1. **Imię i nazwisko:** Tomasz Krawczyk
2. **Posiadane dyplomy i stopnie naukowe - z podaniem nazwy, miejsca i daty ich uzyskania oraz tytułu rozprawy:**

- technik chemik o specjalności analiza chemiczna. Technikum Chemiczne Zespołu Szkół Zawodowych w Raciborzu, 20.05.1998, ukończone z wyróżnieniem z wynikiem celującym.

- magister inżynier, kierunek: technologia chemiczna, specjalność: Technologia chemiczna organiczna, 05.09.2002, studia ukończone z wyróżnieniem z wynikiem bardzo dobrym. Politechnika Śląska w Gliwicach, Wydział Chemiczny, Temat pracy magisterskiej: Badania wpływu budowy nadtlenków organicznych na przebieg luminescencyjnej reakcji utleniania luminolu. Promotor: dr hab. inż. Stefan Baj, Profesor Politechniki Śląskiej.

- doktor nauk chemicznych z zakresu chemii, 18.10.2006 r. Politechnika Śląska w Gliwicach, Wydział Chemiczny. Tytuł rozprawy: Badania nad zjawiskiem chemiluminescencji towarzyszącej procesowi utleniania luminolu przez wybrane organiczne substancje nadtlenowe. Praca doktorska wyróżniona uchwałą Rady Wydziału Chemicznego. Promotor: prof. dr hab. inż. Stefan Baj (Politechnika Śląska). Recenzenci: prof. dr hab. inż. Jacek Młochowski (Politechnika Wrocławska) prof. dr hab. Irena Staneczko-Baranowska (Politechnika Śląska).

3. **Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych**

2006 – 2008, asystent, Katedra Technologii Chemicznej Organicznej i Petrochemii, Wydział Chemiczny, Politechnika Śląska

2008 – nadal, adiunkt, Katedra Technologii Chemicznej Organicznej i Petrochemii, Wydział Chemiczny, Politechnika Śląska

Odbyte staże:

1.05.2008 - 30.04.2009 Laboratory of Chemistry of Biofunctional Molecules, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki, Japonia

1.07.2015-1.09.2015 Laboratory of Chemical Biology, Division of Advanced Science and Biotechnology, Department of Material and Life Science, Graduate School of Engineering, Osaka University, Japonia

4. Wskazanie osiągnięcia stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego (zgodnie z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

Osiągnięciem naukowym jest cykl publikacji zatytułowany:

„***Badania nad rozwojem środków kontrastowych i sond molekularnych”***

4a. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe, o którym mowa w art. 16 ust. 2 ustawy

Lp.	**Publikacje wchodzące w skład osiągniecia naukowego**	IF	cytowania	
			niezależne	auto
H1	Facile detection of proteins on a solid-phase membrane by direct binding of dextran-based luminol-biotin chemiluminescent polymer. H. Zhang, T. Shibata, Tomasz Krawczyk, T. Kabashima, J. Lu, M. Lee, M. Kai✉ -Talanta 2009 vol. 79 no. 3, s. 700-705	3,722	5	4
H2	Alginic acid-based macromolecular chemiluminescent probe for universal protein assay on a solid-phase membrane. Tomasz Krawczyk, M. Kondo, M.G. Azam, H. Zhang, T. Shibata, M. Kai✉ -Analyst 2010 vol. 135 iss. 11, s. 2894-2900	3,913	0	1
H3	Carbon nanofiber-based luminol-biotin probe for sensitive chemiluminescence detection of protein. Stefan Baj, Tomasz Krawczyk✉, N. Pradel, M. G. Azam, T. Shibata, S. Dragusha, Krzysztof Skutil, Mirosława Pawlyta, M. Kai -Anal. Sci. 2014 vol. 30 nr 11, s. 1051-1056	1,394	1	0
H4	Chemiluminescence-imaging detection of DNA on a solid-phase membrane by using a peroxidase-labeled macromolecular probe. M. G. Azam, M. Yamasuji, Tomasz Krawczyk, T. Shibata, T. Kabashima, M. Kai✉. -Talanta 2015 vol. 139, s. 138-142	3,545	2	0

H5	Application of response surface methodology (RMS) to the optimization of a post-column luminol chemiluminescence analysis of silyl peroxides. Stefan Baj✉, Roksana Słupska, Tomasz Krawczyk -Talanta 2013 vol. 103, s. 172-178	3,511	7	0
H6	The influence of dioxygen on luminol chemiluminescence. Stefan Baj✉, Tomasz Krawczyk, K. Staszewska. -Luminescence 2009 vol. 24 iss. 5, s. 348-354	1,209	5	1
H7	Applications of chemiluminescence in the teaching of experimental design. Tomasz Krawczyk✉, Roksana Słupska, Stefan Baj. -J. Chem. Educ. 2015 vol. 92 iss. 2, s. 317-321	1,106	1	0
H8	Modified polysaccharides as potential 19F magnetic resonance contrast agents. Tomasz Krawczyk✉, M. Minoshima, F. Sugihara, K. Kikuchi. -Carbohydr. Res. 2016 vol. 428, s. 72-78	1,929	0	0
H9	Linear polymer separation using carbon-nanotube-modified centrifugal filter units. Tomasz Krawczyk✉, K. Marian, Mirosława Pawlyta. -J. Sep. Sci. 2016 vol. 39 iss. 4, s. 725-731	2,737	1	0
	Suma wskaźników:	23,066	21	6

4b. Określenie wkładu autorskiego w cykl publikacji będących podstawą wniosku habilitacyjnego

H1. Mój wkład w powstanie publikacji H1 polegał na postawieniu hipotezy wyjaśniającej mechanizm wykrywania białek przez sondę molekularną opartą o dekstran, polegający na elektrostatycznym oddziaływaniu białko-sonda. Napisałem odpowiednią część omówienia wyników oraz brałem udział w redakcji tekstu publikacji i sformułowaniu odpowiedzi dla recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 20%.

H2. Mój wkład w powstanie publikacji H2 polegał na zaproponowaniu wykorzystania kwasu alginowego w syntezie chemiluminescencyjnej sondy molekularnej do wykrywania białek. Zaplanowałem i wykonałem odpowiednie doświadczenia i dokonałem interpretacji wyników. Napisałem manuskrypt publikacji, przygotowałem część ilustracji i brałem udział w redakcji tekstu publikacji, sformułowaniu odpowiedzi dla recenzentów i przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

H3. Mój wkład w powstanie publikacji H3 polegał na stworzeniu koncepcji chemiluminescencyjnej sondy molekularnej wykorzystującej włókno węglowe jako szkielet. Zaplanowałem odpowiednią drogę syntezy i zakres badań potrzebnych do wykazania skuteczności takiej sondy. Kierowałem pracami laboratoryjnymi ujętymi w tej publikacji. Wyjaśniłem uzyskane wyniki, napisałem tekst publikacji i przygotowałem ilustracje. Prowadziłem korespondencję z redakcją czasopisma i sformułowałem odpowiedzi dla recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

H4. Mój wkład w powstanie publikacji H4 polegał na wysunięciu koncepcji wykorzystania enzymu jako znacznika przeznaczonego dla polimerycznej sondy wykorzystującej polisacharydy jako szkielet i zjawisko chemiluminescencji. Przeprowadziłem wstępne prace polegające na znalezieniu warunków syntezy pozwalających na zachowanie aktywności enzymu. Brałem udział w redakcji i korekcie tekstu publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 20%.

H5. Mój wkład w powstanie publikacji H5 polegał na zaproponowaniu wykorzystania zjawiska chemiluminescencji w analizie sililowych substancji nadtlenowych. Zaproponowałem zakres potrzebnych badań, w szczególności zaplanowałem sposób przeprowadzenia optymalizacji warunków reakcji substancji nadtlenowych z luminolem w warunkach reakcji pokolumnowej. Konsultowałem przebieg wykonania wszystkich badań ujętych w publikacji. Napisałem wstęp literaturowy i część omówienia wyników. Sformułowałem hipotezę dotyczącą zależność intensywności emisji światła od budowy substancji nadtlenowych. Brałem udział w redakcji tekstu publikacji, sformułowaniu odpowiedzi dla recenzentów i przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 55%.

