



AUTOREFERAT

RENATA PERLIKOWSKA

Zakład Chemii Biomolekularnej
Międzywydziałowa Katedra Chemii i Biochemii Medycznej
Wydział Lekarski
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Łódź, 2017

Załącznik 2

Spis treści	strona
1. Imię i nazwisko.....	3
2. Dyplomy i stopnie naukowe.....	3
3. Zatrudnienie	4
4. Opis osiągnięcia naukowego.....	4
5. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze.....	21

1. Imię i nazwisko

Renata Ewa Perlikowska (z d. Staniszevska)

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

- świadectwo ukończenia studiów podyplomowych w zakresie: Poradnictwo Żywieniowe i Dietetyczne, z dnia 10 maja 2017 r., Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji. Tytuł projektu dyplomowego: „*Postępowanie dietetyczne w niedoczynności tarczycy typu Hashimoto*”.

Promotor: dr hab. Ewa Lange, SGGW Warszawa

- stopień doktora nauk medycznych (w dyscyplinie biologia medyczna) z dnia 5 października 2010 r., Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Wydział Lekarski. Tytuł rozprawy doktorskiej: „*Synteza i badanie właściwości farmakologicznych nowych analogów endomorfina o zwiększonej odporności na działanie proteaz*”.

Promotor: Prof. dr hab. Anna Janecka, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Recenzenci: Prof. dr hab. inż. Aleksandra Olma, Politechnika Łódzka

Prof. dr hab. Zbigniew Szewczuk, Uniwersytet Wrocławski

- dyplom magistra inżyniera na kierunku Biotechnologia w zakresie biotechnologii molekularnej i biochemii technicznej z dnia 13 grudnia 2005 r., Politechnika Łódzka, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności. Tytuł pracy magisterskiej: „*Development of a cellular/enzymatic system for the decarboxylation of malic acid to lactic acid by means of the malolactic enzyme from Oenococcus oeni*” (praca wykonana na: University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, Austria).

Promotor: Prof. Klaus Dieter Kulbe, University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, Austria

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu

2011- nadal- adiunkt w Zakładzie Chemii Biomolekularnej, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny w Łodzi,

2005- 2006- technolog ds. rozwoju, Ośrodek Badań Farmaceutycznych i Klinicznych BIOFANA Sp. z o.o. Kutno.

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. 2016 r. poz. 882 ze zm. W Dz. U. z 2016 r. poz. 1311)

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Synteza i badanie właściwości farmakologicznych nowych analogów peptydów opioidowych

Uzyskane osiągnięcia naukowe, stanowiące podstawę habilitacji zostały udokumentowane w cyklu pięciu prac oryginalnych i jednej przeglądowej, opublikowanych w latach 2011-2016 i dotyczą roli peptydów opioidowych w organizmie i różnorodnych możliwości ich wykorzystania dla celów terapeutycznych.

Summaryczny Impact Factor ISI: 15.577

Punktacja MNiSW: 155

Liczba cytowań: 332 (WoS), 340 (Scopus) (listopad 2017)

Indeks Hirscha : 9 (WoS), 9 (Scopus)

4.2. Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Fichna J, **Perlikowska R**, Wyrebska A, Gach K, do-Rego JC, Toth G, Kluczyk A, Janecka A, Effect of 2',6'-dimethyl-L-tyrosine (Dmt) on pharmacological activity of cyclic endomorphin-2 and morphiceptin analogs, 2011, *Bioorg Med Chem*, 19: 6977-6981.

Perlikowska R, Piekielna J, Fichna J, do-Rego JC, Toth G, Janecki T, Janecka A, Pharmacological properties of novel cyclic pentapeptides with μ -opioid receptor agonist activity, 2014, *Med Chem*, 10: 154-161.

Perlikowska R, Malfacini D, Cerlesi MC, Calo' G, Piekielna J, Floriot L, Henry T, do-Rego JC, Tömböly C, Kluczyk A, Janecka A, Pharmacological characterization of endomorphin-2-based cyclic pentapeptides with methylated phenylalanine residues, 2014, *Peptides*, 55: 145-150.

Perlikowska R, Piekielna J, Gentilucci L, De Marco R, Cerlesi MC, Calo G, Artali R, Tömböly C, Kluczyk A, Janecka A, Synthesis of mixed MOR/KOR efficacy cyclic opioid peptide analogs with antinociceptive activity after systemic administration, 2016, *Eur J Med Chem*, 15 : 276-286.

Perlikowska R, Piekielna J, Mazur M, Koralewski R, Olczak J, do Rego JC, Fichna J, Modranka J, Janecki T, Janecka A. Antinociceptive and antidepressant-like action of endomorphin-2 analogs with proline surrogates in position 2, 2014, *Bioorg Med Chem*, 22: 4803-4809.

Perlikowska R, Janecka A. Bioavailability of endomorphins and the blood-brain barrier- a review, 2014, *Med Chem*, 10: 2-17.

Badania, których wynikiem są ww. publikacje, zostały wykonane w Zakładzie Chemii Biomolekularnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac, osiągniętych wyników oraz ich ewentualnego wykorzystania

4.3.1. Wprowadzenie

Opiaty, takie jak morfina, są najbardziej skutecznymi środkami zwalczającymi ostry ból. Mimo, że mają wiele działań ubocznych, takich jak powodowanie uzależnienia, tolerancji czy depresji oddechowej, do tej pory nie udało się zastąpić ich bezpieczniejszymi środkami. Wykazano, że opiaty działają głównie poprzez receptory μ -opiodowe, zlokalizowane w mózgu ssaków. W roku 1997 Zadina i wsp.¹ odkryli w mózgu dwa tetrapeptydy, które wykazywały niezwykle wysokie powinowactwo i selektywność do receptora μ -opiodowego i zostały uznane za jego endogenne ligandy. Ponieważ związki te działają przez ten sam co morfina receptor nazwano je endomorfina-1 (EM-1, Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂) i endomorfina-2 (EM-2, Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂). Endomorfiny działają głównie przeciwbólowo, przeciwdepresyjnie, przeciwłękowo. Odgrywają ważną rolę w przypadku narażenia na stres, ponieważ zmniejszają uczucie niepokoju. Hamują perystaltykę jelit, pobudzają apetyt i zwiększają aktywność ruchową. Odkrycie endomorfina dało nadzieję na znalezienie bezpieczniejszego niż morfina środka zwalczającego silny ból. Niestety endomorfiny, jak większość peptydów, nie są dobrymi kandydatami na leki. Mimo że wykazują one bardzo silne działanie przeciwbólowe po podaniu dokomorowym (ang. intracerebroventricular, icv) efekt ten nie jest obserwowany po podaniu peryferyjnym, np. dożylnym (ang. intravenous, iv). Wynika to z tego, że są one szybko degradowane przez enzymy proteolityczne, a także w większości nie przechodzą przez barierę krew-mózg (ang. blood-brain barrier, BBB). Projektowanie i synteza analogów endomorfina o lepszym profilu farmakokinetycznym, które znalazłyby zastosowanie jako nowe leki przeciwbólowe czy przeciwdepresyjne jest od wielu lat zadaniem stawianym chemii medycznej.

W ostatnim czasie zsyntetyzowano dziesiątki analogów endomorfina w poszukiwaniu związków o lepszym niż macierzyste peptydy profilu farmakologicznym.^{2,3} Jednak, mimo

¹ Zadina JE, Hackler L, Hackler L, Ge LJ, Kastin AJ. A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor, 1997, Nature, 386: 499-501.

² De Marco R, Janecka A. Strategies to improve bioavailability and in vivo efficacy of the endogenous opioid peptides endomorphin-1 and endomorphin-2, 2015, Curr Top Med Chem, 16: 141-155.

znacznego postępu w badaniach, do tej pory nie udało się otrzymać związku, który byłby równie skuteczny jak morfina w uśmierzaniu silnego bólu, a jednocześnie pozbawiony jej niepożądanych efektów ubocznych, zatem projektowanie nowych, coraz lepszych analogów endomorfin jest nadal prowadzone w wielu laboratoriach na świecie.

Główne strategie syntetyczne, stosowane dotychczas w celu otrzymania analogów peptydów opioidowych o lepszych właściwościach farmakologicznych w porównaniu do natywnych peptydów, polegają na wprowadzaniu nienaturalnych aminokwasów lub D-aminokwasów, tworzeniu wiązań pseudopeptydowych, syntezie struktur chimerycznych, czy też cyklizacji liniowych sekwencji.

Cyklizacja liniowych sekwencji wydaje się być jedną z korzystniejszych metod pozwalających uzyskać związki o zwiększonej odporności na działanie enzymów proteolitycznych, jak również wykazujących korzystną aktywność biologiczną po podaniu obwodowym. Peptydy cykliczne są bowiem bardziej sztywne niż ich liniowe odpowiedniki, a zmniejszona swoboda konformacyjna cząsteczki może mieć wpływ na jej lepsze dopasowanie do określonego typu receptorów i wzrost selektywności.⁴ Cyklizacja zwiększa stabilność metaboliczną oraz lipofilowość, która z kolei wpływa na biodostępność związków, decydującą w dużej mierze o przenikalności peptydów przez błony komórkowe.

Cyklizację liniowych sekwencji można przeprowadzać przy użyciu różnych strategii i w różnych pozycjach. W pracy przeglądowej, w której jestem współautorem, zatytułowanej „*Cyclization in opioid peptides*” autorstwa Piekiełna i wsp., opisane zostały szczegółowo cykliczne analogi peptydów opioidowych opublikowane w ciągu ostatnich 30 lat [II.1.13].

