

**FOTOFIZYCZNE PODSTAWY ZNAKOWANIA
CHEMILUMINESCENCYJNEGO – NOWOCZESNEGO
NARZĘDZIA DIAGNOSTYKI MEDYCZNEJ**

**PHOTOPHYSICAL BASIS OF CHEMILUMINESCENT
LABELING – A MODERN MEDICAL DIAGNOSTIC
TOOL**

Beata Zadykowicz*, Anna Romanowska, Milena Pieńkos

*Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii, Pracownia Badań Luminescencyjnych,
ul. Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk
e-mail: beata.zadykowicz@ug.edu.pl

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Chemiluminescencja

1.1. Natura zjawiska chemiluminescencji

1.1.1. Czynniki fotofizyczne warunkujące emisję promieniowania

1.1.2. Czynniki wpływające na kinetykę i efektywność świecenia

1.2. Wydajność kwantowa chemiluminescencji

1.3. Układy chemiluminezujące

1.3.1. Układy, w których ma miejsce przeniesienie protonu

1.3.2. Układy, w których ma miejsce konwersja spinu

1.3.3. Układy, w których w wyniku reakcji chemicznej eliminowane są małe cząsteczki

1.3.4. Układy, w których zachodzi rozkład nadtlenu

1.4. Zastosowanie chemiluminescencji

2. Znakowanie chemiluminescencyjne


Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

dr inż. Beata Zadykowicz w 2005 roku ukończyła studia magisterskie na kierunku Chemia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, a w 2007 roku studia inżynierskie na kierunku Biotechnologia na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej. W roku 2010 obroniła pracę doktorską pt. „Synteza, struktura, właściwości i reaktywność 9-podstawionych akrydyn oraz pochodzących od nich chemilumino-genów akrydyniowych” przygotowaną pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Jerzego Błażejowskiego. Obecnie jest zatrudniona na stanowisku adiunkta w Pracowni Badań Luminescencyjnych Wydziału Chemii UG. Jej zainteresowania naukowe skupiają się wokół poszukiwań nowych układów luminescencyjnych, charakteryzujących się wysoką wydajnością emisji światła oraz trwałością w roztworach i umiarkowaną szybkością zaniku świecenia, istotnych pod względem utylitarnym.



 <https://orcid.org/0000-0002-7125-5233>


mgr Milena Pieńkos w 2016 roku ukończyła Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. W tym samym roku rozpoczęła Stacjonarne Studia Doktoranckie Chemii i Biochemii przy Wydziale Chemii UG. Jest doktorantką w Pracowni Badań Luminescencyjnych. Jej zainteresowania naukowe skupiają się wokół mechanizmu reakcji chemiluminescencji pochodnych akrydyniowych, które mogą pełnić rolę wydajnych chemilumino-genów. W swoich badaniach naukowych wykorzystuje nowoczesne metody chemii komputerowej.



 <https://orcid.org/0000-0001-5777-6211>

mgr Anna Romanowska od 2010 roku związana z Uniwersytetem Gdańskim początkowo jako studentka Chemii I stopnia, a następnie Chemii II stopnia. Tytuł magistra obroniła w 2016 roku pracą pt. „Pochodne kationu 10-metylo-9-(tiofenoksykarbonylo)akrydyniowego – synteza i właściwości chemiluminescencyjne”. Obecnie jest studentką II roku Studiów Doktoranckich Chemii i Biochemii przy Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Swoją pracę badawczą wykonuje w Pracowni Badań Luminescencyjnych. Jej zainteresowania naukowe koncentrują się wokół syntezy połączeń akrydyny o potencjalnych właściwościach chemiluminescencyjnych i badań nad ich właściwościami fizykochemicznymi i chemiluminescencyjnymi.



 <https://orcid.org/0000-0002-8452-6821>

ABSTRACT

Increasing exposition of people on the factors which negatively affect health lead to the escalation in the incidence of many diseases. In the same time, this phenomenon causes the intensification in research focusing on new therapeutics but, on the other hand, the development of new diagnostic methods is also essential to facilitate the detection of infections in a human organism. One of the promising immunological diagnostic procedure is the chemiluminescent labeling. The high sensitivity of the method and ease of labeling enables the detection of even trace amounts (femtomole level (10^{-15} M)) of both extra- and intracorporeal macromolecules, among others, antibodies, antigens, enzymes, hormones, fragments of nucleic acids, pesticides, or antibiotics.

The molecules which are capable of efficient chemiluminescence – chemiluminogens – are of crucial importance in the chemiluminescent labels enabling the content determination for the tested biomolecules. These chemiluminogens are subjected to the chemical reaction giving the electron-excited product, which subsequently while returning to the ground state generates the electromagnetic radiation. The chemiluminogens can be both organic and inorganic compounds. In case of the first group, the chemiluminescence process occurs mostly in the liquid phase (chemiluminescence of luminol or acridinium derivatives). However, in case of the second group the chemiluminescence occurs in the gas phase (for example, oxidation of the phosphorus vapour with the atomic oxygen). In the medical, chemical, or environmental analytics the procedures for the determination of macromolecules level, for example, α -fetoproteins, β -D-galactosidase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, TSH, FT4, or anti-HIV antibodies, are utilised with chemiluminescent labels mainly based on the acridinium ester derivatives.

The present article describes the photophysical aspects of the chemiluminescence phenomenon and one of the most rapidly developing tool for the immunological diagnostics – chemiluminescent labeling. Additionally, the present publication addresses the utilisation of the chemiluminometric methods and the perspectives to expand applications for these methods in the biological and environmental systems within the field of materials technology or biotechnology.

Keywords: chemiluminescence, chemiluminescent label, chemiluminogen, medical diagnostic, acridinium derivatives

Słowa kluczowe: chemiluminescencja, znacznik chemiluminescencyjny, chemiluminogen, diagnostyka medyczna, pochodne akrydyniowe

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

A	– grupa aktywna znacznika chemiluminescencyjnego
C	– chemiluminogen
CL	– chemiluminescencja
F	– fluorofor
FT4	– tyroksyna
HIV	– wirus nabytego niedoboru (upośledzenia) odporności
HPLC	– wysokosprawna chromatografia cieczowa
HPLC-CL	– wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją chemiluminometryczną
IC	– konwersja wewnętrzna
Ig	– immunoglobulina
ISC	– przejścia interkombinacyjne (międzysystemowe)
M	– molekula
M*	– molekula w stanie elektronowo wzbudzonym
M [•]	– anionorodnik
M ^{+•}	– kationorodnik
Q	– wygaszacz
Q*	– wygaszacz w stanie elektronowo wzbudzonym
S	– łącznik znacznika chemiluminescencyjnego
S ₀ , S ₁ , ..., S _n	– stan singletowy (odpowiednio podstawowy oraz elektronowo wzbudzone)
T ₀ , T ₁ , ..., T _n	– stan trypletowy (odpowiednio podstawowy oraz elektronowo wzbudzone)
TSH	tyreotropina