H6. Mój wkład w powstanie publikacji H6 polegał na zaprojektowaniu doświadczenia mającego określić wpływ obecności tlenu cząsteczkowego na zjawisko utleniania luminolu przez substancje nadtlenowe. Zaplanowałem zakres potrzebnych badań, otrzymałam potrzebne do badań substancje, przygotowałem układ pomiarowy i wykonałem samodzielnie część eksperymentów a pozostałe nadzorowałem. Opracowałem i wyjaśniłem uzyskane wyniki, napisałem tekst publikacji. Brałem udział w redakcji tekstu publikacji i sformułowaniu odpowiedzi dla recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

H7. Mój wkład w powstanie publikacji H7 polegał na zaproponowaniu wykorzystania reakcji utleniania luminolu w nauczaniu statystycznego planowania doświadczeń. Podałem możliwe treści odpowiednich zajęć i sposób ich przeprowadzenia. Wykonałem wstępne prace zmierzające do ustalenia warunków prowadzenia doświadczenia laboratoryjnego, tak aby było wykonalne w warunkach laboratorium studenckiego przy minimalnym zapotrzebowaniu na sprzęt i odczynniki. Napisałem większość tekstu publikacji i dokonałem redakcji całości. Prowadziłem korespondencje z redakcją czasopisma i sformułowałem odpowiedzi dla recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

H8. Mój wkład w powstanie publikacji H8 polegał na sformułowaniu koncepcji wykorzystania polisacharydów jako szkieletu w syntezie środka kontrastowego przeznaczonego do obrazowania ^{19}F MRI. Zaproponowałem koncepcję badań zmierzającą do potwierdzania przydatności takich środków w obrazowaniu. Opracowałem drogę syntezy tych środków, otrzymałem i oczyściłem je i zbadałem ich podstawowe właściwości takie jak rozkład mas cząsteczkowych i właściwości NMR. Wyjaśniłem uzyskane wyniki, napisałem większość tekstu publikacji i dokonałem redakcji całości. Prowadziłem korespondencję z redakcją czasopisma i sformułowałem odpowiedzi dla recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

H9. Mój wkład w powstanie publikacji H9 polegał na stworzeniu koncepcji modyfikacji komercyjnych filtrów wirówkowych przy pomocy nanorurek. Wykonałem wstępne badania polegające na otrzymaniu prototypowego filtra oraz na sformułowaniu planu badań nad optymalizacją osadzania warstwy nanorurek i badaniu właściwości gotowych filtrów. Kierowałem odpowiednimi pracami będącymi podstawą pracy magisterskiej Karoliny Marian. Zaplanowałem układ publikacji, wyjaśniłem uzyskane wyniki, napisałem rozdział omówienie wyników i dokonałem redakcji tekstu publikacji. Prowadziłem korespondencję z redakcją czasopisma i sformułowałem odpowiedzi dla recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

4c. omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wprowadzenie

Sondy molekularne są szeroko stosowanym narzędziem w biologii molekularnej i medycynie [1]. Są to różnego rodzaju cząsteczki, które służą między innymi do wykrywania białek, kwasów nukleinowych, lipidów, wybranych jonów metali (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}), czy reaktywnych form tlenu [2]. Zasada działania sond molekularnych opiera się na obecności w cząsteczce sondy dwóch grup funkcyjnych. Są to grupy receptorowe i reporterowe. Pierwsza pozwala na utworzenie trwałego związku lub kompleksu sondy z analitem. Obecność grupy recepotorowej umożliwia wykrycie tak skonstruowanego kompleksu przy pomocy wybranej techniki instrumentalnej [3]. Wykorzystywane są przy tym różne zjawiska fizyczne lub chemiczne takie jak np. emisja promieniowania czy zmiana barwy. Historycznie pierwsze zastosowania sond molekularnych dotyczyły wykrywania białek w testach immunologicznych [4]. W tym wypadku grupę receptorową stanowiło przeciwciało specyficzne dla wykrywanego białka, natomiast grupa reporterowa wykazywała promieniotwórczość. W późniejszym okresie wprowadzono do praktyki grupy reporterowe wykazujące fluorescencję lub chemiluminescencję. Ze względu na to iż detektory światła są bardzo czułe to zastosowanie grup reporterowych tego typu jest korzystne z punktu widzenia osiąganych granic wykrywalności w testach immunologicznych [5].

Ostatnio rozwijanym zagadnieniem jest zastosowanie sond molekularnych, jako inteligentnych środków kontrastowych w diagnostyce obrazowej. Jest to kolejny etap rozwoju diagnostyki medycznej, polegający na uzyskaniu informacji o substancjach i reakcjach zachodzących w tkankach i komórkach oraz o ich lokalizacji w organizmie. Do najbardziej rozpowszechnionych metod obrazowania należą ultrasonografia, rezonans magnetyczny, tomografia komputerowa i pozytonowa tomografia emisyjna [6]. Dostarczają one informacji o budowie obiektów makroskopowych takich jak tkanki czy organy wewnętrzne i ich zmianach patologicznych. Biorąc pod uwagę ogromny postęp w medycynie, do którego przyczyniły się także techniki obrazowania, dalsze rozwijanie tych technik pozwoli zdobyć informacje o budowie i działaniu organizmów żywych na poziomie molekularnym, które ułatwią zarówno diagnostykę, leczenie jak i profilaktykę różnych chorób.

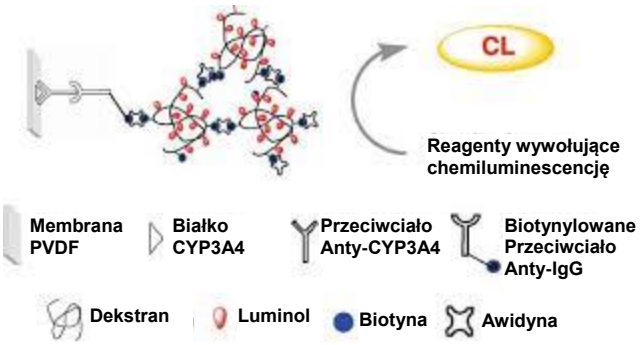
Konstrukcja sond molekularnych, które mogłoby być wprowadzone do organizmu aby po akumulacji w wybranych tkankach lub komórkach dostarczały informacji o zachodzących tam procesach chemicznych jest trudnym zadaniem.

Opis osiągniecia naukowego

Moje osiągnięcie naukowe przedstawione w niniejszym opracowaniu dotyczy rozwoju wielkocząsteczkowych sond molekularnych i zagadnień pokrewnych.

W przypadku sond molekularnych o tradycyjnej budowie jedna cząsteczka sondy może związać się tylko z jedną cząsteczką analitu. Skutkuje to relatywnie niskim sygnałem. Ograniczenie to można przezwyciężyć przez zastosowanie zmultiplikowanej grupy reporterowej. Dzięki temu na jedną wykrywaną cząsteczkę może przypaść wiele cząsteczek, będących źródłem rejestrowanego sygnału.

Propozycję rozwiązania tego problemu przedstawił prof. Kai z Uniwersytetu Nagasaki wykorzystując polisacharyd wielokrotnie podstawiony grupami luminolu oraz biotyny [7]. Luminol miał pełnić rolę chemiluminescencyjnej grupy reporterowej natomiast biotyna grupy receptorowej. Sonda była przeznaczona do wykrywania biotynolowanych przeciwciał w testach immunologicznych przy wykorzystaniu powinowactwa biotyna-awidyna.



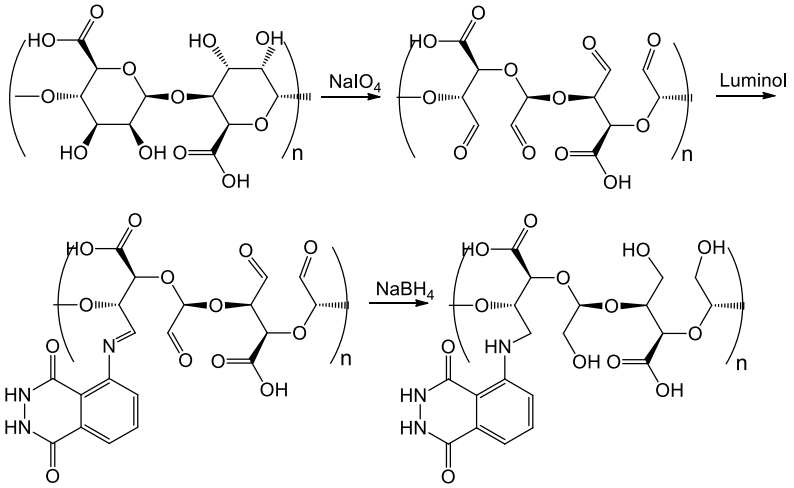
Rys. 1. Zasada działania polimerycznej sondy molekularnej [7]

Taka budowa sondy pozwalała na wzmocnienie sygnału na skutek większej ilości grup luminolu w stosunku do biotyny oraz na możliwość tworzenia się większych agregatów dzięki interakcji awidyna-biotyna. W praktyce pozwalało to na wykrycie modelowego białka CYP3A4 już w ilości 190 fmol (0,5 ng).

Istotnym problemem jaki napotkał prof. Kai było stosunkowo duże nieselektywne powinowactwo sondy do białek jak i do membrany stosowanej jako podłoże. Z tego powodu potencjalny efekt wzmocnienia sygnału przez multiplikacje grupy reporterowej był częściowo niwelowany przez niedostateczną specyficzność. Wymagało to wielokrotnego przemywania membrany w celu usunięcia niespecyficznie związanej sondy [7].

W 2008 roku dzięki stypendium JSPS dołączyłem do grupy prof. Kai gdzie miałem się zająć badaniami tego typu sond. Jednym z problemów jakim zająłem się w Japonii było wykorzystanie sondy opartej o dekstran do wykrywania białek bez wykorzystania przeciwciał. Było to możliwe tylko dla białek o pI w przedziale 8-9, które mogły być wykryte w ilości 25-50 ng. Stwierdziłem, że poza budową białka, skuteczność tej sondy zależała od pH środowiska reakcji sonda-białko [H1]. Wysunąłem więc hipotezę o elektrostatycznym oddziaływaniu sonda-białko przyjmując, że do połączenia sondy z badanym białkiem dochodzi dzięki różnicy ładunków obu substancji w roztworze.

