



UNIwersytet JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

AUTOREFERAT

przedstawiający opis dorobku oraz osiągnięć naukowych

Monika Marcinkowska

Zakład Chemii Leków

Katedra Chemii Farmaceutycznej

Wydział farmaceutyczny

Kraków 2023

Spis treści

1. Imię i nazwisko	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....	3
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.....	3
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.)	4
4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego	4
4.2 Wykaz cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych wchodzących w skład	4
4.3. Szczegółowe omówienie celu naukowego i wyników opisanych w cyklu publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego	6
4.3.1. Wprowadzenie.....	6
4.3.2. Cel badań.....	7
4.3.3. Nowy kierunek poszukiwania efektywnej farmakoterapii schizofrenii oparty na modulacji funkcji receptora GABA-A (praca H1 i H2).....	8
4.3.4. Opracowanie wysokowydajnej metody syntezy ligandów receptora GABA-A z użyciem reaktorów mikrofalowych (praca H3).....	15
4.3.5. Pochodne 2-(4-fluorofenylo)-1H-benz[d]imidazolu jako ligandy receptora GABA-A o wysokiej stabilności metabolicznej (H4)	19
4.3.6. Koncepcja cząsteczek hybrydowych łączących aktywność receptora GABA-A i 5-HT ₆ - nowa klasa związków o aktywności przeciwdepresyjnej i przeciwzapalanej (H5 i H6).....	22
4.3.7. Wpływ uzyskanych wyników badań na rozwój dyscypliny: nauki farmaceutyczne	28
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.	31
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.	36
6.1. Działalność dydaktyczna.....	36
6.2. Działalność organizacyjna.....	38
6.3. Działalność popularyzująca naukę.....	39
7. Informacje dotyczące kariery zawodowej (oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6).	40
7.1. Osiągnięcia naukowo-badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora.....	41
7.2. Osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora.....	41
7.2.1. Badania w obrębie ligandów wielofunkcyjnych receptorów monoaminergicznych	42
7.2.2. Selektywne ligandy receptora α 1-GABA-A jako cel terapeutyczny w udarze niedokrwiennym i drżeniu	45
7.2.3. Ligandy receptorów monoaminergicznych (α _{2B} i 5-HT _{2A}) o aktywności przeciwpsykhotycznej	47
7.2.4. Zastosowanie suplementacji probiotykami w terapii wybranych jednostek chorobowych	49
7.2.5. Poszukiwanie ligandów receptorów monoaminergicznych wpływających na redukcję masy ciała.....	50
7.2.6. Badania z zakresu chemii żywności, żywności funkcjonalnej oraz interakcji leków z pożywieniem	50
7.2.7. Pozostałe tematy badawcze	51
7.3. Nagrody i wyróżnienia	51
8. Literatura	52

1. Imię i nazwisko

Monika Marcinkowska (nazwisko rodowe: Jagodzińska)

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

- 03.2009 **Dyplom doktora chemii przemysłowej i inżynierii chemicznej**
 Department of Chemistry, Materials and Chemical Engineering, Politecnico di Milano, **Mediolan, Włochy**
 Tytuł pracy doktorskiej: „*Synthesis and Evaluation of Novel Anti-Angiogenic Compounds*”
- 09.2004 **Dyplom magistra farmacji**
 Katedra Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków
 Tytuł pracy magisterskiej: „*Synteza alkenowych dipeptydosulfonamidowych izosterów biologicznych*”

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych

- 11.2011-obecnie* **Adiunkt**
 Katedra Chemii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński – Collegium Medicum w Krakowie (UJ CM)
- 07.2009-10.2011 **Staż podoktorski**
 w grupie prof. dr. hab. Marcina Kołaczekowskiego, Katedra Chemii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński – Collegium Medicum w Krakowie (UJ CM)
- 04.2007-07.2007 **Stypendium “visiting scholarship”**
 Department of Organic Chemistry, University of Valencia, Walencja, Hiszpania
- 01.2006-12.2008 **Doktorant**
 Department of Chemistry, Materials and Chemical Engineering, Politecnico di Milano, **Włochy**
- 06.2005-12.2005 **Stypendium Marie Curie (RTN), Early Stage Researcher**
 Department of Chemistry, Materials and Chemical Engineering, Politecnico di Milano, **Włochy**
- 03.2004–07.2004 **Stypendium Erasmus/Socrates**
 Department of Medicinal Chemistry, Utrecht University, Holandia

*Urlopy macierzyńskie: 05.12.2015-02.12.2016 oraz 12.06.2019 -11.10.2019

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).

4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

„Nowe kierunki poszukiwania efektywnej terapii schorzeń OUN opartej na modulacji funkcji receptorów GABA-A”

4.2 Wykaz cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych wchodzących w skład cyklu

* - autorstwo korespondencyjne habilitanta, IF - impact factor przypadający na rok opublikowania pracy, MNiSW - punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego

Publikacja H1:

Marcinkowska M*, Kołaczkowski M, Kamiński K, Bucki A, Pawłowski M, Siwek A, Karcz T, Mordyl B, Starowicz G, Kubowicz P, Pękala E, Wesołowska A, Samochowiec J, Mierzejewski P, Bienkowski P. „Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Fluorinated Imidazo[1,2-*a*]Pyridine Derivatives with Potential Antipsychotic Activity”. *Eur J Med Chem.* **2016**, *124*, 456–467. IF= 4.519, MNiSW: 140 pkt.

Publikacja H2:

Marcinkowska M*, Kołaczkowski M, Kamiński K, Bucki A, Pawłowski M, Siwek A, Karcz T, Starowicz G, Słoczyńska K, Pękala E, Wesołowska A, Samochowiec J, Mierzejewski P, Bienkowski P. „3-Aminomethyl Derivatives of 2-Phenylimidazo[1,2-*a*]Pyridine as Positive Allosteric Modulators of GABA A Receptor with Potential Antipsychotic Activity”. *ACS Chem. Neurosci.* **2017**, *8* (6), 1291–1298. IF= 4.211, MNiSW: 100 pkt.

Publikacja H3:

Fajkis N, Marcinkowska M*, Gryźło B, Krupa A, Kołaczkowski M. „Study on a Three-Step Rapid Assembly of Zolpidem and Its Fluorinated Analogues Employing Microwave-Assisted Chemistry”. *Molecules* **2020**, *25*, 3161. IF= 4.412, MNiSW: 140 pkt.

Publikacja H4:

Marcinkowska M*, Fajkis-Zajczkowska N, Szafrąńska K, Jończyk J, Siwek A, Mordyl B, Karcz T, Latacz G, Kołaczkowski M. „2-(4-Fluorophenyl)-1H-benzo[d]imidazole as a Promising Template for the Development of Metabolically Robust, $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ GABA-A Receptor-Positive Allosteric Modulators”. *ACS Chem. Neurosci.* **2023**, *14*, 6, 1166–1180. IF= 5.780, MNiSW: 100 pkt.

Publikacja H5:

Marcinkowska M*, Mordyl B, Fajkis-Zajczkowska N, Siwek A, Karcz T, Gawalska A, Bucki A, Żmudzki P, Partyka A, Jastrzębska-Więsek M, Pomierny B, Walczak M, Smolik M, Pytka K, Mika K, Kotańska M, Kołaczkowski M. „Hybrid molecules combining GABA-A and serotonin 5-HT₆ receptors activity designed to tackle neuroinflammation associated with depression.” *Eur J Med Chem.* **2023**, *247*, 115071. IF= 7.088, MNiSW: 140 pkt.

Publikacja H6:

Marcinkowska M,* Mordyl B, Siwek A, Głuch-Lutwin M, Karcz T, Gawalska A, Sapa M, Bucki A, Szafrńska K, Pomierny B, Pytka K, Kotańska M, Mika K, Kolaczowski M. „Dual molecules targeting 5-HT₆ and GABA-A receptors as a new approach to combat depression associated with neuroinflammation”. *ACS Chem. Neurosci.* 2023, doi: 10.1021/acchemneuro.3c00033 in press. **IF= 5.780, MNiSW: 100 pkt.**

Przedmiotem istotnego osiągnięcia naukowego, będącego podstawą ubiegania się o stopień doktora habilitowanego jest powiązany tematycznie cykl 6 publikacji (**H1-H6**), opublikowanych w anglojęzycznych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym. Zgodnie z analizą bibliometryczną, łączny współczynnik impact factor cyklu publikacji wynosi 31,79, a odpowiadająca mu punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego to 560 punktów. W 5 pracach jestem pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym, w 1 pracy jestem autorem korespondencyjnym.

Wyniki badań przedstawione w ramach prac **H1-H6** podsumowują interdyscyplinarne prace obejmujące syntezę bibliotek nowych ligandów receptora GABA-A oraz hybrydowych ligandów receptora GABA-A i 5-HT₆, badania powinowactwa do głównych celów biologicznych, oraz badania *in vitro* i *in vivo* weryfikujące potencjał terapeutyczny nowych struktur. We wszystkich pracach pełnię rolę wiodącą, a wkład poszczególnych współautorów prac **H1-H6** został podany w załączniku nr 6.

W pracach **H1, H2 i H4** opisujących syntezę ligandów receptora GABA-A i badania farmakologiczne cząsteczek wiodących, mój wkład polegał na opracowaniu koncepcji nowych struktur chemicznych, zaprojektowaniu ścieżki syntetycznej, przeprowadzeniu syntezy cząsteczek, koordynowaniu przebiegiem badań *in vitro* i *in vivo*, uzyskanie funduszy na badania (z środków NCN oraz FNP), przygotowaniem manuskryptów wraz z analizą wyników, a w dalszym etapie przygotowaniem odpowiedzi do uwag recenzentów.

W pracy **H3** opracowałam koncepcję syntezy w reaktorach mikrofalowych, w oparciu o wyniki uzyskane w pracach **H1 i H2**. Zaprojektowałam przebieg doświadczeń, koordynowałam przebiegiem prac badawczych z pozostałymi współpracownikami oraz analizowałam wyniki. Ponadto, uzyskałam środki na badania (grant NCN), przygotowałam manuskrypt oraz odpowiedzi na recenzje.

W pracach **H5 i H6** opracowałam koncepcję ligandów hybrydowych łączących aktywność receptora GABA-A i 5-HT₆, opracowałam i przeprowadziłam syntezę nowych związków, zaprojektowałam panel badań *in vitro* i *in vivo*, służących do weryfikowania potencjału terapeutycznego nowych związków, uzyskałam środki na badania (grant NCN) oraz przygotowałam manuskrypty i odpowiedzi na recenzje.

Merytoryczny zakres prac **H1-H6** został szczegółowo omówiony w kolejnych podrozdziałach (4.3.1-4.3.6), natomiast wpływ wyników na rozwój dyscypliny nauki farmaceutycznej został przedstawiony w podrozdziale 4.3.7.

4.3. Szczegółowe omówienie celu naukowego i wyników opisanych w cyklu publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

4.3.1. Wprowadzenie: Receptory GABA-A jako cel terapeutyczny w schorzeniach ośrodkowego układu nerwowego

Neurotransmisyjny układ GABA-ergiczny moduluje szeroki zakres funkcji mózgu takich jak: kontrola pobudliwości neuronalnej, sterowanie procesami snu i czuwania, rozpoznawanie bodźców awersyjnych oraz regulacja emocji i zachowania.^{1,2} Badania kliniczne ostatnich lat rzuciły nowe światło na funkcje i sprzężenia w obrębie układu GABA-ergicznego, wskazując na jego zaangażowanie również w procesy patofizjologiczne. Z licznych badań *post mortem* wynika, że w zaburzeniach takich jak: schizofrenia, depresja, lęk, padaczka czy udar niedokrwienny obserwuje się zaburzone funkcjonowanie układu GABA-ergicznego.^{3,4,5} Dysfunkcje te przejawiają się poprzez obniżoną ekspresję markerów układu GABA-ergicznego, w tym enzymów uczestniczących w biosyntezie GABA, a także zmianami w ekspresji i funkcji receptorów GABA-A. To nasuwa przypuszczenie, iż terapia oparta na interakcji z określonymi komponentami układu GABA-ergicznego, odzwierciedlającymi patofizjologię tych zaburzeń, mogłaby przynieść wysoką skuteczność terapeutyczną.

Obecnie, receptor GABA-A uważa się za bardzo obiecujący cel biologiczny, ponieważ może być zaangażowany w etiologię różnych chorób psychicznych takich jak zaburzenia lękowe, schizofrenia czy depresja. W przypadku schizofrenii, wyniki badań *post mortem* pokazały wyraźny związek pomiędzy zmianami w ekspresji transkryptów podjednostek receptorów GABA-A, a schizofrenią.^{3,6} Zmiany w ekspresji i funkcji receptorów GABA-A zanotowano głównie w rejonach kory, jąder podstawy i prążkowie, które są zaangażowane między innymi w regulację procesów behawioralnych.^{7,8} Przykładowo, zaobserwowano zmniejszoną ekspresję mRNA podjednostki $\alpha 1$ receptora GABA-A w korze przedczołowej pacjentów ze schizofrenią.⁹ W innych pracach wykazano, zmiany w gęstości i funkcji receptorów GABA-A zawierających podjednostki β .¹⁰ Co ciekawe, dysfunkcje neurotransmisji GABA-ergicznej dotyczą również pozostałych markerów układu GABA-ergicznego. Przykładowo zaobserwowano obniżone stężenie i ekspresję enzymów uczestniczących w biosyntezie GABA tj. dekarboksylazy glutaminianu 1 (GAD1, GAD67) i GAD2 (GAD65).¹¹ Kolejne badania wykazały obniżoną ekspresję mRNA transportera (GAT1) dla GABA w korze czołowej chorych na schizofrenię.¹² Dane te wskazują na istotną rolę układu GABA-ergicznego i receptorów GABA-A zaangażowanych w patofizjologię schizofrenii i zaburzeń psychiatrycznych.

Szereg badań z zakresu transkryptomiki klinicznej i neuroobrazowania, potwierdza również ścisłe zależności pomiędzy pojawianiem się stanów depresyjnych a zmianami w regulacji układu GABA-ergicznego. Badania spektroskopii rezonansu magnetycznego u osób z depresją wykazały istotny spadek poziomu GABA w porównaniu z grupą zdrowych pacjentów.^{13,14} Postuluje się, że obniżony poziom GABA indukuje z kolei zmiany w ekspresji i funkcji receptorów GABA-A, w strukturach limbicznych. Badania transkryptów podjednostek receptora GABA-A, wykazały obniżenie poziomów mRNA dla podjednostek $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\beta 1$, $\beta 2$,

γ 1 u samobójców cierpiących na depresję.^{4,15} Zmiany te prowadzą do zaburzonej komunikacji pomiędzy neuronami i na poziomie funkcjonowania różnych struktur mózgu, co w konsekwencji jest przyczyną powstawania deficytów behawioralnych. Wyraźna dysfunkcja neurotransmisji GABA-ergiczej u osób z depresją doprowadziła do sformułowania przez klinicystów „GABA-ergiczej hipotezy depresji”¹⁶, która zainicjowała poszukiwanie nowych metod terapii opartych o modulację transmisji GABA-ergiczej.¹⁷ Efektem tych prac było zatwierdzenie przez amerykańską agencję ds. leków i żywności (ang. Food and Drug Administration, FDA), dwóch pozytywnych allosterycznych modulatorów receptora GABA-A, breksanolonu i zuranolonu, do leczenia zaburzeń depresyjnych.¹⁷ Powyższe dane potwierdzają słuszność poszukiwania efektywnych metod farmakoterapii zaburzeń psychicznych opierających się na modulacji aktywności receptorów GABA-A.

4.3.2. Cel badań

Celem prowadzonych badań było uzyskanie biblioteki zróżnicowanych strukturalnie ligandów GABA-A, które poprzez interakcję ze określonymi miejscami wiążącymi w receptorze GABA-A, dostarczyły nowych cząsteczek do weryfikacji ich potencjału terapeutycznego w schizofrenii i depresji, a w dalszej perspektywie mogą poprawić istniejące terapie tych schorzeń. Weryfikacja postawionych hipotez została przeprowadzona poprzez syntezę oryginalnych modulatorów receptora GABA-A, cechujących się właściwościami lekopodobnymi, a następnie ocenę ich właściwości terapeutycznych w zwierzęcych modelach schorzeń psychicznych. Badania przeprowadzone w ramach prezentowanego cyklu prac **H1-H6** miały charakter interdyscyplinarny i obejmowały projektowanie nowych struktur, syntezę chemiczną w tym syntezę wspomaganą reaktorami mikrofalowymi oraz badania farmakologiczne *in vitro* i *in vivo*, potwierdzające efekty farmakologiczne otrzymanych struktur.

Prace syntetyczne przeprowadzono w Katedrze Chemii Farmaceutycznej UJCM, podczas gdy badania farmakologiczne *in vitro* oraz *in vivo* zostały wykonane we współpracy z następującymi grupami i ośrodkami badawczymi:

- 1) dr Agatą Siwek z Pracowni Badań Receptorowych Katedry Farmakobiologii UJCM, która przeprowadziła badania radioreceptorowe oraz elektrofizjologiczne w pracach **H1, H2, H4 i H5**.
- 2) dr Pauliną Kubowicz, dr Karoliną Słoczyńską oraz prof. dr. hab. Elżbietą Pękałą z Zakładu Biochemii Farmaceutycznej, które przeprowadziły badania stabilności metabolicznej w pracach **H1 i H2**.
- 3) dr Barbarą Mordyl z Zakładu Radioligandów Katedry Farmakobiologii UJCM, która wykonała badania oceniające aktywność przeciwzapalną ligandów otrzymanych w pracach **H5 i H6**.
- 4) dr hab. Karoliną Pytką, dr hab. Magdaleną Kotańską z Zakładu i Katedry Farmakodynamiki UJCM, które przeprowadziły badania aktywności przeciwdepresyjnej i przeciwzapalnej *in vivo* ligandów dualnych GABA-A/5-HT₆ przedstawionych w pracach **H5** oraz **H6**.

5) prof. dr hab. Annę Wesołowską, dr hab. Anną Partyką oraz dr hab. Magdaleną Jastrzębską-Więsek oraz z Zakładu Farmacji Klinicznej UJCM które przeprowadziły ocenę aktywności behawioralnej wybranych ligandów GABA-A opisujących odpowiednio w pracy **H1**, **H2**, **H5**, oraz **H6**.

6) dr hab. Anną Krupą z Katedry Technologii Postaci Leku i Biofarmacji UJCM która wykonała zdjęcia z użyciem mikroskopu polaryzacyjnego soli winianu zolpidemu opisanych w pracy **H3**.

7) dr Adamem Buckim, dr Alicją Gawalską oraz dr Jakubem Jończykiem z Katedry Chemii Farmaceutycznej którzy wykonali analizę sposobu wiązania się cząsteczek hybrydowych i dyskusję wyników, opisanych w pracach **H5**, **H6** do receptorów 5-HT₆ oraz GABA-A.

8) prof. dr. hab. Pawłem Mierzejewskim z Instytutu Psychiatrii i Neurologii (IPiN) w Warszawie, prof. dr. hab. Przemysławem Bienkowskim z Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego oraz Prof. dr. Jerzym Samochowcem z Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie, którzy uczestniczyli w badaniach *in vivo* otrzymanych ligandów i w dyskusji wyników, w ramach pracy **H1** oraz **H2**.

9) z prof. dr. hab. Marcinem Kołaczekowskim (Katedra Chemii Farmaceutycznej UJCM, dział badawczo-rozwojowy firmy Adamed) z którym prowadziłam dyskusję na temat zależności pomiędzy strukturą a aktywnością biologiczną uzyskanych cząsteczek (w pracach **H1-H6**).

Badania stanowiące podstawę ubiegania się o stopień doktora habilitowanego powstały w wyniku realizacji projektów, w których pełniłam funkcję kierownika projektu: projekt Inter (31/UD/SKILLS/2015) Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej, projekt Sonata Bis (2018/30/E/NZ7/00247) Narodowego Centrum Nauki oraz w ramach dotacji statutowej UJCM (K/ZDS/005536, K/ZDS/007216 i N42/DBS/000307).

4.3.3. Nowy kierunek poszukiwania efektywnej farmakoterapii schizofrenii oparty na modulacji funkcji receptora GABA-A (praca H1 i H2).

Publikacja H1:

Marcinkowska M*, Kołaczekowski M, Kamiński K, Bucki A, Pawłowski M, Siwek A, Karcz T, Mordyl B, Starowicz G, Kubowicz P, Pękala E, Wesołowska A, Samochowiec J, Mierzejewski P, Bienkowski P. „Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Fluorinated Imidazo[1,2-*a*]Pyridine Derivatives with Potential Antipsychotic Activity.” *Eur J Med Chem.* 2016, 124, 456–467. IF= 4.519, MNiSW: 140 pkt.

Publikacja H2:

Marcinkowska M*, Kołaczekowski M, Kamiński K, Bucki A, Pawłowski M, Siwek A, Karcz T, Starowicz G, Słoczyńska K, Pękala E, Wesołowska A, Samochowiec J, Mierzejewski P, Bienkowski P. „3-Aminomethyl Derivatives of 2-Phenylimidazo[1,2-*a*]Pyridine as Positive Allosteric Modulators of GABA A Receptor with Potential Antipsychotic Activity. *ACS Chem. Neurosci.* 2017, 8 (6), 1291–1298. IF= 4.211, MNiSW: 100 pkt.

Pomimo wielu lat intensywnych badań, farmakoterapia schizofrenii stanowi nadal wyzwanie dla współczesnej psychiatrii. Źle rokująca, lekooporna schizofrenia (do 30% przypadków) jest dramatem jednostki, ale też ogromnym obciążeniem dla rodziny, środowiska i systemu opieki zdrowotnej.¹⁸ Dostępne leki przeciwpsychotyczne działają głównie poprzez interakcję z receptorami monoaminergicznymi, których główną funkcją jest modulowanie neurotransmisji dopaminergicznej, serotonergicznej i noradrenergicznej. Przy długotrwałym stosowaniu, leki te wywołują wiele działań niepożądanych takich jak zaburzenia pozapiramidowe, dysfunkcje metaboliczne i zaburzenia hormonalne, które są głównym powodem rezygnacji z farmakoterapii przez pacjentów.¹⁹ Pomimo wielu niekorzystnych efektów, leki przeciwpsychotyczne są nadal szeroko stosowane u pacjentów z schizofrenią, głównie z uwagi na brak korzystniejszej alternatywy. Istnieje zatem oczywista, podkreślana przez dziesiątki autorów, potrzeba poszukiwania nowych leków przeciwpsychotycznych o odmiennym mechanizmie działania od dotychczas stosowanych.²⁰

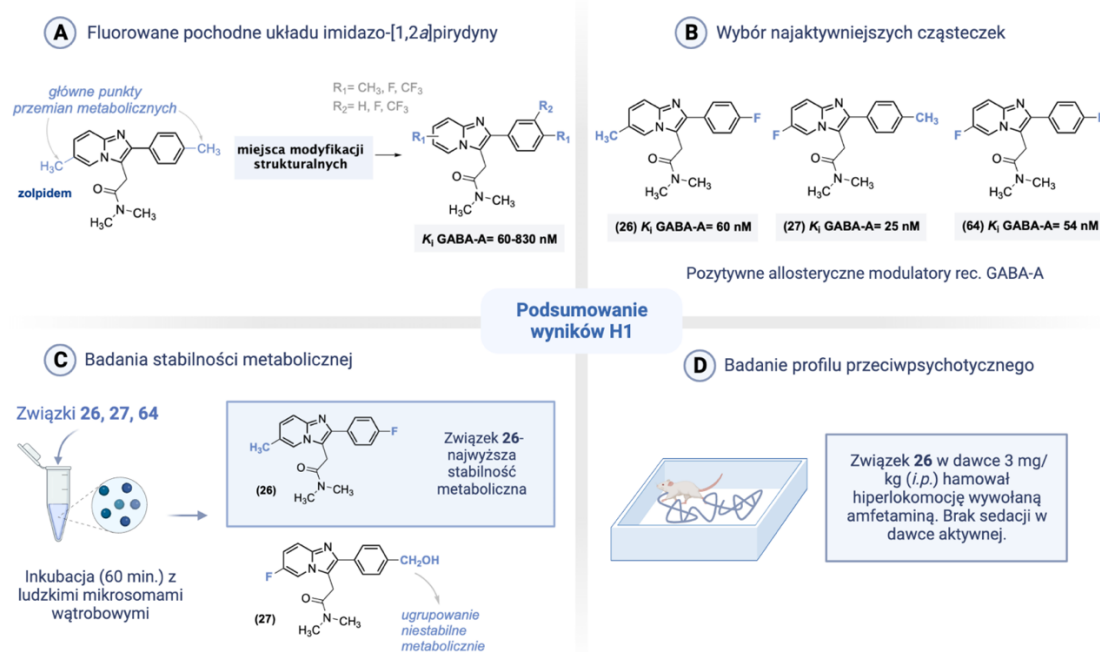
Leki o działaniu GABA-ergicznym są istotnym uzupełnieniem terapii pacjentów z zaburzeniami psychotycznymi, w tym ze schizofrenią.²¹ Praktyka oddziałów psychiatrycznych w Polsce i na świecie pokazuje, że kilkadziesiąt procent pacjentów z ostrym epizodem schizofrenii otrzymuje klasyczne benzodiazepiny (np. diazepam, lorazepam), lub bardziej selektywne pozytywne modulatory receptora GABA-A (np. zolpidem). W jednej z metaanaliz badań klinicznych dotyczących zastosowania benzodiazepin w schizofrenii, autorzy wykazali, że spośród leczonych około 1/3-1/2 pacjentów uzyskało istotną statystycznie poprawę kliniczną.²¹ Benzodiazepiny okazały się bardzo skuteczne jako terapia wspomagająca leczenie neuroleptykami, a obserwowany efekt terapeutyczny pojawiał się stosunkowo szybko od rozpoczęcia terapii.²² Efekty terapeutyczne benzodiazepin powiązano z ich wpływem na transmisję GABA-ergiczną, która ulega wyraźnej dysfunkcji u chorych na schizofrenię.

