

VÝVOJ CHYTRÝCH POTENCIOMETRICKÝCH SENZORŮ POTAŽENÝCH VRSTVAMI ODOLNÝMI BIOPASIVACI PRO DETEKCI RANÉHO STÁDIA ZÁNĚTLIVÝCH PROCESŮ KOLEM KLOUBNÍCH NÁHRAD

IRYNA IVANKO, ELENA TOMŠÍK a MARTIN HRUBÝ

Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i., Heyrovského náměstí 2, 162 06 Praha 6, Česká republika
ivanko@imc.cas.cz, mhruby@centrum.cz

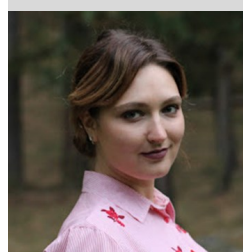
Došlo 8.3.23, přijato 20.3.23. *Nové pohledy na analytickou chemii**

Jedním z problémů při kloubních náhradách jsou komplikace spojené s pooperačními infekcemi. Infekce způsobené bakteriemi, které tvoří biofilmy na površích, se nazývají infekce související s biofilmem (biofilm related infections, BRI). V důsledku následné biologické odezvy organismu dochází k silným patofyziologickým změnám v mikroklimatu kolem takto postiženého povrchu (pokles pH, tvorba různých reaktivních forem kyslíku (ROS), vyčerpání iontů železa a zvýšení koncentrace vápenatých iontů). Vytvořili jsme robustní selektivní polymerní potenciometrický senzor ROS a pH senzor pro detekci změn způsobených sterilním zánětem a bakteriálními a plísňovými infekcemi. Senzor ROS se skládá z vodivé polymerní vrstvy na bázi polythiofenu se zabudovaným komplexem porfyrin-kov, který potenciometricky deteguje přítomnost ROS, jak bylo demonstrováno na peroxidu vodíku. Tento senzor je kovalentně potažen vrstvou odolnou biopasivací (non-biofouling layer, NBL) tvořenou poly(2-methyl-2-oxazolin)em, která funguje jako biokompatibilizátor. Bylo prokázáno, že potenciometrický senzor vykazuje rychlou odezvu na peroxid vodíku, nezaznamenává interferenci s hovězím sérovým albuminem jako modelovým sérovým proteinem a je schopen plně reverzibilně detegovat ROS s lineární odezvou v širokém rozsahu biologicky relevantních koncentrací (od 0,05 μM do 10 μM). Polymerní pH senzor na bázi polyanilinu a poly(2-methyl-2-oxazolinu) na nosiči z titanové slitiny byl vyvinut pro potenciometrickou detekci změn pH v okolí implantátu, aby bylo možné včas detegovat výše uvedené záněty. Vyvinuté elektrody měří změnu pH v rozsahu pH 5 až 8, tedy v rozmezí relevantním pro jednotlivé infekce bakteriemi a kvasinkami.

Klíčová slova: Potenciometrický senzor, vrstva odolná biopasivací, ortopedické implantáty, detekce zánětu a infekce

Úvod

Infekce způsobené bakteriemi, které tvoří biofilmy na površích, se označuje jako infekce související s biofilmem (biofilm-related infections, BRI). Biofilmy jsou tenké vrstvy mikroorganismů pojené jimi sekretovanou extracelulární maticí a skládají se převážně z funkčních amyloidů, proteoglykanů, glykosaminoglykanů a dalších polysacharidů, lipidů a extracelulární DNA (cit.¹). Běžné příklady infekcí souvisejících s biofilmem zahrnují infekce kolem implantátů, jako jsou kloubní náhrady, mechanické srdeční chlopně, prsní implantáty, zavedené katetry, ventrikuloperitoneální sondy atd.² Infekci způsobenou zavedením umělých implantátů lze spolehlivě detegovat současným sledováním řady faktorů, jako jsou pokles pH, tvorba různých reaktivních forem kyslíku (ROS), vyčerpání iontů železa a zvýšení koncentrace vápenatých iontů³. Chronické BRI se vyznačují častými recidivami, rezistencí na antibiotika, složitou a dlouhodobou léčbou, špatnou prognózou, vysokými sociálními a ekonomickými náklady a obtížnou



Iryna Ivanko pracuje jako výzkumná pracovnice na Ústavu makromolekulární chemie AV ČR v.v.i. Titul MSc získala v oboru chemie v roce 2015 na Lvivské Univerzitě. V roce 2017 Iryna Ivanko absolvovala 10 měsíční postgraduální kurz UNESCO & IUPAC na Ústavu makro-molekulární chemie AV ČR v.v.i. a v roce 2022 získala titul Ph.D. na katedře fyzikální a makromolekulární chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. V rámci své Ph.D. práce, Iryna obdržela visegrádské stipendium. Dále měla možnost pracovat na Katedře analytické chemie Abo Univerzity ve Finsku v rámci stipendií EDUFI. Iryna publikovala 12 článků, které získaly 86 citací (HI 6). Její výzkumné zájmy pokrývají potenciometrické senzory a polovodivé polymery pro skladování elektrické energie. Iryna Ivanko získala Cenu Metrohm 2023 za nejlepší publikaci mladého chemika v oblasti elektroanalytické chemie.

diagnózou. Elektrochemické senzory přitahují v posledních letech velkou pozornost díky svým výhodám, jako je jednoduchost, detekce analytu v reálném čase v komplexním prostředí, vysoká citlivost a selektivita, rychlá odezva, možnost miniaturizace a snadné provozní postupy i pro detekci *in vivo*⁴. Kromě vynikajících parametrů pro stanovení důležitých analytů nyní spočívá výzva v převedení těchto senzorů do formátu *in situ* k přímému získávání informací v organismu. V posledních několika letech v tomto směru prokázaly potenciometrické senzory svůj obrovský potenciál⁵.