WPROWADZENIE

Narażenie organizmu ludzkiego na negatywnie wpływające na zdrowie czynniki, takie jak jakość powietrza, zanieczyszczenia wód, hałas czy pola elektromagnetyczne, skutkuje wzrostem liczby zachorowań. Z tego też względu naukowcy oraz przemysł farmaceutyczny prowadzą wzmożone badania nad nowymi terapeutykami. Jednak oprócz leczenia organizmu istotne jest również szybkie wykrywanie jego zakażenia, w czym pomagają nowoczesne i sprawne metody diagnostyczne. Jedną z dobrze rokujących procedur diagnostyki immunologicznej jest znakowanie chemiluminescencyjne. Duża czułość metody oraz łatwość oznaczenia pozwala na wykrywanie nawet śladowych ilości (poziom femtomolowy (10^{-15} M) [1]) zewnątrz- jak i wewnątrzustrojowych makromolekuł między innymi przeciwciał, antygenów, enzymów, hormonów, fragmentów kwasów nukleinowych, pestycydów czy antybiotyków [2].

Związki zdolne do wydajnej chemiluminescencji, czyli chemiluminogeny pełnią istotną rolę w znacznikach chemiluminescencyjnych, umożliwiając oznaczenie miana badanych biomolekuł. Ulegają one reakcji chemicznej, w wyniku której powstaje elektronowo wzbudzony produkt, który powracając do stanu podstawowego generuje promieniowanie elektromagnetyczne. Chemiluminogenami mogą być zarówno związki organiczne jak i nieorganiczne. W przypadku pierwszej grupy proces chemiluminescencji zachodzi głównie w fazie ciekłej (chemiluminescencja luminolu czy pochodnych akrydyniowych), natomiast w drugiej – w fazie gazowej (przykładem może być utlenianie par fosforu atomowym tlenem) [3]. W analityce medycznej, chemicznej czy środowiskowej stosowane są procedury oznaczania poziomu makromolekuł, na przykład α -fetoprotein, β -D-galaktozydazy, dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej, TSH, FT4 czy przeciwciał anti-HIV, z użyciem znaczników chemiluminescencyjnych opartych w dużej mierze na pochodnych estrów akrydyniowych [4, 5].

W artykule omówione zostaną fotofizyczne aspekty zjawiska chemiluminescencji oraz jednego z najbardziej rozwijających się narzędzi diagnostyki immunologicznej – znakowania chemiluminescencyjnego. W niniejszej publikacji poruszony zostanie również temat zastosowania metod chemiluminometrycznych oraz perspektywy rozszerzenia ich zastosowań na układy biologiczne i środowiskowe, w technologiach materiałowych czy biotechnologii.

1. CHEMILUMINESCENCJA

Każdej reakcji chemicznej towarzyszy wymiana energii z otoczeniem. Gdy energia dostarczana jest do układu mówimy o procesach endoenergetycznych, natomiast w przypadku uwalniania energii do otoczenia mówimy o reakcjach egzoenergetycznych. Oddawanie energii może zachodzić na dwa sposoby: pozbywanie się nadmiaru energii poprzez przekazanie jej w zderzeniach do otoczenia lub – w przy-

padku reakcji silnie egzotermicznych – poprzez emisję promieniowania, czyli luminescencję. U podstaw ostatniego procesu leży zjawisko relaksacji – przejścia układu z energetycznego stanu wzbudzonego do stanu podstawowego. W stanie podstawowym wszystkie elektrony zajmują w atomach możliwie najniższe stany energetyczne, a zewnętrzna powłoka na której znajdują się elektrony tworzy tak zwane pasmo walencyjne. Stan wzbudzony to taki, w którym elektrony w atomach materiału są przeniesione z pasma walencyjnego do wyższych stanów energetycznych, czyli do tak zwanego pasma przewodnictwa. Przeniesienie elektronu do pasma przewodnictwa następuje w wyniku działania zewnętrznego czynnika wzbudzającego. Tym czynnikiem może być promieniowanie, temperatura, reakcja chemiczna, oddziaływanie mechaniczne, strumień elektronów, fala ultradźwiękowa lub zewnętrzne pole elektryczne.

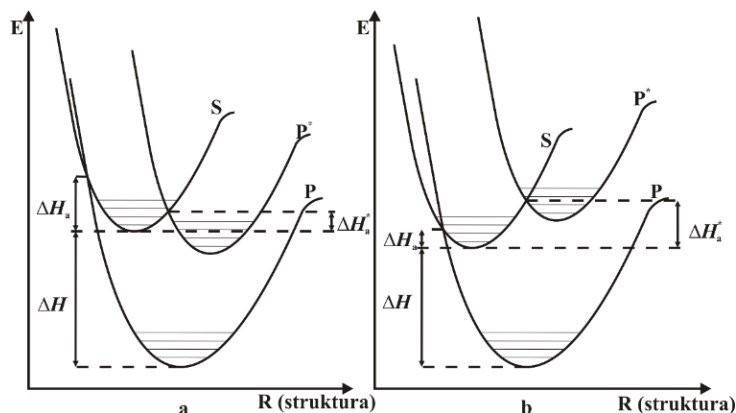
Wszystko w naturze dąży do obniżenia swojego stanu energetycznego, więc również i wzbudzone elektrony dążą do pozbycia się nadmiaru energii. Warunkiem, by elektron mógł oddać energię jest istnienie pustego stanu dozwolonego na niższym poziomie energetycznym oraz prawdopodobieństwo przejścia większe od zera. Innymi słowy w paśmie walencyjnym musi znajdować się puste miejsce (dziura), które elektron może obsadzić. Przejście elektronu ze stanu wzbudzonego do stanu podstawowego, w którym elektron zajmuje wolne miejsce nazywa się rekombinacją (lub anihilacją) pary elektron-dziura. Różnicę energii sprzed rekombinacji i po rekombinacji elektron może wypromieniować w postaci fali elektromagnetycznej i wówczas mówimy o rekombinacji promienistej. Światło generowane jest wówczas, gdy różnica energii pomiędzy pasmem przewodnictwa a pasmem walencyjnym odpowiada energii promieniowania z zakresu widzialnego. Jak wspomniano wyżej, istnieje wiele możliwości uzyskania produktów w stanie elektronowo wzbudzonym w zależności od czynnika wzbudzającego. Emisja promieniowania generowana procesem chemicznym nazywana jest chemiluminescencją (CL) [6, 7].

