

Poszukiwania polimerów ze śladem molekularnym do diagnostyki medycznej i analizy klinicznej

PIOTR LULIŃSKI*,
DOROTA MACIEJEWSKA,
DOROTA KLEJN

Katedra i Zakład Chemii Organicznej,
Wydział Farmaceutyczny,
Warszawski Uniwersytet Medyczny

Streszczenie

W pracy omówiono doniesienia literaturowe z ostatnich lat, dotyczące badań polimerów ze śladem molekularnym do celów diagnostyki medycznej i analizy klinicznej. Omawiana grupa nowych i selektywnych materiałów polimerowych może mieć potencjalne zastosowanie w monitorowaniu przebiegu cukrzycy i chorób nowotworowych, w diagnostyce chorób nerek, serca i miażdżycy oraz w analizie krwi.

Słowa kluczowe: polimery ze śladem molekularnym, diagnostyka medyczna, analiza kliniczna

Investigations of molecularly imprinted polymers for medical diagnostics and clinical analysis

Summary

The review focuses on progress of molecularly imprinted polymers for medical diagnostics and clinical analysis. This class of new and selective polymeric materials could find future applications in monitoring of diabetes and tumors, in diagnostics of kidney and heart diseases, arteriosclerosis or in blood analysis.

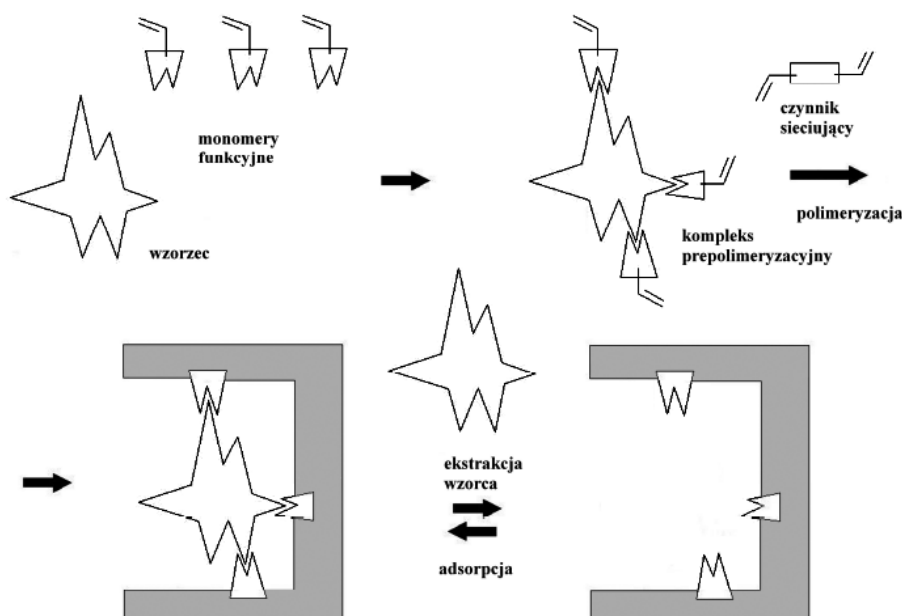
Key words: molecularly imprinted polymers, medical diagnostics, clinical analysis

WSTĘP

Polimery ze śladem molekularnym (ang. *molecularly imprinted polymers*) znalazły szerokie zastosowanie w naukach farmaceutycznych. Są wykorzystywane w procesach izolacji i zagęszczania analitów, jako selektywne adsorbenty w kolumnach chromatograficznych oraz w kolumnkach do ekstrakcji do fazy stałej (SPE, ang. *solid phase extraction*). Stanowią również część sensorową detektorów w ilościowym oznaczaniu wielu związków [1, 2].

Proces tworzenia śladu molekularnego w matrycy polimeru składa się z trzech etapów (ryc. 1). Pierwszy etap obejmuje wytworzenie stabilnej struktury prepolimeryzacyjnej, pomiędzy molekułą tworzącą ślad (wzorcem) a monomerem funkcyjnym. Drugim etapem jest reakcja polimeryzacji przebiegająca najczęściej w obecności czynnika sieciującego. Ostatni etap polega na usunięciu wzorca z matrycy polimerowej [1]. Wzory związków chemicznych budujących matrycę polimerów ze śladem molekularnym przedstawiono na rycinie 2.

Jednym z ciekawszych obszarów wykorzystania polimerów ze śladem molekularnym jest diagnosty-



Ryc. 1. Schemat etapów procesu tworzenia śladu molekularnego w matrycy polimerowej

FIG. 1. Scheme of imprinting process in the polymer matrix

ka i analiza kliniczna. Współczesna opieka medyczna oparta jest na olbrzymiej liczbie testów, mających na celu wczesne rozpoznanie choroby lub/i monitorowanie jej przebiegu. Rośnie popyt na precyzyjne, tanie i szybkie testy, a postęp technologiczny umożliwia realizację tych potrzeb.

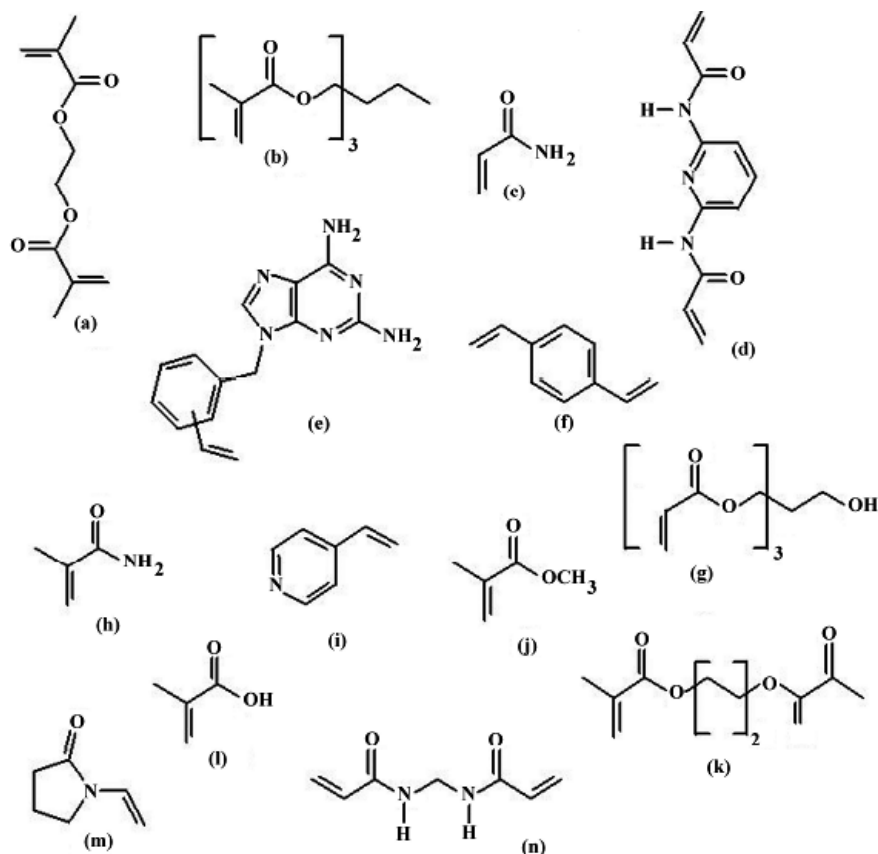
Już od kilku lat obserwowany jest ciągły wzrost wartości światowego rynku diagnostycznego, który obecnie jest szacowany na kilkadziesiąt miliardów euro. Testy diagnostyczne są wykorzystywane przede wszystkim w leczeniu pacjentów cierpiących na choroby układu krążenia i choroby nowotworowe, osób z niewydolnością układu moczowego oraz chorych na cukrzycę. Wzrost liczby osób nadużywających leki i uzależnionych od substancji psychoaktywnych, ogromnie zwiększył zapotrzebowanie na testy identyfikujące substancje toksyczne [3]. Rosnące wymagania ze strony pacjentów oraz personelu medycznego w stosunku do nowych generacji testów dotyczą ich miniaturyzacji, łatwości obsługi i szybkości otrzymywania wyników i stwarzają podstawy do rozwoju nowych technologii.