Ciekawy przypadek kliniczny opisał Wong i wsp. (2010), u 39 letniego pacjenta ze schizofrenią leczonego risperidonem.²³ Z powodu zaburzeń snu dołączono zolpidem, lek modulujący selektywnie aktywność subpopulacji receptorów α_1 GABA-A. W tym czasie obserwowano istotną poprawę kliniczną. Wycofanie zolpidemu spowodowało silny nawrót psychozy i ponowną hospitalizację pacjenta. Kiedy z powrotem włączono zolpidem objawy psychotyczne ustąpiły w przeciągu 72 godzin. Autorzy doniesienia zasugerowali, że zolpidem może wykazywać specyficzne działanie przeciwpsychotyczne.²³

Badania w modelach zwierzęcych przeprowadzone wspólnie z badaczami z Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie (IPiN) potwierdziły, że **zolpidem wykazuje wyraźny profil przeciwpsychotyczny w zwierzęcych modelach psychozy** (praca D11).²⁴ Zolpidem w niskich, subklinicznych dawkach (0,3-3 mg/kg) hamował hiperlokomocję wywołaną podaniem amfetaminy, a także hiperlokomocję indukowaną podaniem antagonisty receptorów NMDA, dizocypiny, **nie wywołując sedacji w dawkach aktywnych**.²⁴ Powyższe efekty zaobserwowano wyłącznie po podaniu zolpidemu, selektywnego modulatora podjednostki α_1 receptora

GABA-A. Nieselektywne benzodiazepiny tj. diazepam oraz midazolam, nie wykazały efektu przeciwpyschotycznego. To sugeruje, iż modulacja aktywność subpopulacji receptorów α_1 -GABA-A stwarza szansę na bardziej selektywne oddziaływanie, na wybrane projekcje GABA związane z etiopatogenezą choroby. **Dane przedstawione powyżej, były pierwszymi tego rodzaju doniesieniami na świecie** i rzuciły nowe światło na możliwości poszukiwania nowych metod farmakoterapii, o mechanizmie odmiennym od obecnie stosowanych leków przeciwpyschotycznych.

Warto dodać, iż zolpidem został wprowadzony na rynek jako krótko i szybko działający, niebenzodiazepinowy lek nasenny, ułatwiający inicjację snu. Zolpidem jest intensywnie metabolizowany w wątrobie, co skutkuje szybką eliminacją i okresem półtrwania wynoszącym ok. 2-3h.^{25,26} W kontekście potencjalnej terapii przeciwpyschotycznej można stwierdzić, iż krótki okres półtrwania zolpidemu, korzystny dla wprowadzania w sen, jest nieodpowiedni z punktu widzenia przewlekłego leczenia schizofrenii. Dlatego też, nadrzędnym celem badań opisanych w pracy **H1**, było opracowanie bliskich analogów strukturalnych zolpidemu, które w przeciwieństwie do cząsteczki macierzystej, cechowałyby się optymalną stabilnością metaboliczną, a przez to dłuższym czasem działania. Kluczowym aspektem przeprowadzonych modyfikacji strukturalnych, było zachowanie cech farmakoforowych odpowiedzialnych za korzystne działanie biologiczne zolpidemu, przy równoczesnej poprawie właściwości farmakokinetycznych. Dlatego też zachowując układ 2-fenyl-imidazo-[1,2a]-pirydyny, zastąpiono wrażliwe na metabolizm wątrobowy, ugrupowania metylowe- atomem fluoru lub grupami trifluorometylowymi (Rys. 1A), które blokują biotransformację mediowaną przez cytochrom P450.



Ryc. 1. Podsumowanie przeprowadzonych badań w ramach pracy H1. Numeracja cząsteczek zgodna z opisem w publikacji (H1).

W oparciu o powyższą strategię, zaprojektowano a następnie zsyntetyzowano pierwszą serię pochodnych (**H1**), gdzie eksplorowano różnorodne podstawniki fluorowe, wprowadzone w obrębie pierścienia 2-fenylimidazo-[1,2*a*]-pirydyny. W kolejnym etapie badań, otrzymane związki zostały poddane ocenie powinowactwa do receptora GABA-A metodą radioreceptorową, a wyniki badań pozwoliły na sformułowanie zależności struktura aktywność dla tej serii pochodnych. W przypadku podstawników wprowadzonych w obrębie pierścienia fenylowego układu 2-fenylimidazo[1,2-*a*]pirydyny, określono preferencję sposobu podstawienia dającą się ująć w szereg; pochodne 4'-F > 4'-CF₃ > 3'-F > 3'-F, 4'-F > 2'-F, 4'-F, > 3'-CF₃, 5'-CF₃. Zaobserwowano również, że wprowadzenie atomu fluoru w pozycję 8 układu 2-fenylimidazo[1,2-*a*]pirydyny, jest niekorzystne dla oddziaływań z receptorami GABA-A i skutkuje brakiem powinowactwa. Pozostałe pochodne cechowały się wysokim powinowactwem do receptora GABA-A w granicach $K_i = 23-850$ nM. Ostatecznie, na podstawie przeprowadzonej analizy zależności struktura aktywność, do dalszych badań wybrano najaktywniejsze cząsteczki (związki **26**, **27** oraz **64**), których wartości powinowactwa wynosiły odpowiednio $K_i = 23$ nM, 56 nM, 60 nM (Ryc. 1B). Wszystkie cząsteczki w badaniach elektrofizjologicznych wykonanych metodą „automated patch clamp”, wykazywały cechy pozytywnych allosterycznych modulatorów receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -GABA-A, zwiększając napływ jonów chlorkowych do wnętrza komórki.

Badania stabilności metabolicznej przeprowadzone na ludzkich mikrosomach wskazały, iż cząsteczkę **27** cechuje niska stabilność metaboliczna, która jest związana z hydroksylacją grupy metylowej usytuowanej w pozycji 4'-pierścienia fenylowego układu 2-fenylimidazo[1,2-*a*]pirydyny (Ryc. 1C). Podobny metabolit wykryto w przypadku leku referencyjnego zolpidemu. W przypadku związków **26** oraz **64**, po 60 minutach inkubacji z mikrosomami wątrobowymi, nie zaobserwowano tworzenia się metabolitów hydroksylowanych. Uzyskane wyniki sugerują, iż pozycja 4'-pierścienia fenylowego układu 2-fenylimidazo[1,2-*a*]pirydyny jest wysoko podatna na metabolizm wątrobowy, a zamiana grupy metylowej na atom fluoru pozwala zwiększyć stabilność metaboliczną. W przeprowadzonych kolejno badaniach hepatotoksyczności, potwierdzono brak efektu hepatotoksycznego dla związków **26**, **27** oraz **64**.

Wynikiem przeprowadzonych badań *in vitro* było wyselekcjonowanie cząsteczki wiodącej **26** do badań behawioralnych *in vivo*. W celu oceny właściwości przeciwpsychotycznych związku **26**, wybrano test hamowania hiperlokomocji wywołanej podaniem substancji psychozotwórczej, amfetaminy. Warto dodać, że amfetamina powszechnie stosowana w zwierzęcych modelach schizofrenii, prowadzi do wystąpienia deficytu GABA i GAD1 w jądrze półleżącym przegrody (*nucleus accumbens septi*).²⁷ To sugeruje, że modele zwierzęce, w których zaburzenia psychotyczne wywołuje się podaniem amfetaminy, są dobrym narzędziem do badania właściwości przeciwpsychotycznych związków GABA-ergicznych. W teście hamowania hiperlokomocji u szczurów indukowanej podaniem amfetaminy, związek **26** w dawce 3 mg/kg (podanie *i.p.*) istotnie hamował hiperlokomocję. Efekt ten utrzymywał się dłużej (60 min) w porównaniu do zolpidemu (30 min), co sugeruje, iż przeprowadzone modyfikacje strukturalne wpłynęły na wydłużenie efektu terapeutycznego. Jednocześnie, związek **26** w dawce aktywnej (3 mg/kg), nie wywołał sedacji i nie wpłynął

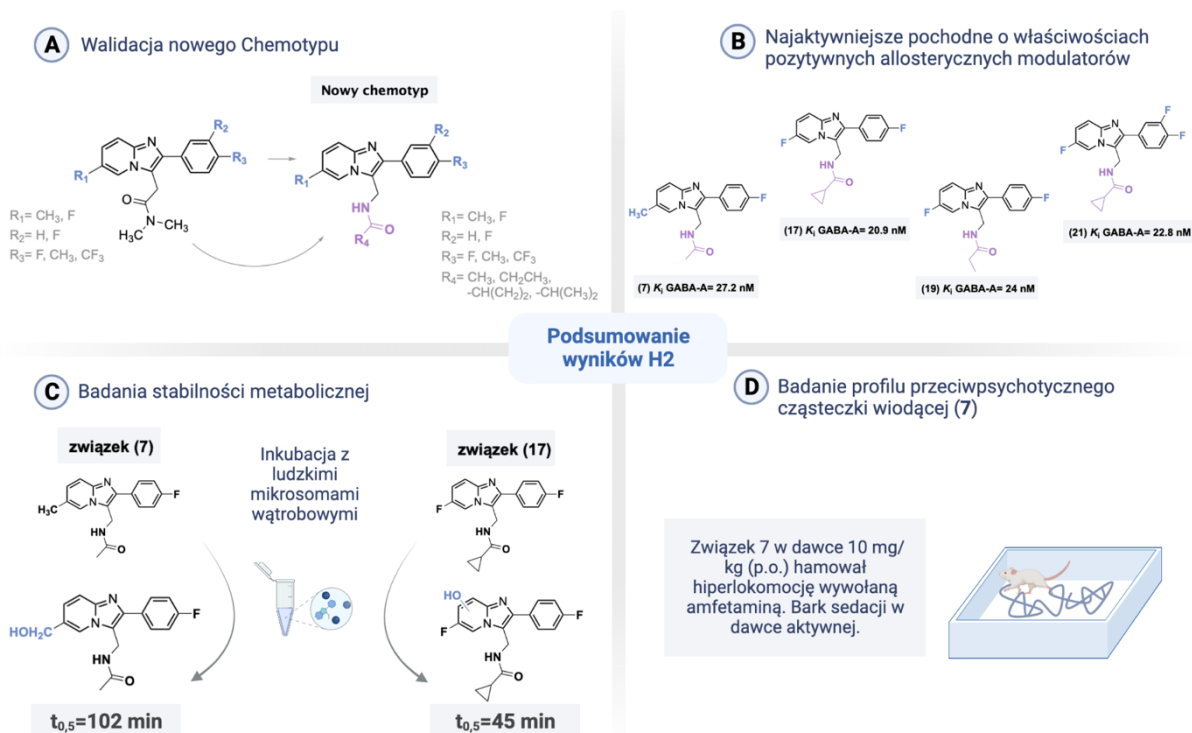
na ruchliwość spontaniczną zwierząt, co potwierdza specyficzne działanie przeciwpyschotyczne. Badania przeprowadzone w pracy **H1**, pozwoliły opracować stabilny metabolicznie, pozytywny allosteryczny modulator receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -GABA-A (**26**), który wykazuje właściwości przeciwpyschotyczne, a efekt farmakologiczny utrzymuje się dłużej niż w przypadku zolpidemu.

Specyficzny mechanizm działania zolpidemu i nowego związku **26** na dzień dzisiejszy nie został potwierdzony, ale można przypuszczać, że jest on związany z nasileniem wpływu neurotransmisji GABA-ergicznej w rejonach jąder podstawy. Teza ta znajduje uzasadnienie w wynikach badań autoradiograficznych, które wykazały wysoki stopień wiązania zolpidemu w tych rejonach mózgu.^{28,29} Ponadto, znaczna część neuronów GABA-ergicznych w śródmózgowiu, między innymi w zwojach podstawy wykazuje wysoką ekspresję subpopulacji receptorów α_1 -GABA-A.³⁰ Z kolei, jedna z hipotez schizofrenii mówi o dysfunkcji neuronów dopaminergicznych w śródmózgowiu i braku kontroli hamującej z strony układu GABA-ergicznego.³¹ W warunkach fizjologicznych, hamujące neurony GABA-ergiczne wysyłają swoje projekcje między innymi z obszarów prążkowania (*striatum*) i jąder podstawy (łac. basal ganglia), kontrolując obszary śródmózgowia, między innymi pola brzusznej nakrywki (*ventral tegmental area* VTA).³² Dysfunkcja układu GABA-ergicznego w tych rejonach, obserwowana wśród chorych na schizofrenię ogranicza kontrolę projekcji dopaminergicznej przez neurony GABA-ergiczne.^{7,8} To nasuwa przypuszczenie, iż zolpidem oraz związek **26** łącząc się z subpopulacją receptorów α_1 -GABA-A w rejonach śródmózgowia, wywierają swoisty efekt hamujący na hiperdopaminę indukowaną substancjami psychozotwórczymi i wykazują efekt przeciwpyschotyczny. Dokładne zależności pomiędzy funkcjonowaniem poszczególnych struktur mózgu i efektem terapeutycznym modulatorów receptora α_1 -GABA-A, będą przedmiotem dalszych, zaawansowanych badań. Niemniej jednak, na podstawie uzyskanych wyników można uznać receptor α_1 -GABA-A jako atrakcyjny cel biologiczny do projektowania nowych związków o potencjalnej wartości terapeutycznej w schizofrenii.

Zachęcające wyniki uzyskane dla pierwszej serii pochodnych, skłoniły do eksplorowania nowej przestrzeni chemicznej i weryfikacji właściwości przeciwpyschotycznych dla nowego chemotypu, opisanego w pracy **H2**. Za podstawowy element strukturalny nowego chemotypu uznano zmianę kierunku podstawienia wiązania amidowego w łańcuchu bocznym. Zachowując szkielet budowy ligandów opisanych w pracy **H1** tj. układ 2-fenylo-imidazo-[1,2*a*]-pirydyny (A) (Ryc. 2A), gwarantujący stabilność metaboliczną i pożądany, dłuższy efekt farmakologiczny, modyfikacji poddano ugrupowanie dimetyloamidowe, odwracając kierunek tworzenia się wiązania amidowego i wprowadzając w jego miejsce szeroką gamę podstawników alkiloamidowych (Ryc. 2A).

Cząsteczki uzyskane w ramach pracy **H2**, charakteryzowały się zróżnicowanym powinowactwem do receptorów GABA-A w zakresie 24-364 nM. Analiza zależności struktura-aktywność potwierdziła właściwości zaobserwowane w pierwszej serii pochodnych **H1**, dotyczące podstawników w obrębie rdzenia 2-fenylo-

imidazo-[1,2a]-pirydyny. Potwierdzono, iż pozycje: 6, 4' oraz 3' i 4' układu 2-fenilo-imidazo-[1,2a]-pirydyny, są optymalne do uzyskania wysokiego powinowactwa do receptora GABA-A. Analiza wpływu podstawnika alkiloamidowego w łańcuchu bocznym na powinowactwo do receptorów GABA-A wykazała, iż pochodne metylowe, etylowe oraz cyklopropylowe cechują się wyższym powinowactwem w stosunku do analogów izopropylowych. Badania elektrofizjologiczne przeprowadzone dla najaktywniejszych pochodnych (**7**, **17**, **19** oraz **21**) wykazały, że związki te posiadają cechy pozytywnych allosterycznych modulatorów receptorów $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -GABA-A, nasilając prądy chlorkowe.



Ryc. 2. Podsumowanie przeprowadzonych badań w ramach pracy H2. Numeracja cząsteczek zgodna z opisem w publikacji (H2).

Wybrane, najaktywniejsze cząsteczki serii **H2** (związek **7** i **17**) zostały poddane ocenie stabilności metabolicznej na szczurzych mikrosomach wątrobowych. Badania te wykazały, że największy wpływ na szybkość przemian metabolicznych miało położenie atomów fluoru w cząsteczce, natomiast rodzaj podstawnika alkilowego w łańcuchu bocznym nie determinował szybkości metabolizmu. W toku badań zaobserwowano iż, okres półtrwania związku **17** wynosił $t_{0,5} = 45 \text{ min}$ (Ryc. 2C), a główną reakcją przemiany metabolicznej była hydroksylacja w obrębie pierścieni aromatycznych. W efekcie, okres półtrwania związku **17** wynosił $t_{0,5} = 45 \text{ min}$ (Ryc. 2C). Podobny efekt opisano w literaturze dla chlorowej pochodnej 2-fenilo-imidazo-[1,2a]-pirydyny, alpidemu, który cechuje się niską stabilnością metaboliczną, a główną drogą jego biotransformacji jest hydroksylacja w pierścieniach aromatycznych.^{26,33} Sugeruje to, iż w celu zachowania wysokiej stabilności metabolicznej, związki posiadające rdzeń 2-fenilo-imidazo-[1,2a]-pirydyny, nie powinny

jednocześnie zawierać atomów chloru lub fluoru w pozycjach 6 oraz 4'. Z kolei, pochodna 2-(4-fluorofenilo)-6-metylimidazo[1,2-*a*]pirydyny (związek **7**), cechowała się dużo wyższą stabilnością metaboliczną, dla której okres półtrwania wynosił 102 min. Zaobserwowano tworzenie się hydroksylowanych metabolitów (M1), obejmujących grupę metylową w pozycji 6, jednakże zawartość metabolitu M1 była dużo niższa, co wpływało na wydłużenie okresu półtrwania. Ostatecznie, uzyskane badania pozwoliły wyselekcjonować cząsteczkę wiodącą **7**, do badań *in vivo*. W celu oceny potencjalnej aktywności przeciwpsychotycznej związku **7**, wybrano test hamowania hiperlokomocji indukowanej podaniem amfetaminy. Jako drogę podania wybrano podanie dożołądkowe, które dodatkowo miało zweryfikować biodostępność badanej cząsteczki. Badania *in vivo* wykazały, iż związek **7** istotnie hamował hiperlokomocję w dawce 10 mg/kg (*p.o.*), co świadczy nie tylko o korzystnej aktywności farmakologicznej związku **7**, ale również o odpowiedniej biodostępności.

Wnioski i podsumowanie badań H1 i H2

W przeprowadzonych badaniach chemiczno-farmakologicznych opisanych w pracach **H1** i **H2**, zidentyfikowano nowe ligandy receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -GABA-A o cechach pozytywnych modulatorów allosterycznych. Ustalono zależności struktura aktywność dla obu serii. Zaobserwowano, iż wprowadzenie atomów fluoru do układu 2-fenylimidazo[1,2-*a*]pirydyny, jak również odwrócenie sposobu tworzenia wiązania amidowego w szeregu $-CH_2-NH-CO-R$, pozwala zachować wysokie powinowactwo do receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -GABA-A. Co istotne, zaobserwowano, iż położenie atomów fluoru w głównym rdzeniu 2-fenylimidazo[1,2-*a*]pirydyny determinuje stabilność metaboliczną uzyskanych pochodnych, gdzie najwyższą stabilność metaboliczną zaobserwowano dla pochodnych 2-(4-fluorofenilo)-6-metylimidazo[1,2-*a*]pirydyny. Daje to przesłankę do dalszego projektowania związków biologicznie aktywnych cechujących się wysokim powinowactwem do receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -GABA-A i optymalną stabilnością metaboliczną. W badaniach *in vivo*, wyselekcjonowane cząsteczki wiodące (**26** dla **H1** oraz **7** dla **H1**) wykazały aktywność świadczącą o znacznym potencjale kontrolowania zaburzeń psychotycznych. W przypadku związku **26**, efekt terapeutyczny utrzymywał się dłużej w porównaniu do zolpidemu, co świadczy o korzystniejszym profilu farmakokinetycznym, z punktu widzenia działania przeciwpsychotycznego. Efekt przeciwpsychotyczny związku **7** uzyskano po podaniu dożołądkowym, co sugeruje, że związek **7** cechuje się również korzystną biodostępnością.

W ramach przeprowadzonych prac, zidentyfikowano oryginalne narzędzia farmakologiczne (**26** i **7**) o korzystnym profilu farmakokinetycznym, które mogą zwiększyć możliwości w zakresie neuropsychofarmakologii doświadczalnej. Uzyskane cząsteczki otwierają możliwości eksploracji nowej przestrzeni chemicznej wśród fluorowanych pochodnych układu 2-fenylimidazo[1,2-*a*]pirydyny, jako nanomolowych ligandów $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -GABA-A, o wysokiej stabilności metabolicznej, wykazujących właściwości przeciwpsychotyczne. Przeprowadzone prace *in vivo* potwierdziły również istotną rolę receptorów $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -GABA-A w kontrolowaniu psychoz i ich potencjał terapeutyczny. Wyniki badań opisanych w pracach **H1** i **H2**,

stanowią krok naprzód w kierunku opracowania oryginalnych farmakoterapii schizofrenii, nie związanych z bezpośrednim hamowaniem receptorów dopaminergicznych.

4.3.4. Opracowanie wysokowydajnej metody syntezy ligandów receptora GABA-A z użyciem reaktorów mikrofalowych (praca H3).

Publikacja H3:

Fajkis, N.; **Marcinkowska, M.***; Gryźło, B.; Krupa, A.; Kolaczkowski, M. Study on a Three-Step Rapid Assembly of Zolpidem and Its Fluorinated Analogues Employing Microwave-Assisted Chemistry. *Molecules* 2020, 25, 3161. IF= 4.412, MNiSW: 140 pkt.

Poszukiwanie nowych cząsteczek biologicznie aktywnych wiąże się również z koniecznością opracowania szybkich i wydajnych metod syntezy, które pozwoliłyby w krótkim czasie na uzyskanie dużych ilości związków przeznaczonych do badań farmakologicznych, szczególnie *in vivo*, określających skuteczność i bezpieczeństwo. Postęp technologiczny w dziedzinie syntezy chemicznej umożliwił zastosowanie reaktorów mikrofalowych, które pozwalają skrócić czas przebiegu reakcji chemicznych, zapewniając jednocześnie wyższą wydajność oraz czystość otrzymywanych cząsteczek.³⁴ Niewątpliwą zaletą prowadzenia syntezy chemicznej wspomaganej promieniowaniem mikrofalowym jest możliwość zredukowania ilości stosowanych rozpuszczalników organicznych, co wpisuje się również w strategię zielonej chemii. Metody opierające się na redukcji ilości rozpuszczalników wykorzystują przyjęty pogląd, iż zwiększenie stężenia reagentów w mieszaninie reakcyjnej, wpływa na wyższe prawdopodobieństwo zderzeń cząsteczek substratów i skutkuje większą wydajnością.^{35,36}

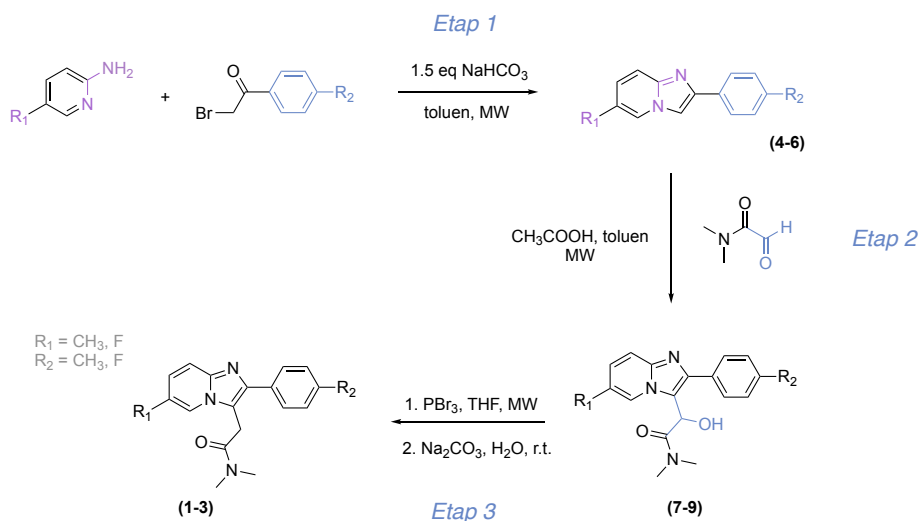
Koncepcja syntezy z użyciem reaktorów mikrofalowych została zaimplementowana w pracy **H3**, do syntezy referencyjnych narzędzi farmakologicznych; zolpidemu (**1**) oraz jego fluorowanych analogów (związek **2** i **3**), uzyskanych w pracy **H1**. Zarówno zolpidem (**1**) jak i nowo uzyskane analogi fluorowane (**2** i **3**), mogą być wykorzystane jako narzędzia farmakologiczne do badań mających na celu weryfikację potencjału terapeutycznego ligandów $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -GABA-A, nie tylko w schorzeniach psychiatrycznych ale również neurologicznych. Co ciekawe, dane kliniczne sugerują, iż modulacja aktywności subpopulacji receptorów α_1 -GABA-A w rejonach jąder podstawy i prążkowiec, może przynieść korzyści terapeutyczne w takich schorzeniach jak choroba Parkinsona czy rekonwalescencja po udarze niedokrwiennym.^{37,38,39} W tym celu istnieje konieczność przeprowadzenia wielopłaszczyznowej weryfikacji efektu farmakologicznego ligandów α_1 -GABA-A, z uwzględnieniem modeli *in vitro* oraz *in vivo*, za pomocą odpowiednich narzędzi farmakologicznych. Wymogi zaawansowanych badań biologicznych sugerują, iż substancje wzorcowe powinny cechować się wysoką czystością, tak aby ewentualne zanieczyszczenia nie zaburzyły interpretacji

uzyskanych wyników badań farmakologicznych.⁴⁰ Ponadto, w przypadku eksperymentów chronicznych istnieje konieczność dostarczenia dużych ilości (1-2g) narzędzi farmakologicznych, co z kolei wiąże się z koniecznością bardzo wydajnej i możliwie szybkiej metody syntezy. Takie wysokie wymagania stawiane substancjom narzędziowym, w szczególności tym podawanym zwierzętom, wymagają opracowania efektywnych metod syntezy.