ROS, zejména peroxid vodíku, jsou v organismu stabilně uvolňovány jako vedlejší produkty řetězce přenosu elektronů nebo působením cytochromu P450. Jsou rovněž zapojeny do zánětlivých reakcí, fagocyty nebo endoteliální buňky jsou schopny zvyšovat koncentrace ROS prostřednictvím NADPH oxidas⁶. Studie ukázaly, že ROS způsobují oxidaci proteinů a lipidů v buněčné membráně patogenů a poškození DNA. Zánětlivé onemocnění tak může rychle postupovat⁷. Lokální změny pH jsou spojeny zejména s bakteriální infekcí, např. pH synoviální tekutiny klesá z 7,5 za aseptických podmínek na 6,7–7,0 u infekci^{2,8}. Zatímco intracelulární pH bakterií je blízké neutrálnímu a zůstává téměř konstantní, aby byla zachována metabolická kapacita a buněčná integrita, extracelulární pH se mění⁹. pH chronické rány se pohybuje od 7,15 do 8,9, zatímco pH při akutní infekci je výrazně nižší¹⁰.

Cílem této práce je příprava robustního selektivního potenciometrického senzoru ROS/pH pomocí tenkých vrstev nanosených na povrch chytrých implantátů, který umožňuje detekci a lokalizaci zánětu v časném stadiu *in situ*. Pro detekci ROS byla použita vodivá polymerní vrstva na bázi polythiofenu se zabudovaným komplexem porfyrin-kov. Citlivý polymerní film pro detekci změny pH byl navržen pomocí polyanilinové vrstvy na $\alpha+\beta$ titanové slitině (Ti-6Al-4V). Oba senzory (ROS/pH) byly chráněny NBL polymerní vrstvou poly(2-methyl-2-oxazolinu) pro biokompatibilizaci.

Experimentální část

Chemikálie

Hexahydrát síranu amonného (98%), mravenčí kyselina (98%), chloroform stabilizovaný amylenem (čistý), chlorid kobaltnatý hexahydrát (98%), chlorid měďnatý, chlorid manganatý monohydrát (> 97%) a 1-methylimidazol (97%), vše od Sigma-Aldrich s.r.o., Praha, ČR. Fosfátem pufrovaný fyziologický roztok (PBS, z tablet, Merck KGaA, Darmstadt, Německo), chlorid sodný, peroxydisíran amonný a anilin (vše Lachner, ČR, p.a.) byly použity bez dalšího čištění.

Přístroje

Polymerizace 5,10,15,20-tetra(thien-3-yl)porfyrinu (3TTP) a elektrochemická charakterizace polymerního

filmu byla provedena pomocí potenciostatu AUTOLAB PGSTAT302N, následně potenciometrické měření poly-3TTP a PANI pak na 6-kanálovém voltmetru s vysokou vstupní impedancí se vstupní impedancí 1010 Ω (Lawson Laboratories, Malvern, PA, USA).

Ramanova spektra filmů poly-3TTP a PANI byla změřena na mikroskopu Via Reflex Raman (Renishaw, UK) s vysoce účinným spektrografem s ohniskovou vzdáleností 250 mm vybaveném laserem Leica DM LM 514 nm. Skenovací elektronová mikroskopie byla realizována na mikroskopu JEOL 6400 (Japonsko).

Rentgenová fotoelektronová spektroskopie byla prováděna pomocí spektrometru K-Alpha+ XPS (ThermoFisher Scientific, UK) pracujícím při základním tlaku $1,0 \cdot 10^{-7}$ Pa. Sběr dat a zpracování bylo provedeno softwarem Thermo Advantage.

Pracovní postupy

Senzor ROS

Elektropolymerizace a charakterizace 3TTP

1,3 milimolu (12 mg) 5,10,15,20(thien-3yl) porfyrinu (3TTP) připraveného podle cit.¹² bylo rozpuštěno ve 4 ml koncentrované mravenčí kyseliny za vzniku zeleného roztoku. Po ultrasonikaci roztoku 3TTP po dobu 10 min byl přidán 0,25mM 1-methylimidazol v dichlormethanu (10 ml). Elektropolymerizace 3TTP byla provedena v tříelektrodovém článku (15 ml). Všechna měření byla provedena při laboratorní teplotě pomocí cyklické voltametrie (CV) s 50 cykly mezi -1 a $1,85$ V s rychlostí polarizace 50 mV s^{-1} . Skelný uhlík (glassy carbon, GC) byl materiálem elektrody, na který byla nanášena měřicí vrstva. Polymerizační roztok byl před každou elektropolymerizací 15 min probublán N_2 . Roztok byl během elektropolymerizace pod inertní atmosférou dusíku. GC elektroda byla testována jako pracovní elektroda (WE), zatímco Pt plech a Ag drát sloužily jako pomocná (CE) resp. referenční (RE) elektroda. Po elektropolymerizaci byly elektrody omyty chloroformem a uloženy v exsikatoru.

Příprava poly-3TTP s kovovým komplexem

Do porfyrinového jádra, které se nachází v tenké vrstvě poly-3TTP, byly zakomplexovány čtyři různé kationty kovů (Fe^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} nebo Mn^{2+}). Do 1 M vodných roztoků $FeCl_2$, $CoCl_2$, $CuCl_2$ nebo $MnCl_2$ byly ponořeny jednotlivé poly-3TTP elektrody na 24 h, aby došlo k chelataci konkrétního kovového kationtu do porfyrinového jádra, a poté omyty vodou a osušeny.