Ze względu na neutralny charakter dekstranu, zastosowanego do syntezy tej sondy uznałem, że lepsze rezultaty można będzie uzyskać zmieniając strukturę sondy, tak aby zwiększyć jej ładunek w roztworze. Z tego względu, że większość białek posiada pI > 4, sonda ta musiała się charakteryzować ujemnym ładunkiem w pH < 4, gdzie białka są zwykle naładowane dodatnio. Syntezę uniwersalnej sondy chemiluminescencyjnej do wykrywania białek oparłem na kwasie alginowym, który jest naturalnym polisacharydem, będącym kopolimerem kwasu D-mannurowego i L-guluronowego, tak więc posiada ładunek ujemny w roztworze wodnym. Synteza sondy została pokazana na Rys. 2.



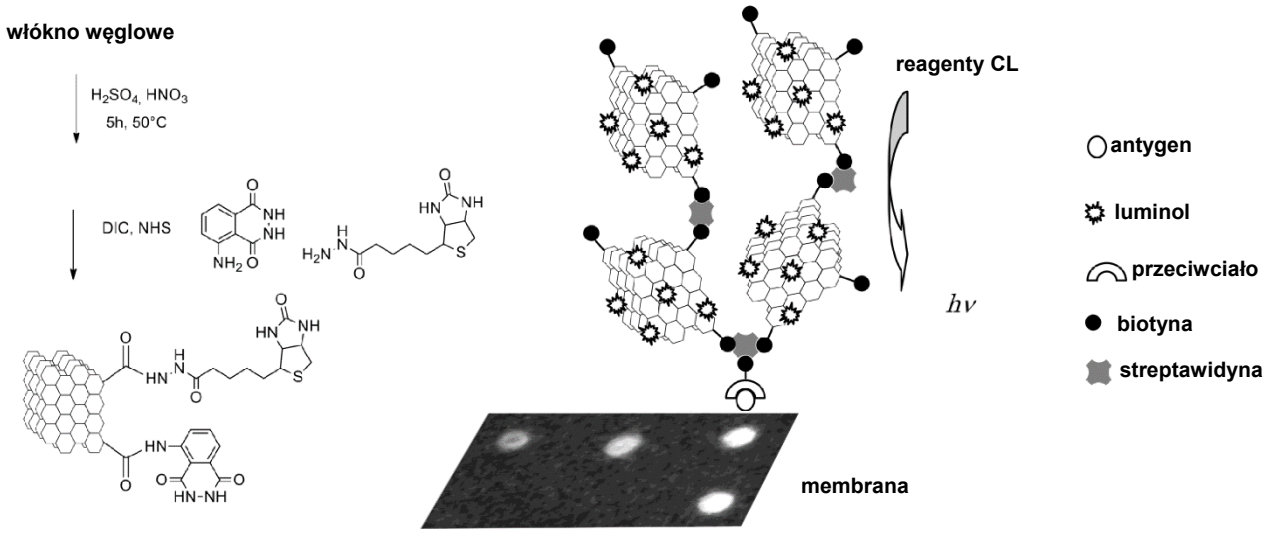
Rys. 2. Przebieg syntezy sondy chemiluminescencyjnej opartej o kwas alginowy

Wicynalne grupy –OH pozwalały na łatwe utlenienie tego kwasu przez $NaIO_4$ i otrzymanie odpowiedniego aldehydu. W porównaniu z kwasem alginowym produkt utleniania był dobrze rozpuszczalny w wodzie a obecność grup aldehydowych pozwalała na łatwe wprowadzenie grup luminolu poprzez utworzenie odpowiedniej iminy. Po redukcji przy pomocy borowodorku sodu i oczyszczeniu przez wytrącenie polimeru z roztworu wodnego przy pomocy acetonitrylu i osuszeniu otrzymywano gotową sondę. Jako modelowe substancje wybrałem białka o pI w zakresie 4.4-11 oraz o masach molowych w przedziale 13-660 kDa. Najlepsze rezultaty uzyskałem gdy pH środowiska reakcji białko-sonda wynosiło około 3. Poniżej tej wartości obserwowałem wzrost poziomu tła, wynikający prawdopodobnie z mniejszej rozpuszczalności sondy w środowisku kwaśnym. Natomiast dla pH > 5 oddziaływanie pomiędzy sondą a większością białek było za słabe. Granica detekcji większości badanych białek wynosiła 15-30 ng białka immbilizowanego na powierzchni membrany wykonanej z PVDF. Wynik ten był porównywalny z innymi szeroko stosowanymi metodami takimi jak np. metoda Bradforda [8]. Sonda charakteryzowała się jednak bardzo dobrą selektywnością i nie wiązała się z innymi testowanymi biocząsteczkami (RNA, DNA, cholesterol), w czym wykazała pewną przewagę w stosunku do klasycznych metod. Wyniki te przewyższały też rezultaty otrzymane dla sondy opartej o dekstran [H2]. Może więc ona zostać wykorzystana do selektywnego wykrywania różnorodnych białek w rutynowej praktyce laboratoryjnej. Szczególnie przydatna mogłaby być dla próbek zawierających zanieczyszczenia utrudniających użycie klasycznych metod kolorymetrycznych [9].

Perspektywicznym zagadnieniem wydawało się poprawienie czułości wykrywania białek przy użyciu tego typu sond molekularnych. Można to było osiągnąć przez obniżenie poziomu sygnału tła. Problem wynikał z istnienia oddziaływania pomiędzy membraną a polisacharydem, przez co pewna ilość modyfikowanego polisacharydu była wiązana przez membranę. Prawdopodobnie było to konsekwencją adsorpcji polisacharydu w porach membrany, z których nie mógł już być łatwo wypłukany bez naruszenia tworzącego się w tym samym czasie kompleksu białko-sonda. Na tej podstawie można było przypuszczać, że użycie innego podłoża do immobilizacji białka, takiego jak szkło albo gładka powierzchnia płytki mikromiareczkowej, mogłoby dać lepsze rezultaty. Innym wyjściem była zmiana materiału konstrukcyjnego sondy na taki, który charakteryzowałby się mniejszym ładunkiem w roztworze, stosunkowo dużym

rozmiarem i dostateczną rozpuszczalnością w wodzie, tak aby utrudniona była penetracja porów membrany.

Opracowaniem odpowiedniej sondy zająłem się po powrocie do Polski kontynuując współpracę z zespołem prof. Kai. Jako materiał konstrukcyjny wybrałem włókna węglowe. Zaletą tego materiału jest łatwość funkcjonalizacji. Sonda miała służyć do selektywnego wykrycia biotynylowanych przeciwciał. Zaproponowana przeze mnie droga syntezy sondy polegała na utlenieniu powierzchni krótkich włókien węglowych (<100 nm) przy pomocy mieszaniny HNO_3/H_2SO_4 i wykorzystanie powstałych powierzchniowych grup -COOH do utworzenia odpowiednich amidów biotyny i luminolu, przy czym na jedną grupę biotyny przypadało około 8 grup luminolu. Koncepcja sondy zakładała także potencjał wzmocnienia sygnału na drodze utworzenia kompleksu makromolekularnego dzięki wiązaniom biotyna-awidyna (Rys. 3). Dzięki zastosowaniu takiego rozwiązania możliwe było selektywne wykrycie około 30 ng biotynylowanego immobilizowanego białka. Ze względu na dużą średnicę sondy w roztworze wynoszącą 57±4 nm jej kontakt z membraną lub wykrywanym białkiem immobilizowanym na membranie jest stosunkowo trudny. Pozwoliło to na poprawę selektywności, obniżenie poziomu tła, ale kosztem wydłużenia czasu tworzenia hybrydy białko-sonda z 30 min (w przypadku polisacharydu) do około 3h [H3].



