

KROPKI KWANTOWE JAKO NARZĘDZIA DIAGNOSTYCZNE

QUANTUM DOTS AS DIAGNOSTIC TOOLS

**Natalia Gruba^{1*}, Wiktoria Rejmak¹, Anita
Romanowska¹, Adam Lesner¹**

¹*Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego,
Ul. Wita Stwosza 63
80-308 Gdańsk*

**e-mail: natalia.gruba@ug.edu.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Zastosowanie kropek kwantowych w diagnostyce chorób nowotworowych
2. Zastosowanie kropek kwantowych w diagnostyce chorób zakaźnych
3. Zastosowanie kropek kwantowych w diagnostyce cukrzycy
4. Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

Dr Natalia Gruba, absolwentka Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, gdzie uzyskała kolejno tytuł zawodowy magistra (2012) oraz doktora nauk chemicznych (2016). Zatrudniona na stanowisku adiunkta w Katedrze Technologii Środowiska UG. Jej badania naukowe dotyczą określania specyficzności substratowej enzymów proteolitycznych, ich optymalizacją oraz wykorzystaniem w poszukiwaniu nowych metod diagnostycznych, przede wszystkim chorób nowotworowych.



<https://orcid.org/0000-0003-3281-9945>

Mgr Wiktoria Rejmak, w 2020 roku uzyskała tytuł zawodowy magistra na kierunku Chemia Uniwersytetu Gdańskiego. Doktorantka Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Gdańskiego o specjalizacji Chemia. W Katedrze Technologii Środowiska, realizuje projekt PRELUDIUM BIS 1, w ramach którego zajmuje się syntezą nowych analogów ludzkiej katolicydyny (LL-37).



<https://orcid.org/0000-0002-2551-6869>

Dr Anita Romanowska, ukończyła studia na kierunku Chemia na Wydziale Chemii UG w 2017 roku, tam również w 2023 roku otrzymała stopień doktora. Obecnie zatrudniona na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, aktualnie na stanowisku asystenta w Katedrze Technologii Środowiska. Jej zainteresowania naukowe dotyczą badań biologicznych peptydomimetyków zawierających sfunkcjonalizowane reszty kwasu L-2,3-diaminopropionowego.



<https://orcid.org/0000-0001-6585-3029>

Prof. dr hab. Adam Lesner, kierownik Pracowni Analityki i Nanodiagnostyki Biochemicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Od wielu lat zajmuje się profilowaniem enzymów proteolitycznych oraz ich wykorzystaniem w diagnostyce. Jego zainteresowania naukowe obejmują również poszukiwania nowych immunomodulatorów, projektowania związków antymikrobytycznych oraz penetrujących błonę komórkową.



<https://orcid.org/0000-0001-8335-3431>

ABSTRACT

The discovery of quantum dots (QDs) was a breakthrough event as it influenced almost every area of our lives. They are used in new technologies, the food industry, clothing production, and finally in medicine. Due to their unique properties, QDs are successfully used in the diagnosis of diseases of various origins - the so-called civilization diseases, infections and cancers. Quantum dots can also serve as tools to monitor the proteolytic activity of enzymes, effectively lowering the detection limit. Our team has been dealing with the proteolytic activity of enzymes for many years, especially in disease diagnosis, for which we also use quantum dots. In this article, we presented the main trends in the use of QDs as diagnostic tools.

Keywords: quantum dots, disease diagnosis, cancerous diseases, infections, diabetes
Słowa kluczowe: kropki kwantowe, diagnostyka chorób, choroby nowotworowe, infekcje, cukrzyca

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

Asp	- kwas asparaginowy
BEL-7402	- linia komórkowa gruczolakoraka szyjki macicy związanego z wirusem brodawczaka ludzkiego
BN-GQD	- grafenowe kropki kwantowe domieszkowane borem i azotem
CCD	- matryca (ang. <i>charge-coupled device</i>)
CK-7	- cytokeratyna-7
CML	- przewlekła białaczka szpikowa
CNPs	- nanocząstek węgla (ang. <i>carbon nanoparticles</i>)
ConA	- konkanawalina
COVID-19	- koronawirus (ang. <i>Corona-Virus-Disease-2019</i>)
CQD	- węglowe kropki kwantowe (ang. <i>carbon quantum dot</i>)
DNA	- kwas deoksyrybonukleinowy
DOX	- doksorubicyna
DPASV	- różnicowa woltamperometria anodowa
dsDNA	- dwuniciowy kwas deoksyrybonukleinowy
ECL	- czujnik elektrochemiluminescencji
ELISA	- test immunoenzymatyczny (ang. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FRET	- bezpromienisty rezonansowy transfer energii (ang. <i>Förster Resonance Energy Transfer</i>)
GQD	- grafenowe kropki kwantowe (ang. <i>graphene quantum dot</i>)
HbA1c	- hemoglobina glikowana
HEK293	- linia komórkowa wywodząca się z ludzkich embrionalnych komórek nerki
HeLa	- linia komórkowa wywodząca się z komórek raka szyjki macicy
HER2-ECD	- domena zewnątrzkomórkowa receptora 2 ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu
HRP	- peroksydaza chrzanowa
IA	- inwazyjna aspergiloza
IgA	- immunoglobulina A
IgG	- immunoglobulina G
K562	- linia komórkowa przewlekłej białaczki szpikowej
LFA	- testy immunologiczne z przepływem bocznym (ang. <i>lateral flow assay</i>)
LNP	- nanocząsteczki polisterenu domieszkowane lantanowcami
MCF-7	- linia komórkowa wywodząca się z komórek estrogenozależnego raka piersi
miRNA	- mikroRNA
MMP-2	- metaloproteinaza macierzy-2
MRI	- rezonans magnetyczny
MTX	- mitoksantronem
N-GQD	- grafenowe kropki kwantowe domieszkowane azotem
PBS	- kwas fenylboronowy
PCR	- reakcja łańcuchowa polimerazy
PET	- pozytonowa tomografia emisyjna
POCT	- testowanie w miejscu opieki nad pacjentem (ang. <i>point of care testing</i>)
RNA	- kwas rybonukleinowy

RT-PCR	- reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją
siRNA	- krótki interferujący kwas rybonukleinowy
SKBR3	- linia komórkowa ludzkiego raka sutka
S-GQD	- grafenowe kropki kwantowe domieszkowane siarką
QD	- kropka kwantowa (ang. <i>quantum dot</i>)
UCPs	- luminoforów fosforanowych konwertujących energię w górę (ang. <i>up-conversion phosphors</i>)
USG	- ultrasonografia