Endomorfiny są zaledwie tetrapeptydami, a poza tym zarówno N-końcowa grupa aminowa jak i C-końcowy amid są elementami strukturalnymi decydującymi o ich aktywności. Z tego powodu cyklizacja typu „głowa-ogon” nie wydaje się korzystna. Wobec czego, zaproponowane w moich dotychczasowych badaniach cykliczne analogi otrzymałam poprzez utworzenie wiązania amidowego pomiędzy grupą aminową i karboksylową w łańcuchach bocznych aminokwasu diaminowego (Lys) i dikarboksylowego (Asp), wprowadzonych do

³ Varamini P, Blanchfield JT, Toth I. Endomorphin derivatives with improved pharmacological properties, 2013, *Curr Med Chem*, 20: 2741-2758.

⁴ Janecka A, Gentilucci L. Cyclic endomorphin analogs in targeting opioid receptors to achieve pain relief, 2014, *Future Med Chem*, 6: 2093-2101.

sekwencji EM-2 (Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂) w pozycje 2 i 5. Spośród otrzymanych związków, peptyd cykliczny o sekwencji Tyr-c(D-Lys-Phe-Phe-Asp)-NH₂ był całkowicie odporny na działanie peptydaz, miał duże powinowactwo do receptorów μ -opiodowych oraz wykazywał bardzo silne i długotrwałe działanie przeciwbólowe po podaniu dokomorowym, a także słabe działanie przeciwbólowe po podaniu peryferyjnym (dożylnym) [II.1.6]. Fakt, że zsyntezowany analog był aktywny ośrodkowo, świadczy o tym, że był w stanie, przynajmniej częściowo, przejść przez barierę krew-mózg. Otrzymane rezultaty pokazały, że cykliczne analogi endomorfina mogą stać się związkami wyjściowymi w dalszych poszukiwaniach środków przeciwbólowych o strukturze peptydowej.

Wobec tego w ramach dalszej pracy naukowej zaprojektowałam kilka kolejnych serii cyklicznych peptydów opiodowych. Syntezę cyklicznych analogów prowadziłam na fazie stałej metodą z zastosowaniem procedury Boc (grupa *tert*-butyloksykarbonylowa) lub Fmoc (grupa 9-fluorenylometoksykarbonylowa) na żywicy *p*-metylobenzhydryloaminowej MBHA (stopień osadzenia 0.8 mmola/g). W zależności od metody grupa ϵ -aminowa Lys blokowana była przez grupę Fmoc lub 4-metylotritylową (Mtt), grupa β -karboksylowa Asp przez grupę fluorenylometylową (Ofm) lub ester 2-fenilo-isopropylowy (O-2PhiPr). Tetrafluoroboran N-tlenku 1-(3-tetrametyloamidynio)-benzotriazolu (TBTU) używałam jako odczynnik kondensujący. Analiza surowych mieszanin poreakcyjnych była prowadzona przy użyciu chromatografii cieczowej (HPLC) połączonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS). Produkty reakcji oczyszczane były z użyciem HPLC i potwierdzane za pomocą wysokosprawnej spektrometrii mas (HR-MS).

W poszukiwaniu związków biologicznie aktywnych, a przede wszystkim odpornych na degradację enzymatyczną, ciekawe wyniki otrzymałam również w wyniku wprowadzania do natywnych struktur liniowych aminokwasów nienaturalnych. Korzystny wpływ na właściwości endomorfina mają zmiany w obrębie reszty Pro w pozycji 2, pełniącej funkcję łącznika, decydującego o położeniu względem siebie grup farmakoforowych, a więc determinującego konformację łańcucha peptydowego. Obecność Pro w sekwencji endomorfina ogranicza znacznie ilość enzymów, zdolnych do trawienia tych peptydów. Prolina, ze swoją cykliczną budową, jest wyjątkowym aminokwasem. Jej obecność w łańcuchu peptydowym powoduje zmianę kierunku tego łańcucha oraz izomeryzację *cis-trans* wiązania peptydowego z poprzedzającym

aminokwasem, co utrudnia dostęp enzymów proteolitycznych. Dlatego endomorfiny, zawierające Pro w pozycji 2 łańcucha, są odporne na działanie większości aminopeptydaz (czyli enzymów odcinających N-końcowy aminokwas). Istnieje jednak grupa enzymów, które hydrolizują właśnie wiązania peptydowe utworzone z udziałem Pro, a wśród nich jest dipeptydylopeptydaza IV (DPP IV, EC 3.4.14.5). Poszukując związków odpornych na działanie DPP IV zaprojektowałam serię analogów EM-2, zawierających zmodyfikowaną prolinę (4-fenylopirydinę, 4-Ph-β-Pro). Syntezę liniowych analogów prowadziłam na fazie stałej metodą z zastosowaniem procedury Fmoc na żywicy MBHA (stopień osadzenia 0.8 mmola/g). Produkty reakcji oczyszczane były z użyciem HPLC i potwierdzone za pomocą HR-MS.

W celu ustalenia, jakie modyfikacje chemiczne prowadzą do otrzymania związków o pożądanym profilu farmakologicznym, dla wszystkich zsyntezowanych analogów przeprowadziłam badanie względnego powinowactwa do receptorów μ -, δ - i κ - opioidowych w preparatach błonowych z mózgu szczura (μ i δ) lub świnki morskiej (κ). Badania receptorowe polegają na wypieraniu znakowanego izotopowo liganda ($[^3\text{H}]$ DAMGO dla receptora μ , $[^3\text{H}][\text{Ile}^{5,6}]$ deltorfiny-2 dla receptora δ , $[^3\text{H}]$ nor-BNI dla receptora κ) o dużym powinowactwie do danego receptora przez nieznakowany analog. Pozwalają one na wyznaczenie wartości IC_{50} , określającej stężenie badanego peptydu, przy którym wypierana jest połowa radioliganda. Porównanie wartości IC_{50} otrzymanych dla różnych analogów pozwala na ustalenie ich względnego powinowactwa i selektywności.

Celem określenia stabilności metabolicznej w obecności enzymów proteolitycznych wykorzystałam metodę badania szybkości degradacji analogów wybranymi enzymami proteolitycznymi: aminopeptydazą M (APM), karboksypeptydazą Y (CPY), DPP IV lub homogenatem z mózgu szczura przy użyciu HPLC.

Analogi o najlepszych właściwościach, wybrane na podstawie testów *in vitro*, były dalej badane *in vivo*. Do badań przeciwbólowych na zwierzętach (test gorącej płytki) wyselekcjonowane zostały najlepsze analogi o wysokim powinowactwie i dużej selektywności do receptora μ -opiodowego i jednocześnie odporne na degradację enzymatyczną. Efekt przeciwbólowy w tego typu badaniu wynika z aktywacji nadrdzeniowych receptorów μ -opiodowych. Aktywność przeciwbólowa była określana najpierw po podaniu icv, a następnie po podaniu obwodowym iv lub dootrzewnowym (ang. intraperitoneal, ip) co pozwalało ustalić, w

jakim stopniu nowe analogi przechodzą przez barierę krew-mózg. Z kolei efekt przeciwdepresyjny określany był w testach behawioralnych: wymuszonego pływania (ang. forced swimming test, FST), podwieszania za ogon (ang. tail-suspension test, TST) i mierzących aktywność ruchową zwierząt (ang. locomotory activity test, LMA).

4.3.2. Omówienie prac będących podstawą osiągnięcia naukowego

Fichna J, Perlikowska R, Wyrebska A, Gach K, do-Rego JC, Toth G, Kluczyk A, Janecka A, **Effect of 2',6'-dimethyl-L-tyrosine (Dmt) on pharmacological activity of cyclic endomorphin-2 and morphiceptin analogs**, 2011, *Bioorg Med Chem*; 19: 6977-6981.

Jako, że otrzymany w ramach mojej pracy doktorskiej analog o sekwencji Tyr-c(D-Lys-Phe-Phe-Asp)-NH₂ wykazał lepszy od endomorfina profil farmakologiczny, został on wybrany jako związek wyjściowy do syntezy nowych cyklicznych peptydów o potencjalnej aktywności przeciwbólowej [II.1.6]. Wobec tego, pierwsza zaprojektowana seria analogów miała ogólny wzór:



gdzie Xaa oznaczało Tyr lub jej pochodną z dwiema grupami metylowymi, 2',6'-dimetylotyrozynę (Dmt), natomiast Yaa i Zaa oznaczały aminokwasy z dodatkową grupą aminową lub karboksylową w łańcuchu bocznym, w tym wypadku Yaa= D-Asp lub D-Lys, Zaa= Asp lub Lys [I.2.1].

Zaprojektowane związki zsyntetyzowałam stosując standardową ortogonalną metodę Boc na żywicy MBHA, jednocześnie wykorzystując grupy Fmoc/Ofm do selektywnego blokowania odpowiednio, aminokwasów diaminowych i dikarboksylowych. Peptydy cykliczne zostały zdjęte z żywicy z wykorzystaniem mieszaniny TFA/TIS/H₂O (95: 2,5: 2,5: 1), wykorzystując dodatkowo promieniowanie mikrofalowe.