Rys. 3. Budowa i zasada działania sondy molekularnej zbudowanej z włókna węglowego [H3]

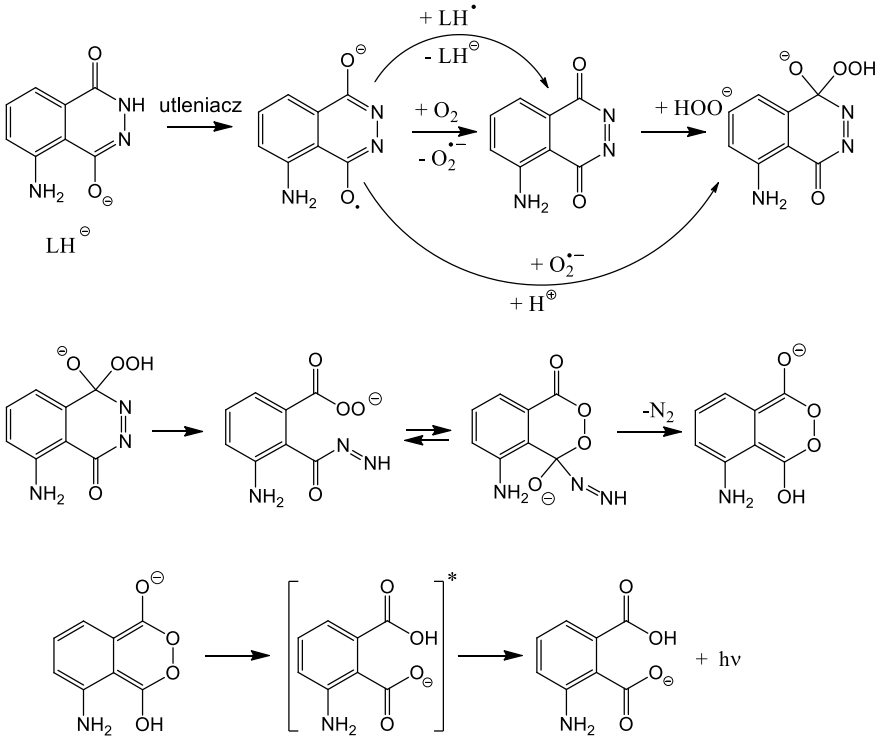
Innym podejściem mającym podnieść czułość detekcji była zmiana sposobu znakowania. Ograniczeniem jest bowiem sam charakter chemiluminescencji luminolu. Jak wiadomo w tej reakcji można uzyskać 1 foton na około 100 cząsteczek luminolu, jakie uległy reakcji [10]. Tak więc liczba fotonów, jakie mogą zostać wyemitowane, stanowi tylko ułamek liczby cząstek luminolu przyłączonej do polimeru.

Z drugiej strony reakcja utleniania luminolu zachodzi wobec katalizatorów takich jak: peroksydaza chrzanowa (HRP), hemina i inne kompleksy żelaza i niektórych innych metali [11]. Wysunąłem więc koncepcję sondy, w której znacznikiem byłby enzym taki jak HRP, natomiast szkielet stanowiłby polisacharyd. Konieczne było opracowanie metody syntezy, w której nie doszłoby do dezaktywacji wrażliwego enzymu. Stwierdziłem, że w przypadku reakcji pomiędzy HRP a utlenionym polisacharydem takim jak dekstran czy kwas alginowy możliwe to było przy utrzymaniu pH w granicach 5-7 we wszystkich etapach procesu i zastosowaniu wody jako rozpuszczalnika. Etap redukcji przy pomocy borowodorku sodowego mógł zostać pominięty gdyż produkt (imina powstała w reakcji utlenionego polisacharydu z HRP) nie ulegał znaczącej hydrolizie w trakcie detekcji. Proponowana sonda ze znacznikiem enzymatycznym oparta o dekstran została użyta do detekcji DNA. Granica detekcji wynosiła 40 ng DNA co potwierdziło skuteczność tej koncepcji budowy sondy [H4].

W późniejszych latach tematyka ta była rozwijana przez zespół profesora Kai z bardzo dobrymi rezultatami. Wykorzystano przy tym reakcje chemiluminescencyjne inne niż utlenianie luminolu.

Użycie dekstranu znakowanego fosfatazą zasadową pozwoliło na osiągnięcie granicy wykrywalności 880 amol biotynylowanego immobilizowanego białka (około 0,1 ng) [12]. Enzym ten katalizuje rozpad pochodnych 1,2-dioksetanu, któremu towarzyszy chemiluminescencja.

Powodem przewagi tej reakcji nad chemiluminescencją luminolu jest najprawdopodobniej mechanizm utleniania luminolu (Rys. 4). Katalizator (np. HRP) uczestniczy tylko w etapie utleniania luminolu do odpowiedniego rodnika, który dalej reaguje już bez udziału katalizatora (Rys. 4). Z tego względu, część fotonów może być generowana poza obszarem, w którym immbilizowana jest wykrywana cząsteczka. Skutkuje to wzrostem poziomu tła. Do takiej sytuacji nie dochodzi wówczas, gdy immobilizowany jest sam luminol, przez co znakowanie HRP lub luminolem mogą dać podobne rezultaty.

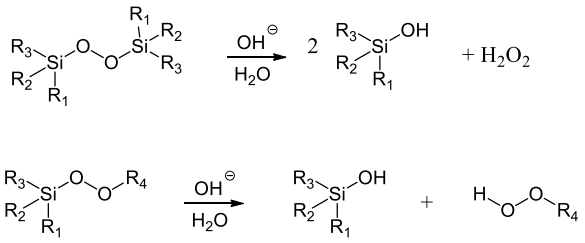


Rys. 4. Mechanizm utleniania luminolu

Uzyskane wyniki skłoniły mnie do przeprowadzenia badań dotyczących detekcji substancji nadtlenowych przy pomocy reakcji utleniania luminolu. Substancje te mają duże znaczenie praktyczne gdyż, są pośrednimi produktami utleniania tlenem cząsteczkowym związków organicznych. W organizmach żywych występują w procesach starzenia [13], tak więc proponowane sondy wykorzystujące luminol mogłyby znaleźć zastosowanie w ich detekcji.

Zgodnie z mechanizmem tego procesu podanym przez zespół Gabora Merenyi [14] (Rys. 4) chemiluminescencja luminolu zachodzi w obecności niemal dowolnego utleniacza, katalizatora, oraz tlenu cząsteczkowego. Zazwyczaj stosuje się nadtlenek wodoru, ale chemiluminescencję luminolu mogą także generować organiczne substancje nadtlenowe. Wówczas jej intensywność jest jednak mniejsza. Istnieją dwa powody takiego zachowania. Pierwszym jest szybkość etapu reakcji utleniacz-katalizator, która zazwyczaj spada w szeregu nadtlenokwasy > nadtlenek wodoru > wodoronadtlenki [15]. Inne substancje nadtlenowe nieposiadające grupy –OOH, nie mogą bezpośrednio spowodować reakcji utleniania luminolu. Wyjątkiem są tutaj takie, które w silnie zasadowym środowisku ulegają hydrolizie do wodoronadtlenków lub nadtlenku wodoru. Przykładowo nadtlenki diacylowe i nadtlenoestry

generują chemiluminescencje a nadtlenki dialkilowe nie [16]. Dzięki temu możliwe było opracowanie metody detekcji nadtlenków sililowych metodą reakcji pokolumnowej. Metoda ta okazała się bardzo czuła w przypadku nadtlenków bissililowych ($R_3Si\text{-}OO\text{-}SiR_3$), które hydrolizują szybko z wytworzeniem nadtlenku wodoru. Dzięki temu mogą być wykryte na poziomie 0,1 nmol. Nadtlenki alkilosililowe, których hydroliza prowadzi do wodoronadtlenków, mogą być wykryte dopiero w dziesięciokrotnie większej ilości [H5].



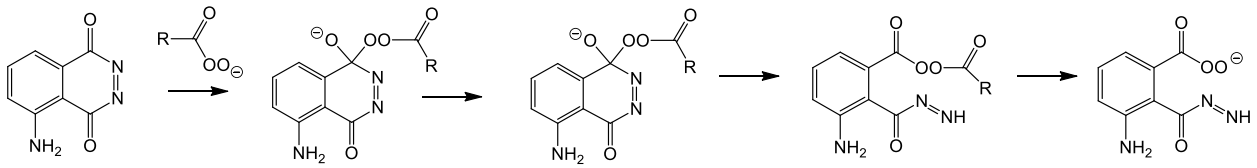
Rys. 5. Przebieg hydrolizy nadtlenków sililowych w środowisku zasadowym

Kolejną charakterystyczną cechą chemiluminescencji luminolu jest znaczenie obecności tlenu cząsteczkowego dla emisji światła. Rolą utleniaczy jest wygenerowanie aktywnej (utlenionej) formy katalizatora, która jest zdolna do utlenienia luminolu. Utleniona forma luminolu (rodnik) może ulec reakcji z anionorodnikiem ponadtlenkowym (powstający z tlenu cząsteczkowego) natomiast dizachinon reaguje z anionem HOO^-. Obie te reakcje prowadzą do α-hydroksy-wodoronadtlenku luminolu. Przy braku tlenu lub nadtlenku wodoru, chemiluminescencja nie powinna być obserwowana [14].

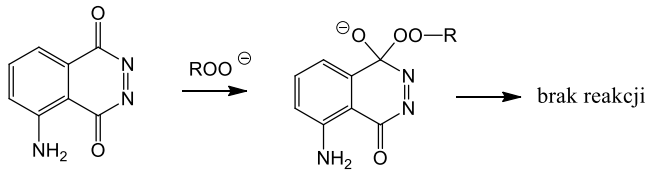
Ten wniosek płynący z ogólnego mechanizmu potwierdziły moje badania, w których analizowałem wpływ odgazowania stosowanych roztworów reagentów na natężenie emisji światła. Jest to wyraźny postęp w tej dziedzinie gdyż wcześniej podobne badania nie były prowadzone pomimo tego, że chemiluminescencja jest często stosowna jako metoda detekcji w HPLC [17]. Zjawisko to mogłoby być także użyte do detekcji tlenu cząsteczkowego.