WPROWADZENIE

Kropki kwantowe (ang. *quantum dots*, QDs) to wysoce fluorescencyjne nanokryształy o średnicy od 2 do 10 nm i intensywności widma emisji zależnej od rozmiaru. W ostatnich latach QD ze względu na swoje unikalne właściwości optyczne i fizykochemiczne są coraz szerzej stosowane w celowaniu w komórki, bioobrazowaniu, dostarczaniu leków i diagnostyce chorób [1,2]. Parametry fotoluminescencyjne QD są przestrajalne, a długość fali ich emisji nieliniowo zależy od ich wielkości. Ta z kolei jest kontrolowana przez warunki przygotowania, takie jak: skład roztworu czy czas wzrostu kryształów [3,4,5]. Zaletami QD są: szerokie widmo wzbudzenia, wąskie i ostre widmo emisji, wysoka jasność fluorescencji, odporność na fotowysbielanie samych QD, jak również ich biokoniuugatów oraz wyjątkowo długi czas życia luminescencji. Możliwe jest również przyłączenie cząsteczki dwufunkcyjnej do powierzchni QD, co daje możliwość dostrojenia właściwości optycznych QD, a także służy jako kotwica do przyłączania QD do ligandów kierujących [6]. Do najczęściej stosowanych kropek kwantowych jako nośników substancji biologicznie czynnych należą: siarczki kadmu (CdS QDs), selenek kadmu (CdSe), siarczki cynku (ZnS), tlenek cynku (ZnO), tellurek kadmu (CdTe) i grafen. Według danych literaturowych QD mogą być stosowane do podawania doksorubicyny (DOX), mitoksantronem (MTX), sakwinawiru, daunorubicyny, 5-fluorouracylu [7-10]. Oprócz ukierunkowania leków, QD są również skuteczne w dostarczaniu innych biomolekuł, takich jak cząsteczki siRNA, w celu blokowania ekspresji genów powodujących chorobę [11].

Aby otrzymać efektywny układ kropki kwantowe – substancja biologicznie czynna, należy jednak spełnić pewne wymagania. Po pierwsze, powierzchnia kropek kwantowych musi zostać sfunckjonalizowana oraz dodatkowo należy zoptymalizować ich kształt i wielkość [12]. Kropki kwantowe oddziałują z biocząsteczkami poprzez różnego rodzaju mechanizmy, takie jak: wiązania peptydowe czy mostki disulfidowe, oddziaływania elektrostatyczne, hydrofobowe i van der Waalsa [13]. Modyfikacja powierzchni ułatwia włączenie wielu grup funkcyjnych i zapewnia możliwość dostrojenia i poprawy właściwości powierzchni, takich jak przyczepność, hydrofobowość, a także zapewnia platformę do dalszej modyfikacji chemicznej i syntezy na powierzchni. Typowe grupy funkcyjne QD obejmują kwasy karboksylowe (-COOH), aminy (-NH₂), tiole (-SH), grupy metoksyłowe (-OCH₃), etoksyłowe (-OC₂H₅) i hydroksyłowe (-OH).

Ze względu na swoje charakterystyczne właściwości fotoluminescencyjne i zdolność do wytwarzania biokompatybilnych układów z różnymi biomolekułami, kropki kwantowe wykazują ogromny potencjał do zastosowania przy opracowywaniu nowych testów molekularnych i immunologicznych dla różnych biomarkerów i pato-

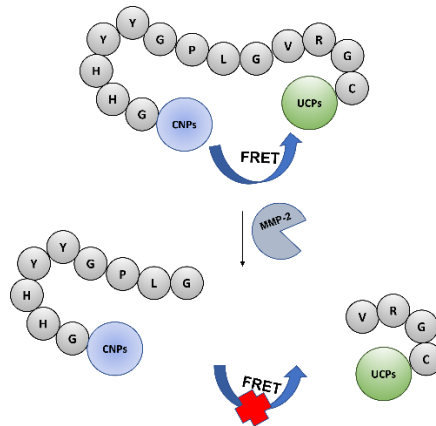
genów. W poniższym artykule przedstawimy przykłady zastosowania kropek kwantowych w diagnostyce.

1. ZASTOSOWANIE KROPEK KWANTOWYCH W DIAGNOSTYCE CHORÓB NOWOTWOROWYCH

Choroby nowotworowe są jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie [14]. Dlatego niezwykle istotne jest poszukiwanie skutecznych metod wykrywania podejrzanych zmian, zwłaszcza na wczesnym etapie choroby, gdy możliwa jest skuteczna terapia. Metody stosowane do diagnozowania nowotworów można podzielić na dwa główne typy: (i) obrazowanie tkanki nowotworowej i badanie histopatologiczne oraz (ii) wykrywanie biomarkerów związanych z nowotworem. Typowe techniki obrazowe obejmują: endoskopię, ultrasonografię (USG), badanie rentgenowskie, obrazowanie fluorescencyjne, rezonans magnetyczny (MRI) i pozytonową tomografię emisyjną (PET) [15]. Wykrywanie biomarkerów związanych z nowotworem obejmuje oznaczanie antygenów, wykrywanie przeciwciał, kwasów nukleinowych, krążących komórek nowotworowych, pęcherzyków zewnątrzkomórkowych i monitorowanie mikrośrodowiska [16]. W ciągu ostatnich dekad zastosowanie QD w diagnostyce nowotworów szybko się rozwinęło. Wykazały one ogromny potencjał zastosowania w obrazowaniu tkanek nowotworowych oraz wykrywaniu biomarkerów i mikrośrodków związanych z nowotworem.

Wang i współpracownicy w 2012 roku zaprojektowali biosensor wykorzystujący zjawisko rezonansowego przeniesienia energii wzbudzenia (FRET) do oznaczania biomarkera nowotworowego, metaloproteinazy macierzy-2 (MMP-2), w próbkach krwi. Użyto $\text{NaYF}_4:\text{Yb}/\text{Er}$ modyfikowanego polietylenoiminą i nanocząstek węgla jako pary donor-akceptor. Zaprojektowana sonda zawierała specyficzną domenę peptydową substratu MMP-2, a jej rozszczepienie przez docelową proteazę oddzielało donor energii od akceptora (ryc.1). To z kolei było podstawą ilościowego oznaczenia MMP-2 [17]. MMP-2 jest zdolna do degradacji kolagenu typu VI i dlatego nie tylko odgrywa kluczową rolę w stanach fizjologicznych i patologicznych, w tym w morfogenezie, reprodukcji i przebudowie tkanek, ale także jest jedną z kluczowych metaloproteinaz zaangażowanych w proces wzrostu, inwazji i powstawania przerzutów w procesie nowotworzenia [18-20]. Zaproponowany homogeniczny biosensor dla MMP-2 oparty na transferze energii rezonansu fluorescencji z luminoforów fosforanowych konwertujących energię w górę (ang. *up-conversion phosphors*, UCPS) do nanocząstek węgla (ang. *carbon nanoparticles*, CNPs) eliminuje zakłócenia tła w złożonych matrycach, takich jak krew czy osocze i umożliwia bezpośrednie zastosowanie czujnika w próbkach biologicznych. Co więcej, elastyczna konstrukcja czujnika zapewnia również możliwość opracowania systemów do wykrywania innych cząsteczek wykorzystujących opisany model. Rok później, nanocząstki $\text{CaF}_2:\text{Ce}/\text{Tb}$

zastosowano do wykrywania receptora aktywatora plazminogenu urokinazy z imponującą granicą wykrywalności ~ 328 pM (podobną poziomem do tej stwierdzanej w ~~poziomach~~ w surowicy pacjentów chorych na raka) [21].



