotometrycznie, poprzez pomiar absorbancji przy określonej długości fali światła, co pozwala na ilościową ocenę antygenu. Im wyższa absorbancja, tym wyższe stężenie badanego białka. Matrycę testu stanowi płytka zawierająca 96 miejsc pomiarowych (studzienek), w których następuje inkubacja przeciwciała z antygenem. W zależności od typu testu powierzchnię każdej studzienki pokrywa się antygenem lub przeciwciałem. Następnie blokuje się powierzchnię roztworem albuminy (np. surowiczej albuminy wołowej, BSA), w celu zapobiegania niespecyficznym wiązaniom białek z fazą stałą płytki. Kolejne kroki uzależnione są od typu metody ELISA, zastosowanej w teście.

W metodzie bezpośredniej ELISA antygen unieruchamiany jest na powierzchni płytki pomiarowej, a następnie po przepłukaniu, inkubowany z wyznakowanym enzymem przeciwciałem (Rysunek 14a). Zaletą tej metody jest szybkość wykonania testu, a ograniczeniem mała ilość dostępnych znakowanych swoistych przeciwciał, dla rzadko oznaczanych diagnostycznie antygenów.

W metodach pośrednich ELISA stosuje się dwa przeciwciała, pierwsze tzw. pierwszorzędowe, bez znacznika, wiążą się z antygenami na powierzchni studzienki pomiarowej. Po przepłukaniu studzienek płytki inkubuje się próbkę drugim

przeciwciałem drugorzędowym, wyznakowanym enzymem lub chemiluminescencyjnie i skierowanym przeciwko przeciwciałom pierwszorzędowym (Rysunek 14b). Chociaż pośrednia metoda ELISA jest bardziej pracochłonna niż metoda bezpośrednia, jej niewątpliwą zaletą jest wyższa czułość oraz duża dostępność znakowanych przeciwciał, przeciwko przeciwciałom wychwytującym. Obie metody wykorzystuje się najczęściej do oznaczania ilości przeciwciał i oceny odpowiedzi immunologicznej na antygeny (Crowther, 2000).

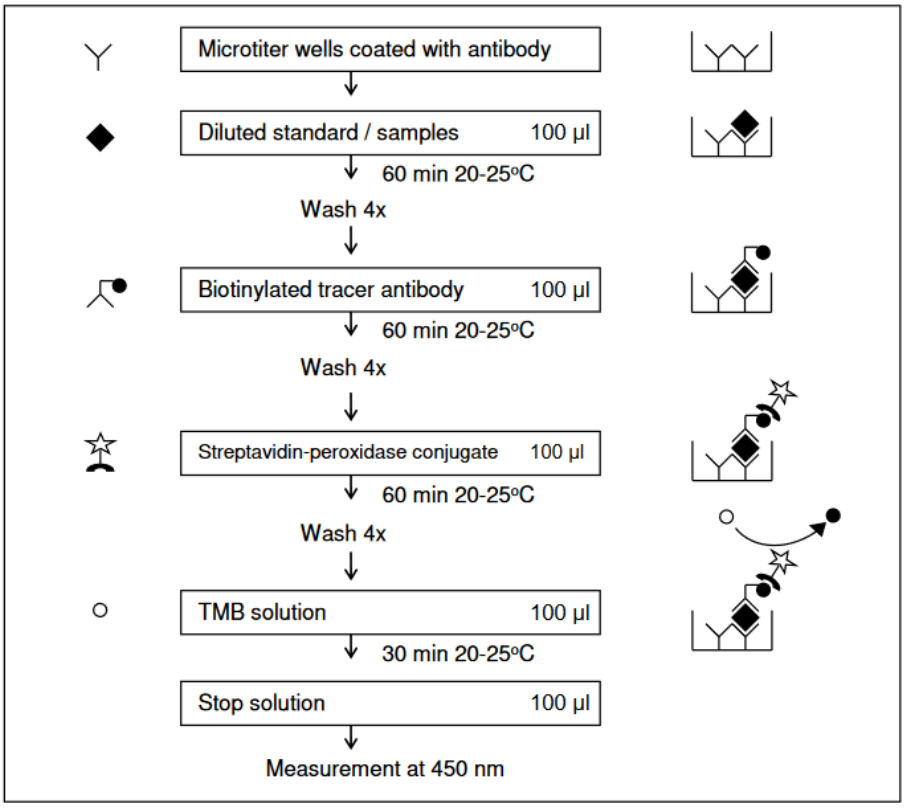
W trzeciej metodzie ELISA i drugiej pośredniej, czyli tzw. kanapkowej, przeciwciała wychwytujące, niewyznakowane, skierowane przeciwko badanemu białku, wiąże się z powierzchnią mikropłytki. Następnie w procesie inkubacji, w studzience testu, badany antygen jest wychwytywany i unieruchamiany przez pierwszorzędowe przeciwciała. W kolejnym kroku, po przepłukaniu, dodawane jest drugie, wyznakowane przeciwciało, tworząc tak zwaną kanapkę, czyli kompleks dwóch przeciwciał, z antygenem pomiędzy nimi. (Rysunek 14c). Uznaje się, że metoda „kanapkowa" jest optymalnym podejściem w badaniach próbek o złożonym składzie analitycznym, ponieważ wychwytywane są jedynie specyficzne dla przeciwciała antygeny (R&D Systems, 2024). Często w tej metodzie, konieczne jest zastosowanie dwóch różnych przeciwciał wychwytujących i potwierdzających, które wiążą się z innymi epitopami antygenu. Jeśli jednak w budowie antygenu występują liczne, powtarzające się epitopy, wykorzystywane są te same przeciwciała zarówno do wychwytywania, jak i do detekcji (R&D Systems, 2024). Testy ELISA wymagają przeprowadzenia procesów optymalizacji w zakresie badanych stężeń antygenów i przeciwciał. W metodzie „kanapkowej" konieczne jest wykonanie wielu rozcieńczeń, zarówno przeciwciał wychwytujących, potwierdzających skierowanych przeciwko antygenowi, jak i drugiemu przeciwciału oraz przeciwciał wyznakowanych enzymem. W wyniku przeprowadzenia tego procesu uzyskuje się widoczny na płytce rozkład intensywności barwy znacznika w zależności od zmiany stężenia, który ilościowo oceniany jest przez pomiar absorbancji.



Rysunek 14. Schemat metody ELISA: bezpośredniej a), pośredniej b) oraz pośredniej „kanapkowej" c). Opracowane na podstawie (Medical Biological Laboratories, 2024).

Przykładowe zastosowanie metody ELISA do ilościowej oceny alfa-defensyn przedstawiono na schemacie protokołu komercyjnego zestawu HNP1-3 ELISA firmy Hycult Biotech (Rysunek 15). Test wykorzystuje metodę ELISA w układzie „kanapkowym". Użyto w nim te same przeciwciała pierwszo i drugorzędowe, HNP1-3, Human, mAb D21, przeciwko alfa-defensynom (HNP1-3). Przeciwciała potwierdzające zostały zmodyfikowane poprzez przyłączenie biotyny, która z uwagi na niewielkie rozmiary nie wpływa na reaktywność biologiczną przeciwciał. Ma również wysokie powinowactwo do streptawidyny, tworząc kompleks, który jest jednym z najczęściej wykorzystywanym do znakowania białek systemem koniugacji. Biotynylowane przeciwciało potwierdzające wiąże się z wychwyconymi alfa-defensynami (HNP1-3). Koniugat streptawidyna-peroksydaza wiąże się z biotynylowanym przeciwciałem śledzącym, a następnie reaguje z substratem, tetrametylobenzydyną (TMB). Reakcja enzymatyczna jest zatrzymywana przez dodanie kwasu szczawiowego. Absorbancja

mierzona za pomocą spektrofotometru przy długości fali 450 nm. Krzywa kalibracyjna jest uzyskiwana poprzez naniesienie absorbancji w stosunku do odpowiednich stężeń standardów ludzkich HNP1-3 (logarytmicznie). Stężenie alfa-defensyn w próbkach, które są analizowane równocześnie ze standardami, można określić na podstawie krzywej kalibracyjnej. Procedura testu określa sposób przygotowania próbki do oceny stężenia alfa-defensyn z osocza, surowicy, płynu oskrzelowo-pęcherzykowego, wydzielin szyjkowo-pochwowych, kału, oraz plwocin. Nie opisuje natomiast w swoim protokole sposobu optymalizacji płynu stawowego do przeprowadzenia oceny ilościowej alfa-defensyn (Hycult Biotech, 2024b).



Rysunek 15. Schemat protokołu komercyjnego zestawu ELISA do oznaczania peptydów HNP1-3. HNP1-3 ELISA kit, Hycult Biotech. Opracowane na podstawie (Hycult Biotech, 2024b).

1.8.2. Test Synovasure Alpha Defensin ELISA Test

Test medyczny „Synovasure Alpha Defensin ELISA Test" (AD-ELISA) jest w rzeczywistości usługą, którą można zlecieć jedynie certyfikowanemu laboratorium i nie ma możliwości zakupu, tych konkretnych zestawów testów ELISA. Producent zaleca, aby dostarczyć próbkę do laboratorium, w krótkim czasie po pobraniu od pacjenta,

wynoszącym poniżej 24 godzin. Jest to duże utrudnienie, które w przypadku Polski wiąże się z koniecznością wysłania próbki do analizy poza granicę kraju. Po otrzymaniu próbki, laboratorium opracowuje wyniki w ciągu 24 do 48 godzin. Test został zoptymalizowany przez producenta na poziomie odcięcia stężenia alfa-defensyn wynoszącym 5,2 μg/ml, a do jego wytworzenia użyto przeciwciał i samych alfa-defensyn firmy Hycult Biotech (Deirmengian, Kardos, Kilmartin, Cameron, Schiller i Parvizi, 2014a). Nie są dostępne szczegóły dotyczące na przykład sposobu rozcieńczania płynu stawowego do testu. Producent deklaruje jedynie, że test został „zoptymalizowany pod kątem oznaczeń w płynie stawowym, w celu eliminacji wpływu lepkości na wynik testu", jednak nie są znane szczegóły tego procesu (Zimmer Biomet, 2024c, Deirmengian, Kardos, Kilmartin, Cameron, Schiller i Parvizi, 2014a). Jest to o tyle ważne, że jak zauważono wcześniej, na rynku dostępne są komercyjne zestawy do oznaczania peptydów HNP1-3, metodą ELISA, innych producentów. Chcąc je zastosować, nawet w celach naukowych, należy mieć na względzie wyniki badań nad oznaczeniem AD w płynie stawowym metodą ELISA, które wykazały, że proces optymalizacji rozcieńczeń płynu stawowego jest istotny a ich dobór, może wpływać na czułość wykonywanego testu (Abdo i in., 2022). Z badań ocieniających możliwości predykcyjne testu AD-ELISA w diagnostyce PJI wynika, że materiał po pobraniu powinien być odwirowywany przed wykonaniem testu, przez 2-3 minut przy 6600 obr/min lub przez 10 minut przy 2000 obr/min., w celu oddzielenia materiału cząsteczkowego od komórkowego. Wykazano bowiem, że próbki zanieczyszczone krwią mogą prowadzić do fałszywie dodatnich wyników testu AD-ELISA (Deirmengian, Kardos, Kilmartin, Cameron, Schiller i Parvizi, 2014a; Zmistowski i in., 2014; Frangiamore i in., 2016). Zauważono ponadto, że stężenie AD w płynie stawowym nie zmienia się przez co najmniej 48 godzin od pobrania, przy przechowywaniu próbki w temperaturze pokojowej. Z drugiej strony wykazano, że szybkie zamożnienie płynu stawowego po aspiracji i przechowywanie ich w stabilnych biologicznie warunkach (-80°C) nie wpływa na wynik testu (Deirmengian, Kardos, Kilmartin, Cameron, Schiller i Parvizi, 2014a).

Według producenta test AD-ELISA charakteryzuje się 97% czułością (95% CI [przedział ufności, CI, ang. confidence interval], 86%–100%) i 96% swoistością (95% CI, 91-99%), na poziomie odcięcia stężenia AD – 5,2 μg/ml. W zleceniach standardów diagnostyki PJI ICM 2018 oraz EBJIS 2021 nie ma określonego stężenia AD w płynie

stawowym, korelującego z PJI. Jest jedynie kryterium uzyskania pozytywnego wyniku testu na obecność AD definiowany jako stosunek sygnału do poziomu odcięcia testu powyżej 1 (ICM 2018) lub wskazanie rodzaju testu: immunoenzymatyczny lub immunochromatograficzny (EBIS 2021).

Badania oceniające możliwość wykorzystywania testu AD-ELISA w diagnostyce PJI wykazały, że w grupie 149 pacjentów, połączone testy na obecność AD i CRP w płynie stawowym poprawnie sklasyfikowały pod kątem PJI 148 pacjentów, wykazując czułość 100 % i swoistość 97,3% tych testów. Jednocześnie wykazano, że stwierdzony w wywiadzie pacjenta zespół ogólnoustrojowej reakcji zapalnej oraz stosowanie antybiotykoterapii przed wykonaniem testu, nie wpływały na średnie stężenia AD w płynie stawowym. Podkreśla to wyższość tych badań nad innymi markerami jak CRP w surowicy czy liczba leukocytów w płynie stawowym, dla których zauważano ponad 40% spadek stężenia w grupie pacjentów leczonych antybiotykami z potwierdzonym PJI (Deirmengian, Kardos, Kilmartin, Cameron, Schiller i Parvizi, 2014a). Inne badania porównujące dwie grupy pacjentów: u których wykonano badania po podaniu antybiotyków oraz grupę, w której wstrzymano się z leczeniem farmakologicznym do czasu pobrania materiału do testów, wykazały, że wcześniejsze podanie leków obniża poziomy biomarkerów PJI we krwi, natomiast nie wpływa na predykcyjność testu AD-ELISA, który wykazał 100% czułość w obu grupach (Shahi, Parvizi i in., 2016).

Badanie na dwóch grupach pacjentów (łącznie 116) zakwalifikowanych do zabiegów rewizyjnych jednoetapowych oraz po reimplantacji, oceniało oprócz przydatności diagnostycznej AD (w teście AD-ELISA), również inne markery: CPR z surowicy i OB pod kątem predykcyjności PJI. O ile dla rewizji jednoetapowych osiągnięto wysoką czułość (100%), swoistość (98%) testu AD-ELISA, to w grupie pacjentów po reimplantacji wyniki te były gorsze i wynosiły odpowiednio, 67%, 97%. Pomimo mniejszej czułość testu między grupami zabiegów chirurgicznych, AD-ELISA wykazał wyższą przydatność diagnostyczną w PJI z uwagi odnotowane gorsze wyniki czułości i swoistości CPR i OB. Po połączeniu wyników w jedną grupę pacjentów, czułość testu AD-ELISA wyniosła 96%, swoistość 98%, przewyższając wyniki CRP z surowicy, odpowiednio 78 i 80% oraz OB, odpowiednio 52%, 82% (Frangiamore i in., 2016).

Inne badanie na małej grupie pacjentów (32), w której obraz kliniczny był niejednoznaczny, a diagnoza pod kątem PJI niepewna, z uwagi na podawanie

antybiotyków i podejrzenia fałszywie dodatnich lub ujemnych wyników posiewu płynu stawowego, oceniło czułość i swoistość AD-ELISA na poziomie 82% dla obu parametrów testu, przy ujemnej i dodatniej wartości predykcyjnej, odpowiednio 92% i 64%. Autorzy tłumaczyli uzyskane niskie wartości predykcyjne z małą i nietypową grupą pacjentów włączonych do badania. Taki specyficzny dobór pacjentów nie powinien podważać wyników innych badań, w których analizowane były duże grupy chorych poddawanych endoprotezoplastyce rewizyjnej stawów kolanowych i biodrowych, osiągając poziomy przekraczające 95% zarówno w czułości, jak i swoistości testu AD-ELISA (Bonanzinga i in., 2016).

W większości badań do podjęcia decyzji o diagnozie pod kątem PIJ posługiwano się kryteriami diagnostycznymi MSIS 2013. Analizy naukowe wskazały wyraźną zależność między pozytywnym wynikiem testu na obecność AD w płynie stawowym a występowaniem PJI, co świadczy o wysokiej przydatność diagnostycznej i referencyjności immunoenzymatycznego testu Synovasure Alpha Defensin ELISA Test w predykcji PJI.

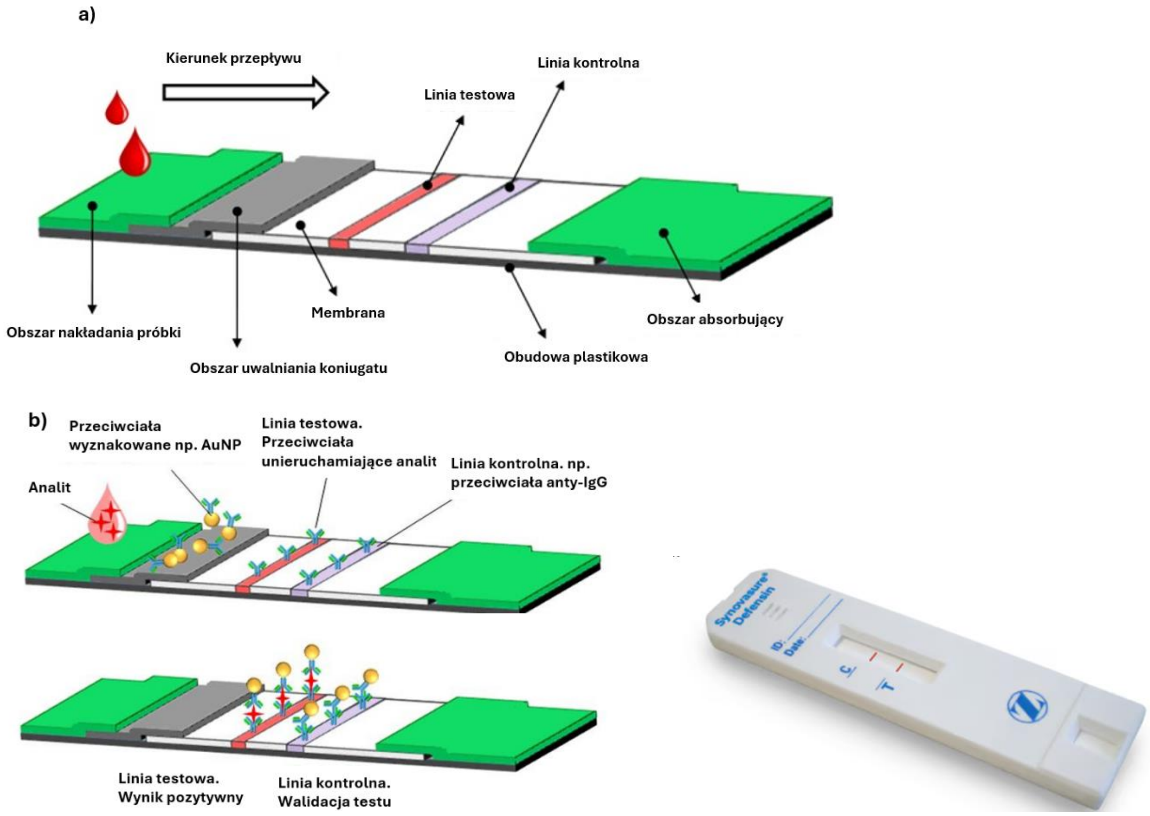
1.8.3. Zasada działania testów immunochromatograficznych

Testy immunochromatograficzne, zwane również testami przepływu bocznego lub bardziej powszechnie „szybkimi testami", dają możliwość wykonania bardzo szybkiej analizy próbki krwi, moczu, potu, śliny czy innych płynów ustrojowych pod kątem występowania określonego biomarkera (Koczula i Gallotta, 2016). Są najbardziej powszechnymi testami, wykonywanymi w „miejscu opieki nad pacjentem", czyli bez konieczności wykorzystywania specjalistycznej aparatury diagnostycznej, cechujące się krótkim czasem potrzebnym na otrzymanie wyniku, wynoszącym do 30 minut od pobrania (N. Jiang i in., 2019).

Test składa się z małej plastikowej kasety, w środku której znajduje się pasek testowy. Można w nim wyróżnić obszar do nakładania próbki, część zawierającą koniugat do analizy, membranę testową wykonaną z nitrocelulozy i obszar absorbujący nadmiar próbki (Rysunek 16 a). Analizowany płyn nakładamy jest w postaci kilku kropel na obszar testowy. Wykorzystując zjawiska kapilarne, płyn przesuwany jest wzdłuż membrany, reagując z przeciwciałami wyznakowanymi, na przykład nanocząstkami złota. O ile w próbce znajdują się specyficzne dla przeciwciała antygeny, dochodzi do ich związania i kompleks dalej przesuwany jest wzdłuż

membrany (Rysunek 16 b). Na poziomie linii testowej znajdują się przeciwciała mające za zadanie zatrzymanie antygenu, związanego z przeciwciałem wyznakowanym AuNP. Pojawienie się czerwonego koloru (będącego efektem obecności nanocząstek złota i odpowiedniej ilości światła) na linii testowej, wskazuje na wynik pozytywny i oznacza, że próbka pacjenta zawierała mierzalne ilości analitu. Następny pasek kontrolny, zawiera przeciwciała specyficzne dla przeciwciał wyznakowanych AuNP. Pojawienie się czerwonej linii na pasku kontrolnym (C) oznacza, że wynik testu jest ważny, czyli został prawidłowo przeprowadzony. Jeśli kolor pojawia się tylko na linii kontrolnej, test jest negatywny. Natomiast gdy czerwona linia widoczna będzie na linii testowej, ale nie pojawi się na linii kontrolnej, test należy uznać za nieprawidłowy i go powtórzyć. Wynik takiego testu należy odczytać w określonym przez producenta czasie od nałożenia próbki, np. w ciągu 10 minut, a nie później niż po 20 minutach od rozpoczęcia wykonywania testu.

Większość testów przepływu bocznego, w odróżnieniu od testów ELISA, nie jest przeznaczona do oceny ilościowej, a jednie jakościowej. Mogą być jednak podobnie czułe jak testy immunoenzymatyczne, wykorzystują do detekcji specyficzne monoklonalne przeciwciała wychwytujące i potwierdzające, co zapewnia testom wysoką czułość i specyficzność. Nie wymagają również zaplecza laboratoryjnego i skomplikowanych procedur pomiarowych i z reguły są tanie. Jednak cena tych testów bywa mocno zróżnicowana. Stwierdzenie, że są tanie, jest zbyt dużym uproszczeniem, ponieważ dla przykładu test immunochromatograficzny na obecność alfa-defensyny w płynie stawowym jest 200 krotnie droższy niż test ciążowy tego samego typu.



Rysunek 16. Budowa i zasada działania testu immunochromatograficznego. Przykład kasety testowej z pozytywnym wynikiem testu, w postaci widocznych czerwonych linii w obszarze kontrolnym (C) oraz testowym (T). b). Opracowana na podstawie (Koczula i Gallotta, 2016, Zimmer Biomet, 2024b).

1.8.4. Test Synovasure Alpha Defensin Lateral Flow Test

Drugi dostępny na rynku medyczny test Synovasure Alpha Defensin Lateral Flow, stworzono z potrzeby szybkiej weryfikacji obecności AD w płynie stawowym w trakcie zabiegów chirurgicznych. Zestaw składa się z kasety testowej, pojemnika na płyn stawowy, dwóch dozowników pozwalających na pobranie 15µl płynu metodą kapilarną (Microsafe), oraz buteleczki z buforem fosforanowym, do rozcieńczenia płynu stawowego. (Rysunek. 17)

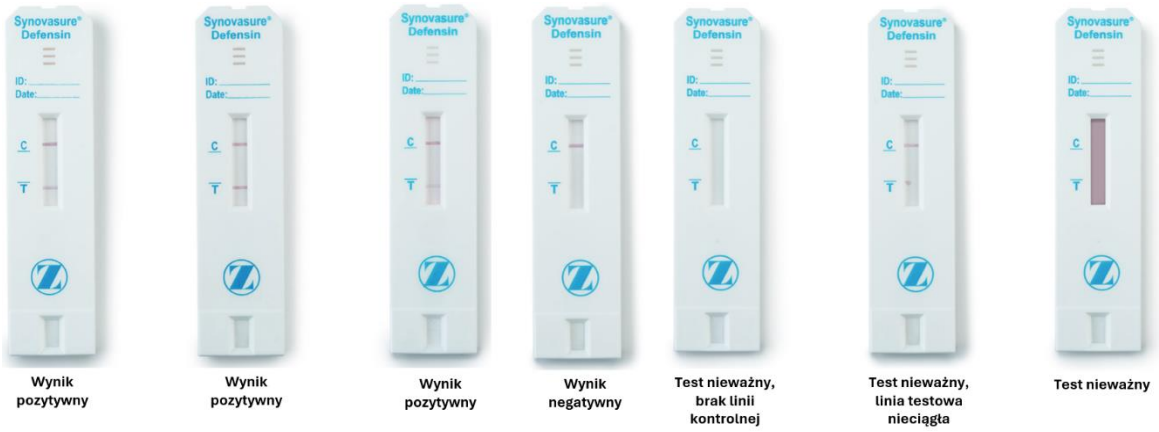


Rysunek 17. Komercyjny zestaw testu Synovasure Alpha Defensin Lateral Flow Test. Schemat sposobu wykonania testu. Opracowane na podstawie materiałów informacyjnych producenta testu (Zimmer Biomet, 2024b).

Budowa tego testu jest analogiczna, do opisanej wcześniej konstrukcji typowego testu immunochromatograficznego. Koniugat w teście tworzą przeciwciała przeciwko AD wyznakowane nanocząstkami złota. Analit po wymieszaniu z koniugatem, przesuwa się po membranie na linię testową, na której znajdują się unieruchomione przeciwciała anty-AD, by następnie dotrzeć do linii kontrolnej z przeciwciałami anty-IgG.

Test należy przechowywać w temperaturze 2-30°C, do czasu, określonego datą przydatności do użycia. Może być wykonywany jedynie w zakresie temperatur od 12°C do 25°C. Przed wykonaniem testu, o ile nie był przechowywany w temperaturze pokojowej, należy wyjąć zestaw i ustabilizować do warunków otoczenia. Płyn stawowy pobrany od pacjenta przelewa się ze strzykawki do pojemnika ułatwiającego, odmierzenie odpowiedniej porcji do testu. Płyn do testu nie wymaga wcześniejszej obróbki np. odwirowywania, ponieważ materiał komórkowy jest usuwany na pierwszej wkładce kasety testowej. Jednak obecność czerwonych krwinek w płynie stawowym większa niż 20% (>1 mln komórek/µl) może wpływać na uzyskiwanie fałszywie negatywnych wyników, o czym użytkownik informowany jest w ulotce. Za pomocą kapilarnego dozownika, pobierany jest płyn, proces napełniania przerywa się, gdy

poziom płynu (objętość 15 µl) osiągnie granicę, zaznaczonej czarnej linii (Rysunek. 17. 1). Pobrany płyn jest następnie rozcieńczany w butelce z buforem fosforanowym (Rysunek. 17.2). Należy pięciokrotnie ścisnąć końcówkę dozownika zanurzoną w butelce z buforem, celem usunięcia całej objętość płynu z dozownika. Następnie po zakręceniu buteleczki z buforem i płynem stawowym, kilkukrotnie miesza się zawartość. Po tym procesie nanosi się 3 pełne krople, na obszar testowy kasety (Rysunek. 17.3). Kaseta przez cały czas musi leżeć płasko na blacie, z dostępem do światła. Odczyt wyniku testu wykonuje się w ciągu 10 do 20 minut, od nałożenia analitu. Nie należy odczytywać wyniku po upływie 20 minut od rozpoczęcia testu. Zasada odczytu testu jest analogiczna do opisywanej wcześniej. Zgodnie z informacją w ulotce testu, wynik należy uznać za pozytywny niezależnie do intensywności linii testowej, pod warunkiem że widoczna jest również linia kontrolna. Przykładowe interpretacje wyników testu przedstawiono na Rysunku 18.



Rysunek 18. Interpretacja wyników testu Synovasure Alpha Defensin Lateral Flow Test. Opracowane na podstawie ulotki informacyjnej producenta testu (Zimmer Biomet, 2024b).

Zgodnie z deklaracją producenta Synovasure Alpha Defensin Lateral Flow Test (LF-AD), charakteryzuje się 94,3% czułością i 94,5% swoistością w detekcji AD z płynu stawowym w diagnostyce PJI (Zimmer Biomet, 2024b). Źródłem tych danych są wyniki badań Deirmengian i wsp. (2020), w którym zanalizowano próbki z dwóch grup o łącznej ilości 645 pacjentów z niestwierdzonym PJI i 122 ze zdiagnozowanym PJI. Zauważono, że czułość testu AD-LF wzrosła po wykluczeniu próbek zanieczyszczonych krwią z 89.5% do 94,3%. Jednocześnie wykonując testy AD-ELISA oceniono różnicę między nimi i zdolność predykcyjną samego testu AD-FL. Porównanie czułości i swoistości AD-FL z wynikami AD-ELISA po połączeniu obu grup nie wykazało istotnej różnicy w czułości odpowiednio 94,3% (95% CI: 88,5% do

97,7%) w porównaniu do 93% (95% CI: 87,1% do 96,7%) oraz swoistości 96,9% (95% CI: 95,3% do 98,1%) w porównaniu z 97,8% (95% CI: 96,4% do 98,8%), (Deirmengian, Madigan i in., 2020). Poziom odcięcia dla testu AD-LF nie jest określony. W badaniach wykonanych w celu walidacji testu do użytku medycznego uzyskiwano wyniki pozytywne (ponad 90%) przy stężeniach AD powyżej 10 µg/ml (FDA, 2024).

Pierwsze badania opublikowane w 2016 r. oceniające, nowy wówczas, test AD-LF pod względem dokładności diagnostycznej w PJI, wykazały wysoką swoistość testu 93% przy niskiej czułości 67%. W opracowaniu nie wykonano jednak drugiego testu AD-ELISA, co uniemożliwiło jednoznaczną interpretację otrzymanych wyników. Wykazano natomiast, równoważność testów wykonanych na próbkach bezpośrednio po pobraniu od pacjentów oraz zamrożonych i przechowywanych w stabilnych biologicznie warunkach (Kasparek i in., 2016).

W innym badaniu Sigmund i in. (2018) porównano nie tylko testy AD-ELISA i AD-FL, ale również różne systemy klasyfikacji, stosowane w celu właściwej diagnostyki PJI. Pod uwagę wzięto trzy systemy: MSIS (2013), Europejskiego Towarzystwa Zakażeń Kości i Stawów (EBJIS) z 2017 r., oraz Amerykańskiego Towarzystwa Chorób Zakaźnych (IDSA). Kryteria EBJIS zostały w międzyczasie znacząco zmienione, ale warto odnieść się do wyników dla dwóch pozostałych systemów klasyfikacji. PJI rozpoznano u 21% pacjentów przy ocenie system IDSA, a czułość testów AD-ELISA i AD-LF wynosiła odpowiednio 73% i 67%. Natomiast gdy tych samych pacjentów oceniono według kryteriów MSIS (2013), u 18% zdiagnozowano PJI, czułość testu AD-ELISA wyniosła 85%, a AD-LF 77%. Swoistość była niezależna od rodzaju testu czy przyjętego systemu klasyfikacji i wynosiła 98%. Uznano, że nie ma istotnych różnic między porównywanymi testami jakościowymi i ilościowymi obecności AD w płynie stawowym w predykcji PJI, niezależnie od stosowanego do oceny występowania zakażenia, systemu klasyfikacji. Ze względu na uzyskane wartość czułości tych testów, autorzy sugerowali, że oba testy nie powinny być stosowane do samodzielnego wykluczania lub potwierdzania PJI, a diagnostykę pacjenta należy poszerzyć o dodatkowe markery (M. P. Kelly i in., 2018). Wnioski z tego badania są zgodne z aktualnymi zaleceniami ICM z 2018 roku, w których test obecności AD w płynie stawowym został sklasyfikowany w systemie oceny na 3

punkty, natomiast aby stwierdzić PJI, konieczne jest uzyskanie co najmniej 6 punktów z panelu zalecanych badań diagnostycznych (Tabela 1).

Kolejne badania nad zdolnością predykcyjną testu AD-LF w diagnostyce PJI, wykazywały bardzo zróżnicowane poziomy czułości testu od 69% do 92,1%, a swoistości między 94% a 100% (Sigmund i in., 2017; Gehrke i in., 2018; Riccio i in., 2018). Dlatego chcąc odpowiedzieć na pytanie, czy oba testy można uznać za równoważne, przeprowadzano badania oparte na metaanalizach opublikowanych badań klinicznych, stosując zaawansowane narzędzia oceny statystycznej.

W pierwszej metaanalizie Eriksson i in. (2018), zanalizowali cztery badania, w których wykonano test AD-ELISA na 482 próbkach i trzy z testem AD-LF (119 próbek), stosując system klasyfikacji MSIS 2013. Wykazano niższą czułość testu AD-LF 71%, w stosunku do AD-ELISA 96%, przy wysokiej swoistości testów, odpowiednio 90% i 96%. Test immunoenzymatyczny wykazał lepszą wartość diagnostyczną, w stosunku do testu przepływu bocznego na podstawie wyników AUC 0,98 vs. 0,75 (pole pod krzywą ROC ang. area under the curve; receiver operating characteristic). Chociaż oba można uznać za cenne narzędzia diagnostyczne w PJI, to analiza wykazała wyższość testu AD-ELISA. Ponadto stwierdzono, że test AD-LF można wykonywać w celu potwierdzenia PJI, a nie do wykluczenia zakażenia, co wynikało z poziomu wiarygodności ujemnego wyniku tego testu (Eriksson i in., 2018). Do podobnych wniosków doszli autorzy innej metaanalizy, uznając, że negatywny wynik testu AD-LF, nie powinien być stosowany do jako jedyny wskaźnik wykluczający PJI (Marson i in., 2018).

W opublikowanej w 2020 r. metaanalizie przeanalizowano wyniki z największej liczby 15 badań, skupiając się na podsumowaniu 11, w których wykonano test AD-LF oraz czterech z testem AD-ELISA, analizując łączenie 1592 próbek (Kuiper i in., 2020). Ocenie podlegała zarówno zdolność predykcyjna obu typów testów na obecność AD w diagnostyce PJI, jak również potencjalne różnice między grupami pacjentów, poddanych zabiegom endoprotezoplastyki stawów kolanowych i biodrowych. W połączonych grupach (stawów kolanowych i biodrowych) nie stwierdzono istotnych różnic między oboma testami na obecność AD. Czułość testów wynosiła AD-ELISA 90%, AD-LF 86%, swoistość odpowiednio 97% i 96%. Nie stwierdzono również znaczących różnic w czułości testu AD-LF, w zależności od miejsca występowania PJI. Dla grupy infekcji w stawach biodrowych wynosiła ona 80%, a kolanowych 87%.

Autorzy nie znaleźli żadnych istotnych argumentów wykazujących wyższość testu AD-ELISA nad AD-LF i uznali, że oba mogą być stosowane w diagnostyce PJI.

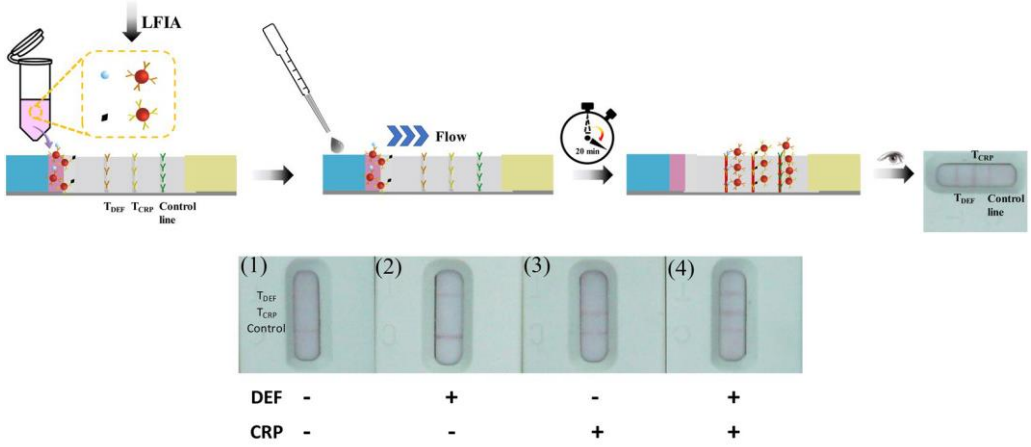
Medyczny test AD-LF wybrano jako porównawczy do walidacji nowego testu na obecność AD w płynie stawowym, opracowywanego w ramach rozprawy doktorskiej. Argumentem za tą decyzją były wyniki badań, podkreślające niewielkie różnice między testami AD-ELISA i AD-LF w poprawności diagnostycznej zakażeń okołoprotezowych. Istotnym czynnikiem jest również łatwość wykonania testu AD-LF. Alternatywą dla szybkiego testu mogą być komercyjne zestawy do metody ELISA, przeznaczone jedynie do badań naukowych. Jednak jak podkreślano wcześniej, test ten należałoby zoptymalizować do detekcji AD w płynie stawowym, z uwagi na brak protokołów pomiarowych w opisach dołączonych do zestawów. Ponadto do wykonania testów ELISA, niezbędny jest dedykowany spektrofotometr mikropłytkowy, którym w trakcie badań nie dysponowano.

1.8.5. Badania nad nowymi testami na obecność alfa-defensyn

Dostępność jedynie dwóch testów na obecność AD w płynie stawowym oraz jednoznacznie wykazana przydatność oceny stężenia AD w płynie stawowym w diagnostyce PJI zainspirowała innych naukowców do prac nad alternatywnymi testami i metodami oznaczania alfa-defensyn. W jednym z badań naukowcy zaprojektowali wielocelowy test immunochromatograficzny do oceny CRP i AD z płynu stawowego, natomiast w innym, wykorzystano metodę spektroskopii masowej MALDI-TOF MS (ang. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry).

Tsai i in. (2019) zaproponowali multipleksowy test immunochromatograficzny (msLFIA; ang. multi-target lateral flow immunoassay strip), który umożliwia detekcję jednocześnie dwóch biomarkerów PJI: AD i CRP w próbce płynu stawowego. W odróżnieniu od zasady działania klasycznych testów immunochromatograficzny, w którym analit inkubowany jest na pasku, w części utrwalania koniugatu, autorzy zaproponowali wstępną inkubację próbki płynu stawowego z mieszaniną przeciwciał skierowanych przeciw CRP i AD wyznakowanych nanocząstkami złota. Celem takiego kroku było skrócenie całkowitego czasu pojedynczej analizy do 20 minut od pobrania, ograniczenie objętości płynu wymaganego do analizy (do ok. 1 µl). Dzięki tej procedurze wykazali zwiększenie czułość i powtarzalność zaproponowanego testu. Na teście, jak pokazano na Rysunku 19, są dwie linie testowe z przeciwciałami anty-AD i

anty-CRP oraz linia kontrolna. Pozytywny wynik testu pokazany jest jako trzy czerwone linie na pasku testowym. Wartości odcięcia testu msLFIA ustalono dla stężenia AD i CRP odpowiednio na 10 µg/ml i 5 µg/ml.

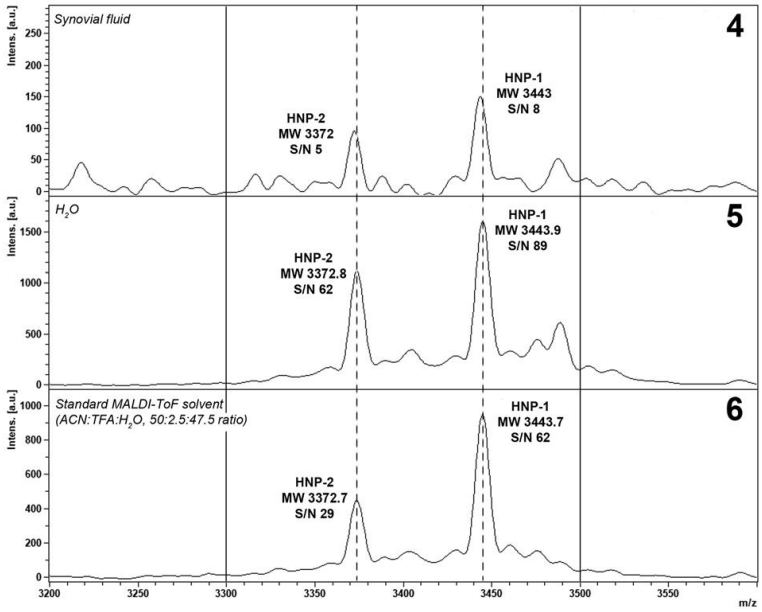


Rysunek 19. Zasada działa multipleksowego testu immunochromatograficznego do jedoczesnej detekcji AD i CRP w płynie stawowym. Opracowane na podstawie (Tsai i in., 2019).

Walidację testu przeprowadzono na 10 próbkach pobranych od pacjentów z podejrzeniem PJI, po zabiegach endoprotezoplastyki stawów biodrowych i kolanowych. Wyniki msLFIA porównano z oceną ilościową stężenia AD metodą ELISA. Wykorzystano w tym celu komercyjne zestawy dla AD i CRP: Human alpha-Defensin 1 DuoSet ELISA i Human C-Reactive Protein/CRP DuoSet ELISA. Na podstawie kryteriów diagnostycznych MSIS oraz wyników testów ELISA, stwierdzono PJI u 6 z 10 pacjentów. W teście msLFIA pozytywny wynik dla samej AD uzyskano u 8 pacjentów, co odpowiada 50% swoistości (2 fałszywie dodatnie wyniki) i 100% czułości testu. Gdy wzięto pod uwagę wyniki dla obu markerów, oznaczanych na tym samym teście (AD i CRP), dwa fałszywie dodatnie wyniki AD zostały poprawione na prawdziwie ujemne, z uwagi na negatywny wynik testu CRP. W jednym przypadku zestawienie w teście obu markerów, spowodowało zakwalifikowanie wyniku jako fałszywie ujemnego, co w efekcie wpłynęło na swoistość 100% i czułość 83,3% testu msLFIA, przy połączonym algorytmie oceny stężenia AD i CRP. Autorzy podkreślili jednocześnie, że multipleksowanie markerów na pasku obniża optyczną intensywność prążków testowych. Fakt ten może ograniczać możliwość zwiększania liczby ocenianych biomarkerów na jednym teście. Autorzy proponują swój test jako alternatywę dla testów ELISA, podkreślając podobną wartość predykcyjną w diagnostyce PJI. Wskazują również na aspekty ekonomiczne, z uwagi niskie koszty produkcji testów msLFIA. Z pewnością zaproponowany test może być konkurencyjny

dla komercyjnego testu przepływu bocznego, jednak zgodnie z kryteriami ICM 2018 pozytywny wynik testu AD i CRP w płynie stawowym, nie jest wystarczający do jednoznacznego potwierdzania PJI i diagnostyka musi być uzupełniona o inne markery. Ponadto test wymaga oceny wiarygodności na większej liczbie próbek od pacjentów z podejrzeniem PJI.

W badaniu zespołu Petrucca i in. (2020) zaproponowano wykorzystanie metody spektroskopii masowej MS MALDI-TOF, do oceny obecności AD w płynie stawowym (HNP MALDI-TOF). Technika spektrometrii mas z desorpcją/jonizacją laserową i analizą czasu przelotu (MALDI-TOF MS), pierwotnie wykorzystywana była głównie w badaniach naukowych. Obecnie jest coraz częściej dostępna również w laboratoriach diagnostycznych, gdzie pomaga w identyfikacji określonych białek czy drobnoustrojów, wykorzystując do tego precyzyjny pomiar mas cząsteczkowych. W prezentowanym badaniu próbka do testu HNP MALDI-TOF składała się z 10 µl płynu stawowego, rozcieńczonego w stosunku 1:100 w standardowym roztworze do techniki MALDI-TOF. Widma masowe zarejestrowane dla próbek od pacjentów porównano z widmami wzorcowymi, które zmierzono dla roztworów z oczyszczonymi AD (HNP-1 i HNP-2; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) z dodatkiem wody, standardowego roztworu dla techniki MALDI-TOF oraz dodanych do aseptycznego płynu stawowego (Rysunek 20). Do badania walidującego zaproponowaną metodę włączono 18 pacjentów zakwalifikowanych do zabiegów rewizyjnych stawów kolanowych (12) i biodrowych (6). Z tej grupy na podstawie kryteriów MSIS 2013, PJI stwierdzono u 8 pacjentów, natomiast 10 uznano za przypadki aseptyczne. Ocena dokładności testu HNP MALDI-TOF w diagnostyce PJI wykazała, że jego czułość, swoistość oraz dodatnia i ujemna wartość predykcyjna wyniosły 100% (ang. positive predictive value; NPV; ang. negative predictive value). Wykorzystując te same próbki, autorzy wykonali dodatkowo test immunochromatograficzny AD-LF Synovasure, który w porównaniu z HNP MALDI-TOF wykazał niższe wartości czułości, swoistości, PPV i NPV wynoszące odpowiednio 87,5%, 90%, 87,5% i 90%.



Rysunek 20. Widma wzorcowe w technice MS MALDI-TOF. Roztworów oczyszczonych HNP-1 i HNP-2 w płynie stawowym (4), wodzie (5) i standardowym roztworze do analizy MALDI-TOF (6). Opracowane na podstawie (Petrucca i in., 2020).

Wśród wskazywanych zalet testu HNP MALDI-TOF MS warto podkreślić jego wysoką czułość analityczną, dającą możliwość oznaczania bardzo niskich stężeń AD (1,25 μg/ml) z małej objętości płynu, szybkość uzyskania wyniku (do 20 minut) oraz bardzo mały koszt pojedynczej analizy (400 krotnie niższy niż cena pojedynczego testu AD-LF). Krótki czas analizy próbki umożliwia zastosowanie testu w diagnostyce śródoperacyjnej, pod warunkiem dobrej współpracy między lekarzami, a doświadczonym w technikach MS MALDI-TOF, zespołem diagnostów laboratoryjnych, pracujących w tym samym szpitalu. Warto jednak zaznaczyć, że spektrometria masowa jest uważana za metodę półilościową, ponieważ intensywność sygnału jest jedynie w przybliżeniu proporcjonalna do ilości substancji w próbce. Dlatego też przedstawione założenia metody testu HNP MALDI-TOF MS powinny zostać zweryfikowane przez inne laboratoria diagnostyczne na większej liczbie próbek, aby opracować standardy wykonywania oznaczeń AD w płynie stawowym w kierunku PJI.

2. Cel, zakres i znaczenie badań

Celem pracy było opracowanie testu i układu pomiarowego do wykrywania alfa-defensyn w płynie stawowym, który mógłby poszerzyć panel badań diagnostycznych, rutynowo stosowany w praktyce klinicznej przy ocenie występowania zakażenia okołoprotezowego. Koncepcja badań zakładała opracowanie metody, która w prosty sposób, bez konieczności stosowania skomplikowanych urządzeń pomiarowych i analizatorów laboratoryjnych, pozwoli na oznaczanie ilości alfa-defensyn w płynie stawowym. Argumentem do badań były potrzeby sugerowane przez lekarzy, którzy na co dzień zmagają się z problemem właściwej diagnostyki zakażeń okołoprotezowych i ograniczeniami w dostępie do wiarygodnych testów. Celem pracy było zweryfikowanie hipotezy badawczej zakładającej, że dedykowane przeciwciała pozwolą na stworzenie efektywnego biosensora do detekcji alfa-defensyn w płynie stawowym o złożonym składzie biologicznym. Wykorzystany w badaniach biosensor opiera się na reakcji antygen-przeciwciało w konfiguracji „kanapkowej", umożliwiając selektywną detekcję alfa-defensyn za pomocą specyficznych przeciwciał wychwytujących i potwierdzających, wyznakowanych różnymi fluoroforami. Dodatkowo sformułowano hipotezę, która zakłada, że wykorzystanie zjawiska wzmocnionej fluorescencji na powierzchni nanocząstek srebra, umożliwi wykrywanie małych ilości alfa-defensyn w próbce. Zastosowane w tym celu nanowarstwy srebra na powierzchni sensora pozwalają na wzmocnienie rejestrowanego sygnału, co przełoży się na uzyskanie wysokiej czułości detekcji.

Do szczegółowego zakresu badań należało:

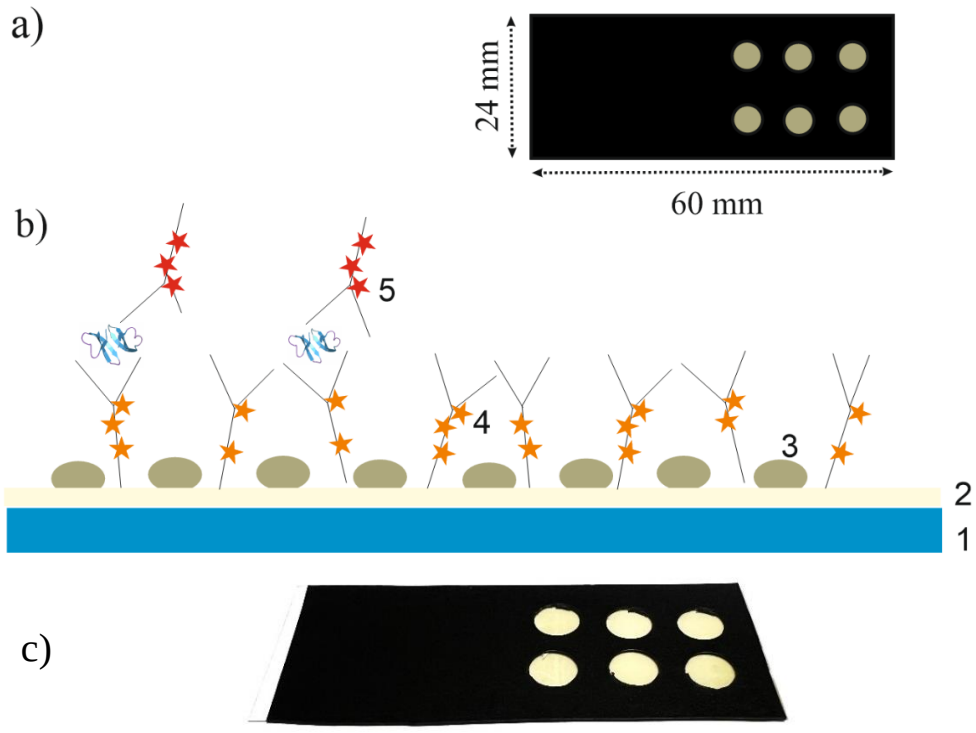
a) dobór metody syntezy nanowarstw srebra, analiza stabilności nanosrebra oraz ocena możliwości wzmocnienia fluorescencji i poprawy stabilności fluoroforu na ich powierzchni,
b) wybór par fluoroforów do znakowania przeciwciał potwierdzających i wychwytujących, określenie charakterystyki spektroskopowej związanych i niezwiązanych z białkami form wybranych znaczników.
c) badanie wiązań między wyznakowaną alfa-defensyną i wyznakowanym przeciwciałem oraz ocena dynamiki wiązań układu „kanapkowego" (przeciwciało – alfa-defensyna – przeciwciało) w roztworach,

d) budowa układu pomiarowego, wykorzystywanego do testu detekcji alfa-defensyn, umożliwiającego selektywne wzbudzania fluoroforów związanych z przeciwciałami na powierzchni sensora metodą TIRF,
e) badanie czułości metody dla różnych stężeń alfa-defensyn,
f) ocena ilościowa obecność alfa-defensyn w próbkach płynu stawowego pobranych od pacjentów uczestniczących w badaniu za pomocą opracowanej metody,
g) porównanie wyników opracowanego testu z komercyjnym testem immunochromatograficznym i oceną kliniczną występowania zakażenia okołoprotezowego.

Badania realizowane w ramach pracy i projektu „doktoratu wdrożeniowego" mają ściśle praktyczne zastosowanie. Wychodzą naprzeciw realnym problemom związanym z niedostateczną ilością testów diagnostycznych, pomocnych w identyfikacji zakażeń okołoprotezowych. Wykorzystywane w badaniach nowoczesne narzędzia analityczne, jakimi są czułe biosensory oraz metody fluorescencyjnej detekcji alfa-defensyn są nowatorskim podejściem. Ich połączenie ma celu z jednej strony poprawę jakości i czułości detekcji, a z drugiej poprzez prosty układ pomiarowy łatwe i szybkie przeprowadzenie testu poza laboratorium badawczym. Zaproponowany układ biosensora oparty na specyficznych przeciwciałach umożliwia jego potencjalne zastosowanie do detekcji innych antygenów, co poszerza możliwość zastosowania metody w wykrywaniu innych biomarkerów. Jednocześnie badania w doktoracie są interdyscyplinarne, ponieważ obejmują swoim zasięgiem nie tylko nauki biologiczne (biofizykę), ale również nauki medyczne, o potencjalnej możliwości wykorzystania ich wyników w rozwiązaniach komercyjnych.

3. Materiały i metody badawcze

W pracy wykorzystano sensor, którego schemat przedstawiono na Rysunku 21. Składa się ze szkiełka nakrywkowego o wymiarach 24 x 60 mm, z celami pomiarowymi (Rysunek 21 a, b 1., c). Górna powierzchnia szkiełka pokryta jest warstwą polilizyny (Rysunek 21 b 2.), na której osadzono srebrne nanowyspy, w celu wykorzystania do detekcji, zjawiska wzmocnionej fluorescencji MEF (Rysunek 21 b 3.). Na powierzchni sensora, unieruchomione są przeciwciała wychwytujące, skierowane przeciwko badanym alfa-defensynom (anty-AD), wyznakowane pierwszym fluoroforem (Rysunek 21 b 4.). Po wychwycie alfa-defensyny z badanej próbki następuje potwierdzenie tego faktu, poprzez przyłączenie do antygenu drugiego przeciwciała potwierdzającego, wyznakowanego innym niż pierwsze fluoroforem. (Rysunek 21 b 5.). Po wzbudzeniu pierwszego fluoroforu możliwa będzie detekcja emisji fluorescencji znaczników związanych z oboma przeciwciałami w zjawisku bezpromienistego transferu energii FRET.



Rysunek 21. Schemat sensora wykorzystywanego w pracy badawczej. a) szkiełko nakrywkowe pokryte nanocząstkami srebra z celami pomiarowymi, b) schematyczne przestawienia budowy sensora, 1. Szkiełko nakrywkowe, 2. Warstwa polilizyny, 3. Syntetyzowane na powierzchni nanowyspy srebra, 4. Przeciwciała wychwytujące związane z powietrznią sensora, 5. Przeciwciała potwierdzające obecność antygenu w próbce. c) zdjęcie przykładowego sensora wykorzystywanego do badań.

3.1. Synteza nanowarstw srebra

3.1.1. Protokół syntezy srebrnych nanowysp

W pracy wykorzystywano chemiczną syntezę nanowysp srebra, modyfikując opisaną w literaturze metodę syntezy (Aslan, Gryczyński i in., 2005). W ramach badań dobierane były stężenia prekursora metalu soli srebra, środka redukującego oraz warunków przeprowadzania syntezy, w tym szczególnie temperatury oraz dynamiki jej wzrostu w trakcie syntezy. Pozwoliło to na opracowanie szczegółowej metody syntezy nanowyspy srebra na potrzeby badań.

W opracowanej metodzie syntezy szkiełka nakrywkowe Epredia (Thermo Scientific, Menzel Gläser) były czyszczone w roztworze NaOH, wypłukane w wodzie dejonizowanej (Millpore, RiOs, Synergy Water Purification System) i osuszane. Następnie umieszczano szkiełka w stężonym kwasie siatkowym (>95%) na 12-24 h. Po tym czasie były opłukiwane wodą dejonizowaną i suszone. Oczyszczone szkiełka zostały pokryte roztworem polilizyny składającym się z: 2,5 ml roztworu polilizyny (0,1% Poly-L-lysine, zawierający Thimeosal 0,01%, cat. No P-8920, Sigma-Aldrich), 17,5 ml 0,01 M buforu fosforanowego, pH 6,5 (PBS, ang. phosphate buffered saline, tabletki, cat. No P-4417, Sigma-Aldrich), nanosząc ok. 1 ml roztworu na każdy szklany slajd. Po godzinie szkiełka były opłukiwane wodą dejonizowaną, pozostawiane do wyschnięcia w pozycji pionowej. Każdy slajd układany był pojedynczo na szalki Petriego, warstwą polilizyny do góry i przechowywany w lodówce do czasu syntezy nanocząstek srebra.

Niezbędne odczynniki przygotowywane były bezpośrednio przed syntezą. Dobraną do warunków syntezy ilość reduktora – 720 mg glukozy (D-(+)-Glucose, ≥ 99.5 %, G8270-100G, Sigma-Aldrich), rozpuszczono w 15 ml wody dejonizowanej i pozostawiono w lodówce, w celu schłodzenia. Wybrany prekursor soli srebra $AgNO_3$ (≥ 99 %, Sigma-Aldrich), w ilości 500 mg rozpuszczono w 60 ml wody dejonizowanej i zabezpieczono przed dostępem światła. Roztwór $AgNO_3$ przelano do szklanego naczynia reakcyjnego o pojemności 100 ml i umieszczono na mieszadle magnetycznym (model ES21H, Wigo), intensywnie mieszając (750 rpm) około 1 minuty. Za pomocą pipety automatycznej odmierzono 700 µl, 5% roztworu NaOH (przygotowanego z odważki analitycznej) i dodano do roztworu soli srebra, ciągle mieszając. Nastąpiło

wytrącenie tlenku srebra (Ag_2O), co w roztworze można zaobserwować w postaci zmiany barwy z przeźroczystej na brązową, z widocznym osadem (Rysunek 22 a.), oraz opisane zgodnie z poniższą reakcją:

$$2AgNO_3 + 2NaOH = Ag_2O + 2NaO_3 + H_2O \quad (6)$$

Odmierzono następnie ok. 2 ml roztwór 30 % amoniaku ($NH_3 \cdot H_2O$ – 35,04 g/mol) i małymi porcjami, pipetą Pasteura, dodawano do roztworu reakcyjnego, intensywnie mieszając. Amoniak dodawany był do momentu uzyskania przeźroczystej barwy roztworu (Rysunek 22 d). Widoczny na Rysunku 22, proces znikania osadu, związany jest z rozpuszczeniem tlenku srebra w amoniaku i tworzeniem jonu kompleksowego $[Ag\ (NH_3)_2]^+$ opisane następującymi rekcjami:

$$Ag_2O + 4NH_3 + H_2O = 2[Ag(NH_3)_2]OH$$

$$[Ag(NH_3)_2]OH \overset{H_2O}{\rightleftharpoons} [Ag(NH_3)_2]^+ + OH^- \quad (7)$$

Następnie naczynie z roztworem umieszczono w większym pojemniku z lodem, na mieszadle magnetycznym i chłodzono przez 10 minut, intensywnie mieszając (750 rpm). Po tym czasie dodano 15 ml schłodzonego roztworu glukozy i mieszano przez następne 2 minuty. Do roztworu włożono 4 szkiełka, wcześniej przygotowane i pokryte roztworem polilizyny. Slajdy spinano zaciskiem po dwa, tak by przylegały do siebie warstwą bez polilizyny. Szkiełka zanurzano w roztworze reakcyjnym, chłodzono jeszcze przez ok. 3 minuty do osiągnięcia temperatury roztworu < 2 °C. Temperatura roztworu przez cały czas syntezy była kontrolowana, dzięki umieszczeniu czujnika termometru (model ST-90, Termoprodukt), zawsze na tej samej głębokości roztworu, przy ściance naczynia.



a) b) c) d)

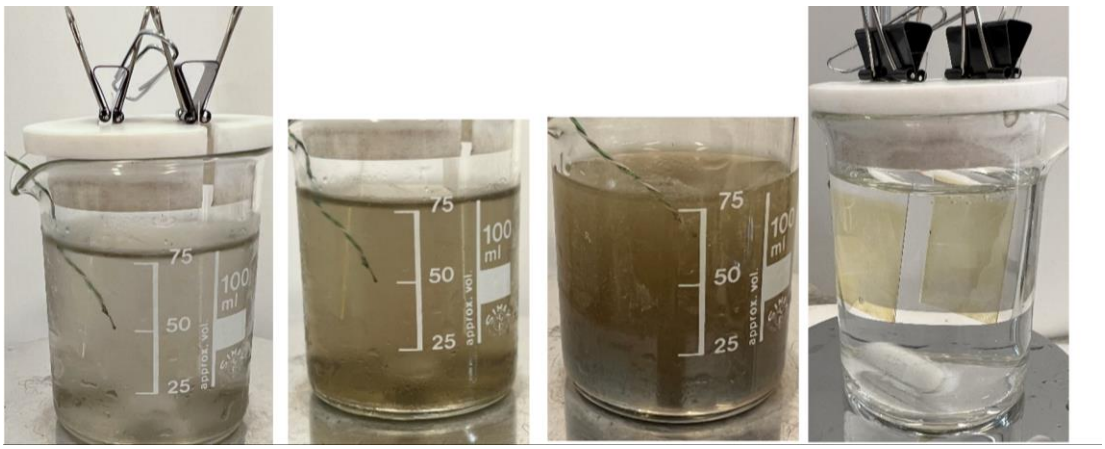
Rysunek 22. Synteza nanocząstek srebra, reakcja wytrącania jonów srebra z mieszaniny reakcyjnej. a) po dodaniu NaOH; b) -d) po powolnym dodawaniu 30% roztworu $NH_3 \cdot H_2O$. Opracowanie własne.