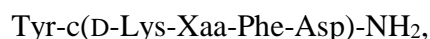
Otrzymane analogi charakteryzowały się wysokim powinowactwem do receptora μ -opiodowego, jak również były odporne na degradację enzymatyczną pod wpływem homogenatu mózgu szczura. Dodatkowa modyfikacja, polegająca na zastąpieniu Tyr w pozycji pierwszej jej

pochodną z dwiema grupami metylowymi, czyli 2',6'-dimetylotyrozyną (Dmt), spowodowała dalszy wzrost powinowactwa względem receptora μ , ale również względem receptora δ , co dało mniej selektywne analogi. Wprowadzone grupy metylowe w pierścieniu aromatycznym Tyr determinują bowiem konformację otrzymanych związków poprzez zwiększenie objętości łańcucha bocznego, to z kolei wpływa na rodzaj interakcji w obrębie domeny wiążącej receptora. Dwa wyselekcjonowane w tej serii analogi: Dmt-c(D-Lys-Phe-D-Pro-Asp)-NH₂ i Dmt-c(D-Asp-Phe-D-Pro-Lys)-NH₂ wykazywały silne, długotrwałe działanie przeciwbólne po podaniu icv, gdzie dawka wywołująca efekt równy połowie efektu maksymalnego wynosiła ED₅₀= 0.01 μ g/zwierzę. Najsilniejszą odpowiedź dla wybranych analogów w dawce 10 ng/zwierzę otrzymano po 30 min od iniekcji icv, a czas trwania efektu przeciwbólowego wynosił powyżej 90 min. Dodatkowo, efekt przeciwbólowy analogów cyklicznych w dawce 3 ng/zwierzę był znacząco hamowany przez jednoczesne podanie antagonisty receptora μ -opiodowego, β -funaltreksaminy (β -FNA) w dawce 1 μ g/zwierzę (icv). Świadczy to o udziale receptorów μ -opiodowych w przekazywaniu działania analgetycznego badanych peptydów. W analogicznie przeprowadzonym badaniu, w którym użyto antagonisty receptora δ -opiodowego, naltrindolu (NTL, 1 μ g/zwierzę, icv) i odpowiednio antagonisty receptora κ -opiodowego, norbinaltorfimy (nor-BNI, 5 μ g/zwierzę, icv), nie zaobserwowano wpływu na własności przeciwbólne cyklicznych analogów, co oznaczało brak udziału receptorów δ i κ w przekazywaniu działania analgetycznego. Wyselekcjonowane peptydy odpowiednio w dawkach 0.01 lub 1 mg/kg nie działały po podaniu iv, zatem nie wykazywały zdolności do przechodzenia przez barierę krew-mózg.

Jak wynika z otrzymanych danych, cykliczne peptydy w porównaniu do ich linowych pochodnych, charakteryzowały się wysokim powinowactwem do receptorów opiodowych, jednocześnie były odporne na degradację enzymatyczną. Dodatkowa modyfikacja, polegająca na zastąpieniu Tyr w pozycji 1 przez Dmt spowodowała zwiększenie powinowactwa, kosztem selektywności, aczkolwiek analogi wykazywały bardzo silny i długotrwały efekt przeciwbólowy, całkowicie hamowany przez antagonistę receptora μ . Efekt ten był obserwowany tylko po podaniu do komór mózgu, a nie występował po podaniu dożylnym.

Perlikowska R, Piekielna J, Fichna J, do-Rego JC, Toth G, Janecki T, Janecka A, Pharmacological properties of novel cyclic pentapeptides with μ -opioid receptor agonist activity, 2014, Med Chem, 10: 154-161.

Kontynuując nurt badań dotyczący poszukiwań analogów o potencjalnym działaniu przeciwbólowym zsyntezowałam i przebadalam kolejną serię związków cyklicznych o ogólnej strukturze:



gdzie Xaa oznaczało D-3-(1-naftylo)-alaninę (D-1-Nal) lub D-3-(2-naftylo)-alaninę, (D-2-Nal) [I.2.2]. Zaproponowane modyfikacje wynikają z tego, że wprowadzenie reszty D-aminokwasowej do jednej z pozycji w pierścieniu cyklicznym silnie determinuje określone konformacje szkieletu, ponieważ reszta heterochiralna ma tendencję do stabilizacji alternatywnych struktur drugorzędowych. Poza tym Nal zawiera bardziej rozbudowany aromatyczny układ pierścieniowy i w ten sposób wprowadza dodatkową zawadę steryczną.

Peptydy, cyklizowane poprzez łańcuchy boczne, zsyntetyzowałam na fazie stałej z zastosowaniem procedury Fmoc/*t*Bu (grupa *tert*-butylowa), jednocześnie wykorzystując hiperkwasowo-labilne grupy Mtt/O-2PhIPr do selektywnego blokowania odpowiednio, aminokwasów diaminowych i dikarboksylowych. Pierwszym etapem była synteza struktur liniowych na żywicy, kolejnym selektywne usunięcie za pomocą 1% roztworu TFA grup blokujących z aminokwasów diamino- i dikarboksylowych (odpowiednio D-Lys i Asp), a następnie zamknięcie pierścienia. Na koniec, peptydy zdejmowano z żywicy zgodnie z procedurą Fmoc (95% TFA).

Przesłanką do zaprojektowania powyższych cyklicznych pentapeptydów było otrzymanie związków o zwiększonej lipofilowości, zdolnych do przechodzenia przez barierę krew-mózg, jednocześnie aktywnych biologicznie po podaniu peryferyjnym.

Otrzymane analogi charakteryzowały się stabilnością metaboliczną. Po czasie inkubacji z homogenatem mózgu szczura wynoszącym 90 min, około 80-90% wyjściowej ilości związków nadal nie uległo degradacji enzymatycznej. Dodatkowo, przeprowadziłam badanie lipofilowości, polegające na określeniu powinowactwa związku chemicznego do fazy polarnej (woda) i niepolarniej (*n*-oktanol), na podstawie którego, dla analogów wyznaczyłam tzw. współczynniki podziału związku pomiędzy te dwie fazy (logP). Współczynnik podziału odzwierciedla bowiem stosunek stężeń związku w fazie oktanolowej i wodnej. Im wyższa wartość logP, tym bardziej

lipofilowy charakter ma badany związek. Mimo że aminokwasy D-1-Nal i D-2-Nal mają taką samą lipofilowość, to otrzymane analogi różniły się w niewielkim stopniu współczynnikiem podziału (odpowiednio $\log P = 2.25$ i 2.10). Różnice we właściwościach farmakologicznych tych związków musiały więc wynikać z innego ułożenia pierścienia aromatycznego względem całej cząsteczki peptydu.

W celu określania względnego powinowactwa zsyntezowanych związków do receptorów opioidowych wykorzystałam nie tylko wspomniane powyżej badanie receptorowe z użyciem preparatów błonowych, ale również test na izolowanych tkankach zwierzęcych, który w przypadku peptydów opioidowych przeprowadzany jest na wycinkach jelita cienkiego świnki morskiej (ang. guinea-pig ileum, GPI), w których występuje duża ilość receptorów μ i κ oraz na izolowanych nasieniowodach myszy (ang. mouse vas deferens, MVD), charakteryzujących się dużą ilością receptorów δ . Testy te umożliwiają ilościową ocenę siły działania związków, pozwalają na określenie ich względnego powinowactwa i selektywności, jak również na stwierdzenie, czy badany związek posiada właściwości agonistyczne czy antagonistyczne. Wyniki testów GPI/MVD potwierdziły rezultaty badań względnego powinowactwa otrzymanych peptydów do receptorów μ i δ w preparatach błonowych. Zsyntezowane analogi cykliczne wykazały wysokie powinowactwo do receptora μ -opiodowego, przy jednoczesnej utracie selektywności w przypadku analogu z D-2-Nal w pozycji trzeciej.

Syntetyzowane przeze mnie analogi były badane pod kątem ich właściwości przeciwbólowych, w teście gorącej płytki po podaniu icv. Niestety dla analogu Tyr-c(D-Lys-D-1-Nal-Phe-Asp)-NH₂ wzrost lipofilowości, spowodował utratę rozpuszczalności w wodzie, co ograniczyło jego aktywność w badaniach *in vivo*. Natomiast efekt przeciwbólowy dla drugiego peptydu, Tyr-c(D-Lys-D-2-Nal-Phe-Asp)-NH₂, był zależny od dawki, a jego czas trwania wynosił około 60 min. O udziale receptorów μ -opiodowych w przekazywaniu działania analgetycznego świadczył fakt hamowania efektu przeciwbólowego badanego pentapeptydu przez jednoczesne podanie antagonisty receptora μ -opiodowego, β -FNA.

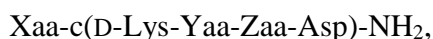
Jako że, receptory opioidowe są zlokalizowane nie tylko w centralnym układzie nerwowym, ale także w obrębie układu pokarmowego, dodatkowo zbadano wpływ peptydu Tyr-c(D-Lys-D-2-Nal-Phe-Asp)-NH₂ na ruchliwość perystaltyczną w teście pasażu żołądkowo-jelitowego (ang. whole gut transit, WGT). Zgodnie z procedurą, po podaniu badanego związku

myszom zaaplikowano (za pomocą sondy dożołądkowej) niewchłaniający się z przewodu pokarmowego barwnik. W teście mierzony był czas od momentu podania barwnika do pojawienia się zabarwionego stolca, odpowiadający przejściu barwnika przez układ pokarmowy. Peptyd Tyr-c(D-Lys-D-2-Nal-Phe-Asp)-NH₂ podany dootrzewnowo (ip) w dawce 1 mg/kg wykazywał hamujące działanie na pasaż żołądkowo-jelitowy, co wskazywało na jego przydatność jako ewentualnego terapeutyku w leczeniu klinicznym chorób układu pokarmowego.