Rysunek 1 Biosensor FRET UCP–peptyd–CNP do wykrywania MMP-2
Figure 1. UCP–peptide–CNP FRET biosensor for MMP-2 detection

W 2020 r. Freitas i współpracownicy wykorzystali QD CdSe/ZnS do opracowania elektrochemicznych immunosensorów, które mogłyby rozpoznawać domenę zewnątrzkomórkową receptora 2 ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu (HER2-ECD), biomarkera komórek raka piersi. W tej metodzie biomarker HER2-ECD izolowano za pomocą unieruchomionych przeciwciał. Następnie do znakowania HER2-ECD zastosowano inny zestaw przeciwciał wstępnie połączonych z QD CdSe/ZnS poprzez interakcję streptawidyna-biotyna. W kolejnym kroku dodano mocny kwas, taki jak HCl, aby ułatwić uwalnianie jonów kadmu z QD CdSe/ZnS, co następnie zmierzono za pomocą różnicowej woltamperometrii anodowej (DPASV) w celu ilościowego określenia ilości biomarkerów komórek nowotworowych [22]. Badania wykazały, że podobne metody są skuteczne w wykrywaniu pochodzących z raka piersi komórek i egzosomów obecnych w ludzkiej surowicy krwi [23,24]. Zatem ten rodzaj nieinwazyjnego wykrywania nowotworów *in vitro* można zastosować do wczesnej diagnostyki.

Ostatnie dwie dekady wiązały się z niezwykłym zainteresowaniem kropkami węglowymi (CQD). W porównaniu do bardziej tradycyjnych markerów (barwniki fluorescencyjne, białka fluorescencyjne i kropki kwantowe), CQD wykazują pewne wysoce pożądane właściwości, takie jak niezwykła stabilność, biokompatybilność, kontrolowaną fotoluminescencję, wyjątkową wydajność katalityczną i łatwą do modyfikowania strukturę chemiczną [25–30]. W rezultacie różne strategie diagnozowania nowotworu (np. metody immunofluorescencyjne [31], obrazowanie fluorescencyjne [32,33] i wykrywanie elektrochemiczne) zostały opracowane w oparciu o CQD. W 2015 r. opracowano sondę do wykrywania raka opartą na kropkach węglowych, sprzężoną z cząsteczką samokierującą Asp (kwas asparagino-

wy), do celowania w nowotwory mózgu. Ten nowy typ kropek węglowych (CQD-Asp) wykazuje nie tylko doskonałą biokompatybilność i przestrajalną emisję pełnokolorowych barw, ale także znaczną zdolność celowania w komórki glejaka C6 bez pomocy jakichkolwiek dodatkowych cząsteczek kierujących. Obrazy fluorescencyjne *in vivo* wykazały biodystrybucję CD-Asp o wysokim kontraście 15 minut po wstrzyknięciu do żyły ogonowej. W miejscu glejaka wykryto znacznie silniejszy sygnał fluorescencyjny niż w niezmiennych nowotworowo komórkach mózgu. Wskazuje to na zdolność CQD-Asp do swobodnego przenikania przez barierę krew-mózg i precyzyjnego celowania w tkankę glejaka [34].

Kilka lat później, w 2019 roku wykorzystano kropki grafenowe (GQD) domieszkowane azotem (N-GQD), siarką (S-GQD) oraz borem i azotem (BN-GQD) do znakowania komórek nowotworowych (komórki HeLa i MCF-7) w porównaniu z komórkami zdrowymi (HEK293). Okazało się, że porównując trzy typy GQD, BN-GQD znacząco wpłynęły na żywotność komórek HeLa, podczas gdy N-GQD i S-GQD nie spowodowały żadnych zmian i okazały się przydatne do celów diagnostycznych [35]. Ponadto stwierdzono, że N-GQD i S-GQD wykazują zmiany widma emisji indukowane pH – barwa niebieska obserwowana w neutralnym pH, a zielona w kwaśnym środowisku. Doniesienia literaturowe wskazują, że komórki nowotworowe i ich mikrośrodowisko są bardziej kwaśne, a zależne od pH zmiany emisji N-GQD i S-GQD są niezwykle przydatne do wykrywania raka. Z kolei BN-GQD nie wykazały różnicy pomiędzy komórkami nowotworowymi a zdrowymi.

Przytoczone przykłady stanowią jedynie niewielki procent zakresu zastosowania kropek kwantowych w diagnostyce chorób nowotworowych. Coraz większa liczba publikacji wskazuje, jak duże zainteresowanie wśród naukowców wzbudza wykorzystanie QD do wczesnego wykrywania zmian nowotworowych. W Tabeli 1 przedstawiono przykłady metod diagnostycznych wykorzystujących kropki kwantowe, stosowanych w diagnostyce chorób nowotworowych.