W reakcji stosowałem przy tym różne utleniacze. W przypadku wodoronadtlenków lub jodozylobenzenu odgazowanie roztworu luminolu i heminy prowadziło do około 50% redukcji intensywności emisji. Nadtlenokwas i nadtlenek diacylowy zachowywały się jednak odwrotnie do oczekiwań. W ich wypadku odgazowanie prowadziło do zwiększenia intensywności emisji. Nie obserwowałem przy tym zmian w kinetyce emisji. Sugeruje to istnienie konkurencyjnego mechanizmu, który może być istotny w przypadku nadtlenokwasów. Zaproponowałem taki

mechanizm polegający na ataku nukleofilowym nadtlenokwasu z wytworzeniem nadtlenku diacylowego (Rys. 6). Produkt ten może ulec hydrolizie do odpowiedniego wodoronadtlenku, który reaguje już dalej według klasycznego mechanizmu [H6]. Kluczowym czynnikiem powinna być tutaj szybkość reakcji pomiędzy nadtlenokwasem a diazachinonem oraz szybkość hydrolizy powstającego nadtlenku diacylowego.



Rys. 6. Alternatywny mechanizm utleniania diazachinonu przez anion nadtlenokwasu



Rys. 7. Alternatywny mechanizm utleniania diazachinonu przez anion wodoronadtlenkowy

Podatność reakcji utleniania luminolu na rożne czynniki oraz jej wizualna atrakcyjność pozwoliły mi na wysunięcie koncepcji wykorzystania tej reakcji w nauczaniu metod statystycznego projektowania doświadczeń. Zaproponowane zajęcia laboratoryjne polegają na zbadaniu wpływu stężeń zasady, utleniacza i katalizatora na intensywność emisji światła. Doświadczenie jest prowadzone według planu dwuwartościowego, co oznacza potrzebę wykonania ośmiu eksperymentów. Obserwacja emisji światła jest możliwa bez stosowania dodatkowej aparatury, przy czym mierzony jest czas trwania emisji. Następnie wykonywana jest analiza statystyczna wyników i określone zostają efekty poszczególnych czynników. Opis tych zajęć został opublikowany w czasopiśmie *Journal of Chemical Education.* Prowadzone są one przeze mnie od kilku lat dla studentów 3 roku studiów inżynierskich [H7].

Osiągnięte przeze mnie wyniki dotyczące chemiluminescencyjnych sond molekularnych skłoniły mnie do rozważenia dalszych usprawnień w tej dziedzinie. Jednym z potencjalnych sposobów mogłoby być zwiększanie ilości grup luminolu przywiązanych do szkieletu polimerowego lub węglowego. Wówczas dojdzie jednak do zmniejszenia odległości między grupami luminolu. Może to skutkować częściowym wygaszeniem chemiluminescencji. Mogą

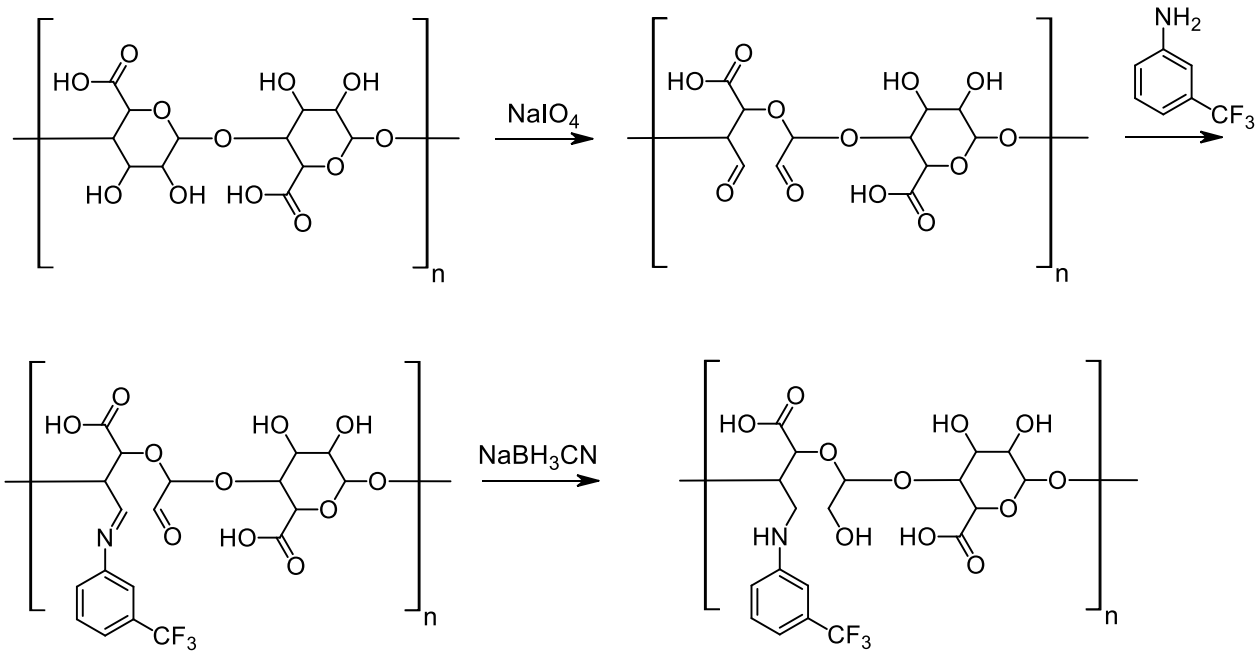
także istnieć ograniczenia natury kinetycznej i dyfuzyjnej związane z koniecznością dostarczenia cząsteczek utleniacza lub tlenu cząsteczkowego do małego obszaru, w którym znajduje się sonda molekularna. Tak więc potencjalny przyrost sygnału może nie być proporcjonalny do ilości cząsteczek luminolu. Było więc zasadne wykorzystanie innych metod detekcji niż detekcja chemiluminescencyjna.

Idealne do tego celu wydawało się zastosowanie zjawiska rezonansu magnetycznego ^{19}F NMR. W tym wypadku były większe szanse na liniową zależność pomiędzy ilością atomów fluoru a sygnałem. Zalety polisacharydów takie jak dostępność, rozpuszczalność i łatwość przetwarzania wydawały się dogodne do otrzymania nowego rodzaju sond molekularnych.

W literaturze dostępne były jedynie pojedyncze informacje na temat polisacharydów znakowanych fluorem [H8]. Stwierdziłem więc, że ten obszar badawczy jest bardzo interesujący i perspektywiczny. Badania te podjąłem we współpracy z prof. Kikuchi z Uniwersytetu Osaka, na które zdobyłem finansowanie w ramach grantu NCN. Zastosowanie zjawiska ^{19}F NMR skierowało też moje zainteresowanie w kierunku środków kontrastowych do obrazowania MRI.

Wykorzystanie związków fluoru do znakowania polisacharydów wymagało w pierwszym etapie przebadania podstawowych właściwości i metod syntezy takich środków kontrastowych. Jednym z wymagań było uzyskanie pochodnej polisacharydu rozpuszczalnej w wodzie o możliwe dużej zawartości fluoru.

Zaproponowałem wykorzystanie do tego celu procesu utleniania polisacharydów takich jak dekstran lub kwas alginowy za pomocą $NaIO_4$ [18]. Utworzone w ten sposób grupy aldehydowe pozwalały na przywiązanie do polisacharydu fluorowanych amin (będących jednymi z łatwo dostępnych, reaktywnych organicznych związków fluoru) poprzez utworzenie odpowiednich imin. Ich redukcja prowadziła do trwałego produktu końcowego. Przykładowa synteza pokazana jest na Rys. 8.



