

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Wydział Farmaceutyczny
Katedra i Zakład Chemii Fizycznej
ul. Kurpińskiego 5
85-096 Bydgoszcz
tel. (052) 585-36-11
e-mail: chemfiz@cm.umk.pl

**AUTOREFERAT PRZEDSTAWIAJĄCY OPIS DOROBKU
I OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH**

do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

dr inż. Przemysław Krawczyk

1. IMIĘ I NAZWISKO: Przemysław Krawczyk

2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE

27.06.2003	Dyplom magistra inżyniera technologii chemicznej, specjalność ochrona środowiska uzyskany na Wydziale Technologii i Inżynierii Chemicznej Akademii Techniczno-Rolniczej im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy na podstawie pracy magistersko-inżynierskiej pt. "Badanie podstaw metodycznych oznaczania wybranych pestycydów w owocach" pod kierunkiem dr. inż. Łukasza Dąbrowskiego
21.12.2011	Stopień doktora nauk chemicznych w dyscyplinie chemia nadany uchwałą Rady Wydziału Technologii i Inżynierii Chemicznej Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy na podstawie dysertacji pt. "Zastosowanie metod chemii kwantowej do opisu spektroskopowych oraz nieliniowych w właściwości optycznych wybranych pochodnych azobenzenu" pod kierunkiem prof. dr hab. Piotra Cysewskiego

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

10. 2004 - 09.2013	Collegium Medicum im. Ludwika Rydgiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu Katedra i Zakład Chemii Fizycznej Wydział Farmaceutyczny Stanowisko: asystent
09.2013 - obecnie	Collegium Medicum im. Ludwika Rydgiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu Katedra i Zakład Chemii Fizycznej Wydział Farmaceutyczny Stanowisko: adiunkt

4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO 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. NR 65, POZ. 595 ZE ZM.

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Zgodnie z treścią w/w ustawy, osiągnięciem naukowym, dołączonym do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego, jest cykl siedmiu prac powiązanych tematycznie, objętych wspólnym tytułem:

Projektowanie nowych sond fluorescencyjnych o potencjalnym zastosowaniu w obrazowaniu medycznym wraz z oceną ich aktywności biologicznych i ewaluacją wpływu na właściwości koniugatu z białkiem

4.2. Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Osiągnięcie naukowe zostało udokumentowane cyklem **siedmiu** przedstawionych poniżej prac opublikowanych w recenzowanych czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) o sumarycznym współczynniku IF równym **19.891**, co stanowi **200** punktów MNiSW. We wszystkich tych pracach jestem autorem korespondencyjnym.

H1. P. Krawczyk, M. Pietrzak, T. Janek, B. Jędrzejewska, P. Cysewski, *Spectroscopic and nonlinear optical properties of new chalcone fluorescent probes for bioimaging applications: a theoretical and experimental study*, J. Mol. Model. 2016, vol. 22, s. 125: 1-11. DOI: 10.1007/s00894-016-2990-4

IF₂₀₁₆: 1.425, Pkt. MNiSW: 20.000

H2. P. Krawczyk, B. Jędrzejewska, M. Pietrzak, T. Janek, *Synthesis, spectroscopic, physicochemical properties and binding site analysis of 4-(1H-phenanthro[9,10-d]-imidazol-2-yl)-benzaldehyde fluorescent probe for imaging in cell biology: Experimental and theoretical study*, J. Photochem. Photobiol. B-Biol., 2016, vol. 164, s. 112-122. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2016.07.044

IF₂₀₁₆: 2.673, Pkt. MNiSW: 30.000

H3. P. Krawczyk, B. Jędrzejewska, M. Pietrzak, T. Janek, *Synthesis, photophysical properties and systematic evaluations of new phenanthroimidazole fluorescent probe for bioimaging : Experimental and theoretical study*, J. Photochem. Photobiol. B-Biol., 2017, vol. 166, s. 74-85. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2016.11.008

IF₂₀₁₇: 3.165, Pkt. MNiSW: 30.000

H4. P. Krawczyk, B. Jędrzejewska, P. Cysewski, T. Janek, *Synthesis, photophysical and biological properties of a new oxazolone fluorescent probe for bioimaging: an experimental and theoretical study*, Org. Biomol. Chem., 2017, vol. 15, s. 8952-8966. DOI: 10.1039/c7ob02439h

IF₂₀₁₇: 3.423, Pkt. MNiSW: 35.000

H5. P. Krawczyk, P. Czeleń, B. Szeffler, P. Cysewski, *Theoretical studies on the interaction between chalcone dyes and Concanavalin A - the reactive group effects on the photophysical and biological properties of the fluorescence probe*, J. Photochem. Photobiol. A-Chem., 2017, vol. 346, s. 327-337. DOI: 10.1016/j.photochem.2017.06.024

IF₂₀₁₇: 2.891, Pkt. MNiSW: 25.000

H6. P. Krawczyk, P. Czeleń, P. Cysewski, *Reactive group effects on the photophysical and biological properties of 2-phenyl-1H-phenanthro[9,10-d]imidazole derivatives as fluorescence markers*, Org. Biomol. Chem., 2018, vol. 16, s. 3788-3800. DOI: 10.1039/c8ob00729b

IF₂₀₁₈: 3.423, Pkt. MNiSW: 35.000

H7. P. Krawczyk, P. Czeleń, T. Jeliński, P. Cysewski, *The influence of donor substituents on spectral properties and biological activities of fluorescent markers conjugated with protein*, J. Photochem. Photobiol. A-Chem., 2018, vol. 365, s. 157-168. DOI: 10.1016/j.jphotochem.2018.08.003

IF₂₀₁₈: 2.891, Pkt. MNiSW: 25.000

Syntezy nowych barwników oraz pomiary eksperymentalnych właściwości spektroskopowych wykonano w Zakładzie Technologii Chemicznej i Fizykochemii Materiałów Wydziału Technologii i Inżynierii Chemicznej Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy [H1-H4].

Badania *in vitro* z zastosowaniem nowych sond fluorescencyjnych wykonano w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej Wydziału Farmaceutycznego z O. Analityki Medycznej Uniwersytetu im. Piastów Śląskich we Wrocławiu [H1-H4].

- Kopie powyższych prac znajdują się z Załączniku nr 4.
- Oświadczenia współautorów o indywidualnym wkładzie autorskim znajdują się w Załączniku nr 5.
- Określenie indywidualnego wkładu autorskiego w powstanie wyżej wymienionych prac znajduje się w Załączniku nr 6.

4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich potencjalnego wykorzystania praktycznego

Obrazowanie molekularne (bioobrazowanie) stało się potężnym i wszechstronnie wykorzystywanym narzędziem w badaniach medycznych, ze względu na unikatowe możliwości wizualizacji cech anatomicznych i morfologicznych szczegółów na poziomie komórkowym i subkomórkowym. Wizualizacja tych zjawisk jest możliwa dzięki wprowadzaniu do organizmu żywego odpowiednio skonstruowanych znaczników fluorescencyjnych. Ich wiązanie się ze specyficznymi elementami struktury tkankowej pozwala na przestrzenną ocenę tych struktur oraz monitorowanie procesów w nich zachodzących. Szczególnie interesująca jest możliwość wykorzystania tych technik w analizie oddziaływań, które odpowiadają za rozwój procesów chorobotwórczych, jak również śledzenia farmaceutyków w trakcie ich interakcji z biocząsteczkami. Ponadto, metody te mają olbrzymie znaczenie dla monitorowania nowych terapii działających lub sterowanych na poziomie komórkowym i molekularnym¹⁻³. Dla przykładu, zasadą leczenia wielu nowotworów złośliwych są zabiegi cytoredukcyjne polegające na doszczętnym wycięciu ogniska pierwotnego wraz z jego przerzutami. Zastosowanie technik obrazowania medycznego w trakcie chirurgicznego zabiegu operacyjnego umożliwia z jednej strony poprawę dokładności wycięcia zmian nowotworowych, a z drugiej prowadzi do ograniczenia resekcji tkanek zdrowych. Obecnie stosowane techniki obrazowania medycznego są konsekwencją podjętych w 1972 roku pierwszych prób znakowania i śledzenia określonych obiektów mikrobiologicznych wykonanych na potrzeby metod medycyny nuklearnej. Obecnie dynamicznie rozwijającą się techniką obrazowania medycznego są metody wykorzystujące właściwości światła, zwłaszcza promieniowania emitowanego przez lasery. Spośród ich wielu odmian, w szczególności bardzo ważnymi narzędziami dla diagnostów stały się badania mikroskopowe wykorzystujące zjawisko fluorescencji przy zastosowaniu mikroskopu fluorescencyjnego oraz konfokalnego. Technika mikroskopii fluorescencyjnej opiera się na pomiarze fluorescencji związków chemicznych (bioznaczników) związanych z określonymi typami komórek, strukturami wewnątrzkomórkowymi lub grupami chemicznymi. W celu uzyskania odpowiedniego obrazu i detekcji biomolekuł wykorzystuje się tu zdolność niektórych związków chemicznych zawartych w komórkach, jak np. chlorofil, do autofluorescencji lub fluorescencji wywołanej czynnikiem biochemicznym. Znacznie powszechniejszym jest fluorescencyjna modyfikacja chemiczna białek polegająca na przyłączeniu zewnętrznego znacznika fluorescencyjnego (fluorochromu) w postaci białka

fluorescencyjnego (FP, ang. *fluorescent protein*) lub barwnika fluorescencyjnego do bioukładu^{4,5}. W tego rodzaju koniugacji bardzo istotne jest precyzyjne umiejscowienie znacznika w sekwencji czy na powierzchni makromolekuły tak, by nie zakłócał on aktywności białka oraz by produkt sprzęgania mógł być wykorzystany do charakterystyki wybarwianego białka. Białka fluorescencyjne występują naturalnie w wielu organizmach, głównie u stawonogów, mięczaków i ryb, a ich rola nie jest szczegółowo poznana. W szczególności, jednym z największych narzędzi medycyny i biologii molekularnej jest białko zielonej fluorescencji (GFP, ang. *green fluorescent protein*) zidentyfikowane w komórkach meduzy *Aequora victoria*^{6,7}. Badania nad tym fluoryzującym organizmem rozpoczęły się w latach 60, kiedy to wyodrębniono akworynę, czyli białko emitujące błękitne światło⁸. Badania przeprowadzone w późniejszym okresie doprowadziły do odkrycia GFP, jako pochłaniającego niebieskie światło skutkując jaskrawo zieloną fluorescencją, a za którego odkrycie naukowcy zostali uhonorowani w 2008 roku Nagrodą Nobla w dziedzinie chemii. Poprzez wprowadzanie przypadkowych mutacji, białko to następnie zmodyfikowano na wiele sposobów otrzymując wiele jego pochodnych o różnych barwach fluorescencji, jak np. YFP świecące na żółto (ang. *yellow fluorescent protein*)⁹. Jednakże zastosowanie FP w celach wizualizacyjnych wymaga tworzenia linii komórkowych oraz zwierząt transgenicznych, będących nośnikami właściwego genu^{10,11}. Ponadto, stosowanie tak dużych makrocząsteczek fluorescencyjnych w wielu wypadkach limituje badania komórkowe, a nawet prowadzi do zmian natywnych cech badanych białek. Z kolei lokalizacja FP tylko w dwóch pozycjach (N- i C-terminalnych rekombinowanego białka) ogranicza możliwość zastosowania FP w wielu badaniach wykorzystujących techniki fluorescencyjne^{12,13}. Ograniczenia te oraz konieczność stosowania zaawansowanych metod inżynierii genetycznej doprowadziły do przewagi nad wykorzystaniem w obrazowaniu medycznym specjalnie projektowanych barwników fluorescencyjnych. Takie sondy fluorescencyjne mogą być swoiście lub nieswoiście ukierunkowane na odpowiednie tkanki, co stwarza możliwość szybszego ich wprowadzenia do zastosowań klinicznych. Duża rozdzielczość technik analitycznych oraz wysoka czułość fluorescencji nie wymaga stosowania dużych stężeń barwników, co zmniejsza ingerencję w badany bioukład. Z kolei zwiększona paleta barw fluorescencji pozwala na ich stosowanie w znacznie szerszym zakresie spektralnym obejmującym UV-Vis-IR¹⁴. Unikatowość ich przejawia się również emisją promieniowania w postaci fotonów w odpowiedzi na mutagenne zmiany konformacyjne białek, co pozwala na szybkie diagnozowanie nowotworów i innych niebezpiecznych dla życia człowieka zmian genetycznych. Barwniki takie są stosunkowo tanie w produkcji oraz łatwe do modyfikacji

w celu uzyskania pożądanych cech. Podstawianie ich odpowiednimi chemicznymi grupami reaktywnymi względem wybranych grup funkcyjnych biocząsteczek pozwala na ich łatwą koniugację i szybkie wykorzystanie w znakowaniu białek. Sondy fluorescencyjne są konstruowane w taki sposób, aby wykazywały jak największe powinowactwo głównie względem grupy aminowej lizyny oraz tiolowej cysteiny lub sulfidowej metioniny białka oraz ulegały łatwemu sprzęganiu poprzez tworzenie wiązań kowalencyjnych w trakcie koniugacji¹⁵. Intensywny rozwój badań nad tworzeniem nowych barwników fluorescencyjnych do zastosowań w obrazowaniu medycznym rozpoczął się wraz ze skonstruowaniem w latach 70 dwudziestego wieku pierwszego cytometru przepływowego. Jako znaczniki fluorescencyjne stosowano wówczas tylko dwa barwniki: rodaminę G zsyntezowaną po raz pierwszy przez M. Ceresole w 1891 roku¹⁶ i fluoresceinę zsyntezowaną przez A. von Baeyer w 1871¹⁷. Rodamina i jej pochodne wciąż są wykorzystywane m.in. do monitorowania aktywności enzymatycznej, jako markery peptydaz, a w połączeniu z nanocząstkami do określenia rozległości resekcji tkanki nowotworowej w badaniu śródoperacyjnym. Sondy molekularne na bazie fluoresceiny stosowane są głównie jako sensory pH oraz do fluorescencyjnego wykrywania obecności krwi na miejscu zbrodni, a jej izotiocyanianowa pochodna (FITC) między innymi do monitoringu białka transferyny, odpowiedzialnego za transport jonów żelaza podczas endocytozy. Kolejnym bardzo ważnym barwnikiem zsyntezowanym po raz pierwszy przez O. Dann w 1971 jest 4',6-diamidyno-2-fenylindol (DAPI)^{18,19}. Początkowo stanowił on efekt bezskutecznych poszukiwań leku w leczeniu trypanosomatozy. Obecnie powszechnie używany jest do wybarwiania jąder komórkowych i chromosomów, a także do wykrywania mykoplazm lub wirusów w kulturach komórkowych. Jednakże ze względu na zaburzanie struktury DNA, związek ten uznany jest za toksyczny i mutageny. Na rynku farmaceutycznym dostępnych jest wiele sond fluorescencyjnych o szerokiej palecie barw fluorescencji i szerokim spektrum działania, jak np. układy typu BODIPY, pochodne Alexa Fluor²⁰, cyjaniny, pochodne naftalenowe (chlorek dansylu, dansyloalanina oraz PRODAN) i inne. Pomimo ich różnorodności, barwniki fluorescencyjne wciąż stanowią bardzo ważny kierunek badań dla zastosowań w mikroskopii przyżyciowej ze względu na możliwości wczesnej diagnostyki zmian nowotworowych i ograniczenia resekcji tkanek zdrowych w trakcie zabiegów chirurgicznych, cukrzycy, choroby Alzheimera, monitorowania oddziaływań międzykomórkowych w wybranym organie, i wielu innych. Poszukiwanie nowych znaczników jest zatem ważnym nurtem naukowym, ponieważ ich zastosowanie w medycynie klinicznej jest nieocenione i nie w pełni wykorzystane. Nowoprojektowane sondy fluorescencyjne, oprócz odpowiedniej grupy

reaktywnej umożliwiającej łatwe sprzęganie z biocząsteczkami, powinny się charakteryzować wieloma właściwościami. Przede wszystkim wymaga się jasnej i wysokiej wydajności kwantowej fluorescencji; długiego czasu życia fluorescencji oraz odporności na fotowysbielanie. Istotne jest również wąskie spektrum emisji, dobra fotostabilność i wysoka wartość przesunięcia Stokesa'. Ponadto ważne jest, aby właściwości fluorescencji nie były zależne od lokalnego środowiska, odmiany biocząsteczki oraz czystej postaci koniugatu. Barwnik powinien również charakteryzować się dobrą rozpuszczalnością; wysoką stabilnością chemiczną i środowiskową; brakiem toksyczności; nieinwazyjnością; wysoką biodostępnością oraz brakiem bioakumulacji²¹⁻²³. Powinien także selektywnie wiązać się z określonym typem komórek, tkanek lub organelli, wykazując kompatybilność ze źródłem wzbudzenia pozwalającą na łatwą detekcję. Pożądane aktywności optyczne liniowe i nieliniowe barwników uzyskuje się dzięki obecności w strukturze odpowiedniego podstawnika donorowego (D), rozdzielonego układem sprzężonych wiązań typu π (układy typu *push-pull*) względem grupy reaktywnej (akceptor elektronów, A). Zapewnia to asymetryczne rozmieszczenie gęstości elektronowej w stanie podstawowym^{24,25} barwnika oraz zdolność jego do orientacji pod wpływem zewnętrznego pola elektrycznego prowadzącego do wzmocnienia wymaganych efektów elektrooptycznych²⁶.