Po osiągnięciu oczekiwanej temperatury roztworu wyjęto pojemnik z roztworem z lodu i przestawiono na drugie mieszadło magnetyczne, z funkcją grzania (RCT basic, IKA). Roztwór mieszano, przy 380 rpm, przez 1 minutę bez grzania, w temperaturze pokojowej. Na mieszadle ustawiono dobraną do warunków syntezy temperaturę grzania, na 180°C oraz pozostawiono ustawioną wcześniej prędkość mieszania 380 rpm.

Glukoza po ogrzaniu roztworu zredukuje w środowisku amoniakalnym powstałe jony kompleksowe do metalicznego srebra, co opisuje następująca reakcja:

$$2[Ag(NH_3)_2]OH + R\text{-}CHO + 2H_2O = 2Ag + R\text{-}COONH_4 + 3NH_3 \cdot H_2O \quad (8)$$

Włączono grzanie, odnotowując dynamikę wzrostu temperatury i kontrolując zmianę barwy syntetyzowanego roztworu. Grzanie przerywano po osiągnięciu ok. 22,5 °C i po czasie ok. 4 minut, gdy barwa roztworu zmieniła się w zielono żółtą (Rysunek 23).



Rysunek 23. Synteza nanocząstek srebra, zmiana barwy mieszaniny reakcyjnej podczas podgrzewania. Na ostatnim zdjęciu szkiełka po syntezie w wodzie dejonizowanej. Opracowanie własne.

Szybko wyjęto szkiełka z roztworu reakcyjnego i przełożono do drugiego pojemnika z czystą wodą (Rysunek 23, ostatnie zdjęcie), mieszając przez 2 minuty w temperaturze pokojowej. Pierwsze dwa szkiełka zostały wyjęte, rozłączone i umieszczone oddzielnych plastikowych pojemnikach, wypełnionych czystą wodą dejonizowaną, które po zamknięciu umieszczono w sonikatorze na 30 sekund. Po wyjęciu opłukano obie powierzchnie slajdu tryskawką z czystą wodą dejonizowaną. Szkiełka po syntezie przechowywano rutynowo w pojemnikach z wodą dejonizowaną w lodówce.

Każde szkiełko analizowano za pomocą spektrofotometru Cary 50 scan, Varian, Australia, w celu określenia położenie pasma absorpcyjnego w zakresie widzialnym. Na

podstawie widm absorpcji oraz wizualnej oceny jednorodności pokrycia szkiełka srebrem, podejmowano decyzję o odrzuceniu lub wykorzystaniu danego slajdu w kolejnych badaniach.

3.1.2. Badania stabilności nanowarstw srebra w różnych warunkach otoczenia

W ramach badań sprawdzono wpływ krótkotrwałego narażenia nanowarstw srebra na warunki otoczenia, jak temperatura, światło czy przechowywanie poza środowiskiem wodnym. W założeniach badań szkiełka po syntezach przechowywane są w lodówce, w pojemnikach z wodą dejonizowaną. To w naturalny sposób chroni je przed światłem, możliwością utleniania czy wysokimi temperaturami otoczenia. Jednak proces przygotowywania slajdu do badań z przeciwciałami, związany na przykład z umieszczeniem warstwy taśmy z celami pomiarowymi, wymaga wcześniejszego wysuszenia powierzchni i odpowiedniego czasu na przygotowanie.

Wykorzystano do badań dwa rodzaje szkiełek, z i bez warstwy polilizyny, na których wykonano syntezę nanosrebra, zgodnie z opracowaną procedurą syntezy (pkt. 3.1.2). Zmierzono widma absorpcji po 1; 2,5; 5; 24; 48 i 72 godzinach przechowywania w różnych warunkach otoczenia. Szkiełka syntetyzowane z warstwą polilizyny i bez niej zbadano po przechowywaniu:

a) w lodówce w wodzie dejonizowanej,

b) w ciemności, bez wody (na szalkach Petriego), w temperaturze pokojowej,

c) przy ekspozycji na światło słoneczne i sztuczne (w pomieszczeniu laboratoryjnym), bez wody w temperaturze pokojowej,

d) przy ekspozycji na światło słoneczne i sztuczne (w pomieszczeniu laboratoryjnym), w wodzie dejonizowanej, w temperaturze pokojowej.

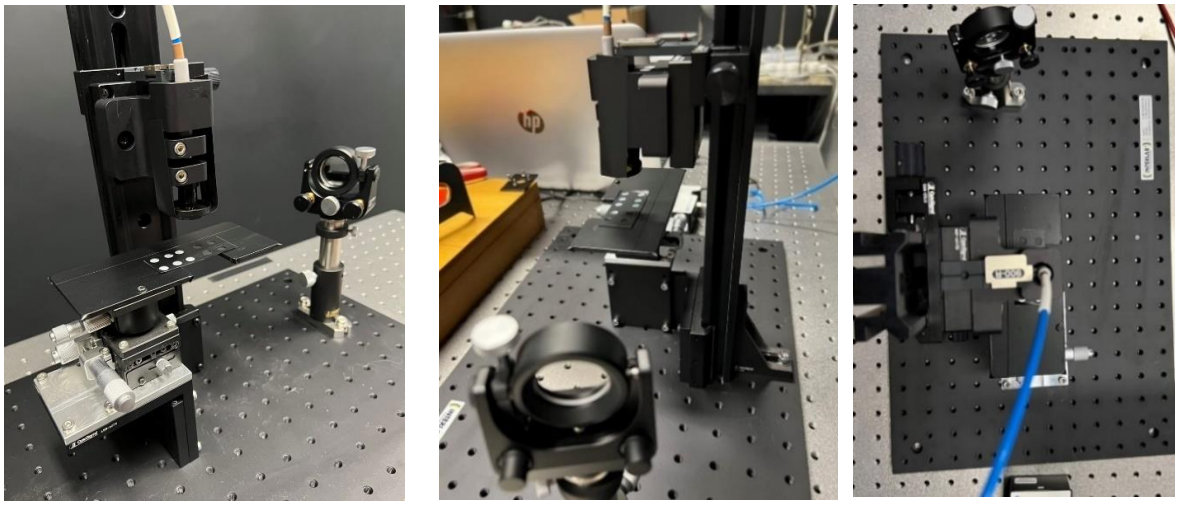
W przypadku próbek wyjmowanych z wody suszono je w pozycji pionowej i temperaturze pokojowej przez ok. 10 minut. Następnie wykonano pomiary widm absorpcji, za pomocą spektrofotometru Cary 50 scan, Varian, Australia.

3.1.3. Badania właściwości nanowarstwy srebra na powierzchni szkła.

Przeprowadzono badania syntetyzowanych nanowysp srebra na powierzchni szkła w obecności fluoroforu. Celem było zweryfikowanie, czy otrzymana w wyniku syntezy nanowarstwa zapewni wzrost fotostabilności badanego fluoroforu oraz ograniczy, lub w pełni zahamuje fotoreakcje, ze względu na skrócenie jego czasu życia w stanie wzbudzonym. Fluoroforem do badań była hiperycyna, związek charakteryzujący się niską wydajnością kwantową, ulegający pod wpływem światła fotodegradacji i fotoreakcji. Jest to związek naturalnie występujący w gatunkach roślin z rodziny dziurawcowatych, powszechnie stosowany zarówno w ziołolecznictwie, jak i przemyśle farmaceutycznym. Z uwagi na swoje silne właściwości fotowzbudzające i fotouczulające, wykorzystywana jest również terapii fotodynamicznej.

W badaniu wykorzystano hiperycynę rozpuszczoną w DMSO. Roztwór wstępny otrzymano przez rozpuszczenie porcji hiperycyny (0,38 mg) w 1,5 ml DMSO (dimetylosulfotlenek, ≥ 99,9 %, D8418, Sigma). Właściwy roztwór testowy został przygotowany przez rozcieńczenie 60 µl roztworu wstępnego, w 1,44 ml glicerolu (≥ 99%, G5516, Sigma). Do badań wykorzystano szkiełka z nanowyspami srebra, otrzymanymi zgodnie z procedurą syntezy (pkt. 3.1.2). Roztwór nanoszono na szkiełka z warstwą nanosrebra, następnie przykryto próbkę drugim, czystym szkiełkiem nakrywkowym, tworząc cienką warstwę fluoroforu na badanej powierzchni. Na inne szkiełko bez koloidów srebra, naniesiono kroplę roztworu hiperycyny.

Do badań wykorzystano pierwszą wersję układu pomiarowego umożliwiającą wzbudzanie próbki, poprze bezpośrednie oświetlenie laserem, przedstawioną na Rysunku 24. Próbki poddano ekspozycji lasera 530 nm PicoQuant GmbH LDH-D-TA-530, pracującego w trybie ciągłym, z maksymalną mocą 10 mW. Za pomocą lustra skierowano wiązkę lasera na miejsce nałożenia próbki. Widma rejestrowano przez 6 godzin, za pomocą detektora spektrometrycznego OceanOptic, do którego podłączono światłowód z soczewką skupiającą umieszczony nad próbką. Pomiędzy próbką a soczewką znajdował się filtr odcinający sygnał lasera wzbudzającego typu longpass 550 nm (OG550, Edmund optics).



Rysunek 24. Pierwsza wersja układu pomiarowego wykorzystana do badań fotostabilności hiperycyny na syntezowanych nanowarstwach srebra. Opracowanie własne.

Wzmocnienie fluorescencji hiperycyny na powierzchni nanocząstek srebra oceniono dwoma metodami: 1) obliczając stosunek wyznaczonych pól powierzchni pod krzywą (AUC) dla zakresu 570 - 750 nm emisji fluorescencji dla próbki na srebrze i samym szkle oraz 2) obliczając stosunek sygnału fluorescencji dla długości fali 600 nm (charakterystycznej dla emisji hiperycyny) na srebrze do sygnału na szkle. AUC zostało obliczone w oprogramowaniu Origin 2022b.

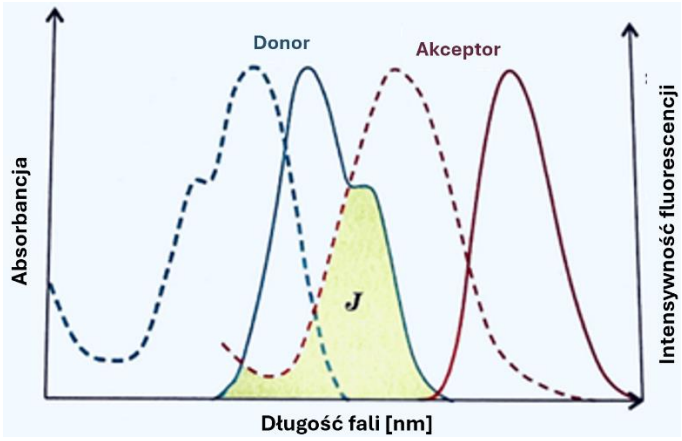
Zbadano stabilność czasową hiperycyny na samym szkle i szkle pokrytym nanocząstkami srebra, poprzez porównanie zmiany AUC dla zakresu 570 - 800 nm emisji fluorescencji, w czasie ekspozycji na światło laserowe. W celu prezentacji wyników obliczono stosunek pola powierzchni pod krzywą, w czasie t naświetlania, do pola w chwili początkowej t_0 w ujęciu procentowym.

Dodatkowo dla próbki badanej na samym szkle, zmierzono czasy życia przed i po ekspozycji na światło, przy użyciu spektrometru w dziedzinie czasu FluoroTime 200, PicoQuant, wyposażonego w mikrokanałowy fotopowielacz R3809U-50 (MCP-PMT, Hamamatsu), moduł PicoHarp300 TCSPC, sterownik PDL800-D i oprogramowanie EasyTau. Fluorescencję wzbudzano przy 530 nm za pomocą tego samego lasera PicoQuant, pracującego w trybie impulsowym i obserwowano przy 600 i 650nm. Dodatkowo dla tych próbek wykonano również pomiary widm absorpcji za pomocą spektrofotometru Cary 50 scan, Varian, Australia.

3.2.Określenie właściwości fizykochemicznych znaczników fluorescencyjnych związanych z badanymi białkami

3.2.1. Wybór znaczników fluorescencyjnych i białek do badań.

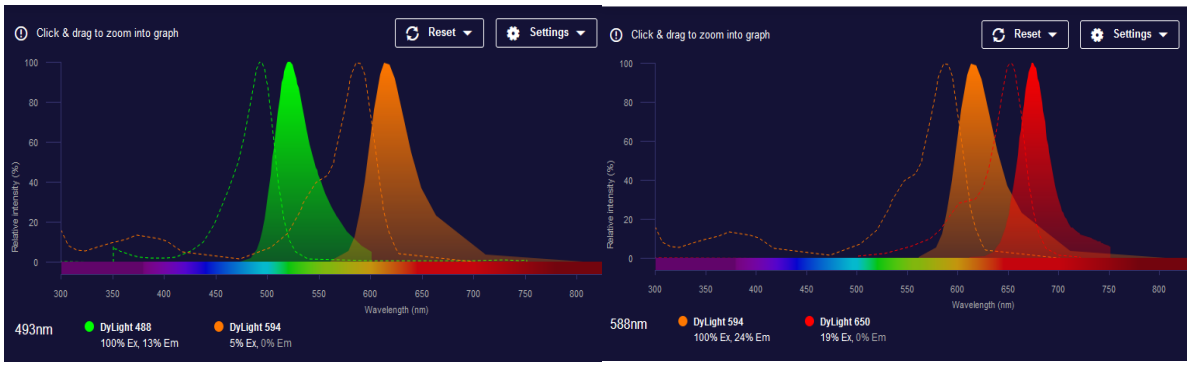
Do przygotowania biosensora detekcji alfa-defensyn, w układzie dwóch przeciwciał (wychwytujących i potwierdzających), wyznakowanych różnymi fluoroforami, konieczne było dokonanie wyboru odpowiednich znaczników fluorescencyjnych i białek do badań. Wykorzystywane znaczniki powinny charakteryzować się wysoką fotostabilnością, wydajnością kwantową oraz możliwością wykorzystania ich do znakowania białek. Charakterystyka widmowa fluoroforów powinna obejmować zakres długości fal, spoza przedziału charakterystycznego dla naturalnych fluoroforów występujących w ciele ludzkim. Ważnym kryterium dobru była również ocena różnych zakresów widmowych, umożlwiających bezpromienisty przekaz energii (FRET – ang. Förster resonance energy transfer). Zjawisko to prowadzi do przekazywana energii wzbudzenia fluoroforu donorowego do akceptora poprzez oddziaływanie dipol – dipol, przy optymalnej dla tego zjawiska, bliskiej odległości między znacznikami (5 – 10 nm). W wyniku transferu energii następuje zmniejszenie intensywności fluorescencji z wyznakowanego przeciwciała wychwytującego (donora) i rozpoczęcie emisji znacznika związanego z przeciwciałem potwierdzającym (akceptor) (Rysunek 25)



Rysunek 25. Relacja między donorem i akceptorem w zjawisku FRET. Widma absorbancji (linia przerywana) i emisji (linia ciągła) donora (kolor niebieski) i akceptora (kolor czerwony), J – całka nakładania emisji donora na absorpcję akceptora. Opracowane na podstawie (Szabelski, 2015).

Na podstawie charakterystyk fluoroforów i danych literaturowych, wybrano znaczniki Thermo Scientific DyLight NHS Ester Fluorescent Dyes (ThermoFisher, 2024b), dedykowane do znakowania białek i szeroko stosowne w pokrewnych metodach badawczych: mikroskopii fluorescencyjnej, cystometrii przepływowej czy testach ELISA. Charakteryzują się wyższą jasnością i fotostabilnością niż inne, podobne znaczniki: Alexa Fluor, CyDye czy LI-COR (Sarkar i in., 2010). DyLight NHS Ester zapewniają możliwość optymalnego wyboru znacznika z szerokiego zakresu maksimów absorbancji od 350 nm do 800 nm z grupy dziesięciu dostępnych fluoroforów. Umożliwia to szybką zmianę fluoroforu, w przypadku niezadawalających wyników doświadczalnych Niewątpliwą zaletą tych znaczników jest fakt, że widma absorpcyjne i emisyjne mają podobny kształt, oraz umożliwiają uzyskanie korzystnych konfiguracji dla par donor-akceptor z uwagi na duże całki nakładania (Solarczyk i in., 2016). Fluorofory aktywowane estrem NHS są również specyficzne, znakując białka i inne cząsteczki na pierwszorzędowych grupach aminowych (zawierające grupę -NH_2).

Do badań eksperymentalnych wybrano dwie pary znaczników Thermofisher DyLight 488 NHS Ester / DyLight 594 NHS Ester oraz DyLight 594 NHS Ester / DyLight 650 NHS Ester, których widma wzorcowe przedstawiono na Rysunku 26. Charakterystyka spektralna fluoroforów związanych z białkami może różnić się od widm wzorcowych, z uwagi na różne obsadzenie fluoroforów na przeciwciałach w procesie znakowania. Z tego powodu niezbędne było wykonanie badań spektralnych wybranych fluoroforów, po wyznakowaniu nimi przeciwciał.



Rysunek 26. Charakterystyka spektralna fluoroforów wybranych do badań. Linie przerywane to widma absorpcji (zielona DyLight 488 NHS Ester, pomarańczowa DyLight 594 NHS Ester, czerwona DyLight 650 NHS Ester), linie ciągłe to widma emisji (DyLight 488 NHS Ester-zielone, DyLight 594 NHS Ester – pomarańczowe, DyLight 650 NHS Ester – czerwone). Opracowane na podstawie charakterystyki spektralnej podanej przez producenta (ThermoFisher, 2024a).

Obiektami biologicznymi w przedmiotowym badaniu są przeciwciała przeciwko alfa-defensynom i same alfa-defensyny. Intencją w wyborze białek było zachowanie spójności między obiektami wykorzystanymi w nowej metodzie detekcji i białkami, używanymi rutynowo do tworzenia testów immunoenzymatycznych. Na podstawie informacji zawartej w publikacji Deirmengian, Kardos, Kilmartin, Cameron, Schiller i Parvizi, (2014a), wybrano białka firmy Hycult Biotech (Uden, Holandia), stosowane w komercyjnych testach ELISA Synovasure. Są to monoklonalne przeciwciała HNP1-3, Human, mAb D21, Hycult Biotech, dostarczane w porcjach 1 ml w roztworze buforu fosforanowego i stężeniu wynoszącym 100 μg/ml. Natomiast alfa-defensyny - HNP1-3, Human, Natural, Hycult Biotech, dostarczane są w porcjach 112 μg lub 75 μg czystego naturalnego HNP 1-3, liofilizowanego z odparowanego rozpuszczalnika, bez dodatkowych składników, w tym stabilizatorów. Jest naturalną mieszaninę HNP-1, HNP-2 i HNP-3 o średnim stosunku peptydów 5:4:1, wyizolowane z azurofilowych granulek granulocytów obojętnochłonnych od zdrowych dawców krwi (Hycult Biotech, 2024a).

Za każdym razem, gdy w metodach badawczych wymieniany będzie „bufor fosforanowy", oznacza, że wykorzystano 0,01M bufor fosforanowy, pH 6,5 (PBS, ang. phosphate buffered saline, tabletki, cat. No P-4417, Sigma-Aldrich).

3.2.2. Właściwości wybranych znaczników fluorescencyjnych związanych z przeciwciałami

Celem zadania było uzyskanie informacji o właściwościach fotofizycznych znaczników fluorescencyjnych po związaniu z przeciwciałami. W tym celu wyznakowano przeciwciała wybranymi fluoroforami i przeprowadzono charakterystykę spektralną.

3.2.2.1. Znakowanie przeciwciał wybranymi fluoroforami

Porcje przeciwciał Hycult HNP1-3, Human, mAb D21 (1 ml roztworu fosforanowego, o stężeniu przeciwciał 100 μg/ml), wyznakowano fluoroforami Thermofisher DyLight 488 NHS Ester, DyLight 594 NHS Ester oraz DyLight 650 NHS Ester. Procedurę znakowania przeprowadzano, zgodnie z zaleceniami protokołu

producenta fluoroforów (ThermoFisher, 2024c). Niezbędną porcję fluoroforu, zależną od ilości znakowanego białka, oszacowano zgodnie z relacją:

$$m_{\,fluroforu}\,[mg] = \frac{ilość\ białka\ [mg]}{MW\ białka} \cdot\ MfE\ \cdot\ MW_{fluroforu} \tag{9}$$

gdzie ilość białka (przeciwciała) do znakowania wynosiła 100 µg (0,1 mg),
$MW_{białka}$ (masa cząsteczkowa, ang. molecular weight), dla przeciwciał założono 150.000MW (ThermoFisher, 2024c),
$MW_{fluoroforu}$ zgodnie z danymi producenta z Tabeli 2, dla znaczników DyLight NHS Ester wynoszą odpowiednio: 488 (1011), 594 (1078), 650 (1066),
MfE – ang. Molar-fold Excess, zalecany nadmiar znacznika zależny od jego rodzaju i ilości znakowanego białka, dla małych stężeń białek i znaczników DyLight NHS Ester wynoszą odpowiednio (ThermoFisher, 2024c): 488 (10-15, dla stężenia białka <2-5 mg/ml), 594 (5-10 dla stężenia białka <5mg/ml), 650 (7, dla stężenia białka <5 mg/ml).

Minimalne ilości znaczników DyLight NHS Ester wynosiły, zgodnie z równaniem (9), odpowiednio:

$$m_{\,DyLight\ NHS\ Ester\ 488}\,[mg] = \frac{0{,}1mg\ IgG}{150000} \cdot\ 15\ \cdot\ 1011 = 0{,}01\ mg$$

$$m_{\,DyLight\ NHS\ Ester\ 594}\,[mg] = \frac{0{,}1mg\ IgG}{150000} \cdot\ 10\ \cdot\ 1078 = 0{,}0072\ mg$$

$$m_{\,DyLight\ NHS\ Ester\ 650}\,[mg] = \frac{0{,}1mg\ IgG}{150000} \cdot\ 7\ \cdot\ 1066 = 0{,}005\ mg$$

Table 1. Properties of the Thermo Scientific DyLight NHS

DyLight Dye	Ex/Em*	ε†	MW (g/mol)
350	353 / 432	15,000	874
405	400 / 420	30,000	793
488	493 / 518	70,000	1011
550	562/576	150,000	1040
594	593 / 618	80,000	1078
633	638 / 658	170,000	1066
650	652 / 672	250,000	1066
680	682 / 715	140,000	950
755	754 / 776	220,000	1092
800	770 / 794	270,000	1050

Table 3. Properties of the DyLight Dyes.

DyLight Dye	A_{max}*	ε†	CF‡
350	353	15,000	0.144
405	405	30,000	0.564
488	493	70,000	0.147
550	557	150,000	0.081
594	595	80,000	0.585
633	627	170,000	0.110
650	655	250,000	0.037
680	684	140,000	0.128
755	755	220,000	0.030
800	777	270,000	0.045

Tabela 2. Tabela charakterystyki fluoroforów DyLight NHS Ester. Opracowana na podstawie (ThermoFisher, 2024c).

Odważanie takiej ilości sproszkowanego znacznika było technicznie utrudnione i wiązało się z nadmiarową ilością fluoroforu w próbce. To z kolei mogło skutkować wydłużeniem czasu dializy. W związku z tym całą porcję (1 mg), każdego znacznika DyLight NHS Ester, rozpuszczono w 100 µl DMSO (dimetylosulfotlenek, ≥ 99,9%, Sigma). Na podstawie równania (10), obliczono minimalną objętości roztworu fluoroforu w DMSO (V_{min}), konieczną do przeprowadzenia znakowania:

$$V_{min} = m_{\,fluroforu}\,[mg] \cdot \frac{100\mu l}{1mg} \qquad (10)$$

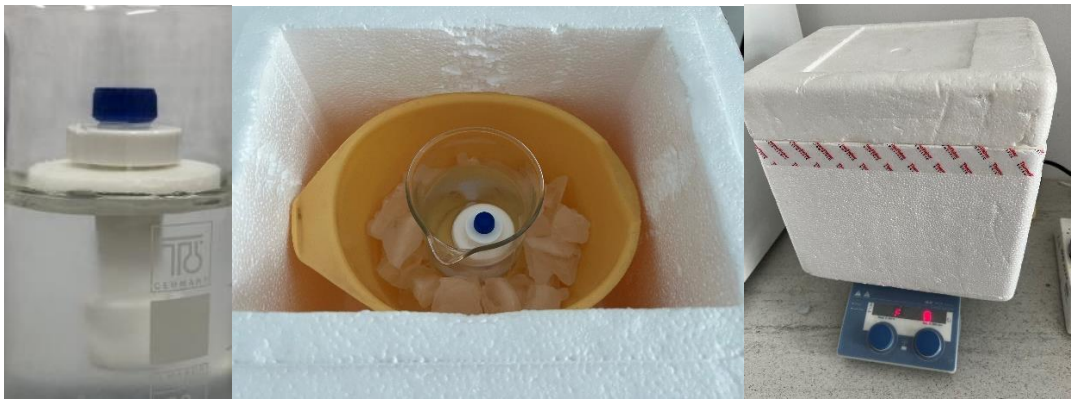
Dla wybranych znaczników V_{min} wynosiła odpowiednio: DyLight NHS Ester 488 (1 µl); DyLight NHS Ester 594 (0,7 µl); DyLight NHS Ester 650 (0,5 µl).

W procesie znakowania zastosowano większy nadmiar znacznika niż zalecane minimum w procedurze określonej przez producenta fluoroforów, aby zwiększyć szansę na bardziej efektywne wyznakowanie przeciwciał. W doświadczeniu użyto dużo mniejsze stężenia przeciwciał, co wynikało ze wielkości porcji dostarczanej od producenta białek. Z tego powodu trzeba było przeciwdziałać efektowi znacznego rozcieńczenia roztworu białka, stosując większy nadmiar fluoroforu.
Ostatecznie dobrane objętości roztworów DMSO ze znacznikami wynosiły: odpowiednio: DyLight NHS Ester 488 (12 µl); DyLight NHS Ester 594 (8,1µl); DyLight NHS Ester 650 (6,3 µl).

Do 1 ml porcji przeciwciał w buforze fosforanowym dodano 300 µl 0,05M buforu boranowego wg. Clarka i Lubsa, pH 8,6 w trzech porcjach po 100 µl, za każdym razem mieszając roztwór za pomocą pipety. Następnie całość roztworu umieszczano w szklanej fiolce na mieszadle magnetycznym (RCT basic, IKA), w łaźni lodowej. Dobraną objętość roztworu DMSO ze znacznikiem dodawano do roztworu przeciwciała w 3 porcjach po 4 µl, 2,7 µl lub 2,1µl odpowiednio dla fluoroforów DyLight NHS Ester 488, 594, 650, w odstępach 5-minutowych, między kolejnymi porcjami, w tym czasie stale mieszając próbkę. Po ostatniej porcji całość mieszano przez kolejną godzinę. Następnie pozostawiono roztwór białka z fluoroforem na 12 godzin w lodówce. Nadmiar fluoroforów w DMSO, z którego pobierano porcje do dializ, był przechowywany do następnego znakowania w zamrażalce w -30°C.

Kolejny krokiem przed rozpoczęciem dializy było przygotowanie zestawu dializacyjnego. Dializę przeciwciał przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu Float-A-Lyzer G2, Spectra/Por, MWCO=100 kD, o pojemności nominalnej 1 ml, z której uzyskuje się po dializie ok. 1,5 ml roztworu. Membrany zestawu pokryte są powłoką zabezpieczającą przed jej wysychaniem, którą należało usunąć. Z tego powodu przed dializą, kolumna była umieszczana na 20 minut w 20% roztworze etanolu, a następnie na kolejne 20 minut w wodzie dejonizowanej. Po tym czasie usuwano wodę z kolumny dializacyjnej i napełniano buforem PBS, wykorzystywanym później również do dializy. Kolumnę dializacyjną pozostawiano zanurzoną w buforze PBS w lodówce.

Roztwór białka z fluoroforem wyjmowano z lodówki i przenoszono do wcześniej przygotowanej i opróżnionej kolumny dializacyjnej Float-A-Lyzer G2, Spectra/Por, MWCO=100 kD. Całość umieszczono w 300 ml buforu dializacyjnego PBS. Naczynie z buforem i kolumną dializacyjną, umieszczono w łaźni lodowej, w celu zabezpieczenia białek przed wysoką temperaturą, jak pokazano na Rysunku 27. Pojemnik z lodem umieszczono w styropianowym pudełku, w celu ograniczenia roztapiania lodu w trakcie dializy. Zamknięty pojemnik styropianowy umieszczono na mieszadle magnetycznym i przy włączonym mieszaniu na 500 rpm, rozpoczęto dializę.



Rysunek 27. Zestaw dializacyjny wykorzystywany w doświadczeniach. Od lewej kolumna dializacyjna w buforze fosforanowym, pośrodku naczynie z zestawem dializacyjnym w łaźni lodowej, z prawej styropianowy pojemnik ochronny z zestawem dializacyjnym, zabezpieczający białka przed ekspozycją na temperaturę pokojową, podczas dializy. Opracowanie własne.

Dializa każdej próbki trwała łącznie ok. 30 godzin, w trakcie których wykonywano około 5-6 wymian buforu. Miało to na celu zapewnienie swobodnego uwalniania nadmiaru znacznika, niezwiązanego z białkiem, do buforu dializacyjnego w którym zanurzona była kolumna dializacyjna. Z reguły, odstępy czasowe między wymianami były między 3 a 5 godzin, z jednym, 12-godzinnym przedziałem nocnym. Wraz z wymianą buforu kontrolowano i uzupełniano, w miarę potrzeb lód w łaźni. Z obserwacji podczas dializ wynika, że styropianowy pojemnik zabezpieczał przed całkowitym rozpuszczeniem lodu, nawet w najdłuższym przedziale czasowym między wymianami, dzięki czemu temperatura buforu nie wzrastała powyżej temperatury osiąganej w lodówce. Decyzję o zakończeniu dializy podejmowano na podstawie pomiaru widma absorpcji roztworu buforu dializacyjnego, za pomocą spektrofotometru Cary 50 scan, Varian, Australia. Brak sygnału od wolnych znaczników pozwalał na zakończenie dializy.

W celu oszacowania stężenia przeciwciał po dializie określano całkowitą objętość uzyskanego roztworu białka. Po dializie uzyskiwano między 1380 µl a 1650 µl roztworu przeciwciał, co przy wyjściowej ilości przeciwciał (100 µg), dawało dostępne stężenia przeciwciał od 72 µg/ml do 61 µg/ml. Białka dzielono na porcje od 100 do 200 µl i umieszczano w micro ependorfach. Następnie próbki były mrożone w ciekłym azocie i przechowywane w zamrażalce w -80°C do czasu pomiarów.

3.2.2.2. Właściwości spektralne znaczników fluorescencyjnych związanych z przeciwciałami

Widma absorpcji zmierzono spektrofotometrem Cary 5000, Varian, Australia, widma emisji spektrofluorymetrem Cary Eclipse, Varian, Australia. Pomiary wykonywano w roztworze o objętości 2000 µl, w kuwetach o drodze optycznej 1 cm.

Na podstawie widm absorpcji obliczono stężenie molowe białka (S) oraz stopień wyznakowania białek N, określający liczba moli fluoroforu na mol białka, zgodnie z relacjami:

$$S\,[M] = \frac{[A_{280} - (A_{max} \cdot CF)]}{\varepsilon_{białka}}\, x\, WR \tag{11}$$

$$N = \frac{A_{max} \cdot WR}{\varepsilon_{+} \cdot S} \tag{12}$$

$\varepsilon_{białka}$- molowy współczynnik absorpcji białka (założono wartość dla IgG - 210.000 $M^{-1}cm^{-1}$)
ε_{+}- molowy współczynnik absorpcji fluoroforu, z Tabeli 2,
A_{max} – wartość zmierzonej absorbancji dla długości fali 595 nm (Dylight 594),
493 nm (Dylight 488) oraz 655 nm (Dylight 650),
CF- współczynnik poprawkowy dla fluoroforu z Tabeli 2,
A_{280} – wartość zmierzonej absorbancji przy długości fali 280 nm dla fluoroforów związanych z białkami,
WR- współczynnik rozcieńczenia obliczany ze stosunku całkowitej objętości próbki do ilości roztworu białka po dializie użytego podczas pomiarów, wynoszący w badaniach od 20 do 28 w zależności od próbki.

Widma emisji do wyznaczania wydajności kwantowych rejestrowano przy wzbudzeniu 480 nm dla wolnych fluoroforów DyLight 488 oraz związanych z przeciwciałami. Wzorcem do wyznaczania wydajności kwantowej była fluoresceina (Fluorescein sodium salt, 46960-25G-F, Sigma), której widma emisji rejestrowano przy tym samym wzbudzeniu 480 nm. Na podstawie danych literaturowych przyjęto wartość wydajności kwantowej fluoresceiny w etanolu równą 0,79 (Kellogg i Bennett, 1964).

Do pomiarów widm emisji DyLight 594, dla wolnych fluoroforów oraz związanych z przeciwciałami, stosowano wzbudzenie 570 nm. Z uwagi na dostępną w literaturze wartość wydajności kwantowej tego znacznika, wzorcem dla fluoroforu związanego z przeciwciałem, była niezwiązana z białkiem forma DyLight 594. Przyjęta wartość wydajności kwantowej do porównania wynosiła 0,83 (Sarkar i in., 2010).

Dla fluoroforu DyLight 650 w formie wolnej oraz związanej z przeciwciałami, widma emisji rejestrowano przy wzbudzeniu 600 nm. W tym przypadku do wyznaczenia wydajności kwantowej wykorzystano jako wzorzec, fluorofor Nile Blue (Nile Blue chloride, 85%, 222550-5G, Sigma-Aldrich), o znanej wydajności kwantowej w metanolu, wynoszącej 0,26 (Guerrero-Martínez i in., 2010), którego widma emisji rejestrowano w tych samych warunkach co fluoroforu DyLight 650.

Wydajność kwantową znaczników DyLight 488, 594, 650 związanych z przeciwciałami obliczano metodą porównawczą (Szabelski, 2015). Do obliczeń wydajności kwantowej wykorzystano zależność (Valeur, 2001):

$$QY = QY_w \frac{\int I(\lambda)d\lambda \cdot (1-10^{-A_w}) \cdot n^2}{\int I_w(\lambda)d\lambda \cdot (1-10^{-A}) \cdot n_w^2} \tag{13}$$

QY- wydajność kwantowa badanego znacznika,
QY_w- wydajność kwantowa wzorca,
$\int I(\lambda)d\lambda$ - pole powierzchni pod widmem emisji dla badanej próbki, obliczane w Origin 2022b,
$\int I_w(\lambda)d\lambda$ - pole powierzchni pod widmem emisji wzorca, obliczane w Origin 2022b,
A, A_w- absorbancja próbki i wzorca dla długości fali wzbudzenia,
n, n_w – współczynniki załamania rozpuszczalników badanej próbki i wzorca, dla buforu fosforanowego, przyjęto wartość wody (1,333), dla etanolu (1,361) a metanolu (1,329).

Dla wybranych do badań par donor – akceptor, dla których może zachodzić zjawisko bezpromienistego transferu energii IgG488-IgG594 (ozn. IgG488, IgG594, znacznik DyLight 488 oraz DyLight 594 związany z przeciwciałem), oraz IgG594-IgG650 (ozn. IgG650, znacznik DyLight 650 związany z przeciwciałem), obliczono całki nakładania widm emisji donora i absorpcji akceptora, oraz krytyczną odległość Förstera R_0, która dla pary donor – akceptor, definiowana jest jako dystans, w którym prawdopodobieństwo emisji fluorescencji ze wzbudzonego donora jest równe prawdopodobieństwu transferu energii do akceptora, czyli odległość na jakiej transfer energii wynosi 50%. Do jej wyznaczenia wykorzystano relację (Szabelski, 2015):

$$R_0 = (8{,}79 \cdot 10^{-5} \cdot \frac{\kappa^2 \cdot QY_D \cdot J}{n^4})^{\frac{1}{6}} \tag{14}$$

κ^2 - czynnik kątowy, przyjęto w obliczeniach stałą wartość $\kappa^2 = 0{,}667$
QY_D - wydajność kwantowa donora
J - całka nakładania widma emisji donora z widmem absorpcji akceptora
n - współczynnik załamania światła w ośrodku

Zmierzono również widma absorpcji i emisji fluorescencji samych znaczników DyLight 488, 594 i 650 (nie związanych z białkiem), w buforze fosforanowym, w celu sprawdzenia czy nie dochodzi do zmian widm, po związaniu się fluoroforu z białkiem.

Wykonano pomiary zaników fluorescencji w czasie i na ich podstawie, wyznaczono czasy życia w stanie wzbudzonym znaczników DyLight 488 oraz 594 w formie związanej i niezwiązanej z białkami. Badania wykonano metodą czasowo rozdzielczą (time-domain) stosując spektrofluorymetr FluoroTime 300 z oprogramowaniem EasyTau firmy PicoQuant oraz laserem Supercontinuum SuperK Extreme, NKT Photonics.

3.2.3. Badania wiązań alfa-defensyna - przeciwciało w roztworach

Na podstawie uzyskanych w poprzednim doświadczeniu wyników badań spektroskopowych dla wyznakowanych przeciwciał, wybrano dwie pary znaczników do relacji donor-akceptor:

- DyLight 488 (donor) - DyLight 594 (akceptor), oraz
- DyLight 594 (donor) - DyLight 650 (akceptor).

Najpierw przeprowadzono badania spektroskopowe oddziaływań antygen-przeciwciało. Ich celem było ustalenie, czy dochodzi do wiązania badanych przeciwciał z alfa-defensyną, oraz ocena czy zachodzi transfer energii między donorem i akceptorem. W związku z tym konieczne było wyznakowanie alfa-defensyn, wspólnym fluoroforem dla obu wybranych par (DyLight 594). Wyznakowanie alfa-defensyny umożliwiło wykorzystanie jej jako akceptora w pierwszej badanej parze oraz donora w drugiej:

- IgG488 (donor) -AD594 (akceptor)
- AD594 (donor) -IgG650 (akceptor)

(IgG488-AD594, AD594-IgG650, ozn. wyznakowane przeciwciało fluoroforem Dylight 488 oraz Dylight 650 w parze z wyznakowaną alfa-defensyną fluoroforem Dylight 594).

W następnym doświadczeniu zbadano dynamikę wiązania wyznakowanych przeciwciał z niewyznakowaną alfa-defensyną w dwóch konfiguracjach w roztworze:

- IgG488 (donor)-AD-IgG594 (akceptor) oraz
- IgG594 (donor)-AD-IgG650 (akceptor).

Celem badania było sprawdzenie jak szybko dochodzi do wiązania przeciwciał z alfa-defensynami w roztworze oraz czy po tym procesie nie zachodzą niekorzystne efekty wpływające na wiązania.

3.2.3.1. Znakowanie alfa-defensyn, charakterystyka spektralna

Do badań wykorzystano alfa-defensyny dostarczone przez tego samego producenta co przeciwciała (Hycult Biotech). Porcja peptydów zwierała 63,2 μg liofilizowanej mieszaniny alfa-defensyn HNP1-3, w proporcjach HNP-1, HNP-2 i HNP-3, odpowiednio 5:4:1. Całą porcję rozpuszczono w 1 ml buforu fosforanowego i wyznakowano fluoroforem DyLight 594. Znakowanie AD wykonano zgodnie z opisaną wcześniej procedurą dla przeciwciał (pkt. 3.2.2.1), z tą różnicą, że z uwagi na małą wielkość alfa-defensyn w stosunku do przeciwciała, konieczne było zastosowanie innego niż poprzednio, zestawu dializacyjnego, Float-A-Lyzer G2, Spectra/Por, MWCO 1 kD.

Charakterystykę spektroskopową wyznakowanej alfa-defensyny (ozn. AD594) wykonano, mierząc widma absorpcji spektrofotometrem Cary 5000, Varian, Australia, a widma emisji spektrofluorymetrem Cary Eclipse, Varian, Australia. Widma emisji rejestrowano przy wzbudzeniu 570 nm. Pomiary wykonywano w roztworze o objętości 2000 μl i w kuwetach o drodze optycznej 1 cm.

Wyznaczono dla AD594 stężenie białka S, stopień wyznakowania N oraz wydajność kwantową, stosując jako wzorzec niezwiązaną formę znacznika DyLight 594, zgodnie z równaniem (11-13). Do wyznaczenia stężenia białka S, należało wyznaczyć doświadczalnie molowy współczynnik absorpcji alfa-defensyny (ε), zgodnie z relacją:

$$\varepsilon = A_{280} / \cdot (l \cdot C) \tag{15}$$

gdzie, A_{280} - wartość absorbancji dla długości fali 280 nm
l - droga optyczna [cm]
C - stężenie molowe

W tym celu nową porcję alfa-defensyn (63,2 μg) rozpuszczono w 1 ml buforu fosforanowego. Na podstawie charakterystyki alfa-defensyn (Human HNP1-3, Natural, Hycult Biotech, o składzie HNP-1, HNP-2 i HNP-3 w relacji ilościowej 5:4:1),

oszacowano masę molową badanej mieszaniny. Przyjęto, na podstawie danych literaturowych, następujące masy peptydów w mieszaninie: HNP-1: 3442 Da, HNP-2: 3371 Da, HNP-3: 3486 Da. Masa molowa mieszaniny alfa-defensyn stosowana w badaniach wynosiła zatem 3418 Da. Znając masę białek (63,2 μg) i objętość badanej próbki, obliczono liczbę moli i stężenie molowe (*C*). Z widma absorpcji, alfa-defensyny w buforze PBS, zmierzonego w kuwecie o drodze optycznej 1cm (*l*), wyznaczono wartość absorbancji dla długości fali 280 nm (A_{280}), co pozwoliło na określenie molowego współczynnika absorpcji dla alfa-defensyny, wynoszącego 30655 $M^{-1}cm^{-1}$, który następnie wykorzystano do wyznaczenia stężenia alfa-defensyny w roztworze, a następnie do obliczenia stopnia wyznakowania.

3.2.3.2. Badania odziaływania przeciwciało – alfa-defensyna

Znając charakterystykę spektralną oraz stężenie molowe wyznakowanych przeciwciał (IgG488, IgG650) i alfa-defensyny (AD594), przeprowadzono badania odziaływania przeciwciało – alfa-defensyna w roztworze. W tym celu określono proporcje molowe wyznakowanych przeciwciał i alfa-defensyny, dla dwóch par: IgG488 (donor) - AD594 (akceptor) oraz AD594 (donor) - IgG650 (akceptor).

W przypadku pierwszej pary wykonano pomiary emisji fluorescencji dla czterech proporcji wyznakowanych przeciwciał do wyznakowanej alfa-defensyny: 1:0; 1:0,5; 1:1; 1:2 utrzymując stałą ilość moli IgG488 (donora) i zmienną ilość moli AD594 (akceptora), w stosunku do ilości moli przeciwciała, w stałej objętości próbki.

Dokładny opis stosowanych proporcji IgG do AD przedstawiono poniżej:
- proporcja 1:0 - stała ilość moli IgG488, bez wyznakowanej alfa-defensyny w próbce
- proporcja 1:0,5 - stała ilość moli IgG488, AD594 w ilości połowy ilości moli przeciwciała
- proporcja 1:1 - taka sama ilości moli IgG488 i AD594
- proporcja 1:2 - dwukrotnie więcej moli AD594 względem ilości moli IgG488

Dla drugiej pary AD594 – IgG650, wykonano pomiary emisji fluorescencji dla czterech analogicznych proporcji 1:0; 1:0,5; 1:1; 1:2, utrzymując stałą ilość moli IgG650 (akceptora) oraz zmienną ilość moli AD594 (donora).

Pomiary wykonano w kuwecie fluorescencyjnej 10 mm x 4 mm, wzbudzając na drodze optycznej 4 mm, w celu uniknięcia niekorzystnych efektów filtrów

wewnętrznych, utrzymując stałą objętość próbki 1,5 ml. Donor pierwszej pary - IgG488 wzbudzano przy 480 nm, natomiast donor drugiej pary - AD594 przy 570 nm. Widma zmierzono spektrofluorymetrem Cary Eclipse, Varian, Australia.

3.2.3.3. Badanie dynamiki wiązań przeciwciało – alfa-defensyna

Zbadano dynamikę wiązania wyznakowanych przeciwciał z niewyznakowaną alfa-defensyną w dwóch konfiguracjach: IgG488 (donor)-AD-IgG594 (akceptor) oraz IgG594 (donor)-AD-IgG650 (akceptor) w roztworze.

Do badań wybrano różne ilości moli niewyznakowanej alfa-defensyny, w stałych ilościach moli wyznakowanych przeciwciał wychwytujących i potwierdzających (4 proporcje stężeń) oraz w jedną próbkę, w której nie było przeciwciała potwierdzającego. Wybrane proporcje przedstawiały się następująco:
- 1:1:0 (taka sama ilość moli IgG488 i AD, brak w próbce IgG594, analogicznie dla drugiej pary: taka sama ilość moli IgG594 i AD, brak w próbce IgG650),
- 1:0,25:1 (oznaczenie: taka sama ilość moli IgG488 i IgG594, ilość AD równa jednej czwartej ilości moli przeciwciał),
- 1:0,5:1 (oznaczenie: taka sama ilość moli IgG488 i IgG594, ilość AD równa połowie ilości moli przeciwciał),
- 1:0,75:1 (oznaczenie: taka sama ilość moli IgG488 i IgG594, ilość AD równa trzy czwarte ilości moli przeciwciał),
- 1:1:1 (oznaczenie: taka sama ilość moli IgG488 i IgG594 i AD).

Pomiary widm emisji fluorescencji wykonano w mniejszej niż w poprzednich doświadczeniach kuwecie (10 mm x 2 mm, wzbudzając na drodze optycznej 2 mm), utrzymując stałą, małą objętość próbki - 0,7 ml. Zmniejszenie objętości próbki przy zachowaniu takiej samej ilości białek jak w poprzednich eksperymentach, miało na celu zwiększenie prawdopodobieństwa interakcji przeciwciała z alfa-defensyną w roztworze.

W kuwecie pomiarowej mieszano alfa-defensyny z przeciwciałami wychwytującymi (dla pierwszej pary z IgG488, dla drugiej z IgG594) i pozostawiano na 20 minut w celu związania. Po tym czasie dodawano przeciwciało wyznakowane akceptorem (dla pary pierwszej IgG594, dla drugiej IgG650), całość szybko mieszano, obracając 2-3 razy zamkniętą kuwetę o 180 stopni i natychmiast rozpoczynano pomiar

widm emisji. Ustawiono częstotliwość rejestracji, co 2 minuty przez około 60 minut. Pomiary wykonano za pomocą spektrofluorymetru Cary Eclipse, Varian, Australia, wzbudzając donor pierwszej pary - IgG488 przy długości fali 480 nm, natomiast donor drugiej pary – IgG594 przy 570 nm.

3.3. Układ pomiarowy wykorzystywany do testu detekcji alfa-defensyn

Pierwszy układ pomiarowy wykorzystywany do badań nad fotostabilnością hiperycyny na srebrze (pkt. 3.1.4 części Materiały i metody badawcze) został zmodyfikowany, w celu detekcji obecności alfa-defensyn na opracowanym biosensorze. Układ został modyfikowany w celu wzbudzania fluoroforów metodą całkowitego wewnętrznego odbicia (TIRF). Dodatkowo wyeliminowano zbędne elementy, mogące ograniczać swobodę doboru geometrii układu. Niezmiennie, układ oparty jest na płycie optycznej o wymiarach 45 x 60 cm stanowiącej podstawę, do której przymocowany jest układ pomiarowy. To sprawia, że, z uwagi na swoje małe rozmiary zewnętrze, może być w łatwy sposób wykorzystywany w innym miejscu, poza laboratorium badawczym. Przeprojektowano i przerobiono stolik, na którym umieszcza się sensor. Do tego celu wykorzystano mikroskopowy stolik krzyżowy, do którego zamocowano metalową płytkę z wyciętym obszarem na sensor. (Rysunek 28, oznaczenie 1,2). Obszar ten ma wymiar zbliżony do szkiełka nakrywkowego z małym rantem, umożliwiającym położenie slajdu w sposób stabilny i powtarzalny. Stolik umożliwia przesuwanie sensowa w obu osiach, za pomocą wygodnych i łatwo dostępnych pokręteł (Rysunek 28, 3) Z uwagi na fakt, że cały stolik oraz detektor zamocowane są do kolumny, możliwa jest również regulacja ich położenia w kierunku góra – dół, co było wykorzystywane przy ustawieniu geometrii układu (Rysunek 28, 4). Dzięki zastosowaniu nowego stolika znacząco zwiększył się zakres ruchów, co umożliwiło dokładne ustawienie każdej z planowanych cel pomiarowych, w osi soczewki skupiającej na końcu światłowodu, podłączonego do detektora OceanOptic (Rysunek 28, 5).

Zastosowany spektrometr OceanOptic Flame S-UV-VIS-ES, jest mały i zasilany z portu USB komputera rejestrującego widma. Jego kompaktowa forma wpisuję się w ideę badań, mających na celu zaproponowanie nie tylko czułego biosensora, ale również łatwej metody detekcji, eliminującej konieczność stosowania skomplikowanych

spektrofluorymetrów. Spektrometr OceanOptic umożliwia rejestrację widm w sposób ciągły, w zakresie od 200 do 850 nm, z częstotliwością zapisu co 0,1 sek. i rozdzielczością 0,4 nm. Zapis widm odbywa się na komputerze z zainstalowanym oprogramowanym sterującym OceanView 2.0.8.

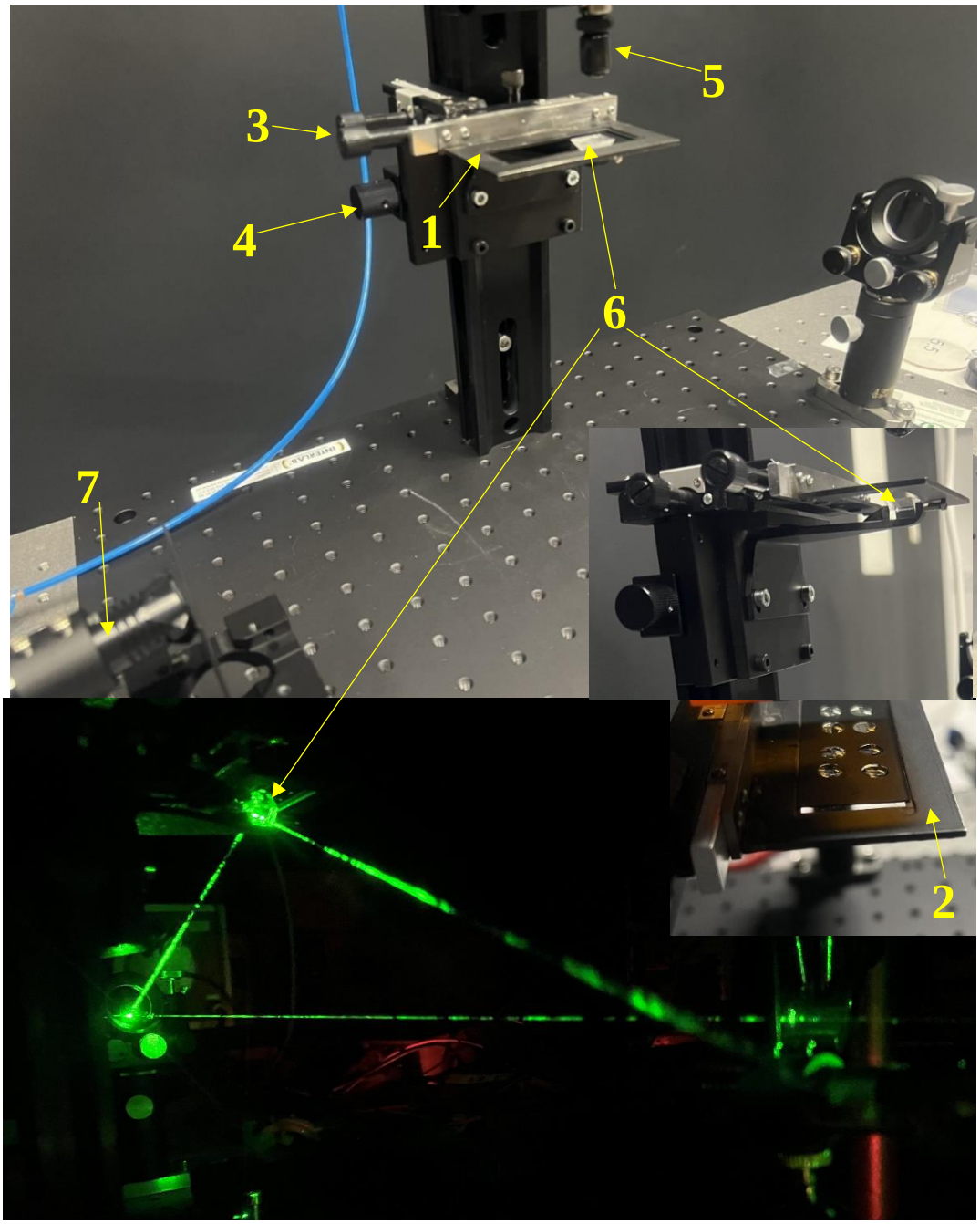
Pod stolikiem, w osi układu detekcyjnego, znajduje się specjalnie wykonany uchwyt, na którym zamocowano pryzmat (Rysunek 28, 6). Jest on wykorzystywany do wytworzenia fali wzbudzającej fluorofory w zjawisku całkowitego wewnętrznego odbicia. Wymiary pryzmaty zostały dobrane w taki sposób, aby umożliwić swobodne przesuwanie stolika z małym sensorem po jego powierzchni bez ograniczenia możliwości precyzyjnego ustawienia każdej celi pomiarowej w osi soczewki detektora. Wykorzystano równoramienny pryzmat o wymiarach powierzchni styku z sensorem 10 x 14 mm, wykonany ze szkła optycznego (N-BK7, n = 1,5168).

Aby wystąpiło zjawisko całkowitego wewnętrznego odbicia i powstała fala wzbudzająca, pryzmat musi być w bezpośrednim kontakcie ze szkiełkiem nakrywkowym, poprzez cienką warstwę olejku immersyjnego. W badaniach użyto olejku immersyjnego (Merck, Sigma Aldrich, n = 1,516). Odległość między stolikiem z sensorem, a umieszczonym pod nim pryzmatem ustawiono tak, aby powierzchnie pryzmatu i szkiełka nakrywkowego idealnie do siebie przylegały, w całym zakresie przesuwu, uwzględniając obecność warstwy olejku pomiędzy nimi. Przy ustawieniu zbyt dużej odległości, podczas przesuwu tracony byłby kontakt między pryzmatem a szkiełkiem sensora i nie dochodziłoby do wzbudzenia i emisji fluorescencji. Zbyt mała odległość między nimi mogłaby prowadzić do uniesienia szkiełka ponad granicę rantu stolika, podczas próby przesuwania próbki między kolejnymi celami pomiarowymi.

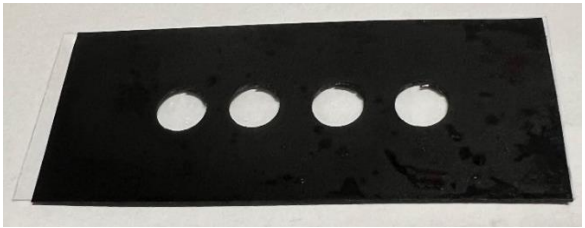
Docelowe źródło światła, do wzbudzania fluoroforu donora, można było wybrać dopiero po ustaleniu pary donor–akceptor do badań. Zdecydowano się na mały, komercyjnie dostępny, zasilany sieciowo, punktowy laser diodowy o nominalnej długości fali 532 nm i mocy 10 mW, umożliwiający wzbudzenie fluoroforu Dylight 594, związanego z przeciwciałami wychwytującymi sensora (Rysunek 28, 7). Za głowicą lasera umieszczono filtr typu bandpass 532 nm, poprawiający jego charakterystykę emisji. Ilość światła wzbudzającego, docierającego do próbki była regulowana doświadczalnie na etapie ustawiania układu pomiarowego, filtrami szarymi. Po tym procesie przed laserem pozostawiono filtr 0,4 OD. W celu eliminacji zbyt dużych sygnałów pochodzących od rozproszonego światła wzbudzającego, przed

układem detekcyjnym umieszczono filtr nieprzepuszczający długość fali emisji lasera 532 nm oraz filtr typu longpass 550 nm. Kąt padania wiązki lasera na pryzmat, związany z kątem granicznym zjawiska TIR, ustawiono doświadczalnie za pomocą lusterka, stanowiącego elementu układu pomiarowego. Na Rysunku 28 oprócz poszczególnych elementów układu pomiarowego, pokazano przebieg wiązki lasera w układzie wykorzystującym TIRF.