Tabela 1. Charakterystyka testów opartych na kropkach kwantowych w diagnostyce nowotworów
Table 1. The characteristics of quantum dot-based tests for cancer diagnosis

Typ QD	Komórki docelowe	Zastosowanie	Lit.
MoS ₂ QDs- MXene	egzosomalny miRNA raka żołądka	czujnik elektrochemiluminescencji (ECL)	[36]
CuInS/ZnS	komórki BEL-7402 gruczolakoraka szyjki macicy związanego z wirusem brodawczaka ludzkiego	sonda do obrazowania celowanego	[37]

Nanodruty Au funkcjonalizowane powierzchniowo	cytokeratyna-7 (CK-7)	system wykrywania białek oparty na oddziaływaniu antygen-przeciwciała	[38]
Mn-MoS₂	komórki nowotworowe nerek 786-O	obrazowanie MRI <i>in vivo</i> ;	[39]
		znakowanie fluorescencyjne	
CuInZn_xS_{2+x}	komórki nowotworowe raka piersi SKBR3 HER2-dodatnie	znakowanie <i>in vitro</i>	[40]
CdS	komórki nowotworowe K562 przewlekłej białaczki szpikowej (CML)	biosensor elektrochemiczny	[41]

2. ZASTOSOWANIE KROPEK KWANTOWYCH W DIAGNOSTYCE INFEKCYJ

W ostatnich latach rozprzestrzenianie się chorób wywołanych przez drobnoustroje budzi zaniepokojenie na całym świecie. Wykrywanie tego typu infekcji stało się wyzwaniem dla opieki zdrowotnej ze względu na ich zakaźność i możliwość występowania mutacji. Konwencjonalne metody diagnostyczne, obejmują przede wszystkim techniki mikroskopowe, testy immunoabsorpcyjne ELISA, immunofluorescencję i analizy PCR. Okazały się one istotne klinicznie, ale wykazują także pewne ograniczenia, takie jak niska czułość, niska swoistość, wysoki koszt, czasochłonność procesu, nieprecyzyjne wyniki, zwłaszcza w przypadku wczesnej i szybkiej diagnostyki chorób zakaźnych [42]. Aby przezwyciężyć te ograniczenia, potrzebne są nowe techniki diagnostyczne. Obiecującą opcją wydają się biosensory oparte na QD charakteryzujące się większą czułością i możliwością określenia stopnia zaawansowania choroby. Biomarkery oparte na kropkach kwantowych stanowią nieinwazyjną, czułą i opłacalną alternatywę, wykazują bowiem wysoką stabilność w próbce, wysoką swoistość w wykrywaniu choroby, a także przydatność w diagnostyce jeszcze przed pojawieniem się objawów [43].

W 2018 roku Bhatnagar i współpracownicy zaprojektowali wysoce czuły i selektywny biosensor do diagnozowania inwazyjnej aspergilozy (IA) wywoływanej przez *Aspergillus fumigatus* [44]. Nanobiosensor elektrochemiczny wykrywa zjadliwy gen docelowy glip (glip-T). Sonda czujnika została wytworzona przy użyciu 1,6-heksanoditiolu stabilizowanego chitozanem, do samodzielnego montażu sond glip na złotej elektrodzie za pośrednictwem nanocząstek złota. Zdolność czujnika do wykrywania glip-T analizowano na podstawie reakcji hybrydyzacji i sygnału uzys-

kanego przy użyciu błękitu toluidynowego jako cząsteczki wskaźnikowej. Parametry analityczne zoptymalizowano pod kątem stężenia glip-T, temperatury, czasu reakcji i stężenia błękitu toluidynowego. Okazało się, że nanobiosensor charakteryzuje się wyjątkową granicą wykrywalności wynoszącą: $0,32 \pm 0,01 \times 10^{-14} \text{M}$ i $0,81 \pm 0,01 \times 10^{-14} \text{M}$, odpowiednio w buforze standardowym i próbce rzeczywistej. Czas wykrywania glip-T to zaledwie ≤ 20 minut. Czujnik może być regenerowany siedmiokrotnie, co wskazuje na jego przydatność do ponownego użycia w diagnostyce, a to z kolei czyni go potencjalnym kandydatem do przekształcenia go w zminiaturyzowane urządzenie ręczne do wykrywania glip-T w miejscach opieki zdrowotnej [44].

Inne podejście przedstawił w 2017 roku zespół Liang. Naukowcy zastosowali bioczujnik fluorescencji składający się z CQD i kropek kwantowych tellurku kadmu (CdTe QD) do wykrywania dwuniciowego DNA (dsDNA) wirusa HIV w próbkach osocza. Czujnik składa się z rozpuszczalnych w wodzie fluorescencyjnych kropek węglowych (CQD) i kropek kwantowych z tellurku kadmu (CdTe) pokrytych kwasem 3-merkapropionowym, których maksimum emisji wynosi odpowiednio 435 i 599 nm przy wzbudzeniu pojedynczą falą o długości 360 nm. QD CdTe pokryte kwasem merkapropionowym najpierw połączono z mitoksantronem (MTX), syntetycznym lekiem antrachinonowym, który może zakłócać DNA, powodując wygaszanie czerwonej fluorescencji przy 599 nm w wyniku przeniesienia elektronów pomiędzy QD CdTe i MTX. Z kolei intensywność fluorescencji zielonej CQD pozostaje praktycznie stała, umożliwiając wykrycie dsDNA. Względny stosunek intensywności fluorescencji jest wprost proporcjonalny do stężenia dsDNA w zakresie od 0 do 50 nM, a granica wykrywalności proponowanej metody wynosi 1,0 nM. Co więcej, typowe związki organiczne, w tym aminokwasy, nukleotydy, albumina surowicy bydlęcej, jednoniciowy DNA i RNA, nie powodowały znaczącej interferencji w trybie detekcji. Nowatorski nanosensor jest prosty, szybki i wygodny, ponieważ nie wymaga modyfikacji ani dodatkowych procedur dotyczących badanej próbki [45].

Pandemia COVID-19 pokazała jak istotnym jest dysponowanie szybkimi narzędziami diagnostycznymi, które można zastosować w miejscu opieki zdrowotnej, aby szybko zidentyfikować zakażone osoby. Istniejące metody wykrywania tego typu infekcji są w większości czasochłonne i często charakteryzują się niewystarczającą czułością. Testy w miejscu opieki nad pacjentem (POCT) stanowią obiecującą alternatywę ze względu na łatwość obsługi, szybkość oraz wysoką swoistość i czułość. Badania takie można wygodnie przeprowadzić przy łóżku pacjenta. Kropki kwantowe (QD), znane ze swoich właściwości multimodalnych, wykazały potencjał w zakresie zwalczania czy też hamowania wirusa COVID-19. W połączeniu ze specyficznymi przeciwciałami QD umożliwiają

bardzo czułe wykrywanie antygenów wirusowych w próbkach pacjentów. Konwencjonalne testy immunologiczne z przepływem bocznym (LFA) są szeroko stosowane w badaniach diagnostycznych ze względu na ich prostotę, niski koszt i przenośność. Często jednak brakuje im czułości wymaganej do dokładnego wykrycia niskiego poziomu wirusii. LFA oparte na kropkach kwantowych (QD) okazały się obiecującą alternatywą, oferując znaczny postęp w zakresie czułości i swoistości [46].