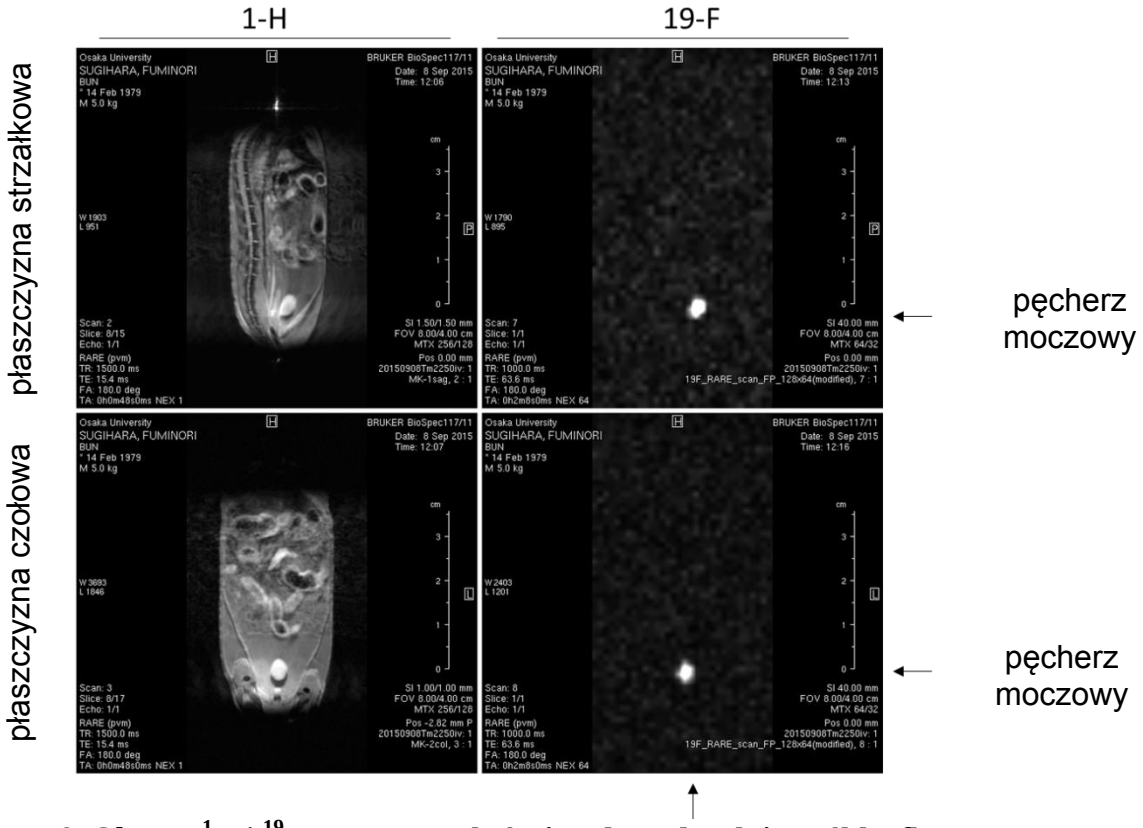
Rys. 8. Przebieg syntezy fluorowanego polisacharydu z kwasu alginowego

Dzięki zastosowaniu aminy z jedną grupą $-CF_3$ do każdej z modyfikowanych jednostek cukrowych zostały wprowadzone trzy atomy fluoru o identycznym przesunięciu chemicznym i nierozszczepionym sygnale na widmie NMR. Ograniczeniem była maksymalna ilość wprowadzonego fluoru, która nie mogła przekroczyć kilku-kilkunastu procent zależnie od rodzaju polisacharydu. Powyżej tej zawartości modyfikowane polisacharydy takie jak dekstran czy kwas alginowy nie były rozpuszczalne w wodzie.

Otrzymane produkty nie wykazywały znaczącej toksyczności względem komórek HeLa. Nie dochodziło przy tym do znaczącej akumulacji modyfikowanego polisacharydu w tych komórkach (około 28 pg polimeru na komórkę) co zostało zbadane na drodze analizy ^{19}F NMR. Dzięki słabej fluorescencji otrzymanych polimerów możliwe było stwierdzenie, że polisacharyd był akumulowany głównie w lizosomach.

Niska toksyczność badanych środków kontrastowych pozwalała na zbadanie ich właściwości w warunkach *in vivo*. Do tego celu wybrałem modyfikowany dekstran o masie cząsteczkowej 50±8 kDa o zawartości fluoru równej 1% co było przeciętnymi wartościami wśród otrzymanych substancji. W przypadku dożylnego podania myszom testowanego polimeru zaobserwowano, że polimer ten był szybko odfiltrowany przez nerki i był wydalany z moczem.

Możliwe było przy tym uzyskanie obrazu ^{19}F MRI pęcherza moczowego.



Rys. 9. Obrazy ^{1}H i ^{19}F MR myszy, której podano dożylnie próbkę fluorowanego polisacharydu.

Polimer taki może być więc zastosowany do obrazowania układu moczowego. Ze względu na niską toksyczność materiał ten może być także użyty jako bezpieczny fluorowany polimer w innych zastosowaniach biotechnologicznych [H8].

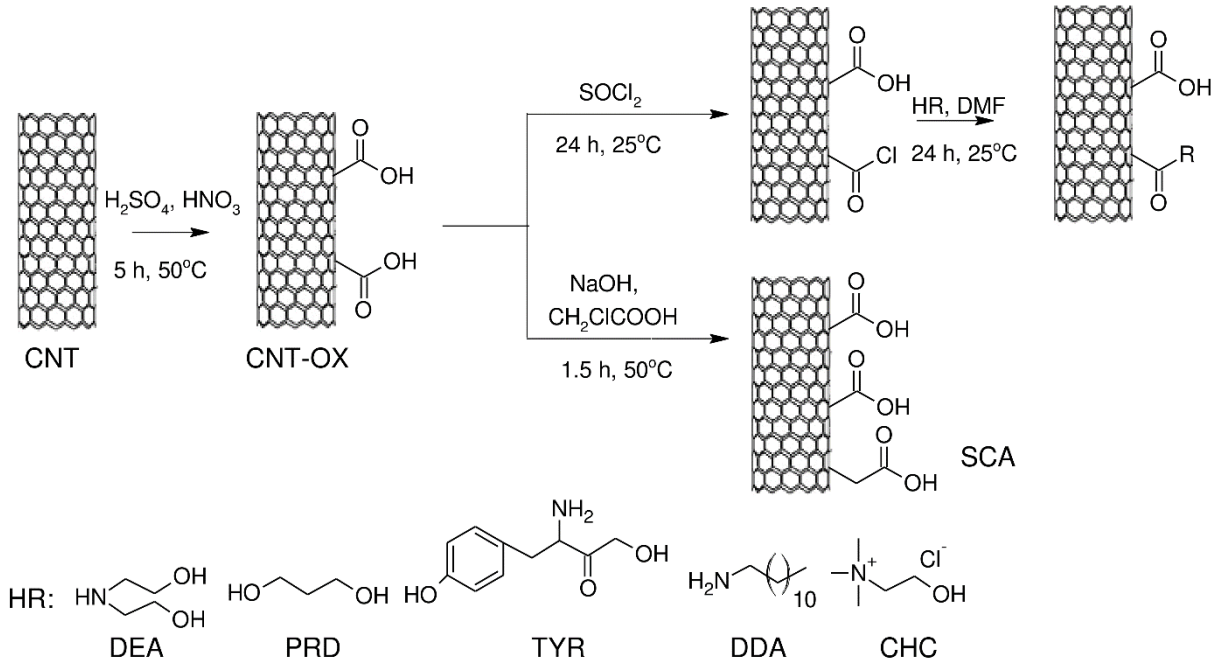
Istotnym problemem w trakcie syntezy modyfikowanych polisacharydów, zarówno w celu otrzymania sond chemiluminescencyjnych czy też środków kontrastowych ^{19}F NMR jest uzyskanie wysokiej czystości finalnego związku. Główną trudnością jest pozbycie się niskocząsteczkowych związków powstającymi w trakcie modyfikacji lub nadmiarów reagentów. W przypadku sond molekularnych do testów immunologicznych mogą one prowadzić do podniesienia poziomu tła, a w przypadku środków kontrastowych mogą przyczyniać się także do zwiększonej toksyczności produktu.

Techniki takie jak strącanie lub przemywanie nie sprawdzają się dobrze w przypadku

polisacharydów, które tworzą zazwyczaj żele, w których okludowane są zanieczyszczenia. Typowym rozwiązaniem jest zastosowanie chromatografii GPC lub SEC, ale przygotowanie większych porcji produktu jest pracochłonne i generalnie wymaga stosowania drogich preparatywnych kolumn typu HPLC.

Alternatywne rozwiązania to dializa lub ultrafiltracja. Ta ostatnia technika jest z powodzeniem stosowana do oczyszczania białek na skalę laboratoryjną, przy czym stosowane są filtry wirówkowe. Daje to bardzo dobre rezultaty, ale liniowe polisacharydy bardzo łatwo przechodzą przez membrany takich filtrów nawet, jeśli mają masy molowe większe od nominalnych. Nie jest więc możliwe ich oczyszczenie w taki sposób.

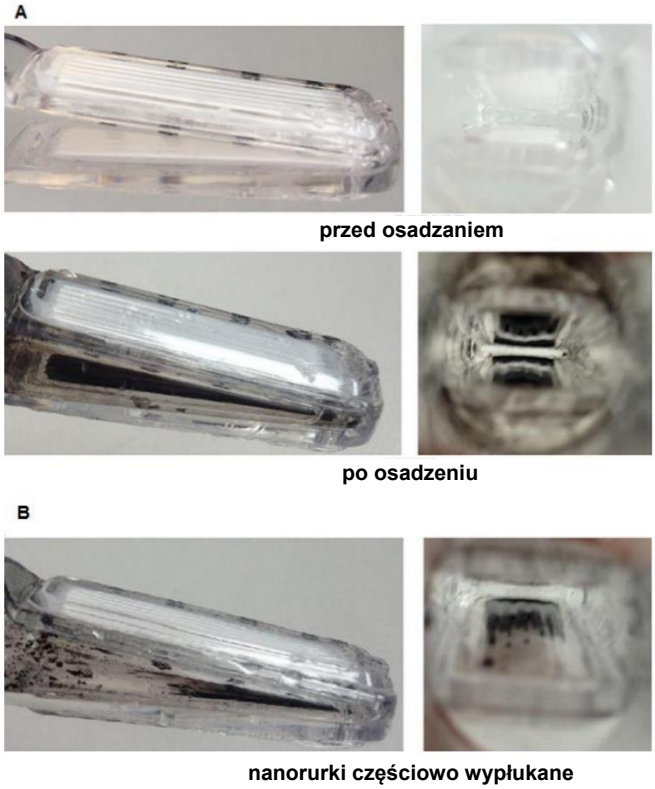
Moja propozycja rozwiązania tego problemu polegała na zastosowaniu ultrafiltracji z udziałem komercyjnego filtra wirówkowego modyfikowanego warstwą nanorurek. Warstwa ta miała doprowadzić do zmniejszenia efektywnej średnicy porów i zatrzymać na membranie polisacharyd, przepuszczając sole i inne małe cząsteczki. W toku badań stwierdziłem, że komercyjne nanorurki o średnicy 6-9 nm i długości 5 μm nie osadzały się na powierzchni tych membran.