Příprava poly-3TTP-Fe/PMeOx

Na povrch poly-3TTP-Fe bylo naneseno 60 μ l 1,75% roztoku poly(2-methyl-2-oxazolinu) s koncovými 3-thiofenylovými skupinami (PMeOx) v ultračisté vodě (Mili-Q). Elektroda pak byla vysušena při pokojové teplotě přes noc. PMeOx s koncovými 3-thiofenylovými skupinami o číselně střední molekulové hmotnosti $M_n = 2,4$ kDa a disperzitě $D = 1,24$ byl připraven podle postupu

v cit.¹². Kovalentní spojení mezi PMeOx a poly-3TTP-Fe filmem bylo zajištěno pomocí CV v potenciálovém rozmezí $-0,2$ V až 1 V vs. Ag|AgCl při scanovací rychlosti 50 mV s^{-1} , počet scanů 5.

Potenciometrické testování různých snímacích vrstev v přítomnosti H_2O_2

Testovací elektroda byla ponořena do roztoku PBS a ponechána 60 min, aby dosáhla stabilního potenciálu. Poté byl přidán roztok peroxidu vodíku od nejnižší (50 nM) do nejvyšší (10 mM) koncentrace. Změna potenciálu byla zaznamenána po úplném dosažení rovnováhy, tj. po 15 min.

Testování poly-3TTP-Fe/PMeOx v přítomnosti katalasy

Katalasa z hovězích jater (Sigma-Aldrich, Česká republika) o koncentraci $110 \cdot 10^{-6}$ jednotek/l byla rozpuštěna v roztoku PBS a použita pro detekci H_2O_2 pomocí poly-3TTP-Fe/PMeOx snímací vrstvy.

pH senzor

Příprava PMeOx/PANI@Ti-6Al-4V

Příprava filmu PANI byla provedena následovně: Nejprve bylo rozpuštěno 6,09 g NaCl ve 20,3 ml destilované vody; poté byla k roztoku přidána koncentrovaná mravenčí kyselina (HCOOH , 4,7 ml). Připravený roztok byl probublán dusíkem 5 min, poté byl ke směsi přidán anilin (0,1 ml, $4,0 \cdot 10^{-2}$ M) a do roztoku byly umístěny tyčinky slitiny Ti-6Al-4V. Ke směsi byl nakonec přidán vodný roztok (2 ml) peroxydisíranu amonného (APS) (0,228 g, $4,0 \cdot 10^{-2}$ M) jako oxidant. Poměr monomeru k oxidantu byl 1:1. Polymerizace byla prováděna 40 min při ~ 0 °C. Získané elektrody byly pečlivě omyty 5M vodným roztokem mravenčí kyseliny a vysušeny při pokojové teplotě. Postup pro nanášení PANI byl opakován dvakrát, aby byl získán silný PANI film.

Roztok PMeOx (1,75 %) s molekulovou hmotností 2 kDa s koncovou thiofenovou skupinou byl nanesen na povrch polyanilinového filmu. K fixaci vrstvy PMeOx byla použita CV (50 mV s^{-1} , 5 skenů, v potenciálovém rozmezí $-0,2$ V až 1 V vs. Ag|AgCl) v acetonitrilu.

Potenciometrické testování PMeOx/PANI@Ti-6Al-4V

Všechna měření pH byla prováděna v 0,1M NaCl. K úpravě pH byla použita 0,1M HCl nebo 0,1M NaOH. K určení reprodukovatelnosti výsledků bylo použito alespoň 5 elektrod PMeOx/PANI@Ti-6Al-4V. V případě měření pH v přítomnosti proteinů bylo přidáno 0,1 % w/w BSA. Referenční elektrodou byl drát Ag|AgCl (3M KCl) (Monokrystaly, Česká republika).

Výsledky a diskuse

Senzor ROS

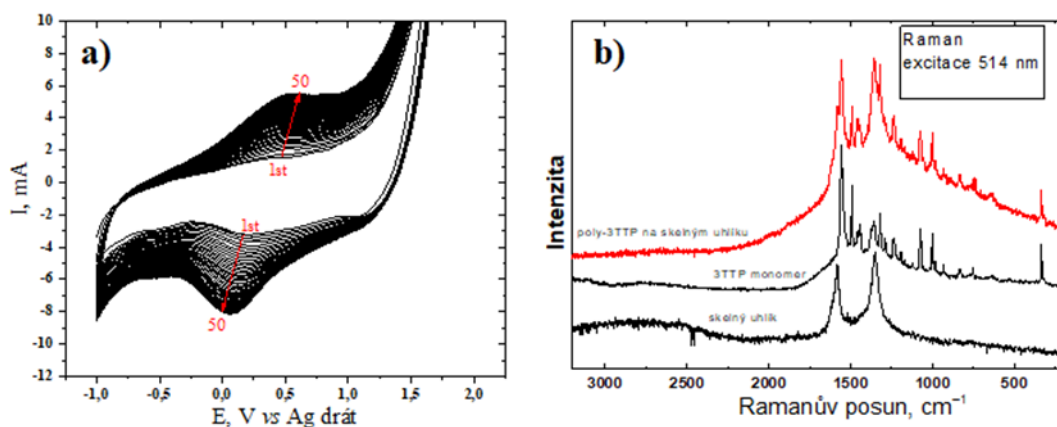
Snímací vrstvy pro detekci ROS byly připraveny elektrochemickou polymerizací 3TTP na GC nosiči. Tvorbu polymerního filmu na povrchu GC lze pozorovat ze čtyřnásobného nárůstu proudové hustoty způsobeného zvýšením počtu depozičních vrstev (obr. 1a). Jak je vidět na obr. 1a, CV křivka monomeru 3TTP má pouze jeden anodický pík ($E_{\text{ox}} = 0,52$ V vs. Ag|AgCl) a jeden katodický pík ($E_{\text{ox}} = 0,1$ V vs. Ag|AgCl). Pro potvrzení tvorby polymerního filmu byla změřena Ramanova spektra polymeru a monomeru (obr. 1b). Tvorba polymerního filmu byla prokázána rozšířením a zesílením Ramanovských signálů odpovídajících monomerům. Valenční vibrace pyrrolového kruhu na porfyrinovém makrocyklu je pozorována při 1320 cm^{-1} a pro poly-3TTP je její intenzita zvýšena¹¹. Charakteristické Ramanovy signály pro thiofenový kruh se nacházejí na vlnových délkách podobných vlnovým délkám porfyriu, proto je obtížné je identifikovat.