Większość spośród obecnie stosowanych testów diagnostycznych wykorzystuje naturalne enzymy lub przeciwciała jako elementy sensorowe. Jednakże ta grupa testów posiada istotne ograniczenia wynikające z ich biostruktury. Są to: słaba odtwarzalność, niestabilność w czasie produkcji i problemy związane ze sterylizacją. Dużą nadzieję na przezwyciężenie tych trudności wiąże się z polimerami ze śladem molekularnym. Dzięki wysokiej selektywności, wytrzymałości mechanicznej, termicznej i chemicznej oraz

taniej preparatyce, omawiana klasa polimerów może stanowić nową generację materiałów do konstrukcji testów diagnostycznych.

MATERIAŁY POLIMEROWE W MONITOROWANIU PRZEBIEGU CUKRZYCY

Cukrzyca jest jedną z najbardziej rozpowszechnionych obecnie chorób. Objawia się zbyt wysokim poziomem glukozy we krwi. Nie leczona cukrzyca prowadzi do poważnych powikłań, związanych z uszkodzeniem wielu narządów. Jednym ze wskaźników stężenia glukozy jest glikowana hemoglobina HbA1c, która jest produktem nieenzymatycznej glikacji hemoglobiny. W wyniku połączenia cząsteczki glukozy z wolną grupą aminową reszty waliny na N-końcu łańcucha β -hemoglobiny powstaje zasada Schiffa, która następnie ulega przegrupowaniu tworząc stabilną ketoaminową pochodną hemoglobiny [4]. Glikacja jest procesem stopniowym i proporcjonalnym do stopnia glikemii. Zawartość HbA1c jest zatem odzwierciedleniem średniego stężenia glukozy we krwi w ciągu 120 dni czyli średniego czasu życia erytrocytu. Olbrzymią zaletą oznaczania poziomu HbA1c jest brak ciągłego wahania stężenia, występujący podczas klasycznego pomiaru stężenia glukozy we krwi. Ponadto glikowana hemoglobina pozwala ocenić ryzyko wystąpienia powikłań cukrzycy [5].



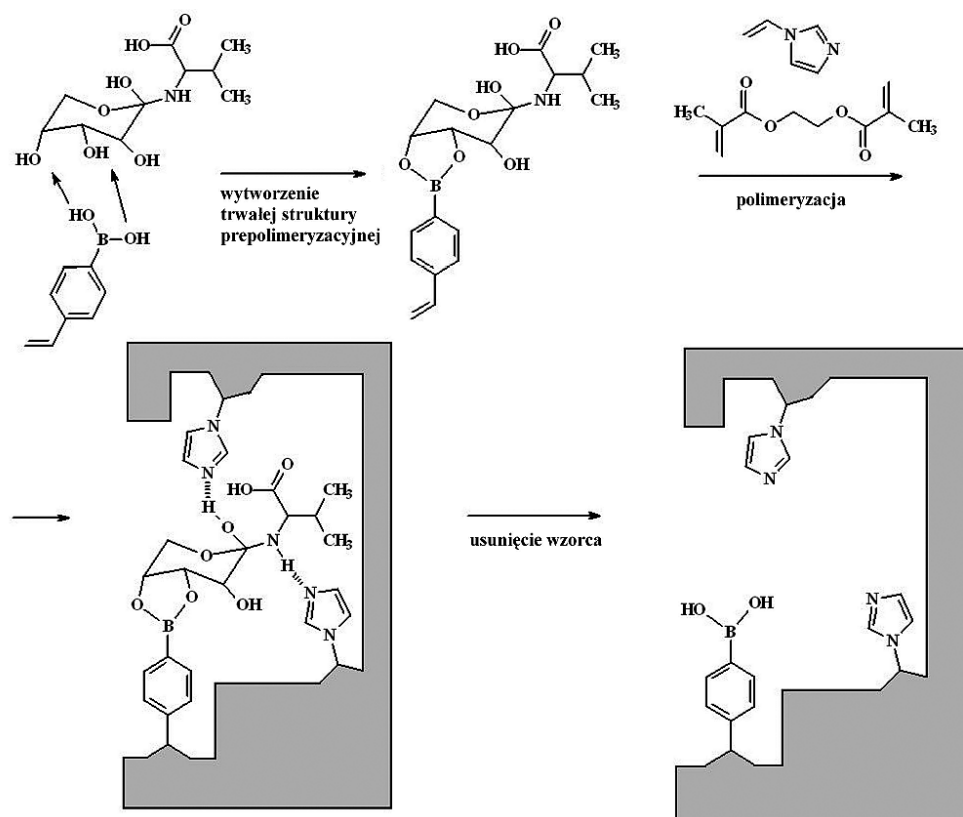
Ryc. 2. Wzory chemiczne monomerów funkcyjnych i czynników sieciujących powszechnie wykorzystywanych w syntezach polimerów ze śladem molekularnym: dimetakrylan glikolu etylenowego (a), trimetakrylan 2-etylo-2-(hydroksymetylo)propano-1,3-diolu (b), akrylamid (c), 2,6-bis(diakrylamido)pirydyna (d), 2,6-diamino-9-(3/4-winylobenzylo)puryna (e), diwinylobenzen (f), triakrylan pentaerytrytolu (g), metakrylan metylu (j), dimetakrylan glikolu tetraetylenowego (k), kwas metakrylowy (l), 1-winylo-2-pirolidon (m), *N,N'*-metylenobisakrylamid (n)

FIG. 2. Chemical formulas of functional monomers and cross-linkers frequently used in syntheses of the imprinted polymers: ethylene glycol dimethacrylate (a), trimethylolpropane trimethacrylate (b), acrylamide (c), 2,6-bis(diacylamido)pyridine (d), 2,6-diamine-9-(3/4-vinylbenzyl)purine (e), divinylbenzene (f), pentaerythritol triacrylate (g), methacrylamide (h), 4-vinylpyridine (i), methyl methacrylate (j), tetraethylene glycol dimethacrylate (k), methacrylic acid (l), 1-vinyl-2-pyrrolidone (m), *N,N'*-methylenebisacrylamide (n)

Najnowsze badania podkreślają zalety oznaczania stężenia HbA1c w diagnostyce cukrzycy, w porównaniu z powszechnie stosowanym pomiarem glukozy [6]. Jednak określenie zawartości glikowanych protein we krwi wymaga czułych i selektywnych metod, dostosowanych do warunków diagnostyki klinicznej.

Yamazaki i wsp. [7] opisali syntezę polimeru ze śladem molekularnym β -D-fruktozylo-L-waliny. Polimer stanowił część powierzchni elektrody i służył do amperometrycznego oznaczania poziomu glikowanej hemoglobiny. Rycina 3 ilustruje proces otrzymywania polimeru molekularnie drukowanego β -D-fruktozylo-L-waliną.

Autorzy zastosowali semi-kowalencyjną strategię syntezy polimeru, w której struktura prepolimeryzacyjna powstaje w reakcji chemicznej (wiązania kowalencyjne), jak i poprzez oddziaływania międzycząsteczkowe (oddziaływania niekowalencyjne). W pierwszym etapie β -D-fruktozylo-L-walinę (wzorec) połączyli z 4-winylofenyloboranem (monomer funkcyjny) wiązaniem estrowym. Następnie sporządzili roztwór związku prepolimeryzacyjnego z 1-winyloimidazolem (drugim monomerem funkcyjnym, który pełnił również istotną rolę w procesach elektrochemicznych), umożliwiając powstanie oddziaływań międzycząsteczkowych. Następnie przeprowadzili polimeryzację w bloku w obecności dimetakrylanu



Ryc. 3. Schemat syntezy polimeru ze śladem molekularnym β -D-fruktozylo-L-waliny

Fig. 3. Scheme of synthesis of β -D-fructosyl-L-valine imprinted polymer

glikolu etylenowego (ryc. 2a), będącego czynnikiem sieciującym w środowisku metanolowo-wodnym, pełniącym rolę porogenu.

Otrzymany polimer autorzy poddali obróbce mającej na celu otrzymanie ziaren o określonej wielkości poprzez roztarcie, przesianie i sedymentację. Następnie z ziaren usunęli wzorec, uwalniając trójwymiarowe wnęki w matrycy polimeru, komplementarne do wzorca. Syntezę ziaren polimeru kontrolnego prowadzili w identycznych warunkach, ale bez wzorca czyli β -D-fruktozylo-L-waliny. Do pomiarów analitycznych przygotowali pastę przez zmieszanie ziaren polimeru, grafitu i parafiny, którą następnie umieścili w korpusie elektrody.