Rys. 10. Przebieg modyfikacji nanorurek

Przebadałem więc zastosowanie modyfikowanych nanorurek. Modyfikacje miały doprowadzić do poprawy dyspergowalności nanorurek w wodzie. Badane warianty modyfikacji nanorurek zebrano na Rys. 10. Najlepsze rezultaty uzyskano dla produktu estryfikacji utlenionych nanorurek i dietanoloaminy (DEA) oraz dla produktu reakcji utlenionych nanorurek z kwasem chlorooctowym (SCA).

Nanorurki poddane takim modyfikacjom mogły być stopniowo osadzone na powierzchni membran tworząc trwały film.



Rys. 11. Przebieg osadzania nanorurek na powierzchni filtra wirówkowego.

Tak uformowana warstwa nanorurek, skutecznie zatrzymywała polisacharydy takie jak dekstran czy kwas alginowy jak również polietylenoglikol o masach większych niż 10 kDa. Wydaje się, że koncepcja takich filtrów wirówkowych może znaleźć szersze zastosowanie praktyczne, szczególnie, jeśli odpowiednie filtry ultrafiltracyjne będą komercyjnie dostępne [H9].

Dalsze plany badawcze

Jak wynika z powyższej dyskusji zagadnienia dotyczące sond molekularnych są interesującym i perspektywicznym polem badawczym. W przyszłości chciałbym kontynuować badania zwłaszcza nad środkami kontrastowymi ^{19}F MRI i stworzyć grupę badawczą zajmującą się tą tematyką. Dotychczas zrealizowałem (jako kierownik projektu) już jeden grant z tego zakresu, którego wyniki pokazały możliwe drogi rozwoju środków kontrastowych ^{19}F oraz pozwoliły na dopracowanie warsztatu naukowego koniecznego do prowadzenia prac w tej dziedzinie.

Najciekawsze wydaje mi się rozwijanie inteligentnych środków kontrastowych tzn. takich, które są podatne na działanie enzymów, jonów wodorowych lub innych czynników [19]. Jest to aktualny temat mogący prowadzić do nowych rozwiązań z zakresu diagnostyki medycznej.

Biorąc pod uwagę wyniki dotychczas prowadzonych na świecie badań istnieje szereg zagadnień, których rozwiązanie w najbliższym czasie przyczyni się do znaczącego postępu w tej dziedzinie.

Pierwszym z nich jest dostarczenie atomów fluoru do określonej lokalizacji w organizmie formie środka kontrastowego. Powinien on charakteryzować się wysoką zawartością fluoru, dobrą rozpuszczalnością i stabilnością w roztworach wodnych, niską toksycznością i odpowiednimi właściwości farmakokinetycznych. Obecnie najwięcej publikacji dotyczy polimerów fluorowanych [20]. Mogą być one otrzymane z fluorowanych monomerów lub przez fluorowanie polimerów. Przykładem tych pierwszych są liniowe amfifilowe kopolimery kwasu akrylowego, fluorowane polimery gwiaździste, dendrymery i hiperrozgałęzione polimery [21], zaś tych drugich rozmaite modyfikacje polimerów takich jak: polisacharydy, cyklodekstryny, polietylenoglikole, białka i aptamery [22]. Inną klasą środków kontrastowych ^{19}F są nanomateriały modyfikowane dużą liczbą atomów fluoru lub tworzące rodzaj kapsuły wokół ciekłego związku fluorowanego [23].

Moim zdaniem wykorzystanie polisacharydów jako szkieletu środków kontrastowych ^{19}F NMR jest sposobem na zminimalizowanie toksyczności i osiągniecie dobrej rozpuszczalności. Dalsze badania nad środkami tej klasy powinny się skupić na wydłużeniu biologicznego okresu półtrwania. Można to prawdopodobnie osiągnąć przez odpowiedni dobór masy molowej

polisacharydu oraz wprowadzenie dodatkowych grup funkcyjnych takich jak polietylenoglikole.

Drugim zagadnieniem jest otrzymanie środka posiadającego dwa stany włączony/wyłączony umożliwiające wykrywanie obecności określonych substancji. Można to osiągnąć dzięki efektowi PRE (paramagnetic relaxation enhancement) [24]. wywoływanym przez obecność jonu paramagnetycznego w cząsteczce środka kontrastowego. W przypadku obrazowania ^{1}H stosuje się np. kompleksy gadolinu, których liczba koordynacyjna ulega zmianie na skutek działania czynnika zewnętrznego. Umożliwia to lub uniemożliwia koordynacje cząsteczek wody przez jon metalu [25]. W takim przypadku atom wodoru cząsteczki wody znajduje się stosunkowo blisko jonu metalu. W przypadku obrazowania metoda ^{19}F osiągniecie tak malej odległości między atomami fluoru a jonem metalu jest bardzo trudne. Przez to osiągalna zmiana odległości fluor-metal dla stanów włączony/wyłączony jest mała.

Potencjalnym rozwiązaniem jest wprowadzenie licznych centrów paramagnetycznych do jednej cząsteczki środka kontrastowego czy tez rozmieszczenie licznych atomów fluoru wokół jednego jonu metalu.

Kolejnym wartym uwagi zagadnieniem to dobór rodzaju jonu metalu i ligandu stanowiącego element środka kontrastowego. Stosowane w obrazowaniu ^{1}H kompleksy gadolinu mają pewne ograniczenia, np. nie mogą być podawane pacjentom z zaburzeniami czynności nerek. Pojawiają się doniesienia na temat możliwych efektów ubocznych, zagrożenia dla środowiska naturalnego czy niedostosowania do rozwoju wysokopolowych skanerów MRI. Zastosowanie związków fluorowych o niskiej toksyczności oraz kompleksów metali takich jak żelazo może być dobrą alternatywą i uzupełnieniem dla tradycyjnych środków kontrastowych. Zastosowanie kompleksów zawierających endogenny pierwiastek (w odróżnieniu od egzogennego gadolinu) zmniejsza zagrożenie występowanie nieprzewidywalnych skutków ubocznych zarówno w organizmie jaki w środowisku naturalnym. Nie bez znaczenia jest cena oraz dostępność pierwiastków ziem rzadkich takich jak gadolin.

Wymienione wyżej zagadnienia nie wyczerpują oczywiście wszystkich ważnych aspektów konstrukcji środków kontrastowych. Wartymi wymienienia są jeszcze umożliwienie selektywnego gromadzenia się środka kontrastowego w zadanych komórkach czy też dostosowanie struktury środka kontrastowego do bodźca na którego obecność będzie on reagował. Warta uwagi jest także możliwość otrzymania bimodalnych środków kontrastowych

wykorzystujących zarówno jądra wodoru jak i fluoru [26].

Aktualnie prowadzę badania nad wykorzystaniem zjawiska paramagnetycznego wzmocnienia szybkości relaksacji (PRE) w wielkocząsteczkowych środkach kontrastowych ^{19}F NMR oraz pracuje nad zagadnieniem toksyczności fluorowanych polisacharydów i ich akumulacji w różnego rodzaju liniach komórkowych. Badania te prowadzę we współpracy z Centrum Onkologii (Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie Oddział w Gliwicach).

Za bardzo cenne dla dalszego postępu prac uważam nawiązanie współpracy z profesorem Kikuchi z Uniwersytetu Osaka, który jest czołowym specjalistą w dziedzinie syntezy środków kontrastowych i sond molekularnych. Współpraca z tym ośrodkiem zaowocowała już jedną publikacją, wystąpieniem konferencyjnym oraz wspólnym wnioskiem o finansowanie badań.

Grupa prof. Kikuchi może się pochwalić licznymi osiągnięciami w dziedzinie syntezy i wykorzystaniu nowych typów środków kontrastowych. Dysponuje ona nowoczesną aparaturą np. spektrometrem Bruker BioSpec AvanceIII 117/11 pozwalającym na wykonanie obrazowania ^{19}F NMR małych zwierząt. Takie zaplecze jednostki współpracującej umożliwi mi znaczne rozszerzenie możliwego do wykonania zakresu doświadczeń ze środkami kontrastowymi o obrazowanie w realistycznych warunkach *in vivo*. Ponadto kontakt z prof. Kikuchi umożliwia stałą dyskusje przebiegu badań i uzyskanie cennych wskazówek.