1.1. NATURA ZJAWISKA CHEMILUMINESCENCJI

Wspomniana wcześniej chemiluminescencja jest definiowana jako emisja promieniowania elektromagnetycznego (ultrafioletowego, widzialnego lub podczerwonego) w wyniku powstawania w czasie reakcji chemicznej wzbudzonych elektronowo produktów pośrednich bądź produktów reakcji [8]. Molekuły w stanie wzbudzonym powstałe w ten sposób mogą same emitować promieniowanie lub przekazać energię innym cząsteczkom, które uwalniają energię w formie emisji. Zgodnie z założeniami diagramu Jabłońskiego chemiluminescencja jest procesem dozwolonej spinowo promienistej dezaktywacji najniższego stanu wzbudzonego (zwykle singletowego (S_1)) molekuly. Istnieje również możliwość emisji promieniowania z najniższego wzbudzonego stanu o innej multipletowości (zwykle trypletowego (T_1)), zwana fosforescencją. Z racji stosunkowo długiego czasu życia ostatniego stanu (proces spi-

nowo wzbroniony) oraz jego zaawansowanej dezaktywacji w roztworach, świecenie związane z dezaktywacją $T_1 \rightarrow S_0$ jest słabe i obserwowane w niewielu układach [9].

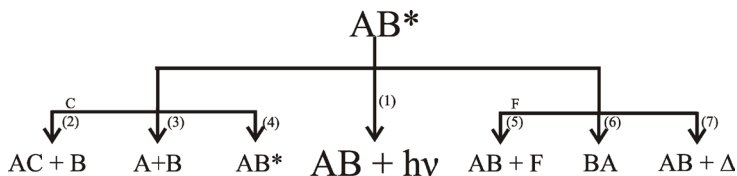
Warunkiem pojawienia się chemiluminescencji jest wysoka egzotermiczność reakcji chemicznej. Tylko wówczas może nastąpić wzbudzenie elektronowe molekuł. Dla przykładu, aby spowodować emisję w zakresie widzialnym (400–750 nm) niezbędna jest energia rzędu 150–300 kJ mol⁻¹ [9].



Rysunek 1. Diagram przedstawiający krzywe energii potencjalnej dla reakcji prowadzącej (a) względnie nie prowadzącej (b) do wzbudzenia elektronowego. S – substrat, P – produkt w podstawowym stanie elektronowym, P* – produkt w stanie elektronowo wzbudzonym

Figure 1. The diagram illustrating the curves of potential energy of the reaction leading (a) or not leading (b) to the electronic excitation. S – substrate, P – ground state product, P* – excited state product

W takim wypadku istotny jest układ poziomów energetycznych cząsteczek reagentów (Rys. 1). Powinien on sprzyjać tworzeniu stanu elektronowo wzbudzonego produktu. Jest to możliwe tylko wówczas, gdy entalpia aktywacji reakcji chemicznej (ΔH_a^*) jest mniejsza od energii aktywacji reakcji prowadzącej do powstania produktu w stanie podstawowym (ΔH_a) [8, 9]. W przypadkach niekorzystnych, uwalniana energia pojawia się w postaci ciepła, nie powodując emisji światła. W związku z tym chemiluminescencja jest obserwowana jedynie wtedy, gdy procesy bezpromienne (Rys. 2) mają niewielki udział w dezaktywacji stanów wzbudzonych [10].



Rysunek 2. Drogi wygaszania wzbudzonego indywiduum: chemiluminescencja (1), reakcja chemiczna z innym indywiduum (2), dysocjacja (3), wewnątrzcząsteczkowe przekazanie energii (4), międzycząsteczkowe przekazanie energii do fluoroforu (F) – pośrednia CL (5), izomeryzacja (6), wygaszanie termiczne (7) [10]

Figure 2. The degradation pathways of the excited entity: chemiluminescence (1), chemical reaction with another molecule (2), dissociation (3), intramolecular energy transfer (4), intermolecular energy transfer to fluorophore (F) – intermediate CL (5), isomerization (6) thermal quenching (7) [10]

1.1.1. Czynniki fotofizyczne warunkujące emisję promieniowania

Następstwem utworzenia elektronowo wzbudzonej molekuly zdolnej do chemiluminescencji jest emisja promieniowania i jej powrót do stanu podstawowego. Proces ten może zachodzić na różnych drogach. Przyjęta przez cząsteczki energia powoduje ich wzbudzenie elektronowe oraz jednocześnie wzbudzenie wibracyjne. Nadmiar energii wibracyjnej jest szybko (10^{-13} – 10^{-12} s) dezaktywowany poprzez niesprężyste zderzenia z cząsteczkami otoczenia [9]. Proces ten nazywany jest relaksacją wibracyjną. Inną możliwą drogą powrotu wzbudzonej molekuly do stanu podstawowego jest konwersja wewnętrzna (IC). Polega ona na bezpromienistym przekształceniu molekuly wzbudzonej elektronowo w cząsteczkę w niższym stanie elektronowym (na przykład $S_2 \rightarrow S_1$), silnie wzbudzoną wibracyjnie. W kolejnym etapie elektronowo wzbudzone cząsteczki mogą powrócić do stanu podstawowego na drodze promienistej z zachowaniem multipletowości (fluorescencja) lub bez zachowania multipletowości (fosforescencja). We wzbudzonej molekule mogą mieć miejsce również przejścia bezpromieniste pomiędzy stanami o różnej multipletowości, nazywane przejściami interkombinacyjnymi (międzysystemowymi, ISC), na przykład $S_1 \rightarrow T_1$, $T_1 \rightarrow S_0$.

Wszystkie opisane wyżej procesy konkurują z promienistym przejściem z najniższego wzbudzonego stanu singletowego (fluorescencja). Podstawowym parametrem charakteryzującym fluorescencję jest wydajność kwantowa procesu (Φ_f):

$$\Phi_f = \frac{k_f}{k_f + k_d} \quad (1)$$

gdzie: k_f – stała szybkości fluorescencji, k_d – stała szybkości procesów dezaktywacyjnych (konkurujących z fluorescencją). Wartość tego parametru przekłada się na intensywność świecenia.

Drugim parametrem charakteryzującym fluoryzujące molekuly jest rzeczywisty czas życia najniższego stanu wzbudzonego (τ_f), który wynika z zależności:

$$\tau_f = \Phi_f \cdot \tau_o \quad (2)$$

gdzie: τ_o jest radiacyjnym czasem życia stanu wzbudzonego. τ_o jest to czas, po upływie którego obsadzenie stanu wzbudzonego zmniejsza się do e^{-1} wartości początkowej, przy założeniu, że nie zachodzą procesy bezpromieniste [7]. Rzeczywisty czas życia uwzględnia wszystkie procesy – promieniste i bezpromieniste – mogące zachodzić z udziałem wzbudzonej elektronowo cząsteczki. Biorąc pod uwagę zależności (1) i (2), rzeczywisty czas życia najniższego wzbudzonego stanu singletowego można wyrazić zależnością (3):

$$\tau_f = \frac{1}{k_f + k_d} \quad (3)$$

1.1.2. Czynniki wpływające na kinetykę i efektywność świecenia

Intensywność oraz szybkość procesu chemiluminescencji jest zależna od wielu parametrów, takich jak [10]: chemiczna struktura prekursora związku chemiluminescującego, cechy i stężenie substratów, rodzaj użytego katalizatora, temperatura, pH i siła jonowa roztworu, rodzaj i polarność rozpuszczalnika, czy obecność substancji mogących być przekaźnikami energii.