β -D-Fruktozylo-L-walina została wybrana jako wzorec, ponieważ stanowi składnik zarówno HbA1c, jak i produktu trawienia HbA1c przez proteazę. W celu określenia selektywności polimeru autorzy porównali zdolność adsorpcji różnych fruktozyloamin: β -D-fruktozylo-L-waliny, β -D-fruktozylo- ϵ -lizyny, β -D-fruktozylo-L-glicyny, β -D-fruktozylo-L-alaniny i β -D-fruktozylo-L-feniloalaniny. Powinowactwo β -D-fruktozylo-L-waliny do matrycy polimeru ze śladem molekularnym było dwukrotnie większe, niż do polimeru kontrolnego i wynosiło odpowiednio 410 i 210 nmol/mg polimeru. Natomiast adsorpcja β -D-fruktozylo- ϵ -lizyny na polimerze ze śladem mo-

lekularnym i polimerze kontrolnym była porównywalna. Brak selektywności adsorpcji wytłumaczyli możliwością powstania nieselektywnych oddziaływań, pomiędzy resztą imidazolową obecną w matrycy polimeru a ugrupowaniem iminowym, które powstaje po reakcji węglowodanu z aminokwasem.

Autorzy zbadali również wpływ innych związków obecnych we krwi na pomiar adsorpcji fruktozyloamin. Sorbitol oraz inne węglowodany zakłócały oznaczenie potencjometryczne, w związku z tym konieczne okazało się wstępne przygotowanie próbek do analiz. Istotnym czynnikiem ograniczającym zastosowanie omawianej metody, jest koszt β -D-fruktozylo-L-waliny użytej jako wzorec w syntezie polimeru. Sode i wsp. [8] zaproponowali zastosowanie analogu strukturalnego (*N*-metylo-L-waliny) podczas syntezy matrycy polimerowej. Użycie analogów strukturalnych wzorców w procesie tworzenia śladu molekularnego jest uzasadnione, jeżeli wzorec jest przyczyną trudności syntetycznych, jest drogi lub otrzymany polimer ma służyć do analizy śladowych ilości tej substancji. Unikamy w ten sposób zjawiska ciągłego uwalniania wzorca (analitu) z ziaren polimeru (ang. *bleeding*) podczas analiz, co mogłoby być powodem zawyżania wyników.

Polimer ze śladem *N*-metylo-L-waliny stanowił składnik elektrody grafitowej i wykazywał podobną

selektywność jak opisany przez Yamazaki i wsp [7]. Próby uzyskania wyższej selektywności poprzez zastosowanie dwóch monomerów funkcyjnych, 1-winyloimidazolu i alliloaminy, nie dały pożądanych efektów. Selektywny polimer ze śladem molekularnym β -D-fruktozylo-L-waliny otrzymali Rajkumar i wsp. [9]. Autorzy zastosowali wyłącznie kowalencyjną strategię otrzymania śladu molekularnego i dodatkowo zbadali wpływ czynnika sieciującego na selektywność polimeru. β -D-Fruktozylowalino-O-bis(4-winylofenyloboran) poddali polimeryzacji z dimetakrylanem glikolu etylenowego, lub z trimetakrylanem 2-etylo-2-(hydroksymetylo)propano-1,3-diolu (ryc. 2b) w dwuskładnikowym roztworze toluen-acetonitrylu.

Polimer usieciowany dimetakrylanem glikolu etylenowego miał większą pojemność adsorpcji, ale charakteryzował się niższą selektywnością, natomiast usieciowany trimetakrylanem 2-etylo-2-(hydroksymetylo)propano-1,3-diolu wykazywał zarówno dużą selektywność, jak i wystarczającą pojemność adsorpcji. Autorzy zbadali wpływ niektórych parametrów procedury oznaczania analitu na otrzymywane wyniki, uzyskując optymalne wartości adsorpcji β -D-fruktozylo-L-waliny dla roztworów o pH = 11,4 i stężeniu 0,2 mmol/L. Obliczony współczynnik powinowactwa do wzorca (ang. *imprinting factor*), czyli stosunek ilości zaadsorbowanej na polimerze ze śladem molekularnym do ilości zaadsorbowanej na polimerze kontrolnym był wysoki i wynosił 4,5. Ponadto autorzy przeprowadzili podstawowe analizy stabilności termicznej otrzymanego polimeru i jego morfologii, wykorzystując termogravimetrię i skaningową mikroskopię elektronową.

Badania termogravimetryczne stwierdziły brak ubytku masy matrycy polimerowej usieciowanej trimetakrylanem 2-etylo-2-(hydroksymetylo)propano-1,3-diolu do temp. 250°C. Mikrografy pokazały obraz ziaren o nieregularnym kształcie i średnicy do 20 μ m. Omówione badania mogą wkrótce doprowadzić do zastosowania polimeru ze śladem molekularnym β -D-fruktozylo-L-waliny w diagnostyce medycznej.

MATERIAŁY POLIMEROWE W ANALIZIE PRZEBIEGU CHORÓB NOWOTWOROWYCH

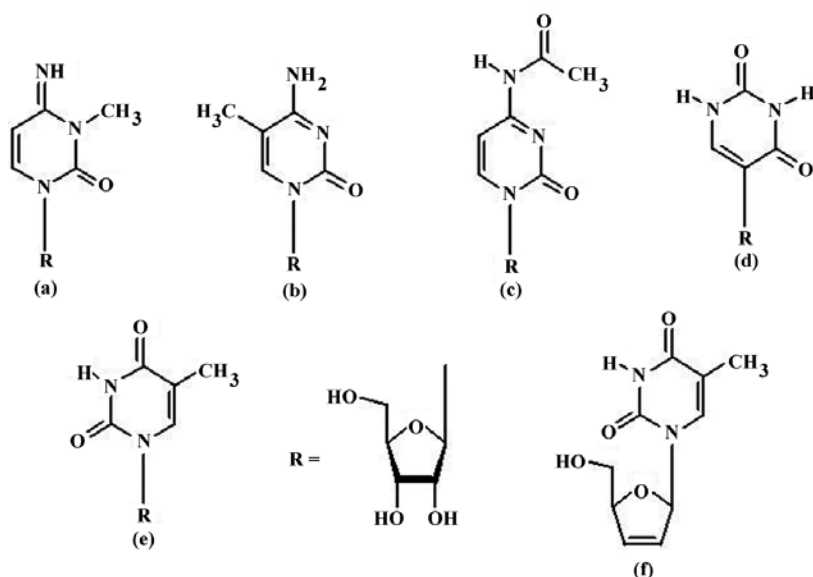
Jedną z najczęstszych przyczyn zgonów w ostatnich dziesięcioleciach są choroby nowotworowe. W chorobach nowotworowych komórki organizmu dzielą się w sposób niekontrolowany. Ich wczesne

rozpoznanie jest niezwykle istotne, gdyż daje możliwość zastosowania właściwej i skutecznej terapii. Normalne i zmodyfikowane nukleozydy reprezentują grupę potencjalnych biomarkerów w diagnostyce nowotworów. Kwas rybonukleinowy, oprócz adenyzy, guanozy, urydyny i cytydyny, zawiera około sto modyfikowanych nukleozydów powstałych w wyniku procesów potranskrypcyjnych (ryc. 4), takich jak metylacja, hydroksylacja, redukcja, izomeryzacja, wprowadzenie grupy tiolowej [10]. Są to m. in. 3-metylocytydina (ryc. 4a), 5-metylocytydina (ryc. 4b), N^4 -acetylcytydina (ryc. 4c) oraz pseudourydina (ryc. 4d). Celem tych modyfikacji jest zwiększenie aktywności biologicznej kwasu rybonukleinowego w wielu procesach biochemicznych.