Cenne jest dla mnie również zdobyte doświadczenie w Nagasaki dotyczące modyfikacji polisacharydów oraz kontakt prof. Kai i pozostałymi pracownikami specjalizujących się w zakresie projektowania sond molekularnych.

Moje kontakty z zagranicznymi ośrodkami o znacznej renomie pozwolą w dalszej perspektywie nawiązanie trójstronnej współpracy pomiędzy Centrum Onkologii (Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie Oddział w Gliwicach), Politechniką Śląską a Uniwersytetem Osaka. Współpraca w takim gronie pozwoli to na rozszerzenie zakresu moich badań o istotne zagadnienia dotyczące toksyczności środków kontrastowych i inne praktyczne aspekty ich zastosowań w medycynie.

Krawczyk

Literatura w tym prace będące podstawą osiągniecia naukowego:

Prace będące podstawą osiągniecia naukowego:

[H1] Zhang, H. , Shibata, T. , Krawczyk, T. , Kabashima, T. , Lu, J. , Lee, M. K. , and Kai, M. Facile detection of proteins on a solid-phase membrane by direct binding of dextran-based luminol–biotin chemiluminescent polymer. *Talanta* **2009**, 79, 700–705.

[H2] Krawczyk, T. , Kondo, M. , Azam, M. G. , Zhang, H. , Shibata, T. , and Kai, M. Alginic acid-based macromolecular chemiluminescent probe for universal protein assay on a solid-phase membrane. *The Analyst* **2010**, 135, 2894.

[H3] Baj, S. , Krawczyk, T. , Pradel, N. , Azam, M. G. , Shibata, T. , Dragusha, S. , Skutil, K. , Pawlyta, M. , and Kai, M. Carbon Nanofiber-based Luminol-biotin Probe for Sensitive Chemiluminescence Detection of Protein. *Analytical Sciences* **2014**, 30, 1051–1056.

[H4] Azam, M. G. , Yamasuji, M. , Krawczyk, T. , Shibata, T. , Kabashima, T. , and Kai, M. Chemiluminescence-imaging detection of DNA on a solid-phase membrane by using a peroxidase-labeled macromolecular probe. *Talanta* **2015**, 139, 138–142.

[H5] Baj, S. , Słupska, R. , and Krawczyk, T. Application of response surface methodology (RSM) to the optimization of a post-column luminol chemiluminescence analysis of silyl peroxides. *Talanta* **2013**, 103, 172–178.

[H6] Baj, S. , Krawczyk, T. , and Staszewska, K. The influence of dioxygen on luminol chemiluminescence. *Luminescence* **2009**, 24, 348–354.

[H7] Krawczyk, T. , Słupska, R. , and Baj, S. Applications of Chemiluminescence in the Teaching of Experimental Design. *Journal of Chemical Education* **2015**, 92, 317–321.

[H8] Krawczyk, T. , Minoshima, M. , Sugihara, F. , and Kikuchi, K. Modified polysaccharides as potential 19F magnetic resonance contrast agents. *Carbohydrate Research* **2016**, 428, 72–78.

[H9] Krawczyk, T. , Marian, K. , and Pawlyta, M. Linear polymer separation using carbon-nanotube-modified centrifugal filter units: Other Techniques. *Journal of Separation Science* **2016**, 39, 725–731.

Pozostała literatura:

[1] Kelloff, G. J. The Progress and Promise of Molecular Imaging Probes in Oncologic Drug Development. *Clinical Cancer Research* **2005**, 11, 7967–7985.

[2] Li, X. , Gao, X. , Shi, W. , and Ma, H. Design Strategies for Water-Soluble Small Molecular

Chromogenic and Fluorogenic Probes. *Chemical Reviews* **2014**, 114, 590–659.

[3] Gopinath, S. C. B. , Tang, T.-H. , Chen, Y. , Citartan, M. , Tominaga, J. , and Lakshmipriya, T. Sensing strategies for influenza surveillance. *Biosensors and Bioelectronics* **2014**, 61, 357–369.

[4] Wu, A. H. B. A selected history and future of immunoassay development and applications in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta* **2006**, 369, 119–124.

[5] Roda, A. , Guardigli, M. , Michelini, E. , Mirasoli, M. , and Pasini, P. Peer Reviewed: Analytical Bioluminescence and Chemiluminescence. *Analytical Chemistry* **2003**, 75, 462 A-470 A.

[6] Weissleder, R. and Pittet, M. J. Imaging in the era of molecular oncology. *Nature* **2008**, 452, 580–589.

[7] Zhang, H. , Smanmoo, C. , Kabashima, T. , Lu, J. , and Kai, M. Dextran-Based Polymeric Chemiluminescent Compounds for the Sensitive Optical Imaging of a Cytochrome P450 Protein on a Solid-Phase Membrane. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, 46, 8226–8229.

[8] Sapan, C. V. , Lundblad, R. L. , and Price, N. C. Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **1999**, 29 (Pt 2), 99–108.

[9] Noble, J. E. and Bailey, M. J. A. Chapter 8 Quantitation of Protein. *In Methods in Enzymology*; Elsevier, 2009; Vol. 463, , pp. 73–95.

[10] Lind, J. and Merényi, G. Determination of the chemiluminescence quantum yield of luminol in rapid chemical reactions. *Chemical Physics Letters* **1981**, 82, 331–334.

[11] Khan, P. , Idrees, D. , Moxley, M. A. , Corbett, J. A. , Ahmad, F. , Figura, G. von , Sly, W. S. , Waheed, A. , and Hassan, M. I. Luminol-Based Chemiluminescent Signals: Clinical and Non-clinical Application and Future Uses. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2014**, 173, 333–355.

[12] Azam, M. G. , Shibata, T. , Kabashima, T. , and Kai, M. Alkaline phosphatase-labeled macromolecular probe for sensitive chemiluminescence detection of proteins on a solid-phase membrane. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2011**, 401, 1211–1217.

[13] Stadtman, E. R. and Berlett, B. S. Reactive Oxygen-Mediated Protein Oxidation in Aging and Disease. *Chemical Research in Toxicology* **1997**, 10, 485–494.

[14] Merényi, G. , Lind, J. , and Eriksen, T. E. Luminol chemiluminescence: chemistry, excitation, emitter. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence* **1990**, 5, 53–56.

[15] Traylor, T. G. , Lee, W. A. , and Stynes, D. V. Model compound studies related to peroxidases. Mechanisms of reactions of hemins with peracids. *Journal of the American Chemical Society* **1984**, 106, 755–764.

[16] Baj, S. , Chrobok, A. , Cieślik, M. , and Krawczyk, T. Application of chemiluminescence for

the detection of peroxy compounds in high-performance liquid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2003**, 375, 327–330.

[17] Huertas-Pérez, J. F. , Moreno-González, D. , Airado-Rodríguez, D. , Lara, F. J. , and García-Campaña, A. M. Advances in the application of chemiluminescence detection in liquid chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2016**, 75, 35–48.

[18] Kristiansen, K. A. , Potthast, A. , and Christensen, B. E. Periodate oxidation of polysaccharides for modification of chemical and physical properties. *Carbohydrate Research* **2010**, 345, 1264–1271.

[19] Bonnet, C. S. and Toth, E. Smart MR Imaging Agents Relevant to Potential Neurologic Applications. *American Journal of Neuroradiology* **2010**, 31, 401–409.

[20] Tirotta, I. , Dichiarante, V. , Pigliacelli, C. , Cavallo, G. , Terraneo, G. , Bombelli, F. B. , Metrangolo, P. , and Resnati, G. ^{19}F Magnetic Resonance Imaging (MRI): From Design of Materials to Clinical Applications. *Chemical Reviews* **2015**, 115, 1106–1129.

[21] Boase, N. R. B. , Blakey, I. , and Thurecht, K. J. Molecular imaging with polymers. *Polymer Chemistry* **2012**, 3, 1384.

[22] Bartusik, D. and Aebisher, D. 19F applications in drug development and imaging – a review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2014**, 68, 813–817.

[23] Ruiz-Cabello, J. , Barnett, B. P. , Bottomley, P. A. , and Bulte, J. W. M. Fluorine (19F) MRS and MRI in biomedicine. *NMR in Biomedicine* **2011**, 24, 114–129.

[24] Mizukami, S. , Takikawa, R. , Sugihara, F. , Hori, Y. , Tochio, H. , Wälchli, M. , Shirakawa, M. , and Kikuchi, K. Paramagnetic Relaxation-Based ^{19}F MRI Probe To Detect Protease Activity. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, 130, 794–795.

[25] Pierre, V. C. , Botta, M. , Aime, S. , and Raymond, K. N. Tuning the Coordination Number of Hydroxypyridonate-Based Gadolinium Complexes: Implications for MRI Contrast Agents [1]. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, 128, 5344–5345.

[26] Gianolio, E. , Napolitano, R. , Fedeli, F. , Arena, F. , and Aime, S. Poly-β-cyclodextrin based platform for pH mapping via a ratiometric 19F/1H MRI method. *Chemical Communications* **2009**, 6044.

Krawczyk