Największy wpływ na wydajność kwantową oraz położenie pasm fluorescencji ma budowa cząsteczki. Wysoce sprzężone układy oraz organiczne molekuly aromatyczne o sztywnych pierścieniach wykazują zwykle zdolność do fluorescencji. W związkach tego typu przerwy między poziomami oscylacyjnymi są relatywnie duże, co skutkuje dominacją fluorescencji nad procesami bezpromienistej dezaktywacji.

Wpływ na świecenie ma rodzaj i położenie podstawnika w układzie aromatycznym związków. Zaobserwowano, że obecność swobodnie rotujących podstawników przy sztywnym układzie aromatycznym zmniejsza intensywność emisji [9]. Stwierdzono dalej, że znaczne obniżenie temperatury usztywnia molekulę oraz ogranicza swobodę ruchu, a tym samym powoduje wzrost wydajności kwantowej fluorescencji. Korzystny wpływ na intensywność emisji ma wprowadzenie do układu aromatycznego podstawników wysoce reaktywnych takich jak $-\text{NH}_2$ czy $-\text{OH}$. Obecność w molekule ciężkich atomów (na przykład bromu czy jodu), sześcioczłonowych pierścieni aromatycznych (chinolina) lub podstawników zawierających niewiążące pary elektronowe (na przykład $-\text{NO}_2$, $-\text{CF}_3$) znacząco wpływa na prawdopodobieństwo przejść międzysystemowych (ISC) i wydajność kwantową fluorescencji [9].

Wpływ na intensywność emisji ma środowisko reakcji, przede wszystkim rodzaj i cechy rozpuszczalnika. Oddziaływanie otoczenia z cząsteczkami substancji

rozpuszczonej ma głównie charakter elektrostatyczny i powoduje zmiany polarności substancji oraz mocy wiązań całego układu (szczególnie wpływa na wiązania wodoro-we). Od rodzaju rozpuszczalnika zależy elektrostatyczna energia stabilizacji stanu elektronowo wzbudzonego i podstawowego powodująca zmiany intensywności oraz położenia pasm fluorescencji.

Wpływ na wydajność chemiluminescencji ma wygaszanie świecenia. Wygaszanie następuje w wyniku oddziaływania substancji wzbudzonej elektronowo (M^*) z innymi molekułami obecnymi w środowisku – wygaszaczami (Q) [11]. Wygaszanie – konkurencyjne do świecenia – jest bezpromienistą dezaktywacją cząsteczki wzbudzonej przez cząsteczki wygaszacza. Rozróżnia się dwa rodzaje wygaszania fluorescencji – statyczne oraz dynamiczne [9, 12]. Wygaszanie statyczne opisywane jest modelem Perrina, który zakłada, że w materiałach usztywnionych cząsteczki M oraz Q są rozmieszczone przypadkowo i nie przemieszczają się w czasie życia stanu wzbudzonego. Dowolna cząsteczka wzbudzona (M^*) oddziałuje z otoczeniem w strefie działania o promieniu r. Dezaktywacja bezpromienista następuje w momencie, gdy cząsteczka Q znajdzie się w strefie działania. W przeciwnym wypadku większe są szanse dezaktywacji promienistej.

Model wygaszania dynamicznego zakłada kontakt cząsteczek M^* i Q w strefie działania w wyniku ruchów dyfuzyjnych. Wydajność tego procesu zależy od lepkości środowiska i wyraża się zależnością Stern'a-Volmer'a [13]:

$$\frac{\Phi}{\Phi_0} = \frac{1}{1 + k_q \cdot \tau_d [Q]} \quad (4)$$

gdzie: τ_d jest czasem życia molekuly w stanie wzbudzonym, k_q jest czynnikiem określającym prawdopodobieństwo spotkania wygaszacza i potencjalnie fluoryzującej molekuly, natomiast Φ i Φ_0 oznaczają odpowiednio wydajność kwantową fluorescencji w obecności i nieobecności wygaszacza o stężeniu [Q]. Energia stanu wzbudzonego może być przekazana innemu indywiduum. Zjawisko to ma miejsce, gdy stan wzbudzony cząsteczki wygaszacza (Q^*) leży niżej w skali energii niż stan wzbudzony cząsteczki M. Wzbudzone cząsteczki wygaszacza mogą dezaktywować na drodze promienistej lub bezpromienistej [12].

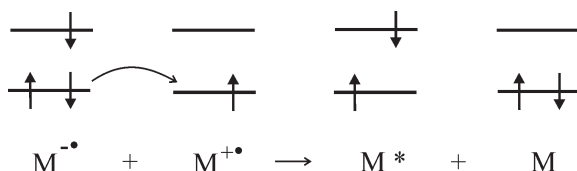
1.2. WYDAJNOŚĆ KWANTOWA CHEMILUMINESCENCJI

Wszystkie procesy prowadzące do chemiluminescencji można przedstawić zgodnie ze schematem (Rys. 3).

niczne (na przykład biały fosfor, sole kwasu chlorowego(I)). Bazując na podobieństwach przebiegu reakcji chemicznych prowadzących do chemiluminescencji można dokonać podziału na niżej opisane układy [6, 7, 12, 14].

1.3.1. Układy, w których ma miejsce przeniesienie elektronu

Układy, w których następuje przeniesienie elektronu między dwiema cząsteczkami należą do najprostszych systemów chemiluminezujących [12]. Chemiluminescencja jest w tym przypadku generowana reakcjami anionorodników (M^-) węglowodorów aromatycznych lub heterocyklicznych z kationorodnikami związków organicznych (M^+) [6, 7, 14, 15]. W wyniku procesu powstają obojętne cząsteczki w stanie elektronowo wzbudzonym (M^*) lub podstawowym (M). Schemat reakcji można przedstawić bazując na teorii orbitali molekularnych (Rys. 4) [14]. Transfer elektronu związany jest z utlenianiem lub redukcją [14].