Najintensywniejszej modyfikacji ulega transportujący kwas rybonukleinowy (tRNA). Po zakończeniu translacji kwas rybonukleinowy jest metabolizowany i uwalnia nukleozydy. Modyfikowane nukleozydy nie mogą być wykorzystane w syntezie *de novo* kwasu rybonukleinowego. Są usuwane z komórek jako produkty końcowe metabolizmu i z krwią trafiają do moczu. Wzrost wydalania modyfikowanych nukleozydów obserwuje się u pacjentów chorych na zespół nabytego niedoboru odporności i niektóre nowotwory płuc, przełyku, piersi, jajnika oraz białaczkę i chłoniaki.

Zwiększona zawartość modyfikowanych nukleozydów w moczu, sugeruje wzmożoną szybkość przemian metabolicznych tRNA w tkankach guza. Natomiast w niektórych nowotworach po zastosowaniu chemioterapii obserwowano szybki spadek poziomu ekskrecji modyfikowanych nukleozydów i poziom ten był stały przez cały okres remisji choroby [11]. Określenie stężenia modyfikowanych nukleozydów w moczu może być zatem zarówno dobrą metodą diagnostyczną jak i narzędziem ułatwiającym monitorowanie terapii.

Jégourel i wsp. [12] zsyntezowali polimer ze śladem molekularnym 5-metylourydyny (ryc. 4e), jako materiał umożliwiający selektywną adsorpcję nukleozydów pirymidynowych z moczu metodą SPE. W celu uzyskania polimeru o wysokiej selektywności adsorpcji, autorzy zastosowali strategię semi-kowalencyjną tworzenia śladu molekularnego i wybrali najlepszy polimer spośród wielu otrzymanych z różnych monomerów funkcyjnych i czynników sieciujących, np. z estru winylofenyloboranowego 5-metylourydyny i akrylamidu (ryc. 2c), 2,6-bis(akrylamido)pirydyny (ryc. 2d) lub 2,6-diamino-9-(3/4-winylobenzylu) puryny (ryc. 2e) i diwinylobenzenu (ryc. 2f), dimetakrylanu glikolu etylenowego, trimetakrylanu 2-etylo-2-(hydroksymetylo)propano-1,3-diolu lub triakrylanu pentaerytrytolu (ryc. 2g).



RYC. 4. Wzory chemiczne modyfikowanych nukleozydów: 3-metylocytydyna (a), 5-metylocytydyna (b), N^4 -acetylocytydyna (c), pseudourydyna (d), 5-metylourydyna (e), 3'-deoksy-2',3'-didehydrotymidyna (f)

FIG. 4. Chemical formulas of modified nucleosides: 3-methylcytidine (a), 5-methylcytidine (b), N^4 -acetylcytidine (c), pseudouridine (d), 5-methyluridine (e), 3'-deoxy-2',3'-didehydrothymidine (f)

Autorzy ocenili zdolność polimerów do adsorpcji naturalnych nukleozydów: cytydyny, urydyny, guanozyny, adenozyne oraz 3'-deoksy-2',3'-didehydrotymidyny (ryc. 4f), tj. nukleozydu bez grup hydroksylowych w pozycjach 2' i 3'.

Inne spojrzenie na chorobę nowotworową, to traktowanie jej jako stan zaburzonego przekazywania sygnałów na poziomie molekularnym [13]. Transdukcja sygnału zachodzi m. in. dzięki fosforylacji bądź defosforylacji odpowiednich reszt tyrozynowych, treoninowych i serynowych białek. Odwracalna fosforylacja białek reguluje takie procesy jak proliferacja, różnicowanie komórek, apoptoza, a zaburzona ekspresja i aktywność fosforylowanych na tyrozynie białek (hiperfosforylacja) towarzyszy zapoczątkowaniu i progresji nowotworu. Fosforylowane na tyrozynie białka, w tym kinazy tyrozynowe czy białka adaptorowe, zaangażowane są w proces przerzutu nowotworu i mogą być wykorzystane jako markery w diagnostyce i leczeniu raka.

Analiza takich związków jest jednak trudna, ze względu na ich bardzo niskie stężenia i brak odpowiednich technik zagęszczania [14]. Do tego celu mogą być wykorzystywane polimery ze śladem molekularnym białek. Jednakże synteza ich stwarza problemy, które nie mają znaczenia w przypadku cząsteczek wzorcowych o małej masie molowej. Białka są rozpuszczalne w wodzie, podczas gdy najczęściej stosowana procedura syntezy polimeru zakłada użycie rozpuszczalników organicznych. Związki wielkocząsteczkowe w ograniczony sposób penetrują sieć polimeru, co utrudnia ich dotarcie do wnętrza adsorpcyjnej. Dodatkowo białka charakteryzują się mobilnością konformacyjną, na którą wpływ ma-

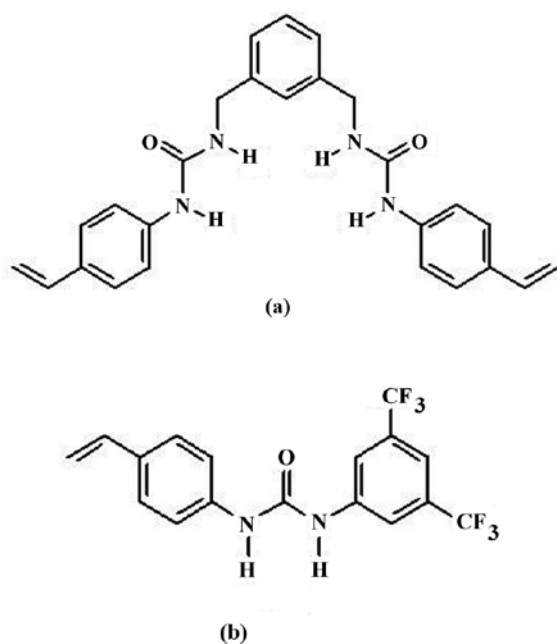
ją temperatura i warunki polimeryzacji. Właściwą konformację mogą zapewnić tylko zbliżone do naturalnych warunki procesu tworzenia śladu molekularnego.

Dotychczas zaproponowano kilka strategii otrzymywania polimerów ze śladem molekularnym protein, m. in. strategię zakładającą tworzenie śladu molekularnego fragmentu białka lub peptydu, czyli kilku aminokwasów (ang. *epitope imprinting*), strategię zakładającą wykorzystanie możliwości chelatowania i zakotwiczenia w matrycy polimeru określonych aminokwasów występujących w strukturze białka (ang. *metal-chelate approach*), strategię wytrawiania lub immobilizacji białka na powierzchni (ang. *grafting/immobilising on surface*) [15].

Emgenbroich i wsp. [16] otrzymali polimer ze śladem molekularnym fosforylowanej tyrozyny z zabezpieczoną grupą aminową i karboksylową (Fmoc-pTyr-OMe). Miejsce wiążące dopasowali do fosforylowanego łańcucha bocznego peptydu. W tym celu użyli monomerów, będących pochodnymi mocznika: 1,1'-[1,3-fenylenebis(metyleno)]bis[3-(4-winylofenylo)mocznika] lub N -3,5-bis(trifluorometylo)fenylo- N' -4-winylofenylo-mocznika (ryc. 5). Schemat tworzenia śladu molekularnego fragmentu cząsteczki w matrycy polimeru do adsorpcji fosforylowanych białek i sam proces adsorpcji, przedstawia rycina 6.

Reakcja polimeryzacji prowadzona była w obecności dimetakrylanu glikolu etylenowego i dodatkowego monomeru funkcyjnego, metakrylamidu (ryc. 2h), a jako porogenu użyto tetrahydrofuranu lub N,N' -dimetyloformamidu.

Autorzy przedstawili bardzo dokładną charakterystykę otrzymanych polimerów, dokonując analizy



RYC. 5. Wzory chemiczne monomerów funkcyjnych pochodnych mocznika, 1,1'-[1,3-fenylenebis(metyleno)]bis[3-(4-winylofenilo)mocznika] (a) i *N*-3,5-bis(trifluorometylo)-fenylo-*N'*-4-winylofenylomocznika (b)

FIG. 5. Chemical formulas of urea derivatives used as the functional monomers, 1,1'-[1,3-phenylenebis(methylene)]bis[3-(4-vinylphenyl)urea] (a) and *N*-3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl-*N'*-4-vinylphenylurea (b)

elementarnej i pomiarów strukturalnych z wykorzystaniem spektroskopii w podczerwieni, spektroskopii fotoelektronów X i spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego, oraz badając morfologię (analiza porozymetryczna i pomiary przy użyciu skaningowej mikroskopii elektronowej). Ponadto, do oszacowania optymalnej stechiometrii kompleksu prepolimeryzacyjnego autorzy wykorzystali modelowanie molekularne. Właściwości adsorpcyjne polimerów weryfikowali przy użyciu różnych technik chromatograficznych z detekcją opartą na spektrometrii mas. Selektowność polimeru określili badając zdolność do adsorpcji krótkich peptydów z fosforylowaną tyrozyną, w obecności nadmiaru ich niefosforylowanych odpowiedników oraz innych fosforylowanych aminokwasów i peptydów, tj. seryny, angiotensyny i treoniny.