Detekce ROS neenzymatickými senzory je výhodná pro praktické aplikace ve srovnání s enzymatickými senzory zejména pro větší robustnost a životnost takových senzorů^{4,13}. Pro detekci ROS byly do porfyrinových derivátů připravených v této studii zakomplexovány vhodné redoxně aktivní ionty přechodných kovů. Za tímto účelem byly poly-3TTP filmy elektrochemicky nanesené na GC ponořeny do odpovídajících roztoků solí kovů na 24 hodin. Porfyriny jsou vynikající chelátory vícevalentních kovů a poly-3TTP-Cu, poly-3TTP-Fe, poly-3TTP-Co a poly-3TTP-Mn tak byly získány po interakci odpovídajících divalentních kovových iontů s porfyrinovým filmem. Přítomnost kovových iontů v porfyriu byla potvrzena měřením fotoelektronovou spektroskopií s vysokým rozlišením¹².

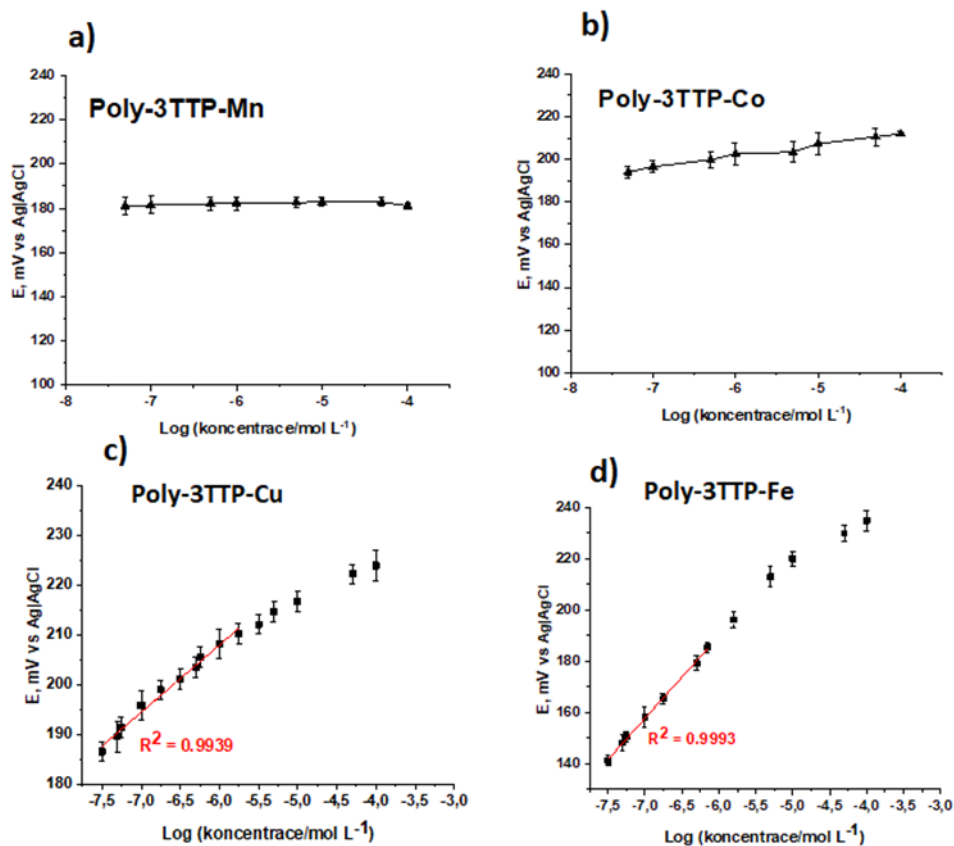
H_2O_2 je významným biomarkerem v patogenezi zánětů a nádorů. V biologických systémech je fyziologický rozsah koncentrací H_2O_2 od 1 do 700 nM, který je nezbytný pro přenos intracelulárního signálu, proliferaci buněk, syntézu proteinů a řízení životních aktivit buňky. V nádorových a zanícených tkáních jsou přítomny řádově vyšší koncentrace. Na základě těchto znalostí byly sestaveny snímací vrstvy poly-3TTP-Me testovány v rozmezí koncentrací H_2O_2 od 50 nM do 100 mM. Jak je vidět na obr. 2a,b, snímací vrstvy poly-3TTP-Mn a poly-3TTP-Co nebyly citlivé na H_2O_2 . Lze to vysvětlit tak, že potenciometrie není pro tyto kovy vhodná metoda pro stanovení H_2O_2 . V literatuře je nejpoužívanější metodou pro detekci H_2O_2 amperometrie, kdy se používají ionty kobaltu a/nebo manganu^{15,16}.

Jak je vidět na obr. 2c,d, pro ionty mědi a železa ve vrstvách poly-3TTP byla pozorována výborná potenciometrická citlivost těchto filmů k peroxidu vodíku.