Podsumowując, zaproponowana modyfikacja polegająca na wstawieniu aminokwasów D-1-Nal i D-2-Nal w pozycję 3, zgodnie z założeniami, przyczyniła się do wzrostu lipofilowego charakteru otrzymanych związków i poprawy ich zdolności do przechodzenia przez barierę krew-mózg, kosztem zmniejszenia rozpuszczalności w wodzie. Jednocześnie, peptyd Tyr-c(D-Lys-D-2-Nal-Phe-Asp)-NH₂ hamując ruchliwość perystaltyczną u myszy, wydaje się być przydatnym związkiem, który mógłby znaleźć zastosowanie w badaniach nad zaburzeniami motoryki przewodu pokarmowego.

Perlikowska R, Malfacini D, Cerlesi MC, Calo' G, Piekłna J, Floriot L, Henry T, do-Rego JC, Tömböly C, Kluczyk A, Janecka A, **Pharmacological characterization of endomorphin-2-based cyclic pentapeptides with methylated phenylalanine residues**, 2014, *Peptides*, 55: 145-150.

W ramach dalszej pracy naukowej zaproponowałam syntezę nowych cyklicznych analogów peptydów opioidowych o ogólnej strukturze:



gdzie Xaa oznaczało Tyr lub Dmt, Yaa i Zaa oznaczały Phe lub Phe podstawioną grupą metylową w pozycji 2, 3 lub 4 pierścienia aromatycznego, czyli odpowiednio 2'-, 3'- lub 4'-metylofenyloalaninę (2'-, 3'- lub 4'-MePhe) [I.2.3]. Aromatyczne aminokwasy występujące w sekwencji peptydów opioidowych są istotnymi elementami strukturalnymi wiążącymi i aktywującymi receptor. Fragmenty o budowie aromatycznej najczęściej są usytuowane w pobliżu hydrofobowych kieszeni należących do domen receptorowych i wykazują znaczne oddziaływania niekowalencyjne w ich obrębie. Stąd propozycja wprowadzenia dodatkowych podstawników, zwłaszcza grup metylowych, do pierścieni aromatycznych Tyr i Phe. Modyfikacja ta może wpływać na konformację ligandów opioidowych ze względu na zwiększoną sztywność łańcuchów bocznych.

Zaprojektowane analogi zsyntezowałam zgodnie z ww. procedurą, na żywicy MBHA Rink Amide metodą z zastosowaniem procedury Fmoc, grup blokujących Mtt/O-2PhiPr oraz TBTU jako odczynnika kondensującego. Dla wszystkich nowych peptydów cyklicznych wykonałam badania względnego powinowactwa do receptorów μ - i δ -opiodowych w preparatach błonowych, oraz badanie stopnia degradacji enzymatycznej. Uzyskane wyniki wykazały, że wprowadzenie metylowanej reszty Phe ogólnie zwiększało wiązanie do receptora δ . Wszystkie cyklopentapeptydy wykazywały wysokie powinowactwo do receptorów μ - opiodowych, przy czym analogi modyfikowane w pozycji czwartej charakteryzowały się wyższym powinowactwem do receptorów δ -opiodowych z jednoczesnym spadkiem selektywności. W tym przypadku, położenie grup metylowych w pierścieniu aromatycznym Phe również determinowało wiązanie z receptorem, a kolejność z jaką decydowało o powinowactwie była następująca: 4'-MePhe \geq 2'-MePhe \geq 3'-MePhe.

Ponadto dla wszystkich peptydów określona została aktywność w teście funkcjonalnym, polegającym na badaniu mobilizacji jonów wapniowych w liniach komórek chomiczych CHO (ang. chinese hamster ovary, CHO) transfekuowanych genami receptorów opiodowych i C-końcowego chimerycznego białka G. Metody tej nauczyłam się w czasie krótkiego stażu naukowego w Laboratorium Farmakologii Uniwersytetu w Ferrarze (Włochy) pod opieką prof. Girolamo Calo [II.12.8]. Przebadane w teście funkcjonalnym związki były silnymi μ/κ - i słabymi δ -agonistami. W badaniach *in vivo* analogi modyfikowane w pozycji czwartej wykazały silne działanie przeciwbólowe w teście gorącej płytki po podaniu icv, co wynikało z jednoczesnego aktywowania więcej niż jednego typu receptora opiodowego.

Badania nad powyżej scharakteryzowanymi seriami peptydów cyklicznych realizowane były w ramach grantu Iuventus Plus MNiSW [II.6.6], a wyniki prezentowałam podczas 32-go Europejskiego Sympozjum Peptydowego w Atenach (Grecja) we wrześniu 2012 roku [II.8.13], podczas Europejskiej Konferencji Opiodowej w Guildford (Wielka Brytania) w kwietniu 2013 roku [II.8.14], jak i podczas 22-go Polskiego Sympozjum Peptydowego w Kudowie Zdroju (Polska) we wrześniu 2013 roku [II.8.15].

Perlikowska R, Piekielna J, Gentilucci L, De Marco R, Cerlesi MC, Calo G, Artali R, Tömböly C, Kluczyk A, Janecka A, Synthesis of mixed MOR/KOR efficacy cyclic opioid peptide

analogs with antinociceptive activity after systemic administration, 2016, Eur J Med Chem, 15 : 276-286.

Dalsza ocena przydatności syntetycznych ligandów receptorów opioidowych o strukturze cyklicznej jako potencjalnych terapeutyków o działaniu przeciwbólowym kontynuowana była w pracy, w której wyjściowa struktura:



zmodyfikowana została w pozycji 3 i 4 poprzez wstawienie D-1-Nal lub D-2-Nal [I.2.4]. Zgodnie z oczekiwaniami cztery nowe analogii były odporne na degradację enzymatyczną. W badaniach receptorowych bardziej korzystną zmianą była modyfikacja w pozycji 4, bowiem otrzymane analogi charakteryzowały się wysokim powinowactwem do receptorów μ i κ , co potwierdzone zostało w teście funkcjonalnym przeprowadzonym na komórkach CHO, podczas gdy analogi z modyfikacjami w pozycji 3 okazały się być słabymi agonistami receptorów opioidowych. Badanie właściwości przeciwbólowych po podaniu icv było przeprowadzone dla wszystkich analogów, a najsilniejszy efekt obserwowany był w przypadku cyklopeptydów z D-1-Nal i D-2-Nal w pozycji 4, co korelowało z badaniami *in vitro*. Dodatkowo związki te wykazały zależną od dawki aktywność przeciwbólową po podaniu ip (ED_{50} odpowiednio 1.160 i 3.244 mg/kg). Dla wyselekcjonowanych analogów w dawce 3 mg/kg zbadano także zależność właściwości przeciwbólowych od czasu po podaniu ip. Najsilniejszą odpowiedź obserwowaliśmy po 15 min od iniekcji. Czas trwania efektu przeciwbólowego wynosił ponad 60 min. Analizy konformacyjne w roztworze i badania dokowania molekularnego potwierdziły, że pozycja jaką zajmuje grupa naftylowa jest istotnym czynnikiem strukturalnym odpowiedzialnym za różne profile farmakologiczne zsyntezowanych analogów.

Perlikowska R, Piekilna J, Mazur M, Koralewski R, Olczak J, do Rego JC, Fichna J, Modranka J, Janecki T, Janecka A, **Antinociceptive and antidepressant-like action of endomorphin-2 analogs with proline surrogates in position 2**, 2014, Bioorg Med Chem, 22: 4803-4809.

Inny aspekt mojej pracy, dotyczył charakterystyki profilu farmakologicznego liniowych analogów EM-2 zawierających w pozycji 2 zmodyfikowaną prolinę (4-fenylopirydynę, 4-Ph- β -Pro) [I.2.5]. Efektem wprowadzenia tego syntetycznego β -aminokwasu, łączącego sztywną

konformację pięciocłonowego pierścienia pirolidynowego proliny z obecnością niepolarnego pierścienia aromatycznego, było zwiększenie lipofilowości a zarazem polepszenie biodostępności otrzymanych analogów.

Analogi zsyntetyzowałam stosując handlowo dostępny racemiczny aminokwas 4-Ph- β -Pro. Otrzymaną mieszaninę dwóch diastereoizomerycznych peptydów rozdzieliłam metodą HPLC. W celu określenia konfiguracji absolutnej reszt 4-Ph- β -Pro w obu peptydach, przeprowadzono stereoselektywną syntezę aminokwasu (3*R*,4*S*)-4-fenylopirolidyno-3-karboksylowego, który następnie został wprowadzony do sekwencji EM-2 w pozycji 2. Konfiguracja absolutna reszt 4-Ph- β -Pro określona została na podstawie czasów retencji otrzymanych po analizie HPLC.