Autorzy wykazali większe powinowactwo otrzymanego polimeru do peptydów zawierających fragment fosfotyrozynowy, niż do innych fosforylowanych peptydów.

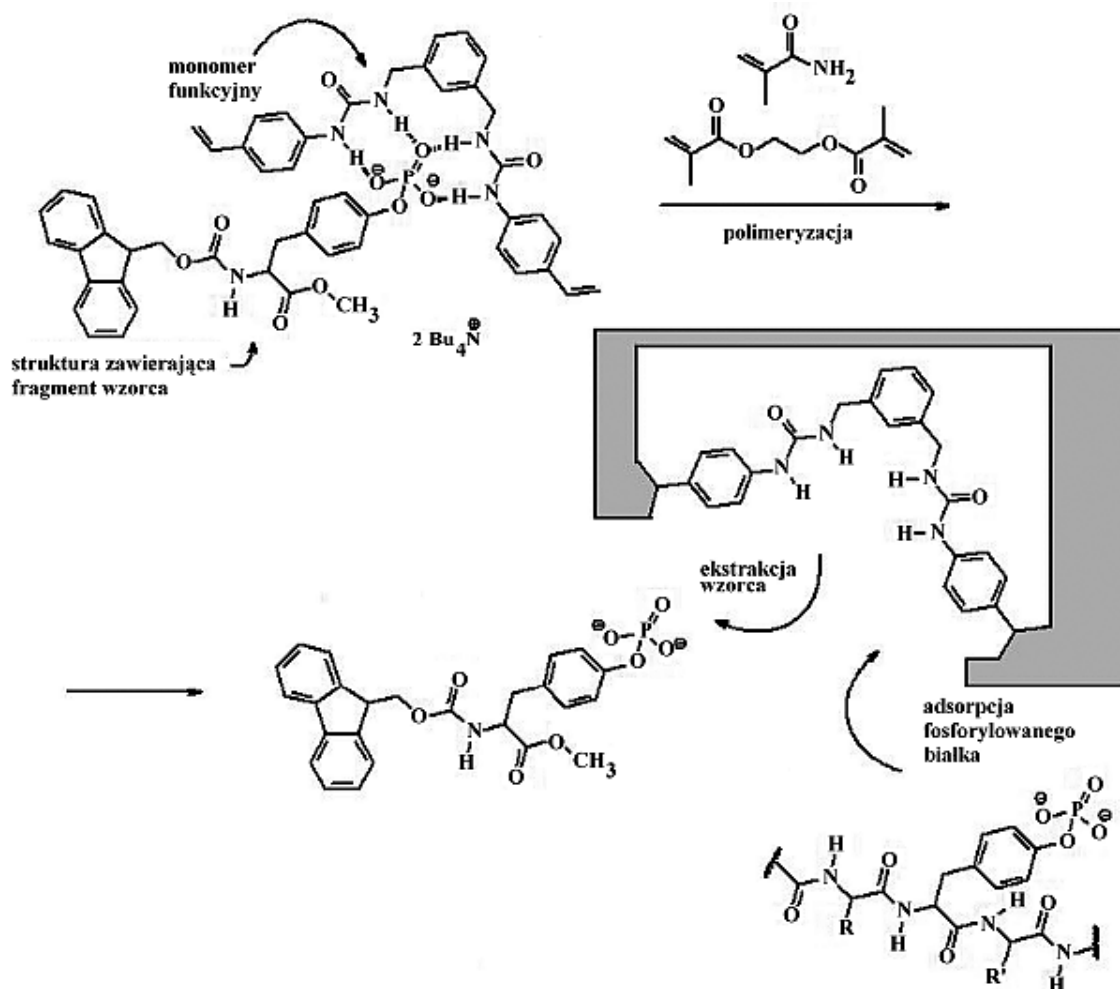
MATERIAŁY POLIMEROWE W DIAGNOSTYCE CHOROÓB NEREK

Choroby nerek należą do grupy chorób bardzo często diagnozowanych u pacjentów. Przewlekła niewydolność nerek jest jedną z nich. Jest to stan postępującego niszczenia struktury tego narządu, prowadzący do upośledzenia czynności nerek. Przewlekła niewydolność nerek może się rozwijać w przebiegu wielu chorób. Stężenie kreatyniny w surowicy krwi jest najczęściej używanym w praktyce klinicznej wskaźnikiem funkcji nerek, a jej podwyższone poziomy są zapowiedzią przewlekłej niewydolności nerek. Kreatynina powstaje w wyniku nieenzymatycznego rozpadu fosforanu kreatyny w mięśniach, w ilości proporcjonalnej do masy mięśniowej (u zdrowego człowieka) i jest wydalana wyłącznie przez nerki (ryc. 7).

Istotnym parametrem służącym do oceny czynności nerek jest klirens kreatyniny, który jest miarą przesączania kłębuszkowego, a oblicza się go na podstawie stężenia kreatyniny w surowicy krwi i w moczu [17]. Obecnie stosowane metody oznaczania stężenia kreatyniny w moczu, oparte są na spektrofotometrycznym pomiarze powstałego w reakcji Jaffe'a kompleksu, jednakże bardzo często w pomiarze przeszkadzają występujące w moczu białka. W ostatniej dekadzie opracowano również inne metody oznaczania kreatyniny np. elektrochemiczne lub chromatograficzne [18, 19]. Z uwagi na ograniczoną selektywność faz stacjonarnych, stanowiących wypełnienia kolumn chromatograficznych, poszukiwanie nowych materiałów wydaje się uzasadnione.

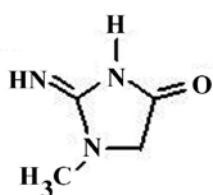
Hsieh i wsp. [20] otrzymali polimery do selektywnej ekstrakcji kreatyniny z moczu, z których jeden był kopolimerem 4-winylopiirydyny (ryc. 2i) i diwinylobenzenu (KPB), zaś drugi był kopolimerem β -cyklodekstryny i epichlorohydryny (KCE). Odpowiednio 4-winylopiirydyna lub β -cyklodekstryna tworzyły niekowalencyjne oddziaływania z kreatyniną (wzorcem). Strukturę β -cyklodekstryny przedstawia rycina 8. Autorzy zbadali selektywność adsorpcji kreatyniny w mieszaninie z *N*-hydroksysukcynimidem oraz 2-pirolidonem. Stosunek adsorpcji kreatyniny do adsorpcji *N*-hydroksysukcynimidu był wysoki i wyniósł 1,86 dla KCE oraz 1,51 dla KPB. Jeszcze wyższe wartości adsorpcji uzyskali dla kreatyniny w stosunku do 2-pirolidonu (odpowiednio 2,34 i 3,11).