Geometrię układu pomiarowego, w tym ustawienie kąta granicznego dla TIRF, ustawiono z pomocą testowego slajdu. Otrzymano go poprzez wyznakowanie polilizyny na powierzchni szkiełka nakrywkowego, na którym umieszczono czarną taśmę PCV z czterema celami pomiarowymi. (Rysunek 29). Slajd testowy otrzymano zgodnie z procedurą: warstwę polilizyny aktywowano buforem węglanowym o pH 8,5, następnie naniesiono na cele różne stężenia wolnej formy znacznika Dylight 594, w tym samym buforze. Po związaniu znacznika z powierzchnią, sensor przechowywano w lodówce. Przed każdym pomiarem na cele nanoszono ok. 15 µl buforu fosforanowego, symulując z ten sposób warunki pomiarowe docelowego biosensora. Szkiełko testowe wykorzystywano przed każdą sesją pomiarową jako test sprawdzający, czy nie doszło do zmiany w geometrii układu oraz oceny stabilności pracy lasera wzbudzającego.



Rysunek 28. Układ pomiarowy wykorzystywany do testu obecności alfa-defensyn. Przebieg wiązki lasera w zjawisku całkowitego wewnętrznego odbicia. Opracowanie własne.



Rysunek 29. Szkiełko testowe do szybkiej weryfikacji poprawności geometrycznej układu pomiarowego. Na rysunku 4 cele pomiarowe, ze związanym na powierzchni znacznikiem Dylight 594, wykorzystywane jako element kontroli jakości układu przed sesjami pomiarowymi. Opracowanie własne.

3.4. Opracowanie procedury testu obecności alfa-defensyn na biosensorze

Opracowano procedurę przeprowadzania testu na obecność alfa-defensyn metodą wzmocnionej fluorescencji na powierzchni nanowarstw srebra (ozn. AD-MEF). W zakresie badań było ustalenie minimalnej ilości przeciwciał wychwytujących, jaka będzie niezbędna do poprawniej detekcji alfa-defensyn z próbki. Ponieważ zgodnie z założeniami protokołu stężenie przeciwciał wychwytujących użytych do testu jest równe stężeniu przeciwciał potwierdzających, zmiana pierwszych będzie skutkowała tożsamą zmianą stężenia drugich przeciwciał. W badaniach natężenie światła wzbudzającego próbkę było regulowane, poprzez dobór filtrów szarych osłabiających laser w taki sposób, aby umożliwić rejestrację stabilnego sygnału emisji akceptora, jednocześnie redukując nominalną moc lasera, w celu ograniczenia efektu fotowybielania znaczników.

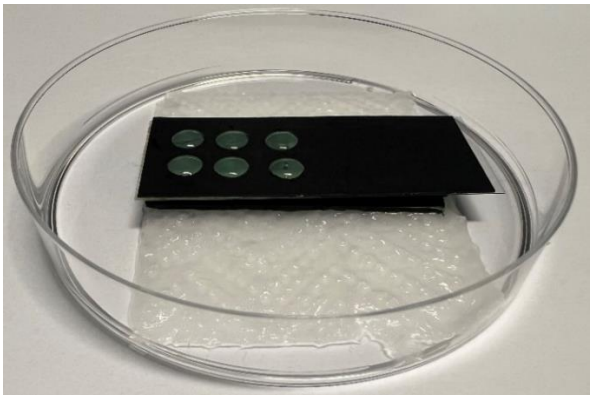
Matrycą do badań było szkiełko nakrywkowe, pokryte roztworem polilizyny, na którym osadzono nanowyspy srebra, zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 3.1.1. Wybór szkiełek po syntezie odbywał się na podstawie pomiarów widm absorpcji. Aby zapewnić powtarzalność sensorów w teście AD-MEF, określono szczegółowe kryteria dotyczące doboru szkiełek po syntezie nanowarstw srebra. Obejmowały one analizę kształtu oraz uzyskanie akceptowalnej wartości absorbancji w maksimum wynoszącej 0,36 - 0,41 i położenia maksimum w przedziale 434 - 440 nm.

Na powierzchnię, po stornie warstwy nanosrebra, naklejana była czarna taśma PCV, z sześcioma celami pomiarowymi, każda o średnicy ok. 6 mm (Rysunek 20, C).

Przeciwciała wychwytujące alfa-defensyny (związane z powierzchnią sensora) oraz potwierdzające ich obecność w próbce, wyznakowane były, wybranymi podczas badań fluoroforami Dylight 594 (ozn. IgG594) oraz Dylight 650 (ozn. IgG650), zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 3.2.2.1. Przed badaniami porcje przeciwciał wyjmowano z zamrażalki (-80°C) i rozmrażano w lodówce.

Na każdą celę pomiarową nakładano 30 µl roztworu wyznakowanego przeciwciała wychwytującego (IgG594) i stężeniu od 25 µg/ml do 68 µg/ml, w zależności od doświadczenia. Różne stężenia uzyskano, rozcieńczając roztwór białek z dializy w buforze fosforanowym.

Po nałożeniu porcji przeciwciał wychwytujących na cele, szkiełka pozostawiono na 24h w lodówce w zamkniętych i zabezpieczonych przed wyschnięciem próbki, szalkach Petriego, w celu ich związania IgG594 z powierzchnią sensora (Rysunek 30).



Rysunek 30. Wykorzystywany do badań biosensor z naniesionym roztworem przeciwciała wychwytującego na szalce Petriego. Na dnie warstwa zabezpieczająca próbkę przed wysuszeniem. Sensor umieszczony na podkładce dystansującej, ograniczającej kontakt z mokrą warstwą zabezpieczającą. Opracowanie własne.

Po 24 godzinach inkubacji przeciwciał z powierzchnią, cele przepłukano buforem fosforanowym, usuwając niezwiązane przeciwciała IgG594.

Na wszystkie cele nakładano po 35 µl buforu blokującego możliwość wiązania innych białek z powierzchnią. Pozostawiono sensor przez 2 godziny w temperaturze pokojowej, w szalce zabezpieczonej przed wyschnięciem próbki. Po tym czasie cele zostały opłukane buforem PBS. Zastosowano bufor blokujący albuminy wołowej o składzie: 1 % BSA (ang. Bovine Serum Albumin), 1 % sacharozy, 0,05 % azydku sodu NaN_3, 0,05 % Tween-20 w 50 mM buforze Tris–HCl, pH 7,4.

Po związaniu przeciwciał z powierzchnią i jej zablokowaniu, na cele sensora nanoszono: roztwór alfa-defensyn w buforze PBS, lub w przypadku docelowego testu, płyn stawowy, w ilości 25 µl na celę. Sensor pozostawiano na 1h w temperaturze pokojowej w celu inkubacji.

Po związaniu przeciwciał z alfa-defensynami cele zostały przepłukane buforem PBS.

W kolejnym kroku na każdą celę naniesiono przeciwciała potwierdzające, wyznakowane fluoroforem Dylight 650 (IgG650) w ilości 25 µl i stężeniu od 25 µg/ml do 68 µg/ml, w zależności od doświadczenia. Sensor pozostawiano na 1h w temperaturze pokojowej w celu inkubacji.

W trakcie inkubacji przeciwciał potwierdzających przygotowano układ pomiarowy do pomiarów spektroskopowych, opisany w pkt. 3.3. Na powierzchnię pryzmatu naniesiono olejek immersyjny, a następnie na stoliku umieszczono slajd testowy (Rysunek 29) z celami o różnych stężeniach znacznika Dylight 594 związanego z powierzchnią szkła. Na każdą z nich naniesiono 15 µl buforu fosforanowego. Pomiary widm emisji na zbudowanym układzie przeprowadzano każdorazowo w pomieszczeniu o ograniczonym dostępie światła dochodzącego do układu pomiarowego. Po włączeniu lasera przesuwano stolik ze slajdem testowym, aby zarejestrować sygnał fluorescencji z cel sensora. Za pomocą oprogramowania OceanView oceniano wizualnie zmianę intensywności emisji z każdej celi. Test ten służył szybkiemu sprawdzeniu układu przed pomiarami docelowej próbki, pod kątem stabilności pracy lasera oraz niezmienności geometrii układu.

Po inkubacji przeciwciał potwierdzających z alfa-defensynami niezwiązane z antygenami IgG650 usunięto, przepłukując cele buforem PBS. Cel zabezpieczano przed wyschnięciem nakładając na każdą 15 µl buforu fosforanowego. Do momentu pomiaru sensor był przechowywany w zamkniętych szalkach Petriego z warstwą zabezpieczającą przed wypchnięciem próbki.

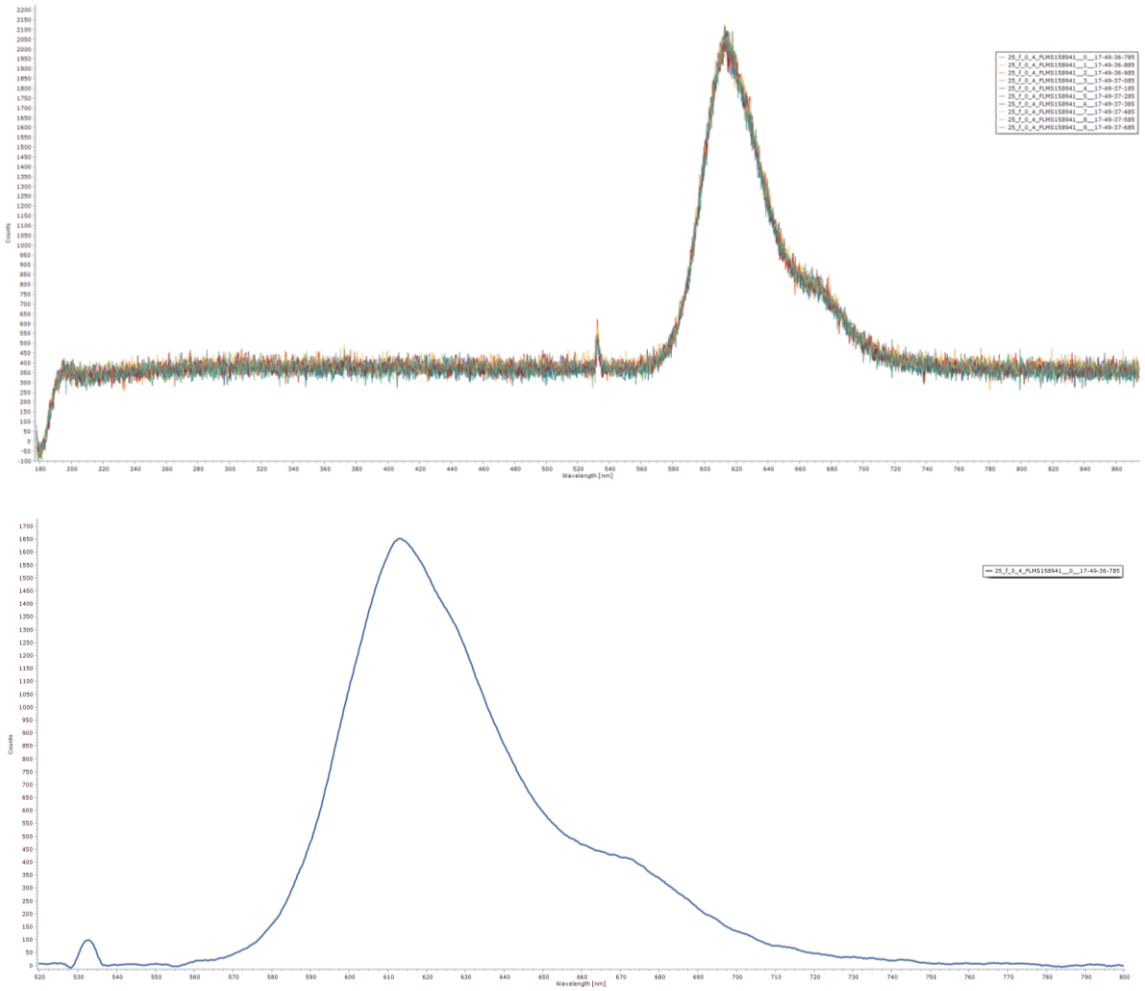
Przygotowany do pomiarów sensor umieszczano na stoliku układu pomiarowego i przesuwano po powierzchni pryzmatu, w celu równomiernego rozprowadzenia olejku immersyjnego pod celami pomiarowymi. Jeśli był to kolejny sensor w sesji pomiarowej, przed położeniem następnego, uzupełniano kroplę olejku impresyjnego na pryzmacie. Następie włączano laser i wykonywano pomiary spektroskopowe.

W zależności od doświadczenia, przy różnych stężeniach przeciwciał, stosowano również w trzy różne intensywności światła dostarczanego do próbki: w maksymalnej emisji lasera, osłabionej filtrem szarym OD 1,0 (48-095, Edmund optics) oraz OD 0,4 (46-219, Edmund optics), w celu doboru optymalnej ilości światła do zarejestrowania stabilnego i różnicującego sygnału akceptora.

Kolejnym etapem po opracowaniu protokołu testu było określenie współczynnika wzmocnienia emisji fluorescencji na powierzchni nanosrebra. Sensor został przygotowany w taki sposób, aby cele pomiarowe znajdowały się po obu stronach slajdu, czyli na części z warstwą nanosrebra i pokrytej jedynie polilizyną. Zbadano dwa rodzaje próbek. Pierwszy zestaw stanowiły sensory z celami na

powierzchni szkła z polilizyną i na powierzchni nanosrebra, na których inkubowane były jedynie wyznakowane przeciwciała wychwytujące (IgG594). Drugi zestaw stanowiły cele z testową „kanapką” (dwa wyznakowane przeciwciała IgG594, IgG650 z wychwyconą AD nakładaną na cele w stężeniu 25 µg/ml). Obliczono średni stosunek maksimum emisji fluorescencji w celach na srebrze do emisji na szkle, określając współczynnik wzmocnienia fluorescencji.

Widma rejestrowano za pomocą dedykowanego dla spektrometru oprogramowaniu OceanView. Widmo emisji z każdej celi rejestrowano w czasie 0,1 sek., za każdym razem zapisując 10 widm, które następnie były uśredniane do jednego widma. Ilość danych zapisywanych przez spektrometr jest na tyle duża, że obróbka widm za pomocą np. arkusza kalkulacyjnego, byłaby skomplikowana i czasochłonna. Dlatego zdecydowano się na wykorzystanie darmowego (do użytku niekomercyjnego), programu do obróbki widm spektroskopowych Spectragryph v1.2.16.1 (Dr. Friedrich Menges Software-Entwicklung, 2024). Program umożliwia otwarcie na raz większej ilości widm i dokonanie automatycznej obróbki, zgodnie z ustawionymi krokami edycji. Korzystając z funkcji „Automate”, ustawiono sekwencję edycji zmierzonych widm w następujących krokach: uśrednianie arytmetyczne wszystkich otwartych widm, wygładzenia uśrednionego widma za pomocą filtra wg. metody Savitzky–Golay, przesunięcie na osi y o wartość sygnału 375 (średni poziom szumu detektora), wycięcie zakresów krótkofalowych z wykresu (prezentacja widma od 520 do 800 nm), oraz określenie linii bazowej (zerowej) na podstawie zakresu 780 - 800 nm, co pokazano graficznie na Rysunku 31. W programie można otworzyć serię widm zmierzonych dla danej celi i po uruchomieniu zapisanej sekwencję edycji, natychmiast otrzymać gotowe widmo. Po wizualnej ocenie poprawności wykonania przez program powyższych kroków przeprowadzono z jego pomocą automatyczną: normalizację widm w maksimum zakresu 600-630 nm i obliczenie pola pod krzywą emisji dla zakresu 650-730 nm (AUC_{widmo}) w celu ilościowej oceny sygnału akceptora. Wyniki analiz były automatycznie zapisywane przez program do plików .csv, które były analizowane w arkuszach MS Excel.



Rysunek 31. Widma emisji fluorescencji, zarejestrowane przez detektor OceanOptic, z jednej celi pomiarowej. U dołu uśrednione widmo po obróbce w oprogramowaniu Spectragryph. Opracowanie własne.

3.5. Zastosowanie biosensora do oceny ilościowej alfa-defensyn

3.5.1. Badania czułości metody dla różnych stężeń alfa-defensyn w buforze fosforanowym

Celem badania było zweryfikowanie czułości testu AD-MEF, przy różnych stężeniach alfa-defensyn w buforze fosforanowym. W pierwszej kolejności sprawdzono czy testem można wykryć stężenia alfa-defensyn, które mogą występować w próbkach od pacjentów.

Badania przeprowadzono na sensorze testu AD-MEF przygotowanego zgodnie z protokołem opisanym w pkt. 3.4. Stężenia przeciwciał wychwytujących i

potwierdzających wynosiły 35 µg/ml, a laser wzbudzający próbkę osłabiany był filtrem szarym OD 0,4.

Na cele pomiarowe nakładano różne stężenia alfa-defensyn. Roztwór wyjściowy stanowiła próbka alfa-defensyn (HNP1-3, Natural, Hycult Biotech) w dostarczonej porcji 112 µg, którą rozpuszczono w 1ml buforu PBS. Z tego roztworu wykonano rozcieńczenia do badanych stężeń: 5 µg/ml, 35 µg/ml, 55 µg/ml, 75 µg/ml. Na każdą celę nałożono zgodnie z protokołem po 25 µl, roztworu badanej próbki tj. AD w buforze fosforanowym o różnym stężeniu w każdej celi: 5 µg/ml, 35 µg/ml, 55 µg/ml, 75 µg/ml i 112 µg/ml. Ostatnia cela (szósta) na sensorze była celą kontrolną, na której nie było antygenu. Na czas inkubacji alfa-defensyn w pozostałych celach, cela kontrolna była zabezpieczona przed wyschnięciem buforem PBS (25 µl).

Po obróbce widm i obliczeniu pól pod krzywą emisji (AUC_{widmo}) dla każdej celi pomiarowej i kontrolnej, w zakresie emisji akceptora (650 - 730 nm) w oprogramowaniu Spectragryph, określono wartość sygnału samego akceptora ($AUC_{sygnał}$). Obliczono ją dla każdej celi pomiarowej, odejmując od pola pod krzywą dla danego widma emisji (AUC_{widmo}) wartość pola pod krzywą widma emisji z celi kontrolnej (bez alfa-defensyn). Do tego celu wykorzystano arkusz kalkulacyjny MS Excel.

3.5.2. Badania możliwości wykorzystania metody do wykrywania alfa-defensyn w płynie stawowym

W badaniu wykorzystano próbki płynu stawowego pobrane od pacjentów z podejrzeniem zakażenia okołoprotezowego. Celem analizy była ocena skuteczności testu AD-MEF w wykrywaniu obecności alfa-defensyn w płynie stawowym.

Lekarze specjaliści ortopedii i traumatologii, współpracujący w ramach badań, kwalifikowali pacjentów na podstawie objawów klinicznych sugerujących infekcję okołoprotezową. Próbki pobierane były w dwóch szpitalach: w Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym w Olsztynie (13 pacjentów) oraz w Szpitalu Klinicznym Ministerstwa Spraw Wewnętrznych i Administracji z Warmińsko-Mazurskim Centrum Onkologii w Olsztynie (1 pacjent). Za każdym razem przed pobraniem uzyskiwano świadomą, pisemną zgodę od pacjentów, na uczestnictwo w eksperymencie medycznym. W szpitalach wykonywano pacjentom inne badania laboratoryjne, ukierunkowane na

diagnostykę infekcji okołoprotezowych, kierując się standardami określonymi w międzynarodowych zaleceniach ICM 2018 (Tabela 1).

Pobrane od pacjentów próbki płynu stawowego były odbierane ze szpitali w ciągu 2 - 3 godzin od zabiegu i przygotowywane do przechowywania. Uzyskiwano w ramach jednego pobrania od pojedynczego pacjenta bardzo zróżnicowane ilość płynu stawowego, od 1 ml do 9 ml. Proces obróbki płynu po pobraniu, polegał na krótkim odwirowaniu przez 3 minuty, przy 6600 obr./min, w celu oddzielenia zanieczyszczeń z krwi od płynu. Następnie pobierany był supernatant, który porcjowano i umieszczano w micro ependorfach, oznaczonych numerem pacjenta. Wszystkie próbki były szybko zamrażane w ciekłym azocie (Rysunek 32) i przechowywane w zamrażalce w temperaturze -80°C, do czasu wykonania badań. Zdjęcia próbek, uzyskanych od pacjentów przestawiono poglądowo na Rysunku 33.



Rysunek 32. Próbka płynu stawowego pobranego od pacjenta po odwirowaniu (z lewej) i zamrożeniu w ciekłym azocie (z prawej). Opracowanie własne.

Pierwsze testy AD-MEF wykonano dla siedmiu wybranych próbek, każda pochodziła od innego pacjenta. Każdą próbkę zbadano w dwóch stężeniach płynu stawowego: bez rozcieńczenia (próbka pobrana od pacjenta) oraz rozcieńczona w stosunku 1:1 w buforze fosforanowym.

Przygotowanie sensora do testu AD-MEF, cały proces inkubacji, rejestracja widm emisji i ich obróbka, były wykonane zgodnie z protokołem opisanym w pkt. 3.4. oraz analizą widm z wykorzystaniem celi kontrolnej, opisaną w pkt. 3.5.1. Stężenia przeciwciał wychwytujących i potwierdzających wynosiły 35 µg/ml, a laser wzbudzający próbkę osłabiany był filtrem szarym OD 0,4.



Rysunek 33. Zdjęcia próbek płynu stawowego, pobranych od 14 pacjentów włączonych do badania z podejrzeniem zakażenia okołoprotezowego. Opracowanie własne.

Płyn stawowy w dwóch stężeniach, inkubowano zgodnie z protokołem w celach pomiarowych (po 5 na slajd), nakładając na każdą 25 µl roztworu. Ostatnia szósta cela, na każdym sensorze, była celą kontrolną, na której zamiast próbki był sam bufor fosforanowy. Do doświadczania wykorzystano 3 sensory, zmierzono sygnały z 14 cel pomiarowych i 3 kontrolnych.

Na podstawie wyników powyższych badań, wykonano dodatkowe doświadczenie, wybierając jedną próbkę płynu, od jednego z pacjentów, w celu przeprowadzenia testu AD-MEF przy dodatkowych rozcieńczeniach płynu stawowego w proporcji: 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:50.

3.5.3. Wyznaczenie krzywej kalibracyjnej testu AD-MEF, wykorzystywanej do oceny ilościowej alfa-defensyn w próbkach płynu stawowego

Krzywą kalibracyjną testu AD-MEF wykonano dla sześciu różnych stężeń roztworu alfa-defensyn w buforze PBS: 1 µg/ml, 2 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml i 20 µg/ml. Zabezpieczono odpowiednią ilość wyznakowanych przeciwciał, tak aby wykonać krzywą kalibracyjną i testy próbek pacjentów, bez potrzeby dodatkowego znakowania, ponieważ w takim przypadku, należałoby powtórzyć krzywą kalibracyjną.

Przygotowano sześć sensorów testu AD-MEF, tak aby na każdym z nich było różne stężenie AD. Na jednym sensorze było 5 cel z tym samym stężeniem AD oraz jedna cela kontrolna.

Przygotowanie sensora do testu AD-MEF, cały proces inkubacji, rejestracja widm emisji i ich obróbka, były wykonane zgodnie z protokołem opisanym w pkt. 3.4. oraz analizą widm z wykorzystaniem celi kontrolnej, opisaną w pkt. 3.5.1. Stężenia przeciwciał wychwytujących i potwierdzających wynosiły 35 µg/ml, a laser wzbudzający próbkę osłabiany był filtrem szarym OD 0,4.

Na wykresach do wyznaczenia krzywej kalibracyjnej, na osi X naniesiono stężenie AD w próbce, a na osi Y wartość $AUC_{sygnał}$. Wykresy zaprezentowano w skali liniowej i logarytmicznej. Dopasowano linię trendu, której równanie zostało wykorzystane jako krzywa kalibracyjna testu AD-MEF. Dla danego stężenia, z pięciu pomiarów, obliczono średnią i odchylenie standardowej od wartości średniej, zgodnie z relacją:

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}{n(n-1)}} \tag{16}$$

Gdzie $S_{\bar{x}}$ - odchylenie standardowe od wartości średniej
x- wartość $AUC_{sygnał}$ dla i-tej celi danego stężenia alfa-defensyny
$\bar{x}$ – wartość średnia $AUC_{sygnał}$ z n=5 cel danego stężenia alfa-defensyny

Wartości odchylenia standardowego od wartości średniej zaznaczono w postaci słupków błędów na wykresach.

3.6.Testy AD-MEF i AD-LF obecności alfa-defensyn w płynie stawowym pobranym od pacjentów

Test AD-MEF wykonano dla 13 pacjentów zakwalifikowanych do badania (pacjenci oznaczeni od P2 do P14) w trzech sesjach pomiarowych.

Próbki płynu stawowego były bezpośrednio po pobraniu porcjowane, zamrażane i przechowywane do czasu wykonania testu, zgodnie z opisem w pkt. 3.5.2. Dzień przed wykonaniem testu próbki z płynem stawowym były wyjmowane z zamrażalki (-80°C) i rozmrażane w lodówce.

Przygotowanie sensora do testu AD-MEF, cały proces inkubacji, rejestracja widm emisji i ich obróbka, były wykonane zgodnie z protokołem opisanym w pkt. 3.4. oraz

analizą widm z wykorzystaniem celi kontrolnej, opisaną w pkt. 3.5.1. Stężenia przeciwciał wychwytujących i potwierdzających wynosiły 35 µg/ml, a laser wzbudzający próbkę osłabiany był filtrem szarym OD 0,4.

Przed pomiarem, próbki płynu stawowego były krótko mieszane w mikro ependorfach, aby w całej objętości było takie same stężenie materiału biologicznego, a następnie rozcieńczane w buforze fosforanowym w stosunku 1:2, wybranym na podstawie wyników badań w części 4.4.2.

Dla każdego pacjenta przygotowano oddzielny sensor, na którym znajdowało się 6 cel pomiarowych. Zgodnie z przyjętą metodologią wykonywania testu, na pięciu celach testowych nanoszono próbkę, rozcieńczony płyn stawowy, w ilości 25 µl na celę. Szósta cela, kontrolna nie była poddawana ekspozycji na próbkę. Minimalna ilość roztworu płynu stawowego do testu wynosiła zatem 125 µl. Z tego wynika, że w celu wykonania testu AD-MEF, konieczne jest pobranie od pacjenta objętość około 42 µl płynu. Tak mała objętość wymagana do przeprowadzenia testu, jest bardzo korzystna z uwagi na często ograniczone możliwości pobrania odpowiedniej ilości płynu stanowego. Związane są one z brakiem płynu w przestrzeni stawowej lub utrudnionym dostępem do wykonania punkcji.

Po wykonaniu pomiarów na układzie do testu AD-MEF i analizie widm, z których otrzymano wartość AUC_{widmo}, w arkuszu MS Excel obliczano $AUC_{sygnał}$. Stosując równanie krzywej kalibracyjnej, uzyskane w pkt. 4.4.3, wyznaczono stężenie AD dla każdej celi pomiarowej, zgodnie z relacją:

$$S_{AD} = e^{\left(\frac{AUC_{sygnał}-1{,}3349}{0{,}9122}\right)} \cdot WR_{płynu} \tag{17}$$

gdzie $WR_{płynu}$ – współczynnik rozcieńczenia płynu stawowego w próbce, równy 3 (rozcieńczenie płynu w buforze fosforanowym w stosunku 1:2)

Obliczono wartość średnią stężenia alfa-defensyn oraz odchylenie standardowe wartości średniej dla każdego pacjenta, z pięciu cel pomiarowych.

W tej samej sesji pomiarowej i z tej samej próbki płynu, którą wykorzystano do testu AD-MEF, wykonano również komercyjny test na obecność alfa-defensyn w płynie stawowym. Wybrano do badań medyczny test przepływu bocznego Synovasure Alpha Defensin Lateral Flow Test. Z uwagi na wysoką cenę komercyjnych zestawów, ograniczony budżet badań i fakt rekrutowania pacjentów do czerwca 2024 r., zakupiono

9 zestawów, co umożliwiło porównanie wyników obu testów dla 9 z 13 zbadanych testem AD-MEF pacjentów.

Charakterystykę testu AD-LF i sposób jego wykonania, opisywano szczegółowo w pkt. 1.8.4. W sesjach pomiarowych testy wykonywane były w temperaturze pokojowej, nieprzekraczającej 23°C. Płyn do testu pobierano za pomocą dozowników dołączonych do zestawu, pozwalających na odmierzenie, wymaganych 15 µl płynu, metodą kapilarną (Microsafe). Następnie płyn był rozcieńczany w dołączonej do zestawu buteleczce z buforem fosforanowym i po wymieszaniu, nakładany na kasetę testową, w postaci 3 pełnych kropel. Odczyt testu odbywał się po 10 minutach od rozpoczęcia testu (podania ostatniej kropli). Test przez ten czas leżał płasko na stole, z dostępem do światła dziennego. Wynik testu udokumentowano poprzez wykonanie zdjęcia aparatem fotograficznym. Testem przebadano próbki pochodzące od pacjentów nr 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 12, 14. Wszystkie testy AD-LF miały datę ważności do 31.01.2025 r., 8 z nich pochodziło z serii LOT: 66372319 (pacjenci: 2, 4, 5, 7, 8, 11, 12, 14), jeden z serii LOT: 66184277 (pacjent 10).

Porównano wyniki obu testów, zakładając, że dla testu AD-MEF za pozytywny wynik testu w diagnostyce zakażeń okołoprotezowych uznaje się wykrycie stężenia AD powyżej poziomu odcięcia komercyjnego testu AD-ELISA wynoszącego 5,2 µg/ml. Dla testu przepływu bocznego natomiast uzyskanie dwóch widocznych na pasku testowym linii: testowej i kontrolnej.

Decyzję o zdiagnozowaniu lub wykluczeniu zakażenia okołoprotezowego, podejmowali lekarze na podstawie wyników badań laboratoryjnych i oceny klinicznej pacjentów, zgodnie ze standardami diagnostyki zakażeń okołoprotezowych ICM 2018 (Tabela 1).

Wyniki obu testów, AD-MEF i AD-LF, porównano z diagnozą lekarską, określając ilości wyników:

- prawdziwie dodatnich, PD (stwierdzona infekcja w ocenie klinicznej i wyniku testu),
- prawdziwie ujemnych PU (stwierdzony brak infekcji w ocenie klinicznej i wyniku testu),
- fałszywie dodatnich FD (stwierdzona infekcja w wyniku testu i niepotwierdzona w ocenie klinicznej),

- fałszywie ujemnych FU (ujemny wynik testu pomimo potwierdzonego zakażenia w obrazie klinicznym),

w celu określenia czułość i swoistości diagnostycznej oraz dodatniej i ujemnej wartości predykcyjnej, każdego z testów na badanej próbie pacjentów:

$$\text{czułość } [\%] = [PD / (FU + PD)] \times 100\%, \tag{18}$$

$$\text{swoistość } [\%] = [PU / (PU + FD)] \times 100\% \tag{19}$$

$$\text{dodatnia wartość predykcyjna } [\%] = [PD / (PD + FD)] \times 100\% \tag{20}$$

$$\text{ujemna wartość predykcyjna } [\%] = [PU / (PU + FU)] \times 100\% \tag{21}$$

4. Wyniki badań i dyskusja

4.1.Synteza nanowarstw srebra

4.1.1. Badania stabilności nanowarstw srebra w różnych warunkach otoczenia

Zbadano stabilność otrzymywanych nanocząstek srebra, w zależności od warunków przechowywania i procesu przygotowywania szkiełek do wykorzystania ich jako biosensor. Założono sprawdzenie potencjalnego wpływu czynników zewnętrznych jak światło czy tlen atmosferyczny, na zmianę widm przygotowanych warstw z nanocząstek. Szkiełka syntetyzowane z warstwą polilizyny i bez niej zbadano po przechowywaniu: w lodówce w wodzie, i bez wody (na szalkach Petriego) w temperaturze pokojowej, oraz przy ekspozycji na światło słoneczne i sztuczne (w pomieszczeniu laboratoryjnym) bez wody i w wodzie dejonizowanej w temperaturze pokojowej. W tym celu zmierzono widma absorpcji po 1, 2.5, 5, 24, 48 i 72 godzinach przechowywania w różnych warunkach otoczenia. Syntezy nanowysp srebra wykonano na dwóch rodzajach szkiełek: z warstwą polilizyny i bez niej, w celu sprawdzenia ewentualnego wpływu modyfikacji powierzchni szkła na jakość koloidu srebra.

W przypadku próbek syntetyzowanych na szkiełkach bez polilizyny przechowywanych bez wody, przy ekspozycji na światło i w ciemności (Tabela 3. próbka 1 i 2), obserwowany jest niewielki, mieszczący się w granicach błędu pomiarowego spadek intensywności absorbancji po 48 godzinach, co sugeruje stabilność warstwy srebra w warunkach przechowywania. W krótszych odstępach czasu widać fluktuacje wzrostu i spadku absorbancji, które mogą być związane niewielkimi różnicami w ustawieniu płytki w komorze pomiarowej, a nie z procesami fizycznymi lub chemicznymi na warstwie. W przypadku szkiełek z polilizyną przechowywanych bez wody przy ekspozycji i braku eskpozycji na światło (próbka 3 i 4) obserwowana tendencja zmiany widma jest podobna, jak opisano powyżej, jedynie zauważalne jest lekkie przesunięcie w kierunku dłuższych długości fal i może to być związane ze zmianą współczynnika załamania światła.

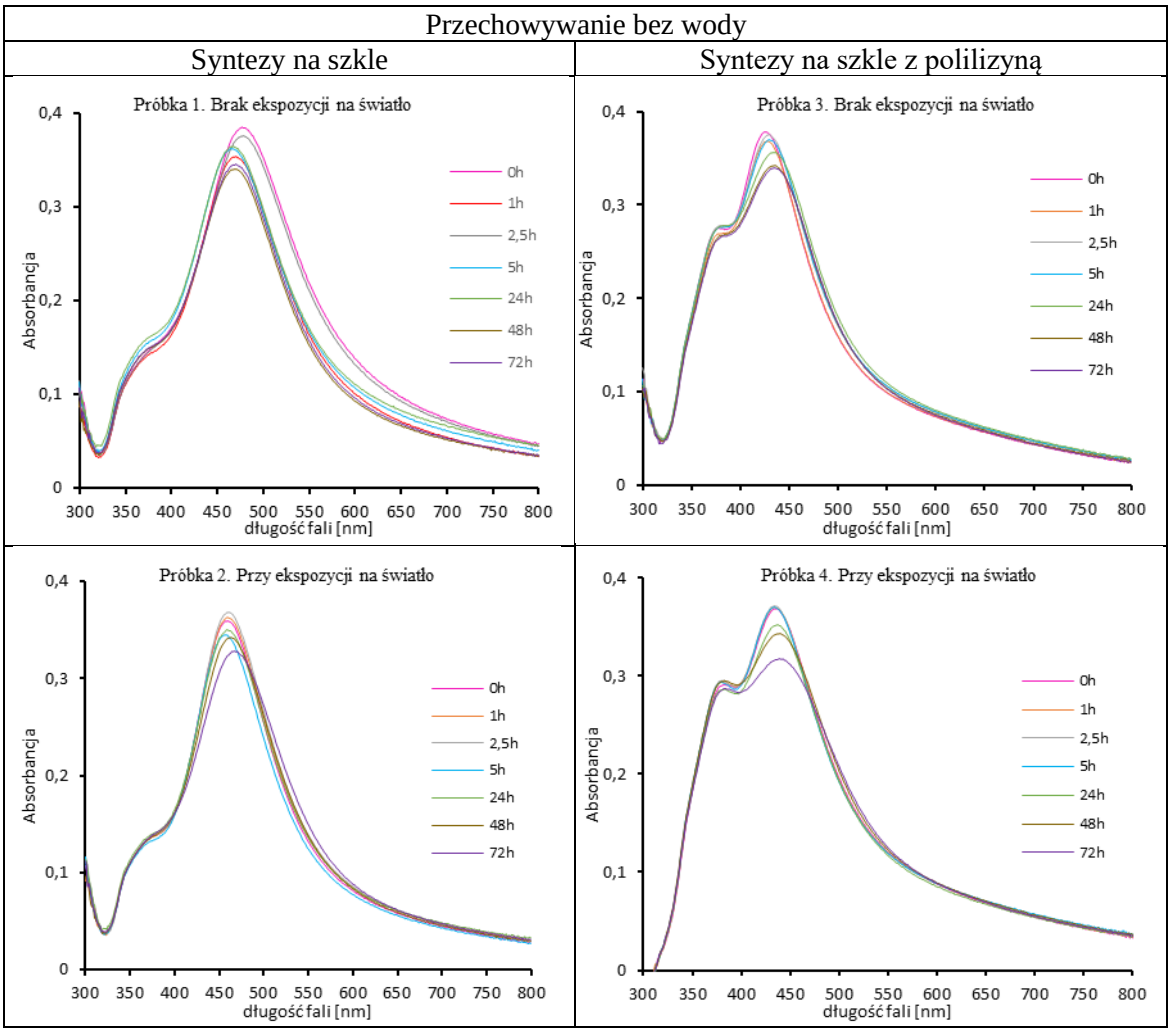


Tabela 3. Widma absorpcji szkiełek z nanocząstkami srebra przechowywanych bez wody. Opracowanie własne.

Wszystkie płytki po syntezie były mokre. Pokrycie szkła polilizyną zawierającą dodatni ładunek na bocznych łańcuchach aminokwasów powoduje, że warstwa ta jest polarna i ma charakter hydrofilowy. Z tego powodu będzie lepiej utrzymywać wodę. Fakt ten wpłynie szybkość oddawania przez polilizynę wody, a w konsekwencji zmianę obserwowanego współczynnika załamania światła.

Dla szkiełek przechowywanych w wodzie (Tabela 4) nie jest obserwowany trend spadku intensywności absorbancji, a wręcz nieznaczny wzrost rejestrowanego sygnału. Nie widać również zmian w czasie, a raczej pewien rozrzut wyników, co może być związane z każdorazowym wyciąganiem i suszeniem próbki przed pomiarem.

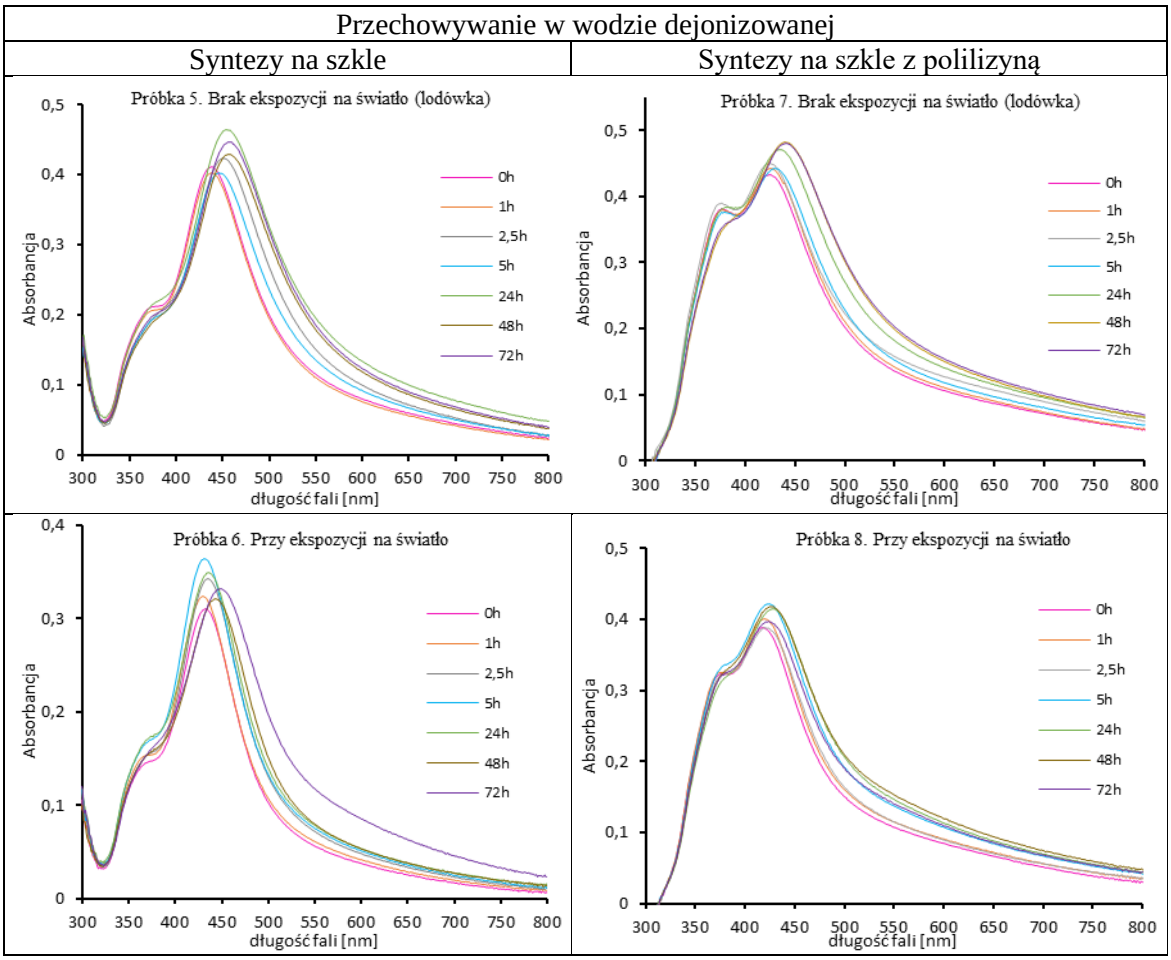


Tabela 4. Widma absorpcji szkiełek z nanocząstkami srebra przechowywanych w wodzie dejonizowanej. Opracowanie własne.

Mimo stosowanych podobnych czasów suszenia próbek (ok. 10 minut w warunkach temperatury pokojowej), ocena wyschnięcia szkiełka i gotowości do badań spektroskopowych, odbywała się makroskopowo (ocena braku kropel wody na powierzchni szkiełek). Jak pokazano na Rysunku 34, warstwa nanosrebra nie jest jednorodna i małe przesunięcie lub zmiana kąta obserwacji może powodować detekcję z innego miejsca na płytce, w konsekwencji rejestrację widma o zmodyfikowanym kształcie.



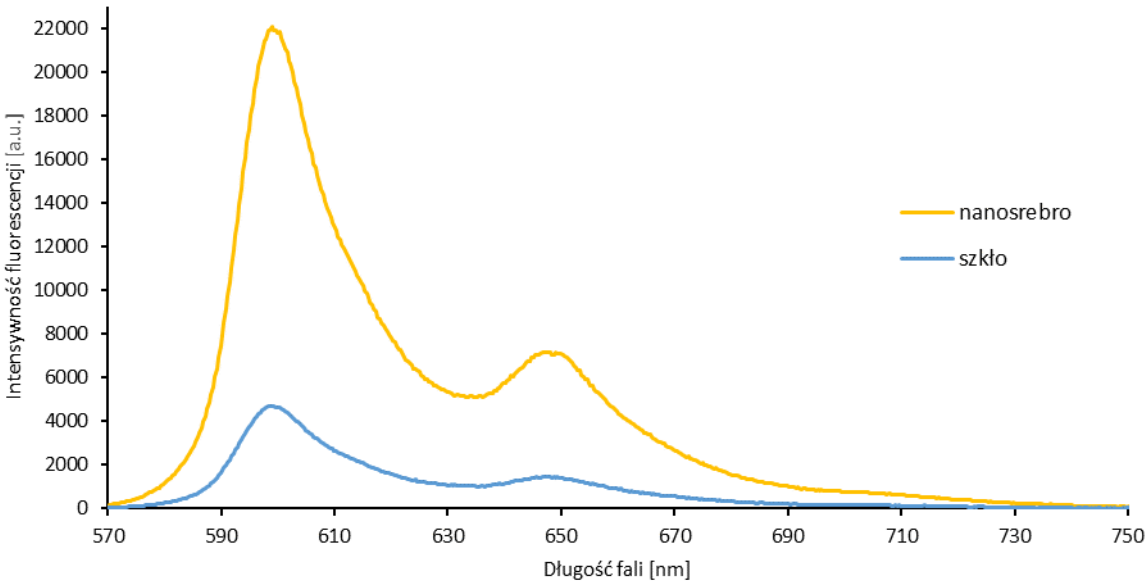
Rysunek 34. Szkiełko nakrywkowe po syntezie nanocząstek srebra. Opracowanie własne

Wyniki doświadczeń pozwalają na stwierdzenie, że krótkoczasowe przechowywanie szkiełek i wyjmowanie ich z wody w celu przygotowania biosensora, nie wpływają na zmianę stabilności nanocząstek. Ponadto w pracy Szczepańska i in. (2020) zbadano wpływ długoczasowego przechowywania kosmetyków z nanocząstkami srebra i nie stwierdzono znaczących różnic w kształcie i intensywności widm absorpcji po 6 tygodniach od syntezy.

4.1.2. Badania właściwości nanowarstwy srebra na powierzchni szkła

Jak podkreślano we wstępie, obecność fluoroforów w bliskiej odległości od nanocząstek metali szlachetnych, powoduje nie tylko wzmocnienie intensywności fluorescencji, ale wpływa również na poprawę ich fotostabilności, poprzez krótsze czasy życia w stanie wzbudzonym. Zbadano, czy takie właściwości można przypisać warstwie nanosrebra otrzymanej w badaniach, na której powierzchni umieszczono fluorofor – hiperycynę. Uzasadnieniem wyboru tego związku jest fakt, że absorbuje i emituje światło w zakresie widzialnym, podobnym jak wyznakowane przeciwciała w opracowanym teście. Dodatkowo związek ten ulega silnej fotodegradacji pod wpływem światła, w tym zarówno fotowybielaniu, jak i reakcjom fotochemicznym. Z tego powodu wykorzystano hiperycynę do badań, mających na celu sprawdzenia, czy warstwa nanosrebra ochroni fluorofory związane z białkami przed fotochemiczną degradacją, wynikającą z ekspozycji na światło w trakcie wykonywania testu.

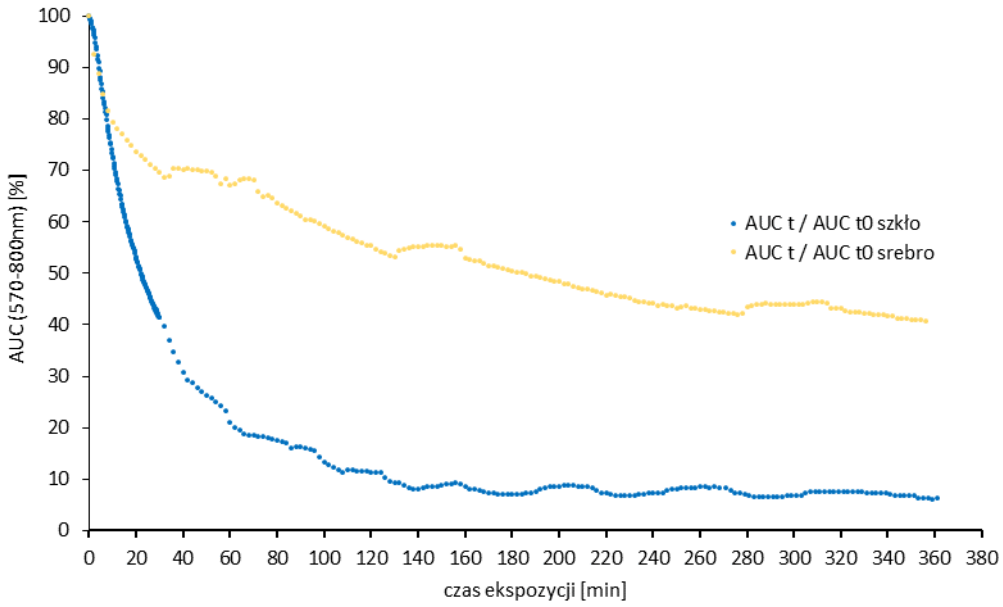
Wynik badań wskazują, że wzmocnienie emisji fluorescencji hiperycyny na warstwie nanosrebra dla długości fali 600 nm wyniosło 4,7 (Wykres 1), a z obliczeń pola pod krzywą AUC (570 - 750 nm) - 4,8 w stosunku do sygnału na samym szkle. Poziom wzmocnienia sygnału zależy nie tylko od warstwy nanocząstek metalu, ale również od samego fluoroforu. Jak wykazano w badaniu Aslan, Gryczyński i in. (2005) poziom wzmocnienia fluorescencji dla różnych znaczników, związanych z różnymi obiektami, na powierzchni nanocząstek srebrna może wahać się od kilku do kilkudziesięciu razy w stosunku do sygnału na samym szkle.



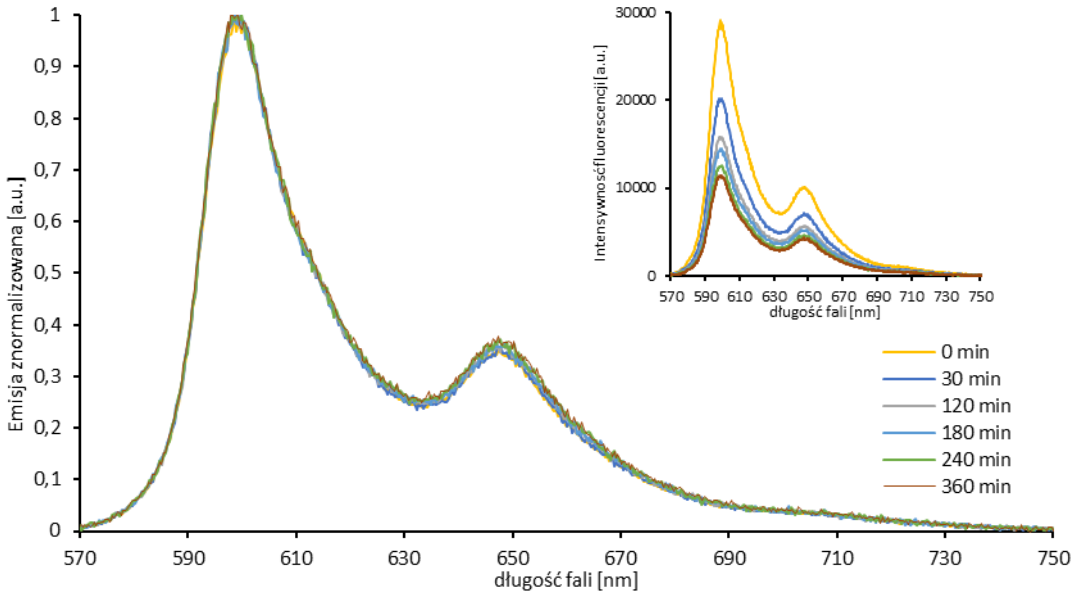
Wykres 1. Wzmocnienie emisji fluorescencji hiperycyny na powierzchni nanocząstek srebra. Opracowanie własne.

Badania w pracy wykazały, że obecność nanocząstek srebra wpływa na stabilność emisji fluoroforu (Wykres 2). Na wykresie przedstawiono wyniki obliczonych pól pod krzywą emisji fluorescencji dla próbki na srebrze i szkle, przedstawionych jako stosunek pola powierzchni pod krzywą w czasie naświetlania t (AUC t) do pola w chwili początkowej t_0 (AUC t_0) w ujęciu procentowym. W przypadku naświetlania hiperycyny na samym szkle początkowa wartość natężenia fluorescencji zmniejszyła się o 90% w ciągu pierwszych dwóch godzin trwania ekspozycji. Dla tego samego fluoroforu na warstwie nanosrebra i po tym samym czasie oświetlania laserem spadek intensywności wyniósł tylko 45%, a po 6 godzinach 60% wartości początkowej. Znacząca różnica w wartości i dynamice spadku intensywności pomiędzy ekspozycją na szkle i warstwie nanosrebra potwierdza lepszą stabilność tego związku na srebrze.

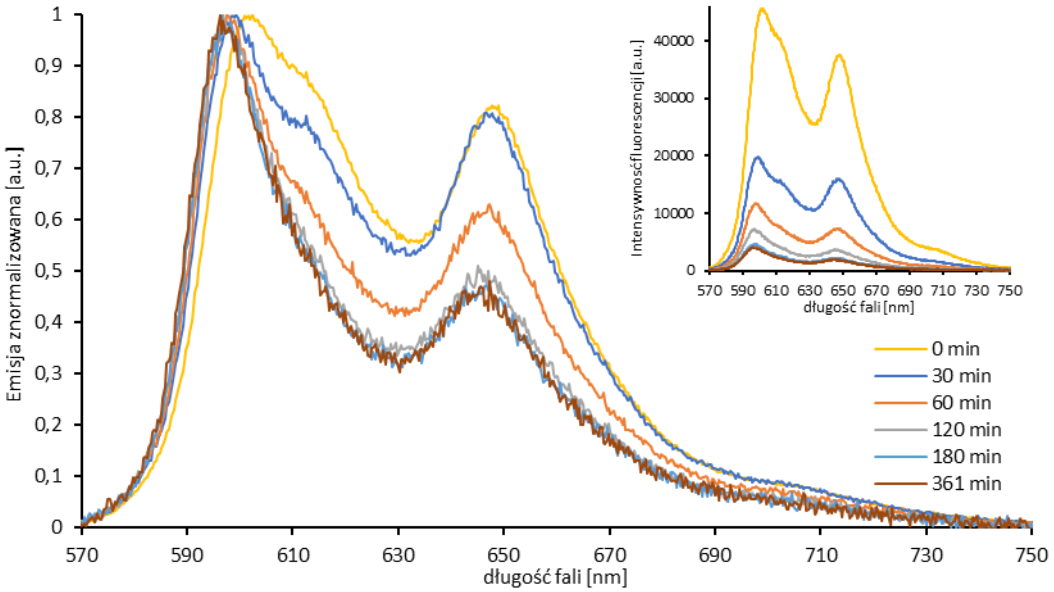
Jak pokazano na Wykresie 3, nie są obserwowane zmiany kształtu, położenia i stosunku pasm 600/650 nm dla hiperycyny na warstwie srebra, a jedynie spadek sygnału spowodowany efektem fotowybielania fluoroforu.



Wykres 2. Zmiana intensywność fluorescencji hiperycyny w czasie na szkle i warstwie nanocząstek srebra w funkcji pola pod krzywą (570-800 nm). Opracowanie własne.



Wykres 3. Znormalizowany sygnał fluorescencji hiperycyny na srebrze w różnym czasie ekspozycji. W prawym górnym rogu widma nieznormalizowane. Opracowanie własne.



Wykres 4. Znormalizowany sygnał fluorescencji hiperycyny na szkle w różnym czasie ekspozycji. W prawym górnym rogu widma nieznormalizowane. Opracowanie własne.

W przypadku naświetlania hiperycyny na samym szkle (Wykres 4) można zaobserwować dodatkowe efekty fotoreakcji, wynikające z dużych zmian relacji między pasmami 600/650 nm i przesunięcia widma. Po długotrwałej ekspozycji na światło hiperycyny na szkle stosunek znormalizowanej intensywności fluorescencji dla długości fali 600 nm (1 pik) do intensywności dla długości fali 650 nm (2 pik) F1/F2, prawie się podwoił (Tabela 5).

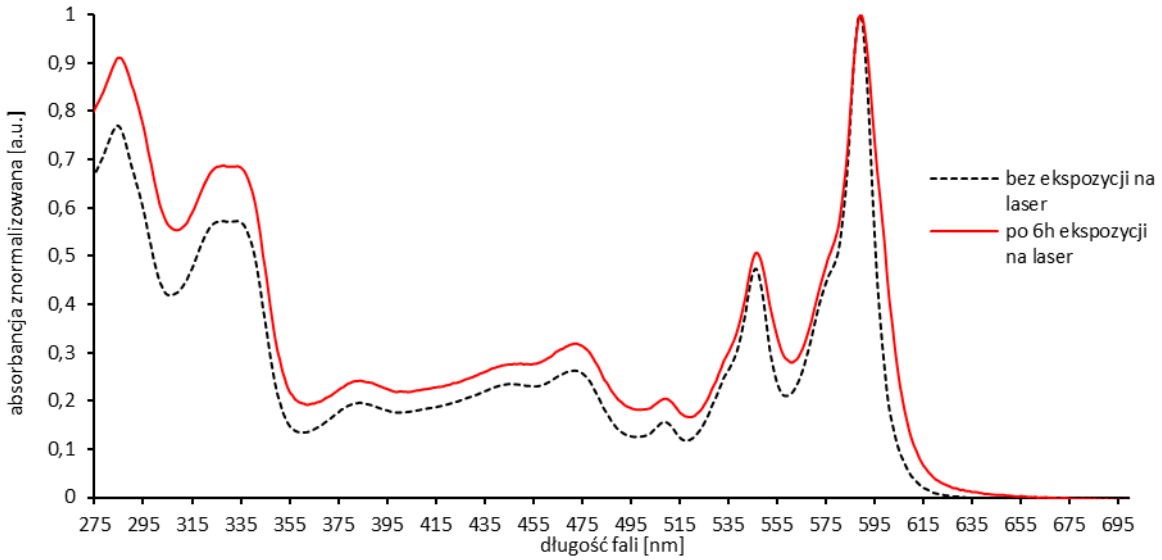
czas ekspozycji [min]			**0**	**30**	**60**	**120**	**180**	**361**
szkło	1 pik	obserwacja [nm]	602,3	599,3	597,6	596,9	596,6	596,3
		F1 Emisja znormalizowana [a.u.]	1	1	1	1	1	1
	2 pik	obserwacja [nm]	649,0	646,4	647,4	645,1	646,4	647,4
		F2 Emisja znormalizowana [a.u.]	0,82	0,81	0,63	0,51	0,47	0,48
	F1/F2		***1,22***	***1,24***	***1,59***	***1,96***	***2,12***	***2,08***
srebro	1 pik	obserwacja [nm]	598,6	598,3	598,6	598,3	598,6	598,9
		F1 Emisja znormalizowana [a.u.]	1	1	1	1	1	1
	2 pik	obserwacja [nm]	647,4	647,4	647,0	648,3	648,7	647,4
		F2 Emisja znormalizowana [a.u.]	0,35	0,36	0,36	0,36	0,36	0,38
	F1/F2		***2,86***	***2,79***	***2,76***	***2,76***	***2,76***	***2,64***

Tabela 5. Zmiana w zależności między położeniem znormalizowanych widm a intensywnością fluorescencji dla długości fali charakterystycznych dla hiperycyny 600 i 650 nm po ekspozycji na światło na szkle i warstwie nanosrebra. Opracowanie własne.

Zaobserwowano również przesunięcie widm w kierunku krótszych długości fal do 6 nm. Opisane powyżej efekty fotoreakcji nie były widoczne w przypadku hiperycyny na warstwie nanosrebra. Stosunek pasma 600/650 nm pozostał stały podczas

naświetlania, a maksima intensywności fluorescencji zostały zarejestrowane dla tych samych długości fal.