Citlivost poly-3TTP-Cu a poly-3TTP-Fe se mění lineárně v rozmezí nízkých biologicky relevantních koncentrací, jak je znázorněno na obr. 2c a 2d. Je zřejmé, že při nízkých koncentracích peroxidu vodíku je citlivost



Obr. 1. (a) Elektropolymerizační křivky 5,10,15,20-tetra(thien-3yl) porfyriu (3TTP) na GC; (b) Ramanova spektra (excitační laser 514 nm) poly-3TTP elektrochemicky připraveného na GC (cit.¹²)



Obr. 2. (a) Potenciometrická odezva (potenciální vs. koncentrace) poly-3TTP-Mn snímací vrstvy; (b) snímací vrstva poly-3TTP-Co; (c) poly-3TTP-Cu snímací vrstva; (d) poly-3TTP-Fe snímací vrstva, vše v PBS (pH 7)¹²

filmů lepší, s lineárním rozsahem od 50 nM do 1 μ M a směrnici $13,54 \pm 0,5$ mV/dekáda ($R^2 = 0,9939$) pro poly-3TTP-Cu a s lineárním rozsahem od 50 nM do 10 μ M a směrnici $31,75 \pm 0,5$ mV/dekáda ($R^2 = 0,9995$) pro poly-3TTP-Fe. Snížení citlivosti při vyšší koncentraci peroxidu vodíku vysvětlujeme tím, že molekuly peroxidu vodíku, které reagují s ionty železa nebo mědi v poly-3TTP, musí difundovat do vnitřních vrstev poly-3TTP-Fe nebo poly-3TTP-Cu. Z hodnoty směrnice a lineárního koncentračního rozsahu bylo vyvozeno, že poly-3TTP-Fe má lepší parametry než poly-3TTP-Cu. Vynikající vlastnosti poly-3TTP-Fe jsou nepochybně také způsobeny strukturou filmu (drsnot povrchu), kterou potvrzují měření skenovací elektronovou mikroskopií a rentgenovou difrakcí¹². Proto byl jako snímací vrstva pro další testování zvolen poly-3TTP-Fe. NBL je zásadní pro zabránění interakci mezi objemnými proteiny a upraveným povrchem. V této práci je jako NBL použit tenký film poly(2-methyl-oxazolinu) (PMeOx) kovalentně elektrochemicky připolymerizovaný přes koncové thiofenové skupiny. Citlivost poly-3TTP-Fe/PMeOx v přítomnosti albuminu jako nejběžnějšího interferentu v biologickém prostředí se lineárně mění se širokým rozsahem koncentrace vodíku (od 50 nM do 100 μ M) (viz obr. 3a). Směrnice je $12,84 \pm 0,5$ mV/dekáda ($R^2 = 0,9920$).

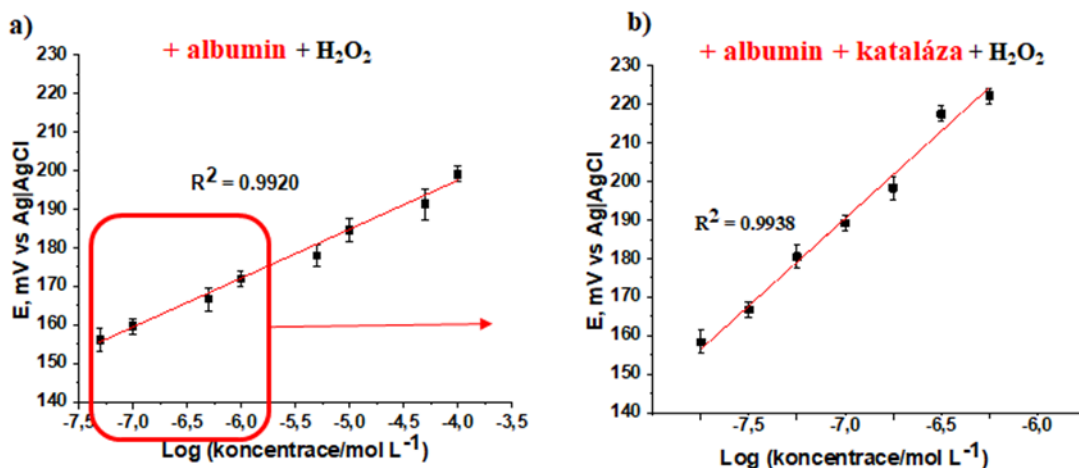
Měření koncentrace H_2O_2 v biologických kapalinách je značně komplikováno velmi krátkým poločasem jeho rozkladu v těchto systémech díky přítomnosti katalasy v krvi a těchto kapalinách obecně a patologicky i v některých případech způsobené produkcí bakteriální katalasy u infekcí. Proto jsme zkoumali účinnost detekce H_2O_2 pomocí poly-3TTP-Fe/PMeOx v přítomnosti katalasy (v biologicky relevantní koncentraci katalasy cca 110 Mu.i. na litr krve¹⁷), výsledky viz obr. 3b. Citlivost filmu poly-3TTP-Fe/PMeOx vůči H_2O_2 v koncentračním rozsahu od

50 nM do 10 μ M je dokonce zlepšena v přítomnosti katalasy, hodnota směrnice je $44,4 \pm 2,2$ mV/dekádu ($R^2 = 0,9938$, $n = 3$), ve srovnání s měřeními bez katalasy (viz obr. 3a a obr. 3b). Jedním z možných vysvětlení zlepšení citlivosti snímací vrstvy poly-3TTP-Fe/PMeOx přidáním katalasy do testovacího roztoku je skutečnost, že mezi katalasou a detekční vrstvou existuje redoxní komunikace, přímá nebo nepřímá přes reaktivnější meziproducty ROS s ultrakrátkým poločasem rozpadu. To mohou být například $\cdot OH$ radikály produkované do určité míry katalasou jako vedlejší produkt rozkladu H_2O_2 (katalasa má určitou menší peroxidasovou aktivitu a naopak). Námí vyvinutý senzorický film poly-3TTP-Fe/PMeOx má tedy slibné parametry pro přesné a citlivé online *in situ* monitorování H_2O_2 . Pro studium selektivity poly-3TTP-Fe/PMeOx vůči H_2O_2 jsme sledovali citlivost této vrstvy vůči chlornanu ClO^- , který je typicky produkován myeloperoxidasou při netože neutrofilů při bakteriálních infekcích.