Autorzy oszacowali również wpływ obecnego w roztworze chlorku sodu na adsorpcję kreatyniny. Obecne w próbkach biologicznych kationy sodu powodują supresję adsorpcji. Autorzy zaobserwowali



Ryc. 6. Schemat tworzenia śladu molekularnego fragmentu cząsteczki w matrycy polimeru

Fig. 6. Scheme of epitope imprinting process in the polymer matrix



Ryc. 7. Wzór chemiczny kreatyniny

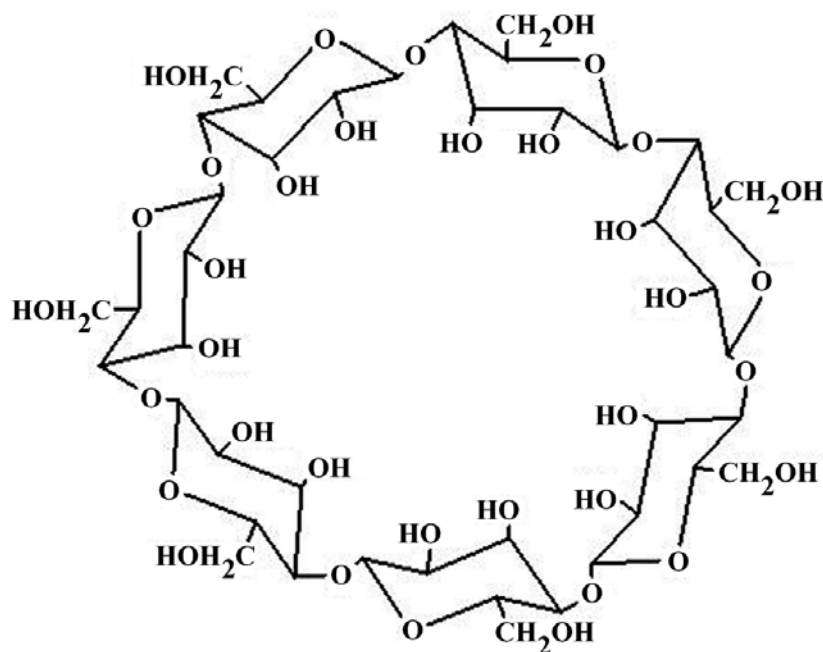
Fig. 7. Chemical formula of creatinine

zmniejszenie adsorpcji kreatyniny, jednakże obecność soli nie wpływała na selektywność wychwytu. Na koniec autorzy przedstawili wyniki badania ekstrakcji do fazy stałej kreatyniny z ludzkiego osocza na KPB. Stężenie jej oznaczali metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją UV. Pomimo znacznej złożoności materiału biologicznego polimery selektywnie adsorbowały kreatyninę. Wyniki

wykazały możliwość aplikacji polimerów ze śladem molekularnym kreatyniny w analizie klinicznej, jednakże istotnym problemem okazała się stosunkowo słaba odtwarzalność złożeń polimerowych.

MATERIAŁY POLIMEROWE W DIAGNOSTYCE I ANALIZIE KLINICZNEJ CHOROÓB SERCA I MIAŻDŻYCY

Niehygieniczny tryb życia, stres i nieprawidłowe odżywianie, to tylko niektóre czynniki ryzyka chorób serca. Mioglobina jest hemoproteiną obecną w mięśniach poprzecznie prążkowanych, zarówno szkieletowych jak i mięśnia sercowego. Jej podstawową rolę jest magazynowanie tlenu. Mioglobina jest uwalniana do krwi w przypadku uszkodzenia tkan-



Ryc. 8. Wzór chemiczny β -cyklodekstryny

FIG. 8. Chemical formula of β -cyclodextrin

ki mięśniowej lub zawale serca [21]. Jest wczesnym markerem wykorzystywanym w diagnozie ostrego zawału mięśnia sercowego, pozwalającym na ocenę rozległości powstałych uszkodzeń [22].

Lin i wsp. [23] zsyntezowali polimer z odciskiem molekularnym mioglobiny w postaci cienkiego filmu. Synteza polimeru przebiegała w następujący sposób. Autorzy przygotowali dwie płytki szklane. Jedna z nich tzw. przykrywająca (ang. *cover glass*) została dokładnie przemyta heksametylodosilazanem. Następnie została zanurzona na 2 godz. w roztworze mioglobiny o stężeniu 0,568 $\mu\text{mol/L}$ i pH 7,4. Po wyjęciu została wysuszona w strumieniu azotu. W ten sposób białko zostało immobilizowane na płytce. Druga płytka tzw. substratowa (ang. *substrate glass*) została najpierw pokryta warstwą poli(estru 3-trimetoksypropylosililowego kwasu metakrylowego), a następnie mieszaniną zawierającą wybrany monomer funkcyjny, czynnik sieciujący i inicjator. Obie płytki właściwymi stronami zostały ze sobą zetknięte (ang. *sandwich contact*) i poddane działaniu promieni UV, w celu polimeryzacji warstwy zawierającej mieszaninę monomerów. W czasie polimeryzacji powstał odcisk molekularny mioglobiny na płytce substratowej. Ostatnim etapem było rozdzielenie płytek i dokładne przemycie płytki substratowej w celu usunięcia wzorca.

Omówiony proces tworzenia śladu molekularnego jest zwany procesem mikrokontaktowym (ang. *micro-contact imprinting*). Optymalizacja struktury filmu zakładała dobór monomeru funkcyjnego, któ-

ry powinien tworzyć silne oddziaływania z białkiem oraz dobór czynnika sieciującego słabo oddziałującego z białkiem. W tym przypadku chodziło o redukcję adsorpcji niespecyficznej. Autorzy wybrali metakrylan metylu (ryc. 2j) jako monomer funkcyjny, gdyż on z rozważanej grupy kilkunastu monomerów tworzył najsilniejsze oddziaływania z mioglobiną. Czynnikiem sieciującym był dimetakrylan glikolu tetrametylenowego (ryc. 2k), który praktycznie nie oddziaływał z mioglobiną. Istotnym punktem prac był dobór odpowiednich warunków usuwania wzorca z filmu po polimeryzacji.

Autorzy scharakteryzowali otrzymaną matrycę stosując analizę Scatcharda oraz przedstawili mikrografy powierzchni warstwy, otrzymane przy użyciu mikroskopii sił atomowych. Mikrografy potwierdziły obecność w matrycy polimeru miejsc zdolnych adsorbować mioglobinę.

Miażdżycza tętnic jest przewlekłą chorobą objawiającą się zmianami zwyrodnieniowymi w błonie wewnętrznej i środkowej tętnic, na skutek gromadzenia się cholesterolu i lipidów. Cholesterol jest steroidem znajdującym się w błonach komórkowych. Jest on także prekursorem w syntezie kwasów żółciowych, hormonów steroidowych i witaminy D. W procesie transportu cholesterolu w surowicy krwi uczestniczą lipoproteiny. Najważniejsze są LDL (ang. *low density lipoproteins*) transportujące cholesterol do tkanek i HDL (ang. *high density lipoproteins*) transportujące go do wątroby, gdzie ulega metabolizmowi [24]. Hippercholesterolemia jest przyczyną chorób sercowo-

naczyniowych i wiąże się z osłabieniem skurczowej i rozkurczowej funkcji serca. Podwyższony poziom innych niż HDL frakcji cholesterolu (ang. *non-HDL-cholesterol*), związany jest ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia choroby niedokrwiennej [25].

Shi i wsp. [26] otrzymali polimer ze śladem molekularnym cholesterolu. Autorzy zastosowali strategię niekowalencyjną i otrzymali kompleks prepolimeryzacyjny pomiędzy cholesterolem i kwasem metakrylowym (ryc. 21). Następnie przeprowadzili polimeryzację w bloku w obecności czynnika sieciującego, dimetakrylanu glikolu etylenowego w porożeniu, którym był układ chloroform-toluen 7:1 v/v. Otrzymane ziarna polimerowe zostały wykorzystane jako faza stacjonarna w procesie ekstrakcji cholesterolu do fazy stałej.

Niezwykle istotnym etapem badań była optymalizacja procedury SPE, która udowodniła aplikacyjne właściwości materiału. Autorzy zbadali wpływ polarności rozpuszczalnika na adsorpcję cholesterolu na etapie nałożenia. W zależności od polarności roztworu zaobserwowali znacząco różną adsorpcję. Adsorpcja cholesterolu z etanolu była znikoma, z toluenu była na poziomie 40-50%, a z heksanu wynosiła 100%. Niestety zarówno na polimerze ze śladem molekularnym jak i na polimerze kontrolnym wynosiła tyle samo.

W celu uwypuklenia miejsc selektywnych w matrycy polimerowej, autorzy zoptymalizowali etap przemycia. Zastosowali najpierw heksan, a potem roztwór toluenu i heksanu w stosunku 1:9 v/v. Taka procedura przemycia spowodowała prawie całkowitą desorpcję cholesterolu z polimeru kontrolnego, a jednocześnie nie usunęła cholesterolu z polimeru ze śladem molekularnym. Ostatni etap procedury SPE, czyli etap elucji, został również zoptymalizowany. Najlepszym eluentem okazał się roztwór o składzie chloroform-etanol-kwas octowy 3:1:1 v/v, który ilościowo desorbował cholesterol z polimeru ze śladem molekularnym. Selektywność złoża określono badając adsorpcję estradiolu. Autorzy wykazali możliwość wykorzystania polimeru do ekstrakcji cholesterolu z materiału biologicznego, takiego jak: mleko, mięso wieprzowe, mięso wołowe, krewetki, jaja i ludzkie osocze.