Efekt ten jest również widoczny w widmie absorpcji (Wykres 5), ponieważ zmianom ulegały stosunki poszczególnych pasm absorpcji przed i po ekspozycji na światło. Jak wynika z doświadczeń obecność nanocząstek srebra w pobliżu fluoroforu, wpływa na poprawę fotostabilności, a w przypadku hiperycyny, eliminuje również fotoreakcje, które zachodzą w stanie wzbudzonym.



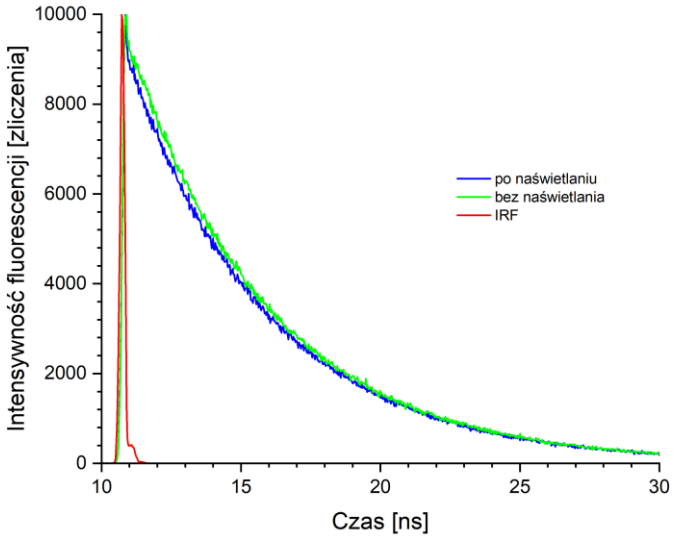
Wykres 5. Znormalizowane widmo absorpcji hiperycyny przed i po ekspozycji na szkle. Opracowanie własne.

Ponadto z obliczonych czasów życia hiperycyny przed o po ekspozycji na światło lasera (Tabela 6), wynika wyraźna zmiana dla głównego składnika - τ_1. Zarówno dla obserwacji 600, jak i 650 nm czasy życia składnika długożyciowego, przed ekspozycją były, w granicach błędu, takie same, by po naświetleniu skrócić się o 100 ps., z niewielką zmianą udziału procentowego tych składników (A_1). Fakt ten potwierdza występowanie fotoreakcji hiperycyny po długotrwałym naświetlaniu.

Hiperycyna	**Obserwacja [nm]**	**τ_1 [ns]**	**A_1 [%]**	**τ_2 [ns]**	**A_2 [%]**	**$\tau_{śr}$[ns]**	**χ^2**
Przed ekspozycją	600	5.153±0.018	81.91	2.576±0.107	18.09	4.687	1.027
Po 6 h ekspozycji		5.058±0.017	87.73	2.702±0.159	12.27	4.769	1.009
Przed ekspozycją	650	5.162±0.017	91.74	2.925±0.243	8.26	4.978	1.017
Po 6 h ekspozycji		5.070±0.017	93.25	2.970±0.291	6.75	4.929	1.017

Tabela 6. Obliczone czasy życia fluorescencji hiperycyny przed i po 6 h ekspozycji na światło lasera na szkle. τ — czas życia składnika o procentowej zawartości A w całym sygnale, $\tau_{śr}$ – ważony po amplitudzie średni czas życia, χ^2- współczynnik dopasowania. Opracowanie własne.

Przedstawione na Wykresie 6 zaniki czasów życia fluorescencji w skali liniowej, pokazują różnicę między widmami dla hiperycyny naświetlanej i nienaświetlanej bez warstwy nanosrebra. Zarejestrowane zmiany kształtu zaników po długotrwałym wzbudzaniu, sugerują, że doszło do jakiś zmian badanego związku w stanie wzbudzonym.



Wykres 6. Zaniki czasów życia fluorescencji hiperycyny naświetlanej laserem przez 6 godzin i nienaświetlanej. Opracowanie własne.

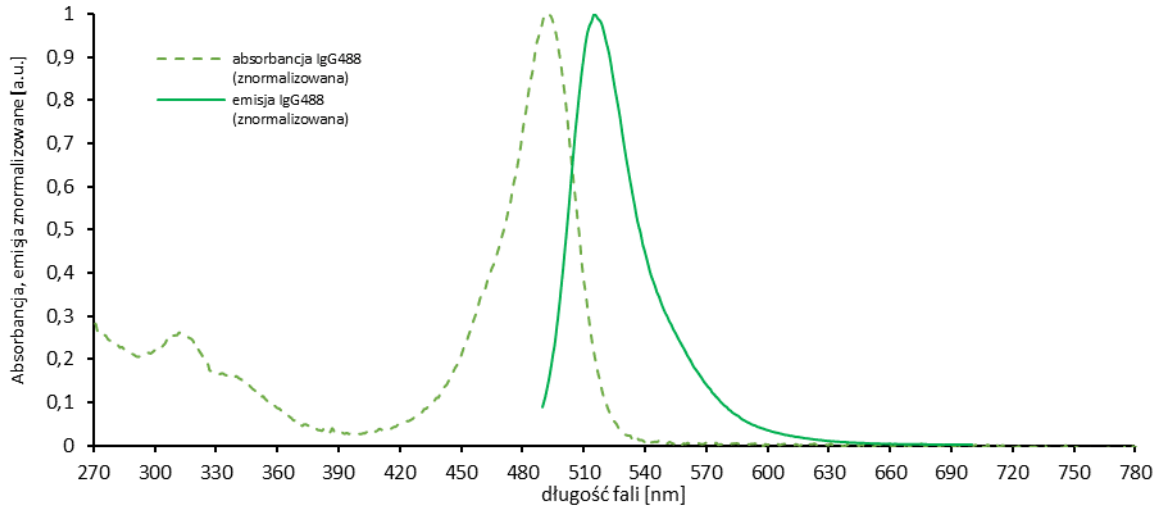
Wyniki badań pozwalają na stwierdzenie, że wykorzystywana do badań nanowarstwa srebra powoduje zwiększenie intensywności fluorescencji i fotostabilności fluoroforu na jej powierzchni. Dodatkowo badania wykazały, że na warstwie nanosrebra obserwuje się jedynie efekt fotowybielania, który jest znacznie mniejszy niż dla warstwy samego szkła. Natomiast dla badanego fluoroforu (hiperycyny), eksponowanej światłem laserowym na powierzchni szkła, oprócz efektu fotowybielania, obserwuje się procesy fotoreakcji, co potwierdzają zmiany w widmach absorpcji, emisji fluorescencji, oraz czasach życia, które sugerują skomplikowane procesy w stanie wzbudzonym, prowadzące do fotodegradacji.

Przedstawione wyniki pozwalają na stwierdzenie, że uzyskana w wyniku syntezy nanowarstwa srebra jest skuteczną matrycą do detekcji w zjawisku wzmocnionej fluorescencji na powierzchni metalu i spełnia założenia projektowanego testu.

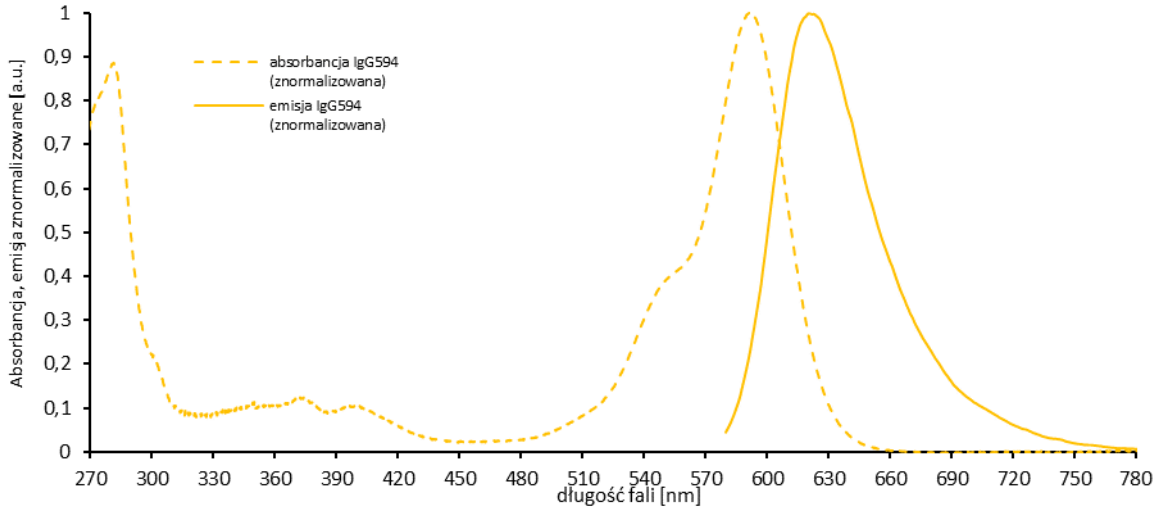
4.2. Określenie właściwości fizykochemicznych znaczników fluorescencyjnych związanych z badanymi białkami

4.2.1. Charakterystyka spektroskopowa badanych fluoroforów po związaniu z przeciwciałami

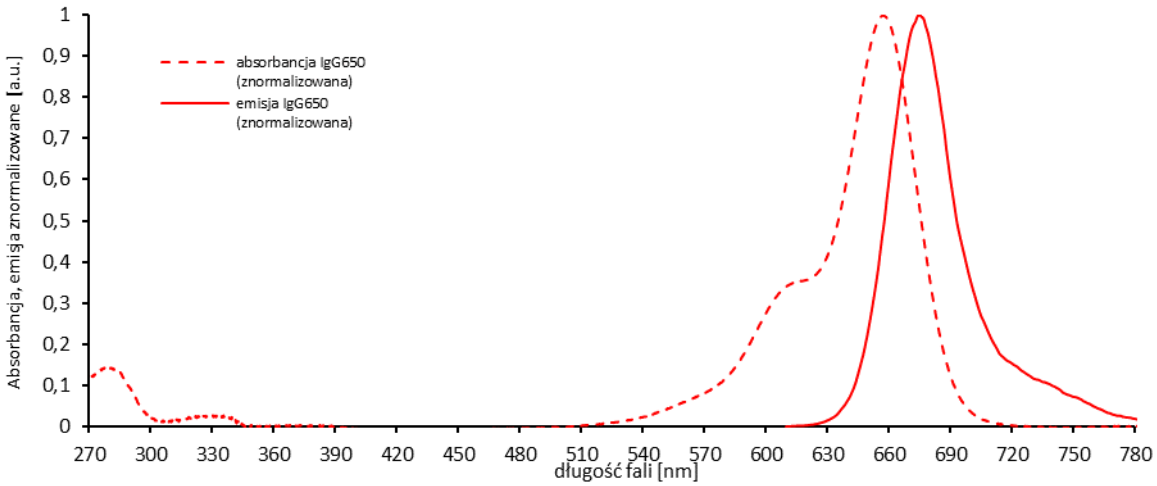
Zmierzone charakterystyki spektralne, trzech badanych fluoroforów związanych z przeciwciałami przedstawiono na Wykresach 7, 8 i 9. Porównując widma absorpcji i emisji dla wyznakowanych białek, z widmami zmierzonymi dla samych znaczników w buforze, można zauważyć różnice w położeniu widm między związaną i wolną postacią fluoroforów (Wykres. 10). Rejestrowane jest przesunięcie długofalowe widma emisji względem widm niezwiązanych form znaczników o około 4 - 5 nm, dla związanego z przeciwciałami fluoroforu DyLight 594 oraz DyLight 650. W przypadku DyLight 488 przesunięcie jest mniejsze ok. 2 nm, ale występuje w kierunku krótkofalowym. Położenie maksimum absorbancji jest podobne dla formy związanej i wolnej fluoroforu DyLight 488 i DyLight 594. Natomiast dla związanego z białkiem DyLight 650, zarejestrowano, przesuniecie widma absorpcji w kierunku długofalowym o ok. 3 nm, podobne jak dla emisji fluorescencji tego znacznika. To może sugerować, że fluorofory nie są obojętne na otoczenie i zmieniają się ich właściwości spektroskopowe po związaniu z przeciwciałem. Podobne przesunięcia widm fluoroforu DyLight 594 zaobserwowano w pracy Sarkar i in. (2010), jednak autorzy nie podjęli dyskusji w tym temacie. W celu weryfikacji uzyskanych wyników zdecydowano o wykonaniu pomiarów czasów życia fluorescencji dla fluoroforów DyLight 488 i DyLight 594. Krzywe zaniku fluorescencji dla fluoroforów związanych i niezwiązanych z białkami, przedstawiono na Rysunkach 35 i 36, natomiast w Tabeli 7 zestawiono obliczone czasy życia fluorescencji.



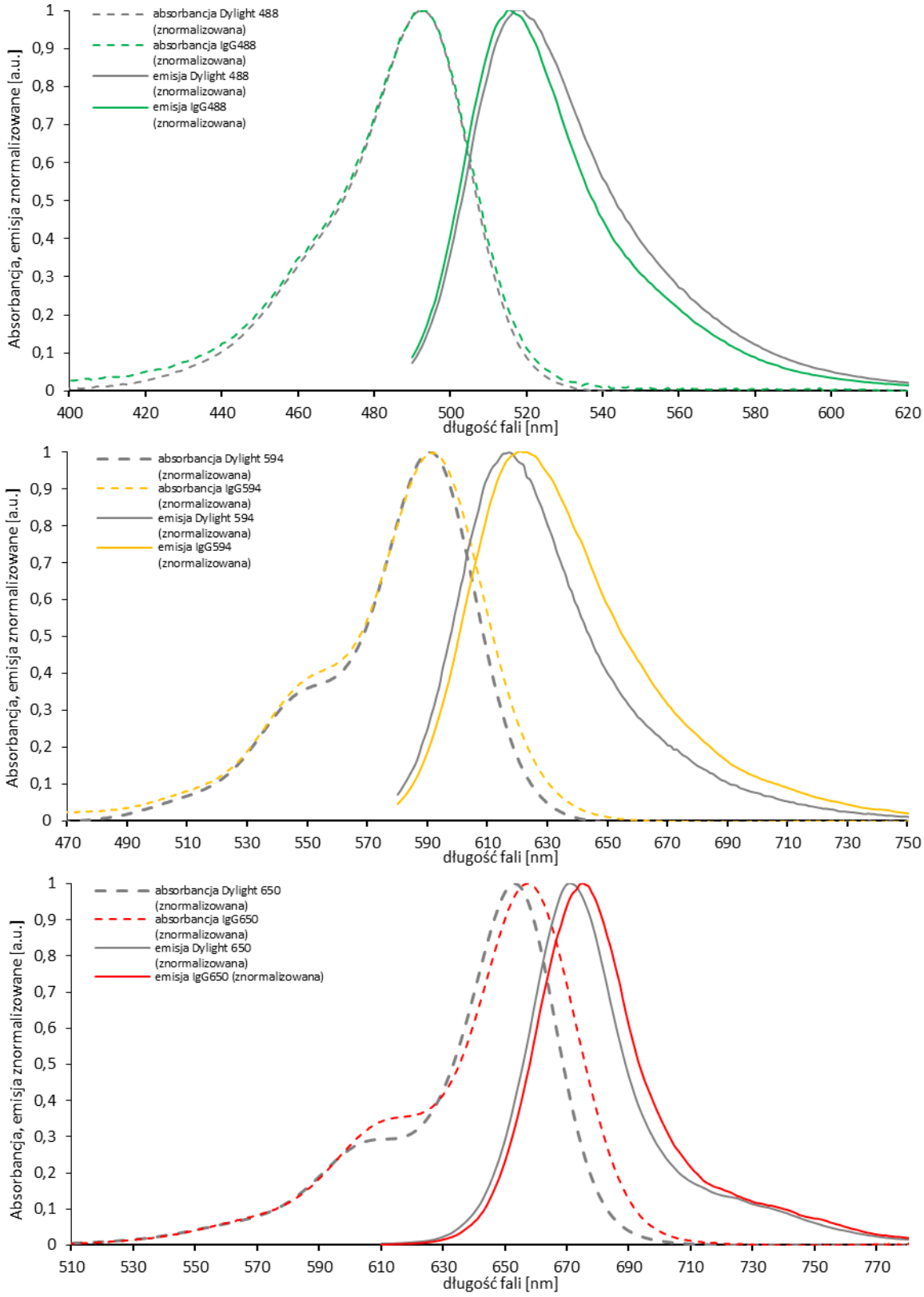
Wykres 7. Znormalizowane widma absorpcji i emisji fluorescencji dla fluoroforu DyLight 488 związanego z przeciwciałami HNP1-3, mAb D21 (oznaczenie IgG488). Opracowanie własne.



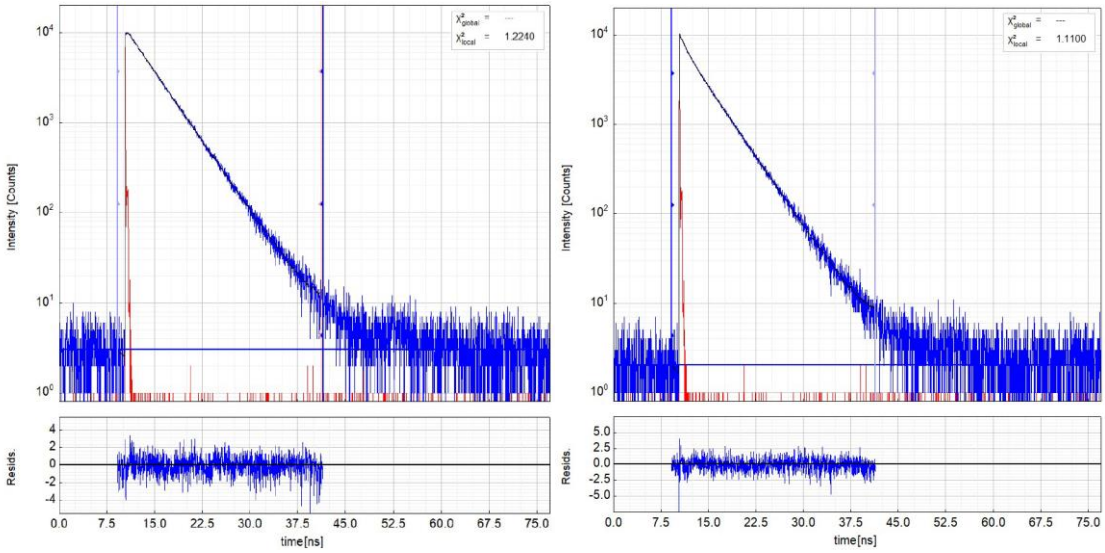
Wykres 8. Znormalizowane widma absorpcji i emisji fluorescencji dla fluoroforu DyLight 594 związanego z przeciwciałami HNP1-3, mAb D21 (oznaczenie IgG594). Opracowanie własne.



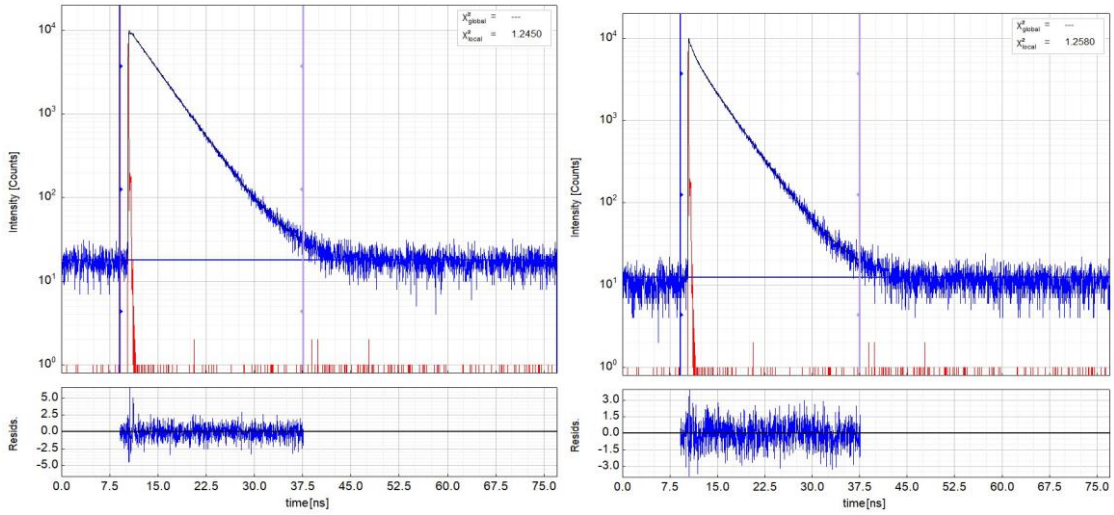
Wykres 9. Znormalizowane widma absorpcji i emisji fluorescencji dla fluoroforu DyLight 650 związanego z przeciwciałami HNP1-3, mAb D21 (oznaczenie IgG650). Opracowanie własne.



Wykres 10. Porównanie znormalizowanych widm absorpcji i emisji fluorescencji dla fluoroforów Dylight 488, 594 oraz 650 związanych z przeciwciałami (ozn. IgG488, 594, 650) oraz samych znaczników w buforze fosforanowym (ozn. Dylight 488, 594, 650). Opracowanie własne.



Rysunek 35. Krzywe zaniku fluorescencji dla fluoroforu DyLight 488 niezwiązanego (po lewej) i związanego z przeciwciałami (z prawej). Dane z programu EasyTau (PicoQuant). Opracowanie własne.



Rysunek 36. Krzywe zaniku fluorescencji dla fluoroforu DyLight 594 niezwiązanego (po lewej) i związanego z przeciwciałami (z prawej). Dane z programu EasyTau (PicoQuant). Opracowanie własne.

fluorofor	**τ_1 [ns]**	**A_1 [%]**	**τ_2 [ns]**	**A_2 [%]**	**τ_3 [ns]**	**A_3 [%]**	**$\tau_{śr}$[ns]**
DyLight 488	4,213 ±0.005	100	-	-	-	-	4,213±0.005
DyLight 488 z przeciwciałem	0,078±0.065	25±11	4,166±0.019	56,9±9.1	1,01±0.16	18,8±2.7	3,905±0.011
DyLight 594	4,036±0.007	100	-	-	-	-	4,036±0.007
DyLight 594 z przeciwciałem	0,184 ±0.077	24.8 ± 2.3	1,15±0.15	24±1.1	4,043±0.036	51.4 ±2.3	3,638±0.012

Tabela 7. Obliczone czasy życia fluorescencji DyLight 488 i 594 w formie związanej i niezwiązanej z przeciwciałem. τ — czas życia składnika o procentowej zawartości A w całym sygnale, $\tau_{śr}$ – ważony po amplitudzie średni czas życia. Opracowanie własne.

Jak wynika z Tabeli 7 duża grupa fluoroforów (ponad 50%), związanych z przeciwciałem, wykazuje taką samą emisję jak niezwiązany z białkiem fluorofor, ponieważ nie zmieniają się czasy życia. Pozostała populacja fluoroforów jest obsadzona na tyle blisko siebie, że w różnym stopniu dochodzi do transferu energii pomiędzy nimi, co powoduje skrócenie czasu życia transferującego znacznika. W związku z tym średnie czasy życia dla fluoroforów po związaniu z przeciwciałami skróciły się o 7% dla DyLight 488 i 10% dla i DyLight 594.

Na podstawie zmierzonych widm absorpcji i emisji obliczono molowe stężenia białek, stopień wyznakowania, wydajności kwantowe fluoroforów związanych z przeciwciałami, oraz dla badanych par donor-akceptor, również całki nakładania i wartości krytycznej odległości Förstera. Wyniki zestawiono w Tabeli 8. Na Wykresie 11 i 12 przedstawiono pasma emisji donora oraz absorpcji i emisji akceptora z zaznaczoną całką nakładania J, dla badanych fluoroforów w stanie związanym z przeciwciałami po procesie znakowania.

	IgG488	IgG594	IgG650
stężenie białka S [M]	$9{,}31 \times 10^{-7}$	$2{,}99 \times 10^{-6}$	$1{,}2 \times 10^{-6}$
N [ilość fluoroforu na mol białka]	32,4	8,4	8
Wydajność kwantowa QY	0,54 [a]	0,41 [b]	0,48 [d]
	Dylight 488	Dylight 594	Dylight 650
Wydajność kwantowa QY fluoroforu w formie niezwiązanej z przeciwciałem	0,9 [a]	0,83 [c]	0,48 [d]
	IgG488 - IgG594	IgG594 – IgG650	
Krytyczna odległość Förstera R_0 [Å]	50,4	72,8	
Całka nakładania J [cm^3/M]	$1{,}64 \times 10^{-13}$	$1{,}96 \times 10^{-12}$	

Oznaczenia:
IgG488, 594, 650 oznacza formę związaną fluoroforu Dylight z przeciwciałami
IgG488-IgG594, IgG594-IgG650 – pary donor-akceptor
a - wyznaczone w stosunku do QY wzorca, fluoresceiny w etanolu (0,79)
b - wyznaczone w stosunku do QY wzorca, niezwiązanej formy samego Dylight 594 (0,83)
c- wartość literaturowa (Sarkar i in., 2010)
d- wyznaczone w stosunku do QY wzorca, Nile blue w metanolu (0,26)

Tabela 8. Parametry chrakteryzujące wyznakowane przeciwciała wykorzystywane do badań. Opracowanie własne.

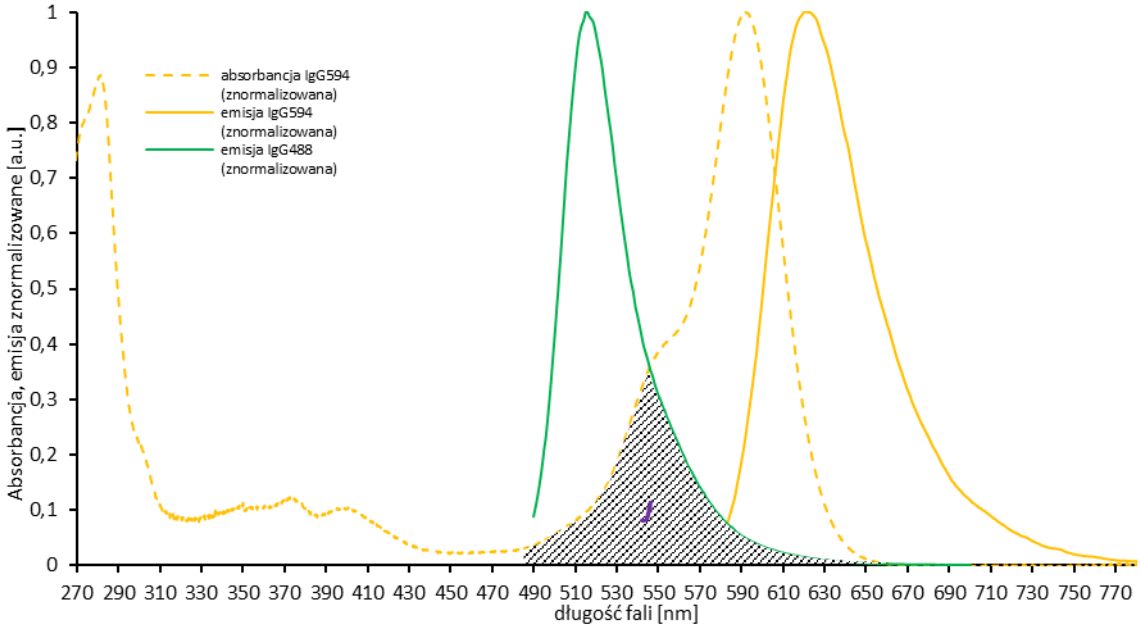
Jak wynika z danych w Tabeli 8, dla fluoroforu Dylight 594 nastąpił spadek wydajności kwantowej po związaniu z przeciwciałem do wartości 0,41. Taki sam efekt zauważono w badaniu (Sarkar i in., 2010), gdzie wykazano, że wartość wydajności kwantowej po związaniu z przeciwciałem zmniejszyła się z 0,83 do 0,64. Obserwowana różnica w spadku wydajności kwantowej między badaniami, może wynikać z faktu

wykorzystania do znakowania innych przeciwciał, mogących różnić się sekwencją lub ilością grup aminowych. Ponadto nie można wykluczyć różnic w stopniu wyznakowania białek między publikacją, a bieżącymi badaniami. Ocena tego jest jednak niemożliwa, ponieważ autorzy nie podali wartości stopnia wyznakowania. Zmniejszenie wydajności kwantowej fluoroforu po związaniu na przeciwciałach najprawdopodobniej wynika z obecności homotransferu energii, między tymi samymi typami molekuł, z uwagi na obecność kilku cząsteczek znacznika na jednym przeciwciele, czego we wnioskach autorzy publikacji nie wykluczyli. Jednocześnie obserwowane w badaniach skrócenie czasów życia fluorescencji, w połączeniu ze spadkiem wydajności kwantowej, wydaje się potwierdzać zajścia homotransferu.

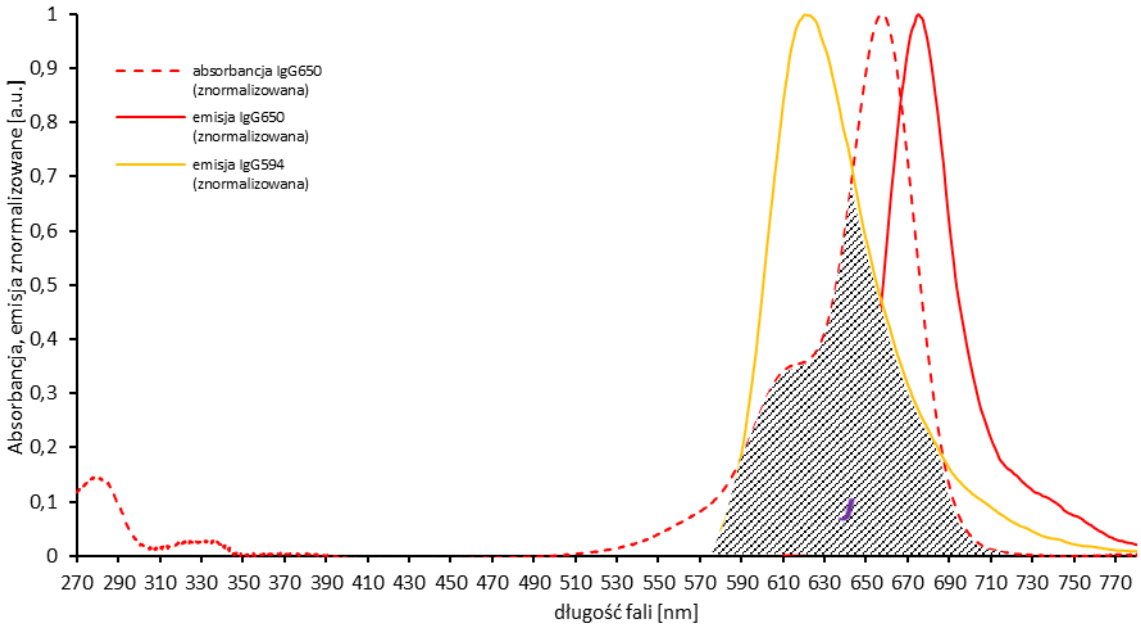
W publikacji Sarkar i in. (2010) wyznaczano również odległość R_0 dla pary donor – akceptor: IgG594 - IgG647 z wykorzystaniem znaczników Dylight, równą 75 Å. Jest to podobna wartość do uzyskanego w badaniach dystansu 72,8 Å dla pary IgG594 - IgG650. W innej publikacji Solarczyk i in., (2016), oceniającej możliwość wykorzystania fluoroforów Dylight do detekcji opartej na zjawisku FRET wskazano, że średnie stopnie wyznakowania dla znacznika DyLight 594 wynoszą od 5,2 do 6,4, natomiast dla DyLight 649 - 5,5. Jak podkreślono w badaniu uzyskanie wyższych stopni wyznakowania oraz lepsze dopasowanie pary donor – akceptor, poprzez wyższe wartości R_0, w górnym zakresie określanym dla FRET między 10-100 Å (1-10 nm), korzystnie wpływają na występowanie bezpromienistego transferu energii. Według autorów jedną korzystniejszych konfiguracji do FRET jest wybór pary DyLight 594 (donor) - DyLight 649 (akceptor). Dla tego zjawiska, szczególnie korzystna jest sytuacja, w której w wyniku znakowania uzyskuje się nadmiar obsadzenia akceptora, ponieważ rośnie prawdopodobieństwo znalezienia akceptora, który ustawi się odpowiednio do donora, co wpłynie na poprawę transferu energii. Uzyskane w badaniach wartość R_0 dla pary IgG488 - IgG594, oraz IgG594 - IgG650 wynosiły odpowiednio 50,4 i 72,8 Å. Z uwagi na małe wielkości wychwytywanych alfa-defensyn (ok. 3,5 kDa) i duże, w stosunku do nich przeciwciała, z którymi związane są fluorofory, uzyskane odległości krytyczne powinny korzystanie wpływać na transfer energii.

Zaobserwowane w analizie spektralnej i uwzględnione w obliczeniach wszystkie zmienne, takie jak przesunięcia widm, czy fakt obniżenia wydajności kwantowej po znakowaniu, pozwalają na stwierdzenie, że w celu obliczania parametrów transferu

energii, należy stosować charakterystyki widmowe wyznakowanych obiektów biologicznych, a nie samych, niezwiązanych fluoroforów.



Wykres 11. Znormalizowane widmo emisji fluorescencji dla DyLight 488 oraz widma absorpcji i emisji fluorescencji dla DyLight 594 związanych z przeciwciałami. Oznaczony obszar prawdopodobnego transferu energii między donorem (IgG488) a akceptorem (IgG594) z zaznaczoną całką nakładania J.

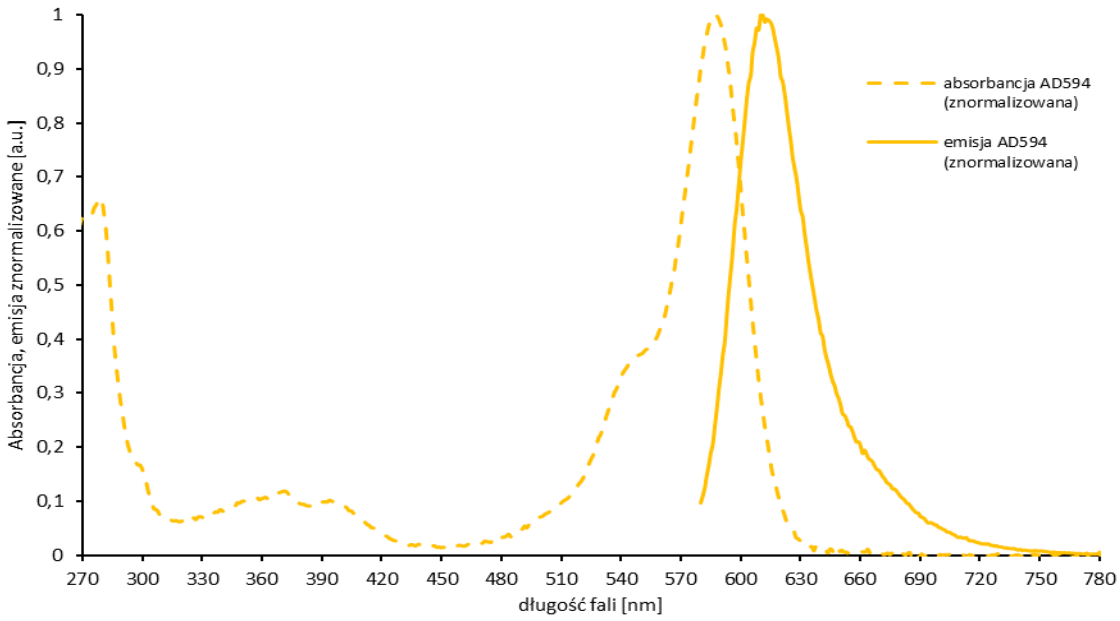


Wykres 12. Znormalizowane widmo emisji fluorescencji dla DyLight 594 oraz widma absorpcji i emisji fluorescencji dla DyLight 650 związanych z przeciwciałami. Oznaczony obszar prawdopodobnego transferu energii między donorem (IgG594) a akceptorem (IgG650) z zaznaczoną całką nakładania J.

4.2.2. Badania wiązań alfa-defensyna - przeciwciało w roztworach

4.2.2.1. Charakterystyka spektralna wyznakowanych alfa-defensyn

Charakterystykę wyznakowanej AD (ozn. AD594) przedstawiono na Wykresie 13. Porównując otrzymane widma ze zmierzonymi wcześniej widmami formy niezwiązanej znacznika Dylight 594 (Wykres. 10), można zauważyć przesunięcie krótkofalowe maksimum emisji fluorescencji wynoszące 6 nm oraz w tym samym kierunku również przesunięcie maksimum absorbancji o 3 nm, w stosunku do widm wolej formy znacznika. Natomiast porównując otrzymane widma wyznakowanych alfa-defensyn, z widmami uzyskanymi po związaniu tego samego fluoroforu z przeciwciałami, przesunięcie emisji wyniosło 10 nm w kierunku krótkofalowym, a absorbancji 3 nm, w tym samym kierunku. Potwierdza to wnioski z badań nad przeciwciałami sugerujące, konieczność stosowania charakterystyk wyznakowanych obiektów biologicznych, w celu obliczania parametrów transferu energii.



Wykres 13. Znormalizowane widma absorpcji i emisji fluorescencji dla DyLight 594 związanego z alfa-defensyną. Opracowanie własne.

W analogiczny sposób jak dla przeciwciał, na podstawie zmierzonych widm absorbancji i emisji, obliczono molowe stężenia AD, stopień wyznakowania, wydajność kwantową znacznika DyLight 594 związanego z AD, oraz całki nakładania i wartości krytycznej odległości Förstera dla badanych par donor-akceptor. Wyniki przedstawiono w Tabeli 10.

	AD594	
stężenie białka S [M]	$1{,}62 \times 10^{-5}$	
N [ilość fluoroforu na mol białka]	4,6	
Wydajność kwantowa QY	0,99 [a]	
	Dylight 594	
Wydajność kwantowa QY fluoroforu w formie niezwiązanej z przeciwciałem	0,83 [b]	
Wielkość / pary donor-akceptor	IgG488 – AD594	AD594 – IgG650
Krytyczna odległość Förstera R_0 [Å]	50,8	83,5
Całka nakładania J [cm^3/M]	$1{,}7 \times 10^{-13}$	$1{,}84 \times 10^{-12}$
Oznaczenia: IgG488 – AD594, AD594 – IgG650 – pary donor-akceptor a - wyznaczone w stosunku do QY wzorca, niezwiązanej formy samego Dylight 594 (0,83) b - wartość literaturowa (Sarkar i in., 2010)		

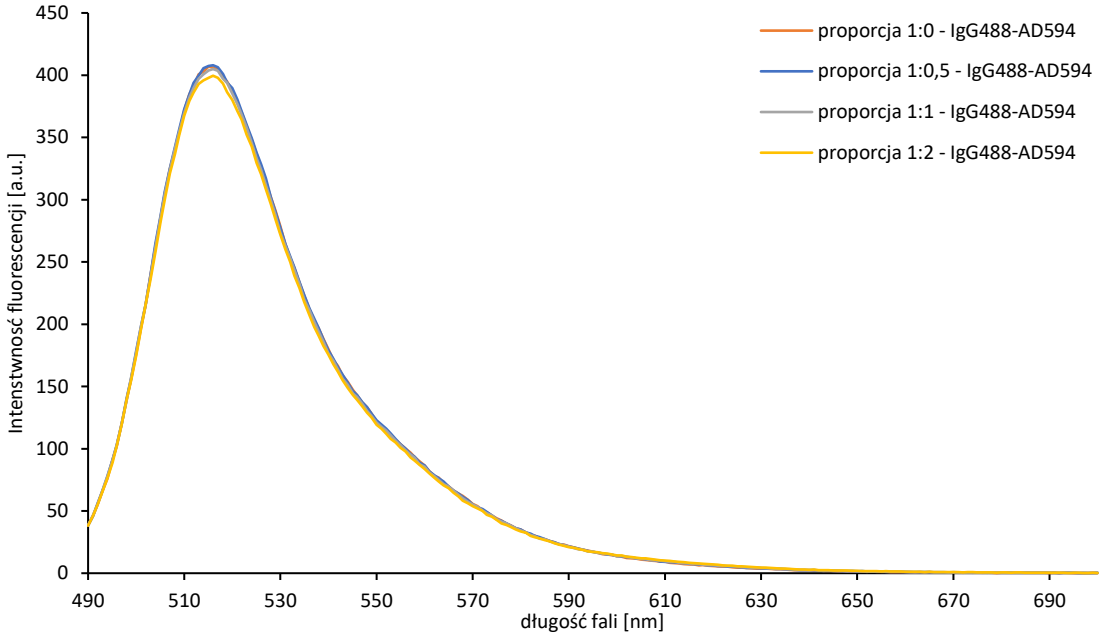
Tabela 9. Wielkości chrakteryzujące wyznakowane alfa-defensyny fluoroforem Dylight 594 (AD594). Opracowanie własne.

Wyniki charakterystyki wyznakowanej AD oraz wielkości opisujące pary donor akceptor z jej wykorzystaniem, użyto w następnym badaniu oddziaływań przeciwciało – alfa-defensyna.

4.2.2.2. Badania odziaływania przeciwciało – alfa-defensyna

Poniżej przedstawiono wyniki badań odziaływania przeciwciało – alfa-defensyna w roztworze, dla dwóch par donor akceptor: IgG488 (donor) - AD594 (akceptor) oraz AD594 (donor) - IgG650 (akceptor), przy określonych proporcjach molowych wyznakowanych przeciwciał i alfa-defensyn, zgodnie z założeniami przyjętymi w metodach badawczych.

Dla pierwszej pary, wyniki pomiarów emisji fluorescencji dla czterech proporcji 1:0; 1:0,5; 1:1; 1:2, w których w kuwecie utrzymywano stałą ilość moli przeciwciała IgG488 (donora) i zmieniano ilość moli wyznakowanej alfa-defensyny AD594 (akceptora), przedstawiono na Wykresie 14.



Wykres 14. Widma emisji fluorescencji dla odziaływania przeciwciało – alfa-defensyna i pary IgG488 – AD594. Opracowanie własne.
Oznaczenia:
- proporcja 1:0 - stała ilość moli IgG488, bez wyznakowanej alfa-defensyny
- proporcja 1:0,5 - stała ilość moli IgG488, AD594 w ilości połowy ilości moli przeciwciała
- proporcja 1:1 - taka sama ilości moli IgG488 i AD594
- proporcja 1:2 - dwukrotnie więcej moli AD594 względem ilości moli IgG488

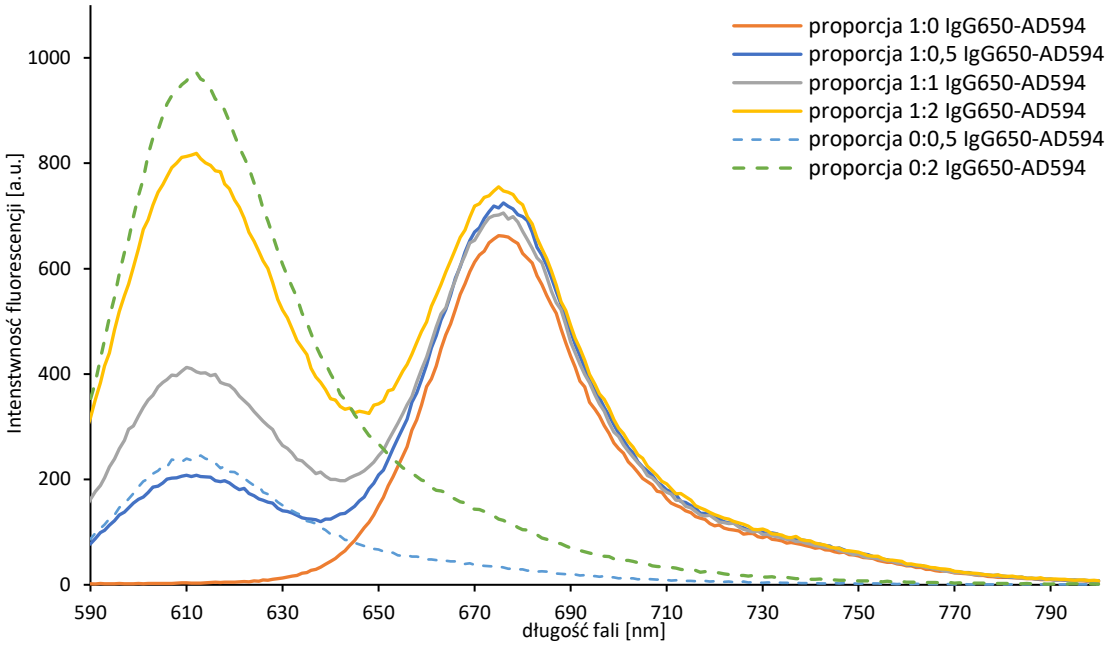
Jak wynika z widm na Wykresie 14, wzbudzenie donora (IgG488) wywołało jego emisję w paśmie charakterystycznym dla fluoroforu Dylight 488, ale nie został zarejestrowany sygnał akceptora (AD594), który był oczekiwany w paśmie w okolicach 610 nm i miałby być efektem transferu energii. Natomiast zauważalne jest wygaszenie pasma emisji charakterystycznego dla Dylight 488, szczególnie gdy w próbce jest najwięcej AD594 (proporcja 1:2). Fakt ten potwierdza występowanie odziaływania, ale jedocześnie wskazuje na mały transfer energii. Jest ono zbyt małe, aby możliwe było wyraźne zarejestrowanie sygnału akceptora i jednocześnie niewystarczające, aby uzyskać pozytywne wyniki detekcji w projektowanym teście.

Analizując wyniki dla pary IgG488- AD594 należy podkreślić, że alfa-defensyna jest bardzo mała w stosunku do przeciwciała. W tej sytuacji, podczas związania się alfa-defensyny z miejscem aktywnym przeciwciała, może dochodzić do stworzenia warunków, w których otoczenie znacznika będzie niekorzystne dla emisji fluorescencji, na skutek występowania różnych oddziaływań znacznika z białkiem. Spowoduje to wygaszenie sygnału fluoroforu i w konsekwencji zarejestrowanie małego transferu. Drugim istotnym elementem jest ustawienie znaczników. Aby wystąpił transfer energii,

muszą odpowiednio ustawić się względem siebie monety przejść (momenty dipolowe), absorpcyjne akceptora i emisyjne donora. Jeżeli białko wymusza określone położenie, które spowoduje, że ustawienia znacznika donora do akceptora będzie niekorzystne, wówczas transfer energii może być utrudniony.

Odnosząc się do wyznaczonej, korzystnej dla transferu energii, wartości odległości krytycznej R_0 dla badanej pary IgG488 - AD594, oraz pary IgG488 - IgG594, wynoszących odpowiednio 50,4 Å i 50,8 Å, należy zwrócić uwagę na wpływ czynnika kątowego κ^2 w definicji R_0 (równanie 14). Jest on zależny od orientacji momentów przejść donora i akceptora, osiągając największą wartość (4) dla równoległego ułożenia momentów dipolowych, a najniższą równą (0), gdy dipole przejść emisyjnych i absorpcyjnych są do siebie prostopadłe. Przyjęto w obliczeniach stałą wartość czynnika kątowego κ^2=0,667, który jest wyznaczony dla standardowego roztworu (ze swobodną rotacją cząsteczek donora i akceptora) i uznawany za dobre uśrednienie w wielu eksperymentach (Szabelski, 2015). Wartość ta jest pewnym przybliżeniem, ponieważ silnie zależy od układu momentów przejść, których fluorofor może mieć więcej niż jeden, w dodatku o różnych ustawieniach. Ponadto znacznik związany z białkiem nie rotuje swobodnie jak w roztworze, co powoduje, że wartość czynnika kątowego dla badanych obiektów będzie inna. Nie ma obecnie metod eksperymentalnych wyznaczania wartości κ^2, a jedynie metody obliczeniowe przedziałów wartości czynnika kątowego, stąd najczęściej stosowane są w obliczeniach przybliżenia. Skutkiem tego może być różnica pomiędzy przewidywanym na podstawie widm obiektów, a wyznaczonym eksperymentalnie transferem energii, co miało miejsce dla pary IgG488 – AD594.

Dla drugiej pary AD594– IgG650, pomiar emisji fluorescencji wykonano dla czterech analogicznych proporcji 1:0; 1:0,5; 1:1; 1:2 utrzymując stałą ilość przeciwciała IgG650 (akceptora) oraz zmienną ilość AD594 (donora). Dodatkowo wykonano pomiar dla dwóch proporcji 0:0,5 oraz 0:2, w których nie było akceptorów (IgG650), natomiast wzbudzany był tylko donor (AD594), w ilości moli równej połowie i dwukrotności ilości moli IgG650, użytej w pozostałych pomiarach.
Nałożone widma emisji fluorescencji z powyższych doświadczeń, przedstawiono na Wykresie 15.



Wykres 15. Widma emisji fluorescencji dla odziaływania przeciwciało – alfa-defensyna i pary – AD594-IgG650. Opracowanie własne.
Oznaczenia:
- proporcja 1:0 - stała ilość moli IgG650, bez wyznakowanej alfa-defensyny,
- proporcja 1:0,5 - stała ilość moli IgG650, AD594w ilości połowy ilości moli przeciwciała,
- proporcja 1:1 - taka sama ilości moli IgG650 i AD594,
- proporcja 1:2 - dwukrotnie więcej moli AD594 względem ilości moli IgG650,
- proporcja 0:0,5 - brak IgG650, AD594 w ilości moli równej połowie liczby moli IgG650, użytej w pozostałych proporcjach,
- proporcja 0:2 - brak IgG650, AD594 w ilości moli równej dwukrotności ilości moli IgG650, użytej w pozostałych proporcjach.

Jak wynika z widm na Wykresie 15 dla drugiej badanej pary donor – akceptor, AD594 – IgG650, obserwowany jest wyraźny transfer energii między fluoroforami. Porównując widmo emisji z proporcji 0:2, z widmem proporcji 1:2, zarejestrowane zostało wygaszenie pasma 610 nm, charakterystycznego dla emisji znacznika AD594 i wzrost emisji w paśmie charakterystycznym dla IgG650 – ok. 680 nm. Analogicznie analizując proporcję 1:0 i 1:1, zauważalny jest wzrost intensywności fluorescencji w paśmie charakterystycznym dla wyznakowanego przeciwciała po związaniu z wyznakowaną alfa-defensyną. Im więcej jest AD594 w próbce, tym wyższy jest sygnał fluorescencji akceptora (IgG650), co świadczy o większej ilości przyłączonego antygenu do przeciwciała, powodując wzrost transferu energii. Mając na uwadze, że wzbudzenie przy 570 nm, ustawione dla pomiarów, powoduje bezpośrednie wzbudzenie i emisję również samego akceptora (IgG650), o czym świadczy sygnał emisji fluorescencji dla proporcji 1:0, to jednak ilość tego przeciwciała w czterech pierwszych

proporcjach (linie ciągłe) jest stała, a sygnał rejestrowany w paśmie ok. 680 nm rośnie wraz ze wzrostem ilości donora w próbce. Świadczy to o rejestrowanym transferze energii w relacji donor-akceptor. Uzasadnieniem tego faktu mogą być również duże wartości całek nakładania i wyższe niż dla pierwszej badanej pary, odległości krytyczne R_0 wynoszące 72,8 Å dla pary przeciwciał (IgG594-IgG650) oraz 83,5 Å dla wyznakowanej pary przeciwciało-antygen (AD594-IgG650), jak pokazano w Tabelach 8 i 9.

4.2.2.3. Badanie dynamiki wiązań przeciwciało – alfa-defensyna

Zbadano dynamikę wiązania wyznakowanych przeciwciał z niewyznakowaną postacią alfa-defensyn w dwóch konfiguracjach: IgG488 (donor) - AD - IgG594 (akceptor) oraz IgG594 (donor) - AD - IgG650 (akceptor) w roztworze.

Wyniki dla pierwszej pary donor-akceptor w układzie IgG488 (donor) - AD - IgG594 (akceptor) przy różnych ilościach moli alfa-defensyny w proporcjach: 1:0,25:1; 1:0,5:1; 1:0,75:1; 1:1:1, w stosunku do równej ilości moli obu wyznakowanych przeciwciał, oraz dodatkowej proporcji 1:1:0, w której użyto takiej samej ilości moli IgG488 i alfa-defensyn, natomiast nie dodano IgG594, przedstawiono zbiorczo w Tabeli 10. Wyniki dla drugiej pary donor – akceptor (IgG594 - AD - IgG650), w tych samych proporcjach AD przedstawiono zbiorczo w Tabeli 11.

Jak wynika z widm emisji, przedstawionych na wykresach w Tabeli 10, pomimo różnych stężeń alfa-defensyny w próbce, nie jest rejestrowany sygnał akceptora (IgG594). Widoczne jest jedynie widmo emisji donora, które nie zmienia się po dodaniu różnych porcji AD, pozostając dodatkowo niezmienne w czasie. Fakt ten potwierdził wyniki przedstawione w poprzednich doświadczeniach z oddziaływań i spowodował, że zrezygnowano z dalszych badań nad parą IgG488-IgG594, pod kątem jej przydatności w projektowanym teście.

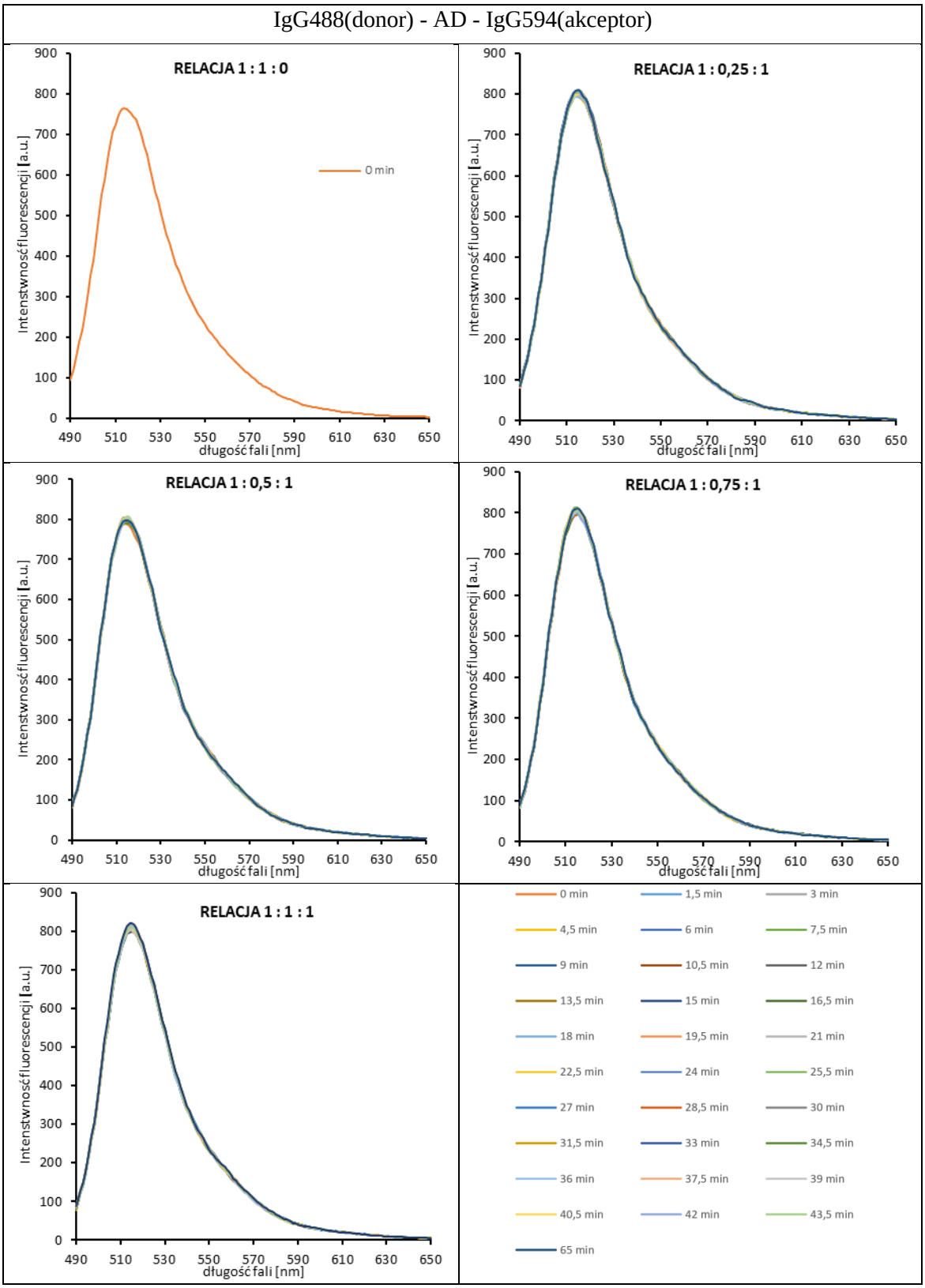


Tabela 10. Badanie dynamiki wiązań IgG488 – AD – IgG594. Zmiana widm emisji fluorescencji w czasie, dla różnych proporcji stężenia AD, w stosunku do wyznakowanych przeciwciał. Opracowanie własne.