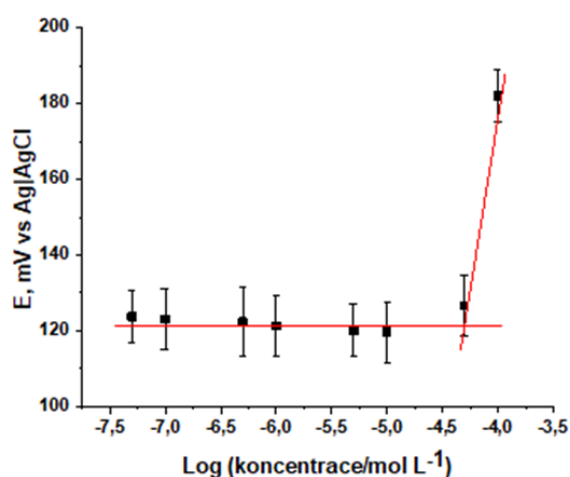
Jak je uvedeno na obr. 4, není žádná odezva poly-3TTP-Fe/PMeOx vůči ClO^- v koncentračním rozsahu od 50 nM do 10 μ M. Pouze pro poslední dvě koncentrace vykazuje poly-3TTP-Fe/PMeOx odezvu. Na druhou stranu, takto vysoké koncentrace nejsou ani patofyziologicky relevantní, protože v zanícených tkáních je koncentrace ClO^- v rozmezí od 50 nM do 5 μ M (cit.^{18,19}). Na základě tohoto výsledku lze dojít k závěru, že sestava naší poly-3TTP-Fe/PMeOx snímací vrstvy je vhodná pro detekci H_2O_2 a přítomnost ClO^- nezhorší její výkon.

pH senzor

Z organických materiálů citlivých na pH je nejslibnější a nejlépe studovaná polyanilin (PANI)^{20–24}. PANI má pKa přesně v relevantním rozsahu hodnot pH pro měření



Obr. 3. (a) Potenciometrická detekce H_2O_2 v PBS (pH 7) pro snímací vrstvu poly-3TTP-Fe/PMeOx v přítomnosti albuminu; (b) poly-3TTP-Fe/PMeOx v přítomnosti albuminu s katalasou¹²

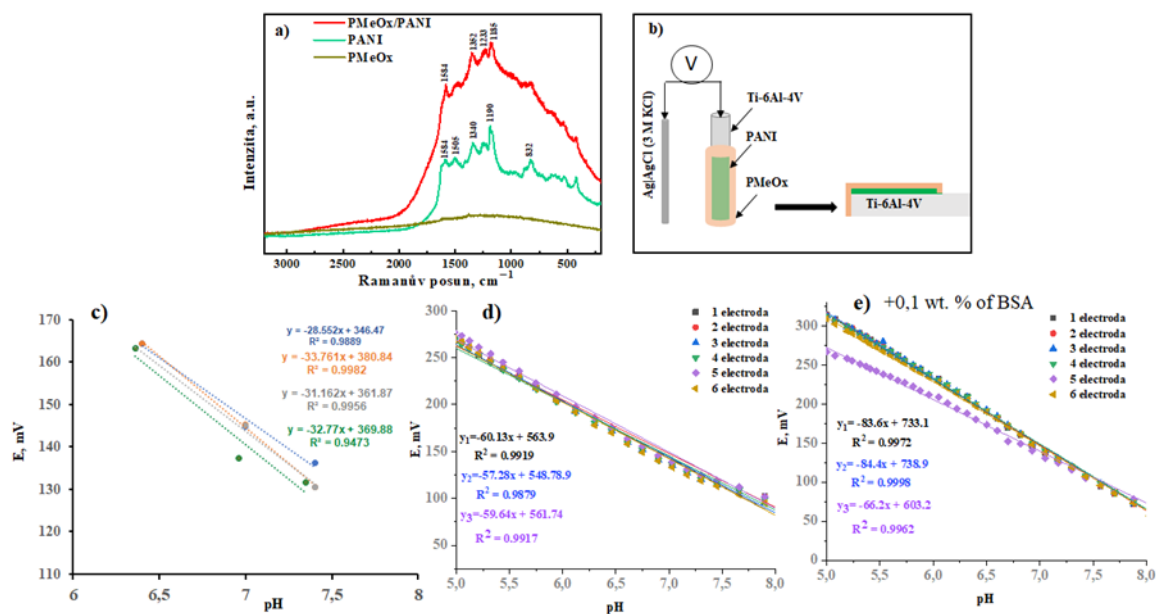


Obr. 4. Potenciometrická detekce ClO⁻ iontů pomocí poly-3TTP-Fe/PMeOx (cit.¹²)

v synoviální tekutině. Nevýhodou PANI je však to, že se obtížně zpracovává, je nebiokompatibilní a má omezenou rozpustnost^{25,26}. Proto je správný výběr syntetického postupu nutný k vytvoření polymerního filmu s reprodukovatelnými vlastnostmi. Depozice PANI byla provedena pomocí chemické oxidační polymerizace²⁷ na α - β titanovou slitinu (Ti-6Al-4V) jako substrát. Tato slitina je běžně používaným konstrukčním materiálem pro ortopedické