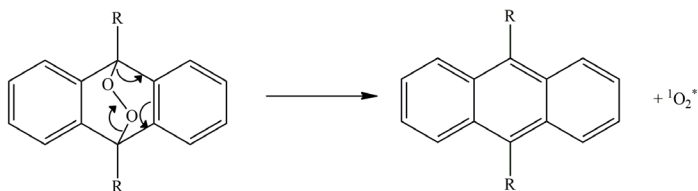


Rysunek 4. Schemat chemiluminescencji inicjowanej przeniesieniem elektronu [14]

Figure 4. The scheme illustrating the chemiluminescence initiated by electron transfer [14]

1.3.2. Układy, w których ma miejsce konwersja spinu

W układach tego typu następuje zmiana spinu, czyli powstają produkty o innym spinie niż spin substratów. Przykładami są nadtlenki arenów (Rys. 5), alifatyczne nadtlenki cykliczne oraz alifatyczne wielocentrowe układy nadtlenkowe. Proces rozpadu wyżej wymienionych połączeń prowadzi do powstania tlenu singletowego lub jego dimeru. Ostatnie indywidua relaksują do tlenu cząsteczkowego w stanie trypletowym emitując światło czerwone [7, 14, 16].

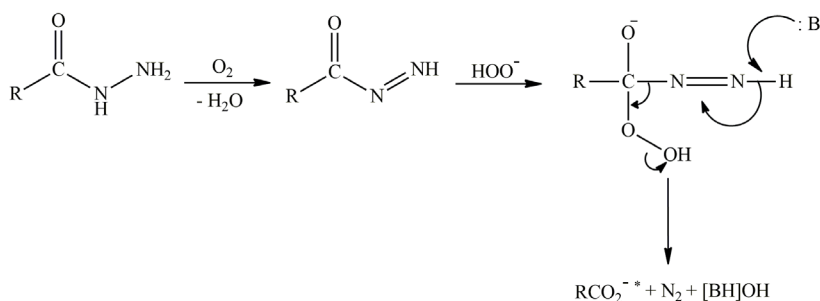


Rysunek 5. Rozpad nadtlenu arenu prowadzący do tlenu singletowego [14]

Figure 5. The decomposition of the arene peroxide leading to singlet oxygen [14]

1.3.3. Układy, w których w wyniku reakcji chemicznej eliminowane są małe cząsteczki

Substancje chemiluminezujące należące do tej grupy uczestniczą w silnie egzotermicznych reakcjach chemicznych, w efekcie których powstają małe molekuły (najczęściej N_2 i CO_2). Uwalniana w procesie chemicznym energia lokuje się w produktach wyżej cząsteczkowych, które mogą być wzbudzone elektronowo [14]. Ich relaksacja może prowadzić, choć nie zawsze, do chemiluminescencji. Utlenianie luminolu lub hydrazydów alkilowych (Rys. 6) reprezentuje układy należące do tej grupy [6, 14, 17].

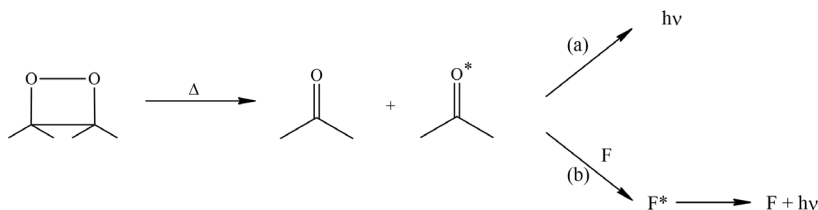


Rysunek 6. Generowanie chemiluminescencji w drodze utleniania hydrazydów alkilowych [14]

Figure 6. The chemiluminescence reaction as a result of oxidation of alkyl hydrazides [14]

1.3.4. Układy, w których zachodzi rozkład nadtlenków

Najbardziej wydajne spośród procesów chemicznych prowadzących do chemiluminescencji są te, w których zachodzi rozkład nadtlenków. W układach nadtlenowych są obecne wiązania O–O, które należą do najsłabszych wiązań kowalencyjnych. W procesach termicznych ulegają one z łatwością rozerwaniu. W konsekwencji powstają związki karbonylowe w elektronowym stanie wzbudzonym. Przykładami tego typu układów są dioksoetany (Rys. 7) [14, 18–21].



Rysunek 7. Rozkład cyklicznego dioksoetanu prowadzący do luminescencji [14]: droga (a) – prowadząca do słabej chemiluminescencji w podwyższonej temperaturze, droga (b) – prowadząca do silnej chemiluminescencji w obecności innych związków zdolnych do świecenia (F), którym przekazywana jest energia powodująca wzbudzenie elektronowe (F*)

Figure 7. The decomposition of cyclic dioxetane leading to luminescence [14]: pathway (a) – leading to poor chemiluminescence at increased temperature, pathway (b) – leading to strong chemiluminescence in the presence of other compounds capable to luminescence (F), which are the result of energy transfer (F*)

1.4. ZASTOSOWANIA CHEMILUMINESCENCJI

Zjawisko chemiluminescencji znalazło liczne zastosowania w badaniach klinicznych [22, 23], farmaceutycznych [24], chemicznych oraz biochemicznych [10, 25–27]. Chemiluminescencja jest wykorzystywana w analityce żywności [28, 29] oraz środowiska [30]. Efekt chemiluminescencji wykorzystywany jest w produkcji specjalistycznych wyrobów oświetleniowych [14] – na przykład latarek typu Cyalume, wykorzystywanych w ratownictwie, policji i wojsku, czy w trakcie imprez masowych w postaci tak zwanych „świecących patyków” (ang. *LightStick*).

Najbardziej znaczące są analityczne zastosowania chemiluminescencji. Wiele układów chemiluminezujących emituje światło w neutralnym lub zasadowym środowisku, na przykład luminol lub lucygenina [31]. Efekt ten wykorzystywany jest do określania punktu końcowego miareczkowania kwasowo-zasadowego w roztworach, w których tradycyjne wskaźniki się nie sprawdzają – na przykład nie reagują zmianą barwy. Metoda stosowana jest do określania kwasowości mleka lub czerwonego wina oraz właściwości tłuszczów i olejów [31].

Zjawisko chemiluminescencji wiąże się z procesami utleniania i/lub redukcji, co znalazło zastosowania w miareczkowaniach red-ox. Stosując mieszaninę lucygenina–H₂O₂ udało się oznaczyć w ten sposób jakościowo: jony srebra, bizmutu, kobaltu, ołowiu, talu i wanadu [10, 31].