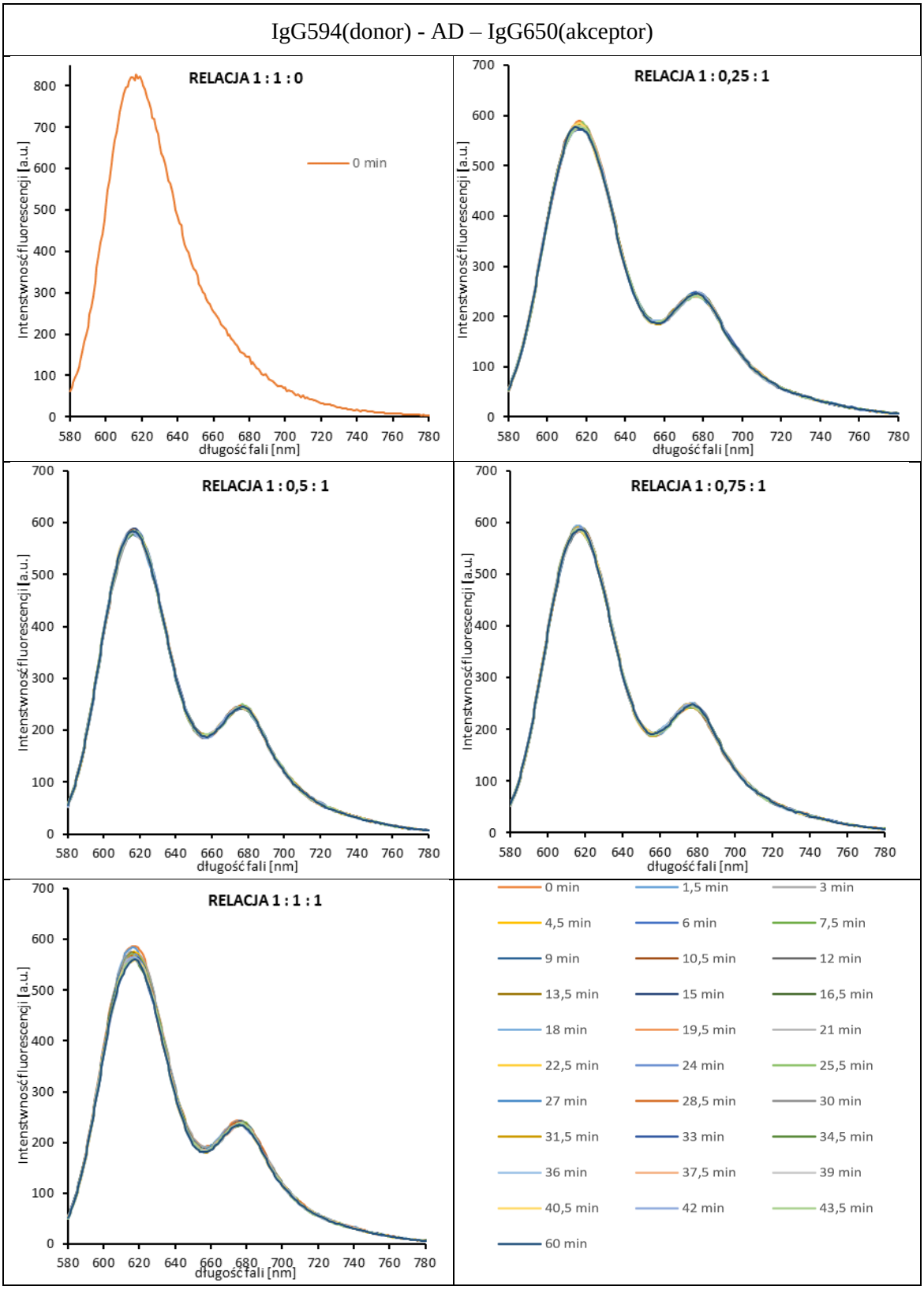


Tabela 11. Badanie dynamiki wiązań IgG594 – AD – IgG650. Zmiana widm emisji fluorescencji w czasie, dla różnych proporcji stężenia AD, w stosunku do wyznakowanych przeciwciał. Opracowanie własne.

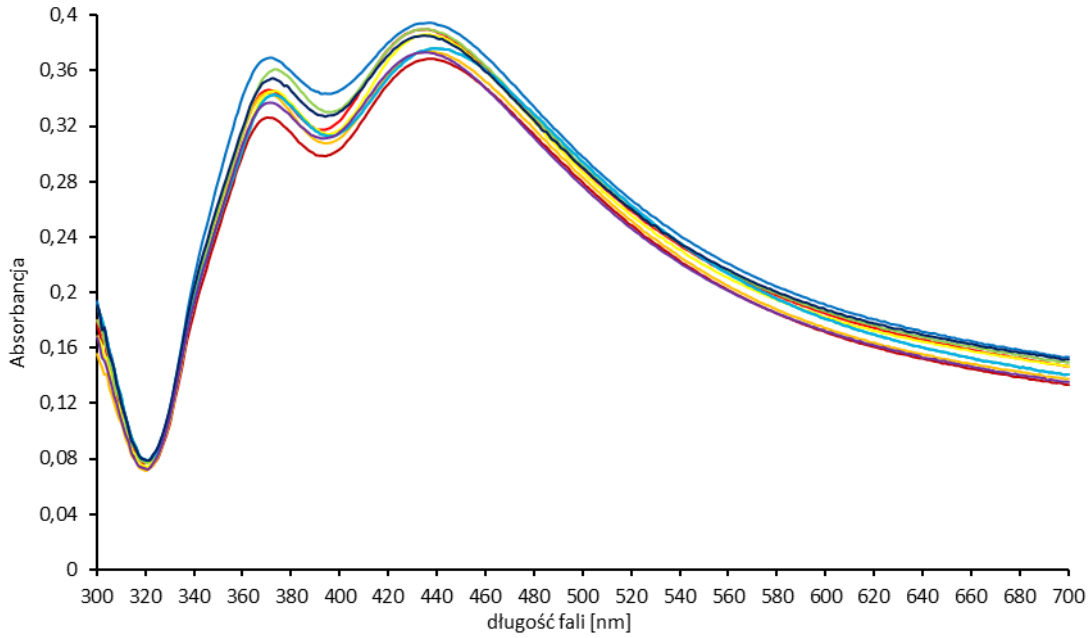
W przypadku drugiej konfiguracji białek IgG594-AD-IgG650, jak wynika z widm przedstawionych w Tabeli 11, zauważalny jest spadek intensywności emisji w postaci gaszenia sygnału donora (IgG594 związanego z AD) po dodaniu do próbki akceptora (IgG650), o czym świadczy zmiana wartości emisji przy długości fali ok. 618 nm z 818 dla proporcji 1:1:0 do wartości 580 w pozostałych próbkach. Jednocześnie po dodaniu porcji akceptora, rejestrowany był sygnał jego emisji w okolicach 680 nm, co potwierdza transfer energii. Analiza pomiarów intensywności emisji fluorescencji w czasie wykazuje brak istotnych różnic w kształcie widm i relacji pomiędzy pasmami donora i akceptora. Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że w roztworze alfa-defensyn związanych z przeciwciałami donora, po dodaniu przeciwciała akceptora, następuje natychmiastowe związanie białek w układzie przeciwciało-antygen-przeciwciało.

Na podstawie prezentowanych powyżej oddziaływań AD594 i AD z wyznakowanymi przeciwciałami, zdecydowano o wyborze pary fluoroforów Dylight 594 i Dylight 650 (donor – akceptor), związanych z przeciwciałami, do dalszych badań nad opracowywanym testem na obecność alfa-defensyn metodą wzmocnionej fluorescencji (AD-MEF).

Dla pierwszej badanej pary donor-akceptor (Dylight 488 z Dylight 594), związanych z przeciwciałami, nie zarejestrowano wystarczająco dużego transferu, aby można było uzyskać odpowiednią, różnicującą detekcję, pozwalającą na osiągnięcie właściwej czułość testu. Decyzję o rezygnacji z pierwszej pary uzasadniają również oszacowane, korzystne dla zjawiska FRET, większe całki nakładania oraz wyższe wartości odległości krytycznych Förstera, dla konfiguracji fluoroforów Dylight 594 z Dylight 650, w stosunku do pary Dylight 488 z Dylight 594, związanych z przeciwciałami.

4.3. Opracowanie procedury testu obecności alfa-defensyn na biosensorze

Na Wykresie 16, pokazano przykładowe widma absorpcji szkiełek pokrytych nanowyspami srebra, wykorzystywanych jako baza biosensora testu AD-MEF. Metoda chemiczna syntezy nanocząstek srebra, chociaż jest szybka, to nie zawsze w jej wyniku otrzymywane są powtarzalne warstwy nanocząstek srebra. Dlatego istotna dla jakości otrzymywanych sensorów jest kontrola spektrofotometryczna każdego szkiełka po syntezie. Zastosowano rygorystyczne kryteria oceny szkiełek po syntezach, w celu zapewnienia odtwarzalności procesu detekcji. Do badań wykorzystywano warstwy, które miały podobne wartości absorbancji w maksimum 0,36 - 0,41; zbliżone położenie maksimum absorbancji, między 434 - 440 nm oraz wartości absorbancji.



Wykres 16. Przykładowe widma absorpcji wybranych do biosensorów szkiełek z warstwą nanocząstek srebra na powierzchni. Opracowanie własne

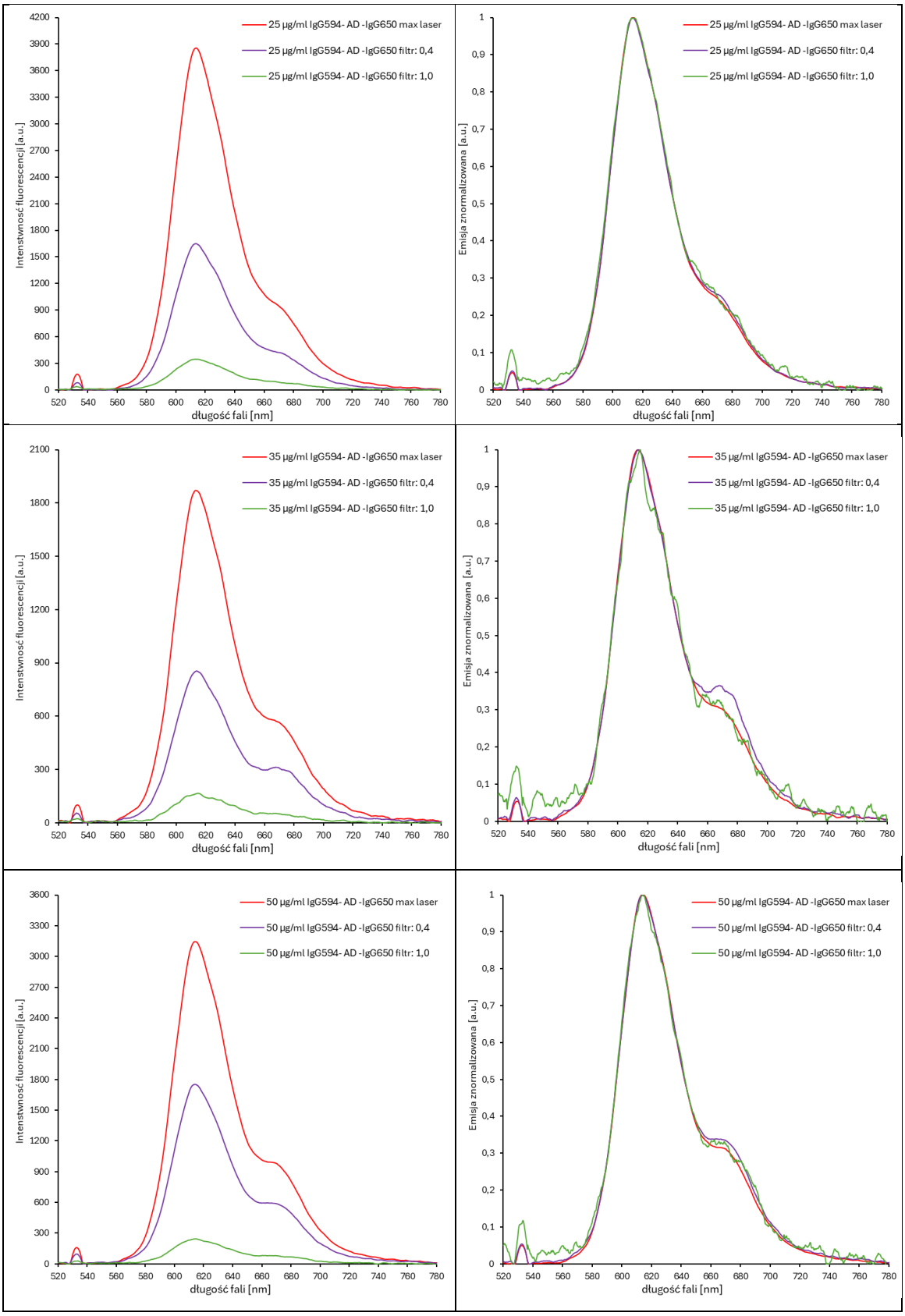
Na cele pomiarowe testu naniesiono różne stężenia przeciwciał wychwytujących, utrzymując stałe stężenie AD i równe przeciwciałom wychwytującym, stężenie przeciwciał potwierdzających. Badania miały na celu sprawdzenia, czy występuje korelacja pomiędzy ilością przeciwciał, wykorzystywanych do wiązania białek z powierzchnią sensora, a sygnałem detekcji AD w teście. Chciano w ten sposób ustalić minimalną ilość przeciwciał, jaka będzie niezbędna do poprawniej detekcji antygenu z próbki. Zbyt mała ilość przeciwciał może obniżać czułość testu, ograniczając zdolność detekcji AD, natomiast zbyt duże stężenie jest niekorzystne z

ekonomicznego punktu widzenia, ponieważ nadmiar przeciwciał, który nie zwiąże się z powierzchnią sensora, zostanie w procesie przygotowywania wypłukany. Z uwagi na fakt, że przeciwciała są najdroższym elementem tego testu, konieczna była weryfikacja tego parametru w jednym z pierwszych kroków przy opracowaniu protokołu.

Jednocześnie przeprowadzono badania mające na celu ustalenie natężenia światła wzbudzającego próbkę, w celu dobru właściwego filtra osłabiającego laser. W tym przypadku zbyt duża intensywność światła będzie niekorzystnie wpływać na znaczniki fluorescencyjne związane z przeciwciałami, powodując ich degradację w procesie fotowybielania. Proces ten będzie tym silniejszy, im większe natężenie światła wzbudzającego. W ocenie brano pod uwagę zmiany w intensywności emisji akceptora, przy różnym osłabieniu światła wzbudzającego donor.

Jak pokazano na wykresach w pierwszej kolumnie Tabeli 11, im mniejsze osłabienie lasera, tym wyższy rejestrowany sygnał wzbudzanego fluoroforu, co oczywiście nie powinno dziwić. Analizując natomiast zmianę intensywności fluorescencji, w zależności od stężenia przeciwciał inkubowanych na powierzchni celi, można zauważyć, że wzrost stężenia białek w roztworze praktycznie nie wpływa na wzrost emisji fluorescencji z cel. Na przykład przy wzbudzeniu próbek laserem osłabionym filtrem 0,4, poziom rejestrowanego sygnału dla celi o stężeniu IgG594 25 µg/ml był bardzo zbliżony do sygnału z celi, na której było nakładane dwukrotnie więcej przeciwciał w procesie inkubacji z powierzchnią (50 µg/ml), co wskazuje na ograniczoną ilość miejsca wiązania przeciwciał w celi.

Z uwagi na duży sygnał donora w stosunku do akceptora, aby ocenić różnicę w emisji akceptora w zależności od stężenia przeciwciał, należało znormalizować widma w maksimum emisji fluorescencji donora. Jak pokazano na wykresach znormalizowanych w drugiej kolumnie Tabeli 12, rejestrowany sygnał akceptora w zakresie 650-730 nm jest silnie zaszumiony przy osłabieniu światła lasera filtrem szarym OD 1,0. Zastosowanie tak silnego osłabienia może wpływać na niskie poziomy rejestrowanego sygnału, co z kolei może skutkować problemami z powtarzalnością testów.


25 µg/ml IgG594- AD -IgG650 max laser
25 µg/ml IgG594- AD -IgG650 filtr: 0,4
25 µg/ml IgG594- AD -IgG650 filtr: 1,0
Intenstwność fluorescencji [a.u.]
Emisja znormalizowana [a.u.]
długość fali [nm]
35 µg/ml IgG594- AD -IgG650 max laser
35 µg/ml IgG594- AD -IgG650 filtr: 0,4
35 µg/ml IgG594- AD -IgG650 filtr: 1,0
50 µg/ml IgG594- AD -IgG650 max laser
50 µg/ml IgG594- AD -IgG650 filtr: 0,4
50 µg/ml IgG594- AD -IgG650 filtr: 1,0

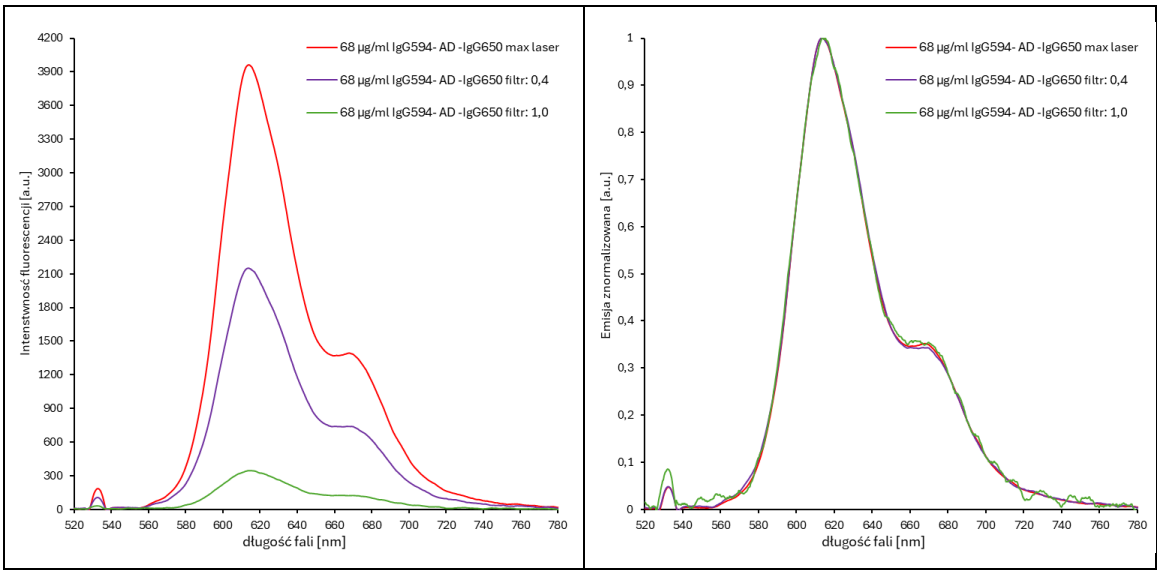


Tabela 12. Widma emisji fluorescencji z cel pomiarowych biosensora, dla różnych stężeń przeciwciał wychwytujących i potwierdzających, związanych z alfa-defensynami o stałym stężeniu. Oznaczenie: max laser – maksymalna, nominalna moc lasera wzbudzającego, filtr 0,4 oraz 1,0 odpowiednio: wiązka osłabiona filtrem szarym OD 0,4 oraz OD 1,0. Widma dla poszczególnych stężeń IgG i różnych emisji światła, przedstawiono w wartościach intensywności emisji fluorescencji oraz po znormalizowaniu. Opracowanie własne.

W pierwszych trzech stężeniach przeciwciał wychwytujących i potwierdzających 25, 35, 50 µg/ml zastosowanie maksymalnej mocy lasera nie wpływa na poziom sygnału akceptora w stosunku do donora (widma znormalizowane). Optymalny sygnał, wyznakowanego przeciwciała potwierdzającego, rejestrowano dla osłabienia lasera filtrem OD 0,4. Ponadto rejestrowane sygnały emisji fluorescencji obu znaczników był w stabilnych, ze względu na czułość spektrometru, zakresach >1000, o czym świadczy brak zaszumienia widm emisji fluorescencji. Z tego powodu zdecydowano o wyborze filtra OD 0,4 do pracy w układzie pomiarowym testu AD-MEF.

Badania pokazują, że wzrost intensywności światła wzbudzającego nie wpływa na zwiększenie emisji akceptora, co potwierdza, że jego fluorescencja jest wynikiem transferu energii w układzie donor-akceptor, a nie jest efektem bezpośredniego wzbudzenia akceptora. Zastosowany laser wzbudzający donor, emituje światło o długości fali 532 nm. Jak wynika z widma absorpcji IgG650 (Wykres 9), przy tej długości fali, absorbancja wynosi jedynie 1,5% wartości maksymalnej. Zjawisko bezpromienistego transferu energii silnie zależy od stopnia nakładania widm emisji donora i absorpcji akceptora, odległości między nimi, czy ułożenia momentów dipolowych pomiędzy donorem i akceptorem. Wzrost intensywności emisji donora

spowodowany większym natężeniem światła wzbudzającego, w małym stopniu zmieni wartość całki nakładania, nieznacznie wpływając na transfer energii.

Policzono pola powierzchni pod krzywą emisji fluorescencji (AUC) dla widm znormalizowanych, w zakresie emisji akceptora (650 - 730 nm). Wyniki przedstawiono w Tabeli 13. Jak wynika z wartości AUC_{widmo}, dla największego stężenia 68 µg/ml przeciwciał wychwytujących i potwierdzających, pole pod krzywą nie zmienia się dla trzech ustawień intensywności światła wzbudzającego. Dla pozostałych stężeń przeciwciał pole było mniejsze, przy maksymalnej emisji lasera niż w konfiguracji z filtrem OD: 0,4. Niektóre wartości AUC_{widmo} dla filtra 1,0 są większe, niż dla pozostałych intensywności światła, jednak w tym przypadku należy zwrócić uwagę na kształt widm, a szczególnie na stopień ich zaszumienia, który może wpływać na szacowanie wartości AUC.

	AUC_{widmo} [650-730 nm]		
Stężenie IgG przy stałym stężeniu alfa-defensyn	**Laser z filtrem OD: 0,4**	**Laser bez filtra**	**Laser z filtrem OD: 1,0**
IgG594 (25 µg/ml) -AD (25 µg/ml) - IgG650 (25 µg/ml)	12,4	11,9	12,9
IgG594 (35 µg/ml) -AD (25 µg/ml) - IgG650 (35 µg/ml)	16,7	14,3	14,6
IgG594 (50 µg/ml) -AD (25 µg/ml) - IgG650 (50 µg/ml)	15,8	14,7	15,4
IgG594 (68 µg/ml) -AD (25 µg/ml) - IgG650 (68 µg/ml)	15,9	16,0	16,3

Tabela 13. Obliczone wartości pola powierzchni pod krzywą (AUC_{widmo}) znormalizowanej emisji fluorescencji w zakresie emisji akceptora (650-730 nm), dla różnych stężeń przeciwciał wychwytujących i potwierdzających, związanych z alfa-defensynami o stałym stężeniu. Oznaczenie: laser bez filtra – maksymalna, nominalna moc lasera wzbudzającego, ozn. z filtrem OD: 0,4 oraz OD: 1,0 odpowiednio: wiązka osłabiona filtrem szarym OD 0,4 oraz OD 1,0.

Na podstawie powyższych wyników, zdecydowano o wyborze filtra OD: 0,4 do pracy w układzie pomiarowym. Dla wybranej konfiguracji laser-filtr, oceniono minimalne stężenie przeciwciał potrzebne do testu, analizując kształt widm w zakresie emisji akceptora oraz wartości pól pod krzywą dla czterech różnych stężeń przeciwciał. Wyniki przedstawione powyżej wskazują, że optymalnym stężeniem IgG do zastosowania w teście będzie 35 µg/ml. Jest to najniższe użyte stężenie, dla którego otrzymano jedne z najwyższych wartości AUC. Oznacza to, że stosowanie większych stężeń IgG nie poprawi sygnału detekcji, a jedynie zwiększy koszt testu ze względu na konieczność użycia większej ilości białka do inkubacji. Wyniki dla przeciwciał w stężeniu 25 µg/ml są wyraźnie niższe od uzyskanych dla pozostałych stężeń, dlatego do testu wybrano stężenie przeciwciał potwierdzających i wychwytujących na poziomie

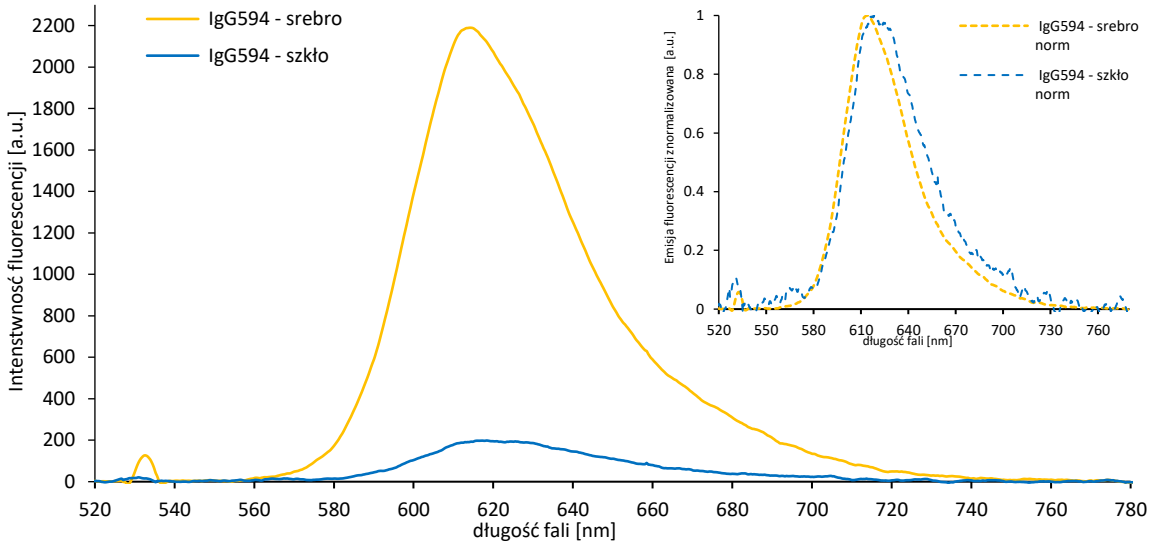
35 µg/ml, będące kompromisem między zdolnością detekcyjną układu, a czynnikami ekonomicznymi testu.

Po określeniu stężenia przeciwciał i intensywności źródła światła wykonano pomiary na biosensorze w celach umieszczonych po stronie samego szkła i na warstwie nanosrebra, w celu określenia współczynnika wzmocnienia fluorescencji. Badania wykonano w dwóch konfiguracjach, gdy na celach związane było tylko przeciwciało wychwytujące IgG594, inkubowane w stężeniu 35 µg/ml oraz w drugim przypadku, gdy sygnał rejestrowany z celi pochodził od docelowej „kanapki" w postaci dwóch przeciwciał (IgG594, IgG650) z wychwyconą alfa-defensyną, nakładaną na cele w stężeniu 25 µg/ml.

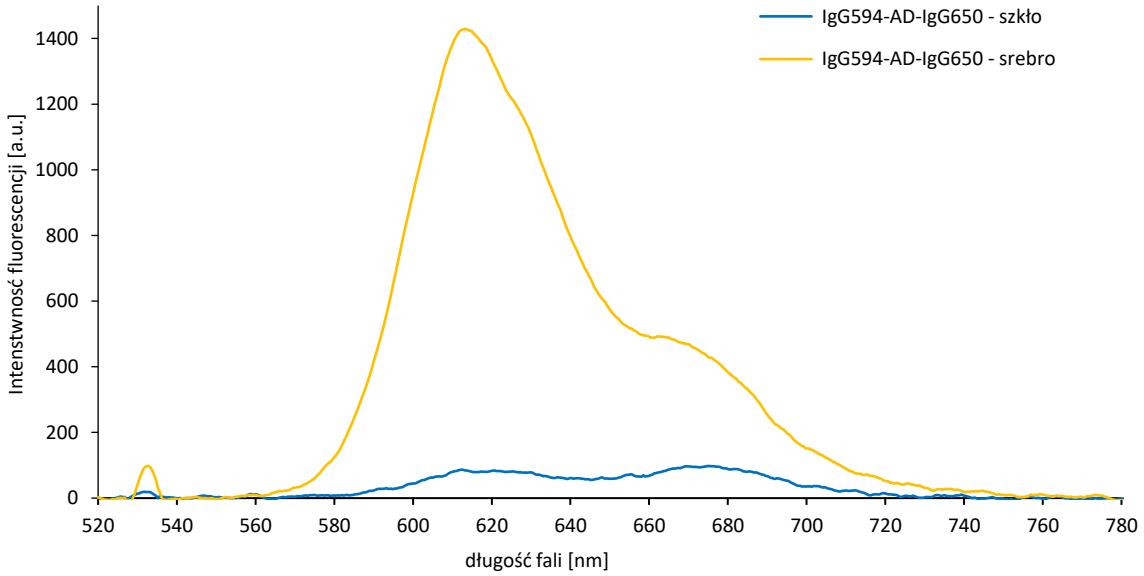
Na wykresach 17 i 18 przedstawiono uśrednione widma zarejestrowane na powierzchni szkła i nanosrebra dla samego IgG594 oraz dla „kanapki" przeciwciał z AD. Dla samego donora (IgG594) związanego z powierzchnią sensora zaobserwowano przesunięcie krótkofalowe o 4 nm, widma emisji na srebrze w stosunku do widma na szkle. Dodatkowo porównując szerokość połówkową widm, można zauważyć, że dla widma emisji na srebrze jest ona mniejsza niż dla samego szkła, a wartość rejestrowanego sygnału charakteryzuje się lepszym stosunkiem sygnału do szumu. Uśredniony współczynnik wzmocnienia fluorescencji dla samego IgG594 związanego z powierzchnią sensora, wyrażony jako stosunek sygnałów w maksimum emisji na srebrze (2189) do maksimum emisji na szkle (198), wyniósł 11. Jest to wartość znacznie wyższa niż zarejestrowana w badaniach fotostabilności hiperycyny (4,7), przedstawionych w rozdziale 4.1.2. Natomiast dla układu „kanapkowego" (Wykres 18), stosunek maksimum emisji donora (IgG594) dla celi na srebrze (1428) do maksimum emisji na samym szkle (84) wyniósł 17. Uzyskane wartości wzmocnień fluorescencji są dużo lepsze od podawanych w literaturze wyników w podobnych eksperymentach. W badaniu Aslan, Gryczyński i in. (2005) na powierzchni pokrytej nanowyspami srebra związano niewyznakowane przeciwciała wychwytujące, natomiast związane z fluoroforem Rhodamine Red X przeciwciała, wykorzystano jako potwierdzające wychwyt antygenu. Zarejestrowano 10-15 razy większą emisję fluorescencji na srebrze w stosunku do emisji na samym szkle.

Zauważalny jest również spadek intensywności fluorescencji donora po związaniu w teście „kanapkowym" z antygenem i akceptorem (sygnał srebro/szkło: 1428/84) w stosunku do sygnału samego IgG594 na powierzchni (sygnał srebro/szkło: 2189/198), co potwierdza podobną obserwację w badaniach wiązań między

przeciwciałami i alfa-defensynami w roztworach. Gaszenie fluorescencji donora po utworzeniu kompleksu (przeciwciało-antygen-przeciwciało) potwierdza zachodzący transferu energii między donorem a akceptorem, który zamierzano uzyskać, projektując układ kanapkowy w teście na obecność alfa-defensyn.



Wykres 17. Widma emisji fluorescencji przeciwciał wyznakowanych fluoroforem Dylight 594 związanych w celach biosensora na powierzchni szkła i nanowarstwie srebra na szkle. Wstawiony wykres przedstawia widma znormalizowane w maksimum emisji fluorescencji. Opracowanie własne.



Wykres 18. Widma emisji fluorescencji testu „kanapkowego” dla przeciwciał wychwytujących i potwierdzających, wyznakowanych Dylight 594 i Dylight 650 po związaniu z AD, zarejestrowane z cel na powierzchni szkła i nanowarstwie srebra na szkle. Opracowanie własne.

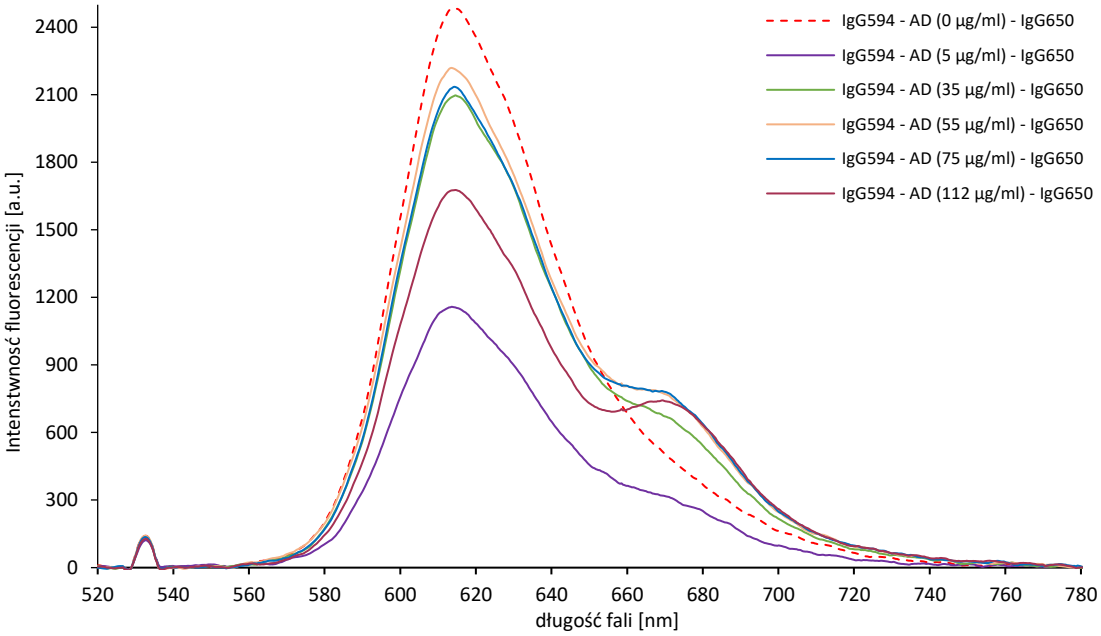
4.4. Zastosowanie biosensora do oceny ilościowej alfa-defensyn

4.4.1. Badania czułości metody dla różnych stężeń alfa-defensyn w buforze fosforanowym

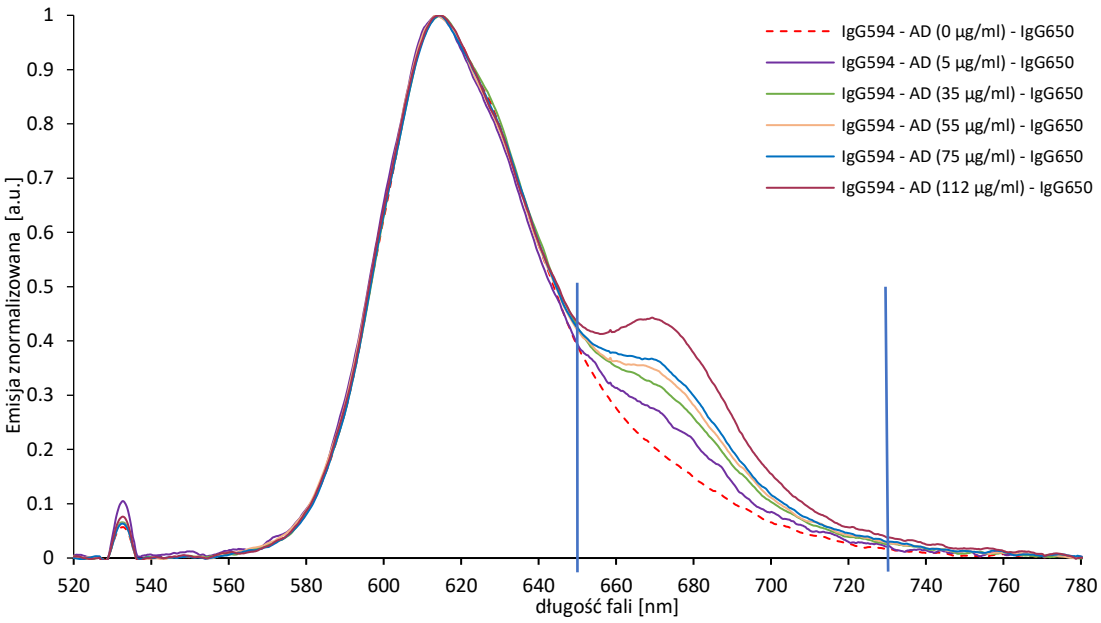
Wykonano badania mające na celu sprawdzenia zdolności różnicowania sygnału detekcji, w zależności od ilości antygenu w próbce, w zaproponowanym teście na obecność alfa-defensyn metodą wzmocnionej fluorescencji na powierzchni nanowarstw srebra (AD-MEF).

W tym celu na cele pomiarowe nanoszono roztwory alfa-defensyn w buforze fosforanowym w wybranych do badań stężeniach: 5 µg/ml, 35 µg/ml, 55 µg/ml, 75 µg/ml i 112 µg/ml, których można się spodziewać w próbkach od pacjentów z podejrzeniem zakażenia okołoprotezowego.

Jak wynika z Wykresu 19 wartości sygnału emisji fluorescencji dla donora (IgG594, długość fali ok. 614 nm) w poszczególnych celach pomiarowych są różne. Sygnał emisji donora z celi dla stężenia AD 5 µg/ml był mniejszy w stosunku do stężenia 55 µg/ml, dla którego zarejestrowano najwyższy sygnał emisji w zakresie wyznakowanego przeciwciała wychwytującego. Wartość sygnału donora głównie zależy od ilości przeciwciał wychwytujących obsadzonych w celi oraz morfologii warstwy srebrnych nanowysp. Ponadto na podstawie otrzymanych widm, trudno jest ocenić ilościowo emisję akceptora (IgG650, maksimum przy długości fali ok. 670 nm), bez odniesienia się do sygnału donora. Dlatego też do oceny transferu energii i ilości AD należało najpierw znormalizować widma w paśmie donora, w celu wyeliminowania opisywanych powyżej efektów. Dzięki temu możliwie było zaobserwowanie różnic wynikających jedynie ze zmiany stężenia alfa-defensyn w próbce. Normalizacja widm w maksimum emisji donora, wyraźnie różnicuje sygnał akceptora w zależności od ilości antygenu w teście, co przedstawiono na Wykresie 20. Na podstawie tych widm, można ilościowo ocenić sygnał akceptora, przez obliczenie pola powierzchni pod krzywą w zakresie emisji wyznakowanego przeciwciała potwierdzającego (650 – 730 nm).



Wykres 19. Widma emisji fluorescencji z cel pomiarowych opracowanego testu AD-MEF przy różnym stężeniu alfa-defensyn w próbce: 5 µg/ml, 35 µg/ml, 55 µg/ml, 75 µg/ml i 112 µg/ml, oraz z celi kontrolnej (linia przerywana). Opracowanie własne.



Wykres 20. Znormalizowane widma emisji fluorescencji z cel pomiarowych opracowanego testu AD-MEF przy różnym stężeniu alfa-defensyn w próbce: 5 µg/ml, 35 µg/ml, 55 µg/ml, 75 µg/ml i 112 µg/ml, oraz z celi kontrolnej (linia przerywana). Niebieskie linie pionowe określają zakres długości fali, w którym obliczano pole powierzchni pod widmem emisji. Opracowanie własne.

W teście wprowadzono również celę kontrolną, która jak opisano w metodach, nie była inkubowana z antygenem, natomiast podlegała wszystkim innym procesom przygotowania sensora do wykonania testu AD-MEF. Sygnał z tej celi powala na ocenę

czy z sensorem nie stało się coś nieprzewidzianego w protokole. Inkubacja na jej powierzchni również przeciwciał wychwytujących, pomimo braku antygenu, wykaże w pomiarze widma emisji fluorescencji, czy doszło do właściwego zablokowania powierzchni testu przed wiązaniem się innych niż przeciwciała wychwytujące białek. Ponadto, co wynika z charakterystyki wybranych znaczników, sygnał emisji donora pokrywa się z emisją akceptora. Dlatego, aby dokładniej oszacować sygnał akceptora (przeciwciała potwierdzającego) w stosunku do stężenia AD zadecydowano, że od pola powierzchni pod krzywą obliczonego dla danego znormalizowanego widma emisji z celi z „kanapką" przeciwciał (AUC_{widmo}), odejmowane będzie obliczone pole pod krzywą dla celi kontrolnej, uzyskując w ten sposób sygnał pochodzący jedynie od akceptora ($AUC_{sygnał}$).

		AUC [650-730 nm]	
IgG594-AD-IgG650	Stężenie alfa-defensyn [µg/ml]	AUC_{widmo}	$AUC_{sygnał}$
	5	13,182	2,51
	35	15,382	4,71
	55	16,259	5,59
	75	16,993	6,32
	112	20,434	9,76
	0 (kontrola)	10,673	

Tabela 14. Obliczone wartość pól powierzchni pod krzywą (AUC) ze znormalizowanych widm emisji fluorescencji z cel pomiarowych opracowanego testu AD-MEF, przy różnym stężeniu alfa-defensyn w próbce, oraz z celi kontrolnej. AUC_{widmo}, wartość pola pod krzywą dla danego widma emisji oszacowana w zakresie 650 – 730 nm. $AUC_{sygnał}$ - wartość pola pod krzywą związana ze wzrostem emisji akceptora po związaniu z alfa-defensynami w teście, uzyskana przez odjęcie od AUC danego widma wartości AUC dla celi kontrolnej (bez antygenu). Opracowanie własne.

Wyniki obliczonych wartość AUC dla sygnału emisji znacznika związanego z przeciwciałem potwierdzającym, przedstawione w Tabeli 14, pokazują, że za pomocą testu AD-MEF można wykryć obecność AD w szerokim zakresie stężeń, pokrywającym spodziewane ilości tego markera w próbkach od pacjentów. Jak wynika opublikowanych badań nad przydatnością oceny obecności AD w płynie stawowych w diagnostyce PJI, wykrycie w próbce stężenia powyżej 5 µg/ml uznaje się za wysoko predykcyjne występowania infekcji u pacjenta (Deirmengian, Kardos, Kilmartin, Cameron, Schiller i Parvizi, 2014a). Z tego powodu komercyjny test oceny obecności AD w płynie stawowym (AD-ELISA), został zoptymalizowany na poziomie odcięcia 5,2 µg/ml. W międzynarodowych zaleceniach standardów diagnostyki infekcji okołoprotezowych ICM 2018 (Parvizi i Gehrke, 2021) i EBJIS 2021 (McNally i in.,

2021), nie określono wartości granicznego stężenia tego markera. Stwierdzono jedynie, że wymagany jest pozytywny wynik testu na obecność AD. Za pozytywny wynik, uznano wartość stosunku sygnału do poziomu odcięcia testu >1 (w teście ELISA) lub pozytywny wynik szybkiego testu przepływu bocznego (AD-LF). Może być to związane z faktem, że obecnie na rynku dostępne są tylko dwa komercyjne testy na obecność AD w płynie stawowym. Ponadto nie ma żadnych badań, które podjęłyby szerszą ocenę korelacji stężenia AD z prawdopodobieństwem występowania PJI. Jedynie w nielicznych badaniach, podawane są konkretne ilości AD wykrywanych w próbkach płynu pacjentów. W jednym z nich wskazano, że średnie stężenie, w dobranej do badań grupie pacjentów ze zdiagnozowanym zakażeniem, wyniosło 59,6 µg/ml, natomiast u pacjentów bez infekcji, średnio wykrywano 1,92 µg/ml alfa-defensyn w płynie stawowym (Deirmengian, Kardos, Kilmartin, Cameron, Schiller, Booth i Parvizi, 2014).

4.4.2. Badania możliwości wykorzystania metody do wykrywania alfa-defensyn w płynie stawowym

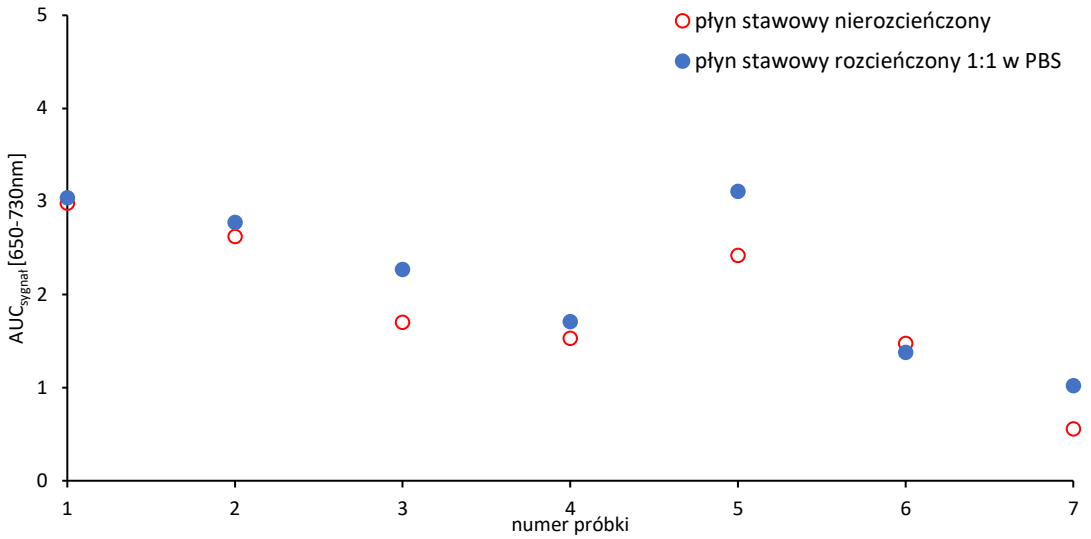
Ocena obecności alfa-defensyn wykonywana będzie w płynie stawowym, dlatego należało przeprowadzić wstępne doświadczenia, weryfikujące poziom wykrywanego sygnału. Jak podkreślano we wcześniejszych rozdziałach pracy, płyn stawowy charakteryzuje się bardzo złożonym składem. Oprócz składników prawidłowych, jak kwas hialuronowy, lubrycyna, elementy osocza krwi, substancje odżywcze i metabolity, znajdują się w nim również inne niż AD, markery stanów zapalnych czy w końcu same patogeny, wywołujące zakażenie okołoprotezowe. Dlatego sprawdzono doświadczalnie, na jakim poziomie należy spodziewać się sygnału detekcji AD w płynie stawowym w teście AD-MEF, oraz w jaki sposób wartość tego sygnału zmienia się przy rozcieńczeniu próbki płynu.

W ramach eksperymentu medycznego zrekrutowano łącznie 14 pacjentów od których w okresie od lipca 2023 r. do czerwca 2024 r., pobrano próbki płynu stawowego. Na badania naukowe uzyskano wcześniej pozytywną opinię Komisji Bioetycznej przy Wydziale Lekarskim, Collegium Medicum Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, podjętą w uchwale Nr 4/2022 oraz 17/2023. W grupie 14 pacjentów, było sześciu mężczyzn i osiem kobiet, średnia wieku pacjenta to 70 lat. Próbki pobrano od pacjentów z okolicy stawu kolanowego (3 pacjentów), z biodrowego

(9 pacjentów) i ramiennego (2 pacjentów). W 6 przypadkach próbki otrzymano w wyniku punkcji stawu, natomiast u 8 pacjentów płyn pobrano w trakcie zabiegu chirurgicznego (śródoperacyjnie). W badaniach w ramach rozprawy doktorskiej płyn stawowy wykorzystano do testów na obecność AD opracowaną metodą wzmocnionej fluorescencji oraz komercyjną metodą z wykorzystaniem zestawów testu immunochromatograficznego Synovasure Alpha Defensin Lateral Flow Test (AD-LF). Wyniki tych badań nie wpływały na proces diagnostyczny i terapeutyczny pacjentów.

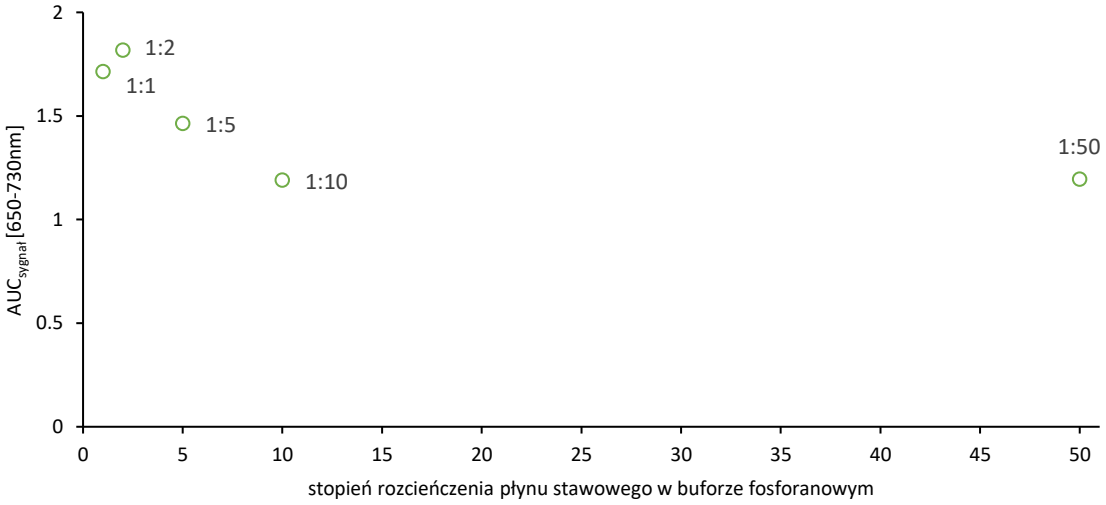
Wyniki testu AD-MEF dla 14 próbek pochodzących od 7 pacjentów w dwóch stężeniach płynu stawowego: bez rozcieńczenia (próbka płynu pobrana od pacjenta) oraz rozcieńczona w stosunku objętościowym 1:1 w buforze fosforanowym, w postaci policzonych wartości pól pod krzywą, znormalizowanych w maksimum donora, widm emisji fluorescencji, w zakresie 650-730 nm ($AUC_{sygnał}$), przedstawiono na Wykresie 21. Jak wynika z danych na Wykresie 21, rozcieńczenie płynu stawowego wpływa na poziom rejestrowanego sygnału w teście. Dla każdej zbadanej próbki sygnał po rozcieńczeniu w buforze fosforanowym (1:1), był wyższy niż dla płynu pobranego bezpośrednio od pacjenta. Może mieć to związek ze skomplikowanym składem płynu stawowego oraz jego naturalną, wysoką lepkością, zapewniającą stawom ochronę przed urazami. Cechy te mogą ograniczać zdolność wiązania alfa-defensyn z przeciwciałami, z powodu ograniczonej dyfuzji cząsteczek w bardzo lepkim środowisku i w efekcie skutkować, niższymi sygnałami detekcji. Wykonywanie testu na próbce nierozcieńczonej, może prowadzić zatem do uzyskiwania wyników fałszywie ujemnych.

Mając na uwadze powyższe wnioski, zbadano inne rozcieńczenia, w celu określenia optymalnego do testu AD-MEF. Wybrano próbkę numer 4 z przebadanej wstępnie grupy, o stosunkowo niskim sygnale. Pochodziła ona od pacjenta, co do którego lekarze podejrzewali zakażenie okołoprotezowe na podstawie innych badań. Wykonano dodatkowy test AD-MEF w pięciu rozcieńczeniach płynu stawowego w buforze fosforanowym: 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:50. Wyniki testu w postaci policzonych wartości pól pod krzywą, w analogiczny sposób jak w poprzednim doświadczeniu, przedstawiono na Wykresie 22. Jak wynika z danych na wykresie, zarejestrowano najwyższy poziom sygnału detekcji alfa-defensyn dla rozcieńczenia płynu w stosunku 1:2 w buforze PBS.



Wykres 21. Obliczone wartość pól pod krzywą ($AUC_{sygnał}$) z widm emisji fluorescencji zarejestrowanych w celach pomiarowych opracowanego testu AD-MEF dla siedmiu próbek płynu stawowego, każda przy dwóch stężeniach płynu (płyn nierozcieńczony i rozcieńczony w stosunku 1:1 w buforze PBS). Opracowanie własne.

Nie bez znaczenia jest również fakt, wykrycia przez test AD-MEF sygnałów dla wyższych rozcieńczeń 1:10 oraz 1:50. Oceniono jednak, że w tym obszarze rozcieńczeń sygnały są stosunkowo niskie i pozostają na podobnym poziomie. Z uwagi na zastosowanie w układzie pomiarowym prostego detektora fluorescencji, rejestracja sygnału z próbek o bardzo dużych rozcieńczeniach, mogłaby wpływać na brak powtarzalności pomiarów. Z tego powodu zdecydowano, że próbki pacjentów do testu AD-MEF będą rozcieńczane w stosunku 1:2 z buforem fosforanowym.



Wykres 22. Obliczone wartość pól pod krzywą ($AUC_{sygnał}$) z widm emisji fluorescencji zarejestrowanych w celach pomiarowych opracowanego testu AD-MEF dla pięciu rozcieńczeń płynu stawowego w buforze fosforanowym: 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:50 z jednej próbki płynu stawowego pacjenta. Opracowanie własne.

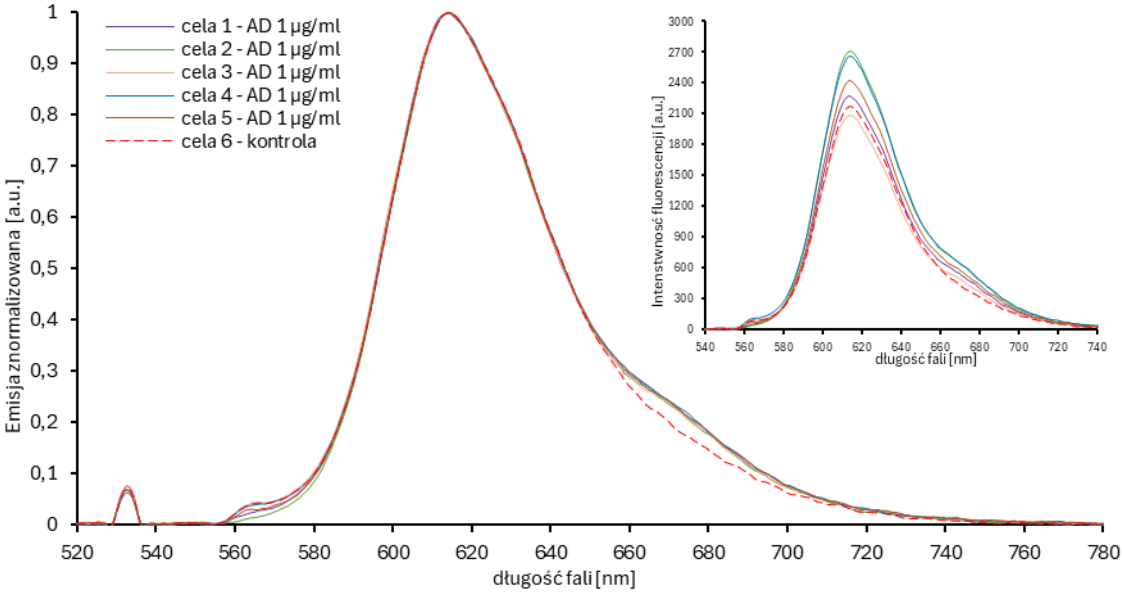
W dwóch kompresyjnie dostępnych testach medycznych, produkowanych przez tego samego producenta, na obecność alfa-defensyn: teście AD-ELISA (Synovasure Alpha Defensin ELISA Test) i AD-LF (Synovasure Alpha Defensin Lateral Flow Test), które szczegółowo opisano we wcześniejszych rozdziałach rozprawy, również stosowane są rozcieńczenia płynu stawowego pobranego od pacjenta. W przypadku testu AD-ELISA, z uwagi na możliwość jego wykonania jedynie w formie usługi, nie są podawane szczegóły dotyczące sposobu rozcieńczania próbek. Producent testu, jak również wyniki badań potwierdzających jego skuteczność, nie opisują, w jaki sposób optymalizowany jest płyn stawowy. Ograniczają się jedynie do ogólnych stwierdzeń o „specjalnych procedurach optymalizacji testu, w celu eliminacji wpływu lepkości płynu na poziom detekcji" (Deirmengian, Kardos, Kilmartin, Cameron, Schiller i Parvizi, 2014a). Z kolei dostępne zestawy ELISA do badań naukowych (np. HNP1-3, Human, ELISA kit, Hycult Biotech), w swoich protokołach nie opisują sposobu przygotowania próbek do oceny tego markera w płynie stawowym. Natomiast wyniki badań Abdo i in., (2022), nad wpływem stopnia rozcieńczenia płynu stawowego na poziom detekcji AD w metodzie ELISA wykazały, że stosowanie małych rozcieńczeń, skutkuje uzyskiwaniem wyników fałszywie ujemnych. Według wyników powyższych badań najbardziej optymalnym rozcieńczeniem dla metody ELISA jest stosunek 1:5000. Z tego powodu podjęta decyzja o rozcieńczeniu próbki płynu do testu AD-MEF jest zasadna.