W 2020 roku Chen i współpracownicy opracowali szybki i czuły test immunologiczny z przepływem bocznym, który wykorzystuje nanocząsteczki polisterenu domieszkowane lantanowcami (LNP) do wykrywania IgG anty-SARV-CoV-2 w ludzkiej surowicy. Rekombinowaną fosfoproteinę nukleokapsydu SARS-CoV-2 naniesiono na membranę nitrocelulozową w celu wychwytu specyficznej IgG. Mysie przeciwciała przeciw ludzkiej IgG wyznakowano samoorganizującymi się LNP, które służyły jako reporter fluorescencyjny. Do tego testu użyto 100- μ l próbki surowicy (rozcieńczenie 1:1000), a cały proces wykrywania trwał 10 minut. Naukowcy przetestowali próbki z wykorzystaniem odwrotnej transkrypcji RT-PCR i porównali z wynikami uzyskanymi metodą LFA. Okazało się, że jedna z próbek ujemnych została uznana za dodatnią pod względem SARS-CoV-2 IgG, natomiast wyniki dla pozostałych próbek były zgodne z wynikami uzyskanymi metodą RT-PCR. Zaproponowane rozwiązanie pozwala na szybkie i czułe wykrycie przeciwciał IgG anty-SARS-CoV-2 w ludzkiej surowicy i umożliwia określenie zakażenia w podejrzanym przypadku [47].

Rok później zespół badawczy Roda opracował immunosensor LFA z wykorzystaniem nanocząstek złota do wykrywania SARS-CoV-2 IgA w surowicy i ślinie. Rekombinowany antygen nukleokapsydowy specyficznie wychwytuje przeciwciała SARS-CoV-2 w próbkach pacjentów. Znakowana nanozłotem antyludzka IgA ujawnia związaną frakcję IgA, a zastosowana podwójna detekcja kolorymetryczna i chemiluminescencyjna umożliwia niedrogie i ultraczułe oznaczanie. Detekcja kolorymetryczna opiera się na prostym urządzeniu, takim jak aparat w smartfonie i mierzy sygnał koloru dostarczany przez znakowaną antyludzka IgA. Do ultraczułej transdukcji chemiluminescencyjnej używa się z kolei przenośnego urządzenia do obrazowania kontaktowego opartego na chłodzonej matrycy CCD. Dokonuje się pomiaru sygnału świetlnego powstałego w wyniku reakcji znakowanej HRP antyludzkiej IgA z substratem H_2O_2 /luminol/wzmacniacze. Naukowcy przebadali 25 próbek surowicy i 9 próbek śliny pobranych od zakażonych i/lub wyzdrowiałych osób. Analizę przeprowadzono za pomocą kolorymetrycznej LFA, która okazała się wystarczająco czuła i powtarzalna, aby umożliwić półilościowe oznaczenie IgA u osób z silną odpowiedzią serologiczną i we wczesnym stadium COVID-19. Po przejściu na wykrywanie che-

miluminescencji ten sam immunosensor wykazywał wyższą zdolność wykrywania, ujawniając obecność IgA w próbkach śliny u zakażonych osób. U pacjentów objętych badaniem (n = 4) poziom IgA w ślinie korelował z czasem, jaki upłynął od rozpoznania oraz z zaawansowaniem choroby. Zaproponowany immunosensor IgA-LFA może być przydatny do nieinwazyjnego monitorowania wczesnych odpowiedzi immunologicznych na COVID-19 oraz do badania przydatności diagnostycznej/prognostycznej IgA śliny w kontekście badań przesiewowych na dużą skalę w celu oceny skuteczności szczepionek SARS-CoV-2 [48].

Szybka i precyzyjna identyfikacja osób zakażonych pozwala na skuteczną walkę z zakażeniami. Pandemia COVID-19 pokazała jak ważna jest odpowiednia diagnostyka, pozwalająca na izolowanie pacjentów. Jednak rozprzestrzeniające się infekcje to nie tylko wirus SARS-CoV-2, ale również inne drobnoustroje, z którymi świat nauki toczy nieustanną walkę. W Tabeli 2 przedstawiono przykłady metod diagnostycznych wykorzystujących kropki kwantowe, stosowanych w diagnostyce infekcji.

Tabela 2. Charakterystyka testów opartych na kropkach kwantowych w diagnostyce infekcji
Table 2. The characteristics of quantum dot-based tests for infection diagnosis

Patogen	Typ QD	Metoda detekcji	Limit detekcji	Lit.
<i>Clostridium tetani</i>	Cu:Zn-In-S/ ZnS	fluorescencyjne paski testowe z przepływem bocznym	0.001 IU/ml w 30 minut	[49]
<i>Staphylococcus aureus</i>	CdTe	pasek papieru nitrocelulozowego z kropkami kwantowymi z wizualizacją fluorescencyjną	0.5 ng/ mL	[50]
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	CdSe/ZnS	fluorescencyjne paski testowe z przepływem bocznym	12.5 pg/ _L w mniej niż 10 min	[51]
<i>Treponema pallidum</i>	CdTe	fluorescencyjne paski testowe z przepływem bocznym	2 ng/mL	[52]

<i>Escherichia coli</i>	emitujące kolor czerwony kropki kwantowe (Qdot 655)	fluorescencyjne paski testowe z przepływem bocznym	300 komórek [53] z bakteryjnych
-------------------------	---	---	------------------------------------

3. ZASTOSOWANIE KROPEK KWANTOWYCH W DIAGNOSTYCE CUKRZYCY

Cukrzyca jest jednym z największych problemów zdrowia publicznego na całym świecie, stanowiącym globalne obciążenie i wpływającym na rozwój społeczno-gospodarczy. Choć w niektórych krajach zapadalność na cukrzycę zaczęła spadać, to w większości pozostałych krajów rozwiniętych i rozwijających się, częstość występowania choroby wzrosła [54]. Cukrzyca jest też jedną z 10 głównych przyczyn zgonów na świecie. Wraz z chorobami układu krążenia, nowotworami i chorobami układu oddechowego schorzenia te odpowiadają za ponad 80% wszystkich przedwczesnych zgonów spowodowanych chorobami niezakaźnymi [55].