Oba enancjomerycznie czyste analogi przebadalam pod kątem powinowactwa i selektywności do receptorów μ -, δ -, κ -opiodowych oraz odporności na degradację proteolityczną w trakcie inkubacji z homogenatem mózgu szczura. Badania receptorowe potwierdziły znaczenie konfiguracji *R* reszty β -Pro, gwarantującej aktywność agonistyczną względem receptorów μ -opiodowych. Peptyd o sekwencji Tyr-(3*R*,4*S*)-4-Ph- β -Pro-Phe-Phe-NH₂ wykazywał równoważne EM-2 działanie, wiążąc się do receptorów μ -opiodowych, ponadto charakteryzował się wysokim powinowactwem do receptorów δ - i κ -opiodowych, podczas gdy drugi analog Tyr-(3*S*,4*R*)-4-Ph- β -Pro-Phe-Phe-NH₂ był prawie 3-krotnie mniej aktywny względem receptorów μ -opiodowych, jednocześnie nie działał przez receptory δ - i κ -opiodowe. Obecność β -aminokwasu miała korzystny wpływ na odporność analogów EM-2 na degradację pod wpływem enzymów znajdujących się w homogenacie mózgu szczura. Związki były około 6-krotnie bardziej stabilne niż macierzysta EM-2.

Badania *in vivo* określające działanie przeciwbólowe otrzymanych peptydów (test gorącej płytki), przeciwdepresyjne (FST i TST) i LMA zostały przeprowadzone przeze mnie na Uniwersytecie w Rouen we Francji pod kierunkiem dr Jean-Claude do Rego (Service Commun d'Analyse Comportementale (SCAC), Institut de Recherche et D'Innovation Biomedicale I.R.I.B., Faculte de Medicine et Pharmacie, Université de Rouen, France). Otrzymałam bowiem miesięczne stypendium Rządu Francuskiego "Séjour de recherche" umożliwiające przeprowadzenie niezbędnych badań potrzebnych do realizacji projektu oraz zapoznania się z technikami *in vivo* szeroko stosowanymi w poszukiwaniu nowych form leku [II.7.7].

W badaniach *in vivo* po podaniu icv, efekt przeciwbólowy najlepszego w tej serii analogu o sekwencji Tyr-(3*R*,4*S*)-4-Ph-β-Pro-Phe-Phe-NH₂ był zależny od dawki i lepszy niż dla EM-2. O udziale receptorów μ-opioidowych w przekazywaniu działania analgetycznego badanego peptydu świadczyło hamowanie efektu przez jednoczesne podanie antagonisty receptora μ-opioidowego, β-FNA.

Możliwe działanie przeciwdepresyjne analogów badano w dwóch zwierzęcych testach behawioralnych badających zachowania depresyjne: FST i TST, a także w LMA. W testach wymuszonego pływania i podwieszania za ogon u myszy dla analogu o sekwencji Tyr-(3*R*,4*S*)-4-Ph-β-Pro-Phe-Phe-NH₂ zaobserwowano zmniejszenie czasu nieruchomości, co dowodziło działania przeciwdepresyjnego analogu, przy czym efekt ten był antagonizowany przez receptory δ- i κ-opioidowe, bowiem podanie NLT i nor-BNI całkowicie zahamowało efekt przeciwdepresyjny analogu. Uzyskane wyniki były zgodne z badaniami receptorowymi, ponieważ najlepszy w tej serii analog przejawiał powinowactwo także do tych receptorów. Analog Tyr-(3*R*,4*S*)-4-Ph-β-Pro-Phe-Phe-NH₂ nie wykazywał wpływu na aktywność motoryczną myszy, co jest zgodne z innymi badaniami wykazującymi, że klasyczne leki przeciwdepresyjne nie wpływają albo tylko nieznacznie zmniejszają aktywność lokomotoryczną.

Wiele badań potwierdza związek układu opioidowego zarówno z działaniem przeciwbólowym, jak i działaniem determinującym nastrój, wobec tego otrzymane wyniki wydają się być obiecujące, bowiem analog Tyr-(3*R*, 4*S*)-4-Ph-β-Pro-Phe-Phe-NH₂ o podwójnym działaniu, przeciwbólowym i przeciwdepresyjnym, może być uważany za interesujący związek wyjściowy do poszukiwania nowych rozwiązań.

Otrzymane rezultaty potwierdziły ponadto istotną rolę reszty aminokwasowej w pozycji 2 endomorfina, która jest odpowiedzialna za właściwą orientację przestrzenną pierścieni aromatycznych Tyr¹ i Trp³/Phe³, umożliwiającą tworzenie kompleksu ligand-receptor.

Perlikowska R, Janecka A, Bioavailability of endomorphins and the blood-brain barrier--a review. 2014, Med Chem ; 10: 2-17.

W ramach mojej działalności naukowej poszukiwałam nowych peptydów będących ligandami receptorów opioidowych, które wykazywałyby potencjalne działanie przeciwbólowe i przeciwdepresyjne, a jednocześnie nie ulegałyby trawieniu enzymami proteolitycznymi i

przechodziły przez barierę krew-mózg. Przede wszystkim celem było otrzymanie analogu, który zdołał by pokonać barierę krew-mózg, bowiem jej precyzyjna wybiórczość powoduje, że większość potencjalnych terapeutyków nie jest w stanie dotrzeć do mózgu. Jak wiadomo, przez barierę krew-mózg przechodzą łatwiej cząsteczki nienaładowane, lipofilowe i o małych rozmiarach. Pomocnym narzędziem w poszukiwaniu nowych analogów zdolnych do przechodzenia przez błony biologiczne, było przygotowanie pracy przeglądowej, charakteryzującej endomorfiny jak i ich analogi, pod kątem zdolności do przechodzenia przez barierę krew-mózg, jednocześnie analizującej dotychczas poznane metody określania lipofilowości czy też biodostępności związków (badania *in vitro* i *in vivo*) [I.2.6]. W pracy tej scharakteryzowałam budowę i funkcje bariery krew-mózg, jako fizycznej i enzymatycznej granicy pomiędzy naczyniami krwionośnymi a tkanką nerwową, umożliwiającej selektywny transport związków krążących we krwi do płynu mózgowo-rdzeniowego. Ponadto dokonałam zestawienia piśmiennictwa pod względem strategii wykorzystywanych w modyfikacji struktury endomorfyn, takich jak zwiększenie lipofilowości (usunięcie grup hydroksylowych, dołączenie grup hydrofobowych, metylacja, halogenowanie, modyfikacje w obrębie N- i C-końca), kationizacja (dołączenie reszty guanidyny, amidowanie N-końca), glikozylowanie, cyklizacja, wykorzystanie systemów ułatwiających transport błonowy (peptydy penetrujące komórkę, ang. cel penetrating peptides, CPCs; liposomy, systemy wektorowe takie jak nanocząsteczki). Zastosowanie odpowiednich zmian w budowie cząsteczki pozwala na modyfikowanie właściwości fizykochemicznych endomorfyn oraz polepszenie ich zdolności do przenikania przez błony biologiczne. W celu zrozumienia zależności pomiędzy strukturą endomorfyn a ich biodostępnością, w moich badaniach wielokrotnie wykorzystywałam poznane metody modyfikacji wyjściowej sekwencji.

4.3.3. Podsumowanie

Poszukiwanie związków znajdujących zastosowanie w terapii bólu jest ważną dziedziną współczesnej nauki. Od wieków największe zastosowanie w uśmierzaniu silnego, ostrego i przewlekłego bólu znajduje morfina, który działa przez receptory opioidowe: μ , δ , κ , zlokalizowane przede wszystkim w ośrodkowym układzie nerwowym, ale również w tkankach

obwodowych, głównie w przewodzie pokarmowym, sercu czy nerkach. Morfina wiąże się do wszystkich trzech typów receptorów opioidowych lecz jej powinowactwo do receptorów μ jest około stu-krotnie większe niż do receptorów δ i κ . Niestety stosowanie morfiny, zwłaszcza przewlekłe, powoduje silne efekty uboczne. Do najgroźniejszych zaliczyć można uzależnienie, depresję oddechową, uporczywe zaparcia, obniżenie ciśnienia krwi. Odkrycie w 1997 roku przez Zadinę i wsp⁵. dwóch tetrapeptydów: EM-1 i EM-2, które wykazywały niezwykle wysokie powinowactwo i selektywność do receptora μ -opiodowego, dało nadzieję na znalezienie bezpieczniejszego niż morfina środka zwalczającego silny ból. Aczkolwiek endomorfiny, jak większość peptydów, nie są dobrymi kandydatami na leki. Podawane egzogennie są nieaktywne, gdyż bardzo łatwo ulegają degradacji pod wpływem enzymów proteolitycznych i nie przechodzą przez barierę krew-mózg. Projektowanie i synteza analogów endomorfyn o lepszym profilu farmakokinetycznym, które znalazłyby zastosowanie jako nowe leki przeciwbólowe i przeciwdepresyjne jest wyzwaniem dla chemików i farmakologów.

Wybrany cykl prac stanowiący osiągnięcie naukowe, dotyczy badania roli peptydów opioidowych w organizmie i różnorodnych możliwości ich wykorzystania dla celów terapeutycznych. W ramach powyższej tematyki zajmowałam się zarówno badaniem zależności aktywności biologicznej zmodyfikowanych związków od ich struktury, projektowaniem i syntezą nowych analogów peptydów opioidowych o budowie liniowej i cyklicznej, jak i badaniem ich właściwości biologicznych.

Wśród możliwych strategii zwiększających aktywność biologiczną poprzez ograniczenie degradacji enzymatycznej czy zwiększenie zdolności do przechodzenia przez błony biologiczne jest wstawianie aminokwasów o konfiguracji D lub aminokwasów nienaturalnych, o niepolarnych łańcuchach bocznych, ewentualnie wprowadzanie wiązań pseudopeptydowych, bądź cyklizacja liniowych sekwencji.