Do tej pory opisano kilka metod syntezy pochodnych układu 2-fenylimidazo[1,2-*a*]pirydyny, które bazują na reakcjach jednonaczyniowe typu „one-pot” lub reakcjach organokatalizy.^{41,42} Jednakże, metody te wymagają użycia drogich i trudno dostępnych reagentów oraz substancji toksycznych takich jak: tribromofosfina, diazoocetan etylu czy cyjanek sodu. Zastosowanie w/w reagentów zwłaszcza w ostatnich etapach syntezy, komplikuje oczyszczanie oraz stwarza zagrożenie, iż nawet niewielkie pozostałości toksycznych substancji, wpłyną na wyniki badań farmakologicznych. Poważnym ograniczeniem jest również implementacja w/w metod do otrzymania fluorowanych pochodnych zolpidemu (**2**, **3**), gdyż wymagałyby one użycia trudnodostępnych i drogich substratów.

Co prawda w pracy **H1** opisano trój etapową ścieżkę syntezy opartą na klasycznych metodach w roztworze, która umożliwiała syntezę zolpidemu i fluorowanych pochodnych, jednakże metoda ta była czasochłonna, wydajności reakcji poszczególnych etapów były stosunkowo niskie, a produkty trudne do oczyszczania. Dlatego, w ramach pracy **H3** zoptymalizowano metodę syntezy zolpidemu (**1**) oraz analogów fluorowanych (**2**, **3**), wykorzystując metody syntezy w reaktorach mikrofalowych. Zastosowanie promieniowania mikrofalowego w syntezie związków organicznych, oferuje dużo korzyści w porównaniu do klasycznych metodologii syntetycznych. Przykładowo, umożliwia skrócenie czasu reakcji chemicznych oraz często ma wpływ na wyższą wydajność i prowadzenie syntezy w warunkach procesów zielonej chemii.^{36,43} Dlatego, w pracy **H3** opisano proces zaimplementowania syntezy wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym do wyjściowej, trój etapowej syntezy zolpidemu (**1**) i pochodnych (**2**, **3**) (Ryc.3).

Zolpidem oraz jego fluorowane pochodne otrzymano na drodze trój etapowej syntezy, rozpoczynającej się od reakcji kondensacji pomiędzy dwoma łatwo dostępnymi blokami budulcowymi: α -bromoacetofenonem oraz fluoropirydino-2-aminą. Do otrzymanych w pierwszym etapie kondensatów (**4-6**) wprowadzono aldehyd: *N,N*-dimetylo-2-oksoacetamid, który pozwolił na otrzymanie α -hydroksyacetamidowych pochodnych (**7-9**). W ostatnim etapie, przeprowadzono dehydroksylację pochodnych (7-9), co pozwoliło uzyskać związki końcowe (**1-3**) z wysokimi wydajnościami oraz czystością >98% HPLC. Wszystkie trzy etapy przeprowadzono w reaktorach mikrofalowych. Warto dodać, że również w ostatnim etapie udało się zastąpić dichloroetan innymi, nietoksycznymi rozpuszczalnikami: tetrahydrofuranem oraz dioksanem. Udało się również skrócić łączny czas przebiegu poszczególnych reakcji z 36 godzin (metoda klasyczna) do 2,25 godzin (metoda w reaktorach mikrofalowych) (Ryc 3).



		Metoda konwencjonalna		Synteza mikrofalowa (MW)	
nr	R_1, R_2	Czas	Wydajność %	Czas	Wydajność %
ETAP 1	(4) $R_1 = \text{CH}_3$ $R_2 = \text{CH}_3$	12 godz.	70	40 min	81
	(5) $R_1 = \text{CH}_3$ $R_2 = \text{F}$	12 godz.	62	40 min	86
	(6) $R_1 = \text{F}$ $R_2 = \text{F}$	12 godz.	57	40 min	88
ETAP 2	(7) $R_1 = \text{CH}_3$ $R_2 = \text{CH}_3$	12 godz.	65	1 godz.	81
	(8) $R_1 = \text{CH}_3$ $R_2 = \text{F}$	12 godz.	62	1 godz.	86
	(9) $R_1 = \text{F}$ $R_2 = \text{F}$	12 godz.	57	1 godz.	88
ETAP 3	(1) $R_1 = \text{CH}_3$ $R_2 = \text{CH}_3$	6 godz.	70	45 min.	71
	(2) $R_1 = \text{CH}_3$ $R_2 = \text{F}$	12 godz.	70	45 min.	82
	(3) $R_1 = \text{F}$ $R_2 = \text{F}$	12 godz.	43	45 min.	76

Ryc 3. Trój etapowa ścieżka syntezy zolpidemu i pochodnych w reaktorach mikrofalowych (MW) oraz tabela z porównaniem wydajności syntezy prowadzonej metodą konwencjonalną i mikrofalową. Numeracja cząsteczek zgodna z opisem w publikacji (H3)

Dodatkowym aspektem przeprowadzonych badań było otrzymanie drobnokrystalicznej soli winianu zolpidemu. Jednym z kluczowych aspektów syntezy związków biologicznie aktywnych, które są wykorzystywane w zaawansowanych badaniach farmakologicznych, jest odpowiednia rozpuszczalność

substancji chemicznych w wodzie. Ma to kluczowe znaczenie nie tylko pod kątem sposobu podania substancji zwierzętom (roztwory wodne), ale rzutuje bezpośrednio na biodostępność *in vivo* badanych substancji.⁴⁴ Warto dodać, że zolpidem w formie wolnej zasady cechuje się bardzo niską rozpuszczalnością w wodzie (<0.1mg/mL), co może skutkować niską biodostępnością, i w efekcie zaburzyć wyniki badań farmakologicznych *in vivo*. Przekształcenie zolpidemu w sól kwasu winowego, pozwala zwiększyć rozpuszczalność do wartości ok. 23 mg/mL.⁴⁵ Jednakże istotnym aspektem jest uzyskanie soli o odpowiednim stopniu rozdrobnienia, ponieważ z reguły osady grubokrystaliczne cechują się wysoką energią krystaliczną co powoduje, że trudno je rozpuścić w wodzie. Natomiast, sole drobnokrystaliczne z uwagi na swoją subtelną strukturę, cechują się wyższą rozpuszczalnością.

W pracy **H3** opracowano metodę pozyskiwania drobnokrystalicznej soli winianu zolpidemu, po przez dodatek czynnika precypitującego; eteru dietylowego do procesu krystalizacji. Analiza wielkości otrzymanych kryształów soli winianu zolpidemu za pomocą mikroskopu polaryzacyjnego wykazała, iż wielkość kryształów wynosi < 5 µm, podczas gdy kryształy uzyskane drogą tradycyjnej krystalizacji posiadają wielkość 10–20 µm. Warto dodać, iż wielkość kryształów soli cząsteczek biologicznie aktywnych może w istotny sposób zmienić rozpuszczalność soli i biodostępność, a co za tym idzie, wpłynąć na wyniki przeprowadzanych eksperymentów *in vivo*.^{44,46} Wiąże się to bezpośrednio z ryzykiem otrzymania pozornie negatywnych wyników doświadczeń, które tak naprawdę mogą być związane z niską rozpuszczalnością i przez to niską biodostępnością związku, a nie rzeczywistym brakiem aktywności farmakologicznej. Dlatego też uzyskanie soli, winianu zolpidemu, o strukturze drobnokrystalicznej (< 5 µm), pozwoli w przyszłości na odpowiednią syntezę substancji referencyjnej, przeznaczonej do badań farmakologicznych.

Wnioski i podsumowanie badań pracy H3

Efektom podjętych badań było opracowanie nowej metody syntezy zolpidemu, która: a) pozwoliła znacznie skrócić czas procesu syntezy, z 36 godzin (metoda tradycyjna) do 2,25 godzin (metoda w reaktorach mikrofalowych); b) produkty izolowane z mieszanin reakcyjnych cechowały się wysoką czystością; c) metoda wykorzystuje tanie i łatwo dostępne bloki budulcowe; d) nie uwzględnia toksycznych reagentów w syntezie. Ponadto, wykorzystanie reaktorów mikrofalowych do syntezy pozwoliło również ograniczyć ilości zużytych rozpuszczalników, co wpisuje się w zasady zielonej chemii. Przeprowadzone badania pozwoliły uzyskać drobnokrystaliczne sole winianu zolpidemu o odpowiednim stopniu rozdrobnienia, które pozwolą zapewnić optymalną rozpuszczalność w wodzie i zmniejszą ryzyko uzyskania fałszywie negatywnych wyników badań *in vivo*. Opracowaną metodologię syntezy wykorzystano do syntezy winianu zolpidemu, który został wykorzystany przez współpracowników z Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie, do weryfikacji potencjału terapeutycznego zolpidemu w drzeniu (*tremor*) (praca **D30**).

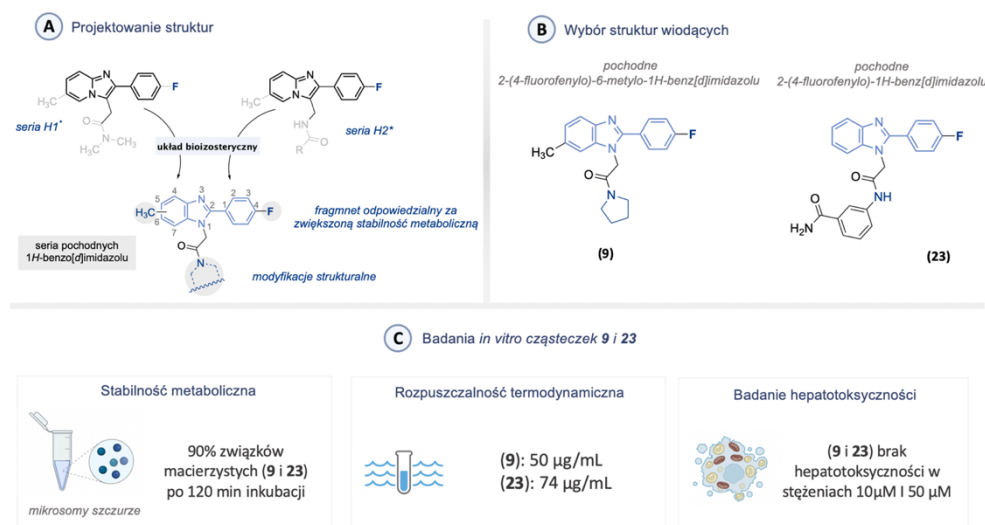
4.3.5. Pochodne 2-(4-fluorofenylo)-1H-benz[d]imidazolu jako ligandy receptora GABA-A o wysokiej stabilności metabolicznej (H4)

Publikacja H4:

Marcinkowska, M.* Fajkis-Zajączkowska N, Szafrńska K, Jończyk J, Siwek A, Mordyl B, Karcz T, Latacz G, Kolaczowski M. „2-(4-Fluorophenyl)-1H-benzo[d]imidazole as a Promising Template for the Development of Metabolically Robust, $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ GABA-A Receptor-Positive Allosteric Modulators.” *ACS Chem Neurosci*. 2023, 14, 6, 1166–1180. IF= 5.780, MNiSW: 100 pkt.

Kontynuując badania nad poszukiwaniem nowych ligandów receptora GABA-A o wysokiej stabilności metabolicznej, w pracy H4 przedstawiono serię pochodnych 2-fenylo-1H-benzo[d]imidazolu. Pierścień 2-fenylo-1H-benzo[d]imidazolu to jeden z bioizosterów układu 2-fenylimidazo[1,2-a]pirydyny, który ma podobne właściwości fizykochemiczne oraz jednocześnie posiada cechy farmakoforowe ligandów receptora GABA-A. Z uwagi na optymalne właściwości fizykochemiczne, pierścień 2-fenylo-1H-benzo[d]imidazolu został określony jako jeden z 100 najczęściej spotykanych układów heterocyklicznych w strukturze leków zatwierdzonych przez FDA.⁴⁷ Dlatego, 2-fenylo-1H-benzo[d]imidazol uznano za optymalny rdzeń, na bazie którego można budować nowe ligandy receptora GABA-A.

Wykorzystując zależności strukturalne opisane w pracach H1 i H2 dotyczące strategii zwiększania trwałości metabolicznej ligandów receptora GABA-A, zaprojektowano serię pochodnych zawierających rdzeń 2-fenylo-1H-benzo[d]imidazolu. Zastępując główny rdzeń 2-(4-fluorofenyl)imidazo[1,2-a]pyridyny występujący w strukturach ligandów receptora GABA-A (H1 i H2), wprowadzono bioizosteryczny układ 2-(4-fluorofenyl)-1H-benz[d]imidazolu (Ryc. 4). Celem modyfikacji było sprawdzenie jak zaproponowana zmiana wpłynie na powinowactwo i aktywność funkcjonalną receptora $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ -GABA-A oraz stabilność metaboliczną.



Ryc. 4. Podsumowanie przeprowadzonych badań w ramach pracy H4. Numeracja cząsteczek zgodna z opisem w publikacji H4. *Serie związków opisanych w pracy H1 oraz H2.

W ramach pracy **H4** otrzymano bibliotekę 21 zróżnicowanych strukturalnie pochodnych 2-(4-fluorofenylo)-1*H*-benz[*d*]imidazolu, które poddano analizie powinowactwa do receptora GABA-A metodą radioreceptorową w celu określenia zależności struktura-aktywność. Analiza położenia grupy metylowej w pierścieniu 2-(4-fluorofenylo)-1*H*-benz[*d*]imidazolu wykazała, iż podstawnik ten wpływa w sposób istotny na powinowactwo do receptorów GABA-A. Analogi posiadające grupę metylową w pozycji 6 układu 2-(4-fluorofenylo)-1*H*-benz[*d*]imidazolu cechowały się powinowactwem w zakresie 3180-6100nM (pK_i 5.21-5.5). Natomiast zmiana pozycji grupy metylowej z 6 na 5 skutkowało utratą powinowactwa. Jednocześnie zaobserwowano, iż rodzaj fragmentu amidowego nie wpływał na powinowactwo do receptora GABA-A. W serii pochodnych zawierających fragment 2-(4-fluorofenylo)-1*H*-benzo[*d*]imidazolu zaobserwowano, iż rodzaj podstawnika amidowego w łańcuchu bocznym odgrywa istotną rolę na powinowactwo do receptora GABA-A. Spośród struktur zawierających różnorodne podstawniki alkilowe w łańcuchu bocznym, powinowactwo do receptora zachowały cząsteczki zawierające podstawniki dimetyloamidowe (**15**) oraz pierścien pirolidyny (**16**). W przypadku pochodnych 2-(4-fluorofenylo)-1*H*-benzo[*d*]imidazolu, zawierających w łańcuchu bocznym podstawniki aromatyczne: 3-aminobenzamidowy (**23**) lub 3-metoksyanilinowy (**25**) oraz 4-fluoroaniliwowy (**29**) wykazały powinowactwo do receptora GABA-A w zakresie 900-2000 nM (pK_i =6.05-5.02).

Badania w grupie pochodnych 2-(4-fluorofenylo)-1*H*-benzo[*d*]imidazolu zostały wzbogacone o badania *in silico*, które umożliwiły analizę kompleksu ligand-receptor na poziomie molekularnym. Warto dodać, iż strukturę krystaliczną ludzkiego receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ GABA-A wykonaną wysokorozdzielczą metodą Cryo-EM, ujawniono dopiero w 2018 roku, więc po ukazaniu się dwóch pierwszych prac **H1**, **H2**. Dlatego badania z zakresu modelowania molekularnego zostały uwzględnione dopiero w pracach **H5** i **H6**, gdzie miarodajna analiza oddziaływań molekularnych była możliwa.⁴⁸ Dokowanie wyselekcjonowanych cząsteczek (**15**, **16**, **23**, **25**, **29**) do modeli molekularnych receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -GABA-A pozwoliły określić ich sposób wiązania w miejscu allosterycznym, pomiędzy podjednostkami α_1 i γ_2 . Analiza oddziaływań pomiędzy związkiem **9**, przedstawicielem serii 2-(4-fluorofenylo)-6-metylo-1*H*-benz[*d*]imidazolu a miejscem allosterycznym receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -GABA-A wykazała, iż grupa metylowa w pozycji 6 struje odpowiednią konformacją liganda, która umożliwia nawiązanie kluczowych oddziaływań z His102 podjednostki α_1 oraz Ser206 podjednostki γ_2 . Wyniki te potwierdzają zależności zaobserwowane w strukturze krystalicznej zolpidemu w kompleksie z receptorem GABA-A, które również wskazały na istotną rolę interakcji molekularnych z α His102 i γ Ser206.⁴⁹ Zmiana miejsca podstawienia grupy metylowej z pozycji 6 na 5 w pierścieniu 1*H*-benz[*d*]imidazolu (związek **10**) powoduje całkowite odwrócenie konformacji liganda, uniemożliwiając nawiązanie kluczowych oddziaływań z kieszenią wiążącą receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -GABA-A. W przypadku pochodnych nieposiadających grupy metylowej w pierścieniu 1*H*-benz[*d*]imidazolu jak np. związek **23**, rozbudowany podstawnik w

amidowym łańcuchu bocznym, kompensuje brak grupy metylowej wymuszając prawidłową konformację liganda, umożliwiając nawiązanie kluczowych oddziaływań z kieszenią wiążącą receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -GABA-A. W kolejnym etapie badań, wyselekcjonowane cząsteczki (**9**, **15**, **16**, **23** i **29**) poddano ocenie zdolności do nasilania przepływu jonów chlorkowych przez kanał jonowy receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -GABA-A. Wszystkie cząsteczki wykazały cechy pozytywnych modulatorów allosterycznych, zwiększając napływ jonów chlorkowych do wnętrza komórki. Aktywność funkcjonalna tych związków była stosunkowo wysoka i wynosiła 172% i 134% efektu GABA. Chociaż wyniki te nie korelowały bezpośrednio z wartościami powinowactwa do receptora GABA-A, należy wziąć pod uwagę, że wpływ modulatorów allosterycznych na przepuszczalność jonów jest złożonym procesem, który zależy od różnych czynników. Uzyskane wyniki sugerują, że cząsteczki **9** i **23**, mogą ułatwiać otwarcie kanału poprzez indukowanie określonej zmiany konformacyjnej receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -GABA-A, co prawdopodobnie wpływa na wysoką odpowiedź funkcjonalną. Na podstawie tych badań wybrano dwie najaktywniejsze cząsteczki, związek **9** - przedstawiciela serii 2-(4-fluorofenylo)-6-metylo-1H-benz[d]imidazolu oraz związek **23** - przedstawiciela serii 2-(4-fluorofenylo)-1H-benzo[d]imidazolu.

Wyselekcjonowane cząsteczki poddano analizie w panelu badań *in vitro* obejmujących ocenę rozpuszczalności w buforze fosforanowym pH=7.4, analizę stabilności metabolicznej w mikrosomach ludzkich oraz badania hepatotoksyczności. W badaniu rozpuszczalności termodynamicznej, związki **9** oraz **23** cechowały się rozpuszczalnością, odpowiednio, 50 oraz 74 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Według kryteriów dla cząsteczek będących na wstępnym etapie procesu „drug discovery” związki te można zakwalifikować jako średnio i dobrze rozpuszczalne w wodzie.⁵⁰ W badaniach stabilności metabolicznej zaobserwowano, iż po 120 minutowej inkubacji z frakcją mikrosomów ludzkich, 90% związków macierzystych nie ulegało metabolizmowi, co świadczy o ich wysokiej stabilności metabolicznej. W kolejnym etapie przeprowadzono ocenę bezpieczeństwa farmakologicznego w zakresie potencjalnych efektów hepatotoksycznych *in vitro*. Jako związek referencyjny zbadano alpidem, ligand GABA-A, który z powodu ostrej hepatotoksyczności został wycofany z rynku farmaceutycznego w latach 90 ubiegłego stulecia. Badane cząsteczki nie wykazały efektów hepatotoksycznych w zakresie badanych stężeń 10 μM i 50 μM . Dla porównania alpidem w stężeniu 50 μM zmniejszał istotnie statystycznie żywotność komórek hepatocytów. Wyniki te sugerują że pochodne układu 2-(4-fluorofenylo)-1H-benz[d]imidazolu o wysokiej stabilności metabolicznej, pozbawione są właściwości hepatotoksycznych w badanym zakresie stężeń.

Podsumowanie i wnioski pracy H4

Badania przeprowadzone w ramach pracy **H4** pozwoliły zidentyfikować nowe chemotypy o strukturze 2-(4-fluorofenylo)-6-metylo-1H-benz[d]imidazolu oraz 2-(4-fluorofenylo)-1H-benz[d]imidazolu, wykazujące cechy pozytywnych allosterycznych modulatorów receptora $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -GABA-A. Badania pozwoliły ustalić zależności struktura-aktywność oraz wymagania strukturalne decydujące o powinowactwie do receptora GABA-A, w grupie pochodnych 2-(4-fluorofenylo)-1H-benzo[d]imidazolu. Najwyższe efekty funkcjonalne w badaniach

elektrofizjologicznych wykazały cząsteczki **9** i **23**, które nasilały prąd jonowy do wartości 172% i 134% aktywności samego GABA. Oba związki cechowały się wysoką stabilnością metaboliczną i brakiem właściwości hepatotoksycznych w badanym zakresie stężeń. Zidentyfikowane cząsteczki **9** i **23** mogą stanowić punkt wyjściowy do dalszego projektowania kolejnych pochodnych 1*H*-benz[*d*]imidazolu, o aktywności pozytywnych allosterycznych modulatorów receptora $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ -GABA-A. Obecnie obie cząsteczki zostały poddane poszerzonym badaniom *in vitro*, mających na celu ocenę potencjału terapeutycznego tych ligandów w schorzeniach, których etiopatogeneza łączy się z zaburzonym funkcjonowaniem układu GABA-ergicznego.

4.3.6. Koncepcja cząsteczek hybrydowych łączących aktywność receptora GABA-A i 5-HT₆ – nowa klasa związków o aktywności przeciwdepresyjnej i przeciwzapalnej (H5 i H6)

Publikacja H5:

Marcinkowska M.*; Mordyl B; Fajkis-Zajczkowska N; Siwek A; Karcz T; Gawalska A; Bucki A; Żmudzki P; Partyka A; Jastrzębska-Więsek M; Pomierny B; Walczak M; Smolik M; Pytka K; Mika K; Kotańska M; Kolaczowski M. Hybrid molecules combining GABA-A and serotonin 5-HT₆ receptors activity designed to tackle neuroinflammation associated with depression. *Eur J Med Chem.* 2023, 247, 115071. IF= 7.088, MNiSW: 140 pkt.

Publikacja H6:

Marcinkowska M.* Mordyl B, Siwek A, Głuch-Lutwin M, Karcz T, Gawalska A, Sapa M, Bucki A, Szafrąńska K, Pomierny B, Pytka K, Kotańska M, Mika K, Kolaczowski M. „Dual molecules targeting 5-HT₆ and GABA-A receptors as a new approach to combat depression associated with neuroinflammation”. *ACS Chem. Neurosci.* 2023, doi: 10.1021/acscchemneuro.3c00033 in press. IF= 5.780, MNiSW: 100 pkt.