W poszukiwaniu nowych znaczników fluorescencyjnych o pożądanych cechach bardzo istotną rolę odgrywa modelowanie komputerowe, wspomagające badania eksperymentalne. Komputerowe wspomaganie projektowania sond fluorescencyjnych wykorzystywanych w bioobrazowaniu (badania *in silico*) jest stosunkowo młodą dziedziną nauki, łączącą szeroko rozwinięte w latach 80 i 90 ubiegłego wieku zdobycze wiedzy z zakresu chemii kwantowej i mechaniki klasycznej. O popularności badań *in silico* decyduje głównie zwiększanie efektywności produkcji, redukcja kosztów wstępnych badań eksperymentalnych oraz czasu ich trwania. W szczególności sektor prywatny szybko rozpoznał ich wielki potencjał i obecnie dynamicznie rozwijające się koncerny farmaceutyczne posiadają w swych strukturach jednostkę dedykowaną takim badaniom. Dzięki dostępności do wydajnych stacji roboczych dostępnych w specjalistycznych ośrodkach superkomputerowych oraz szerokiej gamy specjalistycznego oprogramowania możliwe jest zaprojektowanie i optymalizacja struktur cząsteczek o wymaganych właściwościach fotochemicznych oraz aktywnościach biologicznych. Możliwe jest również modelowanie reakcji oraz stanów przejściowych, czy też analizowanie układów bardziej skomplikowanych, jakimi są centra aktywne enzymów oraz koniugacja z biomolekułami. Otrzymywane na tej drodze rezultaty badań są niezwykle wiarygodne i cenne. Wśród stosowanych technik

modelowania komputerowego bardzo istotnymi są metody *ab initio*: Hartree-Focka^{27,28}, metoda oddziaływania konfiguracji (CI, ang. *Configuration Interaction*)²⁷⁻²⁹ oraz jej rozwinięcia, metoda sprzężonych klasterów (CC, ang. *Coupled Clusters*)³⁰⁻³², metoda Møllera-Plesseta (MPPT, ang. *Møller-Plesset Perturbation Theory*)^{33,34}. Z uwagi na zbyt duży czas trwania obliczeń przy użyciu tych metod, uniemożliwiający niejednokrotnie ich ukończenie, najpowszechniej wykorzystywaną w opisie liniowych i nieliniowych właściwości optycznych jest teoria funkcjonałów gęstości (DFT, ang. *Density Functional Theory*)^{28,35-38}, a w szczególności jej modyfikacja będąca rozszerzeniem na stany ze zmiennym w czasie potencjałem zewnętrznym (TD-DFT, ang. *Time-Dependent Density Functional Theory*)³⁹⁻⁴¹. O powszechności stosowania metod DFT w opisie parametrów spektroskopowych decyduje głównie ich relatywnie wysoka dokładność oraz efektywność obliczeniowa. Dobierając odpowiednio poprawione asymptotycznie funkcjonały korelacyjno-wymienne, wielkości uzyskiwane na drodze tych obliczeń prowadzą do wartości bliskich wartościom doświadczalnym, nawet dla układów zawierających do kilkuset atomów, przy zachowaniu relatywnie krótkiego czasu trwania obliczeń. W modelowaniu molekularnym bardzo istotny etap stanowi również badanie ilościowej zależności między strukturą chemiczną cząsteczki, a jej właściwościami biologicznymi (QSAR, ang. *Quantitative Structure-Activity Relationship*)⁴², pozwalające na ocenę m.in toksyczności, biodostępności czy bioakumulacji badanych sond fluorescencyjnych. Zakłada się tu, że różnice pomiędzy właściwościami fizyko-chemicznymi poszczególnych chromoforów wynikają z różnic w ich budowie, a zależności te można ilościowo opisać za pomocą odpowiednich równań matematycznych. Posiadając dane eksperymentalne dla części molekuł z danej grupy oraz znając wartości tzw. deskryptorów molekularnych wszystkich związków z grupy, budowany jest model farmakoforowy tj. zespół cech przestrzennych i elektronowych, który charakteryzuje związki aktywne. Następnie poprzez wirtualny skryning olbrzymich baz związków można przewidzieć aktywności biologiczne barwników, dla tych, dla których danych eksperymentalnych brakuje. Uzyskana wiedza jest z kolei wykorzystywana w projektowaniu nowych pochodnych o większej sile działania i pożądanых cechach farmakokinetycznych, takich jak odpowiednie wchłanianie, dystrybucja, metabolizm czy wydalanie.

Wielu cennych informacji na temat zachowania się sondy fluorescencyjnej względem znakowanej biostruktury dostarcza dokowanie molekularne. Dokowanie molekularne stanowi ekonomiczną alternatywę dla eksperymentalnych metod określania i prognozowania sposobów koniugacji oraz powinowactwa do tworzenia wiązań pomiędzy celem biologicznym jako receptorem, a sondą fluorescencyjną, rozumianą w tym aspekcie jako

ligand⁴³. Dokowanie molekularne w układzie receptor-ligand w połączeniu z innymi technikami modelowania komputerowego, a w szczególności z dynamiką molekularną (MD, ang. *Molecular Dynamic*) i wirtualnym przeszukiwaniem, jest zyskującą na znaczeniu metodą identyfikowania związków wiodących w projektowaniu sond fluorescencyjnych. Symulacje MD z kolei^{44,45} pozwalają na odtwarzanie z dużą dokładnością dynamiki wielu procesów biologicznych takich jak tworzenie biokompleksu oraz charakteryzowanie zmian konformacyjnych w aktywowanych cząsteczkach receptorów. Dokowanie molekularne uzupełnione symulacjami MD umożliwia ocenę wpływu nowo projektowanych barwników na zmiany strukturalne biocząsteczek na różnych etapach sprzęgania. Z drugiej strony, umożliwia to tworzenie sond fluorescencyjnych wywołujących określone zmiany konformacyjne biomolekuł z jednoczesną możliwością śledzenia stanów przejściowych oraz pomiarów szybkości zachodzenia tych zmian.

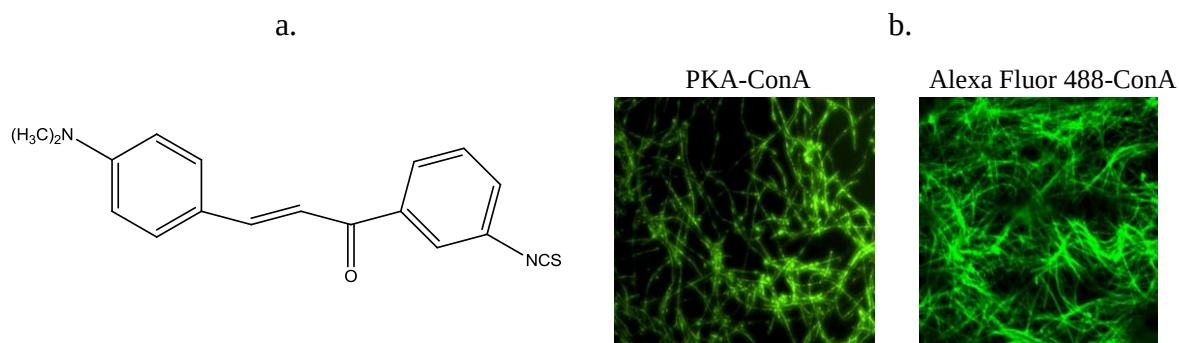
Modelowanie komputerowe jest zatem bardzo ważnym elementem w poszukiwaniu nowych sond fluorescencyjnych o pożądanych cechach i zastosowaniach. Pomimo dostępności do różnych klas sond fluorescencyjnych o udowodnionym działaniu w obrazowaniu i detekcji wielu chorób oraz określonych struktur na poziomie komórkowym i tkankowym wciąż istnieje na nie zapotrzebowanie, co związane jest z postępem w medycynie klinicznej oraz efektywnym leczeniem schorzeń, stanowiących w niedalekiej przeszłości zagrożenie dla życia człowieka. Na tym tle, łącząc swe zainteresowania badawcze z wciąż rozwijanym warsztatem badawczym z zakresu modelowania molekularnego, postanowiłem w swej karierze naukowej zająć się sondami fluorescencyjnymi. Za główny cel prac naukowych realizowanych w ramach przedstawionego wniosku habilitacyjnego obrałem zaprojektowanie nowych barwników fluorescencyjnych o potencjalnym zastosowaniu w obrazowaniu medycznym, a będącymi tańszymi w syntezie i konkurencyjnymi odpowiednikami względem komercyjnie dostępnych sond fluorescencyjnych. Oprócz aspektu związanego z modelowaniem molekularnym istotny nacisk położyłem na stworzenie barwników o realnych praktycznych możliwościach ich wdrożenia do badań *in vitro* z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej. Realizację tego przedsięwzięcia osiągnąłem poprzez wyłonienie bardziej szczegółowych aspektów naukowych:

1. uwzględnienie w badaniach barwników należących do różnych klas związków chemicznych, celem weryfikacji pożądanych cech spektroskopowych oraz biologicznych wpływających na zróżnicowane zastosowanie w potencjalnych badaniach z użyciem komórek żywych;

2. synteza zaprojektowanych metodami teoretycznymi sond fluorescencyjnych i eksperymentalna ocena ich właściwości spektroskopowych;
3. badania *in vitro* mające na celu potwierdzenie słuszności wyboru struktury chemicznej sondy fluorescencyjnej oraz wskazanie jej potencjalnego zastosowania w obrazowaniu medycznym;
4. zastosowanie różnych technik modelowania komputerowego celem wyłonienia metod służących najlepszemu opisowi właściwości spektroskopowych przyszłych, nowo tworzonych sond fluorescencyjnych;
5. wskazanie unikalnego modelu reprezentującego makrocząsteczkę, umożliwiającego przeprowadzenie badań nad koniugatami barwnik-białko metodami *ab initio*;
6. ewaluacja aktywności biologicznych wpływających na potencjalne zastosowanie lub limitację projektowanych znaczników w badaniach *in vitro* z użyciem mikroskopii fluorescencyjnej.
7. wskazanie miejsc aktywnego wiązania zaprojektowanych barwników z Konkanawaliną A oraz ocena zmian strukturalnych białka po koniugacji ze znacznikiem;
8. ocena wpływu zmiany grupy reaktywnej oraz obecności dodatkowych podstawników na warunki koniugacji z białkiem oraz właściwości spektroskopowe i biologiczne biokoniugatu.

Pochodne chalkonu (ChD)

Chalkony (nazwa systematyczna: 1,3-difenylo-2-propen-1-on; benzyldynoacetofenon), czyli pochodne acetofenonu, stanowią produkt pośredni w biosyntezie roślinnych flawonoidów⁴⁶⁻⁴⁹. Chalkony oraz ich pochodne wykazują różnorodną aktywność farmakologiczną: przeciwnowotworową⁵⁰⁻⁵², przeciwcukrzycową⁵³, antyoksydacyjną⁵⁴, antymalaryczną⁵⁵, antyangiogenną⁵⁶, przeciwgrzybiczną⁵⁷, przeciwzapalną⁵⁸, przeciwbakteryjną⁵⁹⁻⁶¹, przeciwwirusową (anty-HIV⁶²), przeciwpierwotniakową oraz przeciwrzodową⁶³. Oprócz tych bardzo istotnych zastosowań medycznych, chalkony posiadają bardzo ważne optyczne i spektralne właściwości znajdujące swe zastosowanie m.in. w optoelektronice oraz w syntezie materiałów o dużej nieliniowości optycznej⁶⁴⁻⁶⁵. Struktura chalkonów o charakterze D- π -A zapewnia wewnątrzcząsteczkowe przeniesienie elektronu (ICT; ang. *Intramolecular charge transfer*), co wzmacnia liniową i nieliniową aktywność optyczną decydujące o możliwości ich zastosowania jako elementów fotoaktywnych.

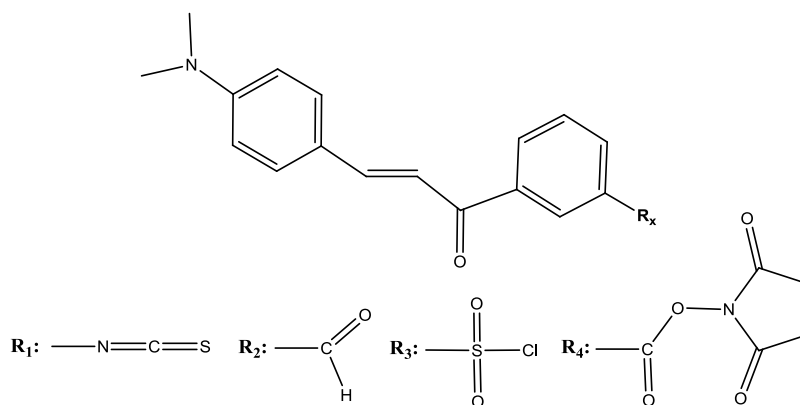


Rys. 1. Barwnik PKA. a. struktura; b. Obraz z mikroskopu fluorescencyjnego dla *Candida albicans* wybarwionych koniugatem PKA-Konkanawalina A oraz Alexa Fluor 488 -Konkanawalina A, temperatura inkubacji 37°C [H1]

Kierując się przytoczonymi przesłankami, badania nad sondami fluorescencyjnymi do zastosowań w obrazowaniu molekularnym rozpocząłem od zaprojektowania fluorochromu bazującego na szkielecie chalkonowym. Wyniki badań przeprowadzone na nowo zsyntezowanym niecentrosymetrycznym 4-dimetyloamino-3'-izotiocyanianie chalkonu, PKA (Rys. 1.) przedstawione zostały w pierwszym osiągnięciu naukowym [H1](#). W celach koniugacyjnych z białkiem, jako reaktywną wybrałem grupę tiocyjanianową. **Połączenie badań eksperymentalnych z modelowaniem komputerowym wskazały na znaczący wpływ polarności rozpuszczalnika na zachowanie solwatochromowe badanego fluorochromu.** Wyznaczone teoretycznie właściwości optyczne wskazały, że PKA charakteryzuje się niemonotonicznym solwatochromizmem, pomimo że badania nad polarnością stanu wzbudzonego sugerowały występowanie solwatochromizmu dodatniego. W związku z tym barwnik PKA może ulegać samoagregacji, a zwłaszcza w środowiskach bardziej polarnych. Powiązanie tej obserwacji ze zmianami strukturalnymi podczas fotowzbudzenia oraz wyznaczonymi wartościami entalpii swobodnej solwatacji pozwoliły mi wytłumaczyć stosunkowo słabą rozpuszczalność tego związku w wodzie, a która na podstawie symulacji komputerowych wynosi zaledwie 1,14 mg/100ml. Wyznaczona przeze mnie wartość przerwy energetycznej pomiędzy orbitalami HOMO i LUMO (E_{GAP} ; ang. *frontier orbital gap*) wskazała na łatwość w uleganiu fotowzbudzeniu, a także wysoką twardość chemiczną Pearsona (η) i dużą stabilność w roztworach. Z kolei przeprowadzona analiza molekularnego potencjału elektrostatycznego (MEP; ang. *Molecular electrostatic potential analysis*) wskazała na atom węgla pierścienia benzenowego łączącego się z grupą dimetyloaminową, jako najbardziej podatnego na atak elektrofilowy, a zatem na możliwość tworzenia się wiązań wodorowych z cząsteczkami białek. Jednocześnie obecność znacznego ładunku dodatniego na atomie azotu grupy NCS, wskazała na łatwość tworzenia wiązania kowalencyjnego podczas koniugacji z białkiem. W przeprowadzonych badaniach wykazałem

również, że sonda PKA charakteryzuje się dużą wydajnością kwantową fluorescencji i wysoką wartością przesunięcia Stokes'a, co czyni ją wielce atrakcyjną do zastosowania w badaniach *in vitro*. Badania spektroskopowe wzbogaciłem również o wyznaczenie przekroju czynnego na absorpcję dwufotonową (TPA, ang. *Two-photon absorption cross section*). W odróżnieniu od zachowania maksimów absorpcji i fluorescencji, wartości TPA wykazały monotoniczny wzrost w funkcji polarności rozpuszczalnika. Co ważniejsze, badany fluorochrom cechuje się wysoką wartością przekroju czynnego na absorpcję dwufotonową, przekraczającą 500 GM. W związku z tym wykazałem, że **molekuła PKA jest znacznikiem z możliwościami zastosowania jej w badaniach z wykorzystaniem mikroskopii zarówno jedno-, jak i dwufotonowej**. Atrakcyjność optyczna PKA oraz spełnienie wszelkich wymogów stawianym znacznikom fluorescencyjnym pozwoliły mi na przejście do drugiego etapu badań. Sonda PKA została połączona z Konkanawaliną A (ConA), a powstały koniugat wykazywał żółto-zieloną fluorescencję przy 550 nm. Otrzymane wyniki wykazały jednoznacznie, że PKA jest znacznikiem konkurencyjnym dla dostępnego na rynku komercyjnym Alexa Fluor 488 oraz izotiocyjanianu fluoresceiny (FITC). Dalsze badania przeprowadzone na komórkach drożdży *Candida albicans* (Rys. 1) pozwoliły stwierdzić, że **wybarwienie komórek jest wynikiem interakcji koniugatu PKA-ConA z polisacharydami obecnymi w ścianie komórkowej drożdży**. W związku z tym istnieje **możliwość zastosowania tej sondy, jako fluoroforu dla wykrywania białek, w szczególności w znakowaniu lektyn do wykrywania specyficznych ugrupowań węglowodanowych, a także przeciwciał w testach immunofluorescencyjnych**.