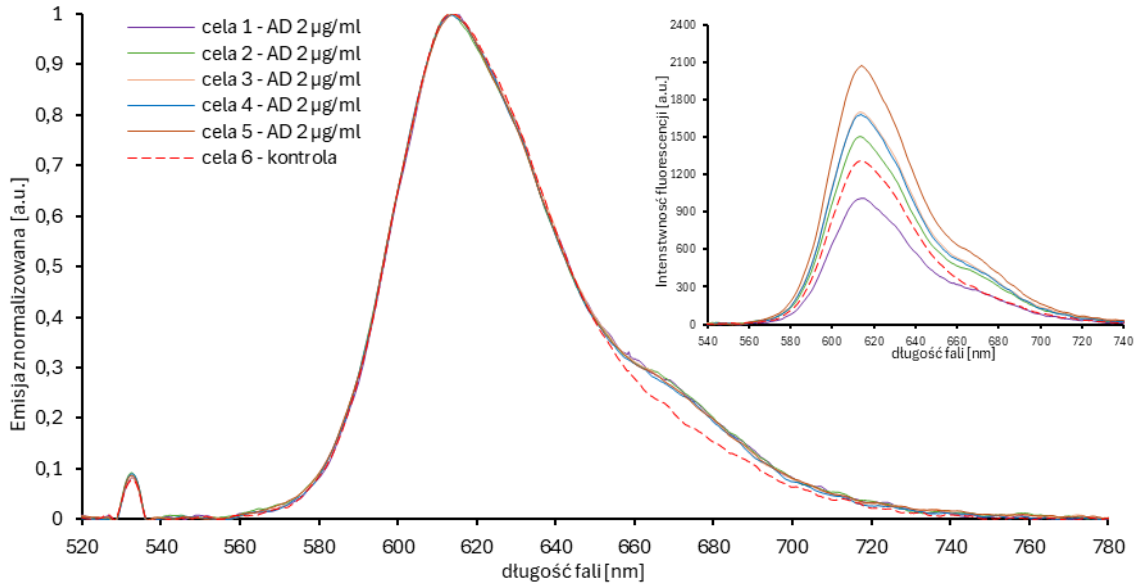
4.4.3. Wyznaczenie krzywej kalibracyjnej testu AD-MEF, wykorzystywanej do oceny ilościowej alfa-defensyn w próbkach płynu stawowego

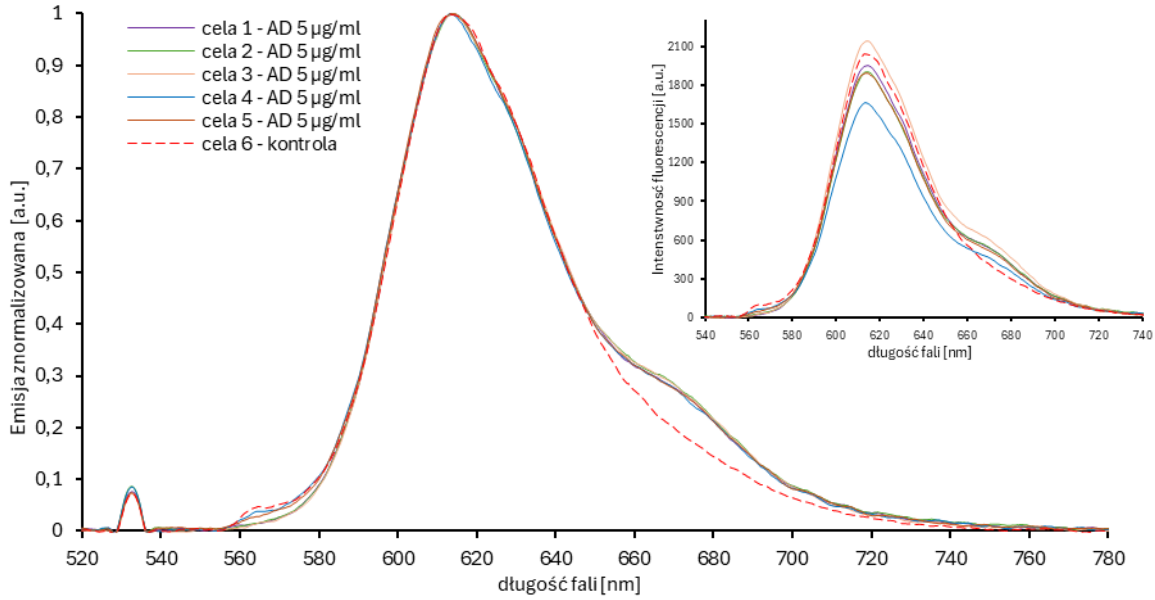
Krzywą kalibracyjną testu AD-MEF wykonano dla sześciu, różnych stężeń roztworu AD w buforze fosforanowym: 1 µg/ml, 2 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml i 20 µg/ml. Dobór stężeń do krzywej wynikał z przesłanek klinicznych. Jak zauważono na podstawie poprzednich badań, płyn stawowy wymaga procedury rozcieńczenia, w celu uzyskania lepszego sygnału detekcji. Jednak płyn ten u każdego pacjenta będzie się różnił, nie tylko ilością markerów, ale również lepkością, wynikającą na przykład z ilości kwasu hialuronowego, czy czasu od pobrania do wykonania badań laboratoryjnych. To może, ale nie musi prowadzić do uzyskiwania niskich sygnałów detekcji. Wykonanie krzywej w niższych stężeniach daje możliwość zastosowania testu

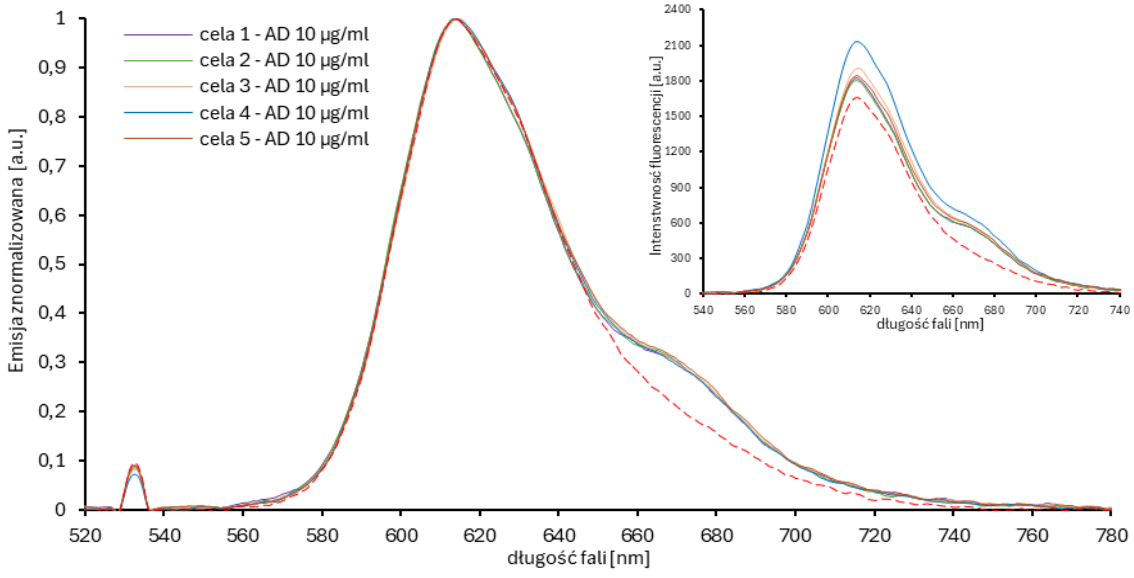
nawet w przypadku, gdy materiał do badań będzie bardzo gęsty i wymagać będzie większego rozcieńczenia dla uzyskania optymalnego sygnału. Można założyć sytuację, że przy rozcieńczeniu płynu w ustalonym stosunku 1:2, wykrywany sygnał będzie na granicy wartości, dla której test można uznać za pozytywny. Powtórzenie tego testu w większym rozcieńczeniu może zmienić niepewny wynik. Drugą istotniejszą klinicznie przesłanką jest, nieokreślone w zaleceniach i publikacjach, stężenie graniczne AD w płynie stawowym. Jeśli za pomocą testu można stwierdzić, że w próbce jest więcej AD niż poziom odcięcia komercyjnego testu AD-ELISA (5,2 µg/ml), to test taki należy uznać na pozytywny (Parvizi i Gehrke, 2021). Ocena ilościowa stężenia AD w diagnostyce PJI, przy obecnym stanie wiedzy, mogłaby się zakończyć na stwierdzeniu, czy w teście wykryto więcej niż 5,2 µg/ml AD, otrzymując wynik pozytywny czy mniej, co z kolei świadczy o negatywnym wyniku testu.

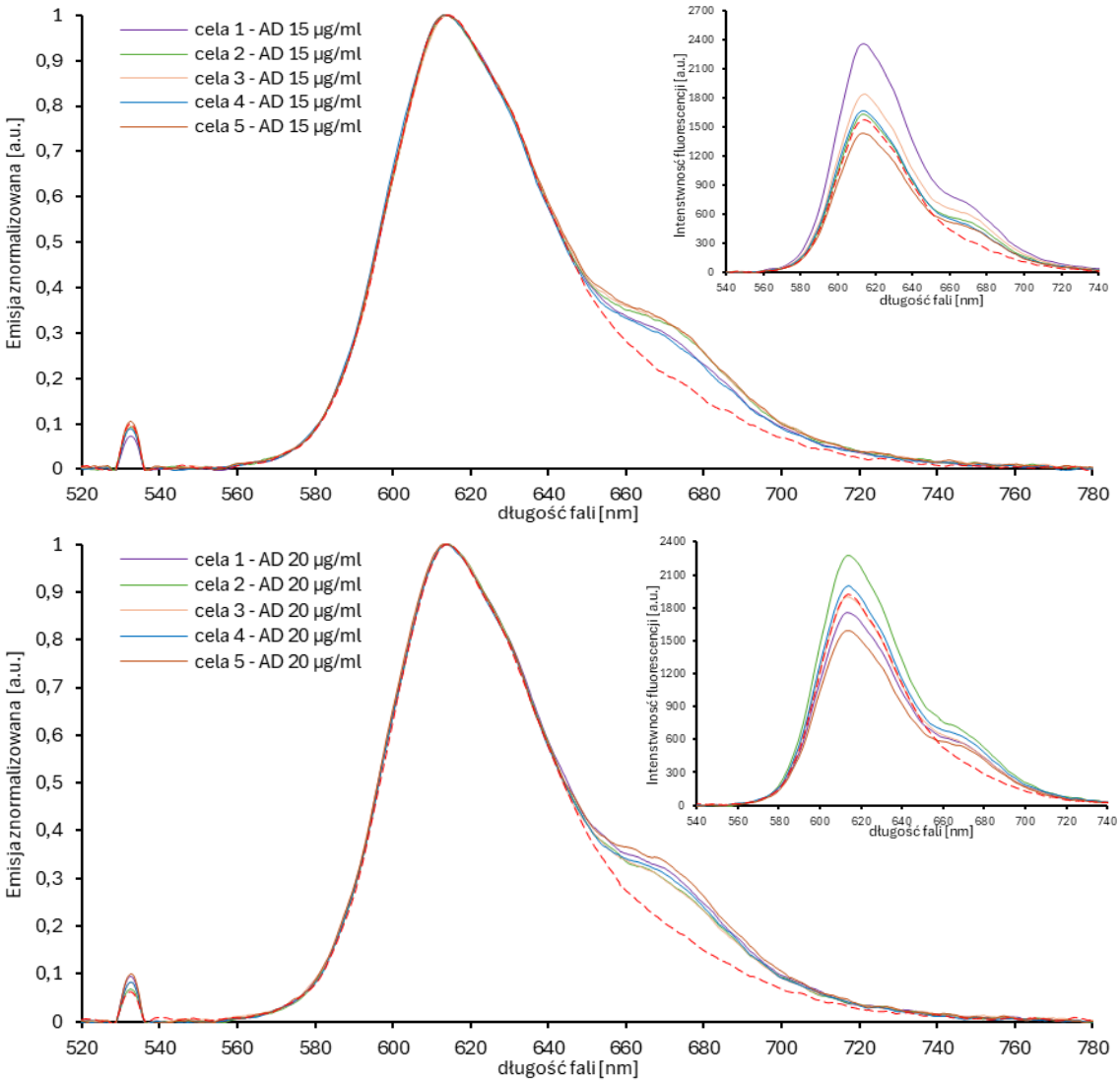
Zmierzone do krzywej kalibracyjnej widma emisji fluorescencji dla wszystkich cel i stężeń przedstawiono zbiorczo na Rysunku 37. Na ich podstawie, obliczono pola pod znormalizowaną krzywą emisji dla każdej celi pomiarowej (AUC_{widmo}), a następnie wartości pola dla samego sygnału pochodzącego od emisji akceptora ($AUC_{sygnał}$). Obliczone wartości przedstawiono w Tabeli 15, w tym również obliczone wartości średnie $AUC_{sygnał}$ dla danego stężenia i odchylenie standardowej wartości średniej, które posłużyły do wyznaczenia krzywej kalibracyjnej testu AD-MEF.




cela 1 - AD 2 µg/ml
cela 2 - AD 2 µg/ml
cela 3 - AD 2 µg/ml
cela 4 - AD 2 µg/ml
cela 5 - AD 2 µg/ml
cela 6 - kontrola
Emisja znormalizowana [a.u.]
długość fali [nm]
Intenstwnosć fluorescencji [a.u.]
długość fali [nm]


cela 1 - AD 5 µg/ml
cela 2 - AD 5 µg/ml
cela 3 - AD 5 µg/ml
cela 4 - AD 5 µg/ml
cela 5 - AD 5 µg/ml
cela 6 - kontrola
Emisja znormalizowana [a.u.]
długość fali [nm]
Intenstwnosć fluorescencji [a.u.]
długość fali [nm]


cela 1 - AD 10 µg/ml
cela 2 - AD 10 µg/ml
cela 3 - AD 10 µg/ml
cela 4 - AD 10 µg/ml
cela 5 - AD 10 µg/ml
Emisja znormalizowana [a.u.]
długość fali [nm]
Intenstwnosć fluorescencji [a.u.]
długość fali [nm]

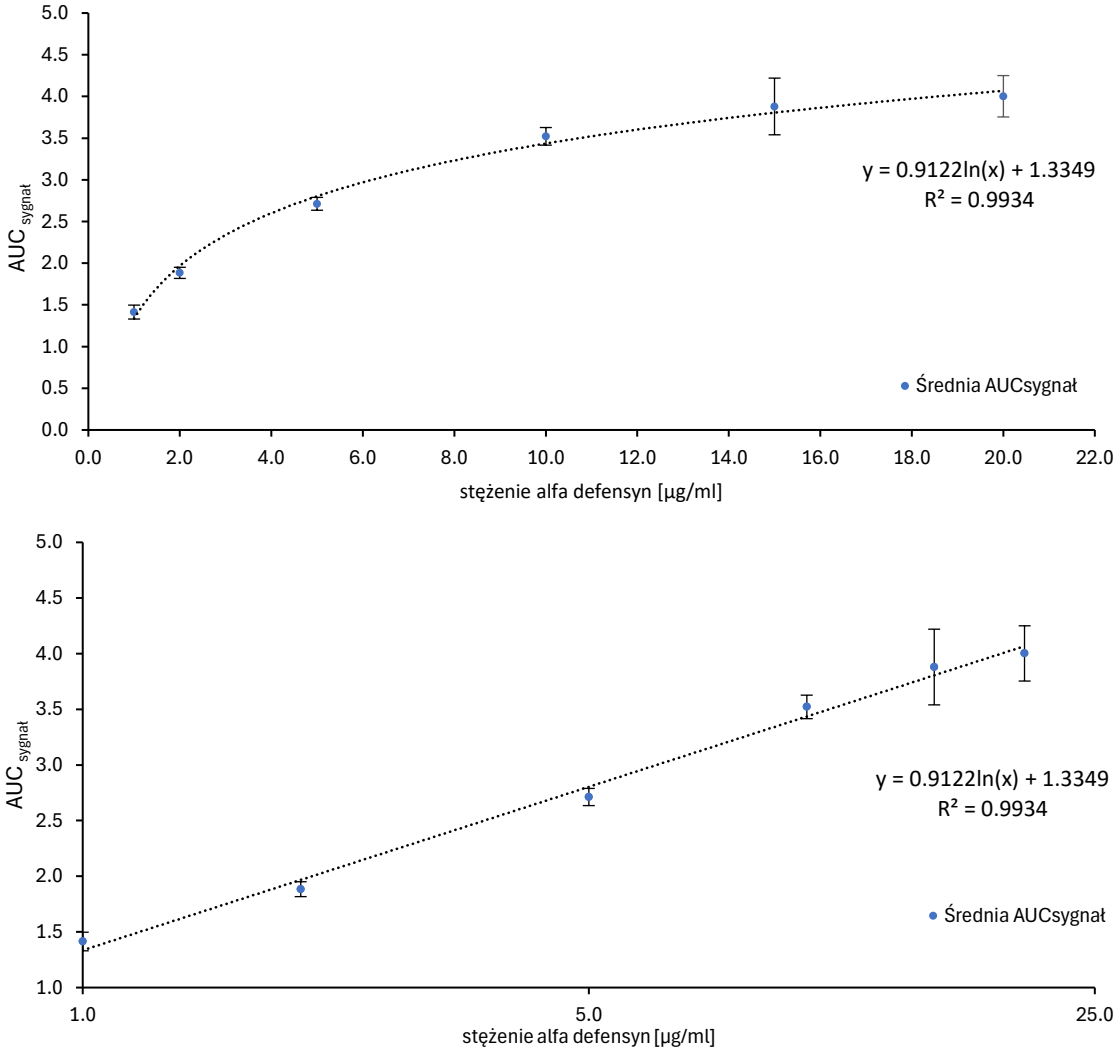


Rysunek 37. Prezentacja wszystkich zmierzonych i znormalizowanych widm emisji fluorescencji z cel pomiarowych przy sześciu stężeniach AD w próbce: 1 µg/ml, 2 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml i 20 µg/ml, oraz z cel kontrolnych (linie przerywane), z sześciu wykorzystanych do badań sensorów, w celu wyznaczenia krzywej kalibracyjnej testu AD-MEF. W rogu każdego wykresu widma emisji przed normalizacją. Opracowanie własne.

			AUC [650-730 nm]			
		IgG594-adef-IgG650	AUC_{widmo}	$AUC_{sygnał}$	Średnia AUCsygnał	Odchylenie std. średniej $S_{\bar{x}}$
Stężenie alfa-defensyn w teście AD-MEF	1 µg/ml	cela 1	11,943	1,468	1,414	0,083
		cela 2	11,699	1,224		
		cela 3	11,685	1,210		
		cela 4	12,082	1,607		
		cela 5	12,035	1,560		
		cela 6 (kontrola)	10,475			
	2 µg/ml	cela 1	12,896	2,056	1,884	0,067
		cela 2	12,82	1,980		
		cela 3	12,689	1,849		
		cela 4	12,502	1,662		
		cela 5	12,713	1,873		
		cela 6 (kontrola)	10,84			
	5 µg/ml	cela 1	13,176	2,436	2,712	0,077
		cela 2	13,561	2,821		
		cela 3	13,388	2,648		
		cela 4	13,562	2,822		
		cela 5	13,573	2,833		
		cela 6 (kontrola)	10,74			
	10 µg/ml	cela 1	14,249	3,331	3,521	0,106
		cela 2	14,347	3,429		
		cela 3	14,438	3,520		
		cela 4	14,319	3,401		
		cela 5	14,844	3,926		
		cela 6 (kontrola)	10,918			
	15 µg/ml	cela 1	14,196	3,207	3,88	0,34
		cela 2	15,308	4,319		
		cela 3	15,404	4,415		
		cela 4	13,901	2,912		
		cela 5	15,535	4,546		
		cela 6 (kontrola)	10,989			
	20 µg/ml	cela 1	15,021	4,270	4,002	0,248
		cela 2	14,334	3,583		
		cela 3	14,248	3,497		
		cela 4	14,574	3,823		
		cela 5	15,588	4,837		
		cela 6 (kontrola)	10,751			

Tabela 15. Obliczone wartość pól pod krzywą z widm emisji fluorescencji do wyznaczenia krzywej kalibracyjnej testu AD-MEF przy różnym stężeniu alfa-defensyn w próbce, oraz z celi kontrolnej. AUC_{widmo}, wartość pola pod krzywą dla danego widma emisji oszacowana w zakresie 650 – 730 nm. $AUC_{sygnał}$ - wartość pola pod krzywą uzyskana przez odjęcie od AUC danego widma, wartości AUC dla celi kontrolnej (bez antygenu). W tabeli podano, obliczoną z pięciu cel pomiarowych średnią wartość $AUC_{sygnał}$ oraz odchylenie standardowe średniej. Opracowanie własne.

Na podstawie wyników przedstawionych w Tabeli 15, przedstawiono graficznie na Wykresach 23, zależność stężenia AD (w µg/ml) od zmierzonego sygnału, w postaci obliczonej wartości średniego pola pod krzywą emisji fluorescencji $AUC_{sygnał}$ dla danego stężenia, z naniesionymi słupkami błędów i logarytmiczną krzywą dopasowania.



Wykres 23. Krzywa kalibracyjna testu AD-MEF. Zależność stężenia AD w próbce, od zmierzonego sygnału ($AUC_{sygnał}$) w dwóch prezentacjach, skali liniowej i wynikającej z przebiegu krzywej dopasowania skali logarytmicznej. $AUC_{sygnał}$ to średnia wartość z pól pod krzywą emisji obliczonych dla poszczególnych cel pomiarowych w określonym stężeniu AD. Słupki błędów naniesiono na podstawie obliczonego odchylenia standardowego średniej z pięciu cel pomiarowych.

Jak wynika z powyższych danych, dla wyższych stężeń 15-20 µg/ml obserwowany jest większy rozrzut wyników niż dla mniejszych, co potwierdza również wartość odchylenia standardowego średniej. Mając na uwadze założenie, że do przeprowadzenia testu wykorzystuje się ocenę obecności AD z pomiarów w pięciu

celach oraz że efekt obserwowany jest dla stężeń dużo wyższych niż stężenie AD pozwalające stwierdzić PJI, można przypuszczać, że nie będzie to miało wpływu na czułość detekcji testu AD-MEF.

Wyznaczone równanie krzywej kalibracyjnej, uzyskane z dopasowania średnich sygnałów detekcji w funkcji stężenia AD w teście AD-MEF, wykorzystywane będzie do oceny ilościowej tych peptydów w płynie stawowym pacjentów, zgodnie z relacją:

$$AUC_{sygnał} = 0{,}9122ln(S_{AD}) + 1{,}3349 \rightarrow S_{AD} = e^{\left(\frac{AUC_{sygnał} - 1{,}3349}{0{,}9122}\right)} \qquad (22)$$

gdzie S_{AD} – to stężenie alfa-defensyn w próbce
$AUC_{sygnał}$ - wartość pola pod krzywą znormalizowanej emisji fluorescencji w zakresie 650 – 730 nm uzyskana przez odjęcie od AUC danego widma badanej próbki, wartości AUC dla celi kontrolnej (bez antygenu).

4.5.Badanie obecności alfa-defensyny w płynie stawowym testami AD-MEF i AD-LF. Ocena wartości predykcyjnej testów

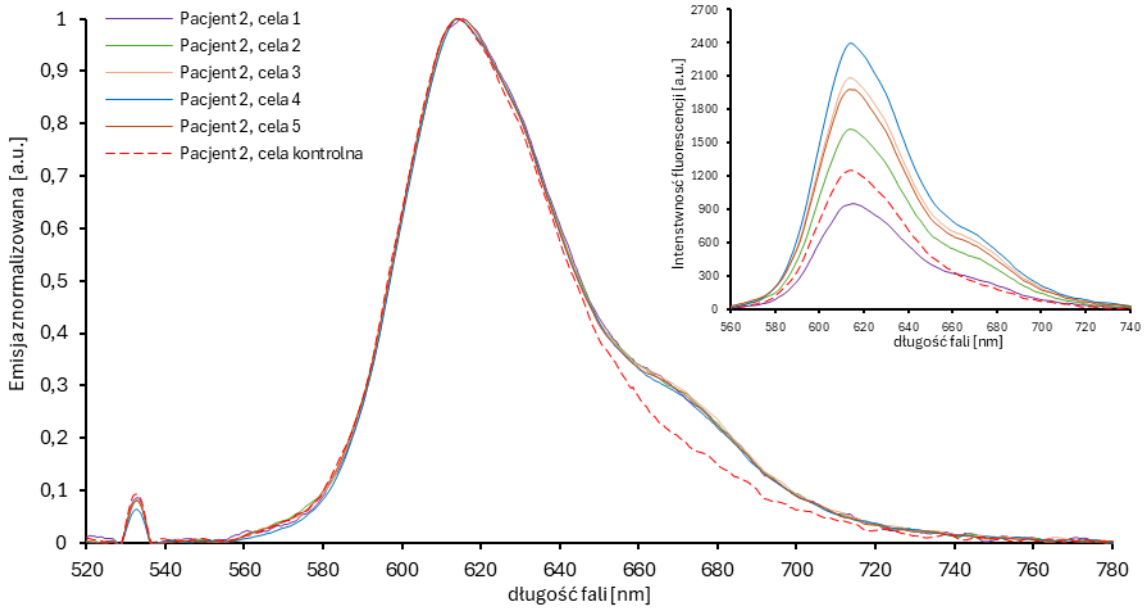
Oceniono obecność AD w płynie stawowym pobranym od 13 pacjentów, za pomocą zaproponowanego w pracy testu AD-MEF, oraz dla 9 pacjentów z wykorzystaniem komercyjnego, medycznego testu immunochromatograficznego Synovasure Alpha Defensin Lateral Flow Test (AD-LF).

Próbki pobrane od pierwszego pacjenta, włączonego do eksperymentu (pacjent nr 1) nie zostały wykorzystane do badań, z uwagi na znaczącą ilość krwi w płynie, nawet po odwirowaniu (pierwsza próbka na Rysunku 33). Czerwona barwa płynu po procesie wirowania i brak supernatantu w próbce, mogą sugerować, że doszło do rozpadu erytrocytów krwi w płynie. Z uwagi na fakt, że znaczące zanieczyszczenie elementami krwi, może wpływać na wyniki testów na obecność alfa-defensyn (Deirmengian, Kardos, Kilmartin, Cameron, Schiller i Parvizi, 2014a; Frangiamore i in., 2016; Zmistowski i in., 2014), próbki pacjenta nr 1 nie były badane.

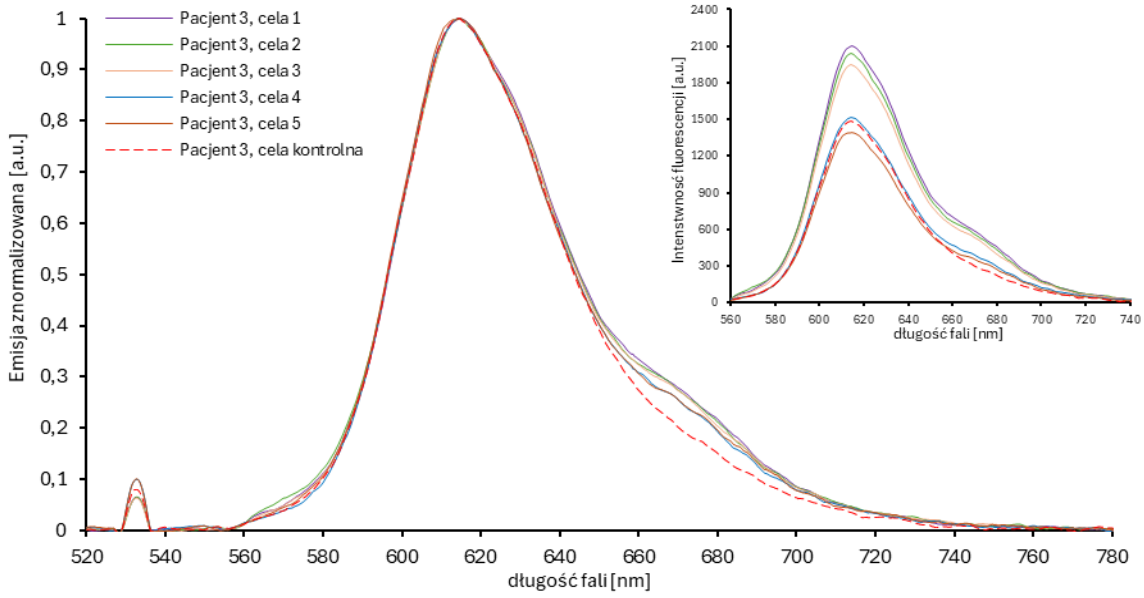
Na wykresach 24 – 36 przedstawiono widma emisji fluorescencji uzyskane z testu AD-MEF dla każdego pacjenta. Na danym sensorze badany był płyn od jednego pacjenta. Stężenie AD określono na podstawie obliczonej wartości $AUC_{sygnał}$, dla każdej z 5 cel pomiarowych, którą podstawiono do równania krzywej kalibracyjnej testu AD-MEF (równanie 22). Z uzyskanych stężeń dla każdej celi, obliczono wartość średnią dla

danego pacjenta i odchylenie standardowe wartości średniej. Wyniki tych obliczeń przestawiono w Tabeli 16.

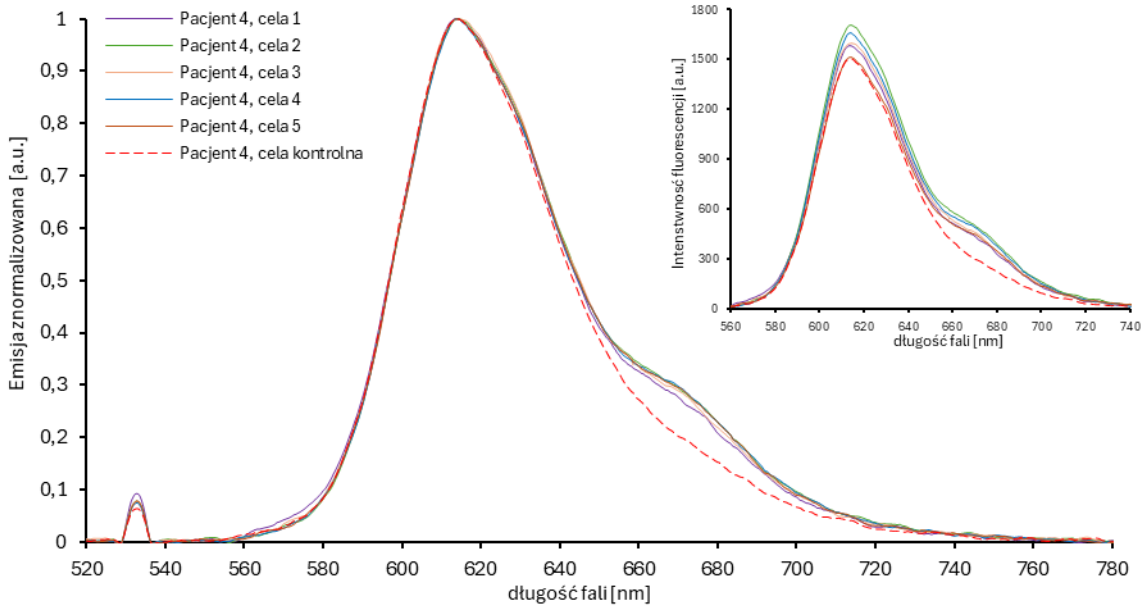
W tych samych sesjach pomiarowych, co test AD-MEF i na tych samych próbkach płynu, wykonano test porównawczy dla 9 pacjentów, wykorzystując w tym celu komercyjny test przepływu bocznego. Wyniki w postaci zdjęć kaset testowych przedstawiono na Rysunku 38.



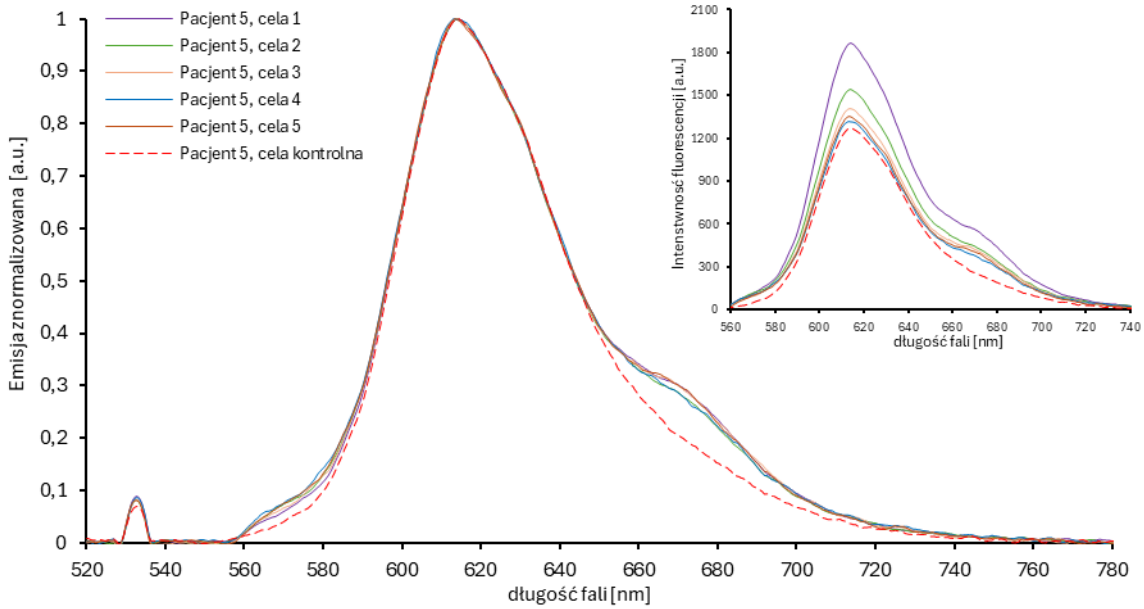
Wykres 24. Zmierzone i znormalizowane widma emisji fluorescencji z testu AD-MEF, dla próbki płynu stawowego pacjenta numer 2. W rogu wykresu widma emisji przed normalizacją. Opracowanie własne.



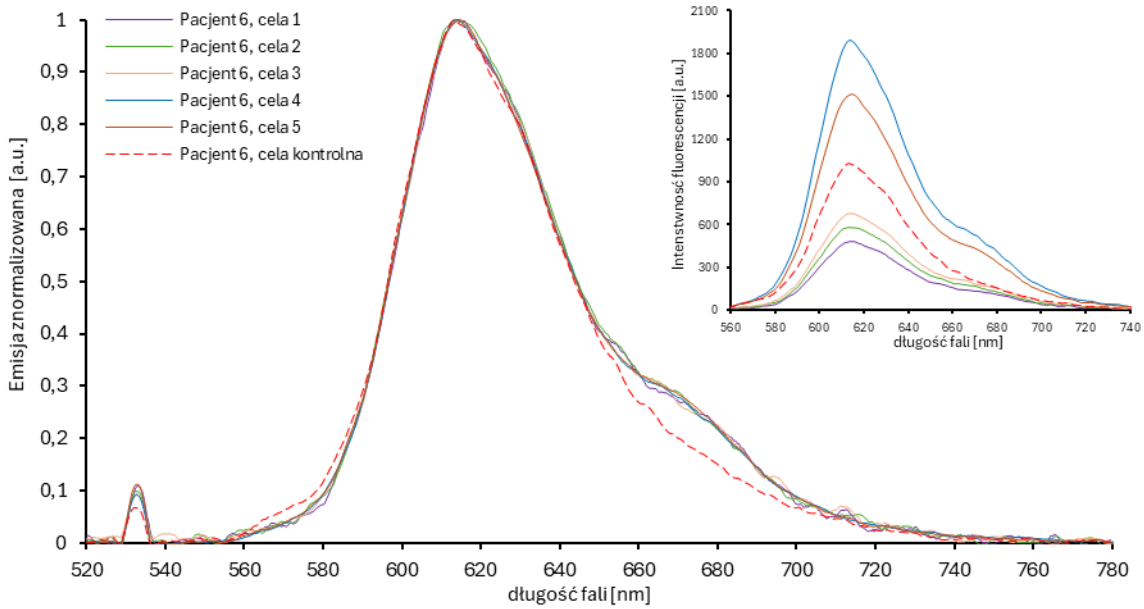
Wykres 25. Zmierzone i znormalizowane widma emisji fluorescencji z testu AD-MEF, dla próbki płynu stawowego pacjenta numer 3. W rogu wykresu widma emisji przed normalizacją. Opracowanie własne.



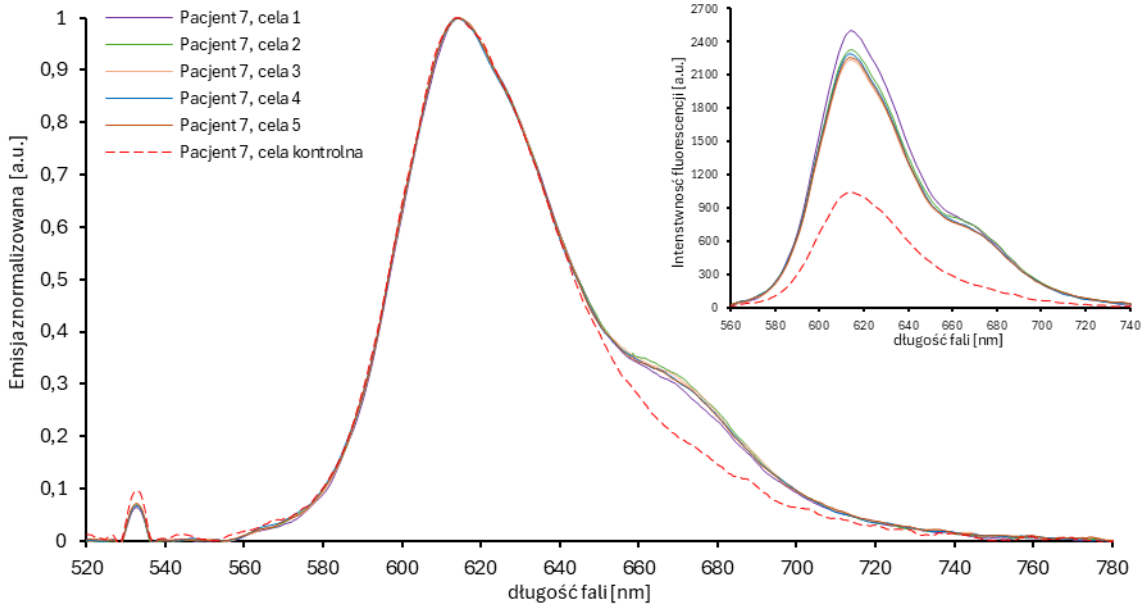
Wykres 26. Zmierzone i znormalizowane widma emisji fluorescencji z testu AD-MEF, dla próbki płynu stawowego pacjenta numer 4. W rogu wykresu widma emisji przed normalizacją. Opracowanie własne.



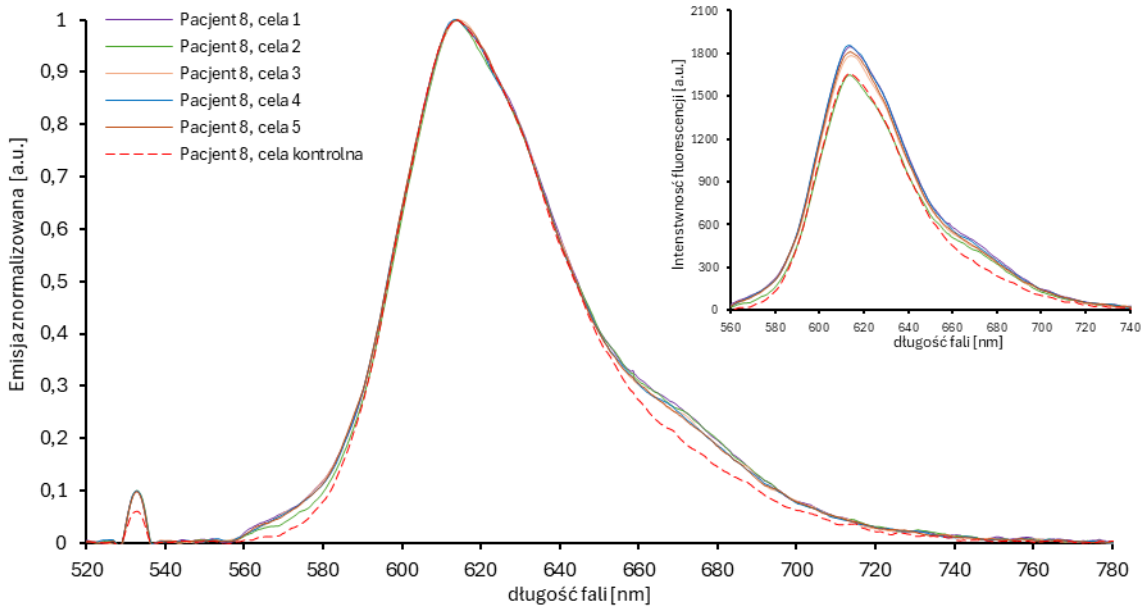
Wykres 27. Zmierzone i znormalizowane widma emisji fluorescencji z testu AD-MEF, dla próbki płynu stawowego pacjenta numer 5. W rogu wykresu widma emisji przed normalizacją. Opracowanie własne.



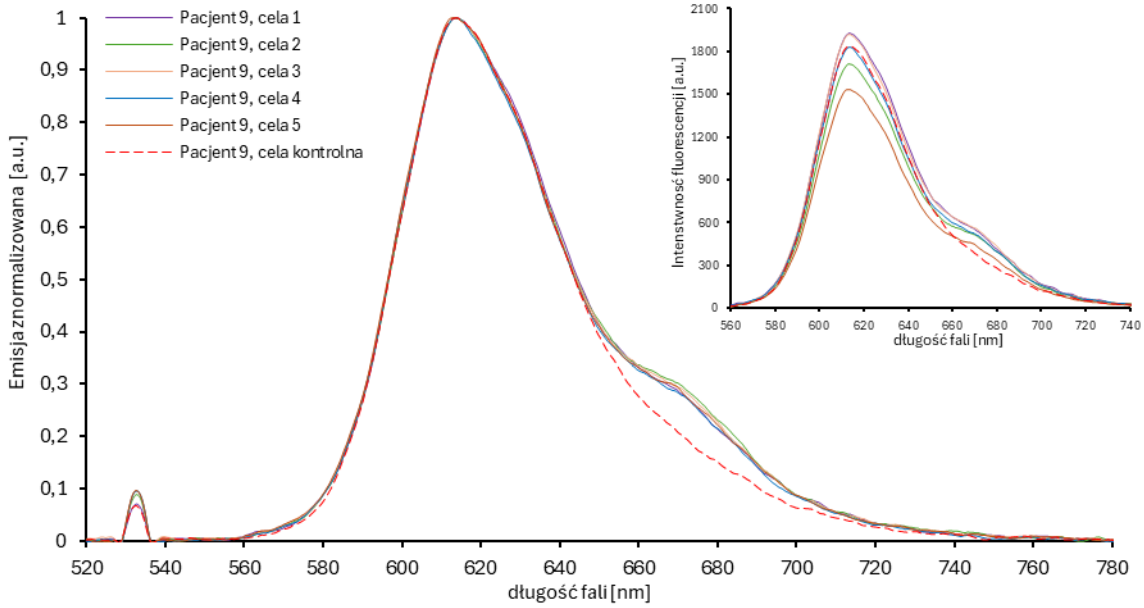
Wykres 28. Zmierzone i znormalizowane widma emisji fluorescencji z testu AD-MEF, dla próbki płynu stawowego pacjenta numer 6. W rogu wykresu widma emisji przed normalizacją. Opracowanie własne.



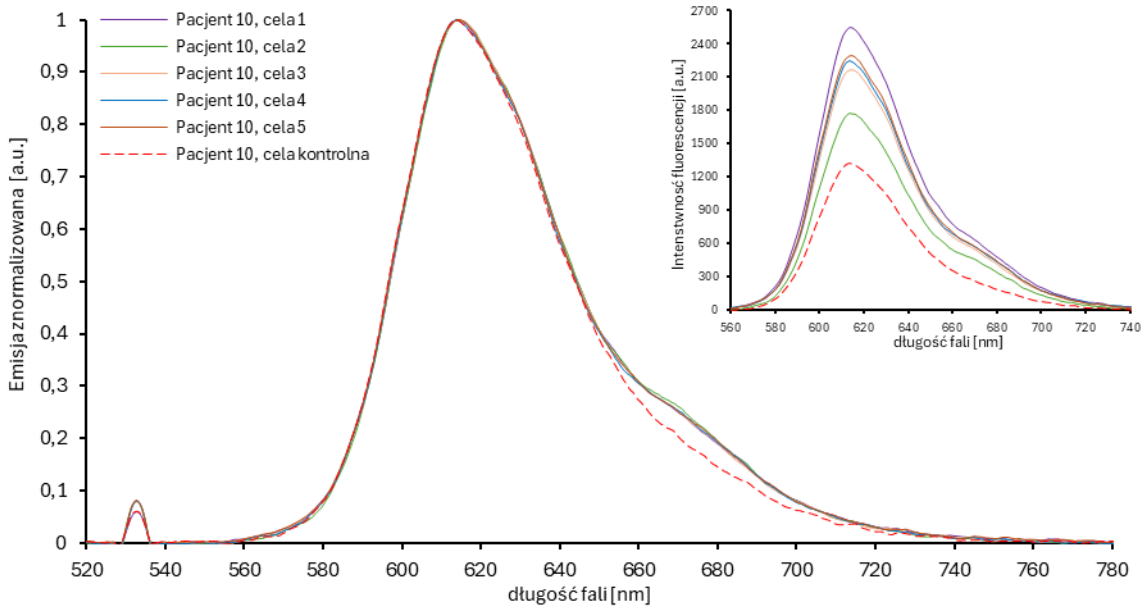
Wykres 29. Zmierzone i znormalizowane widma emisji fluorescencji z testu AD-MEF, dla próbki płynu stawowego pacjenta numer 7. W rogu wykresu widma emisji przed normalizacją. Opracowanie własne.



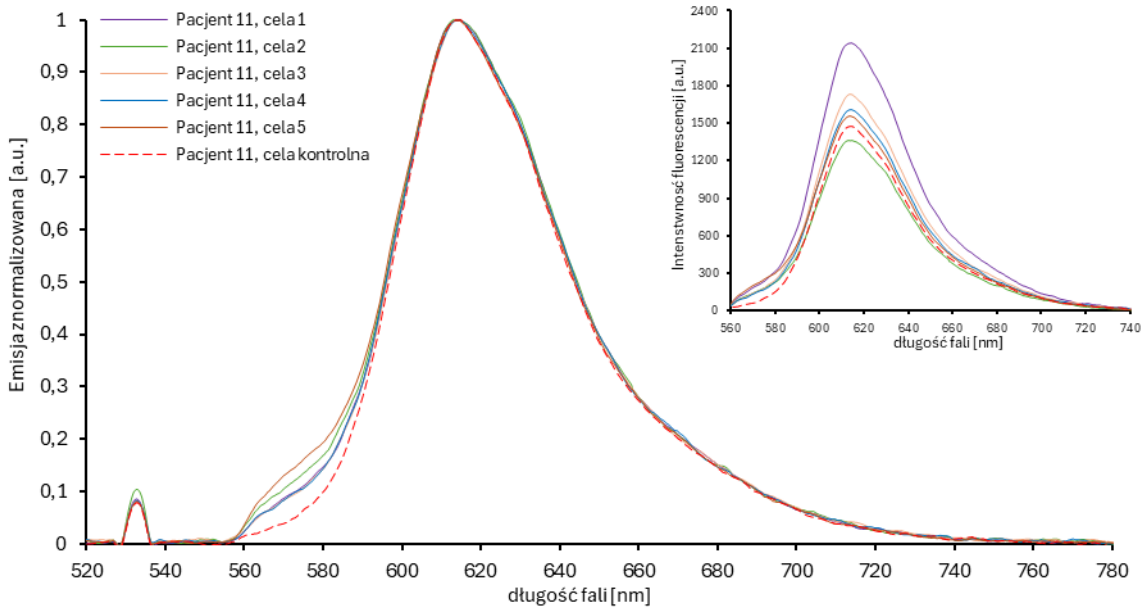
Wykres 30. Zmierzone i znormalizowane widma emisji fluorescencji z testu AD-MEF, dla próbki płynu stawowego pacjenta numer 8. W rogu wykresu widma emisji przed normalizacją. Opracowanie własne.



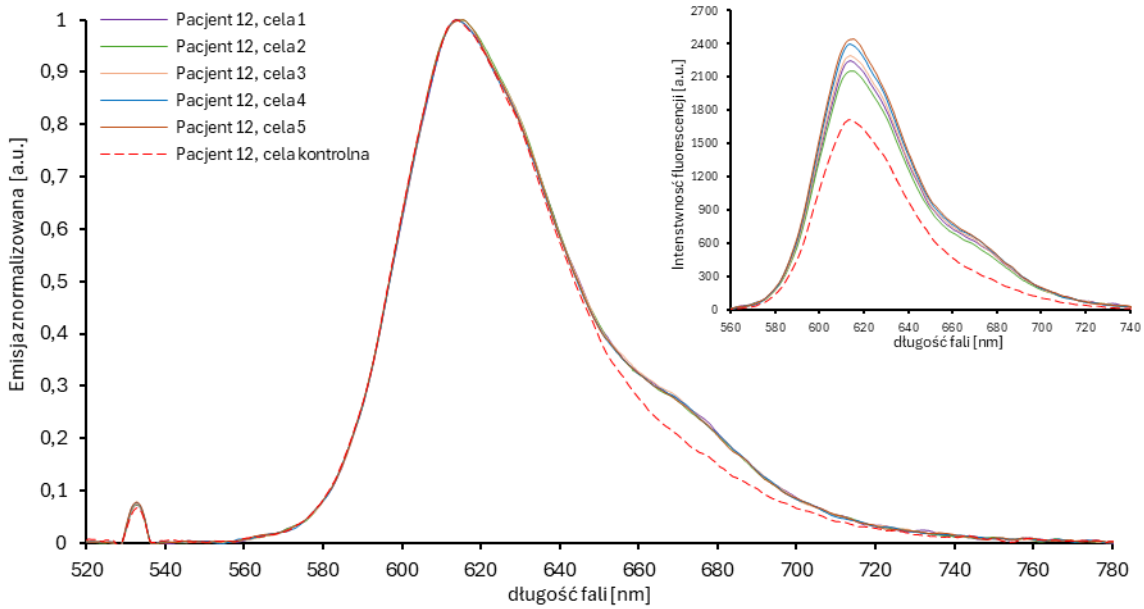
Wykres 31. Zmierzone i znormalizowane widma emisji fluorescencji z testu AD-MEF, dla próbki płynu stawowego pacjenta numer 9. W rogu wykresu widma emisji przed normalizacją. Opracowanie własne.



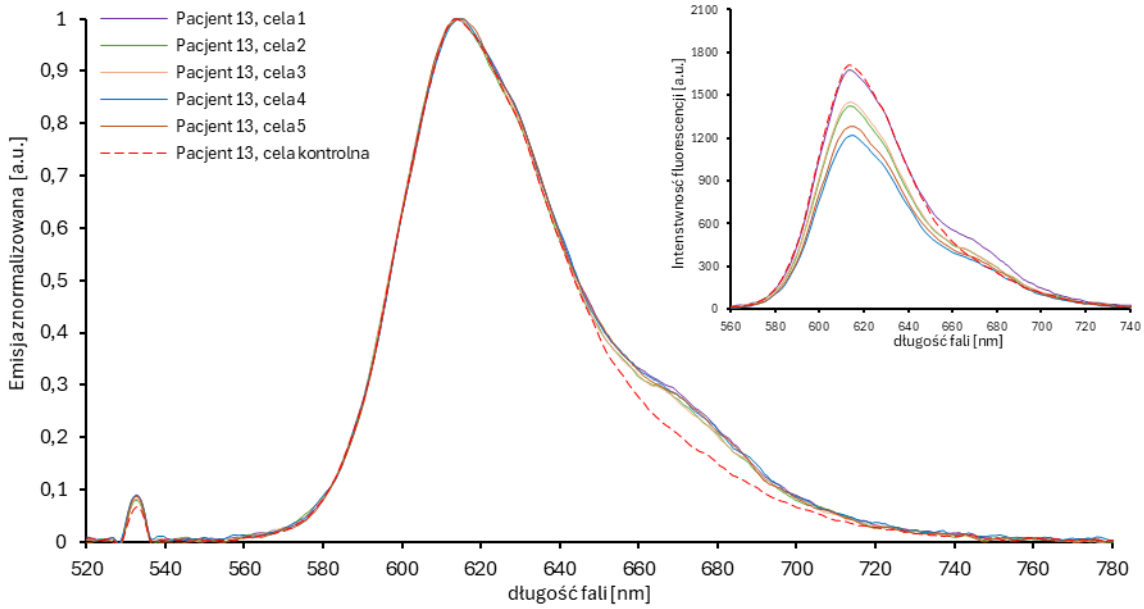
Wykres 32. Zmierzone i znormalizowane widma emisji fluorescencji z testu AD-MEF, dla próbki płynu stawowego pacjenta numer 10. W rogu wykresu widma emisji przed normalizacją. Opracowanie własne.



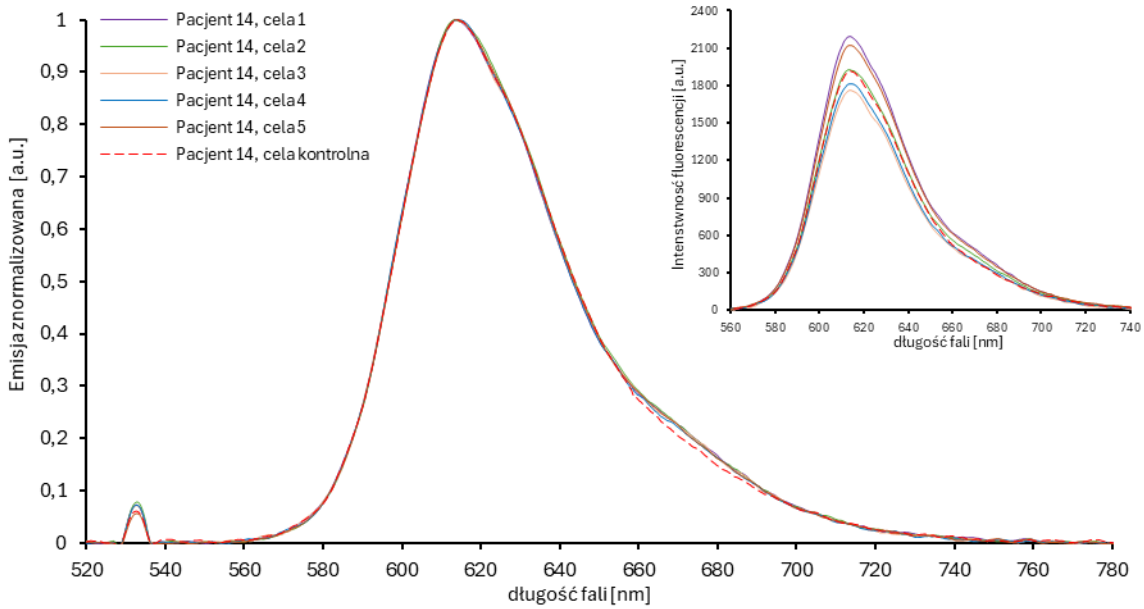
Wykres 33. Zmierzone i znormalizowane widma emisji fluorescencji z testu AD-MEF, dla próbki płynu stawowego pacjenta numer 11. W rogu wykresu widma emisji przed normalizacją. Opracowanie własne.



Wykres 34. Zmierzone i znormalizowane widma emisji fluorescencji z testu AD-MEF, dla próbki płynu stawowego pacjenta numer 12. W rogu wykresu widma emisji przed normalizacją. Opracowanie własne.



Wykres 35. Zmierzone i znormalizowane widma emisji fluorescencji z testu AD-MEF, dla próbki płynu stawowego pacjenta numer 13. W rogu wykresu widma emisji przed normalizacją. Opracowanie własne.



Wykres 36. Zmierzone i znormalizowane widma emisji fluorescencji z testu AD-MEF, dla próbki płynu stawowego pacjenta numer 14. W rogu wykresu widma emisji przed normalizacją. Opracowanie własne.

	pacjent 2			pacjent 3			pacjent 4		
pomiar	AUC_{widmo}	$AUC_{sygnał}$	S_{AD} [µg/ml]	AUC_{widmo}	$AUC_{sygnał}$	S_{AD} [µg/ml]	AUC_{widmo}	$AUC_{sygnał}$	S_{AD} [µg/ml]
cela 1	14,156	3,566	34,6	13,644	3,09	20,6	13,494	2,875	16,2
cela 2	14,117	3,527	33,2	13,421	2,867	16,1	14,295	3,676	39,1
cela 3	14,269	3,679	39,2	13,289	2,735	13,9	13,848	3,229	23,9
cela 4	13,822	3,232	24,0	12,516	1,962	6,0	14,226	3,607	36,2
cela 5	13,948	3,358	27,6	12,604	2,05	6,6	14,166	3,547	33,9
kontrola	10,59			10,554			10,619		
	$\bar{S}_{AD}$	31,7 µg/ml		$\bar{S}_{AD}$	12,6 µg/ml		$\bar{S}_{AD}$	29,9 µg/ml	
	$S_{\bar{S}_{AD}}$	2,7 µg/ml		$S_{\bar{S}_{AD}}$	2,8 µg/ml		$S_{\bar{S}_{AD}}$	4,3 µg/ml	

	pacjent 5			pacjent 6			pacjent 7		
pomiar	AUC_{widmo}	$AUC_{sygnał}$	S_{AD} [µg/ml]	AUC_{widmo}	$AUC_{sygnał}$	S_{AD} [µg/ml]	AUC_{widmo}	$AUC_{sygnał}$	S_{AD} [µg/ml]
cela 1	14,301	3,415	29,4	13,522	2,924	17,1	14,131	3,546	33,9
cela 2	13,84	2,954	17,7	13,763	3,165	22,3	14,836	4,251	73,4
cela 3	14,294	3,408	29,1	13,632	3,034	19,3	14,73	4,145	65,4
cela 4	13,997	3,111	21,0	13,412	2,814	15,2	14,481	3,896	49,8
cela 5	14,244	3,358	27,6	13,608	3,01	18,8	14,535	3,95	52,8
kontrola	10,886			10,598			10,585		
	$\bar{S}_{AD}$	25,0 µg/ml		$\bar{S}_{AD}$	18,6 µg/ml		$\bar{S}_{AD}$	55,1 µg/ml	
	$S_{\bar{S}_{AD}}$	2,4 µg/ml		$S_{\bar{S}_{AD}}$	1,2 µg/ml		$S_{\bar{S}_{AD}}$	6,8 µg/ml	

	pacjent 8			pacjent 9			pacjent 10		
pomiar	AUC_{widmo}	$AUC_{sygnał}$	S_{AD} [µg/ml]	AUC_{widmo}	$AUC_{sygnał}$	S_{AD} [µg/ml]	AUC_{widmo}	$AUC_{sygnał}$	S_{AD} [µg/ml]
cela 1	12,758	2,34	9,0	13,692	2,897	16,6	12,564	2,115	7,1
cela 2	12,641	2,223	7,9	14,247	3,452	30,6	12,615	2,166	7,5
cela 3	12,336	1,918	5,7	13,922	3,127	21,4	12,331	1,882	5,5
cela 4	12,258	1,84	5,2	13,553	2,758	14,3	12,443	1,994	6,2
cela 5	12,255	1,837	5,2	13,736	2,941	17,5	12,486	2,037	6,5
kontrola	10,418			10,795			10,449		
	$\bar{S}_{AD}$	6,6 µg/ml		$\bar{S}_{AD}$	20,1 µg/ml		$\bar{S}_{AD}$	6,5 µg/ml	
	$S_{\bar{S}_{AD}}$	0,8 µg/ml		$S_{\bar{S}_{AD}}$	2,9 µg/ml		$S_{\bar{S}_{AD}}$	0,3 µg/ml	

	pacjent 11			pacjent 12			pacjent 13		
pomiar	AUC_{widmo}	$AUC_{sygnał}$	S_{AD} [µg/ml]	AUC_{widmo}	$AUC_{sygnał}$	S_{AD} [µg/ml]	AUC_{widmo}	$AUC_{sygnał}$	S_{AD} [µg/ml]
cela 1	10,811	0,285	0,95	13,402	2,797	14,9	13,716	3,107	20,9
cela 2	10,761	0,235	0,90	13,247	2,642	12,6	13,105	2,496	10,7
cela 3	10,867	0,341	1,01	13,353	2,748	14,1	13,053	2,444	10,1
cela 4	10,818	0,292	0,96	13,213	2,608	12,1	13,56	2,951	17,6
cela 5	10,58	0,054	0,74	13,13	2,525	11,1	13,419	2,81	15,1
kontrola	10,526			10,605			10,609		
	$\bar{S}_{AD}$	0,91 µg/ml		$\bar{S}_{AD}$	13,0 µg/ml		$\bar{S}_{AD}$	14,9 µg/ml	
	$S_{\overline{S_{AD}}}$	0,05 µg/ml		$S_{\overline{S_{AD}}}$	0,7 µg/ml		$S_{\overline{S_{AD}}}$	2,1 µg/ml	

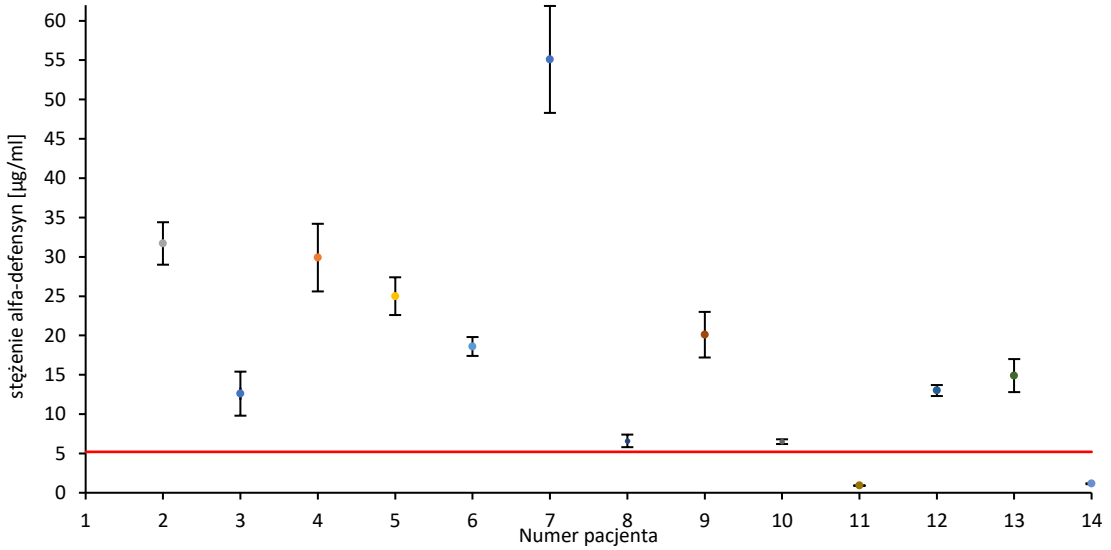
	pacjent 14		
pomiar	AUC_{widmo}	$AUC_{sygnał}$	S_{AD} [µg/ml]
cela 1	11,241	0,49	1,19
cela 2	11,343	0,592	1,33
cela 3	11,192	0,441	1,13
cela 4	11,027	0,276	0,94
cela 5	11,242	0,491	1,19
kontrola	10,751		
	$\bar{S}_{AD}$	1,15 µg/ml	
	$S_{\overline{S_{AD}}}$	0,06 µg/ml	

Tabela 16. Wyniki testu AD-MEF dla próbek płynu stadowego pobranego od 13 pacjentów (pacjenci od 2 do 14). W tabelach wyniki obliczonych na podstawie widm emisji fluorescencji uzyskanych w teście, wartości pól pod krzywą widm AUC_{widmo}, skorygowanych o sygnał z celi kontrolnej wartości $AUC_{sygnał}$, na podstawie, której obliczono stężenie AD w danej celi pomiarowej S_{AD}. Z pięciu cel testu, dla danego pacjenta określono wartość średnią stężenia AD $\bar{S}_{AD}$, oraz odchylenie standardowe od wartości średniej $S_{\overline{S_{AD}}}$.