Jak wspomniano we wstępie opracowania, istnieje wiele przesłanek klinicznych, wskazujących na obiecujący potencjał terapeutyczny cząsteczek modulujących aktywność receptorów GABA-A, w zakresie efektu przeciwdepresyjnego.¹⁷ Dysfunkcję transmisji GABA-ergicznej u chorych na depresję obserwuje się na kilku poziomach, począwszy od obniżenia poziomu GABA w płynie mózgowo-rdzeniowym,⁵¹ do zmian ekspresji transkryptów poszczególnych podjednostek receptora GABA-A.^{4,15}

Najnowsze badania kliniczne wskazują również na ścisłe powiązanie pomiędzy wystąpieniem epizodów depresyjnych, a aktywacją komponenty immunologicznej. Wyniki wielośrodkowych badań klinicznych wykazały istotny wzrost poziomu interleukin prozapalnych IL-6 oraz TNF- α u pacjentów z diagnozą depresji, wskazując na ścisłą zależność pomiędzy zaburzeniami nastroju a komponentą immunologiczną.⁵² Ponadto,

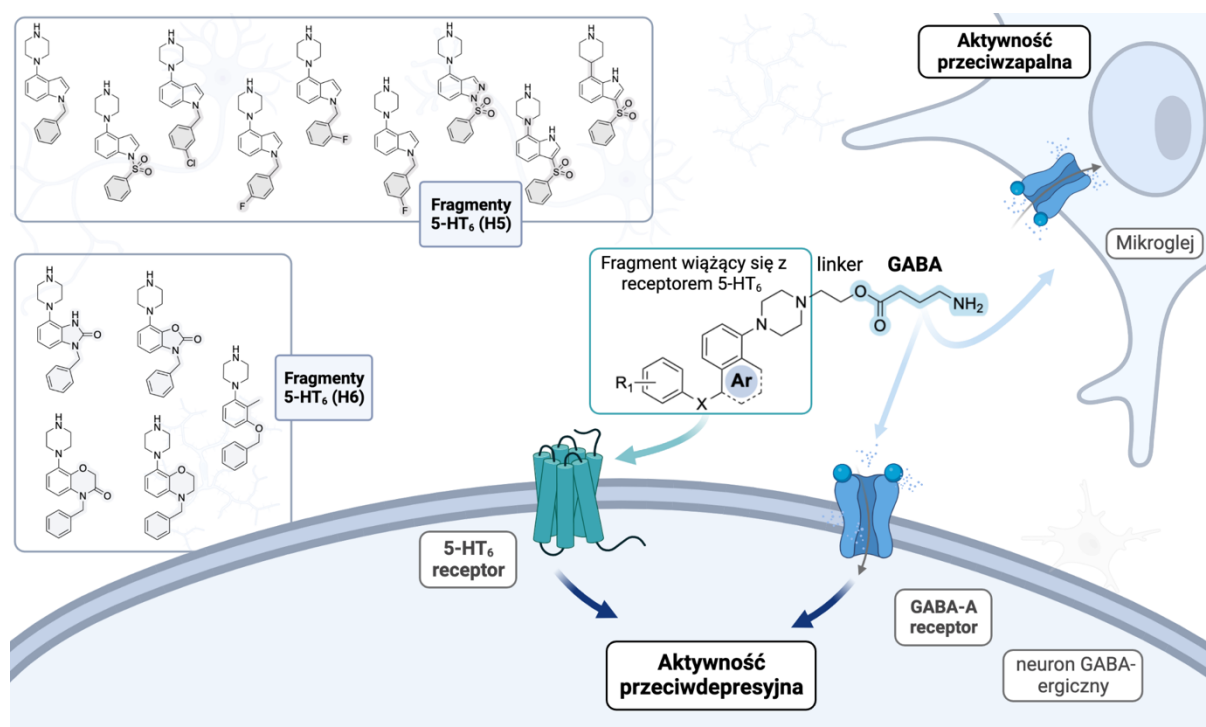
wysoki poziom IL-6 w surowicy pacjentów u których zdiagnozowano anhedonię, był istotnie wyższy niż u pacjentów grupy kontrolnej.⁵³ Obniżanie aktywności IL-6 przez przeciwciała IL-6, spowodowało istotnie kliniczną poprawę symptomów depresji, która pozytywnie korelowała z obniżeniem poziomu IL-6 w surowicy.⁵⁴ Co ciekawe, na poziomie komórkowym dowiedziono, iż podwyższony poziom interleukin IL-6 oraz TNF- α , może sabotować odpowiedź pacjenta na leczenie farmakologiczne lekami z grupy selektywnych inhibitorów wychwytu zwrotnego serotoniny (ang. selective serotonin reuptake inhibitors SSRIs), blokujących aktywność transportera dla serotoniny (SERT). Interleukiny TNF- α i IL-6 nasilają ekspresję i aktywność transportera SERT, zmniejszając w ten sposób terapeutyczne działanie leków przeciwdepresyjnych z grupy SSRI,^{55,56} i przyczyniając się do lekooporności.^{57,58} Odkrycia te były przełomem w zdefiniowaniu patomechanizmu depresji i otwały nowy obszar badawczy w dziedzinie psychoneuroimmunologii.

Co ciekawe, doniesienia literaturowe wskazują na potencjalne zaangażowanie receptorów GABA-A w regulację układu odpornościowego. Wykazano, iż oprócz ekspresji na neuronach, receptory GABA-A znajdują się również na komórkach mikrogleju,^{59,60} a także na komórkach układu odpornościowego krążących we krwi obwodowej.⁶¹ Z kolei aktywacja receptorów GABA-A przez GABA lub małowcząsteczkowe ligandy, skutkowało obniżeniem poziomu cytokin prozapalnych: IL-6, TNF- α , IL-1 β .^{59,62,63}

Biorąc pod uwagę powyższe dane, w pracach **H5** i **H6** za cel przyjęto opracowanie cząsteczek o oryginalnym mechanizmie działania, które wykazywałyby przede wszystkim działanie przeciwdepresyjne i jednocześnie adresowałyby kwestię komponenty immunologicznej. W tym celu cząsteczkę GABA, połączono poprzez linker etylowy z fragmentem odpowiedzialnym za interakcję z komplementarnym celem terapeutycznym; receptorem serotoninowym 5-HT₆ (Ryc. 4). Liczne badania wskazują na receptor 5-HT₆ jako istotny cel molekularny dla poszukiwania leków przeciwdepresyjnych. Teza ta znajduje uzasadnienie w licznych badaniach przedklinicznych które wykazały, iż blokada aktywności receptorów 5-HT₆ wywoływała efekt przeciwdepresyjny w zwierzęcych modelach.^{64,65} Z tego względu uznano receptor 5-HT₆ jako wysoce komplementarny cel terapeutyczny, którego antagonizm może wzmocnić profil przeciwdepresyjny dualnych ligandów. Z kolei, modulacja aktywności receptora GABA-A przez fragment GABA-ergiczny hybrydowej cząsteczki, ma zapewnić regulację neurotransmisji GABA-ergicznej oraz wnieść potencjalną aktywność przeciwzapalną. Badania molekularne potwierdziły ekspresję podjednostek receptora GABA-A na komórkach układu immunologicznego oraz komórek mikrogleju, i możliwość regulacji funkcji układu immunologicznego przez ligandy receptora GABA-A, co dało silną przesłankę do rozwoju tej koncepcji.

W efekcie realizacji badań opisanych w pracach **H5** oraz **H6**, opracowano pierwsze w klasie hybrydowe cząsteczki, jednocześnie modulujące funkcje receptora GABA-A oraz 5-HT₆. W pracy **H5**, opisano pierwszą serię związków hybrydowych, gdzie fragmentem odpowiedzialnym za interakcję z receptorem 5-HT₆, były głównie pochodne 4-(piperazyno-1-yl)-1H-indolu. Z pośród szerokiej palety selektywnych ligandów receptora 5-HT₆ opisanych w literaturze, wybrano głównie struktury posiadające układ 4-(piperazyno-1-yl)-1H-indolu,

z uwagi na dogodność syntetycznego połączenia z cząsteczką GABA, poprzez linker etylowy. Natomiast cząsteczki opisane w pracy **H6**, stanowią rozwinięcie koncepcji hybrydowych ligandów, gdzie eksplorowano nowe chemotypy odpowiedzialne za interakcję z receptorem 5-HT₆, zawierającym aromatyczne fragmenty benzyłowe (Ryc.5).



Ryc. 5. Koncepcja cząsteczek hybrydowych wykazujących jednoczesne powinowactwo do receptorów GABA-A oraz 5-HT₆. Struktury „fragmentów 5-HT₆” zbadane w ramach prac **H5** oraz **H6**.

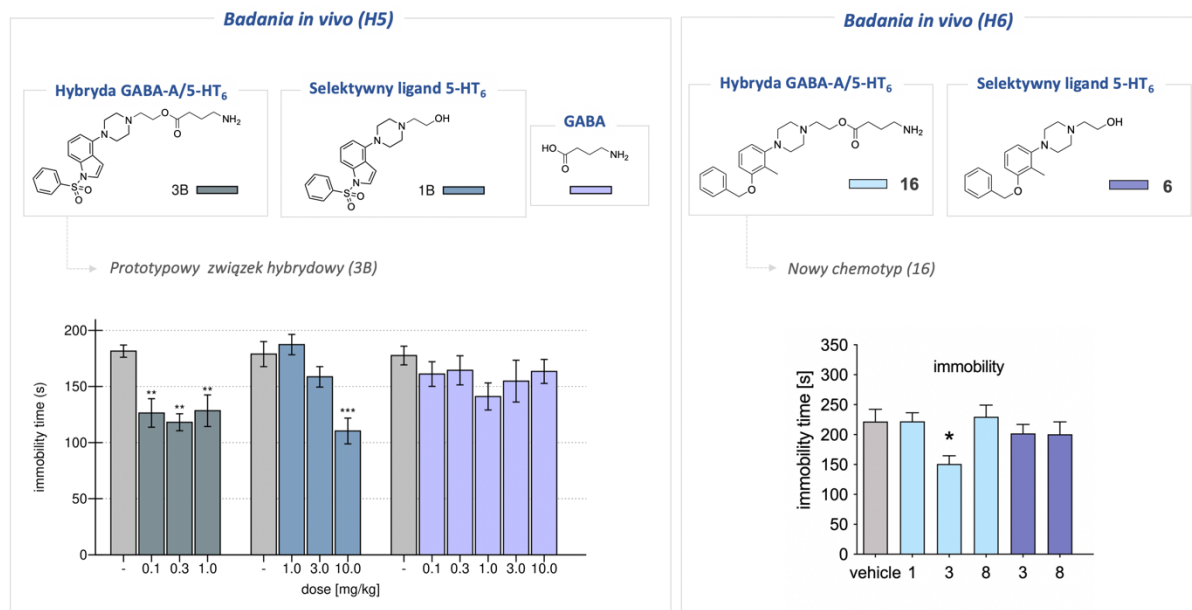
Obie serie cząsteczek hybrydowych (**H5** oraz **H6**) zostały zbadane w celu określenia powinowactwa do receptorów GABA-A oraz 5-HT₆ metodą radioreceptorową, co pozwoliło na sformułowanie zależności struktura-aktywność. Zaobserwowano, iż obie serie cząsteczek hybrydowych cechują się zrównoważonym powinowactwem do obu celów biologicznych w stężeniach nanomolowych. Związki pierwszej serii (**H5**) zawierające w strukturze donory wiązań wodorowych w postaci grupy sulfonilowej, były nieco bardziej aktywne względem receptora 5-HT₆ i GABA-A, w porównaniu do struktur zawierających fragmenty benzyłowe. Analogiczne preferencje dotyczyły cząsteczek drugiej serii (**H6**), gdzie struktury posiadające w swojej strukturze dodatkowe donory wiązań wodorowych w postaci grup karbonylowych w „fragmencie 5-HT₆”, cechowały się wyższym powinowactwem do receptora 5-HT₆ w porównaniu do pozostałych cząsteczek.

Dla najaktywniejszych pochodnych, wybranych na podstawie profilu receptorowego, potwierdzono właściwości antagonistyczne względem receptora 5-HT₆. Natomiast w badaniach elektrofizjologicznych, wykonanych metodą „automated patch clamp”, wybrane cząsteczki indukowały napływ jonów chlorkowych

do wnętrza komórki, w porównywalny sposób do naturalnego agonisty GABA. Wyniki te są komplementarne z analizami *in silico*, które potwierdziły, iż cząsteczki hybrydowe wiążą się z receptorem GABA-A w podobny sposób do GABA, w miejscu ortosterycznym, pomiędzy podjednostkami α_1 oraz β_2 . W przypadku receptora 5-HT₆, analiza na poziomie molekularnym wykazała, iż cząsteczki hybrydowe, układają się w podobny sposób do selektywnych ligandów 5-HT₆, nawiązując analogiczne oddziaływania w kieszeni wiążącej receptora 5-HT₆.

Na podstawie uzyskanych danych, wybrano dwie struktury wiodące, przedstawicielei obu serii - związek **3B** w pracy **H5** oraz **16** w pracy **H6**, które charakteryzowały się zrównoważonym powinowactwem do obu celów biologicznych ($K_i < 150$ nM). Obie struktury wiodące zostały poddane szerokiej palecie testów *in vitro*, mających na celu ocenę właściwości fizykochemicznych oraz lekopodobieństwo, a także stabilność chemiczną i metaboliczną. Badania te wykazały, iż związki wiodące cechuje wysoka rozpuszczalność w wodzie (> 2mg/mL), wysoka stabilność metaboliczna ($t_{0,5} > 60$ min) oraz zdolność do pasywnej penetracji przez błony biologiczne. Wartą podkreślenia cechą tych związków, jest ich relatywnie wysoka stabilność chemiczna w buforach fosforanowych o pH=7.4 i osoczu szczura, pomimo obecności wiązania estrowego w fragmencie linkera. Świadczą o tym wysokie stężenia hybrydy w mózgu, w postaci niezhydrolizowanej (**3B**), które zostały oznaczone w badaniach farmakokinetycznych. Obserwacje te są zgodne z doniesieniami innych autorów, którzy wykazali wysoką stabilność chemiczną dla cząsteczek zawierających fragment 2-(piperazyn-1-ylo)etylo 4-aminomaślanu.⁶⁶ Przykładowo, kandydat na lek związek BL-1020, zawierający w swojej budowie fragment 2-(piperazyn-1-ylo)etylo 4-aminomaślanu, cechował się wysoką stabilnością chemiczną co pozwoliło go rozpatrywać jako kandydata na lek w III fazie badań klinicznych w terapii schizofrenii.⁶⁷

Biorąc pod uwagę, iż obie cząsteczki wiodące (**3B** oraz **16**) charakteryzowały się korzystnymi parametrami fizykochemicznymi i właściwościami lekopodobnymi, zostały przekazane do badań behawioralnych, które miały zweryfikować ich potencjalną aktywność przeciwdepresyjną. W tym celu wybrano standardowe procedury behawioralne, służące do identyfikacji cząsteczek o potencjalnej aktywności przeciwdepresyjnej, test Porsolta. W tych samych warunkach eksperymentalnych, obie cząsteczki hybrydowe (**3B** oraz **16**) zostały zbadane wraz z osobnymi fragmentami odpowiedzialnymi za powinowactwo do receptora 5-HT₆ („fragment 5-HT₆”) (**1B** oraz **6**), które nie posiadały dołączonego fragmentu GABA-ergicznego (Ryc. 6). W przeprowadzonych badaniach, struktury hybrydowe **3B** oraz **16**, wykazały istotną aktywność przeciwdepresyjną w niskich dawkach (0.1- 3mg/kg - **3B**, 3mg/kg - **16**). Obie cząsteczki były znacząco bardziej aktywne od związków selektywnie oddziaływujących z receptorami 5-HT₆ (**1B** oraz **6**), natomiast podanie samego GABA, nie wywołało efektu przeciwdepresyjnego (Ryc. 6). Wyniki te sugerują, że jednoczesna modulacja GABA-A z 5-HT₆, jest korzystna dla obserwowanego globalnego efektu farmakologicznego cząsteczek hybrydowych.



Ryc. 6. Weryfikacja aktywności przeciwdepresyjnej związków hybrydowych opisanych w pracy H5 i H6 w teście Porsolta. Struktury molekuł wiodących (3B i 16) oraz selektywnych „fragmentów 5-HT₆” (1B oraz 6). Wykresy przedstawiają pomiar czasu trwania bezruchu (ang. immobility time), mierzonego w sekundach.

Zachęcające wyniki pierwszych testów behawioralnych skłoniły nas do zweryfikowania aktywności farmakologicznej prototypowej struktury hybrydowej **3B** w modelu depresji, przebiegającej z indukcją komponenty immunologicznej. Biorąc pod uwagę, iż u zwierząt doświadczalnych ogólnoustrojowe podanie lipopolisacharydu (LPS) wywołuje stany depresyjne oraz aktywuje komponentę immunologiczną, wybrano model subchronicznego podania LPS u szczurów. W celu weryfikacji efektu przeciwdepresyjnego wybrano test preferencji sacharozy, ponieważ miarą klinicznej anhedonii, jest u gryzoni obniżenie podaży sacharozy. Zaobserwowano, iż związek **3B** (w dawce 1mg/kg) po 7 dniach podawania, istotnie statystycznie obniżył poziom markerów stresu oksydacyjnego (tlenku azotu i reaktywnych form tlenu) oraz wpłynął na obniżenie poziomu IL-6 w mózgu. Jednocześnie, **3B** wpłynął na wyrównanie nastroju u zwierząt, gdyż zaobserwowano istotny wzrost podaży sacharozy u zwierząt, którym podawano związek **3B**, w porównaniu do grupy kontrolnej. Badania te potwierdziły, iż przedstawiciel nowej klasy cząsteczek hybrydowych, związek **3B** oprócz aktywności przeciwdepresyjnej, wykazuje równocześnie efekt przeciwzapalny.

Z uwagi na istotne podobieństwo strukturalne pomiędzy selektywnymi ligandami poszczególnych podtypów receptorów serotoninowych i potencjalny wpływ receptorów 5-HT_{1A} oraz 5-HT₇ na efekt przeciwdepresyjny, dla cząsteczki prototypowej **3B** wykonano badania powinowactwa do 5-HT_{1A}, 5-HT₇. Celem było wykluczenie możliwości interakcji z tymi celami biologicznymi, które mogłyby być zaangażowane w efekt przeciwdepresyjny związku **3B**. Badania te wykazały niskie powinowactwo do pozostałych podtypów (<30% w stężeniu 10⁻⁷ M), co sugeruje, iż obserwowany efekt **3B** był prawdopodobnie wynikiem interakcji z głównymi celami: receptorami 5-HT₆ oraz GABA-A. Dodatkowo, zweryfikowano wpływ **3B** na oddziaływanie

z tzw. niepożądanym celem biologicznym, jakim jest kanał potasowy hERG. Badania przeprowadzone metodą „automated patch clamp”, wykazały słabą blokadę kanału hERG ($IC_{50} = 4.5 \pm 0.5 \mu M$), co sugeruje obniżone ryzyko w aspekcie potencjalnego działania kardiotoksycznego.

W poszerzonym panelu badań *in vitro* przeprowadzono weryfikację efektu przeciwzapalnego molekuł hybrydowych (**3B** i **16**). Badania wykonane na linii komórkowej mikrogleju BV-2 potwierdziły, iż po stymulacji LPS, cząsteczki hybrydowe **3B** i **16** istotnie obniżyły poziom markerów stresu oksydacyjnego oraz poziom interleukin prozapalnych IL-6 i TNF- α . Jednocześnie zaobserwowano, iż selektywne „fragmenty 5-HT₆” (**1B** i **6**) nie wpłynęły na poziom oznaczanych markerów co sugerowało, że obserwowany efekt przeciwzapalny jest wynikiem modulacji receptora GABA-A. Co istotne, w przypadku związku **3B** aktywność przeciwzapalna została zablokowana przez podanie antagonisty receptora GABA-A, pikrotoksyny, co dodatkowo potwierdza, iż zaobserwowany efekt pochodzi od komponenty GABA-ergicznej.

Wnioski i podsumowanie badań pracy H5 i H6

Badania przedstawione w pracy **H5** i **H6**, pozwoliły na opracowanie pierwszych w klasie cząsteczek hybrydowych, łączących aktywność antagonistyczną do receptora 5-HT₆ oraz agonistyczną do receptora GABA-A, o wyraźnej i nasilonej w stosunku do selektywnych ligandów tych celów biologicznych, aktywności przeciwdepresyjnej oraz przeciwzapalnej. Badania te wskazują, iż jednoczesna modulacja aktywności obu receptorów GABA-A oraz 5-HT₆, może być obiecującą strategią w potencjalnej terapii zaburzeń nastroju przebiegających z komponentą zapalną. Ponadto, w ramach przeprowadzonych badań wykazano, iż komponenta GABA-ergiczna struktury hybrydowej, po przez interakcję z receptorami GABA-A, efektywnie wygasa stany zapalne indukowane LPS. Szczególnie istotny jest wpływ uzyskanych wyników na obniżenie poziomu IL-6 *in vivo*, gdyż badania kliniczne wykazały, że leczenie ukierunkowane na IL-6, może otworzyć nowe możliwości dla pacjentów słabo reagujących na obecnie dostępne leczenie farmakologiczne. Zatem, wykazane właściwości immunofarmakologiczne tej nowej klasy związków mogą wytyczyć nowy kierunek w projektowaniu struktur o aktywności przeciwdepresyjnej i przeciwzapalnej. Opracowane nowe narzędzia farmakologiczne staną się również przedmiotem dalszych badań w tej nowo rozwijającej się gałęzi badań z zakresu psychoneuroimmunologii. Z uwagi na fakt, iż modulacja reakcji immunologicznych przez związki GABA-ergiczne jest stosunkowo nowym kierunkiem badawczym, opracowane związki hybrydowe będą służyć jako narzędzia farmakologiczne do oceny aktywności komórek układu immunologicznego i mikrogleju w wygaszaniu procesu zapalnego. Biorąc pod uwagę ekspresję receptorów GABA-A na komórkach układu immunologicznego, oba ligandy **3B** i **16**, są obecnie przedmiotem zaawansowanych badań farmakologicznych, które ocenią ich efekt przeciwzapalny na makrofagach linii RAW 264.7 oraz wpływ na wewnątrzkomórkowe szlaki sygnalizacyjne, zależne od modulacji receptora GABA-A.

4.3.7. Wpływ uzyskanych wyników badań na rozwój dyscypliny: nauki farmaceutyczne

Uzyskane wyniki przyczyniły się do wzbogacenia wiedzy w na temat potencjału terapeutycznego ligandów receptora GABA-A w schorzeniach OUN oraz do wskazania nowych możliwości terapeutycznych i narzędzi farmakologicznych, które w przyszłości mogą być pomocne w poszukiwaniu leków i nowych metod terapii. Wyniki badań zawartych w pracach **H1-H6** przyczyniły się do rozwoju nauki o leku i dyscypliny nauki farmaceutyczne, na kilku poziomach:

1) Na poziomie farmakologicznym wskazano na możliwość wykorzystania receptorów GABA-A w nowych wskazaniach terapeutycznych. Wykazano, iż modulacja funkcji receptorów GABA-A może przynieść skuteczność farmakologiczną w łagodzeniu objawów schizofrenii oraz depresji z towarzyszącą aktywacją komponenty immunologicznej. Patofizjologia tych schorzeń jest ściśle powiązana z dysfunkcją przekazywania GABA-ergicznego,^{3,16} stąd ligandy ukierunkowane na modulację receptora GABA-A, mogą przynieść korzyści terapeutyczne.

Wspólnie z badaczami z IPIŃ z Warszawy, wskazaliśmy **receptory α_1 -GABA-A jako nowe cele molekularne w poszukiwaniu atypowych związków przeciwpsychotycznych**. Badania przeprowadzone w pracy **H1** i **H2** potwierdziły skuteczność farmakologiczną pozytywnych allosterycznych modulatorów receptorów GABA-A w łagodzenia epizodów psychotycznych. Tym samym przyczyniły się do rozwoju nowych substancji przeciwpsychotycznych, angażujących alternatywne mechanizmy działania, niezwiązane z bezpośrednim hamowaniem działania dopaminy (z ang. "non-dopaminergic agents"). Opracowane cząsteczki wzbogaciły pulę „non-dopaminergic agents”, które stanowią najnowszy trend w poszukiwaniu innowacyjnych metod terapii schizofrenii. Ponadto nowe związki będą służyć jako zaawansowane sondy molekularne do weryfikacji ich potencjału terapeutycznego w leczeniu schizofrenii, w dalszych pracach badawczych. Przeprowadzone badania mogą się również przyczynić się do opracowania nowej strategii selekcji leków do terapii schizofrenii, uwzględniające pozytywne allosteryczne modulatory receptorów GABA-A.

Koncepcja dualnych ligandów łączących synergię aktywności receptorów 5-HT₆ i GABA-A, przedstawiona w ramach prac **H5** i **H6**, przyczyniła się do rozwinięcia najnowszego trendu badawczego, skupiającego się na poszukiwaniu substancji o aktywności przeciwdepresyjnej, opierających się na modulacji funkcji receptorów GABA-A. W 2021 roku została ogłoszona nowa klasa „GABA-ergicznych leków przeciwdepresyjnych”, po oficjalnym zarejestrowaniu i wprowadzeniu na rynek breksanolonu oraz zuranolonu, dwóch allosterycznych modulatorów ekstrasynaptycznych receptorów GABA-A.¹⁷ Jako związki pierwsze w klasie, cząsteczki hybrydowe (**3B** i **16**), oprócz istotnych właściwości przeciwdepresyjnych, adresują również komponentę immunologiczną. Tym samym, zidentyfikowane cząsteczki stanowią istotny **wkład w rozwój psychoneuroimmunologii**, wytyczając nowe kierunki poszukiwania terapii depresji przebiegającej z aktywacją komponenty immunologicznej. Natomiast struktury chemiczne uzyskanych hybryd mogą stanowić prototyp w oparciu o który zostaną zaprojektowane w przyszłości kandydaci na leki.