Teoretyczne badania nad solwatochromizmem barwnika PKA przeprowadziłem metodami chemii kwantowej w ramach metody TD-DFT, stosując następujące funkcjonały hybrydowe: PBE0^{66,67} i B3LYP⁶⁸ oraz poprawione asymptotycznie CAM-B3LYP⁶⁹, LC-BLYP⁷⁰, LC- ω PBE⁷¹ oraz ω B97XD⁷². Wykonane przeze mnie badania wykazały, że **tylko funkcjonal PBE0 poprawnie przewiduje właściwości spektroskopowe cząsteczki PKA**. Jego zastosowanie prowadzi do przesunięcia położenia maksimum pasma absorpcji (λ_{ABS}) dla wartości wertykalnych w kierunku fal dłuższych tylko o 4,7 nm względem wartości zmierzonych, co stanowi średni błąd na poziomie 4,3%. Z kolei dla fluorescencji (λ_{FL}), funkcjonal ten przesunął maksimum w kierunku fal krótszych średnio o 5,9 nm. Na tym tle, udało mi się wyłonić metodę przewidującą w najlepszy sposób właściwości spektroskopowe pochodnych chalkonu, co stanowi cenną wartość dla dalszych badań.



Rys. 2. Struktury pochodnych ChD opisanych w artykule H5

Zainspirowany wynikami badań nad fluoroforem PKA, postanowiłem odpowiedzieć na pytanie, jakie znaczenie dla koniugacji z białkiem ma właściwy dobór grupy reaktywnej. Z tego też względu, grupę reaktywną -NCS zastąpiłem trzema innymi powszechnie stosowanymi grupami funkcyjnymi (Rys. 2): aldehydową (PK1), chlorosulfonową, (PK2) oraz estrową z *N*-hydroksysukcynimidem (PK3), a uzyskane wyniki badań przedstawiłem w osiągnięciu naukowym [H5](#). Zgodnie z literaturą tematu¹⁵, koniugacja znaczników zawierających w swej budowie wybrane przeze mnie grupy reaktywne zachodzi z białkiem poprzez tworzenie wiązań kowalencyjnych z aminami, głównie pochodzącymi od grupy ϵ -aminowej lizyny i aminowych *N*-terminalnych białek i peptydów, zarówno w środowisku wodnym, jak i warunkach niewodnych. W pierwszej części studium dokonałem oceny wpływu zmiany grupy reaktywnej na właściwości fotochemiczne znacznika. Analiza orbitali frontalnych wykazała, że zmiana grupy reaktywnej nie zmienia położenia najniżej leżącego stanu wzbudzonego z przeniesieniem ładunku (CT, ang. *charge transfer*) oraz charakteru przejścia. Zmiana grupy reaktywnej nie zmienia również znacząco wydajności fluorescencji i chemicznej stabilności wszystkich pochodnych ChD oraz łatwości w uleganiu sprzęgania z białkiem. Nie ulega poprawie również rozpuszczalność w wodzie, która dla PK1, PK2 i PK3 wynosi odpowiednio 0,08; 0,56 i 1,15 mg/100 ml. Z kolei konwersja grupy reaktywnej ma istotne znaczenie na lokalizację maksimów pasm absorpcji i fluorescencji. Obecność grupy aldehydowej skutkuje niewielkim przesunięciem λ_{ABS} i λ_{FL} w kierunku fal krótszych, natomiast grupa estrowa wywołuje znaczące przesunięcie batochromowe względem -NCS. Zaobserwowałem również, że pozostaje to w korelacji odwrotnej dla wartości przesunięcia Stokes'a ($\Delta\nu^{St}$), którego największą wartością charakteryzuje się pochodna PK1, zaś najmniejszą cząsteczka PK2. Pojawił się tu pierwszy wniosek, że **obecność grupy chlorosulfonowej może być czynnikiem limitującym w zastosowaniu barwnika jako fluoroforu, ze względu na zbyt niską wartość $\Delta\nu^{St}$** . Zarówno wartości wertykalne, jak

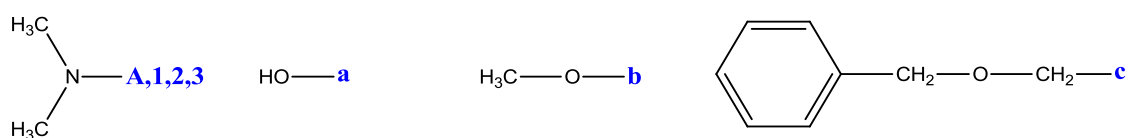
i wyznaczone w oparciu o przybliżenie SS-cLR (ang. *state-specific corrected linear response*) uwidoczniły, że wszystkie pochodne chalkonu charakteryzują się występowaniem niemonotonicznego solwatochromizmu i w połączeniu z analizą polarności stanów wzbudzonych wykazałem, że w środowiskach polarnych charakter grupy reaktywnej nie eliminuje możliwości tworzenia się wiązań wodorowych, jak i występowania zjawiska samoagregacji. Jak wykazała analiza MEP, w przypadku pochodnych ChD za występowanie tych oddziaływań krótkiego zasięgu jest odpowiedzialny atom tlenu w grupie karbonylowej. Dla najlepszego aspektu poznawczego wyznaczyłem również wartości przekroju czynnego na absorpcję dwufotonową w oparciu o model dwustanowy Odar i Chemla⁷³ wykazując, że **tylko obecność grupy chlorosulfonowej oraz estrowej z N-hydroksysukcynimidem wzmacnia w sposób istotny odpowiedź nieliniową**, przyczyniając się do możliwości ich zastosowania w obrazowaniu dwufotonowym.

W drugim etapie badań dokonałem ewaluacji aktywności biologicznych wszystkich badanych pochodnych ChD. Obliczona wartość LogP niższa od 5, wskazała na lipofilowy charakter znaczników oraz dobrą absorpcję i przenikalność przez błony komórkowe⁷⁴. Powiązanie bardzo dobrej dostępności biologicznej ze słabą rozpuszczalnością w wodzie pozwoliło mi na zakwalifikowanie pochodnych chalkonu do II klasy zgodnie z Systemem Klasyfikacji Biofarmaceutycznej (BCS; ang. *Biopharmaceutic Classification System*). Wszystkie pochodne ChD charakteryzują się wysokim prawdopodobieństwem metabolizmu przez Cytochrom P450, a wyznaczona wartość LogBCF wskazała na brak akumulacji w komórkach i tkankach. Symulacje wykazały również, że **obecność grupy estrowej znacząco osłabia możliwość wystąpienia toksyczności do poziomu 14%, podczas gdy obecność -SO₂Cl intensyfikuje do poziomu aż 75%**.

Analizy dokowania molekularnego przeprowadzone z wykorzystaniem struktury Konkanawaliny A (ConA) wykazały, że obecność grup reaktywnych -NCS i -CHO kierują znacznik do miejsca aktywnego zlokalizowanego przy LYS116, przy czym większym powinowactwem do grupy aminowej charakteryzują się pochodne z grupą aldehydową. Pozostałe grupy promują koniugację poprzez LYS101 wykazując tę samą wartość energii swobodnej wiązania. W obu tych miejscach aktywnego wiązania nie zaobserwowałem tworzenia się wiązań wodorowych pomiędzy fluoroforem a sąsiadującymi aminokwasami oraz nakładania się orbitali π płaskiego układu skondensowanych pierścieni aromatycznych interkalatora na struktury aromatyczne przyległych aminokwasów. W ostatnim etapie badań pochodne ChD poddałem analizie dynamiki molekularnej, a stabilność dynamiczną zależnego od czasu zachowania się układu opisano za pomocą wartości RMSD (ang. *root-mean-square*

deviation). Badaniom poddałem struktury otrzymane po symulacjach AutoDock i skoniugowane z białkiem. Badane koniugaty wykazały wysoki poziom podobieństwa stabilności dynamicznej we wszystkich trajektoriach, a zmiana grupy reaktywnej oraz sama obecność sondy nie miała znaczącego wpływu na właściwości strukturalne białka. Symulacje MD wykazały również, że ruchliwość badanych sond względem powierzchni białka jest ograniczona, a niewielka elastyczność geometrii może być związana ze sztywnością strukturalną wiązania kowalencyjnego wytworzonego w trakcie koniugacji. Tylko dla PK2 zaobserwowałem dodatkową stabilizację, jako następstwo utworzenia wiązania wodorowego pomiędzy atomem tlenu proliny PRO 165 i wodorem z grupy sulfonamidowej. W trakcie tych symulacji zaobserwowałem także, że sondy zachowały płaską strukturę, za wyjątkiem PK3 gdzie wystąpił nieznaczny wzajemny skręt płaszczyzn obu układów aromatycznych.

Podsumowując, w H5 wykazałem, że obecność podstawnika estrowego z *N*-hydroksysukcynimidem znacząco poprawia rozpuszczalność znacznika i sprzyja tworzeniu się wiązań czysto kowalencyjnych podczas koniugacji z białkiem, zwiększając stabilność biokompleksu. Ponadto, jego obecność w strukturze poprawia biodostępność sondy fluorescencyjnej i zmniejsza jej właściwości toksyczne oraz akumulacyjność w tkankach. W związku z powyższym, w przypadku pochodnych chalkonowych zastosowanie opisanej grupy estrowej jako grupy reaktywnej, dobierając odpowiednio wyselekcjonowane grupy donorowe, można uzyskać stabilne i cenne sondy fluorescencyjne o szerokim spektrum działania do zastosowań w obrazowaniu biomedycznym.



Rys. 3. Podstawniki donorowe będące przedmiotem badań w pracy naukowej H7

W kolejnej pracy nad pochodnymi chalkonu, a wyszczególnionej pod numerem **H7**, zająłem się oceną wpływu mocy podstawników donorowych na właściwości spektroskopowe i biologiczne wymieniając grupę dimetyloaminową na hydroksylową (**a**), metoksyłową (**b**) oraz benzyloksymetylenową (**c**) (Rys. 3). Analizie poddałem również biokompleksy powstałe po koniugacji barwników ChD z Konkanawalina A. Ze względu na niemożność przeprowadzenia symulacji uwzględniających całą strukturę białka, przyjąłem dwa uproszczone modele reprezentujące makrocząsteczkę. W pierwszym, wiązanie kowalencyjne po stronie białka zostało zamknięte grupą metylową (PKCon), a w drugim tripeptydem (PK-

Tri(LYS)). Tripeptydy dobierałem indywidualnie dla każdego barwnika na podstawie symulacji dokowania molekularnego i obejmowały cząsteczkę lizyny, do której znacznik wykazywał największe powinowactwo oraz dwóch sąsiednich aminokwasów. W związku z tym to osiągnięcie naukowe ma dwojaki aspekt, oprócz wpływu mocy podstawników donorowych na właściwości spektralne i biologiczne chalkonowych sond fluorescencyjnych, uzupełnia poprzednie badania o analizy właściwości optycznych powstałych koniugatów.

Dokonana przeze mnie analiza orbitali frontalnych wykazała, że zmiana podstawnika donorowego nie wpływa znacząco na rozkład gęstości elektronowej, zarówno przed, jak i po koniugacji. Wartość E_{GAP} wzrasta ze słabnącym charakterem donora, jednakże nie wpływa w sposób istotny na fotowzbudzenie znaczników, wartości η , χ oraz ich użyteczność praktyczną. Potwierdziły to dane otrzymane dla koniugatów, dla których wartość E_{GAP} dodatkowo wzrasta. Analiza stref zaniku gęstości elektronowej podczas fotowzbudzenia ($\Delta\rho(r)$) oraz zasięgu (D_{CT}) i wielkości (q_{CT}) przenoszonego ładunku wskazała, że **po koniugacji podstawniki $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{OH}$ i $-\text{OCH}_3$ będą blokować wpływ białka na właściwości spektralne sondy, podczas gdy obecność podstawnika c może umożliwić aktywny udział makromolekuły w procesie ICT barwnika, zmieniając tym samym jego właściwości fotofizyczne**. Moc podstawników aktywujących oraz koniugacja nie zmienia znacząco również położenia miejsc dla oddziaływań o charakterze elektrofilowym i nukleofilowym.

Analiza właściwości spektroskopowych wykazała, że substytucja słabszą grupą donorową skutkuje przesunięciem maksimum absorpcji w kierunku fal krótszych, a wielkość efektu hipsochromowego nie pozostaje w zgodzie ze słabnącym charakterem aktywującym podstawników ($\lambda_{\text{ABS}}^b > \lambda_{\text{ABS}}^a > \lambda_{\text{ABS}}^c$). Wykazałem, że wymiana tych grup nie eliminuje obecności niemonotonicznego solwatochromizmu, którego wielkość pozostaje w korelacji z wartościami D_{CT} i q_{CT} . Ponadto substytucja słabszymi donorami nie wyklucza możliwości występowania specyficznych krótkozasięgowych oddziaływań w układzie rozpuszczalnik-substancja rozpuszczona. Badania nad koniugatami uwiarykowały, że biokompleksy charakteryzują się większą wartością energii wzbudzenia. Pomimo, że wielkość przesunięcia położenia λ_{ABS} dla koniugatu względem formy nieskoniugowanej ($\Delta\lambda_{\text{ABS}}^{\text{N-Con}}$) jest ściśle uzależniona od charakteru wytworzonego wiązania kowalencyjnego oraz rodzaju grupy aktywującej wykazałem, że **obecność w fluoroforze grupy benzyloksymetylenowej będzie czynnikiem limitującym jego wykorzystanie w obrazowaniu medycznym**. Ponadto, oba zastosowane przeze mnie modele niemalże identycznie przewidywały położenie maksimum absorpcji, a $\Delta\lambda_{\text{ABS}}^{\text{Tri(LYS)-Con}}$ wynosiła mniej niż 7 nm. Podobnie jak dla maksimum absorpcji, substytucja słabszym donorem wywołuje również efekt hipsochromowy w położeniu

maksimum fluorescencji ($\lambda_{FL}^c > \lambda_{FL}^a > \lambda_{FL}^b$) i w każdym przypadku uwidacznia się solwatochromizm odwrotny w środowiskach silnie polarnych. Koniugacja przesuwu λ_{FL} w kierunku fal krótszych, przy czym największe przesunięcie $\Delta\lambda_{FL}^{N-Con}$ zaobserwowałem dla podstawnika dimetyloaminowego (10-20 nm). W przypadku pochodnych PKAx, PK1x i PK2x wartość $\Delta\lambda_{FL}^{N-Con}$ zmniejsza się ze słabnącym charakterem donora, a dla PK3x ($\Delta\lambda_{FL}^{N-Con} > 50$ nm) zaobserwowałem trend odwrotny. Pozwoliło mi to stwierdzić, że **wpływ białka na właściwości spektroskopowe koniugatów jest praktycznie pomijalny, za wyjątkiem pochodnych sprzężonych poprzez grupę estrową**. Ponadto, maksimum fluorescencji dla biokompleksu PKA-Konkanawalina A zlokalizowane jest przy 550 nm, co pozostaje w dużej zgodzie z wartością otrzymaną w ramach zastosowanego przeze mnie przybliżenia (520 nm). **Potwierdza to użyteczność zaproponowanego przeze mnie modelu uproszczonego białka w symulacjach komputerowych**. Wprowadzenie do struktury podstawnika -OH pozwala na osiągnięcie wartości $\Delta\nu^{St}$ niemalże dwukrotnie wyższej względem -N(CH₃)₂ i przekraczającej 6500 cm⁻¹, a koniugacja indukuje nieznaczny jego spadek. W ten sposób wykazałem, że **z punktu widzenia przesunięcia Stokes'a, pochodne zawierające grupę hydroksylową wydają się być najbardziej pożądanymi dla projektowania znaczników fluorescencyjnych**.