Odpowiednio wczesne rozpoznanie cukrzycy ma kluczowe znaczenie dla optymalnych wyników leczenia pacjentów, a wiarygodne badania diagnostyczne mogą zidentyfikować osoby, u których wczesna interwencja obejmująca zmianę stylu życia lub podejście farmakologiczne może zapobiec dysglikemii, a nawet wystąpieniu choroby. Wyniki badań wykazały, że wczesne leczenie glikemii zapobiega lub opóźnia szereg powikłań związanych z chorobą [56,57]. Konwencjonalne techniki diagnostyki cukrzycy obejmują analizę poziomu glukozy na czczo, poziomu HbA1c (hemoglobiny glikowanej) lub doustne testy tolerancji glukozy. W badaniach klinicznych pomiar autoprzeciwciał jest często stosowany jako test diagnostyczny w celu identyfikacji osób z wysokim ryzykiem rozwoju cukrzycy, a w warunkach klinicznych autoprzeciwciała są czasami wykorzystywane do rozróżnienia osób chorych na cukrzycę typu 1, gdy charakter choroby jest niejasny [58]. Metody te są przez niektórych pacjentów uważane za bolesne, a otrzymane wyniki mogą się różnić w zależności od czynników, takich jak wiek, czas badania czy warunki fizjologiczne [59]. Co więcej, objawy chorobowe, takie jak hiperglikemia, często stają się klinicznie widoczne dopiero po wielu latach od wystąpienia choroby, co uniemożliwia wczesną interwencję [60]. Aby wyeliminować słabe strony tradycyjnych narzędzi diagnostycznych, wykorzystano nanotechnologię, a opracowane testy mają potencjalnie umożliwić wcześniejsze i nieinwazyjne wykrywanie cukrzycy.

W 2008 roku Liao i współpracownicy opracowali czujnik światłowodowy jednorazowego użytku, zwany Sencils™, zapewniający monitorowanie różnych analitów *in vivo* przez kilka tygodni. Kluczowym elementem układu jest przezskórny światłowod, który umożliwia niezawodny spektroskopowy pomiar reakcji chemicznych w nanotechnologicznej matrycy polimerowej przymocowanej do wszczepionego końca światłowodu. Sensor jest oparty na QD sfunkcjonalizowanymi konkanawaliną (ConA), wielkości i elastyczności zbliżonej do włosa, co umożliwia dyskretną implantację w skórę w celu ciągłego monitorowania poziomu glukozy w płynie śródmiąższowym. W skrócie, glukoza swobodnie dyfunduje do czujnika i wiąże się z ConA, co powoduje zmianę fluorescencji, która z kolei koreluje ze stężeniem glukozy. Czujnik ten z powodzeniem można stosować do szybkiego i dokładnego wykrywania zmian stężenia glukozy w zakresie 0 – 500 mg/dl, w warunkach *in vitro* w roztworach fizjologicznych przez okres do 7 tygodni [61].

W 2017 roku Shehab i współpracownicy użyli grafenowe kropki kwantowe sfunkcjonalizowane receptorami kwasu fenyloboronowego (PBS) jako materiał czujnikowy dla nieenzymatycznego optycznego sensora glukozy. GQD uważane są za dobrą sondę wykrywającą ze względu na ich niską toksyczność, wysoką fotoluminancję, rozpuszczalność w wodzie i doskonałe właściwości fotochemiczne. Opracowany czujnik charakteryzuje się liniową odpowiedzią na glukozę w zakresie stężeń 4–40 mM, ze współczynnikiem korelacji na poziomie 0,97 i dolną granicą wykrywalności wynoszącą około 3,0 mM [62]. Dwa lata później grupa badacza Ebrahimiasla zaproponowała zastosowanie nanokompozytów grafenowo-polipirolowych do elektrochemicznego wykrywania insuliny. Metoda pozwala na monitorowanie stężenia insuliny tak niskiego, jak 1 μM , w oparciu o detekcję elektrochemiczną wynikającą z utleniania insuliny. Opracowany czujnik wykorzystano do analizy surowicy krwi ludzkiej [63].

Innowacyjne podejście do problemu ciągłego pomiaru glukozy przez cukrzyków przedstawili portugalscy naukowcy. W ramach projektu NANOTEARS opracowali nieinwazyjne narzędzie do diagnostyki cukrzycy poprzez wykrywanie glukozy *in vitro* we łzach. W porównaniu z innymi płynami ustrojowymi łzy są łatwiej dostępne i mniej podatne na rozcieńczenie niż krew czy płyn śródmiąższowy. Jest to zatem wartościowa alternatywa w porównaniu z koniecznością wielokrotnego nakłuwania palców igłą każdego dnia w celu monitorowania glikemii. Dodatkowo korzystanie z telefonu komórkowego umożliwia systematyczne gromadzenie i zarządzanie zapisami poziomu glukozy w formie elektronicznej, co ma na celu ograniczenie błędów medycznych i poprawę jakości opieki. Proponowana metoda opiera się na wykorzystaniu spektroskopii fluorescencyjnej. Pomiar polega na zmieszaniu łez z substancją zawierającą sfunkcjonalizowane węglowe kropki kwantowe osadzone w mezoporowatej krzemionce, które po oświetleniu przez czujnik optyczny sprzężony

z kamerą smartfona, stają się fluorescencyjne. Im wyższe stężenie glukozy, tym jaśniej świeci próbka [64].

Cukrzyca stała się chorobą przewlekłą, wymagającą szybkiego i dokładnego wykrywania, jak również ciągłego monitorowania. Naukowcy nieustannie pracują nad udoskonaleniem metod wykrywania choroby, a przede wszystkim poszukują takiej, która w nieinwazyjny sposób pozwalałaby na kontrolowanie glikemii. W Tabeli 3 zestawiono przykłady wykorzystania kropek kwantowych w sensorach do pomiaru stężenia glukozy.

Tabela 3. Charakterystyka testów opartych na kropkach kwantowych w diagnostyce cukrzycy
Table 3. The characteristics of quantum dot-based tests for diabetes diagnosis

Próbka biologiczna	Typ QD	Limit detekcji	Lit.
<i>Pot</i>	Cu _x O NFs	0.0791 μM	[65]
<i>Łzy</i>	Fe _x Co _y O ₄ -rGO	0.0791 μM	[66]
<i>Mocz</i>	NiCo ₂ O ₄	0.376 μM	[67]
<i>Ślina</i>	CoNi-N@GaN-3S	5 μM	[68]
<i>Ślina</i>	SWCNT/rGO/CoPc	0.12 μM	[69]
<i>Mocz</i>	CuO-IL/rGO	190 μM	[70]

3. PODSUMOWANIE

Zastosowanie kropek kwantowych w medycynie nie ogranicza się jedynie do diagnostyki, ale również do terapii czy monitorowania stanu pacjenta po wprowadzonym leczeniu. Ponadto QD znajdują zastosowanie w nowoczesnych technologiach czy elektronice. Co więcej, ogromny potencjał kropek kwantowych został doceniony przez Szwedzką Akademię Nauk, która w 2023 roku Nagrodę Nobla w dziedzinie chemii przyznała trzem naukowcom: Mouni G. Bawendi, Louis E. Brus oraz Alexei I. Ekimov – właśnie za odkrycie i syntezę QD [71].