Do niedawna panował pogląd, że peptydy nie są dobrymi kandydatami na leki, choćby ze względu na ich koszty syntezy, ale i ograniczenia w zastosowaniu wynikające z niskiej biodostępności. Obecnie ten pogląd ulega zmianie, a we współczesnym leczeniu pojawia się coraz więcej leków o budowie peptydowej. Można tu wymienić analog somatostatyny, oktreotydu,

⁵ Zadina JE, Hackler L, Hackler L, Ge LJ, Kastin AJ. A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor, 1997, Nature; 386: 499-501.

stosowany do wykrywania i leczenia pewnych typów nowotworów, a także cyklosporynę, naturalny peptyd cykliczny, o immunosupresyjnych właściwościach. Ogólnie peptydy o budowie cyklicznej charakteryzują się bardzo dużą trwałością, co otwiera perspektywę ich stosowania jako leków. W związku z tym, w celu wyselekcjonowania związków będących potencjalnymi lekami w terapii bólu, opracowałam skuteczną metodę syntezy cyklicznych analogów o budowie peptydowej. Szereg otrzymanych przeze mnie cyklicznych pentapeptydów charakteryzowało się wysokim powinowactwem do receptorów opioidowych i wykazywało silne właściwości przeciwbólowe po podaniu bezpośrednio do komórek mózgowych jak i obwodowo.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Pracę naukową rozpoczęłam w 2006 roku w zespole prof. Anny Janeckiej w Zakładzie Chemii Biomolekularnej na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Celem pracy doktorskiej zatytułowanej: „Synteza i badanie właściwości farmakologicznych nowych analogów endomorfina o zwiększonej odporności na działanie proteaz”, obronionej z wyróżnieniem w czerwcu 2010 roku, było poszukiwanie syntetycznych analogów endomorfina o silnych właściwościach przeciwbólowych, które byłyby jednocześnie odporne na działanie enzymów proteolitycznych, a tym samym aktywne przy podaniu dożylnym lub doustnym [II.2.3]. Projekt dotyczył zagadnień stymulacji naturalnych systemów hamowania przewodnictwa bólu i sposobów jego uśmierzania. Sekwencję endomorfina modyfikowałam przez wprowadzanie aminokwasów nienaturalnych, D-aminokwasów oraz przez cyklizację wyjściowej struktury. Dla wszystkich nowych analogów przeprowadzałam badania powinowactwa do receptorów μ - i δ - opioidowych. Aktywność analogów badałam także w teście funkcjonalnym *in vitro*, polegającym na pomiarze bioluminescencji wywołanej uwalnianiem jonów Ca^{2+} z rekombinowanych linii komórek chemicznych, CHO-MOR-Ekw lub CHO-DOR-Ekw, transfekowanych DNA białka apoekworyny (Ekw) i receptora opioidowego μ lub δ [II.1.1-II.1.3]. Metody tej nauczyłam się w czasie 4-miesięcznego stażu naukowego w Laboratorium Fizjologii Rozwoju, Genomiki i Proteomiki na Katolickim Uniwersytecie w Leuven (Belgia) pod kierunkiem prof. Josef Vanden Broecka [II.6.1, II.12.2].

W celu ustalenia, jakie modyfikacje chemiczne prowadzą do otrzymania związków najbardziej odpornych na działanie proteaz opracowałam metodę badania szybkości degradacji analogów wybranymi enzymami lub homogenatem mózgu szczura przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Wybrane najlepsze analogi były następnie badane *in vivo* pod kątem ich działania przeciwbólowego we współpracującym z naszym zespołem Laboratorium Neuropsychofarmakologii Eksperymentalnej (Rouen, Francja). Miałam okazję uczestniczyć w tych badaniach podczas kilku wyjazdów szkoleniowych w ramach dwustronnej naukowej współpracy pomiędzy Francją i Polską "Polonium" finansowanej ze źródeł MNiSW [II.6.2], oraz dzięki stypendium Erasmus [II.12.3, II.12.5-II.12.6].

W pracy doktorskiej wykazałam, że takie same modyfikacje struktury, prowadzą zazwyczaj do otrzymania bardziej aktywnych analogów EM-2 niż EM-1 [II.1.3.]. Spośród otrzymanych przeze mnie nowych związków zawierających nienaturalne aminokwasy na szczególną uwagę zasługują analogi EM-2, w których zamiast 5-członowego pierścienia proliny w pozycji 2 znajduje się 6-członowy pierścień kwasu piperydino-3-karboksyłowego (Nip), czyli Tyr-(*R*)Nip-Phe-Phe-NH₂ i Dmt-(*R*)Nip-Phe-Phe-NH₂ [II.1.4, II.1.5 i II.2.1]. Analogi z taką modyfikacją wyróżniały się wyjątkowo dużym powinowactwem do receptora μ -opiodowego, były odporne na trawienie i wywoływały silniejszy i dłużej trwający efekt przeciwbólowy niż endomorfiny po podaniu *icv*. Niestety analogi te były nieaktywne przy podaniu dożylnym, co wskazywało, że nie przechodzą przez barierę krew-mózg.

W poszukiwaniu analogów, które wykazywałyby właściwości przeciwbólwe po podaniu obwodowym zaprojektowałam serię cyklicznych analogów endomorfyn. Jak wiadomo przez barierę krew-mózg łatwiej przechodzą związki o większej lipofilowości. Cyklizacja powoduje zazwyczaj wzrost lipofilowości peptydu. Ponadto, jest to metoda otrzymania związków o lepszej bioaktywności i biodostępności. W badaniach nad peptydami opiodowymi, cyklizacja liniowych sekwencji stosowana jest w celu zmniejszenia swobody konformacyjnej cząsteczek, zapobiegając tym samym ich adaptacji do różnych typów receptorów opiodowych. Spośród otrzymanych przeze mnie cyklicznych analogów endomorfyn kilka charakteryzowało się dużym powinowactwem do receptora μ -opiodowego i wykazywało silny i długotrwały efekt przeciwbólowy po podaniu do komór mózgu. Jeden z tych analogów, o sekwencji Tyr-c(D-Lys-Phe-Phe-Asp)-NH₂ wykazywał słaby efekt przeciwbólowy również po podaniu dożylnym, co

pokazało, że cykliczne analogi endomorfina mogą stać się związkami wyjściowymi w dalszych poszukiwaniach środków przeciwbólowych o strukturze peptydowej [II.1.6].

W prowadzonych badaniach poruszałam kwestie syntezy i badania właściwości biologicznych peptydów opioidowych oraz zależności pomiędzy strukturą tych związków a ich aktywnością, a dotychczasowy stan wiedzy zebrałam w czterech pracach przeglądowych [II.1.7-II.1.9 i II.2.2]. Wyżej wymienione badania realizowałam w ramach grantu promotorskiego finansowanego ze źródeł MNiSW [II.6.3] oraz projektu „Stypendia wspierające innowacyjne badania naukowe doktorantów” finansowanego ze źródeł Europejski Fundusz Społeczny i Budżet Państwa [II.6.5]. W tym okresie, zostałam także laureatką stypendium naukowego Fundacji na Rzecz Wspierania Rozwoju Polskiej Farmacji i Medycyny ufundowanego przez Polpharmę [II.7.2].

Dodatkowo, w ramach mojej pracy naukowej uczestniczyłam w badaniach prowadzonych przez prof. Jakuba Fichnę nad ustaleniem miejsc wiążących dla endomorfina na receptorze μ -opioidowym przy zastosowaniu antysensownych oligonukleotydów [II.1.10], jak również w badaniach peptydów opioidowych o własnościach antagonistycznych wobec receptora μ -opioidowego, nazwanych antanal-1 (Dmt-Pro-Trp-D-2-Nal-NH₂) i antanal-2 (Dmt-Pro-Phe-D-2-Nal-NH₂) i ich użycia jako potencjalnych terapeutyków w leczeniu chorób układu pokarmowego [II.1.11]. Antanale znacząco zmniejszały hamujący wpływ EM-2, morfiny i loperamidu w testach *in vitro* określających wpływ związku na motorykę jelit (wpływ na kurczliwość mięśniówki gładkiej indukowanej chemicznie i elektrycznie) oraz w warunkach *in vivo* antagonizowały zahamowany podaniem morfiny czas wydalania koralika z jelita grubego oraz częstości wypróżniania. Badanie własności przeciwbólowych w teście gorącej płytki nie wykazało antagonistycznej aktywności antanali po podaniu obwodowym. Peptydy te mogą mieć również zastosowanie w minimalizowaniu efektów ubocznych, takich jak drgawki czy napady padaczkowe, co zostało szerzej omówione w pracy Fichna i wsp. [II.1.12]. Jak wiadomo, pobudzenie receptorów μ -opioidowych niesie za sobą również efekty uboczne, w postaci np.: konwulsji, co potwierdziły badania nad morfiną i fentanylem. Natomiast podanie związków o własnościach antagonistycznych może wyciszyć ten efekt. Wydaje się, że antanal-1 i antanal-2 mogłyby stanowić alternatywę dla tradycyjnych metod leczenia epilepsji z użyciem opioidów,

bowiem wykazały one silne i zależne od dawki działanie przeciwdrgawkowe, w którym pośredniczyły mechanizmy inne niż te angażujące receptory GABA-ergiczne.