W dalszej części swych badań oceniłem wpływ mocy podstawników donorowych na elektronowy dichroizm kołowy (ECD ang. *electronic circular dichroism*). Zauważyłem, że obecność grup -OH i -OCH₃ zmienia znak i zwiększa intensywność efektu Cottona (CE) względem podstawnika -N(CH₃)₂. Natomiast wprowadzenie do struktury barwnika podstawnika c zmniejsza intensywność i przesuwu CE w kierunku fal dłuższych oraz przyczynia się do pojawienia się dodatkowego dodatniego CE w zakresie 360-363 nm. Ponadto uwidocznilem, że koniugacja wywołuje przesunięcie batochromowe w stosunku do widma ECD samego tripeptydu Tri(Lys), a wielkość tego przesunięcia wzrasta ze wzrostem mocy podstawnika donorowego. W oparciu o teorię Snatzke'a⁷⁵, udało mi się również skorelować znak efektu CE ze zmianami strukturalnymi znacznika zachodzącymi w trakcie sprzęgania z białkiem. **W przypadku biokompleksów ChD-Tri(Lys), prawoskrętna (R) helikalność skutkuje występowaniem dodatniego efektu CE dla pierwszego i ujemnego dla drugiego przejścia $\pi-\pi^*$. Efekty przeciwne są charakterystyczne dla chromoforów o helikalności lewoskrętnej (L). Ponadto wykazałem, że w przypadku pochodnych ChD chiralność zależy w głównej mierze od orientacji sondy fluorescencyjnej w stosunku do aminokwasu: połączenie znacznika w "linii prostej" z lizyną wywołuje helikalność R, a w przypadku orientacji "prostopadłej" - helikalność L.**

Parametry opisujące absorpcję dwufotonową wyznaczyłem w oparciu o technikę kwadratowych funkcji odpowiedzi, korzystając z programu DALTON 2016⁷⁶, wykazując, że **wartość odpowiedzi nieliniowej maleje wraz ze słabnącym charakterem aktywującym podstawników**, bez względu na charakter grupy reaktywnej, a obecność najsłabszego podstawnika benzyloksymetylenowego może w niektórych przypadkach prowadzić nawet do zaniku sygnału dwufotonowego, limitując tym samym użyteczność takich sond w obrazowaniu dwufotonowym. Z kolei na podstawie analiz QSAR wykazałem, że **zmiana grupy dimetyloaminowej na słabsze skutkuje znacznym wzrostem toksyczności badanych znaczników fluorescencyjnych, osiągając prawdopodobieństwo na najwyższym poziomie dla pochodnych zawierających podstawnik c**. Nieznaczne osłabienie tego efektu zaobserwowałem dla układów skoniugowanych, za wyjątkiem PK3c, dla którego toksyczność wzrosła. Nie zauważyłem natomiast wpływu zmiany charakteru podstawnika donorowego na biodostępność oraz biokoncentrację. Wszystkie badane pochodne, zarówno przed, jak i po koniugacji, będą łatwo metabolizowane na drodze utleniania przy udziale enzymów mikrosomalnych cytochromu P450 (CYP).

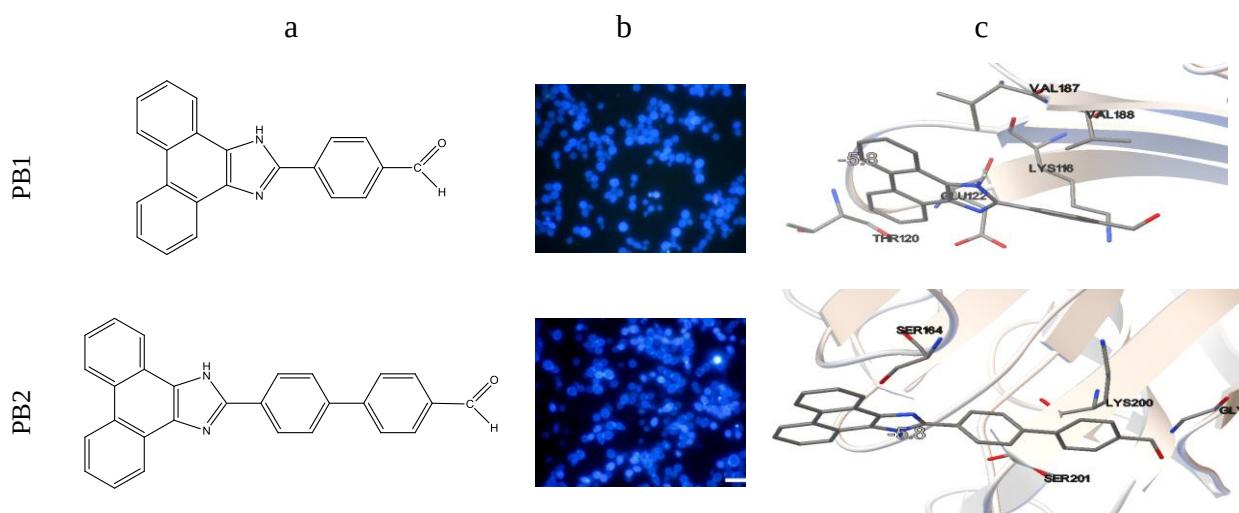
Przeprowadzając symulacje dokowania molekularnego wykazałem, że pochodne chalkonu promują tworzenie wiązania kowalencyjnego z Konkanawaliną A w trzech głównych miejscach aktywnych, zlokalizowanych przy LYS101, LYS114 i LYS116. W przypadku pochodnych sprzęganych poprzez grupę aldehydową substytucja donora nie zmienia miejsca aktywnego wiązania z białkiem (LYS116). Dla pozostałych sond, wymiana grupy dimetyloaminowej na hydroksylową skutkuje zmianą centrum aktywnego, które pozostaje już nie zmienne w obecności pozostałych podstawników. Zauważyłem również, że **powinowactwo do białka wzrasta wraz ze słabnącym charakterem podstawników aktywujących, osiągając największą wartość energii swobodnej wiązania dla grupy benzyloksymetylenowej**. W aktywnym centrum wiążącym dochodzi do interkalacji znaczników z sąsiednimi aminokwasami, jednakże w żadnym przypadku nie zaobserwowałem tworzenia się wiązań wodorowych. Sondy ChD ulegają pewnym zmianom konformacyjnym i w przypadku "prostych" grup reaktywnych (pochodne PKA, PK1 i PK2) skręt grupy karbonylowej zmniejsza się wraz ze słabnącym działaniem podstawników aktywujących, a wzrasta dla sond zawierających w swej budowie reaktywną grupę aromatyczną. Symulacje dynamiki molekularnej przeprowadzone na strukturach otrzymanych po dokowaniu molekularnym i skoniugowanych z Konkanawaliną A nie uwidoczniły wpływu podstawników donorowych na zachowanie dynamiczne sond fluorescencyjnych oraz na właściwości strukturalne białka. **Uwzględniając najbardziej reprezentatywne struktury**

uzyskane po symulacjach MD wykazałem również, że zmiany konformacyjne jakie zachodzą w strukturze po dokowaniu nie wpływają w istotny sposób na właściwości optyczne koniugatów.

Podsumowując, na podstawie przeprowadzonych symulacji komputerowych uwiidocznilem, że obecność w strukturze sondy fluorescencyjnej podstawników donorowych o średniej mocy, takich jak -OH i -OCH₃, a w szczególności w połączeniu z -CHO jako grupą reaktywną, stanowi czynnik optymalizujący pożądane cechy optyczne i biologiczne biokoniugatów.

Pochodne fenantroimidazolu (PhI)

Pochodne imidazolu⁷⁷ są naturalnie występującymi w przyrodzie, wykazując wiele funkcji biologicznych. Do najważniejszych przykładów należą aromatyczne aminokwasy histydyna oraz histamina, a także alkaloidy imidazolowe obecne w niektórych roślinach z rodziny rutowatych (rodzaje *Pilocarpus* i *Casimiroa*). Pochodne PhI mają szerokie spektrum zastosowania, np.: w oczyszczaniu białek modyfikowanych genetycznie, elektronice i fotografii, produkcji termostabilnych tworzyw sztucznych. Najistotniejsze jest jednak ich zastosowanie medyczne m.in. jako: leki przeciwpadaczkowe, przeciwpasożytnicze, przeciwzapalne, przeciwbólowe i hamujące agregację płytek⁷⁸⁻⁸³; jako chemioterapeutyk, antagonist receptoru muskarynowego, środek przeciwwrzdodowy, antagonist benzodiazepinowy, lek przeciwhipertoniczny i nasenny⁸⁴⁻⁸⁷ oraz wykorzystywane są w wielofunkcyjnych środkach w leczeniu choroby Alzheimera⁸⁸. Ponadto znalazły swe zastosowanie jako ratiometryczne sondy fluorescencyjne siarkowodoru⁸⁹, cysteiny i hemocysteiny⁹⁰. Powszechność występowania pochodnych imidazolowych oraz wszechstronność ich zastosowania zainspirowała mnie do zaprojektowania dwóch potencjalnych sond fluorescencyjnych: **4-(1*H*-fenantro[9,10-*d*]-imidazol-2-ilo)-benzaldehyd (PB1)** oraz **4'-(1*H*-fenantro[9,10-*d*]-imidazol-2-ilo)-bifenylo-4-karboaldehyd (PB2)**, będących pochodnymi fenantroimidazolu i zawierających grupę aldehydową, jako aktywnie wiążącą się z białkiem (Rys. 4). Wyniki uzyskane dla tych pochodnych przedstawione są w osiągnięciach naukowych **H2** i **H3**.



Rys. 4. a. Struktura barwników opisanych w artykułach H2 i H3; b. Obrazy z mikroskopu fluorescencyjnego wykonane dla komórek *Yarrowia lipolytica* w obecności koniugatu barwnik-białko^{H2,H3}; c. Wyniki symulacji dokowania molekularnego^{H2,H3}

Przeprowadzone przeze mnie badania teoretyczne wykazały, że obecność dodatkowego pierścienia benzenowego sprzyja zmniejszeniu planarności stanu podstawowego i wzbudzonego. Zabieg zwiększania struktury barwnika nie zmienia z kolei rozkładu gęstości elektronowej obu frontalnych orbitali molekularnych oraz wartości E_{GAP} , wskazując na wysoką wydajność fluorescencji, stabilność chemiczną oraz wysoką reaktywność z białkiem. Molekuły te nie wykazują również znaczących różnic w położeniach miejsc dla ataku nukleofilowego i elektrofilowego. Obecność dodatkowego pierścienia benzenowego nie sprzyja także poprawie rozpuszczalności w wodzie, która na podstawie obliczeń teoretycznych wynosi $6,37 \cdot 10^{-4}$ i $2,01 \cdot 10^{-5}$ mg/100ml, dla PB1 i PB2. Barwnik PB1 charakteryzował się elektronowym widmem absorpcyjnym z maksimum w zakresie od 373,0 nm w eterze dietylowym do 381,5 nm w DMSO, a obecność dodatkowego pierścienia aromatycznego skutkowała minimalnym przesunięciem hipsochromowym lokując λ_{ABS} w zakresie od 372,5 nm do 377,5 nm, odpowiednio. Druga cząsteczka charakteryzowała się nieznacznie wyższym molowym współczynnikiem absorpcji, jednakże ich wartości wskazywały jednoznacznie na wewnątrzcząsteczkowe przeniesienie ładunku. Dla obu molekuł maksimum fluorescencji przesunęło się znacząco w kierunku fal dłuższych, lokalizując się w zakresie 439,4 nm do 500,4 nm dla PB1 i 465,4 nm do 545,4 nm dla PB2. Teoretycznie wyznaczone oraz eksperymentalnie zarejestrowane pasma absorpcji i fluorescencji charakteryzowały się niemonotonicznym zachowaniem w funkcji wzrastającej mocy rozpuszczalników, co pozwoliło mi stwierdzić, że pochodne fenantroimidazolu w środowiskach polarnych charakteryzują się lepszą stabilizacją stanu CT, względem podstawowego. Zaobserwowałem również, że polarność rozpuszczalnika wpływa istotnie na intensywność fluorescencji. PB1

charakteryzował się najwyższą wydajnością kwantową fluorescencji (ϕ_{FL}) w środowiskach polarnych a mniejszą w środowiskach niepolarnych, podczas gdy dla PB2 zaobserwowałem tendencję odwrotną. Wpływy środowiskowe uwidoczniły się także przy średnim czasie życia fluorescencji ($\tau_{sr} = 2,5$ ns). W przypadku PB1 najkrótszy czas życia fluorescencji obserwowany był dla rozpuszczalnika, w którym ϕ_{FL} jest niska, podczas gdy dla PB2 wydajność kwantowa fluorescencji była proporcjonalna do czasu jej trwania. Spowodowane jest to zmiennym oddziaływaniem między silnie spolaryzowaną cząsteczką barwnika a cząsteczkami rozpuszczalnikami w stanie wzbudzonym. W powiązaniu z analizą polarności stanów wzbudzonych wykazana została tendencja obu barwników do autoagregacji w polarnych środowiskach. Na podstawie badań eksperymentalnych, jak i teoretycznych wskazałem, że **obie sondy charakteryzują się wysoką wartością przesunięcia Stokesa', a zabieg zwiększania struktury cząsteczki, przyczynia się do nieznaczącej intensyfikacji wartości $\Delta\nu^{St}$** . Porównując wartości wyznaczone na drodze eksperymentalnej z teoretycznymi wykazałem, że również w przypadku pochodnych imidazolu najlepszym funkcjonalem w opisie właściwości optycznych jest PBE0. Jego zastosowanie w tym przypadku pozwoliło na wyznaczenie maksimów absorpcji ze średnim przesunięciem batochromowym na poziomie 27 nm, oraz 15 nm dla maksimów absorpcji i fluorescencji.

Badania *in vitro* przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej na komórkach *Candida albicans* i *Yarrowia lipolytica* wykazały, że koniugaty PB1-Konkanawalina A oraz PB2-Konkanawalina A charakteryzują się silną i stabilną niebieską fluorescencją. Maksimum emisji pierwszego biokompleksu znajduje się przy 490 nm, podobnie do DAPI oraz Hoechst 33342. W związku z tym, koniugaty PB1-Konkanawalina A stanowią cenną alternatywę dla tych znaczników w detekcji i monitorowaniu **specyficznych ugrupowań węglowodanowych, a także przeciwciał w testach immunofluorescencyjnych**. Dla drugiego koniugatu maksimum λ_{FL} zlokalizowane jest przy 485 nm i na podstawie przedstawionych badań w [H5](#), **PB2 stanowi cenną alternatywę dla FITC do zastosowania jako znacznik fluorescencyjny białek**. Ponadto, **metodologia pomiarowa zastosowana do opisu PB1 może być wykorzystana w badaniach skriningowych innych barwników dostarczając informacji na temat występowania agregacji tych znaczników i wpływu interakcji PB1-Konkanawalina A na właściwości spektroskopowe reporterów fluorescencyjnych**.

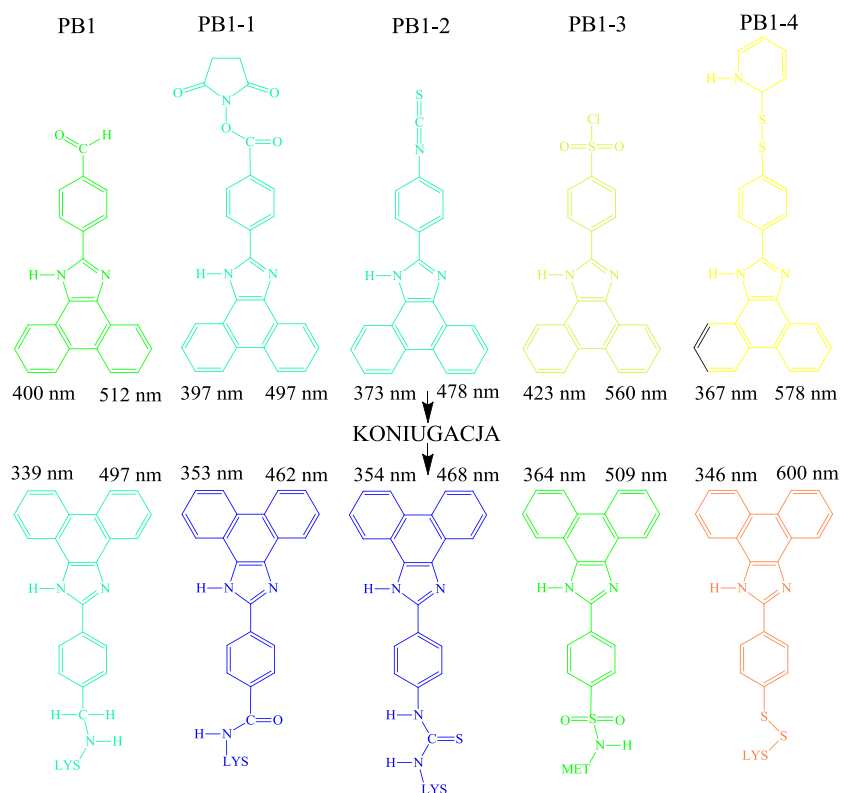
Przeprowadzając symulacje dokowania molekularnego przy użyciu AutoDock wykazałem, że o ile energia swobodna wiązania barwnik-ConA pozostaje na identycznym poziomie, tak lokalizacja centrum aktywnego ulega zmianie. Znacznik PB1 wykazuje

największe powinowactwo do LYS116 ze stałą inhibicji $K_i = 0,79$ mM, zaś PB2 do LYS200 ($K_i = 0,24$ mM). W obu tych miejscach aktywnego wiązania nie zaobserwowałem tworzenia się wiązań wodorowych oraz oddziaływań stackingowych pomiędzy znacznikami a aminokwasami tworzącymi wnękę aromatyczną (Rys. 4). Analiza dokowania pozwoliła mi wnioskować, że w trakcie sprzęgania barwniki ulegają znacznemu skręceniu, które jest wynikiem rotacji grupy fenantroimidazolowej względem pozostałej części struktury.