Chemiluminescencja pozwala na bardzo dokładne potwierdzenie obecności związków organicznych występujących w często skomplikowanych mieszaninach biologicznych. Istnieje możliwość oznaczenia chemiluminometrycznego aminokwasów, związków fosforoorganicznych, przeciwutleniaczy, fenoli, glukozy, alkoholi i aldehydów [31]. Chemiluminescencja znalazła zastosowania w sensorach optycznych, które są wykorzystywane w detektorach do analizy przepływowej oraz chromatografii cieczowej (HPLC) [26, 27]. Wysokosprawna chromatografia cieczowa

z detekcją chemiluminometryczną (HPLC-CL) łączy w sobie prostotę, niski koszt oraz wysoką czułość i selektywność. Z ludzkiej surowicy istnieje możliwość oznaczenia katecholamin wykorzystując jako mieszaninę chemiluminescencyjną luminol i heksacyjanożelazian(III) potasu oraz kwasów karboksylowych z zastosowaniem kompleksu rutenu(II) – tris-(2,2'-bipirydylo)rutenu(II) jako substancji chemiluminescencyjnej. Z moczu można określić poziom alkaloidów opiatowych oraz biogennych amin z użyciem manganianu(VII) potasu jako czynnika chemiluminezującego lub kwasu 5-hydroksyindolo-3-ocowego z generowaniem chemiluminescencji dzięki mieszaninie nadtlenu wodoru i heksacyjanożelazianu(III) potasu.

Potrzeba prowadzenia kontroli zanieczyszczeń atmosfery w znacznym stopniu wpłynęła na rozwój technik chemiluminescencyjnych dla fazy gazowej [32]. Z powodzeniem udało się opracować metody chemiluminescencyjnego oznaczenia związków azotu, siarki i chloru, a także ozonu i węglowodorów [10].

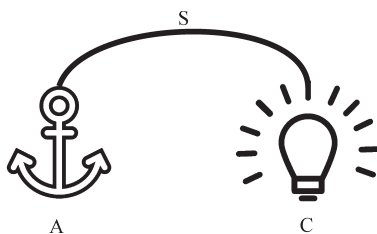
Chemiluminescencja jest rutynową metodą w analizie medycznej [22], głównie dzięki wprowadzeniu znakowania chemiluminescencyjnego. Skutecznie zastępuje ona powszechnie wykorzystywane do niedawna znakowanie izotopowe – nuklidami ^{14}C , ^3H i ^{125}I , które okazały się mieć wiele wad związanych z radiolizą molekuł, wzrostem ryzyka powikłań oraz innymi efektami ubocznymi. Znakowanie izotopami jest ponadto kosztowne, a znaczni i powstałe odpady wymagają specjalnego traktowania i składowania. To spowodowało, że chętnie zaczęto stosować znaczniki nieizotopowe – chemiluminescencyjne i fluoroscencyjne.

2. ZNAKOWANIE CHEMILUMINESCENCYJNE

Znaczniki chemiluminescencyjne wykorzystywane są do ilościowego oznaczenia zewnątrz-, jak i wewnątrzustrojowych makromolekuł takich jak pestycydy, antybiotyki, antygeny, przeciwciała, enzymy czy hormony [33]. Podstawą oznaczenia w układach antygen–przeciwciało jest wysoce specyficzna reakcja między tymi indywidualami. Znakowany antygen współzawodniczy z antygenem nieznakowanym o przyłączenie się do przeciwciała. Po odseparowaniu antygenów niezwiązanych od kompleksów antygen–przeciwciało dokonuje się oznaczenia aktywności poszczególnych frakcji w drodze pomiaru natężenia emitowanego promieniowania. Na podstawie pomiarów można określić stężenie antygeny – wyznaczając uprzednio krzywą kalibracji dla znanych stężeń antygeny i przeciwciała [33].

W cząsteczkach znacznika chemiluminescencyjnego można wyróżnić trzy fragmenty (schematyczna budowa znacznika przedstawiona została na Rysunku 8). Pierwszym jest chemiluminogen (C), który posiada zdolność emisji światła w następstwie wzbudzenia reakcją chemiczną. Drugi koniec znacznika stanowi fragment wiążący (A), który – w drodze reakcji chemicznej – tworzy wiązanie kowalencyjne z grupą funkcyjną oznaczanej makromolekuły. Pomiędzy wymienionymi wyżej jednostkami znajduje się łącznik (S), który eliminuje oddziaływania między

chemiluminogenem a znakowaną makromolekułą. Łączniki to najczęściej łańcuchy alifatyczne zawierające od dwóch do pięciu atomów węgla.



Rysunek 8. Schemat budowy znacznika chemiluminescencyjnego; C – chemiluminogen, S – łącznik (spacer), A – fragment wiążący, grupa aktywna

Figure 8. The scheme of chemiluminescence label; C – chemiluminogen, S – spacer, A – active group (binding fragment)

Znaczniki uczestniczą w wieloetapowym procesie (Rys. 9) – po wprowadzeniu do układu biologicznego – kowalencyjnego wiązania się z makromolekułą, reakcji chemicznej generującej elektronowo wzbudzone indywidua oraz emisji promieniowania umożliwiającą chemiluminometryczne określenie stężenia badanej substancji [34].



Rysunek 9. Etapy oznaczania stężenia makromolekuł z zastosowaniem znacznika chemiluminescencyjnego

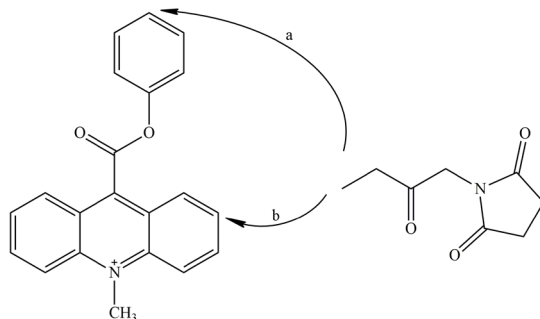
Figure 9. The steps of determining the concentration of macromolecules using a chemiluminescent label

Powszechność zastosowań analitycznych sprawia, że znaczniki chemiluminescencyjne są intensywnie badane pod kątem budowy oraz posiadanych cech. Istotne dla zastosowań jest, aby znaczniki można było łatwo otrzymać. Powinny one wydajnie przyłączać się do biomolekuł oraz być trwale w trakcie oznaczeń. Produkty reakcji powinny wydajnie przekształcać się w elektronowo wzbudzone cząsteczki emitujące promieniowanie w roztworach wodnych. W oznaczeniach chemiluminometrycznych poziom tła powinien być niski i nie powinien pojawiać się efekt samowygazania [33]. Tylko niektóre układy spełniają takie kryteria. Początkowo znacznikami chemiluminescencyjnymi były pochodne luminolu oraz izoluminolu. Stany elektronowo wzbudzone w takich układach generowane są w obecności katalizatora, co w znacznym stopniu obniża czułość metody. Ponadto, przyłączenie znacznika do makromolekuły powoduje spadek wydajności luminescencji. Inne układy badane pod tym kątem to lucyferyna – lucyferaza [35]. Są one mało trwałe ale czułe na obecność wybranych molekuł w środowisku (szczególnie dwuwartościowych jonów metali np. Fe^{2+} , Cu^{2+} czy Ca^{2+}). Interesującymi związkami pod kątem oznaczeń che-

miluminometrycznych okazały się estry akrydyniowe. Połączenia te charakteryzuje wysoka wydajność chemiluminescencji – sięgająca 7%. Nie występuje w przypadku tych połączeń potrzeba stosowania katalizatora do inicjowania chemiluminescencji, a poziom tła oznaczeń jest niski [36]. Umożliwiają one określanie stężeń substancji badanych na poziomie femtomoli (10^{-15} M) [37].