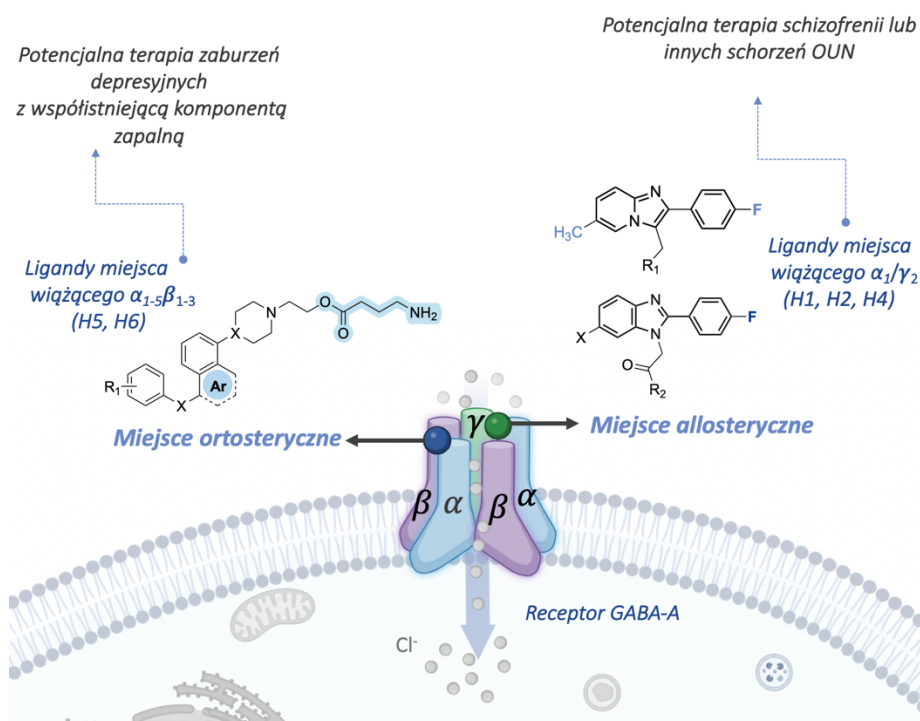
Kolejnym wkładem w rozwój dziedziny nauki farmaceutycznej, **stanowi opracowanie małowcząsteczkowych substancji modulujących funkcje mikrogłęju (H5, H6)**. Obecnie uznaje się, że cząsteczki zdolne do zmiany stanu aktywności mikrogłęju, posiadają duży potencjał terapeutyczny w różnorodnych schorzeniach neurodegeneracyjnych. Z uwagi na fakt, iż receptory GABA-A znajdują się nie tylko na komórkach mikrogłęju i astrocytów, ale również na obwodowych komórkach odpowiedzi immunologicznej, ligandy GABA-A mogą wykazywać funkcje immunomodulujące na kilku poziomach. Daje to możliwość rozszerzenia perspektywy terapeutycznej obejmującej schorzenia przebiegające z aktywacją obwodowej komponenty immunologicznej jak np. ból neuropatyczny. Obecnie, zidentyfikowane narzędzia farmakologiczne (**3B i 16**) modulujące aktywność receptora GABA-A, stały się przedmiotem zaawansowanych prac immunologicznych które dostarczą cennych informacji na temat farmakologicznej modulacji reakcji zapalnych, zależnych od receptorów GABA-A.

2) Na poziomie molekularnym, przeprowadzone badania poszerzyły wiedzę na temat punktów uchwytu nowych związków aktywnych w receptorze GABA-A, które istotnie różnicują mechanizmy terapeutyczne.

Receptor GABA-A jest pentamerem którego podjednostki układają się w konfiguracji $\alpha, \beta, \gamma, \alpha, \beta$ tworząc wewnątrz kanał jonowy, posiadający dwa główne miejsca wiązania dla ligandów: ortosteryczne i allosteryczne (Ryc. 7). Cząsteczki opisane w ramach prac **H1, H2 i H4** łącząc się z receptorem GABA-A w miejscu allosterycznym, pomiędzy podjednostką α_1 i γ_2 , wykazują cechy pozytywnych allosterycznych modulatorów. Jak wykazały prace **H1 i H2**, ligandy działające w mechanizmie allosterycznym, wywierają efekt przeciwpyschotyczny w modelach zwierzęcych i mogą stanowić punkt wyjścia do projektowania nowych leków przeciwpyschotycznych. Z kolei badania opisane w pracy **H4** pozwoliły zidentyfikować nowy chemotyp pozytywnych allosterycznych modulatorów receptora GABA-A posiadający w strukturze pierścieni 2-(4-fluorofenylo)-6-metylo-1H-benz[d]imidazolu oraz 2-(4-fluorofenylo)-1H-benz[d]imidazolu. Badania pozwoliły ustalić niezbędne wymagania strukturalne dla pochodnych układu 2-(4-fluorofenylo)-6-metylo-1H-benz[d]imidazolu, odpowiedzialnych za ich aktywność biologiczną, które mogą ułatwić dalsze projektowanie cząsteczek aktywnych o cechach allosterycznych modulatorów. Obecnie trwają zaawansowane prace farmakologiczne które mają na celu weryfikację ich właściwości farmakologicznych w schorzeniach, których etiopatogeneza łączy się z zaburzonym funkcjonowaniem układu GABA-ergicznego.

Cząsteczki hybrydowe opisane w pracach **H5 i H6**, modyfikują aktywność receptorów GABA-A poprzez mechanizm ortosteryczny i wykazują cechy agonistów/częściowych agonistów, wiążąc się pomiędzy podjednostkami α_{1-6} i β_{1-2} . Jak wykazały nasze badania, ligandy aktywujące receptor GABA-A w mechanizmie ortosterycznym na komórkach mikrogłęju, wywołują efekt przeciwzapalny. Warto dodać, iż do tej pory w literaturze naukowej miejsce wiązania w receptorze GABA-A odpowiadające za modulację komponenty immunologicznej nie zostało dokładnie sprecyzowane. Stąd też opracowane ligandy przyczyniły się do

zwiększenia wiedzy na temat roli receptorów GABA-A w tym zakresie. Natomiast w badaniach behawioralnych, zaobserwowano istotny wpływ ligandów ortosterycznych na zachowanie, gdzie efekt przeciwdepresyjny prawdopodobnie jest wynikiem synergii pomiędzy receptorami GABA-A a 5-HT₆.



Ryc. 7. Zdefiniowane punkty uchwytu ligandów receptora GABA-A, które różnicują mechanizmy farmakologiczne i wyznaczają nowe ścieżki terapeutyczne schorzeń OUN.

Wyniki przeprowadzonych badań opisanych w pracy (H5 i H6), otwierają możliwości eksploracji nowej przestrzeni chemicznej, projektowania i syntetyzowania ligandów ortosterycznych oraz allosterycznych, wykazujących obiecujący potencjał terapeutyczny w schorzeniach OUN, przebiegających z komponentą immunologiczną. Opracowane nowe struktury o korzystnych właściwościach lekopodobnych, mogą stać się punktem wyjścia do projektowania i opracowania nowych leków.

3) Na poziomie metodycznym, opracowano nową, szybką i wydajną metodę syntezy zolpidemu i analogów fluorowanych, wykorzystującą promieniowanie mikrofalowe. Nowa metodyka, pozwala na otrzymanie dużych ilości związków narzędziowych, o wysokim stopniu czystości, spełniających wymogi badań farmakologicznych. Niewątpliwą zaletą syntezy prowadzonej w reaktorze mikrofalowym, jest możliwość szybkiego uzyskania cząsteczek narzędziowych i zredukowanie ilości rozpuszczalników w procesie syntezy, **co ma bezpośrednie znaczenie dla środowiska i wpisuje się w zasady zielonej chemii.** Wyniki badań przełożyły się na aspekt praktyczny, gdyż opisaną metodologię zastosowano do syntezy winianu zolpidemu, który został wykorzystany przez współpracowników z Instytutu Farmakologii IFPAN w Krakowie, w badaniach

przedklinicznych potencjalnej terapii drżenia. Wyniki badań zostały opublikowane w pracy **D30**. Opracowana metoda jest również wykorzystywana w badaniach własnych, gdzie winian zolpidemu jest substancją referencyjną w kierowanym przeze mnie projekcie Sonata Bis.

Reasumując, wyniki opisanych badań wpłynęły na szeroko pojęty rozwój dziedziny nauki farmaceutycznej skupiający się na odkrywaniu i rozwoju nowych leków. Wyniki badań, wpłynęły na rozwój nauki o leku w zakresie projektowania substancji aktywnych biologicznie. Nowe struktury chemiczne mogą stanowić prototyp, w oparciu o który zostaną zaprojektowane w przyszłości kandydaci na leki. Przeprowadzone badania przyczyniły się również do wskazania receptora GABA-A jako celu biologicznego, o dużym potencjale terapeutycznym w schorzeniach OUN takich jak schizofrenia i depresja z towarzyszącą aktywacją układu immunologicznego. Badania wskazane w pracach **H1-H6**, mogą zwiększyć w przyszłości możliwości terapeutycznego postępowania wobec schorzeń OUN, oraz stać się punktem wyjścia do opracowania nowych metod terapii, angażujących cząsteczki o profilu GABA-ergicznym.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

Moja istotna aktywność naukowa była realizowana w 3 ośrodkach zagranicznych podczas **2 stypendiów wyjazdowych oraz 3-letnich studiach doktoranckich:**

- 1) Department of Medicinal Chemistry and Chemical Biology, Utrecht University, Holandia (5-miesięczny staż)
- 2) Dipartimento di Chimica, Materiali ed Ingegneria Chimica 'G. Natta' del Politecnico di Milano, Mediolan, Włochy (stypendium Marie Curie Early Stage Resercher -6 miesięcy oraz 3 letnie studia doktoranckie)
- 3) Departamento de Química Orgánica, Facultad de Farmacia, Universitat de València, Walencia, Hiszpania (4-miesięczny staż)

Rezultatami powyższych aktywności było wiele publikacji w których jestem współautorem (nazwisko rodowe: Jagodzińska):

D1. Brouwer AJ, Elgersma RC, **Jagodzinska M**, Rijkers DT, Liskamp RM. Delayed fibril formation of amylin (20-29) by incorporation of alkene dipeptidosulfonamide isosteres obtained by solid phase olefin cross metathesis. *Bioorg Med Chem Lett.* **2008**, *18* (1), 78-84. doi: 10.1016/j.bmcl.2007.11.009.

D2. **Jagodzinska M**, Huguenot F, Zanda M. Studies on a three-step preparation of β -fluoroalkyl acrylates from fluoroacetic esters. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 9, 2042-2046. doi: 10.1016/j.tet.2006.12.045.

D3. Jagodzinska M, Huguenot F, Candiani G, Zanda M. Assessing the bioisosterism of the trifluoromethyl group with a protease probe. *ChemMedChem*. **2009**, 4, (1), 49-51. doi: 10.1002/cmdc.200800321.

D4. Sani M, Sinisi R, Molteni M, **Jagodzinska M,** Huguenot F, Bruché L, Zanda M.; 'The trifluoroethylamine function as peptide bond replacement' *Chemistry today* 2006, 24, 42-43

D5. Shankar P, **Jagodzinska M,** Sani M, Fossati G, Lezzari P, Zanda M, 'Synthesis and Structure-Activity Relationship Studies of Novel Tubulysin U and V Analogues – Effect of Variations in Tubuvaline on Cytotoxicity' *Org Biomol Chem*. **2013**, 11, 2273-87.

B1. Sinisi R, **Jagodzinska M,** Candiani G, Huguenot F, Sani M, Volonterio A, Maffezzoni R, Zanda M.; 'Fluorinated Inhibitors of Matrix Metalloproteinases' in 'Fluorine in Medicinal Chemistry and Chemical Biology' Willey 2009, Pages: 99–115.

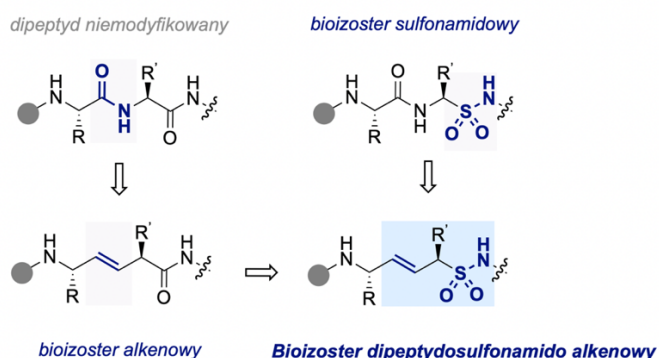
B2. Bruché, L.; Viani, F.; Candini, G.; Hugenot, F.; **Jagodzinska, M.;** Moussier, N.; Sani, M.; Zanda, M.; 'Fluorinated Inhibitors of Matrix Metalloproteinases' in "Current Fluoroorganic Chemistry", Soloshonok, V. A., Yamazaki, T. Eds.; ACS Publications Division and Oxford University Press, Washington, D.C., 2007, pp. 420-430

Byłam również zaangażowana w realizację dwóch projektów europejskich realizowanych na Politechnice w Mediolanie:

1) HPRN-CT- 2002;00181 'Selective Fluorinated Inhibitors of Matrix Metalloproteinases 3 and 9- FLUOR MMPI'

2) European Commission Integrated Project, LSHC-CT-2003-503233 'Selective targeting of angiogenesis and of tumour stroma-STROMA'.

Podczas stypendium Erasmus w Department of Medicinal Chemistry and Chemical Biology, Utrecht University, Holandia pracowałam nad syntezą chemiczną nowych bioizosterów wiązania dipeptydowego, a uzyskane przeze mnie wyniki stały się podstawą do napisania pracy magisterskiej o tytule „Synteza alkenowych dipeptydosulfonamidowych izosterów biologicznych“. W wyniku realizacji powyższych badań opracowano nowe bioizostery wiązania dipeptydowego, opartego na schemacie alkenowych pochodnych dipeptydosulfonamidów (Ryc. 7).



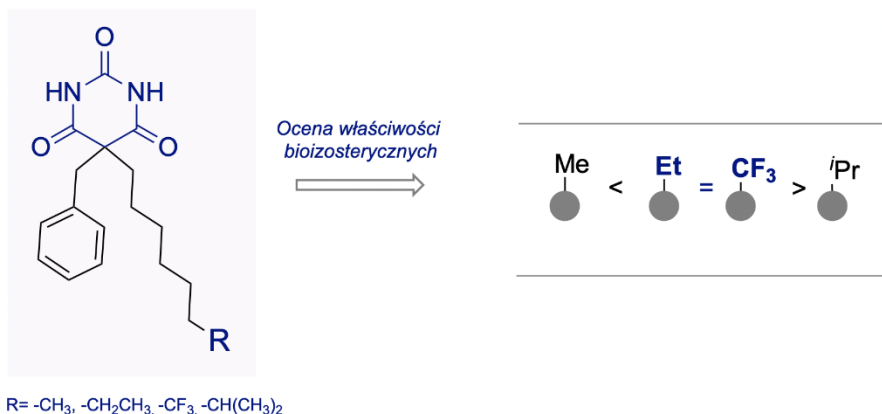
Ryc. 7. Struktury chemiczne podstawowego dipeptydu niemodyfikowanego, podstawowych bioizosterów wiązania peptydowego oraz nowego bioizosteru dipeptydosulfonamido alkenowego.

Nowy układ bioizosteryczny stał się później narzędziem do tworzenia, trwałych, opornych na hydrolizę enzymatyczną długich, modyfikowanych peptydów biologicznie aktywnych. Wyniki badań zostały również opublikowane w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym **D1**.

Chcąc poszerzyć moje horyzonty naukowe, zaraz po odbytym stażu w aptece otwartej w maju 2005, rozpoczęłam pracę w europejskim projekcie: HPRN-CT- 2002;00181 'Selective Fluorinated Inhibitors of Matrix Metalloproteinases 3 and 9- FLUOR MMPI', realizowanym w ramach sześciomiesięcznego stypendium Marie Curie dla młodych naukowców (Early Stage Resercher), finansowanego z ramienia europejskiego programu badawczego RTN FPVI, na Politechnice w Mediolanie. Ówczesna grupa badawcza kierowana przez prof. Matteo Zandę, stała się później miejscem realizacji mojej pracy doktorskiej.

W trakcie studiów doktoranckich trwających od stycznia 2006 do grudnia 2009 na Politechnice w Mediolanie (Włochy), byłam zaangażowana w dwa projekty badawcze: wyżej wymieniony RTN „Fluor MMPI” obejmujący syntezę fluorowych pochodnych kwasu hydroksamowego i barbiturowego oraz „STROMA” związany z syntezą analogów tubulizyny U. Dzięki pracy w zespole prof. Zandy, miałam możliwość doskonalenia swoich umiejętności syntetycznych z zakresu chemii fluoru, wieloetapowej syntezy naturalnych produktów (*total synthesis*) oraz izomerów optycznych. W ramach swojej pracy doktorskiej opracowałam efektywną metodę syntezy kluczowych fluorowanych bloków budulcowych, zawierających ugrupowania $-CF_3$, $-CHF_2$, $-C_2F_5$. Trójetapowa ścieżka syntezy, opierająca się na reakcjach: kondensacji Claisena, selektywnej redukcji i dehydrogenacji mediowanej przez P_2O_5 , pozwoliła otrzymać fluorowane alkeny, które posłużyły do otrzymania cząsteczek biologicznie aktywnych - inhibitorów enzymów MMP-3 i 9. Metoda została przedstawiona w publikacji **D2** w której jestem pierwszym autorem. Aspekty dotyczące syntezy inhibitorów enzymów MMP zostały również przedstawione w rozdziałach dwóch książek **B1** i **B2**.

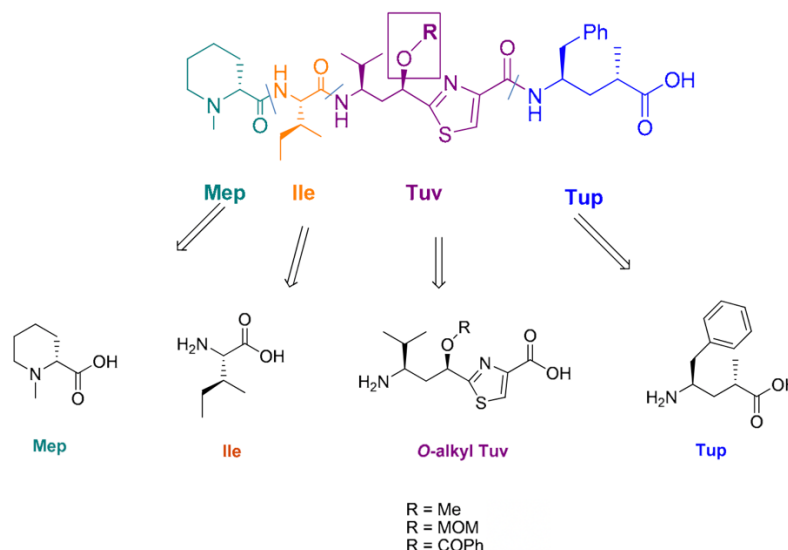
Kolejnym aspektem prowadzonych badań na Politechnice w Mediolanie była synteza fluorowanych pochodnych kwasu barbiturowego, które wykazywały aktywność hamującą w stosunku do enzymów: MMP-2 i MMP-9. Związki te posiadały różnorodne podstawniki fluorowane w dystalnej części łańcucha alkilowego i umożliwiły eksplorowanie właściwości bioizosterycznych grupy trifluorometylowej (CF_3). Otrzymaną przeze mnie serię związków użyto jako narzędzi do porównywania aktywności pochodnej trifluorometylowej z alkilowymi analogami, posiadającymi odpowiednio grupę etylową, metylową oraz izopropylową. Na podstawie wartości IC_{50} do izoform MMP-2 i MMP-9, porównano aktywność barbituranów posiadających podstawnik trifluorometylowy z analogami alkilowymi, gdzie wielkość podstawników dała się ująć w szereg: $Me < Et = CF_3 > iPr$. Badania te pozwoliły stwierdzić, że grupa trifluorometylowa jest bioizosterem grupy etylowej, ponieważ wartości IC_{50} obu pochodnych były zbliżone.



Ryc. 8. Struktury chemiczne podstawowego dipeptydu niemodyfikowanego, podstawowych bioizosterów wiązania peptydowego oraz nowego dipeptydosulfonamido alkenowego bioizosteru.

Warto wspomnieć, iż kwestia bioizosteryzmu grupy -CF₃ była od lat przedmiotem wielu badań, gdzie sugerowano jej podobieństwo do grupy metylowej, etylowej lub izopropylowej. Dlatego też uzyskane wyniki badań, stanowiły istotny wkład w rozwój chemii leków i poszerzyły wiedzę na temat bioizosteryzmu grupy -CF₃. Praca opisująca w/w badania, w której jestem pierwszym autorem, została opublikowana w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym **D3** i od 2008 roku do 3.03.2023 została zacytowana aż 100 razy (wg. google scholar).

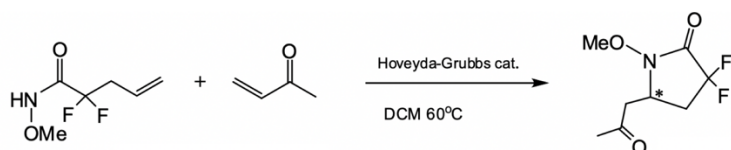
W trakcie realizacji badań w ramach pracy doktorskiej, jednym z celów było opracowanie wydajnej metody syntezy produktu naturalnego tubulizyny U. Tubulizyna U to produkt naturalny produkowany przez bakterie z rodzaju *Myxobacteria*. Posiada silne właściwości cytotoksyczne względem komórek nowotworowych, wynikające z zdolności do dezintegracji mikrotubul i hamowania podziałów komórkowych. Z tego względu, tubulizyna U zyskała zainteresowanie jako potencjalny lek cytotoksyczny, a jej potencjał biologiczny jest nadal szeroko eksplorowany w różnorodnych badaniach *in vitro*. Naturalna tubulizyna U to tetrapeptyd, który jest zbudowany z 3 atypowych aminokwasów: Tup, Tuv, Mep oraz L-lizyny, posiadający sześć centrów chiralnych, co powoduje, że synteza organiczna jest bardzo wymagająca. Występujący w cząsteczce naturalnej tubulizyny U fragment estrowy, jest bardzo podatny na hydrolizę, co powoduje utratę aktywności biologicznej. Z tego względu w ramach europejskiego projektu: LSHC-CT- 2003-503233 'Selective targeting of angiogenesis and of tumour stroma-STROMA' realizowanego przez grupę prof. Zandy, uczestniczyłam w pracach mających na celu modyfikację struktury tubulizyny U we fragmencie Tuv. Celem było otrzymanie analogu strukturalnego cechującego się zwiększoną trwałością hydrolityczną, przy zachowanej aktywności biologicznej (Ryc. 9).



Ryc. 9. Struktury chemiczne tubulizyny U i jej analogów otrzymanych w ramach projektu „STROMA”.

W wyniku przeprowadzonych badań, otrzymano trzy alkilowe analogi tubulizyny U, z czego pochodna posiadająca ugrupowanie metoksymetylowe (MOM) cechowała się wysoką aktywnością cytostatyczną ($IC_{50} = 22$ nM) porównywalną do naturalnej tubulizyny U ($IC_{50} = 3.8$ nM), jednocześnie związek ten był stabilny i nie ulegał hydrolizie. Badania te wykazały, iż grupa metoksymetylowa może służyć jako bioizoster grupy acetylowej, zwiększając jednocześnie stabilność chemiczną struktur biologicznie aktywnych. Wynik badań opublikowano w pracy D5.

Od kwietnia 2007 do lipca 2007 przebywałam na stypendium wyjazdowym na Uniwersytecie w Walencji (Hiszpania) w ramach stypendium „visiting scholarship”, gdzie pracowałam w grupie badawczej prof. Santosa Fustero. W trakcie stypendium przeprowadziłam syntezę azowych związków heterocyklicznych i ich fluorowcowych pochodnych, jak również reakcji w jednym naczyniu (tzw. „one-pot reactions”). Badanie te przyczyniły się do rozwoju nowych metod syntezy organicznej.



Po uzyskaniu stopnia doktora chemii przemysłowej i inżynierii chemicznej na Politechnice w Mediolanie (Włochy), byłam zaangażowana w prowadzenie interdyscyplinarnych badań w Katedrze Chemii Farmaceutycznej, Wydziału Farmaceutycznego UJCM, realizowanych **we współpracy z krajowymi i zagranicznymi ośrodkami badawczymi:**

1) z Prof. dr hab. Pawłem Mierzejewskim z Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie

Efektem współpracy były prace H1, H2 oraz D7, **D8** i **D11**.