implantáty. Pro ochranu senzorkého filmu PANI před adhezí interferujících biomakromolekul byla na PANI@Ti-6Al-4V nanášena NBL vrstva PMeOX, analogicky jako u ROS senzoru (jak je znázorněno na obr. 5b). Chemická struktura jednotlivého filmu PANI, vrstvy PMeOX a kompozitu PMeOX/PANI byla studována Ramanovou spektroskopií s vlnovou délkou excitačního laseru 514 nm a je znázorněna na obr. 5a. Ramanovo spektrum vrstvy PMeOx neobsahovalo žádné pásy spojené s vibračními stavy polymeru, byla zaznamenána pouze fluorescence polythiofenové kostry z koncových thiofenových skupin. Spektrum PANI obsahuje všechny pásy dříve uváděné v literatuře: 1190 cm⁻¹ indikující deformační vibraci C-H, 1340 cm⁻¹ spojené s valenční vibrací polaronické struktury C~N⁺, a 1584 cm⁻¹ deformační vibraci C=C (cit.^{20,21}). Ramanovo spektrum PMeOX/PANI vykazuje oba rysy PANI a také fluorescenci, což je nepřímý důkaz přítomnosti PMeOx.

Nejprve byla změřena potenciometrická pH odezva čistého nosiče Ti-6Al-4V, viz obr. 5c. Bylo prokázáno, že nosič Ti-6Al-4V má citlivost vůči pH -28 mV/pH s linearitou v rozsahu od 6,5 do 7,5, pravděpodobně danou amfoterním charakterem oxidů titanu, hliníku a vanadu v povrchové pasivační vrstvě. Citlivost a lineární odezva vyvinutého PMeOX/PANI@Ti-6Al-4V filmu byla zjištěna pro mnohem širší rozsah pH od 5 do 8, výsledky pro 6 různých elektrod jsou uvedeny na obr. 5d. Všechny 6 stejných elektrod má Nernstovskou odezvu $-59,6$ mV/pH. Bylo zjištěno, že standardní potenciál PMeOX/PANI@Ti-6Al-4V (E^0) je 558,9 mV s dobrou reprodukovatelností



Obr. 5. (a) Ramanova spektra filmů PMeOx, PANI a PMeOx/PANI při vlnové délce excitačního laseru 514 nm, (b) schéma přípravy a struktura elektrody PMeOx/PANI@Ti-6Al-4V pro měření pH, (c) odezva na pH čisté podpory Ti-6Al-4V, (d) odezva snímací vrstvy PMeOx/PANI@Ti-6Al-4V na pH a (e) odezva elektrody PMeOx/PANI@Ti-6Al-4V na pH v přítomnosti BSA (cit.²⁷)

$\pm 8,3$ mV. Takto dobrá reprodukovatelnost standardního potenciálu je žádoucí pro vývoj bezúdržbových, kondicionálních a bezkalibračních senzorů. Rovněž je vysoce reprodukovatelná pH závislost potenciometrické odezvy senzorů. Stabilní a reprodukovatelný potenciál P_{MeOx}/PANI@Ti-6Al-4V je pravděpodobně způsoben synergickým efektem jak podložní matrice Ti-6Al-4V, tak PANI. Pro ověření vlivu NBL P_{MeOx} na potenciometrickou odezvu vrstvy byla provedena měření pH v přítomnosti BSA jako běžného proteinu a výsledky jsou uvedeny na obr. 5e. Potenciálová odezva na změnu pH je lineární v rozmezí koncentrací pH od 5 do 8 se směrnici $-84,4/\text{pH}$ ($R^2 = 0,9998$).

Závěr

V práci jsme navrhli, vyvinuli a otestovali novou generaci implantabilních biosenzorů pro včasnou detekci BRI, která sleduje změny pH a tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS). Snímací vrstva pro detekci ROS sestávala z polyporfyrinu (3TTP) obsahujícího koordinované Fe^{2+} ionty, chráněného NBL tvořenou tenkým filmem poly(2-methyl-2-oxazolinu). Bylo prokázáno, že tento film má schopnost detegovat H_2O_2 potenciometrickou metodou v biologicky relevantním koncentračním rozsahu (od $0,05 \mu\text{M}$ do $10 \mu\text{M}$). Bylo prokázáno, že konkrétní potenciometrický senzor vykazuje rychlou odezvu na peroxid vodíku i v přítomnosti interferujícího hovězího sérového albuminu jako modelového sérového proteinu a v přítomnosti katalasy v biologicky relevantní koncentraci. Dále jsme vyvinuli pH elektrodu založenou na PANI, P_{MeOx} a Ti-6Al-4V, která by mohla být implantovatelným senzorem pro měření pH synoviální tekutiny. Elektroda P_{MeOx}/PANI@Ti-6Al-4V má lineární Nernstovskou odezvu $-59,6/\text{pH}$.

I.I. a E.T. děkují za finanční podporu Zdravotní agentury ČR (NU20–06–00424). M.H. děkuje za finanční podporu Grantové agentury ČR (grant 21–01090S) a programu Strategie AV21 (výzkumný program „Průlomové technologie budoucnosti – senzorka, digitalizace, umělá inteligence a kvantové technologie“, výzkumné téma „Nové korelativní techniky pro analýzu a zobrazování biologických a syntetických polymerních materiálů“).