Na podstawie wyników w Tabeli 16 oraz kształtów widm, zauważalne są zróżnicowane wartości stężeń z poszczególnych cel dla wyższych stężeń AD w próbce od danego pacjenta. Dla próbek, w których wyrywane stężenia były niższe, uzyskiwano bardziej powtarzalne kształty widm między celami danej próbki i niskie wartości odchylnia standardowego wartości średniej, co można zauważyć na podstawie wyników dla pacjentów 11 (0,91 ± 0,05 µg/ml) i 14 (1,15 ± 0,06 µg/ml). Powtarzalne wyniki dla wszystkich 5 cel na jednym sensorze, były również przy niektórych wyższych stężeniach u pacjentów 6 (18,6 ± 1,2 µg/ml), 10 (6,5 ± 0,3 µg/ml) czy 12 (13 ± 0,7 µg/ml). Natomiast w przypadku pacjentów 4 lub 7 obserwowano większe różnice, między poziomami wykrytych stężeń AD w poszczególnych celach, co w efekcie skutkowało wyższymi wartościami odchyleń standardowych średniej. Obserwacja ta nie wynika z różnego wzmocnienia sygnału przez warstwę nanosrebra lub jakości obsadzeń powierzchni cel przeciwciałami wychwytującymi, ponieważ byłaby widoczna również przy niższych stężeniach AD. Wydaje się zatem, że jest to efekt oddziaływań między wychwyconą AD a przeciwciałami potwierdzającymi. Może mieć to związek z występowaniem zjawiska prozony (tzw. efektu haka). Jest to fałszywie negatywna

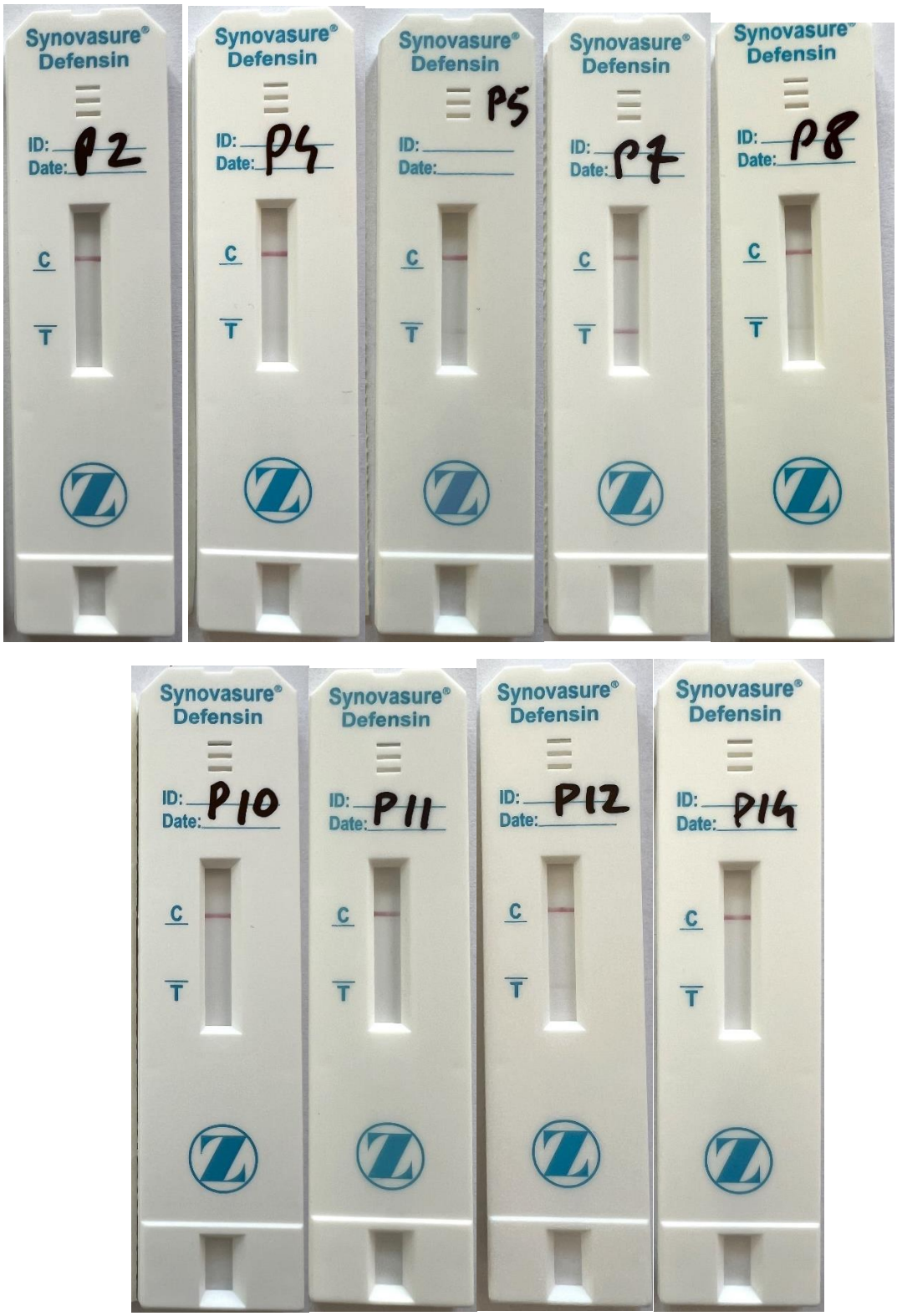
odpowiedź, która występuje w testach immunologicznych, w wyniku nadmiaru antygenu lub przeciwciała, prowadząca do zaburzenia zdolności tworzenia przez przeciwciała kompleksów immunologicznych (Hoofnagle i Wener, 2009). Jeśli w teście, ilość antygenu (AD) jest większa niż ilość przeciwciała potwierdzającego, przeciwciało nie zwiąże się prawidłowo z antygenem, prowadząc do fałszywego, ujemnego wyniku testu lub do zaniżonych wyników. Może to tłumaczyć fakt uzyskiwania zaniżonych wyników w niektórych celach tego samego pacjenta. Podobne efekty zróżnicowanych wyników dla wyższych stężeń między celami obserwowano w teście AD-MEF dla czystej formy AD w buforze fosforanowym, przy wyznaczaniu krzywej kalibracji testu. Jak podkreślano wówczas, ocena w teście nie odbywa się na podstawie jednego pomiaru, z jednej celi, a jest wynikiem analizy stężenia z pięciu cel pomiarowych, co w znaczący sposób redukuje przypadkowość detekcji. Opisane zjawisko można ograniczyć, stosując większe rozcieńczenie próbki, tym samym zmniejszając ilość antygenu. W przypadku uzyskania wyniku na granicy progu decyzji o pozytywnym lub negatywnym wyniku można dzięki pomiarom krzywej kalibracyjnej dla niskich stężeń, powtórzyć test dla większego rozcieńczenia płynu. Gdy te różnicowania występują dla oznaczeń wysokich stężeń, wyższych niż próg decyzji o wyniku testu, konieczność taka wydaje się niepotrzebna, ponieważ nie wpłynie na końcową ocenę wyniku testu.

Oceniając wyniki oznaczeń stężenia alfa-defensyn w teście AD-MEF, założono na podstawie badań i progu odcięcia testu AD-ELISA, że uzyskanie stężenia AD w próbce płynu stawowego powyżej 5,2 μg/ml, oznacza pozytywny wynik testu w kierunku zakażenia okołoprotezowego. Na Wykresie 37 przedstawiono średnie wartości stężenia AD dla wszystkich zbadanych próbek pacjentów, z zaznaczonym progiem decyzyjności o wyniku testu (5,2 μg/ml). Za pomocą testu AD-MEF, stwierdzono na podstawie obecności alfa-defensyn w płynie stawowym pozytywny wynik testu dla pacjentów 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, natomiast negatywny dla pacjentów 11 i 14.



Wykres 37. Średnie stężenia alfa-defensyn wykrywanych w teście AD-MEF dla grupy 13 pacjentów włączonych do badania. Na wykresie naniesiono średnie stężenia AD dla danego pacjenta, z zaznaczonymi słupkami błędów, na podstawie obliczonego odchylenia standardowego średniej z pięciu cel pomiarowych.

Ocenę testu przepływu bocznego Synovasure Alpha Defensin Lateral Flow Test wykonano zgodnie z instrukcją dołączoną do zestawu, która wskazuje, że za wynik pozytywny należy uznać pojawienie się dwóch czerwonych linii na części kontrolnej (C) i testowej (T), widocznych w całej szerokości paska testowego, niezależnie od intensywności ich barwy. Natomiast za wynik negatywny testu należy uznać sytuację, w której na kasecie widoczna jest jedyna linia w części kontrolnej (Zimmer Biomet, 2024a). Jak pokazano na Rysunku 38, bardzo wyraźne dwie linie (kontrolna i testowa) są łatwo rozpoznawalne na kasecie testowej pacjenta 7, pozostałe testy pozytywne mają bardzo słabo widoczną linię testową. Jednak przy uważnej, wizualnej ocenie testu, można dostrzec pełną linię o słabej intensywności w części testowej i zgodnie z instrukcją testu, należało je uznać na pozytywne. W przypadku 3 testów wyraźnie nie było widać linii testowej. Wszystkie 9 testów było ważnych, ponieważ na każdym pojawiła się linia w części kontrolnej. Test wskazał pozytywny wynik dla pacjentów 2, 4, 5, 7, 8, 12, natomiast negatywny 10, 11, 14.



Rysunek 38. Zdjęcia kaset wykonanych testów na obecność AD w płynie stawowym Synovasure Alpha Defensin Lateral Flow Test. Wyraźny pozytywny wynik testu dla pacjenta 7 (widoczne, wyraźne obie linie kontrolna i testowa), testy pacjentów 2, 4, 5, 8, 12, zostały uznane za pozytywne, pomimo słabej intensywności linii testowej. Brak paska testowego na kasetach pacjentów 10, 11 i 14, co oznacza wynik negatywny testu dla tych pacjentów.

Porównując testy AD-MEF z AD-LF, dla 9 wspólnych pacjentów, w przypadku 8 uzyskano te same wyniki. Pacjenci 2, 4, 5, 7, 8, 12 w obu testach uzyskali pozytywny wynik oceny obecności alfa-defensyn w płynie stawowym w diagnostyce zakażeń okołoprotezowych. Pacjenci 11 i 14 w obu testach uzyskali wyniki negatywne. Dla pacjenta 10 w teście AD-MEF oceniono stężenie alfa-defensyn na poziomie 6,5 ± 0,3 µg/ml (wynik pozytywny), natomiast wynik testu AD-LF dla tej samej próbki był ujemny.

Jak podkreślano we wstępie, wyniki badań nad przydatnością diagnostyczną testu AD-LF wykazały, że może on charakteryzować się wysoką, ponad 94% czułością i swoistością w diagnostyce PJI, a jego wynik nie odbiega od analiz wykonywanych na testach AD-ELISA (Deirmengian, Madigan i in., 2020). Z drugiej strony inne badania oparte na metaanalizach, zbierające wyniki wielu różnych badań, wykazywały niższą czułość testu AD-LF 71%, w stosunku do AD-ELISA 96%, sugerując, że z uwagi na poziom wiarygodności ujemnego wyniku tego testu, można go wykonywać w celu potwierdzenia, a nie do wykluczenia zakażenia (Eriksson i in., 2018). Wioski z tych badań potwierdzili autorzy innej metaanalizy, uznając, że negatywny wynik testu AD-LF, nie powinien być stosowany jako jedyny wskaźnik wykluczający zakażenie okołoprotezowe (Marson i in., 2018). Ponadto jak wynika z dokumentu złożonego przez producenta w ramach procedury walidacji testu medycznego w amerykańskiej agencji FDA (ang. U.S. Food and Drug Administration), przy stężeniu alfa-defensyn 6,1 µg/ml za pomocą testu uzyskano 49,2% pozytywnych wyników, by dopiero przy stężeniach na poziomie 10,7 µg/ml, test wykazywał w 93% przypadków pozytywny wynik, jak pokazano na Rysunku 39 (FDA, 2024).

Concentration (µg/mL)	% Positive	95% Confidence Interval	% Negative	95% Confidence Interval
0	0% (0/118)	0-3.1%	100%	97.0-100%
2.2	0% (0/120)	0-3%	100%	97.0-100%
4.3	5% (6/120)	1.9-10.6%	95.0%	89.4-98.1%
4.8	8.3% (10/120)	4.1-14.8%	91.7%	85.2-95.9%
5.4	11.7% (14/120)	6.5-18.8%	88.3%	81.2-93.5%
6.1	49.2% (59/120)	39.9-58.5%	50.8%	41.6-60.1%
8.9	77.5% (93/120)	69.0-84.6%	22.5%	15.4-31.0%
10.7	93.3% (112/120)	87.3-97.1%	6.7%	2.9-12.7%
11.9	93.3% (112/120)	87.3-97.1%	6.7%	2.9-12.7%
12.2	92.5% (111/120)	86.2-96.5%	7.5%	3.5-13.8%
13	96.7% (116/120)	91.7-99.1%	3.3%	0.9-8.31%

Rysunek 39. Tabela limitu detekcji AD dla komercyjnego testu Synovasure Alpha Defensin Lateral Flow Test, załączona przez producenta do oceny wiarygodności testu w Agencji Żywności i Leków, U.S. FDA. Opracowane na podstawie (FDA, 2024).

Dlatego też wynik negatywny dla testu AD-LF w próbce pacjenta 10 jest prawdopodobny, pomimo a może przede wszystkim dlatego, że oszacowane w teście AD-MEF stężenie alfa-defensyn wyniosło zaledwie 6,5 µg/ml. Taka ilość alfa-defensyny, dla testu AD-LF daje pozytywny wynik w około 50% wykonanych testów (Rysunek 39). Natomiast wynik testu AD-MEF przy tym poziomie detekcji można uznać za pozytywny, na podstawie wartości odcięcia komercyjnego testu AD-ELISA. Sytuacja nie powtórzyła się w przypadku pacjenta numer 8, u którego test AD-MEF wykazał podobne stężenie alfa defensyn 6,5 µg/ml, natomiast test AD-FL pokazał w tym przypadku wynik pozytywy. Świadczy to o większej dokładności analitycznej zaproponowanego w pracy testu AD-MEF, w stosunku do testu AD-LF. Warto odnotować dla formalności, że 8 z 9 testów AD-LF pochodziło z jednej serii (taki sam numer LOT), natomiast jeden (test pacjenta 10) był z innej serii. Powyższa obserwacja nie powinna mieć wpływu na ocenę wyniku, ponieważ testy, jakie przedstawił producent, a których wyniki zaprezentowano na Rysunku 39, były wykonywane na 3 różnych seriach testów. Ponadto powtarzalność wyników testów AD-LF dla różnych serii również była oceniana przy dopuszczeniu ich do sprzedaży na rynku Stanów Zjednoczonych Ameryki Północnej i jest zawarta w raporcie dla FDA.

Pacjentom, których próbki badane były testami AD-MEF i AD-LF, wykonywano w szpitalach standardowe badania laboratoryjne, w celu potwierdzenia lub wykluczenia PJI. Każdorazowo badania zlecane były przez lekarzy prowadzących, zgodnie z kryteriami diagnostycznymi opisanymi w konsensusie ICM 2018 oraz ich wiedzą i doświadczeniem. Na podstawie wyników lekarze stawiali diagnozę i decydowali o dalszym toku leczenia. Zebrane dane z badań laboratoryjnych i oceny lekarskie przestawiono w Tabelach 17 i 18. Zgodnie z kryteriami ICM 2018 spełnienie jednego z dwóch kryteriów głównych świadczy o infekcji. W przeciwnym wypadku, w ocenie PJI, należy kierować się kryteriami pomocniczymi.

Jak wynika z przedstawionych badań diagnostycznych, jedynie część pacjentów miała wykonaną diagnostykę przedoperacyjną. Przyczyną tego była wstępna decyzja o kwalifikacji do zabiegu. Dla pacjentów 5, 6, 7, 11 i 14 konieczność wykonania ponownej operacji wynikała z podejrzenia złego funkcjonowania samej endoprotezy. Przyczyną tego stanu były problemy mechaniczne oraz obluzowania i zwichnięcia endoprotez. Była to zatem grupa przypadków aseptycznych, w których pierwotnie lekarze nie podejrzewali infekcji okołoprotezowej. Dopiero w trakcie zabiegu, na

podstawie oceny barwy płynu stawowego, czy obecności w nim ropnej wydzieliny, lekarze wykonywali diagnostykę w kierunku PJI. Przykłady pacjentów 6, 7 i 14 pokazują, że wstępna kwalifikacja przypadku jako aseptycznego może, w wyniku przeprowadzonej diagnostyki śródoperacyjnej, doprowadzić do stwierdzenia zakażenia okołoprotezowego, jak był w przypadku pacjentów 6 i 7, lub skomplikować postawienie właściwej diagnozy, z uwagi na niejasny wynik badań diagnostycznych, co miało miejsce u pacjenta 14. Jak wynika z kryteriów ICM 2018, uzyskanie pozytywnego posiewu z próbki pobranej śródoperacyjnie nie jest wystarczające do stwierdzenia zakażenia. W przypadku pacjenta 14 wykonano podczas zabiegu szybki test PCR Biofire Joint Infection Panel, służący do identyfikacji bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich w próbce płynu stawowego. Wynik tego testu był negatywny. Natomiast po wysłaniu materiału na posiew do laboratorium, zidentyfikowano gronkowca w materiale śródoperacyjnym. W tym przypadku połącznie wyniku jednego posiewu śródoperacyjnego z jednym markerem PJI oznaczonym przed zabiegiem (oceną stężenia CPR w surowicy), nie dało podstaw do stwierdzenia PJI u pacjenta 14. W efekcie wynik jego diagnostyki był nierozstrzygnięty, chociaż zgodnie z decyzją lekarza, podczas zabiegu wykonano czyszczenie powierzchni endoprotezy w zabiegu rewizji jednoetapowej.

Drugą grupą pacjentów, którym oznaczono jedynie część markerów PJI w diagnostyce przedoperacyjnej były podejrzenia wczesnych infekcji. Występują one w krótkim czasie od pierwotnego zabiegu endoprotezoplastyki. W tym przypadku, pacjenci decyzją lekarzy, kierowali byli na pilne zabiegi operacyjne, w celu oczyszczenia powierzchni implantu i oceny PJI w kryteriach śródoperacyjnych. Jak wynika z Tabeli 17 i 18, powszechnie stosowanym przez lekarzy kryterium był posiew, czyli próba mikrobiologicznej identyfikacji patogenu. To badanie było najczęściej wykonywane zarówno przed zabiegiem, jak i w ocenie śródoperacyjnej. W niektórych przypadkach przy pobraniach materiału w trakcie operacji wykonywane były tzw. homogenaty tkankowe. Z pobranych tkanek i płynu stawowego tworzono homogenat i dopiero tak przygotowany materiał wysyłano na przedłużoną hodowlę, w celu zwiększenia czułości wyniku posiewu.

W niektórych przypadkach ograniczeniem w możliwości wykonania dodatkowych badań była mała ilość płynu pobranego przed zabiegiem. W przypadku stawów kolanowych ilość płynu w jego okolicy jest z reguły duża, a sama punkcja

stosunkowo łatwa do przeprowadzenia. Natomiast w endoprotezach stawów biodrowych, prawidłową punkcję można wykonać głównie pod kontrolą USG, a uzyskana ilość płynu stawowego pozwala na zlecenie jedynie części badań. Zakres badań przedoperacyjnych był również uzależniony od samej decyzji o wykonaniu zabiegu rewizyjnego. Jak podkreślali lekarze, jeśli zapadła decyzja o reoperacji, na podstawie wyraźnych objawów wczesnej infekcji lub problemów mechanicznych z endoprotezą, fakt wykonania dodatkowych oznaczeń przed zabiegiem nie wypływał na decyzję o podjęciu interwencji chirurgicznej. Zakładano bowiem, że w warunkach zabiegowych przy swobodnym dostępie do endoprotezy, można pobrać próbki do badań śródoperacyjnych, o ile zajdzie podejrzenie infekcji.

W żadnym z wymienionych przypadków nie wykonano w szpitalu testu na obecność alfa-defensyn w płynie stawowym, ponieważ głównym ograniczeniem w jego stosowaniu są wysokie koszty zakupu testów AD-LF. Materiał pobrany śródoperacyjnie nie był również oceniany histopatologicznie, z uwagi na brak możliwości wykonania takiego oznaczenia w obu współpracujących w ramach badania szpitalach.

Podejmowanie próby izolacji tego samego patogenu z co najmniej dwóch różnych próbek w diagnostyce przedoperacyjnej, w celu spełnienia kryterium głównego, również było utrudnione. Często izolację patogenu uzyskiwano dopiero w drugiej lub trzeciej próbce wysłanej na posiew. Przykładem takich problemów może być przypadek pacjentki 3. Nie spełniono u niej kryterium głównego, ponieważ przy trzech próbach uzyskania pozytywnego wyniku posiewu, potwierdzenie otrzymano z jednej, w dodatku ostatniej. Natomiast skrupulatnie przeprowadzona diagnostyka przedoperacyjna, pozwoliła na potwierdzenie PJI na podstawie kryteriów pomocniczych, o czym świadczy uzyskanie 8 pkt, na 6 wymaganych, w ocenie zgodnie z ICM 2018.

Na podstawie analizowanej w pracy małej grupy 13 pacjentów, wydaje się właściwe by dla każdego pacjenta z podejrzeniem septycznego lub aseptycznego problemu z endoprotezą, zlecana była diagnostyka w pełnym panelu badań określonych w zaleceniach ICM 2018 dla PJI. Oznaczenie wielu markerów PJI daje możliwość dokładniejszej oceny ryzyka występowania infekcji, zanim pacjent zostanie skierowany na zabieg. To pozwoli na uniknięcie niespodziewanych sytuacji w trakcie operacji, a w przypadku jasnego podejrzenia infekcji, wcześniejsze przygotowanie zabiegu i pobranie odpowiedniego materiału do badań śródoperacyjnych.

		Pacjent 2	Pacjent 3	Pacjent 4	Pacjent 5	Pacjent 6	Pacjent 7
	Wiek [lata]	65	85	50	83	70	67
	Płeć	Kobieta	Kobieta	Kobieta	Kobieta	Kobieta	Mężczyzna
	Endoproteza stawu	kolanowego	kolanowego	biodrowego	biodrowego	ramiennego	biodrowego
		Kryteria diagnostyki zakażeń okołoprotezowych wg. ICM 2018					
kryteria główne (dowolne - infekcja)	1.Obecność przetoki komunikującej się z protezą	Nie	Nie	Tak	Nie	Nie	Nie
	2. Wyizolowanie tego samego patogenu w posiewie z co najmniej dwóch różnych próbek	Jeden posiew: citrobacter koseri	Jeden posiew: enterobacter cloacae, morganella morganii, staphylococcus capitis	Dwukrotny posiew: staphylococcus epidermidis MR	Jeden posiew: ujemny	brak badania podejrzenie aseptycznego problemu z endoprotezą	brak badania podejrzenie aseptycznego problemu z endoprotezą
kryteria pomocnicze przedoperacyjne Decyzja: ≥6 – infekcja 2-5 – możliwa infekcja 0-1 – brak infekcji	Krew / osocze:						
	3. CRP > 10 mg/l w surowicy – 2pkt	21,80	19,56	82,00	51,70	32,00	29,00
	4. OB > 30 mm/h – 1pkt	-	35	-	-	-	-
	Płyn stawowy:						
	5. Poziom leukocytów > 3000 kom./µl lub leukocyte esterase (++) – 3pkt	brak prawidłowego wyniku	54797	mała ilość płynu do oznaczeń	-	-	-
	6. Pozytywny test na obecność α-defensyn – 3pkt	-	-	-	-	-	-
	7. Odsetek granulocytów w rozmazie płynu stawowego > 80 % – 2pkt	95	96,1	-	-	-	-
	8. CRP > 6,9 mg/l – 1pkt	11,50	11,14	-	-	-	-
kryteria pomocnicze śródoperacyjne Decyzja: ≥6 – infekcja 4-5 - nierozstrzygający ≤ 3 – brak infekcji	9. ilość punktów z etapu diagnostyki przedoperacyjnej	5	9	2	2	2	2
	10. Pozytywny wynik histologiczny: 5 i więcej neutrofili w 5 i więcej polu widzenia mikroskopu o powiększeniu x 400 w badaniu tkanki okołoprotezowej) – 3pkt	-	-	-	-	-	-
	11. Obecność ropnej wydzieliny – 3pkt	Tak	-	Nie	Nie	Tak	Tak
	12. Dodatni wynik posiewu – 2pkt	Tak: citrobacter koseri	-	Tak: staphylococcus epidermidis MR	Negatywny posiew płynu i homogenatu	Tak: płyn - staphylococcus epidermidis MR, homogenat - staphylococcus aurelus MR, staphylococcus capitis MR	Tak: staphylococcus aureus MR
	13. Suma punktów z diagnostyki przed i pooperacyjnej	8	9	4	2	7	7
	Ocena na podstawie	Kryteria pomocnicze: 8 pkt.	Kryteria pomocnicze: 9 pkt.	Spełnione dwa kryteria główne	Kryteria główne i pomocnicze - brak infekcji	Kryteria pomocnicze: 7 pkt.	Kryteria pomocnicze: 7 pkt.
	Uwagi:	stany podgorączkowe od kilku dni przed pobraniem	-	-	zabieg z powodu podejrzenia powikłań mechanicznych	zabieg z powodu zwichnięcia endoprotezy	zabieg z powodu zwichnięcia endoprotezy
	Diagnoza	PJI	PJI	PJI	Brak PJI	PJI	PJI

Tabela 17. Kliniczna ocena występowania PJI u pacjentów nr 2-7 na podstawie badań diagnostycznych oraz kryteriów ICM 2018 r. Opracowanie własne.

		Pacjent 8	Pacjent 9	Pacjent 10	Pacjent 11	Pacjent 12	Pacjent 13	Pacjent 14
	Wiek [lata]	76	75	70	71	60	70	67
	Płeć	Kobieta	Mężczyzna	Mężczyzna	Kobieta	Kobieta	Mężczyzna	Mężczyzna
	Endoproteza stawu	biodrowego	biodrowego	biodrowego	biodrowego	ramiennego	biodrowego	biodrowego
	Kryteria diagnostyki zakażeń okołoprotezowych wg. ICM 2018							
kryteria główne (dowolne - infekcja)	1.Obecność przetoki komunikującej się z protezą	Nie	Nie	Tak	Nie	Nie	Nie	Nie
	2. Wyizolowanie tego samego patogenu w posiewie z co najmniej dwóch różnych próbek	brak możliwości pobrania płynu	brak badania, wczesne objawy infekcji skierowany na pilny zabieg	brak badania, wczesne objawy infekcji skierowany na pilny zabieg	brak badania podejrzenie aseptycznego problemu z endoprotezą	Trzykrotny posiew: staphylococcus epidermidis MR	Dwukrotny posiew: staphylococcus aureus MS	brak badania podejrzenie aseptycznego problemu z endoprotezą
kryteria pomocnicze przedoperacyjne Decyzja: ≥6 – infekcja 2-5 – możliwa infekcja 0-1 – brak infekcji	Krew / osocze:							
	3. CRP > 10 mg/l w surowicy – 2pkt	10,70	47,60	41,90	2,30	100,9	169,00	124,20
	4. OB > 30 mm/h – 1pkt	-	-	-	-	102	-	-
	Płyn stawowy:							
	5. Poziom leukocytów > 3000 kom./µl lub leukocyte esterase (++) – 3pkt	-	leukocyte esterase (+)	-	-	-	-	-
	6. Pozytywny test na obecność α-defensyn – 3pkt	-	-	-	-	-	-	-
	7. Odsetek granulocytów w rozmazie płynu stawowego > 80 % – 2pkt	-	92	-	-	98	-	-
	8. CRP > 6,9 mg/l – 1pkt	-	16,7	-	-	46,5	-	-
kryteria pomocnicze śródoperacyjne Decyzja: ≥6 – infekcja 4-5 - nierozstrzygający ≤ 3 – brak infekcji	9. ilość punktów z etapu diagnostyki przedoperacyjnej	2	5	2	0	6	2	2
	10. Pozytywny wynik histologiczny: 5 i więcej neutrofili w 5 i więcej polu widzenia mikroskopu o powiększeniu x 400 w badaniu tkanki okołoprotezowej) – 3pkt	-	-	-	-	-	-	-
	11. Obecność ropnej wydzieliny – 3pkt	Tak	Tak	Tak	Nie	-	-	Nie
	12. Dodatni wynik posiewu – 2pkt	Tak: staphylococcus epidermidis MR	Tak: staphylococcus lugdunensis MS, VT,	Tak: enterococcus faecalis HLAR	negatywny	-	-	Tak: staphylococcus epidermidis MR
	13. Suma punktów z diagnostyki przed i pooperacyjnej	7	8	7	0	6	2	4
	Ocena na podstawie	Kryteria pomocnicze: 7 pkt.	Kryteria pomocnicze: 8 pkt.	Jedno kryterium główne, kryteria pomocnicze: 8 pkt.	Kryteria główne i pomocnicze - brak infekcji	Jedno kryterium główne, kryteria pomocnicze: 6 pkt.	Jedno kryterium główne	Kryteria pomocnicze: 4 pkt.
	Uwagi:	zabieg z powodu przewlekłego bólu oraz osteolizy wokół trzpienia endoprotezy	gorączka, decyzja o pilnym zabiegu rewizyjnym	gorączka, decyzja o pilnym zabiegu rewizyjnym	zabieg z powodu obluzowania endoprotezy	pacjentka nie wyraziła zgody na zabieg, brak diagnostyki śródoperacyjnej	pacjent nie wyraził zgody na zabieg, brak diagnostyki śródoperacyjnej	zabieg z powodu zwichnięcia endoprotezy, gorączka
	Diagnoza	PJI	PJI	PJI	Brak PJI	PJI	PJI	Nierozstrzygnięty

Tabela 18. Kliniczna ocena występowania PJI u pacjentów nr 8-14 na podstawie badań diagnostycznych oraz kryteriów ICM 2018 r. Opracowanie własne.

Wyniki obu testów na obecność AD w płynie stawowym porównano z diagnozą lekarską, postawioną na podstawie badań laboratoryjnych. Podsumowanie wyników testów AD-MEF i AD-LF oraz oceny klinicznej występowania PJI przedstawiono w Tabeli 19. Na podstawie decyzji klinicznej określono ilość prawdziwie dodatnich, prawdziwie ujemnych, fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych wyników obu testów na obecność AD. Oceniono czułość i swoistość poszczególnych testów oraz dodatnią i ujemną wartość predykcyjną zgodnie z równaniami (18-21).

Pacjent	Diagnoza (szpital)	Wynik testu na obecność AD w płynie stawowym			
		AD-MEF		AD-LF	
		wynik testu	zdolność testu	wynik testu	zdolność testu
2	PJI	pozytywy (31,7 µg/ml)	PD	pozytywny	PD
3	PJI	pozytywy (12,6 µg/ml)	PD	nie wykonano	
4	PJI	pozytywy (29,9 µg/ml)	PD	pozytywny	PD
5	brak infekcji	pozytywy (25 µg/ml)	FD	pozytywny	FD
6	PJI	pozytywy (18,6 µg/ml)	PD	nie wykonano	
7	PJI	pozytywy (55,1 µg/ml)	PD	pozytywny	PD
8	PJI	pozytywy (6,6 µg/ml)	PD	pozytywny	PD
9	PJI	pozytywy (20,1 µg/ml)	PD	nie wykonano	
10	PJI	pozytywy (6,5 µg/ml)	PD	negatywny	FU
11	brak infekcji	negatywny (0,91 µg/ml)	PU	negatywny	PU
12	PJI	pozytywy (13 µg/ml)	PD	pozytywny	PD
13	PJI	pozytywy (14,9 µg/ml)	PD	nie wykonano	
14	Nierozstrzygnięty	negatywny (1,15 µg/ml)	x	negatywny	x

Tabela 19. Podsumowanie wyników testów na obecność alfa-defensyn w badanej grupie 13 pacjentów z oceną kliniczną występowania PJI. W tabeli określono, na podstawie diagnozy, parametry do oceny zdolności predykcyjnej testów: PD – wynik prawdziwie dodatni, FD – wynik fałszywie dodatni, PU – wynik prawdziwie ujemny, FU – wynik fałszywie ujemny, x- nieokreślona zdolność testu z uwagi na nierozstrzygniętą diagnozę.

Dla testu AD-MEF wykonano 13 analiz, w których 10 wyników było prawdziwie dodatnich (PD), 1 prawdziwie ujemny (PU), 1 fałszywie dodatni (FD) i jeden nierozstrzygnięty. Wyłączając nierozstrzygnięty ostatni wynik, czułość i swoistość testu AD-MEF, wynosiła odpowiednio 100% i 50%, dodatnia i ujemna wartość predykcyjna wyniosły odpowiednio: 91% i 100%.

W przypadku komercyjnego testu immunochromatograficznego na obecność AD w płynie stawowym (AD-LF), wykonano 9 analiz, w tym jedną, której wyniku nie można porównać z nierozstrzygniętą diagnozą. Dla pozostałych ośmiu uzyskano: 5 wyników prawdziwie dodatnich (PD), 1 fałszywie dodatni (FD), 1 prawdziwie ujemny (PU) i 1 fałszywie ujemny (FU). W przypadku AD-FL czułość testu wyniosła 83%, swoistość 50%, dodatnia i ujemna wartość predykcyjna odpowiednio: 83% i 50%.

Oba testy wykazały wysoką przydatność w diagnostyce PJI. Wyższą czułość, czyli większe prawdopodobieństwo wykrycia PJI, wykazał test AD-MEF w stosunku do AD-LF (100% vs. 83%). Zaproponowany w badaniach test miał również wysoką dodatnią i ujemną zdolność predykcyjną (AD-MEF 91% i 100% vs. AD-LF 83%, 50%), które w większym stopniu niż czułość i swoistość charakteryzują zdolność testu do rozpoznania (lub wykluczenia) PJI. Określają bowiem szansę, że dany pacjent, dla którego wykonany zostanie test, rzeczywiście ma PJI, przy określonej trafności testu (czułości i swoistości).

Na ocenę swoistość obu testów, którą szacowana jest na podstawie wyników prawdziwie ujemnych i fałszywie dodatnich, wpływ miały jedynie dwa przypadki pacjentów z negatywną oceną kliniczną PJI. W przypadku pacjenta 11 negatywny wynik oceny klinicznej potwierdziły oba testy na obecność AD i był to jedyny prawdziwie ujemny wynik w grupie badanych pacjentów. Dla pacjenta 5 wynik obu testów na obecność AD wykazały występowanie infekcji, natomiast ocena kliniczna nie dała podstaw do stwierdzenia PJI. Z tego powodu w obliczeniu swoistości testów barany był pod uwagę jeden przypadek PU oraz jeden FD, co zgodnie z definicją swoistości (PU/[PU+FD]x100%) skutkowało szacunkiem na poziomie 50%. Analizując przypadek pacjentki 5, można zauważyć, że należała do grupy pacjentów zakwalifikowanych do zabiegu bez podejrzeń infekcji. Miała wykonane jedynie oznaczenie CRP w surowicy, powyżej kryterium PJI i jeden ujemny posiew przed zabiegiem. W płynie stawowym podczas zabiegu zaobserwowano podejrzanie mętną treść, jednak bez ropnej wydzieliny i z tego powodu pobrano sam płyn stawowy oraz w drugiej próbce płyn z materiałem tkankowym (homogenat), które w posiewie dały wynik negatywny. Na podstawie jedynie negatywnych posiewów uznano w szpitalu, że przypadek jest aseptyczny i taką diagnozę pozostawiono w ocenie testów. W obu testach na obecność AD uzyskano wyniki pozytywne pod kątem infekcji. Z historii choroby pacjentki wynika, że przebieg pooperacyjny był niejednoznaczny. Po zabiegu utrzymywały się podwyższone poziomy CRP w surowicy, jednocześnie pacjentka

zmagała się z zakażeniem układu moczowego. Zastosowana z tego powodu przewlekła antybiotykoterapia, mogła maskować objawy PJI. Z tego powodu przy kolejnych kontrolach i utrzymującym się wysokim stężeniu CRP, lekarze zasugerowali wykonanie ponownego zabiegu. Pacjentka nie wyraziła zgody i zrezygnowała z wizyt kontrolnych. Chociaż wynik testów AD uznano za fałszywie dodatni, możliwe jest, że to wyniki posiewów były fałszywie ujemne, co uprawdopodabniają badania pokazujące, że czułość posiewu jest zróżnicowana i waha się od 45% do 100% (Tsitko i in., 2022). Gdyby na etapie wstępnej diagnostyki pacjentka miała wykonany test na obecność AD jego wynik mógłby dać sygnał lekarzom do zlecenia szerszego zakresu badań diagnostycznych. To z kolei wpłynęłoby na większą dokładność postawionej diagnozy. Fakt, że pacjentka nie poddała się dalszemu leczeniu i z tego powodu nie była pod stałą opieką lekarską, również nie pozwala na wyjaśnienie przyczyn różnej oceny tego przypadku.

Natomiast przypadek pacjenta 14, z uwagi na negatywny wynik obu testów na obecność AD w płynie stawowym, należy uznać za nierozstrzygnięty. Jak podkreślano wielokrotnie w pracy, dla testów na obecność AD ich negatywny wynik w diagnostyce PJI nie powinien wykluczać infekcji i w takiej sytuacji należy rozszerzyć badania o inne markety, w celu potwierdzenia braku infekcji. W przypadku tego pacjenta zlecono za mało badań, ograniczając się jedynie do posiewu śródoperacyjnego i oceny CRP z surowicy.

Ocena wartości predykcyjnej testów na obecność AD w płynie stawowym w diagnostyce PJI jest wysoka. Zaproponowany w pracy test jest porównywalny z komercyjnym testem AD-LF. W przypadku próbek o małym stężeniu AD w płynie stawowym test AD-MEF był bardziej czuły niż test immunochromatograficzny. Dodatkową zaletą testu AD-MEF jest ocena ilościowa stężenia AD w próbce, co eliminuje subiektywny odczyt wyniku z testu przepływu bocznego. Jak pokazano na Rysunku 38, ocena pojawienia się czerwionej linii na pasku testowym nie jest oczywista. Wybarwienie linii w tym obszarze jest często słabo widoczne i wymaga dużego skupienia, w celu właściwej kwalifikacji wyniku testu. Szacuje się, że koszt wytworzenia pojedynczego sensowa dla testu AD-MEF może być pięciokrotnie niższy, niż cena zakupu jednego testu AD-LF. Daje to duży potencjał komercjalizacji metody, a w konsekwencji możliwość obniżenia kosztów wytwarzania sensorów do testów.

5. Wnioski

1. Zastosowanie nanocząstek srebra do wzmocnienia emisji fluorescencji, umożliwiło uzyskanie wysokich współczynników wzmocnienia sygnałów detekcji. Nanowyspy srebra, syntetyzowane na powierzchni sensora, wykazały specyficzne właściwości poprawiające fotostabilność fluoroforu w niewielkiej odległości od metalu. Wykorzystana w badaniach metoda syntezy chemicznej pozwoliła na uzyskanie nanowysp srebra o powtarzalnej charakterystyce widmowej, co wpłynęło na stabilność detekcji sensora.
2. Użyte w sensorze specyficzne przeciwciała przeciwko badanym alfa-defensynom pozwoliły na selektywną detekcję antygenu w układzie dwóch przeciwciał: wychwytujących i potwierdzających, wyznakowanych fluoroforami. Badania charakterystyki widmowej fluoroforów związanych z białkami wykazały, że proces znakowania przeciwciał nie jest dla nich obojętny. Występujące przesunięcia widm absorpcji i emisji oraz zmiany wydajności kwantowych fluoroforów po związaniu z białkami, należy uwzględniać w projektowaniu biosensorów opartych na zjawisku bezpromienistego transferu energii.
3. Zaproponowany układ pomiarowy do detekcji emisji fluorescencji z biosensora, oparty na miniaturowym spektrometrze, komercyjnym źródle światła i układzie selektywnego wzbudzenia próbki w zjawisku TIRF, zapewnia szybki pomiar próbki i możliwość pracy z układem poza laboratorium badawczym. Jego prosta konstrukcja, oparta na niedrogich komponentach, stwarza możliwość dalszych modyfikacji, które mogą prowadzić do zminiaturyzowania całego układu w przyszłości.
4. Badania wykazały, że biosensor skutecznie wykrywa alfa-defensyny w szerokim zakresie stężeń od 1 µg/ml do 112 µg/ml, co pozwoliło na wyznaczenie krzywej kalibracyjnej testu AD-MEF do oceny ilościowej antygenu. Analiza płynu stawowego pobranego od pacjentów potwierdziła zdolność testu do selektywnego wykrywania i precyzyjnej oceny ilościowej AD w próbkach o złożonym składzie biologicznym. Test wymaga pobrania jedynie około 42 µl płynu stawowego, a dzięki wcześniejszemu przygotowaniu sensora, wynik można uzyskać w ciągu 2,5 godziny od pobrania próbki. Daje to możliwość wykonania szybkiej diagnostyki przedoperacyjnej pacjentów z podejrzeniem infekcji. Sama detekcja nie wymaga

stosowania długotrwałych procedur pomiarowych, a analiza zebranych widm emisji fluorescencji pozwala na natychmiastowe otrzymanie wyniku.

5. Walidacja poprawności detekcji alfa-defensyn w płynie stawowym w teście AD-MEF, poprzez porównanie wyników z oceną tych samych próbek za pomocą medycznego testu immunochromatograficznego, pozwoliła na stwierdzenie, że zaproponowany test jest co najmniej równoważny komercyjnemu, a w przypadku niższych stężeń antygenu, wykazuje przewagę nad powszechnie dostępnym testem. Dodatkową zaletą zaproponowanego testu jest szacowany pięciokrotnie niższy koszt analizy próbki pacjenta, w stosunku do ceny komercyjnego testu przepływu bocznego.
6. Porównanie oceny występowania zakażenia okołoprotezowego z wynikami testów na obecność alfa-defensyn w płynie stawowym wykazało, że marker ten ma duży potencjał predykcyjny w diagnostyce PJI. Fakt ten potwierdzają liczne badania naukowe oraz włączenie testu na obecność alfa-defensyn do standardów diagnostyki PJI (ICM 2018 i EBJIS 2017). Powszechne oznaczanie tego markera w płynie stawowym może wpłynąć na dokładniejsze rozróżnienie najczęściej występujących powikłań związanych z aseptycznym obluzowaniem endoprotezy od rzadszych, ale bardziej skomplikowanych w leczeniu, przypadków septycznych, wywołanych infekcją okołoprotezową.

6. Bibliografia

Abdo, R. C. T., Gobbi, R. G., Leite, C. B. G., Pasoto, S. G., Leon, E. P., Lima, A. L. L. M., Bonfa, E., Pécora, J. R., & Demange, M. K. (2022). Quantitative alpha-defensin testing: Is synovial fluid dilution important? *World Journal of Orthopedics*, *13*(8), 760–767. https://doi.org/10.5312/wjo.v13.i8.760

Aboelfetoh, E. F., El-Shenody, R. A., & Ghobara, M. M. (2017). Eco-friendly synthesis of silver nanoparticles using green algae (Caulerpa serrulata): Reaction optimization, catalytic and antibacterial activities. *Environmental Monitoring and Assessment*, *189*(7). https://doi.org/10.1007/s10661-017-6033-0

Ali, J., Ali, N., Wang, L., Waseem, H., & Pan, G. (2019). Revisiting the mechanistic pathways for bacterial mediated synthesis of noble metal nanoparticles. *Journal of Microbiological Methods*, *159*, 18–25. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.02.010

Amendola, V., & Meneghetti, M. (2009). Laser ablation synthesis in solution and size manipulation of noble metal nanoparticles. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *11*(20), 3805. https://doi.org/10.1039/b900654k

Anderson, K., Poulter, B., Dudgeon, J., Li, S.-E., & Ma, X. (2017). A highly sensitive nonenzymatic glucose biosensor based on the regulatory effect of glucose on electrochemical behaviors of colloidal silver nanoparticles on mos2. *Sensors*, *17*(8), 1807. https://doi.org/10.3390/s17081807

Arvieux, C., & Common, H. (2019). New diagnostic tools for prosthetic joint infection. *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research*, *105*(1), S23—S30. https://doi.org/10.1016/j.otsr.2018.04.029

Aslan, K., Gryczynski, I., Malicka, J., Matveeva, E., Lakowicz, J. R., & Geddes, C. D. (2005). Metal-enhanced fluorescence: An emerging tool in biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, *16*(1), 55–62. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.01.001

Aslan, K., Leonenko, Z., Lakowicz, J. R., & Geddes, C. D. (2005). Annealed silver-island films for applications in metal-enhanced fluorescence: Interpretation in terms of radiating plasmons. *Journal of Fluorescence*, *15*(5), 643–654. https://doi.org/10.1007/s10895-005-2970-z

Aslan, K., Wu, M., Lakowicz, J. R., & Geddes, C. D. (2007). Fluorescent Core−Shell Ag@SiO2Nanocomposites for Metal-Enhanced Fluorescence and Single Nanoparticle Sensing Platforms. *Journal of the American Chemical Society*, *129*(6), 1524–1525. https://doi.org/10.1021/ja0680820

Axelrod, D. (1981). Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence. *Journal of Cell Biology*, *89*(1), 141–145. https://doi.org/10.1083/jcb.89.1.141

Axelrod, D. (2001). Selective imaging of surface fluorescence with very high aperture microscope objectives. *Journal of Biomedical Optics*, *6*(1), 6. https://doi.org/10.1117/1.1335689

Axelrod, D. (2022). *Total internal reflection fluorescence (TIRF) and evanescence microscopies*. IOP Publishing. https://doi.org/10.1088/978-0-7503-3351-1

Axelrod, D., Thompson, N. L., & Burghardt, T. P. (1983). Total internal reflection fluorescent microscopy. *Journal of Microscopy*, *129*(1), 19–28. https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1983.tb04158.x

Badshah, M. A., Ju, J., Lu, X., Abbas, N., & Kim, S.-m. (2018). Enhancing the sensitivity of DNA microarrays by metal-enhanced fluorescence using vertical nanorod structures.

Sensors and Actuators B: Chemical, *274*, 451–457. https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.07.163

Baker, C. M., Goh, G. S., Tarabichi, S., Shohat, N., & Parvizi, J. (2022). Synovial c-reactive protein is a useful adjunct for diagnosis of periprosthetic joint infection. *The Journal of Arthroplasty*. https://doi.org/10.1016/j.arth.2022.06.016

Bakker, R. M., Yuan, H.-K., Liu, Z., Drachev, V. P., Kildishev, A. V., Shalaev, V. M., Pedersen, R. H., Gresillon, S., & Boltasseva, A. (2008). Enhanced localized fluorescence in plasmonic nanoantennae. *Applied Physics Letters*, *92*(4), 043101. https://doi.org/10.1063/1.2836271

Bensebaa, F. (2013). *Nanoparticle technologies - from lab to market*. Elsevier. https://doi.org/10.1016/c2009-0-06691-4

Białecki, J., Para, M., Bartosz, P., & Marczyński, W. (2017). Rola lekarza pierwszego kontaktu we wczesnym rozpoznawaniu zakażeń okołoprotezowych stawów. *Pediatr Med Rodz*, *13 (4)*, 460–469. https://www.researchgate.net/publication/323693772_The_role_of_the_primary_care_physician_in_early_diagnosis_of_periprosthetic_joint_infection/fulltext/5aa5c4be45851543e64133b5/The-role-of-the-primary-care-physician-in-early-diagnosis-of-periprosthetic-joint-infection.pdf

Blom, A. W., Lenguerrand, E., Strange, S., Noble, S. M., Beswick, A. D., Burston, A., Garfield, K., Gooberman-Hill, R., Harris, S. R. S., Kunutsor, S. K., Lane, J. A., MacGowan, A., Mehendale, S., Moore, A. J., Rolfson, O., Webb, J. C. J., Wilson, M., & Whitehouse, M. R. (2022). Clinical and cost effectiveness of single stage compared with two stage revision for hip prosthetic joint infection (INFORM): Pragmatic, parallel group, open label, randomised controlled trial. *BMJ*, Artykuł e071281. https://doi.org/10.1136/bmj-2022-071281

Bonanzinga, T., Zahar, A., Dütsch, M., Lausmann, C., Kendoff, D., & Gehrke, T. (2016). How reliable is the alpha-defensin immunoassay test for diagnosing periprosthetic joint infection? A prospective study. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, *475*(2), 408–415. https://doi.org/10.1007/s11999-016-4906-0

Bozic, K. J., Kurtz, S. M., Lau, E., Ong, K., Chiu, V., Vail, T. P., Rubash, H. E., & Berry, D. J. (2009). The epidemiology of revision total knee arthroplasty in the united states. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, *468*(1), 45–51. https://doi.org/10.1007/s11999-009-0945-0

Bozic, K. J., Kurtz, S. M., Lau, E., Ong, K., Vail, T. P., & Berry, D. J. (2009). The epidemiology of revision total hip arthroplasty in the united states. *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*, *91*(1), 128–133. https://doi.org/10.2106/jbjs.h.00155

Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, *3*(3), 238–250. https://doi.org/10.1038/nrmicro1098

Bruce, N., Farrell, F., Xie, E., Scullion, M., Haughey, A.-M., Gu, E., Dawson, M. D., & Laurand, N. (2023). MicroLED biosensor with colloidal quantum dots and smartphone detection. *Biomedical Optics Express*. https://doi.org/10.1364/boe.478276

Bruna, T., Maldonado-Bravo, F., Jara, P., & Caro, N. (2021). Silver nanoparticles and their antibacterial applications. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(13), 7202. https://doi.org/10.3390/ijms22137202

Burghardt, T. P., Charlesworth, J. E., Halstead, M. F., Tarara, J. E., & Ajtai, K. (2006). In situ fluorescent protein imaging with metal film-enhanced total internal reflection

microscopy. *Biophysical Journal*, *90*(12), 4662–4671. https://doi.org/10.1529/biophysj.105.079442

Chatterjee, T., Chatterjee, B. K., Majumdar, D., & Chakrabarti, P. (2015). Antibacterial effect of silver nanoparticles and the modeling of bacterial growth kinetics using a modified Gompertz model. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1850*(2), 299–306. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.10.022

Chen, J., Shi, S., Su, R., Qi, W., Huang, R., Wang, M., Wang, L., & He, Z. (2015). Optimization and application of reflective LSPR optical fiber biosensors based on silver nanoparticles. *Sensors*, *15*(6), 12205–12217. https://doi.org/10.3390/s150612205

Chen, Y., Kang, X., Tao, J., Zhang, Y., Ying, C., & Lin, W. (2019). Reliability of synovial fluid alpha-defensin and leukocyte esterase in diagnosing periprosthetic joint infection (PJI): A systematic review and meta-analysis. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, *14*(1). https://doi.org/10.1186/s13018-019-1395-3

Chen, Z., Lei, Y., & Chen, X. (2012). Immunoassay for serum alpha-fetoprotein using silver nanoparticles and detection via resonance light scattering. *Microchimica Acta*, *179*(3-4), 241–248. https://doi.org/10.1007/s00604-012-0888-0

Chisari, E., Lin, F., Fei, J., & Parvizi, J. (2022). Fungal periprosthetic joint infection: Rare but challenging problem. *Chinese Journal of Traumatology*, *25*(2), 63–66. https://doi.org/10.1016/j.cjtee.2021.12.006

Chiu, S.-W., & Leake, M. C. (2011). Functioning nanomachines seen in real-time in living bacteria using single-molecule and super-resolution fluorescence imaging. *International Journal of Molecular Sciences*, *12*(4), 2518–2542. https://doi.org/10.3390/ijms12042518

Choi, C.-K., Shaban, S. M., Moon, B.-S., Pyun, D.-G., & Kim, D.-H. (2021). Smartphone-assisted point-of-care colorimetric biosensor for the detection of urea via pH-mediated AgNPs growth. *Analytica Chimica Acta*, *1170*, 338630. https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338630

Covey, D. C., & Albright, J. A. (1987). Clinical significance of the erythrocyte sedimentation rate in orthopaedic surgery. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, *69*(1), 148–151. https://doi.org/10.2106/00004623-198769010-00025

Crowther, J. R. (2000). *The ELISA guidebook (methods in molecular biology)*. Humana Press.

Cutter, B., Lum, Z. C., Giordani, M., & Meehan, J. P. (2023). Utility of D-dimer in total joint arthroplasty. *World Journal of Orthopedics*, *14*(3), 90–102. https://doi.org/10.5312/wjo.v14.i3.90

Dandé, Á., Nöt, L. G., Bűcs, G., Kocsis, B., Lőrinczy, D., & Wiegand, N. (2020). Efficacy of microbiological culturing in the diagnostics of joint and periprosthetic infections. *Injury*. https://doi.org/10.1016/j.injury.2020.02.058

Deirmengian, C., Kardos, K., Kilmartin, P., Cameron, A., Schiller, K., Booth, R. E., & Parvizi, J. (2014). The alpha-defensin test for periprosthetic joint infection outperforms the leukocyte esterase test strip. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, *473*(1), 198–203. https://doi.org/10.1007/s11999-014-3722-7

Deirmengian, C., Kardos, K., Kilmartin, P., Cameron, A., Schiller, K., & Parvizi, J. (2014a). Combined measurement of synovial fluid α-defensin and c-reactive protein levels. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, *96*(17), 1439–1445. https://doi.org/10.2106/jbjs.m.01316

Deirmengian, C., Kardos, K., Kilmartin, P., Cameron, A., Schiller, K., & Parvizi, J. (2014b). Diagnosing periprosthetic joint infection: Has the era of the biomarker arrived? *Clinical*

Orthopaedics and Related Research®, *472*(11), 3254–3262. https://doi.org/10.1007/s11999-014-3543-8

Deirmengian, C., Kardos, K., Kilmartin, P., Gulati, S., Citrano, P., & Booth, R. E. (2015). The alpha-defensin test for periprosthetic joint infection responds to a wide spectrum of organisms. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, *473*(7), 2229–2235. https://doi.org/10.1007/s11999-015-4152-x

Deirmengian, C., Madigan, J., Kallur Mallikarjuna, S., Conway, J., Higuera, C., & Patel, R. (2020). Validation of the alpha defensin lateral flow test for periprosthetic joint infection. *Journal of Bone and Joint Surgery*, *Publish Ahead of Print*. https://doi.org/10.2106/jbjs.20.00749

Del Pozo, J. L., & Patel, R. (2009). Infection associated with prosthetic joints. *New England Journal of Medicine*, *361*(8), 787–794. https://doi.org/10.1056/nejmcp0905029

Demir, H. V., Hernández Martínez, P. L., & Govorov, A. (2017). *Understanding and modeling förster-type resonance energy transfer (FRET)*. Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-1876-3

Dieringer, J. A., Lettan, R. B., Scheidt, K. A., & Van Duyne, R. P. (2007). A frequency domain existence proof of single-molecule surface-enhanced raman spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, *129*(51), 16249–16256. https://doi.org/10.1021/ja077243c

Diniz, S. E., Ribau, A., Vinha, A., Oliveira, J. C., Abreu, M. A., & Sousa, R. (2023). Simple and inexpensive synovial fluid biomarkers for the diagnosis of prosthetic joint infection according to the new EBJIS definition. *Journal of Bone and Joint Infection*, *8*(2), 109–118. https://doi.org/10.5194/jbji-8-109-2023

Dondi, R., Su, W., Griffith, G. A., Clark, G., & Burley, G. A. (2012). Highly size- and shape-controlled synthesis of silver nanoparticles via a templated tollens reaction. *Small*, *8*(5), 770–776. https://doi.org/10.1002/smll.201101474

Dong, X., Ji, X., Wu, H., Zhao, L., Li, J., & Yang, W. (2009). Shape control of silver nanoparticles by stepwise citrate reduction. *The Journal of Physical Chemistry C*, *113*(16), 6573–6576. https://doi.org/10.1021/jp900775b

Dr. Friedrich Menges Software-Entwicklung. (2024). *Spectragryph - optical spectroscopy software* (Wersja v1.2.16.1) [Oprogramowanie komputerowe]. https://www.effemm2.de/spectragryph/about.html

Ericksen, B., Wu, Z., Lu, W., & Lehrer, R. I. (2005). Antibacterial activity and specificity of the six human α-defensins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *49*(1), 269–275. https://doi.org/10.1128/aac.49.1.269-275.2005

Eriksson, H. K., Nordström, J., Gabrysch, K., Hailer, N. P., & Lazarinis, S. (2018). Does the alpha-defensin immunoassay or the lateral flow test have better diagnostic value for periprosthetic joint infection? A systematic review. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, *476*(5), 1065–1072. https://doi.org/10.1007/s11999.0000000000000244

Evanoff, D. D., & Chumanov, G. (2005). Synthesis and optical properties of silver nanoparticles and arrays. *ChemPhysChem*, *6*(7), 1221–1231. https://doi.org/10.1002/cphc.200500113

FDA. (2024, sierpień). *Evaluation of automatic class III for synovasure alpha defensin lateral flow test kit decision summary*. https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/DEN180032.pdf.