2) z Prof. dr hab. Przemysławem Bienkowskim z Katedry i Kliniki Psychiatrycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Efektem współpracy były prace **H1**, **H2** oraz **D7**, **D8** i **D11**.

3) z Prof. dr hab. Piotrem Kowalskim i dr Jolantą Jaśkowską z Politechniki Krakowskiej

Efektem współpracy jest praca **D7** oraz 2 ogłoszenia patentowe (załącznik 4).

4) z działem badawczo-rozwojowy firmy Adamed

W ramach projektu „Opracowanie innowacyjnego leku stosowanego w terapii schorzeń ośrodkowego układu nerwowego (OUN) – schizofrenii, depresji, lęku”, kierowanego przez prof. dr. hab. Marcina Kołaczekowskiego, opracowano 2 patenty i 4 zgłoszenia patentowe, w których jestem współautorem. (Szczegółowy wykaz znajduje się w załączniku 4). W ramach kolejnego projektu: „Opracowanie nowych kandydatów na leki w terapii behawioralnych i psychologicznych symptomów demencji (BPSD)”, realizowanego w ramach współpracy z firmą Adamed, opracowano kolejne zgłoszenie patentowe oraz patent (załącznik 4) w których jestem współautorem, a także publikacje **D7**, **D8**, **D11**.

4) z dr hab. Katarzyną Kauter z Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie

Efektem współpracy jest wspólna praca **D30**. Jestem również wykonawcą w gracie OPUS (OPUS 14, 2017/27/B/NZ7/00289) kierowanym przez dr hab. Katarzynę Kuter.

5) z dr Suatem Sari z Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, Ankara, Turcja

Efektem współpracy była praca **D25**.

6) z prof. JM. Witkin i prof. J.Cook z Uniwersytetu Wisconsin-Milwaukee (USA)

Efektem współpracy była praca **D30**.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

6.1. Działalność dydaktyczna

6.2.1. Prowadzone zajęcia

Od momentu zatrudnienia na etacie naukowo-dydaktycznym w Zakładzie Chemii Leków Katedry Chemii Farmaceutycznej UJCM w 2011 roku, istotnym obszarem mojej aktywności są zajęcia ze studentami. Moja aktywność dydaktyczna obejmuje seminaria oraz ćwiczenia laboratoryjne z przedmiotu Chemia Leków dla studentów III roku Wydziału Farmaceutycznego UJCM kierunku farmacja. W latach 2020-2022 brałam udział w modyfikacji struktury prowadzonych ćwiczeń i seminariów z przedmiotu Chemia leków. Byłam odpowiedzialna za opracowanie koncepcji ćwiczeń praktycznych obejmujących nowoczesne techniki analityczne stosowane obecnie w przemyśle farmaceutycznym, w zakresie badania rozpuszczalności preparatów leczniczych metodą kinetyczną oraz analizę preparatów farmaceutycznych wykorzystując

metodę termodynamiczną, z wykorzystaniem HPLC. Powyższe zagadnienia wymagały również opracowania materiałów dydaktycznych, które zostały udostępnione studentom. Obecnie trwają prace nad zebraniem tych treści i przygotowaniem ich w postaci skryptu do ćwiczeń.

Od roku akademickiego 2017/2018 roku prowadzę wykłady oraz seminaria w języku angielskim dla studentów kierunku anglojęzycznego Drug Discovery and Development, z przedmiotów Chemistry in Pharmaceutical Sciences Principles of Medicinal Chemistry, Medicinal Chemistry, oraz Master Project.

6.2.2. Opieka naukowa nad magistrantami i studentami

Od 2011 roku do chwili obecnej byłem promotorem/opiekunem naukowym 12 prac magisterskich studentów Wydziału farmaceutycznego UJCM oraz pełniłem funkcję opiekuna naukowego dwóch studentek z Wydziału Chemii UJ (mgr Nikola Fajkis-Zajączkowska oraz lic. Katarzyna Szafrńska). Staram się również inspirować i zachęcać studentów do podejmowania badań i działalności naukowej. Obie studentki Wydziału Chemii UJ były zaangażowane w realizację badań w ramach projektów badawczych kierowanych przeze mnie - Sonata oraz Sonata Bis, a także uczestniczyły w przygotowaniu publikacji popularnonaukowych do czasopisma Wiadomości oraz Chemiczne Kosmos (D35 i D36). Pełniłem również funkcję opiekuna naukowego 3 studentów zaangażowanych w działalność badawczą w Katedrze Chemii Farmaceutycznej UJCM.

Innym elementem pracy ze studentami jest sprawowanie funkcji opiekuna praktyk studenckich w ramach programów Erasmus+ (2 studentki) oraz wakacyjnych praktyk (1 studentka) w ramach programu Student Exchange Programme (SEP) organizowanego przez Polskie Towarzystwo Studentów Farmacji UJ CM.

6.2.3. Funkcja promotora pomocniczego rozpraw doktorskich

Pełniłem funkcję promotora pomocniczego w dwóch przewodach doktorskich w dyscyplinie nauki farmaceutyczne. Oba tematy rozpraw dotyczyły roli receptorów GABA-A w promowaniu rekonwalescencji poudarowej, które wchodziły w zakres kierowanego przeze mnie grantu Sonata BIS (2018/30/E/NZ7/00247).

- 1) Zakończony przewód doktorski dr n. farm. Barbary Mordyl zwieńczony został rozprawą doktorską „Ocena aktywności pozytywnych modulatorów allosterycznych receptora GABA-A w modelach udaru niedokrwiennego mózgu” (obrona 9.12.2022). Stopień doktora w dyscyplinie nauki farmaceutyczne został nadany na podstawie Uchwały Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne UJ z dnia 19.12.2022 r.
- 2) Wszczęty przewód doktorski mgr Nikoli Fajkis-Zajączkowskiej „Synteza i analiza zależności struktura-aktywność nowych ligandów receptora GABA-A o potencjalnym działaniu neuroprotektynym”. Mgr Nikola Fajkis-Zajączkowska była zatrudniona na stanowisku stypendysty/doktoranta w granicie Sonata Bis (2018/30/E/NZ7/00247). Praca została złożona i jest po recenzjach pozytywnych, z wyróżnieniem. Planowana obrona w czerwcu bieżącego roku.

6.2.4. Doskonalenie kompetencji dydaktycznych

W czasie pracy na etacie naukowo-dydaktycznym brałam udział w licznych kursach i warsztatach dydaktycznych, które pozwoliły mi na doskonalenie warsztatu dydaktycznego oraz zwiększać jakość kształcenia. Poznanie metod dydaktyki aktywnej, pozwoliło mi na wprowadzenie nowych rozwiązań dydaktycznych, zwłaszcza w pracy grupowej na seminariach oraz metod pracy projektowej. Zapoznałam się również z platformami służącymi do nauczania zdalnego, które okazały się przydatne podczas prowadzenia seminariów w formie zdalnej w okresie pandemii COVID-19, a także w doskonaleniu sprawdzania postępów nauczania studentów wraz z kryteriami oceny.

Brałam udział w następujących kursach:

- 1) „Zaawansowane techniki edukacyjne w naukach medycznych. Kurs zaawansowany – nauczanie oparte o problem – Problem Based Learning” (30 godzin), prowadzony przez UJCM w ramach projektu Pro bono Collegii Medici Universitatis Jagiellonicae (2012).
- 2) „Kurs Trenerów Nauki” (2017, Kraków). Szkolenie obejmowało 32 godziny z zakresu: metody dydaktyki aktywnej, roli i zadań trenera nauki, deontologii trenerskiej, andragogiki, kontaktu trenera z grupą, metod i technik trenerskich, projektowania szkoleń, trudnych sytuacji szkoleniowych, zarządzania projektem szkoleniowym.
- 3) „Kurs Corel Draw” (16 godzin) organizowany przez Arc Docenti UJ (2018)
- 4) Udział w kursie: „Jak się uczyć i nauczyć tego innych?” (10 godzin) w 2020
- 5) kurs „Myślenie Wizualne (Sketchnoting)” (10 godzin) organizowanych przez Nauczycielewsieci.pl w 2021

6.2. Działalność organizacyjna

W ramach działalności organizacyjnej realizowanej na rzecz Collegium Medicum UJ, biorę udział w przygotowaniach wniosków o uzyskanie finansowania na zakup aparatury naukowo-badawczej:

- 1) W roku 2017 opracowałam wniosek na inwestycje w zakresie dużej infrastruktury badawczej na zakup spektrometru NMR 500MHz dla Wydziału Farmaceutycznego UJCM, umożliwiającego przeprowadzenie charakterystyki struktury chemicznej cząsteczek. Wniosek „Wielofunkcyjny system spektroskopii NMR w poszukiwaniu i rozwoju nowych leków” otrzymał dotację z funduszy Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego na kwotę 2 460 000 PLN (numer wniosku: IA/SP/0032/2018). W ramach realizacji inwestycji uczestniczyłam także w procedurach przetargowych i byłam członkiem komisji nadzorującej przetarg na zakup spektrometru NMR 500 MHz. Aparat jest obecnie wykorzystywany intensywnie w pracach badawczo-rozwojowych Wydziału Farmaceutycznego UJCM.

- 2) W 2019 roku brałam również udział w współtworzeniu wniosku do Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego o przyznanie środków finansowych na utrzymanie aparatury badawczej: QPatch 16X - system do automatycznych badań elektrofizjologicznych. Wniosek otrzymał dofinansowanie w wysokości 322 184 PLN na pokrycie kosztów serwisowych aparatu QPatch 16X (numer decyzji: 45/E-338/SPUB/SP/2019).
- 3) Od roku 2018 byłam zaangażowana w współtworzenie koncepcji merytorycznej Centrum Rozwoju Terapii Chorób Cywilizacyjnych i Związanych z Wiekiem (CDT-CARD) na Kampusie Medycznym UJ CM. Brałam udział w tworzeniu wniosku o wpisanie CDT-CARD do Polskiej Mapy Infrastruktury Badawczej. Spośród 146 wniosków wysłanych do Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, 70 z nich uzyskało wpis na mapę drogową, w tym projekt CDT-CARD.
- 4) W ramach mojej działalności związanej z CDT-CARD, współtworzyłam wniosek o dofinansowanie zakupu infrastruktury badawczej dla CDT-CARD w ramach konkursu POIR 4.2 (Program Operacyjny Inteligentny Rozwój 2014-2020 działanie 4.2). Przygotowany wniosek i agenda badawcza liczyła prawie 400 stron dokumentacji. Projekt uzyskał dofinansowanie w wysokości 39 997 636 PLN.
- 5) W 2021 roku uzyskałam fundusze z programu qLIFE w ramach programu Inicjatywa Doskonałości Uczelnia Badawcza (06/IDUB/2019/94) na zakup wielostanowiskowej licencji do programu Spectrus Procesor dla pracowników Katedry Chemii Farmaceutycznej UJCM.

Za udział w projekcie CDT-CARD otrzymałam nagrodę Dziekana Wydziału Farmaceutycznego UJCM (w 2019) oraz nagrodę Rektora UJCM (w 2021) za działalność organizacyjną.

W ramach działalności organizacyjnej na rzecz Wydziału Farmaceutycznego UJCM sporządziłam prezentację służącą do promocji Wydziału (2017, 2018).

6.3. Działalność popularyzująca naukę

Moja aktywność popularyzująca naukę obejmuje publikacje o charakterze popularnonaukowym w języku polskim (**D35, D36**) wymienione w załączniku 4, oraz artykuły popularnonaukowe w języku angielskim:

- A1.** 'Old drug, new hopes' w 'Science & Technology' issue 17, december 2015 (wydawany przez Pan European Networks)
- A2.** 'More than forgetfulness' Horizon 2020 Projects 2015, issue 6 www.horizon2020projects.com
- A3.** Pawłowski M, Obniska J, Zajdel P, Byrtus H, Chłoń-Rzepa G, Kołaczkowski M, Czopek, A, **Marcinkowska M**, Kamiński K, Zagórska A, Żmudzki P, Bucki A, Grychowska K, Canale V, Miodoński A. How are new drugs designed? Science Projector, Jagiellonian University in Krakow, Department of Communications and Marketing, Kraków, 2014.

W 2015 roku biorąc udział w konkursie popularyzatorskim INTER organizowanym przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej, wygłosiłam prezentację popularnonaukową pt. „Starty lek nowe sztuczki”, za którą

otrzymałam nagrodę publiczności i pierwszą nagrodę Kapituły Konkursu. Konkurs odbywał się pod patronatem medialnym takich portali jak: Nauka w Polsce PAP, Forum Akademickie, studentnews.pl. Prezentacja była równocześnie rozpowszechniana przez FNP na platformie youtube, dzięki czemu trafiła do szerokiego grona odbiorców. Prezentacja dotyczyła możliwości zastosowania znanego leku nasennego zolpidemu w terapii schizofrenii, bazując na wynikach badań prowadzonych we współpracy z Instytutem Psychiatrii i Neurologii w Warszawie. Moja działalność popularyzatorska przyciągnęła uwagę osób zainteresowanych wykorzystaniem zolpidemu w potencjalnej terapii schorzeń OUN. W 2016 roku skontaktowała się ze mną czytelniczka jednego z portali popularnonaukowych informując, iż zolpidem, lek nad którym wówczas pracowałam, podawany w niskich dawkach jej mężowi, przynosi poprawę w redukcji objawów neurologicznych będących skutkiem udaru niedokrwionego mózgu. Przypadek ten jak i liczne raporty kliniczne opisane w literaturze naukowej, zainspirowały mnie później do sformułowania hipotez badawczych w projekcie Sonata Bis, którym obecnie kieruję, a sam lek stał się punktem wyjścia do opracowania nowych, lepszych cząsteczek, kandydatów na nowe leki neuropsychiatryczne. Przypadek ten dowodzi jak wielką wartość ma popularyzacja nauki wśród szerokiego grona odbiorców i wpłynął na chęć rozwijania nowego tematu badawczego związanego z udarem niedokrwionym.

7. Informacje dotyczące kariery zawodowej (oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6).

Aktualnie mój dorobek naukowy obejmuje **46** publikacji, w tym **36** publikacji oryginalnych angielskojęzycznych, **8** prac poglądowych oraz **2** rozdziały w książkach anglojęzycznych. W 12 pracach jestem pierwszym autorem, a w 10 autorem pierwszym i korespondencyjnym. Ponadto jestem autorem lub współautorem **40** doniesień zjazdowych na konferencjach międzynarodowych oraz krajowych doniesień i komunikatów zjazdowych. Jestem również współtwórcą **5** zgłoszeń patentowych i 3 patentów. Pełniłam funkcję kierownika grantu w trzech projektach finansowanych z źródeł FNP oraz NCN (załącznik 4).

Sumaryczny współczynnik oddziaływania IF wszystkich publikacji wynosi **167,459** co odpowiada **2635** punktom w klasyfikacji MNiSW. Całkowita liczba cytowań wynosi **579** (z wyłączeniem autocytowań **522**), a indeks Hirscha jest równy **15** (dane na podstawie Bibliografii UJ CM z dnia 25.04.2023 r.).

Tabela 2. Podsumowanie dorobku naukowego

Dorobek naukowy*	Okres przed uzyskaniem stopnia doktora	Okres po uzyskaniu stopnia doktora	Podsumowanie dorobku naukowego
Liczba publikacji z impact factor	4	34	38
Liczba publikacji bez impact factor	-	5	5
Sumaryczny Impact factor	8,418	159,041	167,459
Suma pkt. MEiN	68	2567	2635

Indeks Hirscha	-	-	15
----------------	---	---	----

*Dane na podstawie analizy bibliometrycznej Biblioteki Medycznej UJCM z dnia 25.03.2023, włączając osiągnięcia naukowe

7.1. Osiągnięcia naukowo-badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora

Na początkowym etapie rozwoju naukowego, moja działalność była skoncentrowana głównie wokół metodologii syntezy organicznej, syntezie układów bioizosterycznych oraz wieloetapowej syntezie cząsteczek biologicznie aktywnych. Działalność naukowo-badawczą rozpoczęłam z chwilą podjęcia 6-miesięcznego stażu na Uniwersytecie w Utrechcie (Holandia) w ramach programu Erasmus/Socrates. Pracowałam wówczas w grupie badawczej prof. Roberta Liskampa w Department of Medicinal Chemistry and Chemical Biology, gdzie uczestniczyłam w syntezie bioizosterów wiązania dipeptydowego, co zostało szczegółowo przedstawione w rozdziale 5. Dzięki temu doświadczeniu zdobyłam wiedzę z zakresu podstaw syntezy organicznej a także chemii peptydów i peptydomimetyków. Przeprowadzone badania dały podstawę do napisania pracy magisterskiej o tytule „Synteza alkenowych dipeptydosulfonamidowych izosterów biologicznych”, której promotorem była prof. dr hab. Katarzyna Kieć-Kononowicz z Katedry Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych, Wydziału Farmaceutycznego UJCM. Praca została wyróżniona w wydziałowym konkursie prac magisterskich w listopadzie 2004 roku.

Podejmując studia doktoranckie na Politechnice w Mediolanie, w grupie badawczej prof. Matteo Zandy, uczestniczyłam w syntezie związków fluoropochodnych, inhibitorów MMP3 i MMP9. Oceniałam właściwości bioizosteryczne grupy trifluorometylowej oraz pracowałam nad wieloetapową ścieżką syntezy produktu naturalnego tubulizyny U. Merytoryczne aspekty mojej działalności na Politechnice w Mediolanie, zostały szczegółowo omówione w rozdziale 5 niniejszego opracowania. Stopień doktora zdobyłam na Politechnice w Mediolanie w marcu 2009 roku, a tytuł mojej rozprawy brzmiał: „*Synthesis and Evaluation of Novel Anti-Angiogenic Compounds*”. W okresie przed doktoratem odbyłam również 4 miesięczny staż w ramach stypendium „visiting scholarship” na Uniwersytecie w Walencji (Walencja, Hiszpania) w grupie prof. Santosa Fustero, gdzie doskonaliłam swój warsztat syntetyczny skupiając się na reakcjach jednonaczyniowych i syntezie heterocykli azotowych. Doświadczenie zdobyte podczas pracy w 3 zagranicznych ośrodkach badawczych pozwoliły mi opanować różnorodne aspekty syntezy związków organicznych, które były przydatne w późniejszych pracach badawczej. Moja działalność naukowa przed doktoratem zaowocowała współautorstwem w 4 publikacjach w czasopiśmie anglojęzycznych (w 2 jestem pierwszym autorem) oraz 2 rozdziałami w książkach (szczegóły zostały podane w załączniku 4).

7.2. Osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora moje zainteresowania badawcze ewoluowały w kierunku poszukiwania związków biologicznie aktywnych, które poprzez oddziaływanie z celami biologicznymi, ściśle związanymi z patologią schorzeń, mają szansę na wysoką skuteczność terapeutyczną. Obejmują one badania interdyscyplinarne związane z projektowaniem i syntezą struktur chemicznych o właściwościach lekopodobnych, po planowanie badań farmakologicznych służących do weryfikacji efektywności terapeutycznej nowych związków. Badania te są efektem współpracy z wieloma grupami badawczymi w obrębie UJCM, ale również z krajowymi i zagranicznymi ośrodkami badawczymi (rozdział 5).

Oprócz mojego głównego nurtu badawczego związanego z farmakologią receptora GABA-A, równocześnie rozwijałam drugi kierunek badawczy związany z otrzymywaniem cząsteczek o wielofunkcyjnym mechanizmie działania, skierowanych na cele biologiczne o kluczowym znaczeniu dla terapii zaburzeń neuropsychiatrycznych towarzyszących chorobie Alzheimera oraz ligandów receptorów monoaminergicznych o aktywności przeciwpłytkowej. W wyniku realizacji powyższych tematów badawczych powstały 4 prace oryginalne w których jestem pierwszym autorem i/lub korespondencyjnym autorem.

7.2.1. Badania w obrębie ligandów wielofunkcyjnych receptorów monoaminergicznych

Po uzyskaniu stopnia doktora chemii przemysłowej i inżynierii chemicznej w 2009 roku, rozpoczęłam staż podoktorski w **Zakładzie Chemii Leków Katedry Chemii Farmaceutycznej UJCM w grupie badawczej prof. dr hab. Marcina Kołaczkowskiego**. W tym czasie uczestniczyłam w projekcie „Opracowanie innowacyjnego leku stosowanego w terapii schorzeń ośrodkowego układu nerwowego (OUN) – schizofrenii, depresji, lęku”, kierowanego przez prof. dr hab. Marcina Kołaczkowskiego, realizowanego w ramach konsorcjum z firmą Adamed, Instytutem Psychiatrii i Neurologii w Warszawie oraz Politechniką Krakowską. W projekcie tym uczestniczyłam w syntezie kilku zróżnicowanych chemotypów o charakterze cząsteczek multimodalnych, oddziałujących z kilkoma receptorami monoaminergicznymi: 5-HT₆, HT₇, D₂, 5-HT_{2A} oraz z transporterem SERT, jednocześnie pozbawiając ich oddziaływania z kluczowymi antycelami: receptorem H₁, M₁ oraz kanałem potasowym hERG. Taki profil aktywności miał zapewnić odpowiednią aktywność terapeutyczną w różnorodnych chorobach psychiatrycznych takich jak: depresja, lęk czy schizofrenia. Najważniejsze grupy chemiczne były przedmiotem 4 polskich i międzynarodowych zgłoszeń patentowych, oraz 2 patentów udzielonych w krajach Unii Europejskiej, USA, Rosji, Indiach, Japonii oraz Australii, w których jestem współautorem. Z badań tych pochodzą również liczne publikacje, których jestem współautorem **D5** i **D6**.

Współpraca z firmą Adamed sp. z o.o. była później kontynuowana w ramach projektu „Opracowanie nowych kandydatów na leki w terapii behawioralnych i psychologicznych symptomów demencji (BPSD)”, kierowanego przez prof. dr hab. Marcina Kołaczkowskiego. W ramach tego projektu uczestniczyłam w syntezie dualnych ligandów receptorów monoaminergicznych, które mogły mieć potencjalne zastosowanie

w łagodzeniu zaburzeń psychicznych towarzyszących demencji. W ramach tych prac badawczych powstały najważniejsze cząsteczki, które uzyskały ochronę patentową oraz udało się wyłonić kandydata na lek, który przeszedł do etapu zaawansowanego rozwoju przedklinicznego, a prawa autorskie do cząsteczek zostały wykupione przez zagraniczną firmę farmaceutyczną Acadia.

W 2015 roku rozpoczęłam realizację własnych projektów, z których pierwszy obejmował opracowanie nowych ligandów wielofunkcyjnych, dedykowanych populacji pacjentów geriatrycznych, cierpiących na zaburzenia psychiczne towarzyszące demencji. Projekt „*Synteza i badania farmakologiczne nowych pochodnych benzizoksazolopropylololidyny jako wielofunkcyjnych ligandów o potencjalnych właściwościach prokognitywnych i przeciwpsychotycznych*”, w którym **pełniłam funkcję kierownika projektu**, uzyskał finansowanie z środków **Narodowego Centrum Nauki w konkursie SONATA 8 (2014/15/D/NZ7/01789)**. W ramach tego projektu zaplanowałam i kierowałam pracami badawczymi interdyscyplinarnego zespołu, którego celem było opracowanie cząsteczek multimodalnych i ocena ich aktywności w modelach zwierzęcych.

Przesłanką do pojęcia badań w/w projekcie były liczne dane kliniczne które raportowały, iż pacjenci z demencją cierpią na współtowarzyszące zaburzenia psychiatryczne takie jak: psychoza, stany depresyjne, agresja czy napady lęku. Obecnie nie ma specjalistycznych leków, które byłyby skuteczne w łagodzeniu zaburzeń neuropsychiatrycznych towarzyszących demencji. Z tego względu klinicyści często zapisują neuroleptyki stosowane powszechnie w terapii schizofrenii. Jednakże leki te mają ograniczoną skuteczność i nasilają upośledzenie funkcji poznawczych, a także mogą powodować zwiększone ryzyko zgonu pacjentów geriatrycznych. Z tego względu postuluje się, aby osiągnąć optymalną skuteczność kliniczną pacjenci, u których rozpoznano neuropsychiatryczne zaburzenia towarzyszące demencji, powinni być leczeni lekami które oddziałują z specyficznymi celami biologicznymi, powiązаныmi z patogenezą choroby.⁶⁸ Jednym z potencjalnych celi biologicznych jest receptor serotoninowy 5-HT_{2A}, którego polimorfizm genetyczny był powiązany z wystąpieniem objawów neuropsychiatrycznych u pacjentów z demencją.⁶⁹ Ponadto w badaniach pośmiertnych zaobserwowano zmniejszoną gęstość receptorów 5-HT₆ w korze przedczołowej pacjentów z chorobą Alzheimera oraz zmniejszoną ekspresję receptorów 5-HT₇ w hipokampie.^{69,70} Podobne zmiany zaobserwowano dla receptorów dopaminergicznych D₂, których wrażliwość i gęstość się zmienia u tej populacji pacjentów.