W analizie miażdżycy markerem może być też fosfatydylocholina. Fosfatydylocholina (nazywana potocznie lecytyną) należy do grupy glicerofosfolipidów i powstaje z połączenia kwasu fosfatydowego z resztą choliny. Jest najbardziej rozpowszechnionym w organizmie fosfolipidem oraz podstawowym składnikiem błon komórkowych, zwłaszcza ich warstw zewnętrznych [27]. Jest także głównym fosfolipidem

surowicy, stanowi bowiem integralną część lipoprotein. Zarówno w lipoproteinach HDL, jak i LDL stanowi ponad 60% wszystkich fosfolipidów [28].

Pegoraro i wsp. [29] otrzymali membranę ze śladem fosfatydylocholiny, selektywnie rozpoznającą fosfolipidy na bazie kopolimeru polietylenu i alkoholu poliwinylowego. Właściwości otrzymanej membrany zostały dokładnie zbadane przy użyciu technik spektralnych, kalorymetrycznych i analizy termogravimetrycznej. Powierzchnię membrany zanalizowano stosując mikroskopię sił atomowych. Membrana wykazywała pięciokrotnie większą adsorpcję fosfatydylocholiny niż membrana kontrolna. Jednocześnie selektywność adsorpcji fosfatydylocholiny w odniesieniu do adsorpcji związków o zbliżonej strukturze, tj. fosfatydyloetanoloaminy i fosfatydyloinozytolu była wysoka.

MATERIAŁY POLIMEROWE W ANALIZIE KRWI

Hemoglobina jest białkiem syntetyzowanym w szpiku kostnym, obecnym w erytrocytach i odpowiedzialnym za transport tlenu do tkanek. Przy poziomie hemoglobiny we krwi poniżej normy, (<12g/dL u kobiet, <13g/dL u mężczyzn) stwierdza się niedokrwistość [30]. Jest ona istotnym problemem zdrowotnym, gdyż dotyka około dwóch miliardów ludzi na całym świecie, głównie na skutek występowania niedoborów żelaza. Wiąże się z uszkodzeniem mechanizmów odporności i jest uważana za główny czynnik ryzyka niewłaściwego przebiegu ciąży [31].

Guo i wsp. [32] zastosowali strategię tworzenia filmu ze śladem molekularnym do otrzymania polimeru selektywnie adsorbującego hemoglobinę. W celu poprawy właściwości mechanicznych żelu poliakrylamidowego autorzy zastosowali jako matrycę chitosan, liniowy polisacharyd D-glikozoaminy i N-acetyloglikozoaminy. Chitosan był najpierw usieciowany w reakcji z epichlorohydryną, a następnie jego powierzchnię pokryto warstwą żelu poliakrylamidowego w obecności hemoglobiny jako wzorca. Następnie usunięto hemoglobinę poprzez dokładne przemycie 10% kwasem octowym. Autorzy przedstawili mikrografy powierzchni ziaren otrzymane przy użyciu skaningowej mikroskopii elektronowej, scharakteryzowali parametry adsorpcji oraz określili zdolność matrycy do wielokrotnego zastosowania. Odtwarzalność wyników, w zależności od badanego stężenia, po trzech cyklach adsorpcji i desorpcji, wynosiła ponad 94%.

Erytrocyty posiadają na swojej powierzchni charakterystyczne antygeny A, B i H. Obecność odpowiednich antygenów jest niezwykle istotna podczas przetaczania krwi. W medycynie transfuzyjnej w celu identyfikacji odpowiedniej grupy krwi, wykorzystuje się przeciwciała immobilizowane na żelu dekstranowym. Jedynie niektóre z przeciwciał są w stanie rozróżnić podgrupy A_1 i A_2 . Różnica pomiędzy oboma podgrupami polega na odmiennej strukturze powierzchni erytrocytów i różnej gęstości odpowiednich antygenów (A_1 : $0,81 - 1,17 \times 10^6$ A-antygenów w erytrocycie, A_2 : $2,4 - 2,9 \times 10^5$ A-antygenów w erytrocycie) [33-35].

Seifer i wsp. [36] otrzymali polimer ze śladem molekularnym erytrocytu odpowiedniej podgrupy. Autorzy zastosowali mikrokontaktowy proces tworzenia śladu molekularnego, opisany uprzednio w części dotyczącej tworzenia śladu mioglobiny. Najpierw przygotowali mieszaninę prepolimeryzacyjną zawierającą monomer funkcyjny, 1-winylo-2-pirolidon (ryc. 2m) oraz czynnik sieciujący, N,N' -metylenobisakrylamid (ryc. 2n) oraz odpowiedni inicjator reakcji polimeryzacji. Po krótkim czasie od momentu zainicjowania polimeryzacji przenieśli żelującą mieszaninę w postaci cienkiej warstwy na płytkę kwarcową i następnie umieścili na niej zagęszczone erytrocyty z krwi. Proces polimeryzacji był kontynuowany przez następne 12 godz. Po usunięciu erytrocytów, płytki z cienką warstwą polimeru ze śladem erytrocytów, posłużyły jako część sensorowa bioczuJNIKA krystalicznej nanowagi kwarcowej.

Istotnym problemem badawczym była optymalizacja czasu żelowania mieszaniny polimeryzacyjnej. Przy zbyt szybkim naniesieniu erytrocytów na żel, ulegały one destrukcji w środowisku organicznych monomerów, natomiast po zbyt długim czasie matryca była zbyt twarda, aby utworzył się w niej ślad. Nawet w optymalnym czasie, który ustalono na 1-5 minut, znaczna część erytrocytów ulegała całkowitej sedimentacji w matrycy, co uniemożliwiało ich późniejsze usunięcie. Przeprowadzone pomiary potwierdziły jednak selektywność otrzymanej matrycy względem podgrup A_1 i A_2 .

PODSUMOWANIE

Polimery ze śladem molekularnym są nowymi, selektywnymi materiałami, które mogą znaleźć zastosowanie w diagnostyce medycznej i analizie klinicznej. Niniejsza praca przeglądowa ukazuje za-

awansowany stopień badań nad wdrożeniem omawianych materiałów do praktyki medycznej, w różnych obszarach diagnostyki i analizy klinicznej.

LITERATURA

- [1] LULIŃSKI P.: Polimery ze śladem molekularnym w naukach farmaceutycznych. Cz. I. Podstawy procesu tworzenia śladu molekularnego. Zastosowanie w syntezie leków i technologii postaci leku. *Polimery* (2010), 11-12, 799-805.
- [2] LULIŃSKI P.: Polimery ze śladem molekularnym w naukach farmaceutycznych. Cz. II. Zastosowanie w analizie farmaceutycznej. *Polimery* (2011), 1, 3-10.
- [3] PILETSKY S. A., TURNER N. W., LAITENBERGER P.: Molecularly imprinted polymers in clinical diagnostics – Future potential and existing problems. *Medical Engineering and Physics* (2006), 28, 971-977.
- [4] LAPOLLA A., TRALDI P., FEDELE D.: Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins. *Clinical Biochemistry* (2005), 38, 103-115.
- [5] SACKS D. B.: Correlation between hemoglobin A1c (HbA1c) and average blood glucose: can HbA1c be reported as estimated blood glucose concentration? *Journal of Diabetes Science and Technology* (2007), 1, 801-803.
- [6] NATHAN D. M., BALKAU B., BONORA E., BORCH-JOHNSEN K., BUSE J. B., COLAGUIRI S., DAVIDSON M. B., DEFONZO R., GENUTH S., HOLMAN R. R., J. L., KIRKMAN S., KNOWLER W. C., SCHATZ D., SHAW J., SOBNGWI E., STEFFES M., VACCARO O., WAREHAM N., ZINMAN B., KAHN R.: International expert committee report on the role of the A1c assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* (2009), 32, 1327-1334.
- [7] YAMAZAKI T., OHTA S., YANAI Y., SODE K.: Molecular imprinting catalyst based artificial enzyme sensor for fructosylamines. *Analytical Letters* (2003), 36, 75-89.
- [8] SODE K., OHTA S., YANAI Y., YAMAZAKI T.: Construction of a molecular imprinting catalyst using target analogue template and its application for an amperometric fructosylamine sensor. *Biosensors and Bioelectronics* (2003), 18, 1485-1490.
- [9] RAJKUMAR R., WARSINKE A., MOHWALD H., SCHELLER F. W., KATTERLE M.: Development of fructosyl valine binding polymers by covalent imprinting. *Biosensors and Bioelectronics* (2007), 22, 3318-3325.