Przeprowadzone przeze mnie badania oceny aktywności biologicznych wykazały również, że oba barwniki charakteryzują się wartością LogP poniżej 5 i, podobnie jak pochodne ChD, należy je zakwalifikować do II klasy BCS. Ponadto związki te będą łatwo ulegać metabolizmowi przez Cytochrom P450 nie akumulując się w komórkach i tkankach. Jednocześnie wykazałem, że wprowadzenie do struktury dodatkowego pierścienia aromatycznego, znacząco zmniejsza prawdopodobieństwo wystąpienia efektu toksycznego, który spada z poziomu 69% dla PB1 do 46% dla PB2. W swych badaniach zwróciłem również uwagę na fakt, że zaprojektowane przeze mnie barwniki mogą być wykorzystane w innych dziedzinach medycyny klinicznej, wykazując właściwości antynowotworowe, antypsychotyczne i wiele innych. Oba związki nie wykazują właściwości antyoksydacyjnych i antybakteryjnych.

Podsumowując, wykonane przeze mnie badania pozwoliły stwierdzić, że **wprowadzanie dodatkowego ugrupowania aromatycznego nie poprawia znacząco właściwości optycznych barwników oraz koniugatów, a nowo otrzymane pochodne imidazolu spełniają wszelkie wymogi stawiane znacznikom fluorescencyjnym stosowanym w obrazowaniu medycznym i stanowią one cenną i tańszą alternatywę dla dostępnych obecnie na rynku komercyjnych markerów.**

Atrakcyjność otrzymanych rezultatów badań nad PB1 i PB2 skłoniła mnie do dalszych badań nad pochodnymi fenantroimidazolu. Podobnie jak w przypadku pochodnych chalkonu, postanowiłem dokonać ewaluacji zmiany grupy funkcyjnej na właściwości spektroskopowe oraz biologiczne tej klasy związków. Do badań wybrałem pochodną PB1 podstawioną grupami reaktywnymi analogicznie do pochodnych ChD (Rys. 5), a wyniki uzyskanych rezultatów przedstawiłem w osiągnięciu naukowym pod numerem [H6](#). Tym razem postanowiłem również ocenić wpływ sprzęgania na właściwości znacznika poprzez grupę sulfidową metioniny wybierając w tym celu grupę pirydylodisiarczkową. Dla oceny zmiany



Rys. 5. Struktury barwników PhI przed i po koniugacji przedstawionych w artykule H6. Kolory odtwarzają barwy fluorescencji badanych związków

właściwości spektroskopowych po koniugacji również zastosowałem przedstawione wcześniej dwa przybliżenia reprezentujące biocząsteczkę. Wstępne badania nad elektrooptycznymi właściwościami wykazały, że zmiana grupy reaktywnej nie wpływa znacząco na lokalizację obu frontalnych orbitali molekularnych przed i po koniugacji oraz na brak skupienia chmury elektronowej na tym wiązaniu kowalencyjnym. Na podstawie wpływu polarności rozpuszczalnika na parametry opisujące $\Delta\rho(r)$ wykazałem, że wzmocnienie CT za pomocą grupy reaktywnej przebiega równoległe z występowaniem solwatochromizmu odwrotnego. W przypadku PB1-4 zaobserwowałem, że D_{CT} zmniejsza się o połowę względem PB1 pomimo wzrostu q_{CT} , co sugeruje lokalny charakter przejścia. W związku z tym w paśmie absorpcji tej sondy mogą być widoczne wkłady pochodzące od innych orbitali. Zarówno barwniki, jak i koniugaty charakteryzowały się wysoką wartością E_{GAP} , co pozwoliło mi stwierdzić, że grupa reaktywna nie wpływa na wydajność fluorescencji, stabilność chemiczną oraz łatwość tworzenia wiązań kowalencyjnych z białkiem. Nie wpływa także na lokalizację miejsca dla ataku nukleofilowego, ale wywołuje zmiany w położeniu miejsc dla ataku elektrofilowego.

Analiza właściwości spektroskopowych wykazała, że zmiana grupy reaktywnej wpływa na zachowanie solwatochromowe pochodnych PhI. Substytucja grupą estrową

wywołuje najmniejsze hipsochromowe przesunięcie maksimum absorpcji (3 nm) względem PB1. Tylko obecność $-SO_2Cl$ wywołuje efekt batochromowy (średnio 20,2 nm). Ponadto wykazałem, że wymiana grupy aktywnej nie eliminuje występowania niemonotonicznego solwatochromizmu jako następstwo zmiennej stabilizacji stanu podstawowego lub wzbudzonego. Dzięki zastosowaniu modeli reprezentujących białko wykazałem charakter wpływu koniugacji na parametry spektroskopowe znaczników. Maksimum absorpcji biokompleksów przesuwają się w kierunku fal krótszych, a wielkość przesunięcia solwatochromowego jest charakterystyczna dla danej grupy reaktywnej. Największe przesunięcie hipsochromowe zaobserwowałem dla PB1 i PB1-3 (ponad 55 nm), zaś najmniejsze dla PB1-2 i PB1-4 (średnio 18 nm). Ponadto, przesunięcie hipsochromowe maksimum λ_{ABS} na poziomie 18 nm dla PB1Con oraz 32 nm dla PB1-Tri(Lys) względem wartości zmierzonej (H2, 370 nm) **udowodniło po raz kolejny słuszność stosowania uproszczonych modeli makrocząsteczki w analizach spektralnych.** Z kolei uwzględniając struktury po dokowaniu molekularnym i symulacjach dynamiki molekularnej wykazałem brak wpływu białka na właściwości spektroskopowe znacznika fluorescencyjnego. Zachowanie niemonotoniczne zaobserwowałem również w położeniu pasma fluorescencji barwników i biokompleksów oraz przesunięcie maksimum λ_{FL} w kierunku fal krótszych po koniugacji z ConA. W przypadku emisji uzyskałem jeszcze większą zgodność zastosowanych modeli reprezentujących białko (494,9 nm - 497,1 nm) względem wartości zmierzonej (490 nm). Barwniki charakteryzowały się wysoką wartością przesunięcia Stokesa', a koniugacja sprzyjała jej wzrostowi. **Ponadto, wprowadzenie do struktury grupy pirydylodisiarczkowej jest czynnikiem maksymalizującym wartość $\Delta\nu^{St}$ obu form.**

Wyznaczone przeze mnie pasma ECD dla koniugatów PB-Tri(Lys) wykazały znaczne zmiany widmowe względem tripeptydu, co wskazuje na występowanie licznych zmian konformacyjnych w białku, jako następstwo koniugacji ze znacznikiem PhI. Jednocześnie **na podstawie analizy widm ECD wykazałem, że w szczególności najmniej pożądanymi wśród zbadanych będą sondy zawierające grupę chlorosulfonową oraz pirydylodisiarczkową.**

W oparciu o model dwustanowy i przy założeniu wartości poszerzenia linii widmowej wynikającego ze skończonego czasu życia stanu wzbudzonego na poziomie 0.4 eV, uzyskałem wartości TPA wyrażone w GM na następującym poziomie: 279,1; 154,4; 141,1; 119,1 i 23,1 odpowiednio dla PB1-3, PB1, PB1-1, PB1-2 i PB1-4. W związku z tym dla pochodnych PhI tylko **obecność grupy chlorosulfonowej jest czynnikiem**

maksymalizującym wartość TPA, podczas gdy wprowadzenie do struktury podstawnika pirydylodisiarczkowego przyczynia się do jej wygaszania. Jednakże, zgodnie literaturą tematu⁹⁰⁻⁹³, sondy PB1 i PB1-1 z wartościami TPA powyżej 100 GM również mogą stanowić cenne narzędzie wizualne w dynamicznym obrazowaniu w czasie rzeczywistym w badaniach *in vitro* i *in vivo*.

W pracy tej wykazałem, że **wprowadzenie do struktury grupy estrowej jest czynnikiem zwiększającym rozpuszczalność barwnika, podczas gdy grupa aldehydowa staje się czynnikiem limitującym.** Nie mniej jednak żadna z zastosowanych grup reaktywnych nie poprawia słabej rozpuszczalności pochodnych fenantroimidazolu w wodzie. Na podstawie wyznaczonych przeze mnie wartości LogP oraz LogBCF należy sądzić, że wszystkie sondy charakteryzują się dobrą biodostępnością oraz brakiem bioakumulacji, a sprzęganie z ConA nie zmienia znacząco tych właściwości. Wykazałem, że zarówno formy nieskoniugowane, jak i biokompleksy opisane są wysokim prawdopodobieństwem metabolizmu przez cytochrom P450, za wyjątkiem PB1-4, dla której prawdopodobieństwo to spada poniżej 40%. Co ważniejsze, wykazałem że obecność grupy pirydylodisiarczkowej oraz -SO₂Cl znacząco zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia efektu toksycznego (82%), a koniugacja niweluje ten efekt w niewielkim stopniu (78%). Tylko obecność -NCS oraz grupy estrowej redukuje toksyczność pochodnych imidazolu do poziomu 50%.

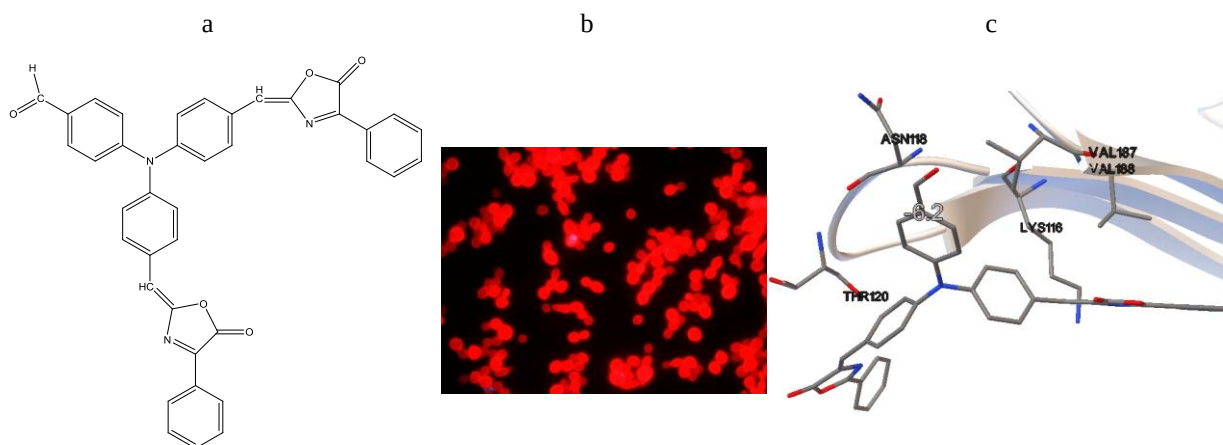
Na podstawie symulacji dokowania molekularnego wskazałem, że substytucja grupy aldehydowej grupą estrową, izotiocyjanianową lub chlorosulfonową zmienia miejsce największego powinowactwa z LYS116 na LYS30, a zmiana centrum aktywnego związana jest z nieznacznym wzrostem energii swobodnej wiązania i spadkiem stałej inhibicji. W trakcie dopasowania znacznika do wnęki aromatycznej dochodzi w każdym przypadku do skrócenia struktury na wiązaniu imidazol-benzen. Zauważyłem, że tylko pochodna -SO₂Cl jest stabilizowana poprzez utworzenie wiązania wodorowego pomiędzy labilnym atomem wodoru pierścienia imidazolowego a atomem tlenu THR3. W przypadku grupy pirydylodisiarczkowej miejsce aktywnego wiązania zlokalizowane jest przy MET42, o nieznacznie mniejszej wartości powinowactwa i stałej inhibicji. Struktura PB1-4 również jest stabilizowana wiązaniem wodorowym utworzonym pomiędzy atomem wodoru pierścienia pirydynowego a ASN44. Symulacje dynamiki molekularnej na geometriach otrzymanych po dokowaniu i sprzężonych z ConA wykazały, że po 10 ns wszystkie konformacje biokompleksów osiągnęły stabilność dynamiczną, wykazując podobne właściwości strukturalne i dynamiczne. Analiza konformacji markerów w stanie równowagi względem powierzchni ConA wykazała, że płaszczyzna badanych znaczników ulega

niewielkiemu skręceniu, a mobilność i elastyczność analizowanych sond jest ograniczona, ze względu na charakter wytworzonego wiązania kowalencyjnego oraz właściwości strukturalne białka.

Podsumowując, **koniugacja analizowanych sond z Konkanawaliną A wywołuje efekt hipsochromowy względem barwników, nie zmieniając jednak ich podstawowych cech wymaganych dla sond fluorescencyjnych. Badane pochodne PhI, bez względu na charakter grupy reaktywnej, po sprzężeniu z białkiem będą wywoływać masowe modyfikacje konformacyjne w strukturze II-rzędowej białek, które mogą wpływać na interakcje białka ze specyficznymi ugrupowaniami węglowodanowymi w ścianie komórkowej. Na podstawie analizy właściwości fotochemicznych oraz aktywności biologicznych stwierdziłem, że obecność grupy pirydylodisiarczkowej jest czynnikiem ograniczającym zastosowanie barwnika PhI jako sondy fluorescencyjnej w badaniach *in vitro* oraz *in vivo* a zastosowanie barwnika w postaci estru *N*-hydroksysukcynimidowego pozwala na zaprojektowanie szeregu cennych sond fluorescencyjnych o szerokim spektrum działania.**

Pochodna oksazolonu

Oksazolon, nazwany zgodnie z nomenklaturą Hantzsch-Widmana, jest częścią dużej rodziny związków opartych na oksazolach. Pierścień 4-oksazolonowy, który formalnie jest laktamem, występuje w wielu lekach (fenozone, thiozalinone, cyklazodone, reclazepam itp.). Podstawione 5-oksazolony można również uważać za produkty cyklizacji *N*-acylo- α -aminokwasów, co czyni je laktonami i czasami określa się mianem azolaktonów^{94,95}. Pochodne oksazolonu są szeroko stosowane jako syntony w projektowaniu różnych biosensorów⁹⁶, fluoroforów⁹⁷, fotoreceptorów elektrofotograficznych oraz materiałów o wysokiej wartości odpowiedzi nieliniowej⁹⁸. Ponadto, cząsteczki oksazolonu są szeroko stosowane w wielu dziedzinach medycyny klinicznej, wykazując aktywność antybakteryjną^{99,100}, anty-HIV¹⁰¹, przeciwrzybiczą¹⁰², przeciwnowotworową¹⁰³, przeciwcukrzycową, antagonistyczną, uspokajającą^{104,105} i kardi toniczną¹⁰⁶. Oksazolony są stosowane również jako alergen kontaktowy w eksperymentach immunologicznych, szczególnie do badań nad nadwrażliwością typu opóźnionego¹⁰⁷.