Estry akrydyniowe są jedną z najważniejszych grup związków wykorzystywanych w oznaczeniach chemiluminometrycznych. Zastosowanie znalazły przede wszystkim sole 9-fenoksykarbonylo-10-metyloakrydyniowe. Reagują one z nadtlaniem wodoru w środowisku alkalicznym w efekcie czego pojawia się emisja światła [38]. Znaczniki zawierające estry akrydyniowe mogą przyłączać się w dużych ilościach do oznaczanych molekuł nie pozbawiając ich właściwości biologicznych. Ważne jest również, że związki te można stosunkowo łatwo otrzymać.

W diagnostyce znalazły zastosowanie dwa rodzaje znaczników chemiluminescencyjnych bazujących na estrach akrydyniowych (Rys. 10). Pierwszy posiada łącznik we fragmencie usuwanym w procesie utlenienia znacznika (nie emitującym promieniowania (Rys. 10, Schemat a)), drugi – we fragmencie pozostającym po utlenieniu znacznika (emitującym promieniowanie (Rys. 10, Schemat b)). Utlenianie kationów 9-fenoksykarbonylo-10-metyloakrydyniowych prowadzi do oderwania fragmentu fenoksykarbonylowego oraz przekształcenia reszty molekuly w elektronowo wzbudzony 10-metylo-9-akrydon [14, 39]. W zależności od umiejscowienia łącznika uzyskuje się znaczniki należące do jednej z wyżej wymienionych grup (Rys. 10).



Rysunek 10. Rodzaje znaczników chemiluminescencyjnych opartych na estrach akrydyniowych a) posiadający łącznik we fragmencie usuwanym podczas utleniania, b) posiadający łącznik we fragmencie pozostającym po utlenieniu znacznika – rdzeniu akrydyny

Figure 10. The types of chemiluminescent labels based on acridinium esters a) with a spacer in the fragment of leaving group, b) with a spacer in the fragment remaining after the oxidation – the acridine moiety

Podnoszenie wydajności kwantowej chemiluminescencji jest jednym z celów badań prowadzonych przez liczne ośrodki naukowe. Z wiedzy o mechanizmie chemiluminescencji wynika, że na efektywność świecenia może mieć wpływ fragment odchodzący, który w przypadku kationów 9-fenoksykarbonylo-10-metyloakrydyniowych jest resztą fenylową. Brak podstawników w reszcie fenylowej powoduje, że

chemiluminogen wykazuje niską trwałość. Stąd ważne są badania nad wpływem podstawników we fragmencie fenoksykarbonylowym chemiluminogenów na ich stabilność oraz podatność na atak nukleofilowy czynnika utleniającego – jak wynika z mechanizmu generowania chemiluminescencji [14, 39]. Na podstawie tych przesłanek podjęte zostały badania nad pochodnymi estru fenolowego kwasu 9-karboksyloakrydynowego posiadającymi różne podstawniki w pierścieniu fenylowym (alkile, atomy fluorowców, grupę metoksyłową, grupę nitrową), aby określić wpływ budowy związków na ich właściwości fizykochemiczne oraz chemiluminescencyjne [4, 5, 40]. Na właściwości chemiluminogenne wpływ mieć może również grupa znajdująca się przy endocyklicznym atomie azotu (R) [41]. Badania obejmujące pięć pochodnych (R = CH₃, C₂H₅, *n*-C₃H₇, *i*-C₃H₇, PhCH₂) wykazały, iż najwyższą efektywność chemiluminescencji osiągnięta jest w przypadku pochodnej *N*-metylowej – średnio o 20% wyższą niż dla pozostałych połączeń [41].

Znaczniki akrydyniowe zostały wprowadzone do diagnostyki medycznej w początku lat osiemdziesiątych ubiegłego stulecia. Ich znaczenie systematycznie rośnie. Były one wykorzystane między innymi do znakowania tyotropiny, tyroksyny, estradiolu, progesteronu oraz immunoglobuliny G [36]. W ostatnich latach firma Siemens Healthcare Diagnostics wprowadziła na rynek zautomatyzowane testy immunologiczne oparte na pochodnych akrydyniowych. Tego typu systemy immunodiagnostyczne mogą być używane do diagnostyki wielu chorób: alergii (immunoglobulina E (IgE)), anemii i metabolizmu żelaza w organizmie (oznaczanie poziomu ferrytyny, kwasu foliowego czy witaminy B12), osteoporozy (witamina D), układu sercowo-naczyniowego (peptyd natriuretyczny typu B, galektyna 3, mioglobina czy troponina sercowa I), cukrzycy (C-peptyd i insulina), zapalenia wątroby typu A, B i C oraz oceny marskości wątroby, onkologicznych (markery raka piersi, jajników, jąder, prostaty), czy wenerycznych (kiły) [42]. Istnieje również możliwość monitorowania poziomu wielu leków terapeutycznych, na przykład karbamazepiny, digitoksyny, digotoksyny, gentamycyny, fenobarnitalu, teofiliny, tobramycyny, kwasu walproinowego czy wankomycyny [42]. Niezwykle ważna jest zdolność oznaczenia przeciwciał IgG i IgM przeciw wirusowi cytomegalii oraz różyczki, a także przeciwciał IgG swoistych dla antygenów *Toxoplasma gondii* [42–44]. Możliwości stosowania znaczników akrydyniowych są ogromne i wydaje się, że wciąż nie do końca poznane.

UWAGI KOŃCOWE

Analiza chemiczna oraz diagnostyka molekularna, w tym immunologiczna, są prężnie rozwijającymi się dziedzinami nauki znajdującymi coraz szersze zastosowania. Poszukiwanie układów chemiluminezujących, charakteryzujących się możliwie wysoką wydajnością emisji światła, wysoką trwałością w roztworach oraz umiarkowaną szybkością zaniku świecenia ma priorytetowe znaczenie dla zastosowań metod chemiluminescencyjnych w tych obszarach. Stosowanie metod chemi-

luminometrycznych w diagnostyce immunologicznej umożliwia szybkie określanie przyczyn chorób zakaźnych i nowotworowych oraz właściwą kontrolę ich leczenia. Interesujące są perspektywy rozszerzenia zastosowań metod chemiluminometrycznych na układy biologiczne i środowiskowe. Można też przewidywać rychłe wykorzystanie tych metod w technologiach materiałowych i biotechnologii.