W Pracowni Analityki i Nanodiagnostyki Biochemicznej UG również prowadzimy prace związane z wykorzystaniem kropek kwantowych, przede wszystkim do monitorowania aktywności proteolitycznej określonych enzymów [72,73], którą można skorelować z daną jednostką chorobową. Zastosowanie QD w badaniach enzymatycznych powoduje znaczne zmniejszenie limitu detekcji, co stwarza szanse na opracowanie niezwykle czułych i precyzyjnych narzędzi do określania proteaz w próbkach biologicznych. To z kolei może stanowić podstawę do opracowania nowych narzędzi diagnostycznych wykorzystujących QD.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] D. Onoshima, H. Yukawa, Y. Baba, *Adv Drug Deliv Rev.*, 2015, **95**, 2.
- [2] P. Zrazhevskiy, X. Gao, *Nano Today*, 2009, **4**, 414.
- [3] R. F. Bilan Feury, I. Nabiev, A. Sukhanova, *Bioconjugate Chem.*, 2015, **26**, 609.
- [4] W. Yu, D. Noureldine, T. Isimjan, B. Lin, S. Gobbo, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2015, **17**, 1001.
- [5] I. Robel, V. Subramanian, M. Kuno, P. V. Kamat, *J. Am. Chem. Soc.* 2006, **128**, 2385.
- [6] D.F. Watson, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2010, **1**, 2299.
- [7] Z. Li, W. Xu, Y. Wang, B.R. Shah, C. Zhang, Y. Chen, Y. Li, B. Li. *Carbohydr. Polym.*, 2015, **121**, 477.
- [8] Z. Wang, J. Xia, C. Zhou, B. Via, Y. Xia, F. Zhang, Y. Li, L. Xia, J., Tang, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2013, **112**, 192.
- [9] X. Chen, Y. Tang, B. Cai, H. Fan, *Nanotechnology*, 2014, **25**, 235101.
- [10] J. B. Blanco-Canosa, W. Miao, S. Kimihiro, P. Eleonora, L.J. Travis, E. D. Philip, A.W. Russ, L. M. Igor, *Coordination Chemistry Reviews* 2014, **263**, 101.
- [11] M. V. Yezhelyev, L. Qi, R. M., O'Regan, S. Nie, X. Gao, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 9006.
- [12] M. Z. H. Saad, R. Jahan, U. Bagul, *Asian J. Biomed. Pharm. Sci.*, 2012, **2**, 11.
- [13] P. Malik, S. Gulia, R., Kakkar, *Adv. Mat. Lett.*, 2013, **4**, 811.
- [14] R. L. Siegel, K. D. Miller, H. E. Fuchs, A. Jemal, *CA Cancer J. Clin.*, 2022, **72**, 7.
- [15] N. Listed, *Dukemed Healthnews*. 2010, **16**, 8.
- [16] H. Wang, S. Yang, L. Chen, Y. Li, P. He, G. Wang, H. Dong, P. Ma, G. Ding, *Bioact Mater.*, 2023, **33**, 174.
- [17] Y. Wang, P. Shen, C. Li, Y. Wang, Z. Liu, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 1466.
- [18] G. Giannelli, J. Falk-Marzillier, O. Schiraldi, W. G. Stetler-Stevenson, V. Quaranta, *Science*, 1997, **277**, 225.
- [19] D. R. Edwards, G. Murphy, *Nature*, 1998, **394**, 527.
- [20] J. Fang, Y. Shing, D. Wiederschain, L. Yan, C. Butterfield, G. Jackson, J. Harper, G. Tamvakopoulos, M. A. Moses, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2000, **97**, 3884.
- [21] W. Zheng, S. Zhou, Z. Chen, P. Hu, Y. Liu, D. Tu, H. Zhu, R. Li, M. Huang, X. Chen, *Chem. Int. Ed.*, 2013, **52**, 6671.
- [22] M. Freitas, M. M. P. S. Neves, H. P. A. Nouws, C. Delerue-Matos, *Talanta*, 2020, **208**, 120430.
- [23] M. Freitas, H. P. A. Nouws, E. Keating, V. C. Fernandes, C. Delerue-Matos, *Mikrochim. Acta*, 2020, **187**, 184.
- [24] K. Boriachek, M. N. Islam, V. Gopalan, A. K. Lam, N. T. Nguyen, M. J. A. Shiddiky, *Analyst*, 2017, **142**, 2211.
- [25] X. T. Zheng, A. Ananthanarayanan, K. Q. Luo, P. Chen, P. Small, 2015, **11**, 1620.
- [26] M. J. Molaei, *Talanta*, 2019, **196**, 456.
- [27] Y. F. Wang, A.G. Hu, *J. Mater. Chem.*, 2014, **34**, 6921.
- [28] M. Moniruzzaman, S. D. Dutta, J. Hexiu, K. Ganguly, K.-T. Lim, J. Kim, *Biomater. Sci.*, 2022, **10**, 3527.
- [29] M. Moniruzzaman, S. D. Dutta, K. T. Lim, J. Kim, *Appl. Surf. Sci.*, 2022, **597**, 153630.
- [30] S. D. Dutta, K. Ganguly, J. Hexiu, A. Randhawa, M. Moniruzzaman, K. T. Lim, *Macromol. Biosci.*, 2023, **23**, 2300096.
- [31] Y. J. Li, S. H. Wu, J. J. Zhang, R. H. Zhou, X. X. Cai, *Cell Prolif.*, 2020, **53**, 1.
- [32] M. Zheng, S. B. Ruan, S. Liu, T. T. Sun, D. Qu, H. F. Zhao, Z. G. Xie, H. L. Gao, X. B. Jing, Z. C. Sun, *ACS Nano*, 2015, **9**, 11455.
- [33] X. L. Huang, F. Zhang, L. Zhu, K. Y. Choi, N. Guo, J. X. Guo, K. Tackett, P. Anilkumar, G. Liu, Q. M. Quan, H. S. Choi, G. Niu, Y. P. Sun, S. Lee, X. Y. Chen, *ACS Nano*, 2013, **7**, 5684.
- [34] M. Zheng, S. Ruan, S. Liu, T. Sun, D. Qu, H. Zhao, Z. Xie, H. Gao, X. Jing, Z. Sun, *ACS Nano*, 2015, **9**, 11455.
- [35] E. Campbell, M. T. Hasan, R. Gonzalez Rodriguez, G. R. Akkaraju, A. V. Naumov, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 2019, **5**, 4671.
- [36] Y. Guo, Y. Nie, P. Wang, Z. Li, Q. Ma, *Talanta*. 2023, **259**, 124559.
- [37] E. M. Kim, S. T. Lim, M. H. Sohn, H. J. Jeong, *J. Nanopart. Res.*, 2017, **19**, 251.