Rys. 6. a. Struktura barwnika PB3; b. Obraz z mikroskopu fluorescencyjnego wykonany dla komórek *Candida albicans* w obecności koniugatu PB3-ConA; c. Miejsce aktywnego wiązania barwnika z białkiem

Zgodnie z powyższym, wybór pochodnej oksazolonu do badań nad wykorzystaniem w obrazowaniu medycznym nie był przypadkowy, a studia literaturowe doprowadziły mnie do zaprojektowania i syntezy **4-{N,N-Bis[4-benzylideno-2-fenyl-1,3-oksazol-5(4H)-ono]amino}benzaldehydu** (PB3), pierścieniem oksazolonowym o strukturze laktonu - Rys. 6, a wyniki badań w osiągnięciu naukowym [H4](#). Studia teoretyczne wykazały, że barwnik PB3 cechuje się dobrą rozpuszczalnością w roztworach polarnych, jak i nie polarnych, za wyjątkiem fazy wodnej ($1.41 \cdot 10^{-5}$ mg/100 ml). Fluorofor ten charakteryzuje się niskoleżącym stanem wzbudzonym z wewnątrzcząsteczkowym przeniesieniem ładunku oraz wysoką wartością przerwy energetycznej. Wykonane przeze mnie analizy właściwości elektrochemicznych jednoznacznie wskazały, że PB3 opisany jest cechami sprzyjającymi łatwej i szybkiej reakcji sprzęgania z białkiem. Z kolei zarejestrowane eksperymentalnie, jak i wyznaczone teoretycznie, widma absorpcji uwiaryściły dwa różne pasma, przy ok 250 nm oraz w zakresie 450-480 nm. Wykonana przeze mnie analiza $\Delta\rho(r)$ wskazała, że po absorpcji fotonu następuje wewnątrzcząsteczkowy transfer ładunku z części trifenyloaminowej do fragmentów z grupami oksazolonowymi (przejście HOMO-LUMO). Niemniej jednak zauważyłem również znaczny wzrost gęstości elektronowej na grupie aldehydowej (jako reaktywnej), co wyjaśnia obecność dodatkowego, mniej intensywnego pasma absorpcji związanego z przejściem wzbronionym, jako wynik wkładów pochodzących od innych orbitali molekularnych. Pomimo tego, **barwnik PB3 charakteryzuje się wysoką wartością przesunięcia Stokesa**, która zwiększa się kilkakrotnie przy przejściu ze środowiska słabo do silnie polarnego. Obecność rozpuszczalnika nieznacznie wpływa na przesunięcie solwatochromowe głównego pasma absorpcji, ale wywołuje znaczące przesunięcia

batochromowe w położeniu maksimum λ_{FL} lokującego się w zakresie 520-637 nm dla wartości eksperymentalnych oraz 516-629 nm dla wartości teoretycznych. Wpływy środowiskowe uwidoczniły się również w czasie życia fluorescencji, który skraca się wraz ze wzrostem polarności ośrodka, nie pozostając przy tym w korelacji z ϕ_{FL} . W oparciu o jednoparametrową skalę wpływu polarności/polaryzowalności rozpuszczalnika (SPP)^{109,110} oraz metodę wieloparametrowej regresji liniowej Catalána¹¹¹ wykazany został istotny wpływ na położenie pasma absorpcji zarówno polaryzowalności rozpuszczalnika, jak i jego dipolarności, kwasowości i zasadowości. Z kolei pasmo fluorescencji wykazywało wrażliwość jedynie na dipolarność ośrodka. Wartość przesunięcia Stokesa' oraz wydajność kwantowa fluorescencji zmieniały się również w funkcji dipolarności ośrodka, przy jednoczesnym braku wyraźnego wpływu polaryzacji oraz kwasowości i zasadowości rozpuszczalnika. W związku z tym wykazane zostało, że **zwiększanie dipolarności środowiska sprzyja zwiększaniu stabilizacji elektronowego stanu wzbudzonego bardziej, niż stanu podstawowego, co z kolei prowadzi do zwiększonego efektu batochromowego w położeniu pasm emisji barwnika PB3 względem maksimum absorpcji**. Omówione zwiększanie polaryzacji i stabilizacji stanu z przeniesieniem ładunku miało swoje odzwierciedlenie również w zmianach strukturalnych znacznika po wzbudzeniu oraz w wyznaczonych eksperymentalnie i teoretycznie wartościach momentów dipolowych. W obecności każdego z analizowanych rozpuszczalników obserwowano dużo większą wartość momentu dipolowego dla stanu wzbudzonego, względem podstawowego. Polarność stanu CT wzrastała w funkcji polarności ośrodka, a średnia odległość transferowanego ładunku wyznaczona w oparciu o metodę Bakhshieva oraz $\Delta\rho(r)$ wynosiła 2,5 Å. W ten sposób wykazałem, że **silniejszych specyficznych interakcji krótkiego zasięgu w układzie PB3-rozpuszczalnik należy się spodziewać dla elektronowego stanu wzbudzonego**. Ponadto, dla tej klasy wykazałem **użyteczność stosowania funkcjonału PBE0, jako metody najlepiej opisującej parametry optyczne barwników fluorescencyjnych**.

Obiecujące wyniki badań nad właściwościami spektroskopowymi barwnika PB3 podyktowały wykonanie testów *in vitro*. Badania z użyciem mikroskopii fluorescencyjnej na komórkach *Candida albicans* wykazały, że **koniugat PB3-Con A charakteryzuje się maksimum absorpcji przy 525 nm oraz czerwonym, intensywnym i stabilnym pasmem fluorescencji przy 605 nm**. Uzyskane rezultaty pozwoliły mi na porównanie PB3 do **bromku etydyny**, który jednak wiążąc się z DNA wykazuje silne właściwości mutagenne, onkogenne i teratogenne¹⁰⁸, co ogranicza możliwości jego praktycznego zastosowania. Ponadto, właściwości spektralne otrzymanego koniugatu powodują, że **barwnik PB3 jest**

atrakcyjnym konkurentem dla Alexa Fluor 594 oraz jodku propidyny. Z kolei przeprowadzone testy cytotoksyczności na komórkach nowotworowych jelita grubego - HT29 udowodniły, że **PB3 i PB3-Con A nie wykazują wyraźnej cytotoksyczności przy stężeniach poniżej 20 μ M, uzyskując żywotność komórek na poziomie wyższym od 85%.** W związku z tym nowo zsyntezowany **barwnik stanowi cenną alternatywę do zastosowań w wykrywaniu reszt α -mannopiranozylowych i α -glukopiranozylowych w próbkach biologicznych.** Ponadto widma dichroizmu kołowego koniugatu PB3-ConA nie wykazywały różnic względem czystego roztworu białka, wskazując, że **fluorofor PB3 nie wpływa na strukturę drugorzędową lektyn, a tym samym na interakcje Konkanawaliny A z ugrupowaniami węglowodanowymi w ścianie komórkowej *Candida albicans*.** Uzupełnieniem badań *in vitro* były przeprowadzone przeze mnie symulacje dokowania molekularnego, które wskazały **LYS116 jako miejsce o największym powinowactwie do wytworzenia wiązania kowalencyjnego ze znacznikiem** ($\Delta G_b = -6,2$ kcal/mol, $K_i = 1,09$ mM). We wnęce aromatycznej utworzonej przez THR120, VAL187 i VAL188 i ASN118 zauważyłem konkurencyjne oddziaływania asparaginy do wytworzenia wiązania z grupą aldehydową markera, a także stwierdziłem brak stabilizujących wiązań wodorowych oraz oddziaływań stackingowych. Struktura PB3, dopasowując się do centrum aktywnego, uległa pewnym zmianom konformacyjnym, przy czym największym modyfikacjom podlegały kąty dwuścienne utworzone pomiędzy pierścieniami oksazolonów, a pozostałą częścią barwnika.

Na podstawie teoretycznie wyznaczonych aktywności biologicznych stwierdziłem, że nowo zsyntezowany **fluorofor oksazolonowy charakteryzuje się dobrą biodostępnością oraz absorpcją i transmisją przez błony komórkowe. Wysokie prawdopodobieństwo metabolizmu przez enzymy cytochromu P450 oraz niskie poziomy bioakumulacji wskazują na szybkie jego usuwanie z organizmu bez interakcji z innymi cząsteczkami farmakologicznymi i pochodzenia komórkowego.**

Podsumowując, w osiągnięciu naukowym H4 przedstawiłem pełną charakterystykę spektralną oraz biologiczną 4-{N,N-Bis[4-benzylideno-2-fenilo-1,3-oksazol-5(4H)-ono]-amino}benzaldehydu jako znacznika fluorescencyjnego, będącego konkurentem dla komercyjnie dostępnych, wraz z wykazaniem jego potencjalnego zastosowania w badaniach *in vitro*.

Prowadzone przeze mnie badania, stanowiące podstawę do wszczęcia postępowania habilitacyjnego, doprowadziły do zaprojektowania i syntezy czterech sond fluorescencyjnych, należących do różnych grup związków chemicznych. Dokonana pełna charakterystyka właściwości spektralnych i wpływu rozpuszczalnika na zachowanie solwatochromowe

otrzymanych barwników umożliwiła wykonanie badań *in vitro* na komórkach drożdży, które potwierdziły możliwości ich zastosowania w obrazowaniu medycznym, wskazując jednocześnie na aspekty potencjalnego ich wykorzystania i możliwości wprowadzenia do obrotu na rynku farmaceutycznym. Wyłonienie teoretycznych metod służących najwłaściwшему opisowi parametrów optycznych sond fluorescencyjnych pozwoliło mi na wskazanie najodpowiedniejszych grup reaktywnych oraz substytucji dodatkowymi podstawnikami, które z jednej strony wzmacniają pożądane cechy, ale nie wpływają znacząco na zmiany właściwości optycznych powstających koniugatów z białkiem. Symulacje dokowania oraz dynamiki molekularnej wskazały miejsca aktywnego wiązania z białkiem i ich zmiany ze względu na modyfikacje parametrów geometrycznych markerów wraz z charakterystyką zmian w strukturze drugorzędowej białka po koniugacji. Jednocześnie zaproponowałem uproszczony model reprezentujący białko uwzględniany w modelowaniu komputerowym, udowadniając jego celowość i skuteczność w uzyskiwanych cechach biokompleksów barwnik-białko. Jego zaaplikowanie w przyszłych badaniach stanowić będzie znaczące ułatwienie w projektowaniu kolejnych sond fluorescencyjnych przeze mnie, jak i innych naukowców. Uwieńczeniem całości badań prowadzonych w ramach postępowania habilitacyjnego była przeprowadzona analiza aktywności biologicznych proponowanych sond fluorescencyjnych, ze szczególnym wskazaniem ewentualnego efektu toksycznego, biodostępności i akumulacji w organizmie żywym potwierdzających lub limitujących ich atrakcyjność farmakokinetyczną.

5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO - BADAWCZYCH

Prace naukowe prowadzone przeze mnie przed doktoratem skupiły się wokół opisu liniowych i nieliniowych właściwości optycznych wybranych pochodnych azobenzenu, stilbenu, benzylidenoaniliny i fenyldiazenylokarbazolu w celu sformułowania relacji pomiędzy ich strukturą, a nieliniową aktywnością optyczną. Przyczyniły się one do powstania czterech prac (IF=10.220; pkt. MNiSW = 112), z czego w jednej byłem jedynym autorem (N4). Pozostałe prace powstały w oparciu o współpracę z ośrodkami naukowymi w Polsce (Instytut Chemii Fizycznej i Teoretycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej), jak i zagranicznymi (Institute of Organic and Pharmaceutical Chemistry, The National Hellenic Research Foundation, Ateny, Grecja; Department of Chemistry, The Lundbeck Foundation Centre for Theoretical Chemistry, University of Aarhus, Dania oraz Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, Brazylia). Badane przeze mnie związki, jako układy typu D- π -A, charakteryzowały się istnieniem w widmie elektronowym

pasma absorpcji o dużej intensywności związanego z wewnątrzcząsteczkowym przeniesieniem ładunku (N1, N4). Największą polarnością stanu z przeniesieniem ładunku charakteryzowały się pochodne karbazolu, połączone poprzez mostek azowy z pierścieniem benzenowym. Na podstawie analizy wpływu izomeryzacji na liniowe właściwości spektroskopowe wykazałem, iż formy *trans* azobenzenu charakteryzują się mniejszą energią przejścia do stanu z przeniesieniem ładunku w porównaniu z formami *cis*. Zgodnie z dostępnymi danymi eksperymentalnymi, wszystkie z analizowanych układów charakteryzowały się solwatochromizmem dodatnim. Na podstawie przeprowadzonych obliczeń hiperpolaryzowalności elektronowej oraz przekrojów czynnych na absorpcję dwufotonową uwypukliłem, iż najkorzystniejszymi układami, z punktu widzenia maksymalizacji tych wielkości, wydają się być chromofory zawierające mostek węglowy z systemem sprzężonych wiązań podwójnych typu π pomiędzy pierścieniami benzenowymi. Natomiast pochodne *N*-benzilidenoaniliny charakteryzowały się nieliniową odpowiedzią optyczną większą od pochodnych azobenzenu, o ile ich geometria wykazuje planarność. Nieplanarność w obrębie mostka π -elektronowego skutkowała spadkiem wartości hiperpolaryzowalności molekularnych o kilka rzędów. Wartości przekrojów czynnych na absorpcję dwufotonową oraz hiperpolaryzowalności rzędu pierwszego obliczone w oparciu o model dwustanowy pozostawały w dobrej zgodności z wartościami uzyskanymi metodami ścisłymi, dzięki czemu dowiodłem kluczowej roli niskoleżącego stanu wzbudzonego z przeniesieniem ładunku w nieliniowej odpowiedzi optycznej badanej grupy molekuł. Na podstawie analizy wpływu siły podstawników donorowo-akceptorowych na nieliniowe właściwości optyczne wykazałem, że obecność silnego podstawnika elektronoakceptorowego ma na nie kluczowy wpływ [N2]. Przeprowadzone w następnym etapie badania strukturalne dowiodły znacznej zależności omawianych właściwości od konformacji cząsteczki, zarówno dla wkładów elektronowych jak również oscylacyjnych [N4]. Te ostatnie wkłady, w obliczeniach których uwzględnione zostały również efekty wynikające z anharmoniczności elektrycznej i mechanicznej, wydają się być szczególnie wrażliwe na zmiany strukturalne. Tym samym, potwierdzona została silna zależność wkładów anharmonicznych do hiperpolaryzowalności pierwszego rzędu od konformacji azobenzenu, wskazując, że wkłady pochodzące od anharmoniczności elektrycznej i mechanicznej kompensują się w dużym stopniu wyłącznie dla jednej z form. W ówczesnych latach obserwacja ta była szczególnie wartościową, ze względu na dotychczasowy brak tego rodzaju badań w literaturze przedmiotu. Konsekwencją tej zależności było podważenie wiarygodności przewidywań modelu oscylatora podwójnie harmonicznego.

Nieodłączną i dosyć pokaźną część prowadzonych przeze mnie badań stanowiła analiza przydatności różnorodnych metod obliczeniowych chemii kwantowej stosowanych w modelowaniu liniowych i nieliniowych właściwości optycznych molekuł. W trakcie realizowanych badań potwierdziłem niemożność stosowania standardowych funkcjonałów hybrydowych, jak B3LYP, w opisie polaryzowalności długich łańcuchów oraz stanów z przeniesieniem ładunku, a których zastosowanie do obliczeń hiperpolaryzowalności oraz przekroju czynnego na absorpcję dwufotonową prowadzi do wartości dalece przeszacowanych względem wartości eksperymentalnych. W momencie podjęcia przeze mnie badań, w literaturze przedmiotu pojawiły się pierwsze sugestie jak efektywnie wyeliminować błąd samooddziaływania, a nowe potencjały korelacyjno-wymienne, jak CAM-B3LYP, zaproponowane przez innych autorów, zostały przeze mnie wykorzystane do wyznaczenia nieliniowych właściwości optycznych pochodnych azobenzenu. Rezultaty tych badań były jednymi z pierwszych w tym obszarze. W szczególności, udało mi się potwierdzić przydatność tych funkcjonałów w obliczeniach parametrów charakteryzujących widma dwufotonowe. Niepodważalny element nowości stanowił również ich pomyślnie zastosowanie do oszacowania odpowiedzi jądrowej na zaburzenie silnym polem elektrycznym.

Po uzyskaniu tytułu doktora nauk chemicznych, podtrzymując współpracę z ośrodkiem naukowym we Wrocławiu, nawiązałem dodatkowo współpracę z Zakładem Technologii Chemicznej i Fizykochemii Materiałów Wydziału Technologii i Inżynierii Chemicznej Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy oraz Laboratory of Biology and Applied Pharmacology, CNRS, Ecole Normale Supérieure de Cachan, France, co zaowocowało powstaniem czterech prac opublikowanych w międzynarodowych czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania. Ponadto, powstał artykuł, którego jestem jedynym autorem [N7]. Nie uwzględniając prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego będącego podstawą o ubieganie się o wszczęcie postępowania habilitacyjnego, całkowity IF tych prac wynosi 16.537, co odpowiada 165 punktom MNiSW. Cztery prace powstały przy współpracy z dr hab. inż. Beatą Jędrzejewską i dotyczyły różnych klas barwników organicznych, ze szczególnym uwzględnieniem zmian środowiskowych na właściwości spektralne oraz zmiany strukturalne po wzbudzeniu cząsteczki. Celem dwóch pierwszych artykułów [N5 i N6] było porównanie właściwości fotofizycznych niejonowych i jonowych związków o przedłużonym układzie sprzężonych elektronów π , sprawdzenie możliwości zastosowania metod teoretycznych do ich opisu oraz wykazanie istnienia nieliniowej odpowiedzi tych związków pod wpływem naświetlania promieniowaniem