- [10] BULLINGER D., NEUBAUER H., FEHM T., LAUFER S., GLEITER C. H., KAMMERER B.: Metabolic signature of breast cancer cell line MCF-7: profiling of modified nucleosides via LC-IT MS coupling. *BMC Biochemistry* (2007), 8: 25.
- [11] SEIDEL A., BRUNNER S., SEIDEL P., FRITZ G. I., HERBARTH O.: Modifies nucleosides: an accurate tumour marker for clinical diagnosis of cancer, early detection and therapy control. *British Journal of Cancer* (2006), 94, 1726–1733.
- [12] JEGOUREL D., DELEPEE R., BRETON F., ROLLAND A., VIDAL R., AGROFOGLIO L. A.: Molecularly imprinted polymer of 5-methyluridine for solid-phase extraction of pyrimidine nucleoside cancer markers in urine. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* (2008), 16, 8932–8939.
- [13] AZUMA K., TANAKA M., UEKITA T., INOUE S., YOKOTA J., OUCHI Y., SAKAI R.: Tyrosine phosphorylation of paxillin affects the metastatic potential of human osteosarcoma. *Oncogene* (2005), 24, 4754–4764.
- [14] EMGENBROICH M., BORRELLI C., SHINDE S., LAZRAQ I., VILELA F., HALL A. J., OXELBARK J., DE LORENZI E., COURTOIS J., SIMANOVA A., VERHAGE J., IRGUM K., KARIM K., SELLERGREN B.: A phosphotyrosine – imprinted polymer receptor for the recognition of tyrosine phosphorylated peptides. *Chemistry A European Journal* (2008), 14, 9516–9529.
- [15] ROBINSON-BENNETT B. L., DEFORD J., DIAZ-ARRASTIA C., LEVINE L., WANG H.-Q., HANNIGAN E. V., PAPAConstantinou J.: Implications of tyrosine phosphoproteomics in cervical carcinogenesis. *Journal of Carcinogenesis* (2008), 7: 2.
- [16] BOSSI A., BONINI F., TURNER A. P. F., PILETSKY S. A.: Molecularly imprinted polymers for the recognition of proteins: the state of art. *Biosensors and Bioelectronics* (2007), 22, 1131–1137.
- [17] PASSOS V. M. A., BARRETO S. M., LIMA-COSTA M. F. F.: Detection of renal dysfunction based on serum creatinine levels in a Brazilian community. The Bambui health and ageing study. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (2003), 36, 393–401.
- [18] HARLAN R., CLARKE W., DI BUSSOLO J. M., KOZAK M., STRASESKI J., LI MEANY D.: An automated turbulent flow liquid chromatography – isotope dilution mass spectrometry (LC-IDMS) method for quantitation of serum creatinine. *Clinica Chimica Acta* (2010), 411, 1728–1734.
- [19] PANDEY P. C., MISHRA A. P.: Novel potentiometric sensing of creatinine. *Sensors and Actuators B* (2004), 99, 230–235.
- [20] HSIEH R.-Y., TSAI H.-A., SYU M.-J. Designing a molecularly imprinted polymer as an artificial receptor for the specific recognition of creatinine in serum. *Biomaterials* (2006), 27, 2083–2089.
- [21] LAURENCE A. S.: Serum myoglobin and creatine kinase following surgery. *British Journal of Anaesthesia* (2000), 84, 763–766.
- [22] YAMAMOTO M., KOMIYAMA N., KOIZUMI T., NAMEKI M., YAMAMOTO Y., TOYODA T., OKUNO T., TATENO K., SANO K., HIMI T., KURIYAMA N., NAMIKAWA S., YOKOYAMA M., KOMURO I.: Usefulness of rapid quantitative measurement of myoglobin and troponin T in early diagnosis of acute myocardial infarction. *Circulation Journal* (2004), 68, 639–644.
- [23] LIN H.-Y., RICK J., CHOU T.-C.: Optimizing the formulation of a myoglobin molecularly imprinted thin-film polymer – formed using a micro-contact imprinting method. *Biosensors and Bioelectronics* (2007), 22, 3293–3301.
- [24] GOLDSTEIN J. L., BROWN M. S.: The LDL receptor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* (2009), 29, 431–438.
- [25] NODA H., ISO H., IRIE F., SAIRENCHI T., OHATAKA E., OHTA H.: Association between non-high-density lipoprotein cholesterol concentrations and mortality from coronary heart disease among Japanese men and women: the Ibaraki prefecture health study. *Journal of Artherosclerosis and Thrombosis* (2010), 17, 30–36.
- [26] SHI Y., ZHANG J.-H., SHI D., JIANG M., ZHU Y.-X., MEI S.-R., ZHOU Y.-K., DAI K., LU B.: Selective solid-phase extraction of cholesterol using molecularly imprinted polymers and its application in different biological samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2006), 42, 549–555.
- [27] HIGGINS J. A.: The transverse distribution of phospholipids in the membranes of Golgi subfractions of rat hepatocytes. *Biochemistry Journal* (1984), 219, 261–272.
- [28] YAMAMOTO A.: Phospholipids and their fatty acid composition in hyperlipemia. *Japanese Journal of Medicine* (1975), 14, 104–106.
- [29] PEGORARO C., SILVESTRI D., CIARDELLI G., CRISTALLINI C., BARBANI N.: Molecularly imprinted poly(ethylene-co-vinyl alcohol) membranes for the specific recognition of phospholipids. *Biosensors and Bioelectronics* (2008), 24, 748–755.
- [30] VAN STRATEN A. H. M., HAMAD M. A. S., VAN ZUNDERT A. J., MARTENS E. J., SCHONBERGER J. P. A. M., DE WOLF A. M.: Preoperative hemoglo-

- bin level as a predictor of survival after coronary artery bypass grafting. *Circulation* (2009), 120, 118–125.
- [31] XING Y., YAN H., DANG S., ZHUOMA B., ZHOU X., WANG D.: Hemoglobin levels and anemia evaluation during pregnancy in the highlands of Tibet: a hospital based study. *BMC Public Health* (2009), 9: 336.
- [32] GUO T. Y., XIA Y. Q., HAO G. J., SONG M. D., ZHANG B. H.: Adsorptive separation of hemoglobin by molecularly imprinted chitosan beads. *Biomaterials* (2004), 25, 5905–5912.
- [33] BIRD G. W. G.: Relationship of the blood subgroups A_1 , A_2 and A_1B , A_2B to haemagglutinins present in the seeds of *Dolichos biflorus*. *Nature* (1952), 170, 674.
- [34] ECONOMIDOU J., HUGHES-JONES N. C., GARDNER B.: Quantitive measurements concerning A and B antigens sites. *Vox Sanguinis* (1967), 12, 321–328.
- [35] FURUKAWA K., CLAUSEN H., HAKOMORI S.-I., SAKAMOTO J., LOOK K., LUNDBLAD A., MATTES M. J., LLOYD K. O.: Analysis of the specificity of five murine anti-blood group A monoclonal antibodies, including one that identifies type 3 and type 4 determinants. *Biochemistry* (1985), 24, 7820–7826.
- [36] SEIFER A., LIEBERZEIT P., JUNGBAUER C., DICKERT F. L.: Synthetic receptors for selectively detecting erythrocyte ABO subgroups. *Analytica Chimica Acta* (2009), 651, 215–219.

Adres autorów:

Katedra i Zakład Chemii Organicznej
Wydział Farmaceutyczny
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa
tel./faks +22 572 0643
e-mail: piotr.lulinski@wum.edu.pl