PODZIĘKOWANIA

Praca finansowana z DS 530-8225-D600-17.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] A. Natrajan, D. Wen, *Org. Biomol. Chem.*, 2015, **13**, 2622.
- [2] S. Wang, A. Natrajan, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 19989.
- [3] R.J. VanZee, A. U. Khan, *J. Chem. Phys.*, 1976, **65**, 1764.
- [4] J. Czechowska, A. Kawecka, A. Romanowska, M. Marczak, P. Wityk, K. Krzyński, B. Zadykowicz, *J. Luminescence*, 2017, **187**, 102.
- [5] B. Zadykowicz, J. Czechowska, A. Ożóg, A. Renkevich, K. Krzyński, *Org. Biomol. Chem.*, 2016, **14**, 652.
- [6] S. Paszyc, *Podstawy fotochemii*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1992.
- [7] J.A. Barltrop, J.D. Coyle, *Fotochemia – podstawy*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1987.
- [8] A.M. García-Campaña, W.R.G. Baeyens, L. Cuadros-Rodríguez, F. Alés Barrero, J.M. Bosque-Sendra, L. Gámiz-Gracia, *Curr. Org. Chem.*, 2002, **6**, 1.
- [9] S.G. Schulman, J.M. Schulman, Y. Rakicioğlu, [w:] *Chemiluminescence in analytical chemistry*, rozdz. 3, Marcel Dekker, New York 2001.
- [10] A.M. García-Campaña, W.R.G. Baeyens, X. Zhang, [w:] *Chemiluminescence in analytical chemistry*, rozdz. 2, Marcel Dekker, New York 2001.
- [11] C. Huber, K. Fährnich, C. Krause, T. Werner, *J. Photochem. Photobiol. A*, 1999, **128**, 111.
- [12] P. Suppan, *Chemia i światło*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1997.
- [13] L.K. Fraiji, D.M. Hayes, T.C. Werner, *J. Chem. Edu.*, 1992, **69**, 424.
- [14] F. McCapra, *Pure Appl. Chem.*, 1970, **24**, 611.
- [15] J.-Y. Koo, S.P. Schmidt, G.B. Schuster, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, **75**, 30.
- [16] O.V. Reshetnyak, E.P. Kovalchuk, P. Skurski, J. Rak, J. Błażejowski, *J. Luminescence*, 2003, **105**, 27.
- [17] A. Wróblewska, O.V. Reshetnyak, E.P. Kovalchuk, R.I. Pasichnyuk, J. Błażejowski, *J. Electroanal. Chem.*, 2005, **580**, 41.
- [18] G.B. Schuster, *Acc. Chem. Res.*, 1979, **12**, 366.
- [19] S.P. Schmidt, G.B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.*, 1978, **100**, 1966.
- [20] K.A. Horn, G.B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.*, 1979, **101**, 7097.
- [21] S.P. Schmidt, G.B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, **102**, 7100.
- [22] L.J. Kricka, *Anal. Chim. Acta*, 2003, **500**, 279.
- [23] C. Dodeigne, L. Thunus, R. Lejeune, *Talanta*, 2000, **51**, 415.
- [24] A. Roda, M. Guardigli, E. Michelini, M. Mirasoli, P. Pasini, *Anal. Chem.*, 2003, **1**, 462A.
- [25] S. Baj, T. Krawczyk, *Anal. Chim. Acta*, 2007, **585**, 147.
- [26] A.M. García-Campaña, F.J. Lara, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, **387**, 165.

- [27] L. Gámiz–Gracia, A.M. García–Campana, J.F. Huertas–Pérez, F.J. Lara, *Anal. Chim. Acta*, 2009, **640**, 7.
- [28] F. Watanabe, S. Takenaka, K. Abe, Y. Tamura, Y. Nakano, *J. Agr. Food Chem.*, 1998, **46**, 1433.
- [29] L. Gámiz–Gracia, A.M. García–Campana, J.J. Soto–Chinchilla, J.F. Huertas Pérez, A. González Casado, *Trends Anal. Chem.*, 2005, **24**, 927.
- [30] L. Zhao, L. Sun, X. Chu, *Trends Anal. Chem.*, 2009, **28**, 404.
- [31] K.D. Gundermann, F. McCapra, *Chemiluminescence in organic chemistry*, Springer-Verlag, Berlin 1987.
- [32] X.R. Zhang, W.R.G. Baeyens, A.M. García–Campana, J. Ouyang, *Trends Anal. Chem.*, 1999, **18**, 384.
- [33] G. Zomer, J.F.C. Stavenuiter, *Anal. Chim. Acta*, 1989, **227**, 11.
- [34] C. Shellum, G. Gubitz, *Anal. Chim. Acta*, 1989, **227**, 97.
- [35] C. Garcia–Iriepa, P. Gosset, R. Berraud–Pache, M. Zemmouche, G. Taupier, K.D. Dorkenoo, P. Didier, J. Léonard, N. Ferré, I. Navizet, *J. Chem. Theory Comput*, 2018, **14(4)**, 2117.
- [36] I. Weeks, I. Beheshti, F. McCapra, A.K. Campbell, J.S. Woodhead, *Clin. Chem.*, 1983, **29**, 1474.
- [37] D. Perez–Bendito, M. Silva, [w:] *Chemiluminescence in analytical chemistry*, rozdz. 8, Marcel Dekker, New York 2001.
- [38] K. Smith, Z. Li, J.–J. Yang, I. Weeks, J.S. Woodhead, *J. Photochem. Photobiol. A*, 2000, **132**, 181.
- [39] J. Rak, P. Skurski, J. Błażejowski, *J. Org. Chem.*, 1999, **64**, 3002.
- [40] K. Krzywiński, A. Ożóg, P. Malecha, A.D. Roshal, A. Wróblewska, B. Zadykiewicz, J. Błażejowski, *J. Org. Chem*, 2011, **76(4)**, 1072.
- [41] S. Batmanghelich, J.S. Woodhead, K. Smith, I. Weeks, *J. Photochem. Photobiol. A*, 1991, **56**, 249.
- [42] Siemens Healthcare Diagnostics [online], [dostęp: 2018-07-02], Dostępny w Internecie: <https://www.healthcare.siemens.pl/immunoassay/systems/advia-centaur-cp-immunoassay-sys/assays>.
- [43] L. Holec–Gąsior, B. Ferra, J. Czechowska, I.E. Serdiuk, K. Krzywiński, J. Kur, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2016, **85**, 422.
- [44] L. Holec–Gąsior, B. Ferra, J. Czechowska, I.E. Serdiuk, K. Krzywiński, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2018, **13**, 13.

Praca wpłynęła do Redakcji 5 lipca 2018