Dlatego w projekcie Sonata (2014/15/D/NZ7/01789), opracowano bibliotekę wielofunkcyjnych ligandów, które poprzez interakcje z receptorami 5-HT₆, 5-HT_{2A}, 5-HT₇ i dopaminergicznych D₂, ściśle związanymi z patologią zaburzeń neuropsychiatrycznych w demencji, mogłyby wykazać potencjalne korzyści w łagodzeniu tych objawów. W ramach projektu, opracowano trzy różne grupy chemiczne ligandów wielofunkcyjnych, które następnie poddano szerokiej charakterystyce w badaniach *in vitro* oraz *in vivo*. Badania te pozwoliły wyselekcjonować trzy cząsteczki wiodące, charakteryzujące się skojarzoną aktywnością przeciwdepresyjną,

przeciwłękową oraz przeciwpsychotyczną. Cząsteczki wykazują również wysoki profil bezpieczeństwa farmakologicznego i nie indukują działań ubocznych, niebezpiecznych dla wrażliwej populacji osób starszych, takich jak wahania ciśnienia tętniczego, senność, zaburzenia gospodarki węglowodanowej. Co ciekawe, dla chemotypu zawierającego w swojej budowie układ 6-fluorobenzo[*d*]isoksazolo-3-propyłu, charakteryzującego się wysokim powinowactwem do receptorów 5-HT_{2A}, opisano kolejne zastosowanie związane z hamowaniem agregacji płytek krwi, co może być potencjalnie zastosowane w prewencji chorób kardiologicznych. Uzyskane wyniki przeprowadzonych badań chemiczno-farmakologicznych, pozwoliły na sformułowanie sugestii dotyczących możliwości działania terapeutycznego wielofunkcyjnych ligandów w terapii zaburzeń neuropsychiatrycznych towarzyszących demencji. Opracowane w projekcie nowe ligandy wielofunkcyjne mogą zostać użyte jako narzędzia farmakologiczne w badaniach przedklinicznych lub stać się punktem wyjścia do opracowania nowych leków.

Wyniki prac badawczych przeprowadzonych w ramach projektu Sonata, zostały opisane w czterech pracach eksperymentalnych (D12, D20, D23, D26) oraz jednej pracy przeglądowej (D33). **W trzech pracach jestem pierwszym autorem i/lub autorem korespondencyjnym.** Prezentując temat związany z poszukiwaniem ligandów wielofunkcyjnych skierowanych na zaburzenia neuropsychiatryczne towarzyszące demencji otrzymałam **pierwszą nagrodę za prezentację ustną posteru i wyróżnienie posteru na 2 konferencjach oraz nagrodę polskiego towarzystwa farmaceutycznego za prezentację ustną** (szczegóły zostały przedstawione w rozdziale 7.3)

Kontynuując temat poszukiwania związków wielofunkcyjnych, **w ramach współpracy z dr hab. Anną Więckowską z Zakładu Fizykochemicznej Analizy Leku UJCM**, zsyntetyzowałam bibliotekę ligandów multimodalnych o właściwościach antagonistów receptora 5-HT₆ oraz hamujących aktywność butyrylocholinoesterazy. Przesłanką do opracowania multimodalnych cząsteczek łączących w/w aktywności były obiecujące wyniki II fazy badań klinicznych, które wykazały istotnie wyższą korzyść kliniczną terapii skojarzonej z zastosowaniem donepezylu (inhibitora acetylocholinoesterazy) i idalopirdyny (antagonisty receptora 5-HT₆), w porównaniu do monoterapii.⁷¹

W celu opracowania ligandów multimodalnych, połączono fragmenty alkiloftalimidu odpowiadające za hamowanie butyrylocholinoesterazy z pierścieniem 1-benzylo-4-(piperazyno-1-yl)-1H-indolu blokującego aktywność receptora 5-HT₆. Otrzymane cząsteczki zbadano w testach *in vitro*, które potwierdziły dualną aktywność względem receptora 5-HT₆ oraz butyrylocholinoesterazy. Najaktywniejsze cząsteczki poddano ocenie właściwości antyoksydacyjnych w teście FRAP, które potwierdziły właściwości antyoksydacyjne tych struktur. Wyselekcjonowane cząsteczki zostaną dalej ocenione w zaawansowanych badaniach farmakologicznych w celu oceny aktywności prokognitywnej. Wyniki badań obejmujące prace z zakresu syntezy oraz badań *in vitro* opisano **w publikacji D19 w której jestem pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym.**

W ramach grantu NCN Sonata (2016/23/D/NZ7/01328) i luventus Plus (IP2012063272), prowadzonych przez dr hab. Annę Więckowską, w których pełniłam rolę wykonawcy, dokonałam syntezy selektywnych ligandów receptora 5-HT₆, które następnie zostały połączone z fragmentami takryny lub fenylometanoaminy, w celu uzyskania ligandów wielofunkcyjnych. Wyniki tych badań zostały opisane w pracach D10 oraz **D17**, których jestem współautorem.

Nawiązując współpracę z **dr. hab. Magdaleną Jastrzębską-Więsek z Zakładu Farmacji Klinicznej UJCM**, zsyntetyzowałam związek narzędziowy EMD386088 w ilości i czystości dostosowanych do wymogów badań farmakologicznych *in vitro*. Związek ten został wykorzystany w pracach eksperymentalnych *in vitro* oceniających jego profil aktywności funkcjonalnej względem receptorów 5-HT₆. Wyniki badań zostały opublikowane w pracy **D6** w której jestem współautorem.

7.2.2. Selektywne ligandy receptora α 1-GABA-A jako cel terapeutyczny w udarze niedokrwiennym i drżeniu

Równolegle jako kierownik projektu byłam zaangażowana w realizację drugiego projektu „*Stary lek, nowe sztuczki - od znanego leku nasennego do cząsteczek o potencjalnych właściwościach przeciwpsychotycznych*”, wyłonionego w ramach konkursu „**Inter**” **Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej**. Projekt ten był kontynuacją badań prowadzonych w ramach **współpracy z Instytutem Psychiatrii i Neurologii w Warszawie**, którego celem było uzyskanie fluorowanych analogów zolpidemu o dobrej rozpuszczalności oraz potwierdzenie ich skuteczności terapeutycznej w łagodzeniu objawów psychotycznych. Szczegółowe cele i wyniki zostały wcześniej opisane w ramach pracy **H1**.

Prezentacja w/w projektu miała charakter popularnonaukowy dostępny dla szerokiego grona odbiorców. W 2016 skontaktowała się ze mną czytelniczka jednego z portali popularnonaukowych informując, iż zaobserwowała u swojego męża zadziwiającą poprawę objawów neurologicznych będących skutkiem udaru, po jednorazowym podaniu niskich dawek zolpidemu. W ten sposób zasugerowała, iż ten sam lek zolpidem, może być pomocny nie tylko w przypadku zaburzeń psychicznych, ale jest również nadzieją w innych przypadkach.

Dokonując analizy literatury zauważyłam, że opisano aż kilka przypadków klinicznych na świecie w których zanotowano regresję objawów neurologicznych udaru mózgu i tylko dwie prace eksperymentalne, które próbowały tłumaczyć mechanizm działania zolpidemu.^{38,39,72,73} Zachęciło mnie to do rozpoczęcia kolejnych badań, których celem było opracowanie nowych ligandów receptora GABA-A o potencjalnym zastosowaniu w rekonwalescencji po udarze mózgu. W 2019 roku uzyskałam finansowanie na projekt badawczy „Ocena potencjału terapeutycznego nowych pozytywnych allosterycznych modulatorów receptora GABA-A w udarze niedokrwiennym mózgu”, w ramach konkursu **SONATA Bis 8 (2018/30/E/NZ7/00247) z funduszy Narodowego Centrum Nauki**. W ramach tego interdyscyplinarnego projektu staram się opracować nowe chemotypy potencjalnych ligandów receptora GABA-A, które w sposób selektywny modulują synaptyczną

transmisję GABA-ergiczną, pozostając bez wpływu na toniczną transmisję GABA-ergiczną, medioną za pośrednictwem ekstrasymparycznych receptorów GABA-A.

Prace przeprowadzone w zwierzęcych modelach udaru niedokrwiennego wykazały, iż w skutek udaru, w strefie okołozawałowej obserwujemy nasiloną toniczną transmisję GABA-ergiczną, która istotnie koreluje z pojawieniem się deficytów neurologicznych. W pracach tych zaobserwowano, iż nasilenie synaparycznej transmisji GABA-ergiczej przez takie leki jak np. zolpidem, bezpośrednio korelowało z poprawą funkcji motorycznych i behawioralnych u zwierząt doświadczalnych.^{72,74} Badania te zasugerowały, iż szybka aktywacja synaparycznej transmisji GABA-ergiczej w rejonie okołozawałowym, jest odpowiedzialna za jego efekt terapeutyczny. Co ciekawe, zarówno u ludzi jak i u zwierząt doświadczalnych efekt nasenny/sedatywny nie występował w zastosowanych, niskich dawkach. Jest to związane między innymi z zmianą wrażliwości i gęstości receptorów GABA-A w rejonie okołozawałowym,⁷² u osobników po udarze, co pociąga za sobą odmienną reakcję tej populacji chorych na lek.

W projekcie udało się potwierdzić terapeutyczną rolę receptorów GABA-A w rekonwalescencji po udarze oraz opracowano kilka nowych chemotypów, cechujących się wysokim powinowactwem do receptora GABA-A, które są obecnie analizowane w panelu badań farmakologicznych. Niektóre cząsteczki posiadają również dodatkowe właściwości farmakologiczne, przewyższające aktywność związku referencyjnego zolpidemu i obecnie przechodzą procedurę zgłoszenia wynalazku do Centrum Transferu Technologii UJ (CITRU), celem uzyskania przyszłej ochrony patentowej. Realizacja projektu przyczyniła się również do powstania prac **H3** i **H4**. Zadania badawcze realizowane w projekcie są też przedmiotem dwóch rozpraw doktorskich (rozdział 6.2.3.) w których pełnią rolę promotora pomocniczego. Część wyników uzyskanych w ramach realizacji tego projektu dotyczące wpływu modulacji receptora GABA-A na synaparyczną transmisję GABA-ergiczną zostały zaprezentowane w formie referatu ustnego na XXXVII Szkole Zimowej organizowanej przez Instytut Farmakologii IF PAN w Krakowie (wykład na zaproszenie, wykaz doniesień zjazdowych załącznik 4). Streszczenie wystąpienia zostało również przedstawione w formie publikacji przeglądowej w czasopiśmie Kosmos (publikacja **M1**), którego wydanie specjalne obejmowało wystąpienia prelegentów XXXVII Szkoły Zimowej IF PAN.

Kolejnym istotnym aspektem terapeutycznym ligandów receptora GABA-A jest choroba Parkinsona i drżenie spoczynkowe. Istnieje kilka raportów klinicznych opisujących przypadki pacjentów z zaawansowaną formą choroby Parkinsona, u których zaobserwowano natychmiastową poprawę deficytów motorycznych po podaniu subklinicznych dawek zolpidemu.³⁷ Co ciekawe, dysfunkcje układu GABA-ergicznego zaobserwowano również wśród pacjentów cierpiących na drżenie spoczynkowe. W płynie mózgowo-rdzeniowym tych osób zanotowano obniżone stężenie GABA w stosunku do grupy kontrolnej.³⁷ Z kolei, prace eksperymentalne wykazały, iż myszy transgeniczne pozbawione receptorów $\alpha 1$ -GABA-A, wykazują zaburzenia motoryki charakterystyczne dla pacjentów z drżeniem spoczynkowym.⁷⁵

W ramach wspólnych badań przeprowadzonych z **dr hab. Katarzyną Kuter z Zakładu Neuropsychofarmakologii Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie** oraz **prof. JM. Witkin i prof. J.Cook z Uniwersytetu Wisconsin-Milwaukee (USA)**, przeprowadzono badania mające na celu ocenę wpływu ligandów receptora GABA-A na drżenia wywołane farmakologiczną deplecją dopaminy. W tym celu zastosowano modele zwierzęce opierające się na podaniu harmaliny, pimozydu i tetrabenazyny. Badania wykazały, iż modulacja funkcji receptora $\alpha 2$ i $\alpha 3$ GABA-A za pomocą selektywnego liganda MP-III-024, powodowała istotną redukcję drżących ruchów pyszczka wywołaną harmaliną lub pimozydem. Zolpidem nie powodował istotnego wpływu na drżenia wywołane za pomocą w/w substancji farmakologicznych. Badania te sugerują, że receptory GABA-A, szczególnie te zawierające podjednostki $\alpha 2/3$, mogą być potencjalnym celem terapeutycznym w leczeniu drżenia spoczynkowego lub tremoru parkinsonowskiego. Wyniki badań opisano w wspólnej pracy **D30**.

W trakcie poszukiwania nowych chemotypów potencjalnych ligandów receptora GABA-A nawiązałam współpracę z **dr Suatem Sari z Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, Ankara, Turcja**. W ramach współpracy poszukujemy potencjalnych ligandów receptora GABA-A oraz związków biologicznie aktywnych, które można zastosować w terapii padaczki lub chorób współistniejących. Pierwsza praca z zakresu naszej współpracy została opublikowana w 2021 roku (**D25**).

7.2.3. Ligandy receptorów monoaminergicznych (α_{2B} i 5-HT_{2A}) o aktywności przeciwplatekowej

Poza głównym nurtem badawczym dotyczącym cząsteczek biologicznie aktywnych w obrębie OUN, moja działalność naukowa skupiła się na poszukiwaniu cząsteczek biologicznie aktywnych o właściwościach przeciwplatekowych. Leki przeciwplatekowe stanowią ważny element wielu schematów terapeutycznych w chorobach układu krążenia i stosowane są głównie w celu prewencji takich schorzeń jak: choroba wieńcowa, zawał serca, udar mózgu oraz zakrzepica. Pomimo ogromnej dostępności różnorodnych preparatów przeciwzakrzepowych na rynku farmaceutycznym, wciąż trwają poszukiwania nowych cząsteczek o wysokiej aktywności przeciwplatekowej. Głównym niepowodzeniem obecnie dostępnych leków przeciwplatekowych jest lekooporność występująca u około 40% pacjentów.⁷⁶

W ramach współpracy z **dr hab. Magdaleną Kotańską i dr hab. Moniką Kubacką z Katedry Farmakodynamiki UJCM**, zsyntetyzowałam bibliotekę pochodnych 4,4-dimetyloizchinolino-1,3(2H,4H)-dionu (**D16**) i pochodnych guanidyny (DY), jako selektywnych antagonistów receptora adrenergicznego α_{2B} . Liczne badania sugerują, iż nadmierna stymulacja adrenergiczna może potęgować agregację płytek, w wyniku stymulacji receptorów α_{2B} -adrenergicznych, powodując zwiększoną wrażliwość płytek na pozostałe czynniki stymulujące agregację np. tromboksan czy ADP. Ponadto nadmierna stymulacja adrenergiczna oraz

aktywacja płytkowych receptorów α_{2B} -adrenergicznych, mogą przyczyniać się do oporności na zastosowane zwykle leki przeciwplatekcyjne, takie jak aspiryna czy kłopidogrel.⁷⁷ Wykazano również, iż substancje selektywnie blokujące podtyp receptora adrenergicznego α_{2B} , mogą hamować patologiczną agregację płytek, nie wywołując efektów niepożądanych typowych dla cząsteczek blokujących receptory α_1 .

Stało się to główną przesłanką do opracowania dwóch serii cząsteczek o cechach antagonistów receptora adrenergicznego α_{2B} i selektywności wobec receptora adrenergicznego α_1 . Na podstawie szerokiego panelu badań *in vitro* wyselekcjonowano najaktywniejsze cząsteczki, które zostały zbadane w dwóch modelach agregacji *in vitro* indukowanej kolagenem oraz adrenaliną + ADP. Nowe cząsteczki wykazały aktywność antyagregacyjną w obu modelach, z czego pochodne 4,4-dimetyloizochinolono-1,3(2H,4H)-dionu wykazały wyższą aktywnością antyagregacyjną. Jeden związek (3) z serii 4,4-dimetyloizochinolono-1,3(2H,4H)-dionu, przewyższył aktywność cząsteczki referencyjnej ARC-239 i może w przyszłości posłużyć jako narzędzie farmakologiczne do dalszych badań lub stanowić punkt wyjścia do projektowania selektywnych ligandów receptora α_{2B} , o aktywności przeciwplatekcyjnej. Badania te potwierdziły również istotną rolę receptora α_{2B} jako obiecującego celu molekularnego do opracowania związków o aktywności przeciwplatekcyjnej. Cząsteczki blokujące receptor α_{2B} mogą być szczególnie przydatne u pacjentów z opornością na aspirynę lub kłopidogrel, gdzie udział płytkowych receptorów α_2 -adrenergicznych i nadmiernej stymulacji adrenergicznej przyczynia się do zwiększonej aktywności płytek.⁷⁸ Wyniki badań zostały opublikowane w pracy **D18** (pochodne guanidyny) oraz **D16**, w której jestem pierwszym i korespondencyjnym autorem.

Kontynuując poszukiwanie związków biologicznie aktywnych o aktywności przeciwplatekcyjnej, w ramach prowadzonego przeze mnie projektu **Sonata (2014/15/D/NZ7/01789)**, otrzymano kilka związków cechujących się nanomolowym powinowactwem do receptorów serotoniny 5-HT_{2A} i ok. 10-100-krotną selektywnością wobec pozostałych podtypów receptorów 5-HT₆, 5-HT₇, oraz 100-1000-krotną selektywnością wobec receptora adrenergicznego α_1 . Warto dodać, iż receptory 5-HT_{2A} to jeden z punktów uchwytu leków przeciwplatekcyjnych. Jednym z mechanizmów aktywacji płytek krwi jest szlak zależny od serotoniny, gdzie uwalniana z płytek serotonina prowadzi do aktywacji i agregacji płytek za pośrednictwem receptorów 5-HT_{2A}. Dlatego cząsteczki o cechach antagonistów receptora 5-HT_{2A}, takie jak ketanseryna i sarpogrelat wprowadzono na rynek farmaceutyczny i stosowano w terapii przeciwplatekcyjnej.⁷⁹ Jednakże, do tej pory skuteczność antyagregacyjną potwierdzono dla kilku chemotypów, głównie dla pochodnych chinazolin-2,4(1H,3H)-dionu (ketanseryna) oraz pochodnych kwasu bursztynowego (sarpogrelat). W celu poszerzenia wiedzy na temat aktywności przeciwplatekcyjnej antagonistów receptora 5-HT_{2A}, w pracy **D26** przeprowadzono badania mające na celu ocenę skuteczności przeciwplatekcyjnej nowego chemotypu, pochodnych 6-fluorobenzo[d]izokazolo-3-ilo)propylo-5-metylopirolidyny, które umożliwiłyby eksplorację nowej przestrzeni chemicznej.

Pochodne 6-fluorobenzo[d]izokazolo-3-ilo)propylo-5-metylopirolidyny zbadano w trzech modelach agregacji *in vitro* wywołanych: kolagenem, serotoniną +ADP kolagenu, serotoniną +ADP. Wszystkie zbadane związki wykazały zdolność do hamowania agregacji w tych modelach, w zakresie porównywalnym do cząsteczek referencyjnych sarpogrelatu i ketanseryny. Aktywność przeciwplatekowa badanych związków korelowała z siłą blokowania receptora 5-HT_{2A}. Jeden związek; AZ 928, przewyższył aktywność przeciwplatekową związki referencyjnych, we wszystkich trzech modelach badawczych. Przeprowadzone badania pozwoliły wskazać strukturę 6-fluorobenzo[d]izokazolo-3-ilo)propylo-5-metylopirolidyny jako obiecujący chemotyp, który może stać się punktem wyjścia do projektowania związków o cechach antagonistów receptora 5-HT_{2A} i aktywności przeciwplatekowej. Warto dodać, iż cząsteczki blokujące szlak agregacji zależny od serotoniny mogą być przydatne w schorzeniach patofizjologicznych w których jest zaangażowana serotonina i receptor 5-HT_{2A} takich jak: miażdżyca i remodeling naczyń krwionośnych, choroby tętnic obwodowych czy nadciśnienie płucne. Najbardziej aktywny związek AZ928 będzie służył jako narzędzie farmakologiczne w zaawansowanych badaniach farmakologicznych, które pozwolą ocenić potencjał terapeutyczny tej grupy pochodnych w modelach *in vivo*. Wyniki badań opisano w pracy **D26** w której jestem pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym.

7.2.4. Zastosowanie suplementacji probiotykami w terapii wybranych jednostek chorobowych

Pełniąc rolę opiekuna prac magisterskich na kierunku kosmetologia, moje zainteresowania badawcze uległy rozszerzeniu o tematykę chorób skórnych. W pracy **D32**, w której jestem pierwszym i korespondencyjnym autorem, dokonano przeglądu literatury dotyczącej skuteczności stosowania probiotyków, zarówno doustnie, jak i miejscowo, w leczeniu atopowego zapalenia skóry. Przedstawiono również potencjalne mechanizmy działania dotyczące wpływu probiotyków na reakcje immunologiczne. Opisywane badania kliniczne przeprowadzone u dzieci z atopowym zapaleniem skóry wskazywały, iż suplementacja probiotykami może przynieść korzyść w łagodzeniu objawów atopowego zapalenia skóry, jeżeli zostanie rozpoczęta w bardzo wczesnym okresie dzieciństwa. Ponadto przegląd literaturowy pozwolił sformułować wniosek, iż w przyszłych badaniach warto rozważyć połączenie suplementacji probiotykami z jednoczesnym, miejscowym stosowaniem kremów zawierających probiotyki.

Kontynuując temat probiotyków, wspólnie z dr hab. Agnieszką Zagórką z Katedry Chemii Farmaceutycznej i innymi współautorami, w pracy **D34** dokonano przeglądu literatury dotyczącej zależności pomiędzy mikroflorą jelitową a chorobami psychiatrycznymi. W artykule przeprowadzono metaanalizę badań klinicznych dotyczących skuteczności suplementacji probiotykami a redukcją objawów chorób psychiatrycznych. Metaanaliza wykazała, iż suplementacja preparatami probiotycznymi istotnie zmniejszyła objawy depresji wśród pacjentów z depresją, natomiast w przypadku takich chorób jak schizofrenia czy lęk, nie zaobserwowano istotnego wpływu na redukcję objawów. Wśród parametrów decydujących o

skuteczności terapii, największe znaczenie miała ilość i skład preparatu probiotycznego (preparat wieloszczepowy) oraz czas trwania badania.

7.2.5. Poszukiwanie ligandów receptorów monoaminergicznych wpływających na redukcję masy ciała

Od 2012 roku byłam wykonawcą w projekcie NCN „Częściowi agoniści receptorów alfa-2- adrenergicznych jako nowa perspektywa skutecznego i bezpiecznego zmniejszania masy ciała” (DEC-2011/03/B/NZ7/00635), kierowanego przez dr hab. Magdalenę Kotańską. W projekcie tym zajmowałam się projektowaniem i optymalizacją ścieżki syntetycznej ligandów receptorów adrenergicznych oraz brałam udział w dyskusji wyników i przygotowywaniu manuskryptów **D13** i **D31**. Wyniki tego projektu wskazały nowe możliwości wykorzystania ligandów receptorów adrenergicznych w leczeniu syndromu metabolicznego lub otyłości (**D13**, **D31**).

W ramach tego tematu badawczego brałam udział w syntezie antagonisty 5-HT₆, który służył jako narzędzie farmakologiczne do weryfikacji efektu tych cząsteczek w redukcji masy ciała. Co ciekawe, oprócz istotnych aktywności prokognitywnych i przeciwdepresyjnych wykazano, iż antagoniści receptora 5-HT₆ mogą wpływać na redukcję masy ciała, poprzez wpływ na ośrodek sytości w mózgu.⁸⁰ W badaniach opisanych w pracach **D9** i **D15**, w których jestem współautorem wykazano, iż idalopirdyna powoduje istotną redukcję masy ciała u zwierząt otyłych, obniżając poziom tkanki tłuszczowej i zmniejszając poziom trójglicerydów i kwasów tłuszczowych we krwi. Biorąc pod uwagę, iż idalopirdyna dotarła do etapu badań klinicznych, gdzie badano jej wpływ na deficyty poznawcze u pacjentów z chorobą Alzheimera,⁸¹ dodatkowa aktywność terapeutyczna, wykazana w pracach **D9** i **D15** może stać się nowym kierunkiem zastosowania tej cząsteczki.

7.2.6. Badania z zakresu chemii żywności, żywności funkcjonalnej oraz interakcji leków z pożywieniem

W ramach współpracy z dr hab. Pawłem Paśko z Zakładu Bromatologii UJCM, uczestniczyłam w kilku pracach badawczych poświęconych roli żywienia w profilaktyce chorób cywilizacyjnych oraz interakcji leków z pożywieniem. W pracach **D14** oraz **D28** dotyczących interakcji leków przeciwhistaminowych drugiej generacji (praca **D14**) i leków przeciwwirusowych (praca **D28**) z pożywieniem, uczestniczyłam w dyskusji wyników, opisie zależności pomiędzy strukturą chemiczną a właściwościami farmakokinetycznymi tych leków. W pracach **D27** i **D29** uczestniczyłam w opracowaniu opisu zależności pomiędzy strukturą chemiczną związków selenoorganicznych, a ich wpływem na biosyntezę izotiocyjanianów i pochodnych fenolowych przez kiełki roślin z rodziny *Brassicaceae*. W pracy **D21**, opisującej bezpieczeństwo stosowania kiełków brukwi jako żywności funkcjonalnej, brałam udział w dyskusji wyników.