LITERATURA

- Arciola C. R., Campoccia D., Montanaro L.: *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 397 (2018).
- McLean R. J. C., Lam J. S., Graham L. L.: *J. Bacteriol.* **194**, 6706 (2012).
- Lebeaux D., Ghigo J.-M., Beloin C.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **78**, 510 (2014).
- Zhao S., Zang G., Zhang Y., Liu H., Wang N., Cai S., Wang G.: *Biosens. Bioelectron.* **179**, 113052 (2021).
- Cuartero M., Crespo G. A.: *Curr. Opin. Electrochem.* **10**, 98 (2018).
- Pendyala S., Natarajan V.: *Respir. Physiol. Neurobiol.* **174**, 265 (2010).
- Saran M., Bors W.: *Free Radical Res. Commun.* **7**, 213 (1989).
- Al-Ahmad A., Wiedmann-Al-Ahmad M., Faust J., Bachle M., Follo M., Wolkewitz M., Kohal R.: *J. Biomed. Mater. Res., Part B* **95**, 101 (2010).
- Movafagh S., Crook S., Vo K.: *J. Cell. Biochem.* **116**, 696 (2015).
- Iyer N. V., Kotch L. E., Agani F., Leung S. W., Laughner E., Wenger R. H., Semenza G. L.: *Genes Dev.* **12**, 149 (1998).
- Aydin M.: *Vib. Spectrosc.* **68**, 141 (2013).
- Urbánek T., Ivanko I., Svoboda J., Tomšík E., Hrubý M.: *Sens. Actuators, B* **363**, 131827 (2022).
- Daniels J. S., Pourmand N.: *Electroanalysis* **19**, 1239 (2007).
- Dai H., Lu W., Zuo X., Zhu Q., Pan C., Niu X., Liu J., Chen H.L., Chen X.: *Biosens. Bioelectron.* **95**, 131 (2017).
- Balasubramanian P., Annalakshmi M., Chen S.-M., Sathesh T., Peng T.-K., Balamurugan T. S. T.: *ACS Appl. Mater. Interfaces* **10**, 43543 (2018).
- Manavalan S., Ganesamurthi J., Chen S. M., Veerakumar P., Murugan K.: *Nanoscale* **12**, 5961 (2020).
- Vitai M., Góth L.: *Clin. Chim. Acta* **1**, 35 (1997).
- Li P., Jia Y., Zhao N., Zhang Y., Zhou P., Lou Z., Han K.: *Anal. Chem.* **92**, 12987 (2020).
- Tan H., Wu X., Weng Y., Lu Y., Huang Z.-Z.: *Anal. Chem.* **92**, 3447 (2020).
- Furukawa Y., Ueda F., Hyodo Y., Harada I., Nakajima T., Kawagoe T.: *Macromolecules* **21**, 1297 (1988).
- Tomšík E., Laishevkina S., Svoboda J., Gunar K., Hromádková J., Shevchenko N.: *Sensors* **22**, 2784 (2022).
- Furst A. L., Francis M. B.: *Chem. Rev.* **119**, 700 (2018).
- Settu K., Chen C. J., Liu J. T., Chen C. L., Tsai J. Z.: *Biosens. Bioelectron.* **66**, 244 (2015).
- Ismail R., Šeděnková I., Černochová Z., Romanenko I., Pop-Georgievski O., Hrubý M., Tomšík E.: *Biosensors* **12**, 446 (2022).
- Macdiarmid A. G., Chiang J. C., Huang W., Humphrey B. D., Somasiri N. L. D.: *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **125**, 309 (1985).
- Boeva Z. A., Sergeyev V. G.: *Polym. Sci., Ser. C* **56**, 144 (2014).
- Tomšík E., Gunár K., Krunclová T., Ivanko I., Trousil J., Fojt J., Hrubý M.: *Adv. Mater. Interfaces* **10**, 2201878 (2022).

I. Ivanko, E. Tomšík, and M. Hrubý (*Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic*): **Development of Smart Potentiometric Sensors Covered with Non-biofouling Layer for Detection of Early Stages of Inflammatory Processes Around Joint Replacements**

One of the problems occurring after the joint replacement is connected with the post-surgery infections which are caused by bacteria that form biofilms on surfaces and are referred to as biofilm-related infections (BRI). It is also worth noting that due to the bioresponse, strong pathophysiological changes in the microclimate of an affected surface occur (decrease in pH, formation of various reactive oxygen species (ROS), depletion of Fe ions, and increase in the concentration of Ca ions). In this work we have prepared a robust selective potentiometric sensor of ROS and pH sensor for the detection of pH changes caused by sterile inflammation and bacterial and fungal infections. The ROS sensor consists of a conductive polymer layer based on polythiophene with an incorporated porphyrin-metal complex that potentiometrically detects the presence of ROS (H_2O_2 and ClO^- ions). This sensor is connected by the covalent bonds with a non-biofouling layer of poly(2-methyl-2-oxazoline), which works as a biocompatibilizer. It was shown that the potentiometric sensor shows a rapid response to hydrogen peroxide, does not

record any interference with bovine serum albumin as a model serum protein, and is able to fully reversibly detect ROS with a linear response within a wide range of biological relevant concentrations (from $0.05 \mu\text{M}$ to $10 \mu\text{M}$). The sensing electrode based on polyaniline and poly(2-methyl-2-oxazoline) on a titanium alloy support was developed for the potentiometric detection of peri-implant pH changes to enable early detection of the aforementioned pathologies. The developed electrodes show the changing of pH in the range between 5 and 8 for the individual pathogenic bacteria or pathogenic yeast, with a Nernstian slope of $-59.6/\text{pH}$.

Keywords: potentiometric sensor, nonbiofouling, orthopedic implants, detection of inflammation and infection

Acknowledgements

I.I. a E.T. report financial support was provided by Czech Health Research Council (NU20-06-00424), M.H. reports financial support was provided by Czech Science Foundation (21-01090S), and Strategy AV21 (research program "Breakthrough future technologies – sensors, data, AI and quantum technologies", research topic "New correlative techniques for analysis and imaging of biological and synthetic polymer materials").