- [38] S. J. Patil, A. Zajac, T. Zhukov, S. Bhansali, *Sens. Actuators B Chem.*, 2008, **129**, 859.
- [39] S. Zheng, M. Zhang, H. Bai, M. He, L. Dong, L. Cai, M. Zhao, Q. Wang, K. Xu, J. Li, *Int J Nanomedicine.*, 2019, **14**, 9513.
- [40] M. Michalska, A. Florczak, H. Dams-Kozłowska, J. Gapinski, S. Jurga, R. Schneider, *Acta Biomater.*, 2016, **35**, 293.
- [41] J. Wang, X. Wang, H. Tang, Z. Gao, S. He, J. Li, S. Han, *Biosens Bioelectron.*, 2018, **100**, 1.
- [42] R. G. Kerry, K. E. Ukhrebor, S. Kumari, G. K. Maurya, S. Patra, G. K. Maurya, S. Patra, B. Panigrahi, S. Majhi, J. R. Rout, M. D. P. Rodriguez-Torres, G. Das, H. S. Shin, J. K. Patra, *Biomater Sci.*, 2021, **9**, 3576.
- [43] M. Boissiere, Springer; Berlin, Germany: 2013, 75.
- [44] I. Bhatnagar, K. Mahato, K. K. R. Ealla, A. Asthana, P. Chandra, *Int J Biol Macromol.* 2018, **110**, 449.
- [45] S. S. Liang, L. Qi, R. L. Zhang, M. Jin, Z. Q. Zhang, *Sens. Actuators B Chem.*, 2017, **244**, 585.
- [46] S. M. Mousavi, M. Y. Kalashgrani, A. Gholami, N. Omidifar, M. Binazadeh, W. H. Chiang, *Biosensors (Basel)*, 2023, **13**, 786.
- [47] Z. Chen, Z. Zhang, X. Zhai, Y. Li, L. Lin, H. Zhao, L. Bian, P. Li, L. Yu, Y. Wu, G. Lin, *Anal Chem.* 2020, **92**, 7226.
- [48] A. Roda, S. Cavalera, F. Di Nardo, D. Calabria, S. Rosati, P. Simoni, B. Colitti, C. Baggiani, M., Roda, L. Anfossi, *Biosens Bioelectron.* 2021, **172**, 112765.
- [49] H. M. Meng, J. Chen, L. Qu, Z. Li, *Methods Mol Biol.*, 2020, **2135**, 285.
- [50] H. R. Chandan, M. Venkataramana, M. D. Kurkuri, B. R. Geetha, *Sens. Actuators B Chem.*, 2016, **222**, 1201.
- [51] F. Cimaglia, A. Aliverti, M. Chiesa, P. Poltronieri, E. De Lorenzis, A. Santino, L.A. Sechi, *Nanotechnol. Dev.*, 2012, **2**, 5.
- [52] H. Yang, D. Li, R. He, Q. Guo, K. Wang, X. Zhang, P. Huang, D. Cui, *Nanoscale Res. Lett.* 2010, **5**, 875.
- [53] J. G. Bruno, *Pathogens.*, 2014, **3**, 341.
- [54] X. Lin, Y. Xu, X. Pan, J. Xu, Y. Ding, X. Sun, X. Song, Y. Ren, P. F. Shan, *Sci Rep.*, 2020, **10**, 14790.
- [55] M. H. Forouzanfar, A. Afshin, L. T. Alexander, H. R. Anderson, Z. A. Bhutta, S. Biryukov, M. Brauer et al., *Lancet*, 2016, **388**, 1659.
- [56] D. Control, C. T. R. Group, *Ophthalmology*, 1995, **102**, 647.
- [57] M. Evans, *Lancet*, 1998, **352**, 1932.
- [58] S. E. Regnell, Å. Lernmark, *Diabetologia*, 2017, **60**, 1370.
- [59] A. D. Association, *Diabetes Care*, 2019, **42**, S13.
- [60] D. Bleich, R. A. Jackson, J. S. Soeldner, G. S. Eisenbarth, *Diabetes Care*, 1990, **13**, 111.
- [61] K. C. Liao, T. Hogen-Esch, F. J. Richmond, L. Marcu, W. Clifton, G. E. Loeb, *Biosens Bioelectron.*, 2008, **23**, 1458.
- [62] M. Shehab, S. Ebrahim, M. Soliman, *J. Lumin.*, 2017, **184**, 110.
- [63] S. Ebrahimiasl, E. Fathi, M. Ahmad, *J. Nanomed. Res.*, 2019, **3**, 219.
- [64] W.K. Kipnusu, C. Doñate-Buendía, M. Fernández-Alonso, J. Lancis, G. Mínguez-Vega, *Part. Part. Syst. Charact.*, 2020, **37**, 2000093.
- [65] Z. Yu, H. Wu, Z. Xu, Z. Yang, J. Lv, C. Kong, *Sensors (Basel)*, 2023, **23**, 695.
- [66] F. Zhou, H. Zhao, K. Chen, S. Cao, Z. Shi, M. Lan, *Anal. Chim. Acta.*, 2023, **1243**, 340781.
- [67] S. Chen, D. Zhang, Y. Yang, X. Song, *IEEE Sens. J.*, 2021, **21**, 13074.
- [68] S. Chen, H. Huang, H. Sun, Q. Liu, H. Zhu, J. Zhao, P. Liu, J. Yu, *ACS Appl. Mater. Interfaces.*, 2022, **14**, 49035.
- [69] O. Adeniyi, N. Nwahara, D. Mwanza, T. Nyokong, P. Mashazi, *Sens. Actuators B Chem.*, 2021, **348**, 130723.
- [70] N. Janmee, P. Preechakasedkit, N. Rodthongkum, O. Chailapakul, P. Potiyaraj, N. Ruecha, *Anal. Methods.*, 2021, **13**, 2796.
- [71] All Nobel Prizes 2023 - NobelPrize.org [dostęp 2023-01-15]
- [72] J. Popow-Stellmaszyk, B. Bajorowicz, A. Malankowska, M. Wysocka, T. Klimczuk, A. Zaleska-Medynska, A. Lesner, *Bioconjug Chem.*, 2018, **29**, 1576.

[73] J. Pianka, N. Gruba, A. Lesner, *Bioorg Chem.*, 2023, **133**, 106426.

Praca wpłynęła do Redakcji 26 stycznia 2024 r.