Frangiamore, S. J., Gajewski, N. D., Saleh, A., Farias-Kovac, M., Barsoum, W. K., & Higuera, C. A. (2016). A-Defensin accuracy to diagnose periprosthetic joint infection—best available test? *The Journal of Arthroplasty*, *31*(2), 456–460. https://doi.org/10.1016/j.arth.2015.09.035

Fu, Y., Zhang, J., & Lakowicz, J. R. (2010). Plasmon-controlled fluorescence: Applications to sensing and single molecule detection. W A. Periasamy, P. T. C. So & K. König (Red.), *BiOS*. SPIE. https://doi.org/10.1117/12.850765

Funston, A. M., Novo, C., Davis, T. J., & Mulvaney, P. (2009). Plasmon coupling of gold nanorods at short distances and in different geometries. *Nano Letters*, *9*(4), 1651–1658. https://doi.org/10.1021/nl900034v

Ganz, T. (2004). Defensins: Antimicrobial peptides of vertebrates. *Comptes Rendus Biologies*, *327*(6), 539–549. https://doi.org/10.1016/j.crvi.2003.12.007

Gbejuade, H. O., Lovering, A. M., & Webb, J. C. (2014). The role of microbial biofilms in prosthetic joint infections. *Acta Orthopaedica*, *86*(2), 147–158. https://doi.org/10.3109/17453674.2014.966290

Geddes, C. D., Parfenov, A., Roll, D., Gryczynski, I., Malicka, J., & Lakowicz, J. R. (2003). Silver fractal-like structures for metal-enhanced fluorescence: Enhanced fluorescence intensities and increased probe photostabilities. *Journal of Fluorescence*, *13*(3), 267–276. https://doi.org/10.1023/a:1025046101335

Gehrke, T., Lausmann, C., Citak, M., Bonanzinga, T., Frommelt, L., & Zahar, A. (2018). The accuracy of the alpha defensin lateral flow device for diagnosis of periprosthetic joint infection. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, *100*(1), 42–48. https://doi.org/10.2106/jbjs.16.01522

Gemmel, F., Van den Wyngaert, H., Love, C., Welling, M. M., Gemmel, P., & Palestro, C. J. (2012). Prosthetic joint infections: Radionuclide state-of-the-art imaging. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, *39*(5), 892–909. https://doi.org/10.1007/s00259-012-2062-7

Global Health Observatory. (2024, sierpień). *Dane ze strony*. World Health Organization. https://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/life_tables/situation_trends_text/en/

Gryczynski, I., & Gryczynski, Z. (2019). *Practical fluorescence spectroscopy*. Taylor & Francis Group.

Grzelecki, D., Walczak, P., Grajek, A., Szostek, M., Dudek, P., Bartosz, P., Olewnik, Ł., Czubak-Wrzosek, M., Marczak, D., & Tyrakowski, M. (2020). Elevated plasma D-dimer concentration has higher efficacy for the diagnosis of periprosthetic joint infection of the knee than of the hip—A single-center, retrospective study. *Journal of Orthopaedic Research*. https://doi.org/10.1002/jor.24897

Guerrero-Martínez, A., Pérez-Juste, J., & Liz-Marzán, L. M. (2010). Recent progress on silica coating of nanoparticles and related nanomaterials. *Advanced Materials*, *22*(11), 1182–1195. https://doi.org/10.1002/adma.200901263

Gunsolus, I. L., Mousavi, M. P. S., Hussein, K., Bühlmann, P., & Haynes, C. L. (2015). Effects of humic and fulvic acids on silver nanoparticle stability, dissolution, and toxicity. *Environmental Science & Technology*, *49*(13), 8078–8086. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01496

Harrick, N. J., & Beckmann, K. H. (1974). Internal reflection spectroscopy. W *Characterization of solid surfaces* (s. 215–245). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-4490-2_11

Hashemi Goradel, N., Ghiyami-Hour, F., Jahangiri, S., Negahdari, B., Sahebkar, A., Masoudifar, A., & Mirzaei, H. (2017). Nanoparticles as new tools for inhibition of cancer angiogenesis. *Journal of Cellular Physiology*, *233*(4), 2902–2910. https://doi.org/10.1002/jcp.26029

He, Y., Yang, X., Yuan, R., & Chai, Y. (2019). A novel ratiometric SERS biosensor with one Raman probe for ultrasensitive microRNA detection based on DNA hydrogel

amplification. *Journal of Materials Chemistry B*, *7*(16), 2643–2647. https://doi.org/10.1039/c8tb02894j

Hip and knee replacement. (2021). W *Health at a glance*. OECD. https://doi.org/10.1787/8b492d7a-en

Hoofnagle, A. N., & Wener, M. H. (2009). The fundamental flaws of immunoassays and potential solutions using tandem mass spectrometry. *Journal of Immunological Methods*, *347*(1-2), 3–11. https://doi.org/10.1016/j.jim.2009.06.003

Huang, J.-S., Kern, J., Geisler, P., Weinmann, P., Kamp, M., Forchel, A., Biagioni, P., & Hecht, B. (2010). Mode imaging and selection in strongly coupled nanoantennas. *Nano Letters*, *10*(6), 2105–2110. https://doi.org/10.1021/nl100614p

Hycult Biotech. (2024a, sierpień). *Charakterystyka białek HNP1-3, Human, mAb D21 oraz HNP1-3, Human, Natural, Hycult na stronie producenta*. https://www.hycultbiotech.com/product/hc4014/.

Hycult Biotech. (2024b, sierpień). *Opis komercyjnego testu HNP1-3, Human, ELISA kit*. https://www.hycultbiotech.com/product/hnp1-3-human-elisa-kit/.

Iravani, S., Korbekandi, H., Mirmohammadi, S. V., & Zolfaghari, B. (2014). Synthesis of silver nanoparticles: Chemical, physical and biological methods. *Research in Pharmaceutical Sciences*, *9(6)*, 385–406.

Izakovicova, P., Borens, O., & Trampuz, A. (2019). Periprosthetic joint infection: Current concepts and outlook. *EFORT Open Reviews*, *4*(7), 482–494. https://doi.org/10.1302/2058-5241.4.180092

Jeong, Y., Kook, Y.-M., Lee, K., & Koh, W.-G. (2018). Metal enhanced fluorescence (MEF) for biosensors: General approaches and a review of recent developments. *Biosensors and Bioelectronics*, *111*, 102–116. https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.04.007

Jiang, N., Ahmed, R., Damayantharan, M., Ünal, B., Butt, H., & Yetisen, A. K. (2019). Lateral and vertical flow assays for point-of-care diagnostics. *Advanced Healthcare Materials*, *8*(14), 1900244. https://doi.org/10.1002/adhm.201900244

Jiang, X. C., Chen, W. M., Chen, C. Y., Xiong, S. X., & Yu, A. B. (2010). Role of temperature in the growth of silver nanoparticles through a synergetic reduction approach. *Nanoscale Research Letters*. https://doi.org/10.1007/s11671-010-9780-1

Jiang, Y., Zhang, X., Pei, L., Yue, S., Ma, L., Zhou, L., Huang, Z., He, Y., & Gao, J. (2018). Silver nanoparticles modified two-dimensional transition metal carbides as nanocarriers to fabricate acetycholinesterase-based electrochemical biosensor. *Chemical Engineering Journal*, *339*, 547–556. https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.01.111

Jiraroj, D., Tungasmita, S., & Tungasmita, D. N. (2014). Silver ions and silver nanoparticles in zeolite A composites for antibacterial activity. *Powder Technology*, *264*, 418–422. https://doi.org/10.1016/j.powtec.2014.05.049

Ju-Nam, Y., & Lead, J. R. (2008). Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Science of the Total Environment*, *400*(1-3), 396–414. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.06.042

Kasparek, M. F., Kasparek, M., Boettner, F., Faschingbauer, M., Hahne, J., & Dominkus, M. (2016). Intraoperative diagnosis of periprosthetic joint infection using a novel alpha-defensin lateral flow assay. *The Journal of Arthroplasty*, *31*(12), 2871–2874. https://doi.org/10.1016/j.arth.2016.05.033

Kellogg, R. E., & Bennett, R. G. (1964). Radiationless intermolecular energy transfer. III. determination of phosphorescence efficiencies. *The Journal of Chemical Physics*, *41*(10), 3042–3045. https://doi.org/10.1063/1.1725672

Kelly, K. L., Coronado, E., Zhao, L. L., & Schatz, G. C. (2003). The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment. *ChemInform*, *34*(16). https://doi.org/10.1002/chin.200316243

Kelly, M. P., Darrith, B., Hannon, C. P., Nam, D., Courtney, P. M., & Della Valle, C. J. (2018). Synovial fluid alpha-defensin is an adjunctive tool in the equivocal diagnosis of periprosthetic joint infection. *The Journal of Arthroplasty*, *33*(11), 3537–3540. https://doi.org/10.1016/j.arth.2018.06.026

Khanna, P., Kaur, A., & Goyal, D. (2019). Algae-based metallic nanoparticles: Synthesis, characterization and applications. *Journal of Microbiological Methods*, *163*, 105656. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.105656

Khayati, G. R., & Janghorban, K. (2012). The nanostructure evolution of Ag powder synthesized by high energy ball milling. *Advanced Powder Technology*, *23*(3), 393–397. https://doi.org/10.1016/j.apt.2011.05.005

Khodashenas, B., & Ghorbani, H. R. (2019). Synthesis of silver nanoparticles with different shapes. *Arabian Journal of Chemistry*, *12*(8), 1823–1838. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.12.014

Kim, S.-J., & Cho, Y. J. (2021). Current guideline for diagnosis of periprosthetic joint infection: A review article. *Hip & Pelvis*, *33*(1), 11. https://doi.org/10.5371/hp.2021.33.1.11

Knoblauch, R., & Geddes, C. D. (2019). Review of advances in metal-enhanced fluorescence. W *Reviews in plasmonics* (s. 253–283). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-18834-4_10

Koczula, K. M., & Gallotta, A. (2016). Lateral flow assays. *Essays in Biochemistry*, *60*(1), 111–120. https://doi.org/10.1042/ebc20150012

Kowalska, D., Szalkowski, M., Sulowska, K., Buczynska, D., Niedziolka-Jonsson, J., Jonsson-Niedziolka, M., Kargul, J., Lokstein, H., & Mackowski, S. (2020). Silver island film for enhancing light harvesting in natural photosynthetic proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(7), 2451. https://doi.org/10.3390/ijms21072451

Kuiper, J. W. P., Verberne, S. J., Vos, S. J., & van Egmond, P. W. (2020). Does the alpha defensin ELISA test perform better than the alpha defensin lateral flow test for PJI diagnosis? A systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, *478*(6), 1333–1344. https://doi.org/10.1097/corr.0000000000001225

Kunzmann, A., Andersson, B., Thurnherr, T., Krug, H., Scheynius, A., & Fadeel, B. (2011). Toxicology of engineered nanomaterials: Focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1810*(3), 361–373. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.04.007

Lakowicz, J. R. (2001). Radiative decay engineering: Biophysical and biomedical applications. *Analytical Biochemistry*, *298*(1), 1–24. https://doi.org/10.1006/abio.2001.5377

Lakowicz, J. R. (Red.). (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer US. https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4

Lamagni, T. (2014). Epidemiology and burden of prosthetic joint infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *69*(suppl 1), i5—i10. https://doi.org/10.1093/jac/dku247

Lee, S., & Jun, B.-H. (2019). Silver nanoparticles: Synthesis and application for nanomedicine. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(4), 865. https://doi.org/10.3390/ijms20040865

Lehrer, R. I., & Lu, W. (2011). A-Defensins in human innate immunity. *Immunological Reviews*, *245*(1), 84–112. https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.2011.01082.x

Le Ru, E. C., & Etchegoin, P. G. (2009). *Principles of surface-enhanced raman spectroscopy*. Elsevier. https://doi.org/10.1016/b978-0-444-52779-0.x0001-3

Li, C., Margaryan, D., Ojeda-Thies, C., Perka, C., & Trampuz, A. (2020). Meta-analysis of serum and/or plasma D-dimer in the diagnosis of periprosthetic joint infection. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, *15*(1). https://doi.org/10.1186/s13018-020-01808-1

Li, J., Zhou, Q., & Deng, B. (2022). Serum versus synovial fluid interleukin-6 for periprosthetic joint infection diagnosis: A systematic review and meta-analysis of 30 diagnostic test accuracy studies. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, *17*(1). https://doi.org/10.1186/s13018-022-03458-x

Li, M., Cushing, S. K., & Wu, N. (2015). Plasmon-enhanced optical sensors: A review. *The Analyst*, *140*(2), 386–406. https://doi.org/10.1039/c4an01079e

Li, X., Odoom-Wubah, T., Chen, H., Jing, X., Zheng, B., & Huang, J. (2013). Biosynthesis of silver nanoparticles through tandem hydrolysis of silver sulfate and cellulose under hydrothermal conditions. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, *89*(12), 1817–1824. https://doi.org/10.1002/jctb.4259

Lindberg-Larsen, M., Odgaard, A., Fredborg, C., & Schrøder, H. M. (2021). One-stage versus two-stage revision of the infected knee arthroplasty - a randomized multicenter clinical trial study protocol. *BMC Musculoskeletal Disorders*, *22*(1). https://doi.org/10.1186/s12891-021-04044-8

Lismont, M., & Dreesen, L. (2012). Comparative study of Ag and Au nanoparticles biosensors based on surface plasmon resonance phenomenon. *Materials Science and Engineering: C*, *32*(6), 1437–1442. https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.04.023

Loiseau, A., Asila, V., Boitel-Aullen, G., Lam, M., Salmain, M., & Boujday, S. (2019). Silver-Based plasmonic nanoparticles for and their use in biosensing. *Biosensors*, *9*(2), 78. https://doi.org/10.3390/bios9020078

Louis, C., & Pluchery, O. (2012). *Gold nanoparticles for physics, chemistry and biology*. Imperial College Press.

Louis, C., & Pluchery, O. (2017). *Gold nanoparticles for physics, chemistry and biology (second edition)*. World Scientific Publishing Co Pte Ltd.

Lovati, A. B., Bottagisio, M., de Vecchi, E., Gallazzi, E., & Drago, L. (2016). Animal Models of Implant-Related Low-Grade Infections. A Twenty-Year Review. W *Advances in experimental medicine and biology* (s. 29–50). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/5584_2016_157

Maale, G. E., Eager, J. J., Srinivasaraghavan, A., Mohammadi, D. K., & Kennard, N. (2020). The evolution from the two stage to the one stage procedure for biofilm based periprosthetic joint infections (PJI). *Biofilm*, *2*, 100033. https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2020.100033

Maeda, H., Sawa, T., & Konno, T. (2001). Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS. *Journal of Controlled Release*, *74*(1-3), 47–61. https://doi.org/10.1016/s0168-3659(01)00309-1

Malachová, K., Praus, P., Rybková, Z., & Kozák, O. (2011). Antibacterial and antifungal activities of silver, copper and zinc montmorillonites. *Applied Clay Science*, *53*(4), 642–645. https://doi.org/10.1016/j.clay.2011.05.016

Malicka, J., Gryczynski, I., & Lakowicz, J. R. (2003). DNA hybridization assays using metal-enhanced fluorescence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *306*(1), 213–218. https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)00935-5

Mansour, S. C., Pena, O. M., & Hancock, R. E. W. (2014). Host defense peptides: Front-line immunomodulators. *Trends in Immunology*, *35*(9), 443–450. https://doi.org/10.1016/j.it.2014.07.004

Marsich, E., Bellomo, F., Turco, G., Travan, A., Donati, I., & Paoletti, S. (2013). Nano-composite scaffolds for bone tissue engineering containing silver nanoparticles: Preparation, characterization and biological properties. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *24*(7), 1799–1807. https://doi.org/10.1007/s10856-013-4923-4

Marson, B. A., Deshmukh, S. R., Grindlay, D. J. C., & Scammell, B. E. (2018). Alpha-defensin and the Synovasure lateral flow device for the diagnosis of prosthetic joint infection. *The Bone & Joint Journal*, *100-B*(6), 703–711. https://doi.org/10.1302/0301-620x.100b6.bjj-2017-1563.r1

Martinez, V., & Henary, M. (2016). Nile red and nile blue: Applications and syntheses of structural analogues. *Chemistry - A European Journal*, *22*(39), 13764–13782. https://doi.org/10.1002/chem.201601570

Mazur, P., Skiba-Kurek, I., Mrowiec, P., Karczewska, E., & Drożdż, R. (2020). Synergistic ros-associated antimicrobial activity of silver nanoparticles and gentamicin against *staphylococcus epidermidis*. *International Journal of Nanomedicine*, *Volume 15*, 3551–3562. https://doi.org/10.2147/ijn.s246484

McConoughey, S. J., Howlin, R., Granger, J. F., Manring, M. M., Calhoun, J. H., Shirtliff, M., Kathju, S., & Stoodley, P. (2014). Biofilms in periprosthetic orthopedic infections. *Future Microbiology*, *9*(8), 987–1007. https://doi.org/10.2217/fmb.14.64

McNally, M., Sousa, R., Wouthuyzen-Bakker, M., Chen, A. F., Soriano, A., Vogely, H. C., Clauss, M., Higuera, C. A., & Trebše, R. (2021). The EBJIS definition of periprosthetic joint infection. *The Bone & Joint Journal*, *103-B*(1), 18–25. https://doi.org/10.1302/0301-620x.103b1.bjj-2020-1381.r1

Medical & Biological Laboratories. (2024, sierpień). *The principle and method of ELISA*. https://ruo.mbl.co.jp/bio/e/support/method/elisa.html.

Meng, X., Wang, H., Chen, N., Ding, P., Shi, H., Zhai, X., Su, Y., & He, Y. (2018). A graphene–silver nanoparticle–silicon sandwich SERS chip for quantitative detection of molecules and capture, discrimination, and inactivation of bacteria. *Analytical Chemistry*, *90*(9), 5646–5653. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b05139

Mertz, J. (2000). Radiative absorption, fluorescence, and scattering of a classical dipole near a lossless interface: A unified description. *Journal of the Optical Society of America B*, *17*(11), 1906. https://doi.org/10.1364/josab.17.001906

Mori, Y., Ono, T., Miyahira, Y., Nguyen, V. Q., Matsui, T., & Ishihara, M. (2013). Antiviral activity of silver nanoparticle/chitosan composites against H1N1 influenza A virus. *Nanoscale Research Letters*, *8*(1), 93. https://doi.org/10.1186/1556-276x-8-93

Mulvaney, P. (1996). Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles. *Langmuir*, *12*(3), 788–800. https://doi.org/10.1021/la9502711

Naik, A. N., Patra, S., Sen, D., & Goswami, A. (2019). Evaluating the mechanism of nucleation and growth of silver nanoparticles in a polymer membrane under continuous precursor supply: Tuning of multiple to single nucleation pathway. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *21*(8), 4193–4199. https://doi.org/10.1039/c8cp06202a

Nakahara, A., Shirasaki, Y., Mizuno, J., Sekiguchi, T., Ohara, O., & Shoji, S. (2013). PDMS-CYTOP hybrid structure microwell array chip for total internal reflection fluorescence microscopy. W *2013 8th IEEE international conference on nano/micro engineered and molecular systems (NEMS)*. IEEE. https://doi.org/10.1109/nems.2013.6559835

NFZ. (2024, sierpień). *Raport Wykonanie świadczeń endoprotezoplastyki stawowej w 2022 r*. https://www.nfz.gov.pl/download/gfx/nfz/pl/defaultstronaopisowa/349/59/1/opracowanie_do_publikacji__na_stronie_internetowej_nfz_wykonanie_swiadczen_endoprotezoplastyki_stawowej_w_2022_r..docx.

Nordlander, P., Oubre, C., Prodan, E., Li, K., & Stockman, M. I. (2004). Plasmon hybridization in nanoparticle dimers. *Nano Letters*, *4*(5), 899–903. https://doi.org/10.1021/nl049681c

Ong, C., Lee, Q. Y., Cai, Y., Liu, X., Ding, J., Yung, L.-Y. L., Bay, B.-H., & Baeg, G.-H. (2016). Silver nanoparticles disrupt germline stem cell maintenance in the Drosophila testis. *Scientific Reports*, *6*(1). https://doi.org/10.1038/srep20632

Pang, Y., Wang, C., Lu, L., Wang, C., Sun, Z., & Xiao, R. (2019). Dual-SERS biosensor for one-step detection of microRNAs in exosome and residual plasma of blood samples for diagnosing pancreatic cancer. *Biosensors and Bioelectronics*, *130*, 204–213. https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.01.039

Pannu, T. S., Villa, J. M., Patel, P. D., Riesgo, A. M., Barsoum, W. K., & Higuera, C. A. (2020). The utility of serum d-dimer for the diagnosis of periprosthetic joint infection in revision total hip and knee arthroplasty. *The Journal of Arthroplasty*, *35*(6), 1692–1695. https://doi.org/10.1016/j.arth.2020.01.034

Pantidos, N. (2014). Biological synthesis of metallic nanoparticles by bacteria, fungi and plants. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, *05*(05). https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000233

Parvizi, J., & Gehrke, T. (2014). International consensus on periprosthetic joint infection. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, *96*(6), 441. https://doi.org/10.2106/jbjs.n.00023

Parvizi, J., & Gehrke, T. (2021). *Ustalenia II Międzynarodowego Spotkania w sprawie infekcji mięśniowo-szkieletowych Konsensus* (W. Marczyński & J. Białecki, Red.). Medisfera.

Parvizi, J., Jacovides, C., Adeli, B., Jung, K. A., & Hozack, W. J. (2011). Mark B. coventry award: Synovial c-reactive protein: A prospective evaluation of a molecular marker for periprosthetic knee joint infection. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, *470*(1), 54–60. https://doi.org/10.1007/s11999-011-1991-y

Parvizi, J., Tan, T. L., Goswami, K., Higuera, C., Della Valle, C., Chen, A. F., & Shohat, N. (2018). The 2018 definition of periprosthetic hip and knee infection: An evidence-based and validated criteria. *The Journal of Arthroplasty*, *33*(5), 1309–1314.e2. https://doi.org/10.1016/j.arth.2018.02.078

Parvizi, J., Zmistowski, B., Berbari, E. F., Bauer, T. W., Springer, B. D., Della Valle, C. J., Garvin, K. L., Mont, M. A., Wongworawat, M. D., & Zalavras, C. G. (2011). New definition for periprosthetic joint infection: From the workgroup of the musculoskeletal infection society. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, *469*(11), 2992–2994. https://doi.org/10.1007/s11999-011-2102-9

Pérez-Prieto, D., Portillo, M. E., Puig-Verdié, L., Alier, A., Martínez, S., Sorlí, L., Horcajada, J. P., & Monllau, J. C. (2017). C-reactive protein may misdiagnose prosthetic joint infections, particularly chronic and low-grade infections. *International Orthopaedics*, *41*(7), 1315–1319. https://doi.org/10.1007/s00264-017-3430-5

Petrucca, A., Santino, I., Gentile, G., Mazza, D., Viglietta, E., Iorio, R., Simmaco, M., Ferretti, A., & Borro, M. (2020). Detection of α-defensin in synovial fluids by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry as an innovative and cost-effective assay for improved definition of periprosthetic joint infections. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *34*(11). https://doi.org/10.1002/rcm.8791

Qin, Y., Ji, X., Jing, J., Liu, H., Wu, H., & Yang, W. (2010). Size control over spherical silver nanoparticles by ascorbic acid reduction. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical*

and Engineering Aspects, *372*(1-3), 172–176. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.10.013

R&D Systems. (2024, sierpień). *ELISA Development Guide. A guide for the use of antibodies in ELISA development*. https://resources.rndsystems.com/images/site/edbapril025670.pdf.

Ray, K., Chowdhury, M. H., Zhang, J., Fu, Y., Szmacinski, H., Nowaczyk, K., & Lakowicz, J. R. (2008). Plasmon-Controlled fluorescence towards high-sensitivity optical sensing. W *Optical sensor systems in biotechnology* (s. 1–28). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/10_2008_9

Riccio, G., Cavagnaro, L., Akkouche, W., Carrega, G., Felli, L., & Burastero, G. (2018). Qualitative alpha-defensin versus the main available tests for the diagnosis of periprosthetic joint infection: Best predictor test? *Journal of Bone and Joint Infection*, *3*(3), 156–164. https://doi.org/10.7150/jbji.26401

Richard, T. (2006). *Fluorescence sensors and biosensors*. Taylor & Francis Group.

Rodelo, J. R., De la Rosa, G., Valencia, M. L., Ospina, S., Arango, C. M., Gómez, C. I., García, A., Nuñez, E., & Jaimes, F. A. (2012). D-dimer is a significant prognostic factor in patients with suspected infection and sepsis. *The American Journal of Emergency Medicine*, *30*(9), 1991–1999. https://doi.org/10.1016/j.ajem.2012.04.033

Rowan, F. E., Donaldson, M. J., Pietrzak, J. R., & Haddad, F. S. (2018). The role of one-stage exchange for prosthetic joint infection. *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine*, *11*(3), 370–379. https://doi.org/10.1007/s12178-018-9499-7

Rycenga, M., Cobley, C. M., Zeng, J., Li, W., Moran, C. H., Zhang, Q., Qin, D., & Xia, Y. (2011). Controlling the synthesis and assembly of silver nanostructures for plasmonic applications. *Chemical Reviews*, *111*(6), 3669–3712. https://doi.org/10.1021/cr100275d

Sarkar, P., Sridharan, S., Luchowski, R., Desai, S., Dworecki, B., Nlend, M., Gryczynski, Z., & Gryczynski, I. (2010). Photophysical properties of a new DyLight 594 dye. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *98*(1), 35–39. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2009.10.005

Schindler, M., Walter, N., Maderbacher, G., Sigmund, I. K., Alt, V., & Rupp, M. (2023). Novel diagnostic markers for periprosthetic joint infection: A systematic review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1210345

Seiffert, J., Hussain, F., Wiegman, C., Li, F., Bey, L., Baker, W., Porter, A., Ryan, M. P., Chang, Y., Gow, A., Zhang, J., Zhu, J., Tetley, T. D., & Chung, K. F. (2015). Pulmonary toxicity of instilled silver nanoparticles: Influence of size, coating and rat strain. *Plos One*, *10*(3), Artykuł e0119726. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119726

Serpone, N., & Horikoshi, S. (2013). *Microwaves in nanoparticle synthesis: Fundamentals and applications*. Wiley & Sons, Limited, John.

Shahi, A., Deirmengian, C., Higuera, C., Chen, A., Restrepo, C., Zmistowski, B., & Parvizi, J. (2015). Premature therapeutic antimicrobial treatments can compromise the diagnosis of late periprosthetic joint infection. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, *473*(7), 2244–2249. https://doi.org/10.1007/s11999-015-4142-z

Shahi, A., Kheir, M. M., Tarabichi, M., Hosseinzadeh, H. R. S., Tan, T. L., & Parvizi, J. (2017). Serum d-dimer test is promising for the diagnosis of periprosthetic joint infection and timing of reimplantation. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, *99*(17), 1419–1427. https://doi.org/10.2106/jbjs.16.01395

Shahi, A., Parvizi, J., Kazarian, G. S., Higuera, C., Frangiamore, S., Bingham, J., Beauchamp, C., Valle, C. D., & Deirmengian, C. (2016). The alpha-defensin test for periprosthetic joint infections is not affected by prior antibiotic administration. *Clinical*

Orthopaedics and Related Research, *474*(7), 1610–1615. https://doi.org/10.1007/s11999-016-4726-2

Shahi, A., Tan, T. L., Kheir, M. M., Tan, D. D., & Parvizi, J. (2017). Diagnosing periprosthetic joint infection: And the winner is? *The Journal of Arthroplasty*, *32*(9), S232—S235. https://doi.org/10.1016/j.arth.2017.06.005

Sigmund, I. K., Holinka, J., Gamper, J., Staats, K., Böhler, C., Kubista, B., & Windhager, R. (2017). Qualitative α-defensin test (Synovasure) for the diagnosis of periprosthetic infection in revision total joint arthroplasty. *The Bone & Joint Journal*, *99-B*(1), 66–72. https://doi.org/10.1302/0301-620x.99b1.bjj-2016-0295.r1

Sigmund, I. K., Puchner, S. E., & Windhager, R. (2021). Serum inflammatory biomarkers in the diagnosis of periprosthetic joint infections. *Biomedicines*, *9*(9), 1128. https://doi.org/10.3390/biomedicines9091128

Sigmund, I. K., Yermak, K., Perka, C., Trampuz, A., & Renz, N. (2018). Is the enzyme-linked immunosorbent assay more accurate than the lateral flow alpha defensin test for diagnosing periprosthetic joint infection? *Clinical Orthopaedics and Related Research*, *476*(8), 1645–1654. https://doi.org/10.1097/corr.0000000000000336

Skrabalak, S. E., Au, L., Li, X., & Xia, Y. (2007). Facile synthesis of Ag nanocubes and Au nanocages. *Nature Protocols*, *2*(9), 2182–2190. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.326

Sloan, M., Premkumar, A., & Sheth, N. P. (2018). Projected volume of primary total joint arthroplasty in the U.S., 2014 to 2030. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, *100*(17), 1455–1460. https://doi.org/10.2106/jbjs.17.01617

Solarczyk, K., Wojcik, K., & Kulakowski, P. (2016). Nanocommunication via FRET with dylight dyes using multiple donors and acceptors. *IEEE Transactions on NanoBioscience*, *15*(3), 275–283. https://doi.org/10.1109/tnb.2016.2541462

Staats, A., Li, D., Sullivan, A. C., & Stoodley, P. (2021). Biofilm formation in periprosthetic joint infections. *Annals of Joint*, 0. https://doi.org/10.21037/aoj-20-85

Staiano, M., Matveeva, E. G., Rossi, M., Crescenzo, R., Gryczynski, Z., Gryczynski, I., Iozzino, L., Akopova, I., & D'Auria, S. (2009). Nanostructured silver-based surfaces: New emergent methodologies for an easy detection of analytes. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *1*(12), 2909–2916. https://doi.org/10.1021/am900617p

Sugawa, K., Takeshima, N., Uchida, K., Tahara, H., Jin, S., Tsunenari, N., Akiyama, T., Kusaka, Y., Fukuda, N., Ushijima, H., Tsuchido, Y., Hashimoto, T., Hayashita, T., & Otsuki, J. (2015). Photocurrent enhancement of porphyrin molecules over a wide-wavelength region based on combined use of silver nanoprisms with different aspect ratios. *Journal of Materials Chemistry C*, *3*(43), 11439–11448. https://doi.org/10.1039/c5tc02606g

Szabelski, M. (2015). *Zastosowanie czasowo-rozdzielczej spektroskopii do badań bezpromienistego transferu energii wzbudzenia w znakowanych fluorescencyjnie biomolekułach* (Publikacja nr 1509-3018 ; 196) [Rozprawa habilitacyjna, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski]. Rozprawy i Monografie - Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie.

Szczepańska, E., Bielicka-Giełdoń, A., Niska, K., Strankowska, J., Żebrowska, J., Inkielewicz-Stępniak, I., Łubkowska, B., Swebocki, T., Skowron, P., & Grobelna, B. (2020). Synthesis of silver nanoparticles in context of their cytotoxicity, antibacterial activities, skin penetration and application in skincare products. *Supramolecular Chemistry*, *32*(3), 207–221. https://doi.org/10.1080/10610278.2020.1726917

Szczęsny, G., Babiak, I., Kowalewski, M., & Górecki, A. (2005). Septyczne obluzowania protez stawów biodrowego i kolanowego. *Chirurgia Narządów Ruchu i Ortopedia Polska*, *70*

(3), 179–184. https://www.researchgate.net/profile/Ireneusz-Babiak/publication/7473322_Septic_loosing_of_hip_and_knee_prosthesis/links/02e7e5182bb32ed475000000/Septic-loosing-of-hip-and-knee-prosthesis.pdf

Szmacinski, H., Toshchakov, V., Piao, W., & Lakowicz, J. R. (2013). Imaging of protein secretion from a single cell using plasmonic substrates. *BioNanoScience*, *3*(1), 30–36. https://doi.org/10.1007/s12668-013-0076-7

Takáč, P., Michalková, R., Čižmáriková, M., Bedlovičová, Z., Balážová, Ľ., & Takáčová, G. (2023). The role of silver nanoparticles in the diagnosis and treatment of cancer: Are there any perspectives for the future? *Life*, *13*(2), 466. https://doi.org/10.3390/life13020466

Tan, T., Tian, C., Ren, Z., Yang, J., Chen, Y., Sun, L., Li, Z., Wu, A., Yin, J., & Fu, H. (2013). LSPR-dependent SERS performance of silver nanoplates with highly stable and broad tunable LSPRs prepared through an improved seed-mediated strategy. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *15*(48), 21034. https://doi.org/10.1039/c3cp52236a

Tang, H., Xu, J., Yuan, W., Wang, Y., Yue, B., & Qu, X. (2022). Reliable diagnostic tests and thresholds for preoperative diagnosis of non-inflammatory arthritis periprosthetic joint infection: A meta-analysis and systematic review. *Orthopaedic Surgery*. https://doi.org/10.1111/os.13500

Tarabichi, S., Goh, G. S., Baker, C. M., Chisari, E., Shahi, A., & Parvizi, J. (2023). Plasma d-dimer is noninferior to serum c-reactive protein in the diagnosis of periprosthetic joint infection. *Journal of Bone and Joint Surgery*, *Publish Ahead of Print*. https://doi.org/10.2106/jbjs.22.00784

Tarannum, N., Divya, D., & Gautam, Y. K. (2019). Facile green synthesis and applications of silver nanoparticles: A state-of-the-art review. *RSC Advances*, *9*(60), 34926–34948. https://doi.org/10.1039/c9ra04164h

Tejamaya, M., Römer, I., Merrifield, R. C., & Lead, J. R. (2012). Stability of citrate, PVP, and PEG coated silver nanoparticles in ecotoxicology media. *Environmental Science & Technology*, *46*(13), 7011–7017. https://doi.org/10.1021/es2038596

ThermoFisher. (2024a, sierpień). *Charakterystyka spektralna znaczników ThermoFisher DyLight 488 NHS Ester, DyLight 594 NHS Ester, oraz DyLight 650 NHS Ester, wygenerowana w konfiguratorze na stronie producenta*. https://www.thermofisher.com/order/fluorescence-spectraviewer#!/.

ThermoFisher. (2024b, sierpień). *Katalog fluoroforów ThermoFisher*. http://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/brochures/1602361-Fluorescent-Products-Guide.pdf.

ThermoFisher. (2024c, sierpień). *Procedura znakowania białek zalecana przez producenta fluoroforów Dylight Thermofisher*. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0011595_DyLight_AmineReactive_Dye_UG.pdf.

Thompson, J. M., Saini, V., Ashbaugh, A. G., Miller, R. J., Ordonez, A. A., Ortines, R. V., Wang, Y., Sterling, R. S., Jain, S. K., & Miller, L. S. (2017). Oral-Only linezolid-rifampin is highly effective compared with other antibiotics for periprosthetic joint infection. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, *99*(8), 656–665. https://doi.org/10.2106/jbjs.16.01002

Tittl, A., Mai, P., Taubert, R., Dregely, D., Liu, N., & Giessen, H. (2011). Palladium-Based plasmonic perfect absorber in the visible wavelength range and its application to hydrogen sensing. *Nano Letters*, *11*(10), 4366–4369. https://doi.org/10.1021/nl202489g

Toossi, N., Adeli, B., Rasouli, M. R., Huang, R., & Parvizi, J. (2012). Serum white blood cell count and differential do not have a role in the diagnosis of periprosthetic joint infection. *The Journal of Arthroplasty*, *27*(8), 51–54.e1. https://doi.org/10.1016/j.arth.2012.03.021

Tsai, T.-T., Huang, T.-H., Ho, N. Y.-J., Chen, Y.-P., Chen, C.-A., & Chen, C.-F. (2019). Development of a multiplex and sensitive lateral flow immunoassay for the diagnosis of periprosthetic joint infection. *Scientific Reports*, *9*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-019-52051-6

Tschmelak, J., Kumpf, M., Kappel, N., Proll, G., & Gauglitz, G. (2006). Total internal reflectance fluorescence (TIRF) biosensor for environmental monitoring of testosterone with commercially available immunochemistry: Antibody characterization, assay development and real sample measurements. *Talanta*, *69*(2), 343–350. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.09.048

Tsitko, H., Dudzińska, P., Milanowska, M., Grudzińska, A., & Jarosz, D. (2022). The diagnosis of periprosthetic joint infection after the arthroplasty of knee joint. *Journal of Education, Health and Sport*, *13*(2), 131–135. https://doi.org/10.12775/jehs.2023.13.02.018

Ullah Khan, S., Saleh, T. A., Wahab, A., Ullah Khan, M. H., Khan, D., Ullah Khan, W., Rahim, A., Kamal, S., Ullah Khan, F., & Fahad, S. (2018). Nanosilver: New ageless and versatile biomedical therapeutic scaffold. *International Journal of Nanomedicine*, *Volume 13*, 733–762. https://doi.org/10.2147/ijn.s153167

Valeur, B. (2001). *Molecular fluorescence: Principles and applications*. Wiley & Sons, Incorporated, John.

Veerachamy, S., Yarlagadda, T., Manivasagam, G., & Yarlagadda, P. K. (2014). Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: A review. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, *228*(10), 1083–1099. https://doi.org/10.1177/0954411914556137

Vidlak, D., & Kielian, T. (2016). Infectious dose dictates the host response during staphylococcus aureus orthopedic-implant biofilm infection. *Infection and Immunity*, *84*(7), 1957–1965. https://doi.org/10.1128/iai.00117-16

Wang, R., Shi, G., Zhang, H., Wang, T., Ren, W., & Jiao, Q. (2023). Globulin and albumin/globulin ratios as potential biomarkers for the diagnosis of acute and chronic peri-prosthetic joint infections: A retrospective study. *Surgical Infections*, *24*(1), 58–65. https://doi.org/10.1089/sur.2022.215

Wang, X., Li, Y., Wang, H., Fu, Q., Peng, J., Wang, Y., Du, J., Zhou, Y., & Zhan, L. (2010). Gold nanorod-based localized surface plasmon resonance biosensor for sensitive detection of hepatitis B virus in buffer, blood serum and plasma. *Biosensors and Bioelectronics*, *26*(2), 404–410. https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.07.121

Wang, Z., Chen, C., Wang, Y., Li, F., Huang, J., Luo, Z., Rao, S., Tan, Y., Liu, Y., Yin, H., Wang, Y., He, Z., Xia, K., Wu, B., Hu, X., Luo, M., Liu, H., Chen, T., Hong, C., ... Xie, H. (2019). Ångstrom-Scale silver particles as a promising agent for low-toxicity broad-spectrum potent anticancer therapy. *Advanced Functional Materials*, *29*(23), 1808556. https://doi.org/10.1002/adfm.201808556

Wiley, B. J., Im, S. H., Li, Z.-Y., McLellan, J., Siekkinen, A., & Xia, Y. (2006). Maneuvering the surface plasmon resonance of silver nanostructures through shape-controlled synthesis. *The Journal of Physical Chemistry B*, *110*(32), 15666–15675. https://doi.org/10.1021/jp0608628

Wu, N. (2011). Electrochemical and optical biosensors based on nanomaterials and nanostructures A Review. *Frontiers in Bioscience*, *S3*(4), 1308–1331. https://doi.org/10.2741/s228

Xu, H., Liu, L., Xie, J., Huang, Q., Lai, Y., & Zhou, Z. (2022). Plasma fibrinogen: A sensitive biomarker for the screening of periprosthetic joint infection in patients undergoing re-revision arthroplasty. *BMC Musculoskeletal Disorders*, *23*(1). https://doi.org/10.1186/s12891-022-05476-6

Xu, H., Xie, J., Yang, J., Huang, Z., & Pei, F. (2021). Role of d-dimer and fibrinogen in the diagnosis of periprosthetic joint infection: A systematic review and meta-analysis. *Orthopaedic Surgery*, *13*(3), 692–700. https://doi.org/10.1111/os.12969

Yang, Y., Murray, J., Haverstick, J., Tripp, R. A., & Zhao, Y. (2022). Silver nanotriangle array based LSPR sensor for rapid coronavirus detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *359*, 131604. https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.131604

Yao, X., Mohammed, Ao, Chen, Kalaichelvan, Girilal & Xiao. (2012). Inactivation of microbial infectiousness by silver nanoparticles-coated condom: A new approach to inhibit HIV- and HSV-transmitted infection. *International Journal of Nanomedicine*, 5007. https://doi.org/10.2147/ijn.s34973

Yguerabide, J., & Yguerabide, E. E. (1998). Light-Scattering submicroscopic particles as highly fluorescent analogs and their use as tracer labels in clinical and biological applications. *Analytical Biochemistry*, *262*(2), 157–176. https://doi.org/10.1006/abio.1998.2760

Young, L. J., Ströhl, F., & Kaminski, C. F. (2016). A guide to structured illumination TIRF microscopy at high speed with multiple colors. *Journal of Visualized Experiments*, (111). https://doi.org/10.3791/53988

Yu, B.-Z., Fu, J., Chai, W., Hao, L.-B., & Chen, J.-Y. (2020). Neutrophil to lymphocyte ratio as a predictor for diagnosis of early Periprosthetic joint infection. *BMC Musculoskeletal Disorders*, *21*(1). https://doi.org/10.1186/s12891-020-03704-5

Zaarour, M., El Roz, M., Dong, B., Retoux, R., Aad, R., Cardin, J., Dufour, C., Gourbilleau, F., Gilson, J.-P., & Mintova, S. (2014). Photochemical preparation of silver nanoparticles supported on zeolite crystals. *Langmuir*, *30*(21), 6250–6256. https://doi.org/10.1021/la5006743

Zahar, A., Klaber, I., Gerken, A.-M., Gehrke, T., Gebauer, M., Lausmann, C., & Citak, M. (2019). Ten-Year results following one-stage septic hip exchange in the management of periprosthetic joint infection. *The Journal of Arthroplasty*, *34*(6), 1221–1226. https://doi.org/10.1016/j.arth.2019.02.021

Zeng, J., Roberts, S., & Xia, Y. (2010). Nanocrystal-Based time–temperature indicators. *Chemistry – A European Journal*, *16*(42), 12559–12563. https://doi.org/10.1002/chem.201002665

Zhang, J., Pitter, M. C., Liu, S., See, C., & Somekh, M. G. (2006). Surface-plasmon microscopy with a two-piece solid immersion lens: Bright and dark fields. *Applied Optics*, *45*(31), 7977. https://doi.org/10.1364/ao.45.007977

Zheng, M., Ruan, S., Liu, S., Sun, T., Qu, D., Zhao, H., Xie, Z., Gao, H., Jing, X., & Sun, Z. (2015). Self-Targeting fluorescent carbon dots for diagnosis of brain cancer cells. *ACS Nano*, *9*(11), 11455–11461. https://doi.org/10.1021/acsnano.5b05575

Zheng, Z., Nguyen, H. L., Hanikel, N., Li, K. K.-Y., Zhou, Z., Ma, T., & Yaghi, O. M. (2022). High-yield, green and scalable methods for producing MOF-303 for water harvesting from desert air. *Nature Protocols*. https://doi.org/10.1038/s41596-022-00756-w

Zielińska, A., Skwarek, E., Zaleska, A., Gazda, M., & Hupka, J. (2009). Preparation of silver nanoparticles with controlled particle size. *Procedia Chemistry*, *1*(2), 1560–1566. https://doi.org/10.1016/j.proche.2009.11.004

Zimmer Biomet. (2024a, sierpień). *Instrukcja testu przepływu bocznego synovasure alpha defensin lateral flow test kit*. https://cddiagnostics.com/assets/pdf/IFU/Lateral%20Flow/Test%20Kit/EN_M40004_Synovasure_Alpha_Defensin_Lateral_Flow_IFU.pdf.

Zimmer Biomet. (2024b, sierpień). *Materiały informacyjne dotyczące testu synovasure alpha defensin lateral flow test*. https://www.zimmerbiomet.com/content/dam/zb-corporate/en/products/specialties/diagnostics/synovasure-alpha-defensin-lateral-flow-test/2468.2-GLBL-en-Synovasure-Lateral-Flow-Test-Brochure.pdf.

Zimmer Biomet. (2024c, sierpień). *Opis charakterystyki testu: Evidence-based comparison of the synovasure® alpha defensin ELISA test and alpha defensin lateral flow test*. https://www.zimmerbiomet.com/content/dam/zb-corporate/en/products/specialties/diagnostics/synovasure-alpha-defensin-lateral-flow-test/23771GLBLenEvidenceBasedComparison.pdf. https://www.zimmerbiomet.com/content/dam/zb-corporate/en/products/specialties/diagnostics/synovasure-alpha-defensin-lateral-flow-test/1314.2-GLBL-en-Synovasure-Reference-Guide.pdf

Zmistowski, B., Della Valle, C., Bauer, T. W., Malizos, K. N., Alavi, A., Booth, R. E., Choong, P., Deirmengian, C., Ehrlich, G. D., Gambir, A., Huang, R., Kissin, Y., & Kobayashi, H. (2014). Diagnosis of periprosthetic joint infection. *Journal of Orthopaedic Research*, *32*(S1), 98–107. https://doi.org/10.1002/jor.22553

7. Spis rysunków, wykresów i tabel

7.1. Spis rysunków

Rysunek 1. Mechanizmy fluorescencji wzmacnianej przez metal 12

Rysunek 2 Wartości współczynnika jakości nanocząstek metali na powierzchni styku metalu z powietrzem 13

Rysunek 3. Schemat przedstawiający procesy w MEF. 14

Rysunek 4. Widma absorpcji nanocząstek srebra (a) oraz koloidów nanopłytek srebra (b-h). 17

Rysunek 5. Przykładowe zdjęcia wykonane techniką elektronowej mikroskopii emisyjnej i skaningowej mikroskopii elektronowej nanocząstek srebra o różnych kształtach 19

Rysunek 6. Widma absorpcji trójkątnych AgNP w roztworach po syntezie redukującej ostrość ich wierzchołków. 19

Rysunek 7. Metody syntezy nanocząsteczek srebra (AgNP). 21

Rysunek 8. Synteza chemiczna AgNP z wykorzystaniem cytrynianu.. 23

Rysunek 9. Schemat biosensora LSPR opartego na światłowodzie. 32

Rysunek 10. Schemat immunoenzymatycznego testu kanapkowego z wykorzystaniem powierzchni pokrytej wyspami nanosrebra (SIF) 34

Rysunek 11. Przykład wzbudzenia przez całą próbkę (epifluorescencja) oraz selektywnego wzbudzenia (TIRF) w mikroskopii fluorescencyjnej. 36

Rysunek 12. Schemat mikroskopu TIR w układzie z pryzmatem nad próbką. 38

Rysunek 13. Tworzenie biofilmu na powierzchni endoprotezy, patogeny najczęściej wywołujące PJI. 43

Rysunek 14. Schemat metody ELISA: bezpośredniej a), pośredniej b) oraz pośredniej „kanapkowej”. 57

Rysunek 15. Schemat protokołu komercyjnego zestawu ELISA do oznaczania peptydów HNP1-3. HNP1-3 ELISA kit, Hycult Biotech. 58

Rysunek 16. Budowa i zasada działania testu immunochromatograficznego. 63

Rysunek 17. Komercyjny zestaw testu Synovasure Alpha Defensin Lateral Flow Test 64

Rysunek 18. Interpretacja wyników testu Synovasure Alpha Defensin Lateral Flow Test. 65

Rysunek 19. Zasada działa multipleksowego testu immunochromatograficznego do jedoczesnej detekcji AD i CRP w płynie stawowym. 69

Rysunek 20. Widma wzorcowe w technice MS MALDI-TOF. 71

Rysunek 21. Schemat sensora wykorzystywanego w pracy badawczej. 74

Rysunek 22. Synteza nanocząstek srebra, reakcja wytrącania jonów srebra z mieszaniny reakcyjnej. 76

Rysunek 23. Synteza nanocząstek srebra, zmiana barwy mieszaniny reakcyjnej podczas podgrzewania. 77

Rysunek 24. Pierwsza wersja układu pomiarowego wykorzystana do badań fotostabilności hiperycyny na syntezowanych nanowarstwach srebra. 80
Rysunek 25. Relacja między donorem i akceptorem w zjawisku FRET..... 81
Rysunek 26. Charakterystyka spektralna fluoroforów wybranych do badań. 82
Rysunek 27. Zestaw dializacyjny wykorzystywany w doświadczeniach..... 86
Rysunek 28. Układ pomiarowy wykorzystywany do testu obecności alfa-defensyn..... 96
Rysunek 29. Szkiełko testowe do szybkiej weryfikacji poprawności geometrycznej układu pomiarowego. 96
Rysunek 30. Wykorzystywany do badań biosensor z naniesionym roztworem przeciwciała wychwytującego na szalce Petriego. 98
Rysunek 31. Widma emisji fluorescencji, zarejestrowane przez detektor OceanOptic. 101
Rysunek 32. Próbka płynu stawowego pobranego od pacjenta po odwirowaniu (z lewej) i zamrożeniu w ciekłym azocie (z prawej). 103
Rysunek 33. Zdjęcia próbek płynu stawowego, pobranych od 14 pacjentów włączonych do badania z podejrzeniem zakażenia okołoprotezowego..... 104
Rysunek 34. Szkiełko nakrywkowe po syntezie nanocząstek srebra. 111
Rysunek 35. Krzywe zaniku fluorescencji dla fluoroforu DyLight 488 niezwiązanego (po lewej) i związanego z przeciwciałami (z prawej)..... 121
Rysunek 36. Krzywe zaniku fluorescencji dla fluoroforu DyLight 594 niezwiązanego (po lewej) i związanego z przeciwciałami (z prawej)..... 121
Rysunek 37. Prezentacja wszystkich zmierzonych i znormalizowanych widm emisji fluorescencji z cel pomiarowych przy sześciu stężeniach AD w próbce 150
Rysunek 38. Zdjęcia kaset wykonanych testów na obecność AD w płynie stawowym Synovasure Alpha Defensin Lateral Flow Test..... 164
Rysunek 39. Tabela limitu detekcji AD dla komercyjnego testu Synovasure Alpha Defensin Lateral Flow Test. 165

7.2. Spis wykresów

Wykres 1. Wzmocnienie emisji fluorescencji hiperycyny na powierzchni nanocząstek srebra 113
Wykres 2. Zmiana intensywność fluorescencji hiperycyny w czasie na szkle i warstwie nanocząstek srebra w funkcji pola pod krzywą (570-800 nm). 114
Wykres 3. Znormalizowany sygnał fluorescencji hiperycyny na srebrze w różnym czasie ekspozycji. 114
Wykres 4. Znormalizowany sygnał fluorescencji hiperycyny na szkle w różnym czasie ekspozycji. 115
Wykres 5. Znormalizowane widmo absorpcji hiperycyny przed i po ekspozycji na szkle. 116
Wykres 6. Zaniki czasów życia fluorescencji hiperycyny naświetlanej laserem przez 6 godzin i nienaświetlanej 117
Wykres 7. Znormalizowane widma absorpcji i emisji fluorescencji dla fluoroforu DyLight 488 związanego z przeciwciałami HNP1-3..... 119

Wykres 8. Znormalizowane widma absorpcji i emisji fluorescencji dla fluoroforu DyLight 594 związanego z przeciwciałami HNP1-3 119

Wykres 9. Znormalizowane widma absorpcji i emisji fluorescencji dla fluoroforu DyLight 650 związanego z przeciwciałami HNP1-3 119

Wykres 10. Porównanie znormalizowanych widm absorpcji i emisji fluorescencji dla fluoroforów Dylight 488, 594 oraz 650 związanych z przeciwciałami 120

Wykres 11. Znormalizowane widmo emisji fluorescencji dla DyLight 488 oraz widma absorpcji i emisji fluorescencji dla DyLight 594 związanych z przeciwciałami. 124

Wykres 12. Znormalizowane widmo emisji fluorescencji dla DyLight 594 oraz widma absorpcji i emisji fluorescencji dla DyLight 650 związanych z przeciwciałami 124

Wykres 13. Znormalizowane widma absorpcji i emisji fluorescencji dla DyLight 594 związanego z alfa-defensyną 125

Wykres 14. Widma emisji fluorescencji dla odziaływania przeciwciało – alfa-defensyna i pary IgG488 – AD594. 127

Wykres 15. Widma emisji fluorescencji dla odziaływania przeciwciało – alfa-defensyna i pary – AD594-IgG650 129

Wykres 16. Przykładowe widma absorpcji wybranych do biosensorów szkiełek z warstwą nanocząstek srebra na powierzchni 134

Wykres 17. Widma emisji fluorescencji przeciwciał wyznakowanych fluoroforem Dylight 594 związanych na celach biosensora na powierzchni szkła i nanowarstwie srebra na szkle..... 140

Wykres 18. Widma emisji fluorescencji testu „kanapkowego" dla przeciwciał wychwytujących i potwierdzających, wyznakowanych Dylight 594 i Dylight 650 po związaniu z AD, zarejestrowane z cel na powierzchni szkła i nanowarstwie srebra na szkle 140

Wykres 19. Widma emisji fluorescencji z cel pomiarowych opracowanego testu AD-MEF przy różnym stężeniu alfa-defensyn w próbce 142

Wykres 20. Znormalizowane widma emisji fluorescencji z cel pomiarowych opracowanego testu AD-MEF przy różnym stężeniu alfa-defensyn w próbce 142

Wykres 21. Obliczone wartość pól pod krzywą ($AUC_{sygnał}$) z widm emisji fluorescencji zarejestrowanych w celach pomiarowych opracowanego testu AD-MEF dla próbek płynu stawowego. 146

Wykres 22. Obliczone wartość pól pod krzywą ($AUC_{sygnał}$) z widm emisji fluorescencji zarejestrowanych w celach pomiarowych opracowanego testu AD-MEF dla pięciu rozcieńczeń płynu stawowego 146

Wykres 23. Krzywa kalibracyjna testu AD-MEF. 152

Wykres 24. Zmierzone i znormalizowane widma emisji fluorescencji z testu AD-MEF, dla próbki płynu stawowego pacjenta numer 2. 154

Wykres 25. Zmierzone i znormalizowane widma emisji fluorescencji z testu AD-MEF, dla próbki płynu stawowego pacjenta numer 3. 154

Wykres 26. Zmierzone i znormalizowane widma emisji fluorescencji z testu AD-MEF, dla próbki płynu stawowego pacjenta numer 4. 155

Wykres 27. Zmierzone i znormalizowane widma emisji fluorescencji z testu AD-MEF, dla próbki płynu stawowego pacjenta numer 5 155

Wykres 28. Zmierzone i znormalizowane widma emisji fluorescencji z testu AD-MEF, dla próbki płynu stawowego pacjenta numer 6 156
Wykres 29. Zmierzone i znormalizowane widma emisji fluorescencji z testu AD-MEF, dla próbki płynu stawowego pacjenta numer 7. 156
Wykres 30. Zmierzone i znormalizowane widma emisji fluorescencji z testu AD-MEF, dla próbki płynu stawowego pacjenta numer 8 157
Wykres 31. Zmierzone i znormalizowane widma emisji fluorescencji z testu AD-MEF, dla próbki płynu stawowego pacjenta numer 9 157
Wykres 32. Zmierzone i znormalizowane widma emisji fluorescencji z testu AD-MEF, dla próbki płynu stawowego pacjenta numer 10 158
Wykres 33. Zmierzone i znormalizowane widma emisji fluorescencji z testu AD-MEF, dla próbki płynu stawowego pacjenta numer 11 158
Wykres 34. Zmierzone i znormalizowane widma emisji fluorescencji z testu AD-MEF, dla próbki płynu stawowego pacjenta numer 12 159
Wykres 35. Zmierzone i znormalizowane widma emisji fluorescencji z testu AD-MEF, dla próbki płynu stawowego pacjenta numer 13 159
Wykres 36. Zmierzone i znormalizowane widma emisji fluorescencji z testu AD-MEF, dla próbki płynu stawowego pacjenta numer 14 160
Wykres 37. Średnie stężenia alfa-defensyn wykrywanych w teście AD-MEF dla grupy 13 pacjentów włączonych do badania. 163

7.3. Spis tabel

Tabela 1. Kryteria diagnostyki PJI 52
Tabela 2. Tabela charakterystyki fluoroforów DyLight NHS Ester. 84
Tabela 3. Widma absorpcji szkiełek z nanocząstkami srebra przechowywanych bez wody. ... 110
Tabela 4. Widma absorpcji szkiełek z nanocząstkami srebra przechowywanych w wodzie dejonizowanej 111
Tabela 5. Zmiana w zależności między położeniem znormalizowanych widm a intensywnością fluorescencji dla długości fali charakterystycznych dla hiperycyny 600 i 650 nm po ekspozycji na światło na szkle i warstwie nanosrebra. 115
Tabela 6. Obliczone czasy życia fluorescencji hiperycyny przed i po 6 h ekspozycji na światło lasera na szkle 116
Tabela 7. Obliczone czasy życia fluorescencji DyLight 488 i 594 w formie związanej i niezwiązanej z przeciwciałem. 121
Tabela 8. Parametry chrakteryzujące wyznakowane przeciwciała wykorzystywane do badań. 122
Tabela 10. Wielkości chrakteryzujące wyznakowane alfa-defensyny fluoroforem Dylight 594 (AD594) 126
Tabela 10. Badanie dynamiki wiązań IgG488 – AD – IgG594 131
Tabela 11. Badanie dynamiki wiązań IgG594 – AD – IgG650 132

Tabela 12. Widma emisji fluorescencji z cel pomiarowych biosensora, dla różnych stężeń przeciwciał wychwytujących i potwierdzających, związanych z alfa-defensynami o stałym stężeniu..... 137

Tabela 13. Obliczone wartości pola powierzchni pod krzywą (AUC_{widmo}) znormalizowanej emisji fluorescencji w zakresie emisji akceptora (650-730 nm), dla różnych stężeń przeciwciał wychwytujących i potwierdzających, związanych z alfa-defensynami o stałym stężeniu..... 138

Tabela 14. Obliczone wartość pól powierzchni pod krzywą (AUC) ze znormalizowanych widm emisji fluorescencji z cel pomiarowych opracowanego testu AD-MEF, przy różnym stężeniu alfa-defensyn w próbce oraz z celi kontrolnej..... 143

Tabela 15. Obliczone wartość pól pod krzywą z widm emisji fluorescencji do wyznaczenia krzywej kalibracyjnej testu AD-MEF przy różnym stężeniu alfa-defensyn w próbce oraz z celi kontrolnej. 151

Tabela 16. Wyniki testu AD-MEF dla próbek płynu stadowego pobranego od 13 pacjentów (pacjenci od 2 do 14)..... 161

Tabela 17. Kliniczna ocena występowania PJI u pacjentów nr 2-7 na podstawie badań diagnostycznych oraz kryteriów ICM 2018 r..... 169

Tabela 18. Kliniczna ocena występowania PJI u pacjentów nr 8-14 na podstawie badań diagnostycznych oraz kryteriów ICM 2018 r..... 170

Tabela 19. Podsumowanie wyników testów na obecność alfa-defensyn w badanej grupie 13 pacjentów z oceną kliniczną występowania PJI..... 171