o dużym natężeniu. Barwniki te oparte były na szkielecie 1,4-diwinylbenzenu z przyłączoną z jednej strony cząsteczką pirydyny ($A-\pi-S-\pi-A^+X^-$) [H5] lub benzimidazolu ($A-\pi-S-\pi-A$) [H6], a z drugiej ich solą alkilową. Przeprowadzone badania wykazały, że właściwości spektralne badanych związków różnią się od właściwości barwników typu $D-\pi-A^+X^-$. Różnice we właściwościach fotofizycznych występowały również porównując związek centrosymetryczny ze związkami niecentrosymetrycznymi. Zmetylowanie pirydyny lub benzimidazolu powodowało nieznaczną zmianę w położeniu maksimum absorpcji barwników w stosunku do związku niejonowego, miało natomiast istotny wpływ na położenie pasma fluorescencji (przesunięcie batochromowe). Wartości przesunięć Stokesa były dwukrotnie większe dla związków jonowych, co pozwoliło stwierdzić, że po wzbudzeniu następuje zmiana geometrii cząsteczki i momentu dipolowego, a emisja fluorescencji nie zachodzi ze stanu Francka-Condon'a lecz ze stanu zrelaksowanego. Badania dowiodły, że występowanie tzw. "rededge effect" wynika z istnienia różnych konformerów i zmiany otoczki solwacyjnej tych konformerów w stanie wzbudzonym. Teoretyczna analiza geometrii badanych związków w stanie podstawowym i w pierwszym stanie elektronowo wzbudzonym dowiodła, że fragment cząsteczki z zalkilowanym pierścieniem heterocyklicznym jest bardziej skręcony w stanie podstawowym i wypłaszczony w stanie wzbudzonym. W przypadku związku niejonowego, cząsteczka jest płaska zarówno w stanie podstawowym, jak i wzbudzonym. Analiza rozkładu gęstości elektronowej na orbitalu HOMO i LUMO wskazała dla związku jonowego przesunięcie ładunku elektronowego w kierunku kationu, a dla związku centrosymetrycznego do centralnego pierścienia fenyłowego. Wśród funkcjonałów korelacyjno-wymiennych, najlepszą zgodność między wynikami eksperymentalnymi a teoretycznymi uzyskano dla CAM-B3LYP w przypadku pasm absorpcji oraz dla LC- ω PBE dla widm fluorescencji. Wartości teoretyczne potwierdziły również ujemny solwatochromizm dla związków jonowych, a dla związku niejonowego efekt odwrotny. Badania teoretyczne wykazały również istotny wpływ polarności środowiska na wartość momentu dipolowego w stanie podstawowym oraz w pierwszym stanie wzbudzonym wskazując jednocześnie, że wzbudzenie cząsteczki do pierwszego stanu singletowego skutkuje spadkiem momentu dipolowego. W kolejnych pracach [N8, N9] zaprezentowane zostały badania spektralne oktapolowych barwników push-pull o symetrii C_3 ($D(-\pi-A)_3$); posiadające jako skrajne grupy 2-fenyllooksazon (akceptory elektronów) i połączone poprzez wiązanie metinowe z trifenyloaminą wykazującą właściwości elektronowodonorowe. Cechy optyczne barwników zostały również porównane z ich analogiem o strukturze liniowej. Badania dowiodły, że związek z symetrycznie podstawioną

trifenylamina wykazuje batochromowe przesunięcie pasma absorpcji w stosunku do barwnika o budowie liniowej, jako efekt wzajemnego oddziaływania między poszczególnymi "gałęziami" cząsteczki, które powoduje wzrost powinowactwa elektronowego ugrupowania elektronowo-akceptorowego chromoforu pochłaniającego światło. Ponadto wzrost wymiarowości molekuly poprzez wprowadzenie dodatkowych pierścieni fenyłowych separujących donor od akceptora elektronów powodował nieznaczny efekt hipsochromowy, który można przypisać utrudnieniu w przeniesieniu ładunku na skutek skręcenia cząsteczki już w stanie podstawowym. Rozgałęzienie cząsteczki i wzrost polarności rozpuszczalnika skutkowało batochromowym przesunięciem pasma fluorescencji, co oznacza większą stabilizację singletowego stanu wzbudzonego w rozpuszczalnikach polarnych. Wzrost wielkości cząsteczki oraz zmniejszenie polarności środowiska zwiększało z kolei wydajność kwantową fluorescencji. W pracach tych rolę środowiska w stabilizacji cząsteczek barwnika w roztworze, opisano różnymi skalami polarności rozpuszczalnika opartymi na modelu Onsagera. Uzyskane wyniki eksperymentalne zostały wzbogacone o obliczenia kwantowo-chemiczne. Zarówno dla stanu podstawowego, jak i stanu wzbudzonego CT obserwowano wzrost wartości momentu dipolowego podczas przejścia z fazy gazowej do rozpuszczalnika. Ponadto zwiększenie polarności rozpuszczalnika zwiększało zarówno wartość momentu dipolowego w stanie podstawowym, jak i wzbudzonym.

Istotnym elementem badań w przedstawionych pracach była również ocena przekroju czynnego na absorpcję dwufotonową. Badania wykazały, że zalkilowanie ugrupowania elektronowo-akceptorowego jest czynnikiem maksymalizującym wartość TPA [N6]. Z kolei zastąpienie struktury liniowej strukturą o symetrii C₃ zwiększa współczynnik absorpcji z 690 GM do blisko 4000 GM [N8, N9]. We wszystkich przypadkach uzyskano dużą zgodność pomiędzy wartościami eksperymentalnymi a wyznaczonymi teoretycznie z użyciem programu Dalton. Ponadto, analizy teoretyczne wykazały, że w przypadku związków wykazujących dodatni solwatochromizm, efektywny przekrój czynny na absorpcję dwufotonową wzrasta wraz ze wzrostem polarności środowiska [N6, N5]. Dla pozostałych barwników, opisanych ujemnym solwatochromizmem, trend taki nie był obserwowany [N8, N9]. W pracy nad pochodnymi azosulfonamidów [N7] wykazano, że zwiększanie struktury podstawnika donorowego staje się czynnikiem minimalizującym wartość przekroju czynnego na absorpcję dwufotonową. Ponadto, przy zastosowaniu metod kwantowo-chemicznych, przedstawiono w tej pracy szczegółową analizę liniowych i nieliniowych właściwości optycznych oraz zmiany strukturalne po wzbudzeniu pochodnych azosulfonamidów zawierających trzy różne podstawniki donorowe. Odnosząc się do badań

eksperymentalnych¹¹², uznano metodę PBE0 jako najlepiej opisującą właściwości spektralne badanych barwników. Całokształt przeprowadzonych badań nad ich solwatochromizmem oraz analiza wartości przesunięcia Stokesa' i TPA uwidocznili użyteczność analizowanych pochodnych azosulfonamidów w bioobrazowaniu, ze szczególnym wskazaniem na pochodną dihydroksoetyloaminową.

6. PIŚMIENNICTWO

1. C.S. Levin; *Primer on molecular imaging technology*; Eur. J. Nucl. Med. Mol. I., 2005, 325-345. DOI: 10.1007/s00259-005-1973-y.
2. J. Bil, M. Winiarska; *Molekularne mechanizmy aktywności terapeutycznej rytuksymabu, przeciwciała monoklonalnego anti-CD20*; Postępy biologii komórki, 2007, 34 (2), 335-359.
3. T. Sołtysiński; *Targets and strategies for imaging dynamics of molecular-cell interactions in autoimmune disorders*; Molecular Imaging 6, 2007, s. 365.
4. V. Ntziachristos; *Fluorescence Molecular Imaging*; Annu. Rev. Biomed. Eng. 2006, 8(1), 1-33. DOI: 10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095831
5. M. Chen, M. Yin; *Design and development of fluorescent nanostructures for bioimaging*; Prog. Polym. Sci. 39 (2014) 365– 395. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2013.1
6. B.N. Giepmans, S.R. Adams, M.H. Ellisman, R.Y. Tsien; *The fluorescent toolbox for assessing protein location and function*; Science 2006, 312, 217-224. DOI: 10.1126/science.1124618
7. M. Wydro, P. Lehmann; *Białko zielonej fluorescencji (GFP)-struktura, własności i zastosowanie w biologii molekularnej roślin*; Postępy Biochem. 2004, 50, 282-292
8. F.H. Johnson, O. Shimomura, Y. Saiga; *Action of Cyanide on Cypridina Luciferin*; J. Cell. Comp. Physiol. 1962, 59, 223-239. DOI: 10.1002/jcp.1030590306
9. N.C. Shaner, P.A. Steinbach, R.Y. Tsien; *A guide to choosing fluorescent Proteins*; Nat. Methods 2008, 2, 905-909. DOI: 10.1038/nmeth.1209
10. S. Remy, L. Tesson, C. Usal, S. Menoret, V. Bonnamain, V. Nerriere-Daguin, J. Rossignol, C. Boyer, T. H. Nguyen, P. Naveilhan, L. Lescaudron, I. Anegón; *New line of GFP transgenic rats relevant for regenerative medicine and gene therapy*; Transgenic Res. 2010, 19(5), 745 – 763. DOI: 10.1007/s11248-009-9352-2
11. G. Crivat, J.W. Taraska; *Imaging proteins inside cells with fluorescent tags*; Trends Biotechnol. 2012, 30, 8-16. DOI: 10.1016/j.tibtech.2011.08.002
12. M.J. Hinner, K. Johnsson; *How to obtain labeled proteins and what to do with them*; Curr. Opin. Biotechnol. 2010, 21, 766-776. DOI: 10.1016/j.copbio.2010.09.011

13. A. Pomorski, A. Krężel; *Exploration of biarsenical chemistry challenges in protein research*; ChemBioChem 2011, 12, 1152-1167. DOI: 10.1002/cbic.201100114
14. R. Tsien; *Roger Tsien: bringing color to cell biology*; J. Cell. Biol. 2007, 179; 6-8. DOI: 10.1083/jcb.1791pi
15. M.A. Brinkley, Brief Survey of Methods for Preparing Protein Conjugates with Dyes, Haptens, and Cross-Linking Reagents. Bioconjugate Chem. 1992, 3, 2-13. DOI: 10.1021/bc00013a001
16. M. Ceresole; *Red dye-stuff*. German patent 48731; French patent 186697; US patent 456081 (diethyl-rhodamine), July 14, 1891.
17. A. Baeyer; *Über ein neue Klasse von Farbstoffen*; Ber. Dtsch. Chem. Ges. 1871, 4, 555-558. DOI: 10.1002/cber.18710040209
18. O. Dann, G. Bergen, E. Demant, G. Volz; *Trypanocide Diamidine des 2-Phenyl-benzofurans, 2-Phenyl-indens und 2-Phenyl-indols*; Liebigs Ann. Chem. 1971, 749, 68-89. DOI: 10.1002/jlac.19717490110
19. J. Kapuscinski; *DAPI: a DNA-specific fluorescent probe*; Biotech. Histochem. 1995, 70(5), 220–33. DOI: 10.3109/10520299509108199
20. Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Chapter 1.3 Alexa Fluor® Dyes Spanning the Visible and Infrared Spectrum, 11th Edition (2010), thermofisher.com/probes
21. D. Janczewski, Y. Zhang, G.K. Das, D.K. Yi, P. Padmanabhan, K.K Bhakoo, T.T Tan, S.T. Selvan; *Bimodal magnetic-fluorescent probes for bioimaging*; Microsc. Res. Tech. 2011, 74, 563-576. DOI: 10.1002/jemt.20912
22. M. Tsuji, S. Ueda, T. Hirayama, K. Okuda, Y. Sakaguchi, A. Isono, H. Nagasawa; *FRET-based imaging of transbilayer movement of pepducin in living cells by novel intracellular bioreductively activatable fluorescent probes*; Org. Biomol. Chem. 2013; 11(18), 3030-3037. DOI: 10.1039/C3OB27445D
23. F. Auzel; *Upconversion and Anti-Stokes Processes with f and d Ions in Solids*; Chem. Rev. 2004, 104(1), 139–174. DOI: 10.1021/cr020357g
24. H. S. Nalwa, M. Siezo *Nonlinear Optics of Organic Molecules and Polymers*; Boca Raton, FL : CRC Press, 1994
25. L. R. Dalton *Nonlinear Optical Polymeric Materials: From Chromophore Design to Commercial Applications, in the series Advances in Polymer Science*; Heidelberg : Springer-Verlag, 2001

26. A. Goonesekera, S. Ducharme; *Effect of dipolar molecules on carrier mobilities in photorefractive polymers*; J. Appl. Phys. 1999, 85, 6506-6514. DOI: 10.1063/1.370154
27. L. Pielą; *Idee chemii kwantowej*; Warszawa : Wydawnictwo Naukowe PWN, 2004
28. R. F. Nalajewski; *Podstawy i metody chemii kwantowej. Wykłady*; Warszawa : PWN, 2001
29. A. Szabo, N. Ostlund *Modern quantum chemistry: Introduction to advanced electronic structure theory*; Macmillan Pub. Co. Inc., 1982
30. R. J. Barlett; *Coupled-cluster approach to molecular structure and spectra: a step toward predictive quantum chemistry*; J. Phys. Chem. 1989, 93, 1697-1708. DOI: 10.1021/j100342a008
31. O. Christiansen, A. Halkier, H. Koch, P. Jørgensen, T. Helgaker; *Integral-direct coupled cluster calculations of frequency-dependent polarizabilities, transition probabilities and excited-state properties*; J. Chem. Phys. 1998, 108, 2801-2816. DOI: 10.1063/1.475671
32. O. Christiansen; *Coupled Cluster Theory with Emphasis on Selected New Developments*; Theor. Chem. Acc. 2006, 116, 106-123. DOI: 10.1007/s00214-005-0037-5
33. C. Møller, C. Plesset; *Note on an Approximation Treatment for Many-Electron Systems*; Phys. Rev. 1934, 46, 618-622. DOI: 10.1103/physrev.46.618
34. J. A. Pople, J. S. Binkley, R. Seeger; *Theoretical models incorporating electron correlation*; Int. J. Quant. Chem. 1976, 10, 1-19. DOI: 10.1002/qua.560100802
35. P. Hohenberg, W. Kohn; *Inhomogeneous Electron Gas*; Phys. Rev. 1964, 136, B864-B871. DOI: 10.1103/physrev.136.b864
36. W. Kohn, L. J. Sham; *Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects*; Phys. Rev. 1965, 140, A1133-A1138. DOI: 10.1103/physrev.140.a1133
37. D. R. Salahub, M. C. Zerner; *The challenge of d and f electrons*; Waszyngton DC : ACS, 1989
38. R. G. Parr, W. Yang *Density-functional theory of atoms and molecules*. Oksford : Oxford Univ.Press, 1989
39. R. Bauernschmitt, R. Ahlrichs; *Treatment of electronic excitations within the adiabatic approximation of time dependent density functional theory*; Chem. Phys. Lett. 1996, 256, 454-464. DOI: 10.1016/0009-2614(96)00440-x
40. M. E. Casida, C. Jamorski, K. C. Casida, D. R. Salahub; *Molecular excitation energies to high-lying bound states from time-dependent density-functional response theory: Characterization and correction of the time-dependent local density approximation ionization threshold*; J. Chem. Phys. 1998, 108, 4439-4449. DOI: 10.1063/1.475855

41. J. S. Grimme, F. Furche, R. Ahlrichs; *An improved method for density functional calculations of the frequency-dependent optical rotation*; Chem. Phys. Lett. 2002, 361, 321-328. DOI: 10.1016/s0009-2614(02)00975-2
42. G. Gini; *QSAR Methods*; Methods. Mol. Biol. 2016, 1425, 1-20. DOI: 10.1007/978-1-4939-3609-0_1
43. X.Y. Meng, H.X. Zhang, M. Mezei, M. Cui; *Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery*; Curr. Comput.-Aid. Drug, 2011, 7; 146-157. DOI: 10.2174/157340911795677602
44. J. Mortier, C. Rakers, M. Bermudez, M.S. Murgueitio, S. Riniker, G. Wolber; *The impact of molecular dynamics on drug design: applications for the characterization of ligand-macromolecule complexes*; Drug Discov. Today, 2015, 20, 686-702. DOI: 10.1016/j.drudis.2015.01.003
45. H. Zhao, A. Caflisch; *Molecular dynamics in drug design*; Eur. J. Med. Chem., 2015, 91, 4-14. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.08.004
46. F.A. Tomas-Barberan, M.N. Clifford; *Flavanones, chalcones and dihydrochalcones – nature, occurrence and dietary burden*; J. Sci. Food Agric. 2000, 80, 1073-1080. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1073::AID-JSFA568>3.0.CO;2-B
47. H.K. Hsieh, T.H. Lee, J.P. Wang, C.N. Lin, *Synthesis and anti-inflammatory effect of chalcones and related compounds*; Pharm. Res. 1998, 15, 39-46. PMID: 9487544
48. T. Iwashina; *The structure and distribution of the flavonoids in plants*; J. Plant Res. 2000, 113, 287-299. DOI: 10.1007/pl00013940
49. S. Kohlmünzer; *Farmakognozja*. Wydawnictwo lekarskie PZWL, Warszawa 1998.
50. D. K. Mahapatra, S.K. Bharti, V. Asati; *Anti-cancer chalcones: Structural and molecular target perspectives*, Eur. J. Med. Chem. 2015, 98, 69-114. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.05.004
51. R. Nishimura, K. Tabata, M. Arakawa, Y. Ito, Y. Kimura, T. Akihisa, H. Nagai, A. Sakuma, H. Kohno, T. Suzuki, *Isobavachalcone, a Chalcone Constituent of Angelica keiskei, Induces Apoptosis in Neuroblastoma*; Biol. Pharm. Bull. 2007, 30, 1878–1883. DOI: 10.1248/bpb.30.1878
52. Y.L. Hsu, P.L. Kuo, W.S. Tzeng, C.C. Lin; *Chalcone inhibits the proliferation of human breast cancer cell by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis*; Food Chem. Toxicol. 2006, 44, 704–713. DOI: 10.1016/j.fct.2005.10.003