We wrześniu 2011 roku, po rocznej przerwie (urodzenie dziecka i opieka) wróciłam do Zakładu Chemii Biomolekularnej UM w Łodzi gdzie jako adiunkt otrzymałam szansę dalszej współpracy z zespołem Pani prof. Anny Janeckiej. Zachęcona rezultatami badań nad cyklicznymi analogami endomorfyn [II.1.6] podjęłam dalsze prace nad scharakteryzowaniem pod kątem aktywności farmakologicznej nowe cykliczne ligandy receptorów opioidowych. Tematyka ta była realizowana m.in. w ramach grantu Iuventus Plus MNiSW [II.6.6], a efektem jest cykl prac przedstawiony jako osiągnięcie naukowe [I.2.1-I.2.6].

Z uwagi na to, że dalszym celem była ocena przydatności nowych syntetycznych ligandów jako potencjalnych terapeutyków o działaniu przeciwbólowym i przeciwdepresyjnym, w czerwcu 2012 zostałam powołana na promotora pomocniczego przewodu doktorskiego mgr farm. Justyny Piekielej zatytułowanego: „Synteza cyklicznych analogów endomorfiny-2 o potencjalnym działaniu przeciwbólowym”, którego promotorem jest prof. Anna Janecka., W tym czasie uczestniczyłam w przygotowaniu pracy przeglądowej autorstwa Piekielej i wsp. [II.1.13], reasumującej dotychczasowy stan wiedzy z zakresu metod cyklizacji związków o charakterze peptydowym.

Kontynuując badania nad cyklicznymi ligandami receptorów opioidowych uczestniczyłam w badaniach nad serią związków, którymi były dwie pary analogów, o ogólnej strukturze: $Xaa-c(Yaa-Phe-Phe-Zaa)NH_2$, gdzie cyklopeptydy w każdej z par różniły się tylko w pozycji 1 ($Xaa = Tyr$ lub Dmt), natomiast $Yaa = D-Lys$ lub $D-Cys$, a $Zaa = Asp$ lub Cys [II.1.14]. W pierwszej parze boczne łańcuchy reszt $D-Lys$ i Asp odpowiednio w pozycji 2 i 5 połączono wiązaniem amidowym analogicznie do opisanych wcześniej peptydów, a cyklizację przeprowadzono na żywicy. Analiza LC-MS/MS surowej mieszaniny poreakcyjnej pierwszego analogu o sekwencji $Tyr-c(D-Lys-Phe-Phe-Asp)NH_2$ wykazała obecność dwóch głównych pików, z których pierwszy odpowiadał oczekiwanemu cyklicznemu pentapeptydowi $[M + H]^+$, natomiast drugi stanowił cyklodimer $[M_2 + 2H]^{2+}$.

Drugą parę w tej serii stanowiły dwa związki zawierające mostek disiarczkowy o ogólnym wzorze: $Tyr/Dmt-c(D-Cys-Phe-Phe-Cys)NH_2$. Synteza liniowych struktur przeprowadzona została na żywicy MBHA Rink Amide z zastosowaniem procedury Fmoc, przy czym cyklizacja

odbyła się w dwojaki sposób- na żywicy lub w roztworze. W wyniku cyklizacji peptydów w roztworze powstał wyłącznie oczekiwany cykliczny pentapeptyd, natomiast efektem cyklizacji przeprowadzonej na żywicy było otrzymanie oprócz cyklicznego związku także dwóch cyklodimerów o orientacji głowa-ogon i głowa-głowa. Trawienie tych dimerów chymotrypsyną pozwoliło w sposób jednoznaczny ustalić ich strukturę. Na podstawie otrzymanych rezultatów, dokonano ilościowego badania produktów reakcji cyklizacji w celu określenia stosunku cyklomonomer/cyklodimer w zależności od wielkości pierścienia, użytej do syntezy żywicy i rodzaju wiązania powstającego w czasie zamykania pierścienia. Okazało się, że wprowadzenie egzocyklicznej reszty Dmt zamiast Tyr w pozycji 1 zwiększało stosunek monomeru do cyklodimeru. Można przypuszczać, że wynikało to z obecności dodatkowych grup metylowych w pierścieniu Dmt, zwiększających zawadę przestrzenną i utrudniających dimeryzację.

W drugiej serii analogów otrzymano sekwencje o ogólnym wzorze: Xaa-c(Yaa-Phe-Phe-Asp)NH₂, gdzie Xaa oznaczało Tyr lub Dmt, natomiast Yaa to *cis*- lub *trans*-aminocykloheksylo-D-alanina (D-ACA_{1a}) [II.1.15]. Liniowe struktury syntezowane były na żywicy, natomiast cyklizacja przeprowadzona była w roztworze z użyciem odczynnika kondensującego HATU. Analogicznie do peptydów zawierających mostki disiarczkowe i w tym przypadku nie zaobserwowano tworzenia cyklodimerów, wobec czego wnioskować można, że powstanie cyklodimerów jest możliwe tylko podczas cyklizacji prowadzonej na żywicy.

Otrzymane cyklopeptydy badane były pod kątem ich powinowactwa i selektywności do receptorów opioidowych. Reszta Dmt w pozycji 1 przyczyniła się do wzrostu powinowactwa otrzymanych analogów w porównaniu z resztą Tyr. Cyklopeptyd o strukturze Dmt-c(*cis*-D-ACA_{1a}-Phe-Phe-Asp)NH₂ wykazywał duże powinowactwo i selektywność względem receptorów μ -opiodowych, podczas gdy analog zawierający *trans*-D-ACA_{1a} wykazywał wysokie powinowactwo do receptorów μ i δ , a umiarkowane do κ .

Analiza konformacyjna i dokowanie do receptorów μ i κ wykazały, że cyklopeptyd o strukturze Dmt-c(*cis*-D-ACA_{1a}-Phe-Phe-Asp)NH₂ może przyjmować konformację przestrzenną umożliwiającą wiązanie jedynie z receptorem μ . Peptyd zawierający izomer *trans* jest w stanie wiązać się z receptorem μ i δ , aczkolwiek energia z jaką wiąże się do miejsc aktywnych obu tych receptorów znacznie się różni.

W ostatniej serii, zaprojektowane zostały analogi cykliczne o wzorze: Xaa-c(D-Lys-Yaa-Zaa-Asp)NH₂, gdzie Xaa oznaczało Tyr lub Dmt, natomiast Yaa i Zaa to fluorowane pochodne Phe: 4-fluorofenyloalanina (4-F-Phe), 2,4-difluorofenyloalanina (2,4-F-Phe) lub 4-trifluorometylofenyloalanina (4-CF₃-Phe) [II.1.16]. Fluorowane pochodne charakteryzują się występowaniem wysoce spolaryzowanego wiązania C-F, które odpowiada za lepiej dopasowaną do miejsca wiążącego na receptorze konformację cząsteczki. Ponadto fluorowane pochodne mają charakter lipofilowy, a także są dużo bardziej odporne na degradację enzymatyczną, co może mieć korzystny wpływ na biodostępność takich związków.

Zgodnie z założeniami cykliczne związki modyfikowane dodatkowo poprzez wprowadzenie atomów fluoru charakteryzowały się dużą odpornością na degradację pod wpływem enzymów znajdujących się w homogenacie mózgu szczura. Ponadto, badania powinowactwa i selektywności względem receptorów opioidowych μ , δ i κ oraz ich aktywności i intensywności wiązania z tymi receptorami w teście funkcjonalnym badającym mobilizację Ca²⁺ w komórkach CHO wykazały, że prawie wszystkie analogi wiązały się do więcej niż jednego typu receptora, były albo mieszanymi agonistami receptorów typu μ/κ lub $\mu/\delta/\kappa$, albo selektywnymi agonistami receptora κ . Na podstawie badań *in vitro* wyselekcjonowano dwa najbardziej aktywne analogi, Dmt-c(D-Lys-Phe-4-F-Phe-Asp)NH₂ i Dmt-c(D-Lys-Phe-2,4-F-Phe-Asp)NH₂, które miały subnanomolowe powinowactwo do receptorów μ i κ oraz znacznie słabsze do δ . Związki te przebadano *in vivo* w teście gorącej płytki. Po podaniu icv, oba cyklopeptydy wywierały efekt przeciwbólowy znacznie silniejszy niż EM-2, ponadto działały przeciwbólowo również po podaniu ip, co świadczy o tym, że były zdolne przejść przez barierę krew-mózg. Mimo, że oba analogi wykazywały duże powinowactwo do receptorów μ i κ tylko β -FNA hamowała przeciwbólowe działanie tych analogów, potwierdzając fakt, że efekt przeciwbólowy opioidów jest związany głównie z aktywacją receptora μ -opiodowego.