53. T. Enoki, H. Ohnogi, K. Nagamine, Y. Kudo, K. Sugiyama, M. Tanabe, E. Kobayashi, H. Sagawa, I. Kato; *Antidiabetic Activities of Chalcones Isolated from a Japanese Herb, Angelica keiskei*; J. Agric. Food Chem. 2007, 55, 6013–6017. DOI: 10.1021/jf070720q
54. P.M. Sivakumar, P.K. Prabhakar, M. Doble; *Synthesis, antioxidant evaluation, and quantitative structure–activity relationship studies of chalcones*; Med. Chem. Res. 2010, 20, 482–492. DOI: 10.1007/s00044-010-9342-1
55. S.K. Awasthi, N. Mishra, B. Kumar, M. Sharma, A. Bhattacharya, L.C. Mishra, V.K. Bhasin; *Potent antimalarial activity of newly synthesized substituted chalcone analogs in vitro*; Med. Chem. Res. 2008, 18, 407–420. DOI: 10.1007/s00044-008-9137-9
56. Y.S. Lee, S.S. Lim, K.H. Shin, Y.S. Kim, K. Ohuchi, S.H. Jung; *Anti-angiogenic and Anti-tumor Activities of 2'-Hydroxy-4'-methoxychalcone*; Biol. Pharm. Bull. 2006, 29(5), 1028–1031. DOI: 10.1248/bpb.29.1028
57. K.L. Lahtchev, D.I. Batovska, S.P. Parushev, V.M. Ubiyvovk, A.A. Sibirny, *Antifungal activity of chalcones: A mechanistic study using various yeast strains*, Eur. J. Med. Chem. 2008, 43, 2220–2228. DOI: 10.1016/j.ejmech.2007.12.027
58. F. Jin, X.Y. Jin, Y.L. Jin, D.W. Sohn, S.A. Kim, D.H. Sohn, Y.C. Kim, H.S. Kim; *Structural requirements of 2',4',6'-tris(methoxymethoxy) chalcone derivatives for anti-inflammatory activity: The importance of a 2'-hydroxy moiety*; Arch. Pharm. Res. 2007, 30, 1359–1367. DOI: 10.1007/bf02977357
59. C.S. Chidan Kumar, H.K. Fun, C. Parlak, L. Rhyman, P. Ramasami, M. Tursun, S. Chandraju, C.K. Quah; *Synthesis, molecular structure, FT-IR, Raman, XRD and theoretical investigations of (2E)-1-(5-chlorothiophen-2-yl)-3-(naphthalen-2-yl)prop-2-en-1-one*; Spectrochim. Acta Part A 2014, 132, 174–182. DOI: 10.1016/j.saa.2014.04.155
60. K. Baba, M. Taniguchi, K. Nakata; *Studies on Agnelica keiskei “ashitaba”*; Foods Food Ingredients J. Jpn. 1998, 178, 52–60.
61. K. Sugamoto, Y.I. Matsusita, K. Matsui, C. Kurogi, T. Matsui; *Synthesis and antibacterial activity of chalcones bearing prenyl or geranyl groups from Angelica keiskei*; Tetrahedron 2011, 67, 5346–5359. DOI: 10.1016/j.tet.2011.04.104
62. A.L. Cole, S. Hossain, A.M. Cole, O. IV Phanstiel; *Synthesis and bioevaluation of substituted chalcones, coumaranones and other flavonoids as anti-HIV agents*; Bioorgan. Med. Chem. 2016, 24, 2768–2776. DOI: 10.1016/j.bmc.2016.04.045
63. J.R. Dimmock, D.W. Elias, M.A. Beazely, N.M. Kandepu; *Bioactivities of chalcones*; Curr. Med. Chem. 1999, 6, 1125–1149. PMID: 10519918

64. K.M. Rahulan, S. Balamurugan, K.S. Meena, G.-Y. Yeap, C.C. Kanakam; *Synthesis and nonlinear optical absorption of novel chalcone derivative compounds*; Opt. Laser Technol. 2014, 56, 142-145. DOI: 10.1016/j.optlastec.2013.07.008
65. T.A. Fayed; *A novel chalcone-analogue as an optical sensor based on ground and excited states intramolecular charge transfer: A combined experimental and theoretical study*; Chem. Phys. 2006, 324 631-638. DOI: 10.1016/j.chemphys.2005.11.039
66. J.P. Perdew, K. Burke, M. Ernzerhof; *Generalized gradient approximation made simple*; Phys. Rev. Lett. 1996, 77, 3865-3868. DOI: 10.1103/PhysRevLett.77.3865
67. J.P. Perdew, K. Burke, M. Ernzerhof; *Errata: Generalized gradient approximation made simple*; Phys. Rev. Lett. 1977, 78, 1396. DOI: 10.1103/PhysRevLett.78.1396
68. A. D. Becke; *Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange*; J. Chem. Phys. 1993, 98, 5648-52. DOI: 10.1063/1.464913
69. T. Yanai, D. Tew, N. Handy; *A new hybrid exchange-correlation functional using the Coulomb-attenuating method (CAM-B3LYP)*; Chem. Phys. Lett. 2004, 393, 51-57. DOI: 10.1016/j.cplett.2004.06.011
70. H. Iikura, T. Tsuneda, T. Yanai, K. Hirao; *Long-range correction scheme for generalized-gradient-approximation exchange functionals*; J. Chem. Phys. 2001, 115, 3540-3544. DOI: 10.1063/1.1383587
71. O. A. Vydrov, G. E. Scuseria; *Assessment of a long range corrected hybrid functional*; J. Chem. Phys. 2006, 125, 234109. DOI: 10.1063/1.2409292
72. J.-D. Chai, M. Head-Gordon; *Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom-atom dispersion corrections*; Phys. Chem. Chem. Phys. 2008, 10, 6615-6620. DOI: 10.1039/B810189B
73. J.L. Oudar, D.S. Chemla; *Hyperpolarizabilities of the nitroanilines and their relations to the excited state dipole moment*; J. Chem. Phys. 1977, 66, 2664–2668. DOI:10.1063/1.434213
74. Ch. Lipinski, F. Lombardo, B.W Dominy, P.J. Feeney; *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development setting*; Adv. Drug. Deliv. Rev. 1997, 23, 3-25. DOI: 10.1016/S0169-409X(00)00129-0
75. G. Snatzke; *Circular Dichroism and Absolute Conformation: Application of Qualitative MO Theory to Chiroptical Phenomena*; Angew. Chem. Int. Ed. 1979, 18(5), 363-377. DOI: 10.1002/anie.197903631
76. K. Aidas, C. Angeli and et al.; *The Dalton quantum chemistry program system*; WIREs Comput. Mol. Sci. 2014, 4, 269–284. DOI: 10.1002/wcms.1172

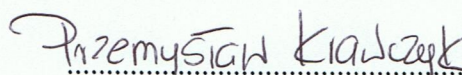
77. O.S. El'tsov, V.S. Mokrushin; *Reaction of 4,5-Dinitroimidazole with Ethylenediamine and Some Transformations of the Obtained 5-(2-Aminoethylamino)-4-nitro-1H-imidazole*; Chem. Heterocyclic Comp. 2002, 38, 1331- 1335. DOI: 10.1023/a:1022122208213
78. U. Uçucu, N.G. Karaburun, I. Işıkdağ; *Synthesis and analgesic activity of some 1-benzyl-2-substituted-4,5-diphenyl-1H-imidazole derivatives*; Farmaco 2001, 56, 285–290. DOI: 10.1016/S0014-827X(01)01076-X
79. A. Yeşilada, S. Koyunoğlu, N. Saygili, E.Kupeli, E. Yeşilada, E. Bedir, I. Khanc; *Synthesis, anti-inflammatory and analgesic activity screening of some new 4-(3H)-quinazolinone derivatives*; Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. 2004, 337, 96–104. DOI: 10.1002/ardp.200200752
80. L. Quattara, M. Debaert, R. Cavier; *Synthesis and antiparasitic activity of new nitro-5-imidazole derivatives*; Farmaco. (sci) 1987, 42(6), 449–456. PMID: 2904887
81. S. Dutta; *Synthesis and anthelmintic activity of some novel 2-substituted-4,5-diphenyl imidazoles*; Acta Pharma. 2010, 60(2) 229–235. DOI: 10.2478/v10007-010-0011-1
82. A.K. Sengupta, T. Bhattacharya; *Synthesis and antimicrobial activity of some substituted 2-phenyl-3-arylquinazol-4-ones*; J. Indian Chem. Soc. 1983, 60, 373–376. DOI: 10.1002/chin.198349246
83. L. Navidpour, H. Shadnia, H. Shafaroodi, M. Amini, R. Dehpour, A. Shafiee, *Design, synthesis and biological evaluation of substituted 2-alkylthio-1,5-diarylimidazoles as selective COX-2 inhibitors*; Bioorg. Med. Chem. 2007, 15, 1976–1982. DOI: 10.1016/j.bmc.2006.12.041
84. G. Fluoret; *Synthesis of pyroglutamylhistidylprolineamide by classical and solid phase methods*; J. Med. Chem. 1970, 13, 843–845. DOI: 10.1021/jm00299a011
85. R.N. Brogden, R.C. Heel, T.M. Speight, G.S. Avery; *Metronidazole in anaerobic infections: a review of its activity, pharmacokinetics and therapeutic use*; Drugs 1978, 16(5), 387–417. PMID:363399
86. R.W. Brimblecombe, W.A.M. Duncan, G.J. Durant, J.C. Emmett, C.R. Ganellin, M.E. Parsons, J.W. Black; *The pharmacology of cimetidine, a new histamine H₂-receptor antagonist*; Br. J. Pharmacol. 1975, 53, 435–436. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.00854.x
87. W. Hunkeler, H. Möhler, L. Pieri, P. Polc, E.P. Bonetti, R. Cumin, R. Schaffner, W. Haefely; *Selective antagonists of benzodiazepines*; Nature 1981, 290, 514–516. DOI: 10.1038/290514a0
88. J. Liu, J. Qiu, M. Wang, L. Wang, L. Su, J. Gao, Q. Gua, J. Xu, S.L. Huang, L.Q. Gu, Z.S. Huang, D. Li; *Synthesis and characterization of 1H-phenanthro[9,10-d]imidazole derivatives*

- as multifunctional agents for treatment of Alzheimer's disease; *Biochim. Biophys. Acta* 2014, 1840(9), 2886–2903. DOI: 10.1016/j.bbagen.2014.05.005
89. X. Cheng, H. Jia, J. Feng, J. Qin, Z. Li; *Reactive probe for hydrogen sulfite: good ratiometric response and bioimaging application*; *Sensors Actuators B* 2013, 184, 274–280. DOI: 10.1016/j.snb.2013.04.070
90. W. Lin, L. Long, L. Yuan, Z. Cao, B. Chen, W. Tan; *A ratiometric fluorescent probe for cysteine and homocysteine displaying a large emission shift*; *Org. Lett.* 2008, 10(24), 5577–5580. DOI: 10.1021/ol802436j
91. H. Zhang, C. Wang, G. Wang, K. Wang, K. Jiang; *Thrombin-mediated ratiometric two-photon fluorescent probe for selective imaging of endogenous ultratrace glutathione in platelet*; *Biosens. Bioelectron.* 2016, 78, 344–350. DOI: 10.1016/j.bios.2015.11.065
92. H. Zhang, K. Wang, X. Xuan, Q. Lv, Y. Nie, H. Guo; *Cancer cell-targeted two-photon fluorescence probe for the real-time ratiometric imaging of DNA damage*; *Chem. Commun.* 2016, 52, 6308–6311. DOI: 10.1039/c6cc02290a
93. J. H. Lee, Ch. S. Lim, Y. S. Tian, J. H. Han, B. R. Cho; *A Two-Photon Fluorescent Probe for Thiols in Live Cells and Tissues*; *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 1216–1217. DOI: 10.1021/ja9090676
94. IUPAC, *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the "Gold Book"); 1997
95. L.N. Sharada, Y. Aparna, M. Saba, S.N.T. Sunitha, L. Viveka; *A Review on Reactions and Applications of Oxazolone*; *Int. J. Sci. Res. Publ.* 2015, 5(6), 1–9. ISSN: 2250-3153
96. G. Ozturk, S. Alp, S. Timur; *Photophysical characterization of fluorescent oxazol-5-one derivatives in PVC and their application as biosensors in the detection of ACh and AChE inhibitor: Donepezil*; *Dyes Pigments* 2008, 76, 792–798. DOI: 10.1016/j.dyepig.2007.02.005
97. M. Bourotte, M. Schmitt, A.F. Wund, C. Pigault, J. Haiech, J.J. Bourguignon; *Fluorophores related to the green fluorescent protein*; *Tetrahedron Lett.* 2004, 45, 6343–6348. DOI: 10.1016/j.tetlet.2004.06.072
98. Y.L.N. Murthy, V. Christophera, U.V. Prasad, P.B. Bisht, D.V. Ramanaih, B.S. Kalanoor, S.A. Ali; *Synthesis and study of nonlinear optical properties of 4-substituted benzylidene-2-phenyl oxazol-5-ones by Z-scan technique*; *Synth. Met.* 2010, 160, 535–539. DOI: 10.1016/j.synthmet.2009.11.029
99. S.A. Siddiqui, S.R. Bhusare, D.V. Jarikote, R.P. Pawar, Y.B. Vibhute; *New Novel synthesis and antibacterial activity of 1-(substituted phenyl)-2-phenyl-4-(3'-halo, 4'-hydroxy, 5'-methoxy benzylidene)-imidazole-5-ones*; *Bull. Kor. Chem. Soc.*, 2001, 22, 1033–1036

100. C.R. Tandel, D. Manmen; *Synthesis and study of some compounds containing oxazolone ring, showing biological activity*; Indian J. Chem. 2008, 47B, 932–937
101. I.R. Siddiqui, P.K. Singh, V. Srivastava, J. Singh; *Facile synthesis of acyclic analogues of carbocyclic nucleoside as potential anti-HIV pro-drug*; Indian J. Chem. 2010, 49B, 512–520
102. R.T. Moxley, S. Ashwal, C. McDonald, S. Pandya, A. Connolly, C. Wade; *Practice Parameter: Corticosteroid treatment of Duchenne dystrophy: Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society*; Neurology 2005, 64, 13–20. DOI: 10.1212/01.wnl.0000148485.00049.b7
103. C. Sanchez, C. Mendez, J.A. Salas; *Indolocarbazole natural products: occurrence, biosynthesis, and biological activity*; Nat. Prod. Rep. 2006, 23, 1007–1045. DOI: 10.1039/b601930g
104. K.M. Khan, U.R. Mughal, M.T.H. Khan, Z. Ullah, S. Perveen, M.I. Choudhary; *Oxazolones: New tyrosinase inhibitors; synthesis and their structure–activity relationships*; Bioorg. Med. Chem. 2006, 14, 6027–6033. DOI: 10.1016/j.bmc.2006.05.014
105. M.A. Mesaik, S. Rahat, K.M. Khan, Z. Ullah, M.I. Choudhary, S. Murad, Z. Ismail, A. Rahman, A. Ahmad; *Synthesis and immunomodulatory properties of selected oxazolone derivatives*; Bioorg. Med. Chem. 2004, 12, 2049–2057. DOI: 10.1016/j.bmc.2004.02.034
106. M.A. Pasha, V.P. Jayashankara, K.N. Venugopala, G.K. Rao; *Zinc oxide (ZnO): An Efficient Catalyst for the Synthesis of 4-arylmethylidene-2-phenyl 5(4H)-oxazolones Having Antimicrobial Activity*; J. Pharmacol. Toxicol. 2007, 2, 264–270. DOI: 10.3923/jpt.2007.264.270
107. ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (UE) 2017/735 z dnia 14 lutego 2017 r., Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej, L 112/1
108. Witold Mizerski, *Tablice biologiczne*, Adamantan, Warszawa 2013, ISBN 978-83-7350-243-7, s. 302
109. (a) C. Reichardt, *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*, 2nd ed., VCH Publishers, Weinheim, 1988. (b) A. M. Wiośetek-Reske, S. Wysocki, G. W. Bąk; *Determination of dipole moment in the ground and excited state by experimental and theoretical methods of N-nonyl acridine orange*; Spectrochim. Acta A 2005, 62, 1172–1178. DOI: 10.1016/j.saa.2005.04.010

110. A. Kowski, B. Kukliński, P. Bojarski; *Dipole moment of aniline in the excited S1 state from thermochromic effect on electronic spectra*; Chem. Phys. Lett. 2005, 415, 251–255. DOI: 10.1016/j.cplett.2005.09.008
111. J. Catalán; *Toward a Generalized Treatment of the Solvent Effect Based on Four Empirical Scales: Dipolarity (SdP, a New Scale), Polarizability (SP), Acidity (SA), and Basicity (SB) of the Medium*; J. Phys. Chem. B 2009, 113, 5951–5960. DOI: 10.1021/jp8095727
112. M.S. Zakerhamidi, S. Ahmadi-Kandjani, M. Moghadam, E. Ortyl, S. Kucharski; *Substituent and solvent effects on the dipole moments and photophysical properties of two azo sulfonamide dyes*; J. Mol. Struct. 2011, 996, 95–100. DOI: 10.1016/j.molstruc.2011.04.023

Bydgoszcz, 10 sierpnia 2018 r.

Przemysław Kwaśny

podpis habilitanta