Jak wspomniano powyżej, endomorfiny są szybko degradowane przez peptydazy, zwłaszcza przez DPP IV i APM, aczkolwiek stopień degradacji może być znacząco hamowany poprzez zastosowanie inhibitorów proteaz. W odniesieniu do badań z początku lat 90-tych, pokazujących, że podanie specyficznych inhibitorów enzymów proteolitycznych powoduje wzrost poziomu endogennych peptydów opioidowych i zwiększenie ich aktywności biologicznej, podjęłam się również badań nad takimi związkami. Inhibitory enzymów degradujących

endomorfiny mogłyby stanowić alternatywę dla tradycyjnych metod leczenia bólu z użyciem opioidów. Podjęłam się zatem badań nad otrzymanymi wcześniej w zespole prof. A. Janeckiej peptydami o budowie podobnej do endomorfina: Tyr-Pro-DCIPhe-Phe-NH₂ (EMDB-1), Tyr-Pro-Ala-NH₂ (EMDB-2) i Tyr-Pro-Ala-OH (EMDB-3), które w testach z udziałem homogenatu mózgu szczura i handlowo dostępnych enzymów (DPP IV, APM) hamowały degradację enzymatyczną endomorfina [II.1.17- II.1.19]. Moim celem było ustalenie, dla jakich enzymów peptydy te są inhibitorami i jaki typ inhibicji reprezentują. Otrzymane wyniki wskazały, że badane związki są słabymi inhibitorami DPP IV i dużo lepszymi inhibitorami APM, oraz że działają w sposób kompetycyjny, blokując miejsce aktywne enzymu. Czasy potrzebne do degradacji endomorfina przez enzymy proteolityczne były bowiem 2-3-krotnie dłuższe w stosunku do czasów otrzymanych w eksperymencie wykonanym bez inhibitorów [II.1.18]. Dodatkowo, dla otrzymanych inhibitorów określono wpływ na motorykę jelit w teście *in vitro* badającym wpływu związków na indukowaną kurczliwość mięśniówki gładkiej jelit szczurzych (ang. organ bath) [II.1.17]. Hamujące perystaltykę jelit działanie EM-2 dzięki obecności EMDB-1 lub -2 zostało wydłużone. Otrzymane związki były efektywniejsze niż handlowo dostępne inhibitory proteaz, diprotina A (inhibitor DPP IV) i aktinonina (inhibitor APM), potencjalnie aktywne jako terapeutyki stosowane w leczeniu chorób układu pokarmowego, zwłaszcza biegunek. Dodatkowo w badaniach *in vivo*, jednoczesne podanie icv wyselekcjonowanych inhibitorów: EMDB-1 lub EMDB-2 z EM-1 lub -2 spowodowało wydłużenie czasu działania przeciwbólowego w teście gorącej płytki [II.1.19]. W teście wymuszonego pływania u myszy określającym stopień działania przeciwdepresyjnego, również zaobserwowano polepszenie profilu farmakologicznego endomorfina, co wynikało najprawdopodobniej z hamowania działania inhibitorów na degradację enzymatyczną. Jednocześnie EMDB-1 lub EMDB-2 nie wykazywały wpływu na reakcję behawioralną w modelu badającym aktywność lokomotoryczną.

Z uwagi na to, że głównym celem mojej pracy było poszukiwanie ligandów receptorów μ -opiodowych o silnych właściwościach przeciwbólowych/przeciwdepresyjnych, które działałyby po podaniu obwodowym, skoncentrowałam się na zastosowaniu modyfikacji chemicznych umożliwiających przechodzenie przez barierę krew-mózg. Przygotowanie pracy przeglądowej na temat analogów endomorfina zdolnych do przechodzenia przez barierę krew-mózg, pozwolił na zapoznanie się z szeroko stosowanymi strategiami ułatwiającymi przechodzenie przez błony

biologiczne [I.2.6]. Jedną z takich metod została wykorzystana w pracy pod kierunkiem prof. J. Fichny [II.1.20]. Zaproponowana modyfikacja EM-2 polegała na wprowadzeniu w pozycji 3 liniowej struktury zmodyfikowanej Phe, posiadającej resztę glukozową (acetylowaną i nie acetylowaną) związaną z pierścieniem aromatycznym wiązaniem β -glikozydowym. Glikozylowane analogi zostały scharakteryzowane w badaniach *in vitro* (badania receptorowe i GPI) i *in vivo* (test gorącej płytki na myszach, podanie iv). Analog zawierający acetylowaną resztę cukrową nie wiązał się do receptorów μ -opiodowych i nie wykazywał aktywności w teście GPI, podczas gdy drugi peptyd z nie acetylowaną resztą był aktywny w badaniach receptorowych, choć posiadał niższe powinowactwo i aktywność w GPI niż EM-2. Najlepszy analog w tej serii w dawce 3 mg/kg po podaniu iv wywołał efekt przeciwbólowy, który nie był hamowany przez jednoczesne podanie antagonisty receptorów opiodowych, metjodku naloksonu w dawce 1 mg/kg, ip, co świadczyło o centralnym działaniu analogu i jego zdolności do przechodzenia przez barierę krew-mózg. Strategia polegająca na glikozylacji pierścienia aromatycznego w sekwencji EM-2 okazała się efektywnym rozwiązaniem poprawiającym aktywność przeciwbólową w ośrodkowym układzie nerwowym, na co wpływ miała większa stabilność wobec proteolizy otrzymanego analogu, a także wzrost przepuszczalności przez barierę krew-mózg.

Nowym kierunkiem pracy naukowej jaki podjęłam w 2017 roku jest badanie własności rubiskolin. Wstępem było przygotowanie pracy przeglądowej dotyczącej rubiskoliny-5 (Tyr-Pro-Leu-Asp-Leu-OH) i rubiskoliny-6 (Tyr-Pro-Leu-Asp-Leu-Phe-OH) [II.1.21]. Rubiscoliny, wyizolowane z liści szpinaku w wyniku degradacji enzymatycznej białka RuBisCo, działają poprzez receptory opiodowe. Jako δ -selektywne peptydy opiodowe po podaniu centralnym wywierają aktywność przeciwbólową, przeciwłkową i stymulującą pamięć. Ponadto, rubiscoliny stymulują spożywanie pokarmów (normalna dieta) lub hamują ten proces (dieta wysokotłuszczowa), w co zaangażowane są różne mechanizmy. Podczas gdy inne peptydy opiodowe są łatwo rozkładane przez enzymy proteolityczne, rubiscoliny wydają się być odporne na degradację enzymatyczną. Wykazano, że rubiskolina-6 jest wchłaniana z przewodu pokarmowego i przechodzi przez barierę krew-mózg, aktywując centralne receptory opiodowe, a także wpływa na endogenne układy opiodowe w centralnym układzie nerwowym poprzez sygnały z obwodowego układu nerwowego. Fakt, że rubiscoliny są aktywne nawet po podaniu

doustnym, zwiększa ich potencjalne znaczenie w przemyśle farmaceutycznym. Biorąc pod uwagę dotychczasowe wyniki badań, zaproponowałam rubiskoliny jak i ich analogi jako potencjalne terapeutyki w leczeniu depresji. Zaburzenia depresyjne i lękowe należą do najczęstszych zaburzeń zdrowia psychicznego na całym świecie, których częstość występowania w ciągu życia wynosi odpowiednio 16% i 10%. Uważa się również, że mają wspólny szlak genetyczny i uwarunkowania środowiskowe, a często pojawiają się jednocześnie, utrudniając ocenę ich niezależnych efektów. Głównym celem proponowanego projektu jest charakterystyka profilu farmakologicznego rubiskolin w testach depresyjnych zachowań gryzoni : FST i TST. Badania te pozwalają sprawdzić odporność gryzoni na depresję poprzez pomiar czasu bezruchu, interpretowanego jako zachowanie depresyjne.

Podsumowanie dorobku naukowego

Po obronie rozprawy doktorskiej jestem współautorem **16** artykułów w czasopismach naukowych z tzw. „listy filadelfijskiej”, **1** artykułu spoza listy, **7** referatów konferencyjnych (przedstawionych w załączonym wykazie dorobku naukowo-badawczego). Wyniki badań zostały również zaprezentowane przeze mnie lub innych współautorów na wielu zagranicznych i krajowych konferencjach naukowych. Sumaryczny współczynnik impact factor (z roku publikacji) tych publikacji wynosi **45.91**. W całym moim dorobku publikacyjnym (30 artykułów) wskaźnik ten wynosi: **78.904** (z roku publikacji). Ogólna liczba cytowań artykułów z moim udziałem (listopad 2017) wynosi **332** (wg bazy ISI Web of Science) ; **340** (wg Scopus) ; w tym odpowiednio **267 (277)** przy pominięciu samocytowań. Mój indeks Hirscha wynosi **9** (Web of Science) ; **9** (Scopus).

Poza wyżej wymienionym dorobkiem, wymiernym efektem moich badań, jest otrzymanie przeze mnie wielu stypendiów krajowych i zagranicznych oraz nagród. Pełne ich zestawienie zamieszczone zostało w punkcie II.7. załączonego wykazu dorobku naukowo-badawczego (Załącznik 3).

Dotychczas byłam wykonawcą 2 międzynarodowych grantów dwustronnych (Bilateral Scientific Agreement between France and Poland “Polonium”, Bilateral Scientific Agreement between Belgium and Poland), grantu promotorskiego, a także kierownikiem grantu dla młodych

Załącznik 2

naukowców MNiSW „Juventus Plus”. Pełne zestawienie tytułów i numerów projektów zamieszczone zostało w punkcie II.6. załączonego wykazu dorobku naukowo-badawczego (Załącznik 3).

Oprócz pracy naukowej, wykonuję również pracę dydaktyczną, prowadziłam lub prowadzę wykłady, ćwiczenia audytoryjne i laboratoryjne z przedmiotów : Biochemia, Chemia ogólna, Chemia organiczna z elementami biochemii statycznej, Fakultet : Przełomowe odkrycia w historii rozwoju leków, Chemia Medyczna w języku angielskim. Uczestniczyłam w opiece naukowej nad stażystami i doktorantami Zakładu Chemii Biomolekularnej, m.in. byłam promotorem pomocniczym w przewodzie doktorskim mgr farm. Justyny Piekielnej (promotor prof. A. Janecka).

Perlikowska Kewit

Uwaga :

W nawiasach kwadratowych znajdują się numery prac z załączonego zestawienia dorobku naukowego (Załącznik 3).