7.2.7. Pozostałe tematy badawcze

W ramach współpracy z **dr Bartoszem Pomiernym z Zakładu Biochemii Toksykologicznej UJ CM**, brałam udział w syntezie związku referencyjnego SDB który służył do opracowania metody ilościowego pomiaru uwolnionego siarkowodoru *in vivo*. Wyniki pracy zostały opisane w pracy **D24**. Natomiast w ramach współpracy z **dr hab. Marcinem Magierowskim z Pracowni Inżynierii Komórkowej i Diagnostyki Izotopowej Wydziału Lekarskiego UJCM** uczestniczyłam w dyskusji wyników w ramach pracy **D22**, dotyczącej efektów terapeutycznych donorów H₂S i potencjalnym mechanizmie degradacji *in vivo*. Współpraca ta będzie kontynuowana w ramach przyszłych badań dotyczących syntezy potencjalnych donorów H₂S i ocenie ich skuteczności gastroprotekcijnej.

Pełnię rolę opiekuna studentów praktyk laboratoryjnych (lic. Katarzyna Szafrąńska) i funkcję promotora pomocniczego w przewodzie doktorskim (mgr Nikoli Fajkis), uczestniczyłam w instruowaniu studentów w tworzeniu prac przeglądowych odnośnie tematów związanych z odkrywaniem i rozwojem nowych leków. Prace przeglądowe w języku polskim z udziałem podopiecznych ukazały się w czasopiśmie Kosmos (**D36**) oraz Wiadomości Chemiczne (**D35**).

7.3. Nagrody i wyróżnienia

- 1) **11.2004**- Wyróżnienie pracy na Wydziałowym konkursie prac magisterskich „Synteza alkenowych dipeptydosulfonamidowych izosterów biologicznych“
- 2) **06.2005**- Stypendium Marie Curie Fellowship (Research training network) fundowane przez Komisję Europejską
- 3) **03-2011**- Wyróżnienie pracy doktorskiej
- 4) **05.2013**- Pierwsze miejsce za ustną prezentację posteru na konferencji IX EWDD Ninth European Workshop in Drug Discovery- Certosa di Pontigiano (Siena-Italy)
- 5) **06.2013**- Wyróżnienie ustnej prezentacji posteru na konferencji: IIIrd SEQT Summer School: "Medicinal Chemistry in Drug Discovery: The Pharma Perspective" (Tres Cantos, Madrid, June 25-27, 2013)
- 6) **01.2015**- Pierwsze miejsce oraz nagroda publiczności w konkursie popularyzatorskim INTER organizowanym przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej- 01.2015
- 7) **2013,2014,2015, 2016, 2017** Nagroda Dziekana Wydziału Farmaceutycznego za osiągnięcia naukowe
- 8) **2020, 2021**- Nagroda Prorektora ds. UJCM za działalność organizacyjną
- 9) **2020**- Polska Nagroda Inteligentnego Rozwoju w kategorii Naukowiec Przyszłości

10) 2022- Nagroda Prorektora ds. UJCM za działalność dydaktyczną

8. Literatura

- (1) Jie, F.; Yin, G.; Yang, W.; Yang, M.; Gao, S.; Lv, J.; Li, B. Stress in Regulation of GABA Amygdala System and Relevance to Neuropsychiatric Diseases. *Front. Neurosci.* **2018**, *12*, 562. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00562>.
- (2) Field, M.; Dorovych, V.; Thomas, P.; Smart, T. G. Physiological Role for GABAA Receptor Desensitization in the Induction of Long-Term Potentiation at Inhibitory Synapses. *Nat Commun* **2021**, *12* (1), 2112. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22420-9>.
- (3) Hashimoto, T.; Arion, D.; Unger, T.; Maldonado-Avilés, J. G.; Morris, H. M.; Volk, D. W.; Mirnics, K.; Lewis, D. A. Alterations in GABA-Related Transcriptome in the Dorsolateral Prefrontal Cortex of Subjects with Schizophrenia. *Mol Psychiatry* **2008**, *13* (2), 147–161. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4002011>.
- (4) Merali, Z. Dysregulation in the Suicide Brain: MRNA Expression of Corticotropin-Releasing Hormone Receptors and GABAA Receptor Subunits in Frontal Cortical Brain Region. *Journal of Neuroscience* **2004**, *24* (6), 1478–1485. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4734-03.2004>.
- (5) Chen, L.; Yung, W.-H. GABAergic Neurotransmission in Globus Pallidus and Its Involvement in Neurologic Disorders. *Sheng Li Xue Bao* **2004**, *56* (4), 427–435.
- (6) Hashimoto, T.; Bazmi, H. H.; Mirnics, K.; Wu, Q.; Sampson, A. R.; Lewis, D. A. Conserved Regional Patterns of GABA-Related Transcript Expression in the Neocortex of Subjects With Schizophrenia. *AJP* **2008**, *165* (4), 479–489. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2007.07081223>.
- (7) Bernard, J. A.; Russell, C. E.; Newberry, R. E.; Goen, J. R. M.; Mittal, V. A. Patients with Schizophrenia Show Aberrant Patterns of Basal Ganglia Activation: Evidence from ALE Meta-Analysis. *NeuroImage: Clinical* **2017**, *14*, 450–463. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2017.01.034>.
- (8) Fritze, S.; Harneit, A.; Waddington, J. L.; Kubera, K. M.; Schmitgen, M. M.; Otte, M.-L.; Geiger, L. S.; Tost, H.; Meyer-Lindenberg, A.; Wolf, R. C.; Hirjak, D. Structural Alterations in Brainstem, Basal Ganglia and Thalamus Associated with Parkinsonism in Schizophrenia Spectrum Disorders. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **2021**, *271* (8), 1455–1464. <https://doi.org/10.1007/s00406-021-01270-y>.
- (9) Beneyto, M.; Abbott, A.; Hashimoto, T.; Lewis, D. A. Lamina-Specific Alterations in Cortical GABAA Receptor Subunit Expression in Schizophrenia. *Cerebral Cortex* **2011**, *21* (5), 999–1011. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhq169>.
- (10) Zhao, C.; Xu, Z.; Chen, J.; Yu, Z.; Tong, K.-L.; Lo, W.-S.; Pun, F. W.; Ng, S.-K.; Tsang, S.-Y.; Xue, H. Two Isoforms of GABAA Receptor B2 Subunit with Different Electrophysiological Properties: Differential Expression and Genotypical Correlations in Schizophrenia. *Mol Psychiatry* **2006**, *11* (12), 1092–1105. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001899>.
- (11) Bullock, W. M.; Cardon, K.; Bustillo, J.; Roberts, R. C.; Perrone-Bizzozero, N. I. Altered Expression of Genes Involved in GABAergic Transmission and Neuromodulation of Granule Cell Activity in the Cerebellum of Schizophrenia Patients. *AJP* **2008**, *165* (12), 1594–1603. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2008.07121845>.
- (12) Volk, D. W.; Austin, M. C.; Pierri, J. N.; Sampson, A. R.; Lewis, D. A. GABA Transporter-1 MRNA in the Prefrontal Cortex in Schizophrenia: Decreased Expression in a Subset of Neurons. *AJP* **2001**, *158* (2), 256–265. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.158.2.256>.
- (13) Price, R. B.; Shungu, D. C.; Mao, X.; Nestadt, P.; Kelly, C.; Collins, K. A.; Murrough, J. W.; Charney, D. S.; Mathew, S. J. Amino Acid Neurotransmitters Assessed by Proton Magnetic Resonance Spectroscopy: Relationship to Treatment Resistance in Major Depressive Disorder. *Biological Psychiatry* **2009**, *65* (9), 792–800. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.10.025>.
- (14) Sanacora, G.; Mason, G. F.; Rothman, D. L.; Behar, K. L.; Hyder, F.; Petroff, O. A. C.; Berman, R. M.; Charney, D. S.; Krystal, J. H. Reduced Cortical γ -Aminobutyric Acid Levels in Depressed Patients Determined by Proton Magnetic Resonance Spectroscopy. *Arch Gen Psychiatry* **1999**, *56* (11), 1043. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.56.11.1043>.
- (15) Choudary, P. V.; Molnar, M.; Evans, S. J.; Tomita, H.; Li, J. Z.; Vawter, M. P.; Myers, R. M.; Bunney, W. E.; Akil, H.; Watson, S. J.; Jones, E. G. Altered Cortical Glutamatergic and GABAergic Signal Transmission with Glial Involvement in Depression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102* (43), 15653–15658. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507901102>.

- (16) Luscher, B.; Shen, Q.; Sahir, N. The GABAergic Deficit Hypothesis of Major Depressive Disorder. *Mol Psychiatry* **2011**, *16* (4), 383–406. <https://doi.org/10.1038/mp.2010.120>.
- (17) Fasipe, O. J.; Agede, O. A.; Enikuomehin, A. C. Announcing the Novel Class of GABA–A Receptor Selective Positive Allosteric Modulator Antidepressants. *Future Science OA* **2021**, *7* (2), FSO654. <https://doi.org/10.2144/fsoa-2020-0108>.
- (18) Lally, J.; Gaughran, F.; Timms, P.; Curran, S. Treatment-Resistant Schizophrenia: Current Insights on the Pharmacogenomics of Antipsychotics. *PGPM* **2016**, *Volume 9*, 117–129. <https://doi.org/10.2147/PGPM.S115741>.
- (19) Li, P.; L. Snyder, G.; E. Vanover, K. Dopamine Targeting Drugs for the Treatment of Schizophrenia: Past, Present and Future. *CTMC* **2016**, *16* (29), 3385–3403. <https://doi.org/10.2174/1568026616666160608084834>.
- (20) Insel, T. R. Rethinking Schizophrenia. *Nature* **2010**, *468* (7321), 187–193. <https://doi.org/10.1038/nature09552>.
- (21) Benzodiazepines in the Treatment of Schizophrenia: A Review and Reappraisal. *AJP* **1991**, *148* (6), 714–726. <https://doi.org/10.1176/ajp.148.6.714>.
- (22) Müller-Spahn, F. A Patient Who Changed My Practice: Benzodiazepines in Schizophrenia? *International Journal of Psychiatry in Clinical Practice* **1997**, *1* (2), 141–142. <https://doi.org/10.3109/13651509709024716>.
- (23) Wong, G. Y. M.; Bastiampillai, T.; Dhillon, R. Potential Antipsychotic Effects of Zolpidem. *Aust N Z J Psychiatry* **2010**, *44* (2), 190. <https://doi.org/10.3109/00048670903487290>.
- (24) Mierzejewski, P.; Kolaczowski, M.; Marcinkowska, M.; Wesolowska, A.; Samochovec, J.; Pawlowski, M.; Bienkowski, P. Antipsychotic-like Effects of Zolpidem in Wistar Rats. *European Journal of Pharmacology* **2016**, *773*, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.01.009>.
- (25) Trenque, T.; Bustany, P.; Lamiable, D.; Legros, S.; Choisy, H. Pharmacokinetics and Brain Distribution of Zolpidem in the Rat after Acute and Chronic Administration. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2011**, *46* (7), 611–613. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1994.tb03868.x>.
- (26) Durand, A.; Thénot, J. P.; Bianchetti, G.; Morselli, P. L. Comparative Pharmacokinetic Profile of Two Imidazopyridine Drugs: Zolpidem and Alpidem. *Drug Metabolism Reviews* **1992**, *24* (2), 239–266. <https://doi.org/10.3109/03602539208996294>.
- (27) Lindefors, N.; Hurd, Y. L.; O'Connor, W. T.; Brene, S.; Persson, H.; Ungerstedt, U. Amphetamine Regulation of Acetylcholine and γ -Aminobutyric Acid in Nucleus Accumbens. *Neuroscience* **1992**, *48* (2), 439–448. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(92\)90503-T](https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90503-T).
- (28) Kang, J. I.; Park, H.-J.; Kim, S. J.; Kim, K. R.; Lee, S. Y.; Lee, E.; An, S. K.; Kwon, J. S.; Lee, J. D. Reduced Binding Potential of GABA–A/Benzodiazepine Receptors in Individuals at Ultra-High Risk for Psychosis: An [18F]-Fluoroflumazenil Positron Emission Tomography Study. *Schizophrenia Bulletin* **2014**, *40* (3), 548–557. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbt052>.
- (29) Chen, L.; Savio Chan, C.; Yung, W.-H. Electrophysiological and Behavioral Effects of Zolpidem in Rat Globus Pallidus. *Experimental Neurology* **2004**, *186* (2), 212–220. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2003.11.003>.
- (30) Zhang, L.; Chen, L.; Xue, Y.; Yung, W. Modulation of Synaptic GABA_A Receptor Function by Zolpidem in Substantia Nigra Pars Reticulata. *Acta Pharmacologica Sinica* **2008**, *29* (2), 161–168. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2008.00735.x>.
- (31) Grace, A. A.; Gomes, F. V. The Circuitry of Dopamine System Regulation and Its Disruption in Schizophrenia: Insights Into Treatment and Prevention. *Schizophrenia Bulletin* **2019**, *45* (1), 148–157. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbx199>.
- (32) Sesack, S. R.; Grace, A. A. Cortico-Basal Ganglia Reward Network: Microcircuitry. *Neuropsychopharmacol* **2010**, *35* (1), 27–47. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.93>.
- (33) Limban, C.; Nuță, D. C.; Chiriță, C.; Negreș, S.; Arsene, A. L.; Goumenou, M.; Karakitsios, S. P.; Tsatsakis, A. M.; Sarigiannis, D. A. The Use of Structural Alerts to Avoid the Toxicity of Pharmaceuticals. *Toxicology Reports* **2018**, *5*, 943–953. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.08.017>.
- (34) Dąbrowska, S.; Chudoba, T.; Wojnarowicz, J.; Łojkowski, W. Current Trends in the Development of Microwave Reactors for the Synthesis of Nanomaterials in Laboratories and Industries: A Review. *Crystals* **2018**, *8* (10), 379. <https://doi.org/10.3390/cryst8100379>.
- (35) *Microwave Effects in Organic Synthesis: Myth or Reality? - Kappe - 2013 - Angewandte Chemie International Edition - Wiley Online Library*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/anie.201204103> (accessed 2022-02-14).
- (36) Kappe, C. O.; Pieber, B.; Dallinger, D. Microwave Effects in Organic Synthesis: Myth or Reality? *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (4), 1088–1094. <https://doi.org/10.1002/anie.201204103>.
- (37) Daniele, A.; Panza, F.; Greco, A.; Logroscino, G.; Seripa, D. Can a Positive Allosteric Modulation of

- GABAergic Receptors Improve Motor Symptoms in Patients with Parkinson's Disease? The Potential Role of Zolpidem in the Treatment of Parkinson's Disease. *Parkinson's Disease* **2016**, 2016, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2016/2531812>.
- (38) Autret, K.; Arnould, A.; Mathieu, S.; Azouvi, P. Transient Improvement of Poststroke Apathy with Zolpidem: A Single-Case, Placebo-Controlled Double-Blind Study. *Case Reports* **2013**, 2013 (feb08 1), bcr2012007816–bcr2012007816. <https://doi.org/10.1136/bcr-2012-007816>.
- (39) Cohen, S. I.; Duong, T. T. Increased Arousal in a Patient with Anoxic Brain Injury After Administration of Zolpidem. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation* **2008**, 87 (3), 229–231. <https://doi.org/10.1097/PHM.0b013e318161971b>.
- (40) Pauli, G. F.; Chen, S.-N.; Simmler, C.; Lankin, D. C.; Gödecke, T.; Jaki, B. U.; Friesen, J. B.; McAlpine, J. B.; Napolitano, J. G. Importance of Purity Evaluation and the Potential of Quantitative ¹H NMR as a Purity Assay: Miniperspective. *J. Med. Chem.* **2014**, 57 (22), 9220–9231. <https://doi.org/10.1021/jm500734a>.
- (41) Zhang, B.; Shan, G.; Ma, Q.; Xu, Q.; Lei, X. An Improved and Scalable Synthesis of Zolpidem via a CuI/BINOL-Mediated Tandem Reaction of Imine and Alkyne. *Heterocyclic Communications* **2017**, 23 (6), 445–448. <https://doi.org/10.1515/hc-2017-0152>.
- (42) Nair, D. K.; Mobin, S. M.; Namboothiri, I. N. N. Synthesis of Imidazopyridines from the Morita–Baylis–Hillman Acetates of Nitroalkenes and Convenient Access to Alpidem and Zolpidem. *Org. Lett.* **2012**, 14 (17), 4580–4583. <https://doi.org/10.1021/ol3020418>.
- (43) Kappe, C. O. Controlled Microwave Heating in Modern Organic Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43 (46), 6250–6284. <https://doi.org/10.1002/anie.200400655>.
- (44) Dahan, A.; Miller, J. M. The Solubility–Permeability Interplay and Its Implications in Formulation Design and Development for Poorly Soluble Drugs. *AAPS J* **2012**, 14 (2), 244–251. <https://doi.org/10.1208/s12248-012-9337-6>.
- (45) Williams, M. The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, 15th Edition Edited by M.J.O'Neil, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK ISBN 9781849736701; 2708 Pages. April 2013, \$150 with 1-Year Free Access to The Merck Index Online. *Drug Dev. Res.* **2013**, 74 (5), 339–339. <https://doi.org/10.1002/ddr.21085>.
- (46) Murdande, S. B.; Pikal, M. J.; Shanker, R. M.; Bogner, R. H. Aqueous Solubility of Crystalline and Amorphous Drugs: Challenges in Measurement. *Pharmaceutical Development and Technology* **2011**, 16 (3), 187–200. <https://doi.org/10.3109/10837451003774377>.
- (47) Shearer, J.; Castro, J. L.; Lawson, A. D. G.; MacCoss, M.; Taylor, R. D. Rings in Clinical Trials and Drugs: Present and Future. *J. Med. Chem.* **2022**, 65 (13), 8699–8712. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c00473>.
- (48) Zhu, S.; Noviello, C. M.; Teng, J.; Walsh, R. M.; Kim, J. J.; Hibbs, R. E. Structure of a Human Synaptic GABAA Receptor. *Nature* **2018**, 559 (7712), 67–72. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0255-3>.
- (49) Zhu, S.; Sridhar, A.; Teng, J.; Howard, R. J.; Lindahl, E.; Hibbs, R. E. Structural and Dynamic Mechanisms of GABAA Receptor Modulators with Opposing Activities. *Nat Commun* **2022**, 13 (1), 4582. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32212-4>.
- (50) Kerns, E.; Di, L.; Carter, G. In Vitro Solubility Assays in Drug Discovery. *CDM* **2008**, 9 (9), 879–885. <https://doi.org/10.2174/138920008786485100>.
- (51) Price, R. B.; Shungu, D. C.; Mao, X.; Nestadt, P.; Kelly, C.; Collins, K. A.; Murrugh, J. W.; Charney, D. S.; Mathew, S. J. Amino Acid Neurotransmitters Assessed by 1H MRS: Relationship to Treatment-Resistance in Major Depressive Disorder. *Biol Psychiatry* **2009**, 65 (9), 792–800. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.10.025>.
- (52) Sowa-Kućma, M.; Styczeń, K.; Siwek, M.; Misztak, P.; Nowak, R. J.; Dudek, D.; Rybakowski, J. K.; Nowak, G.; Maes, M. Lipid Peroxidation and Immune Biomarkers Are Associated with Major Depression and Its Phenotypes, Including Treatment-Resistant Depression and Melancholia. *Neurotox Res* **2018**, 33 (2), 448–460. <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9835-5>.
- (53) Li, Y.; Yue, Y.; Chen, S.; Jiang, W.; Xu, Z.; Chen, G.; Zhu, Z.; Tan, L.; Yuan, Y. Combined Serum IL-6, C-Reactive Protein, and Cortisol May Distinguish Patients with Anhedonia in Major Depressive Disorder. *Front. Mol. Neurosci.* **2022**, 15, 935031. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.935031>.
- (54) Sun, Y.; Wang, D.; Salvatore, G.; Hsu, B.; Curran, M.; Casper, C.; Vermeulen, J.; Kent, J. M.; Singh, J.; Drevets, W. C.; Wittenberg, G. M.; Chen, G. The Effects of Interleukin-6 Neutralizing Antibodies on Symptoms of Depressed Mood and Anhedonia in Patients with Rheumatoid Arthritis and Multicentric Castlemann's Disease. *Brain, Behavior, and Immunity* **2017**, 66, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.06.014>.
- (55) Samuvel, D. J.; Jayanthi, L. D.; Bhat, N. R.; Ramamoorthy, S. A Role for P38 Mitogen-Activated Protein Kinase in the Regulation of the Serotonin Transporter: Evidence for Distinct Cellular Mechanisms Involved in Transporter Surface Expression. *J Neurosci* **2005**, 25 (1), 29–41. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3754->

04.2005.

- (56) Malynn, S.; Campos-Torres, A.; Moynagh, P.; Haase, J. The Pro-Inflammatory Cytokine TNF- α Regulates the Activity and Expression of the Serotonin Transporter (SERT) in Astrocytes. *Neurochem Res* **2013**, *38* (4), 694–704. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0967-y>.
- (57) Haroon, E.; Daguanno, A. W.; Woolwine, B. J.; Goldsmith, D. R.; Baer, W. M.; Wommack, E. C.; Felger, J. C.; Miller, A. H. Antidepressant Treatment Resistance Is Associated with Increased Inflammatory Markers in Patients with Major Depressive Disorder. *Psychoneuroendocrinology* **2018**, *95*, 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.05.026>.
- (58) Strawbridge, R.; Hodsoll, J.; Powell, T. R.; Hotopf, M.; Hatch, S. L.; Breen, G.; Cleare, A. J. Inflammatory Profiles of Severe Treatment-Resistant Depression. *J Affect Disord* **2019**, *246*, 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2018.12.037>.
- (59) Lee, M.; Schwab, C.; Mcgeer, P. L. Astrocytes Are GABAergic Cells That Modulate Microglial Activity. *Glia* **2011**, *59* (1), 152–165. <https://doi.org/10.1002/glia.21087>.
- (60) Nieman, A. N.; Li, G.; Zahn, N. M.; Mian, M. Y.; Mikulsky, B. N.; Hoffman, D. A.; Wilcox, T. M.; Kehoe, A. S.; Luecke, I. W.; Poe, M. M.; Alvarez-Carbonell, D.; Cook, J. M.; Stafford, D. C.; Arnold, L. A. Targeting Nitric Oxide Production in Microglia with Novel Imidazodiazepines for Nonsedative Pain Treatment. *ACS Chem. Neurosci.* **2020**, *11* (13), 2019–2030. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.0c00324>.
- (61) Peng, Y. The Immunological Function of GABAergic System. *Front Biosci* **2017**, *22* (7), 1162–1172. <https://doi.org/10.2741/4539>.
- (62) Fu, J.; Han, Z.; Wu, Z.; Xia, Y.; Yang, G.; Yin, Y.; Ren, W. GABA Regulates IL-1 β Production in Macrophages. *Cell Reports* **2022**, *41* (10), 111770. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111770>.
- (63) Forkuo, G. S.; Nieman, A. N.; Kodali, R.; Zahn, N. M.; Li, G.; Rashid Roni, M. S.; Stephen, M. R.; Harris, T. W.; Jahan, R.; Guthrie, M. L.; Yu, O. B.; Fisher, J. L.; Yocum, G. T.; Emala, C. W.; Steeber, D. A.; Stafford, D. C.; Cook, J. M.; Arnold, L. A. A Novel Orally Available Asthma Drug Candidate That Reduces Smooth Muscle Constriction and Inflammation by Targeting GABA α Receptors in the Lung. *Mol. Pharmaceutics* **2018**, *15* (5), 1766–1777. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b01013>.
- (64) Wesolowska, A. Potential Role of the 5-HT $_6$ Receptor in Depression and Anxiety: An Overview of Preclinical Data. *Pharmacological Reports* **2010**, *62* (4), 564–577. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(10\)70315-7](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(10)70315-7).
- (65) Yun, H.-M.; Rhim, H. The Serotonin-6 Receptor as a Novel Therapeutic Target. *Exp Neurobiol* **2011**, *20* (4), 159–168. <https://doi.org/10.5607/en.2011.20.4.159>.
- (66) Nudelman, A.; Gil-Ad, I.; Shpaysman, N.; Terasenko, I.; Ron, H.; Savitsky, K.; Geffen, Y.; Weizman, A.; Rephaeli, A. A Mutual Prodrug Ester of GABA and Perphenazine Exhibits Antischizophrenic Efficacy with Diminished Extrapyramidal Effects. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (9), 2858–2862. <https://doi.org/10.1021/jm7012453>.
- (67) Geffen, Y.; Keefe, R.; Rabinowitz, J.; Anand, R.; Davidson, M. BL-1020, a New γ -Aminobutyric Acid-Enhanced Antipsychotic: Results of 6-Week, Randomized, Double-Blind, Controlled, Efficacy and Safety Study. *J. Clin. Psychiatry* **2012**, *73* (09), e1168–e1174. <https://doi.org/10.4088/JCP.12m07642>.
- (68) Gerlach, L. B.; Kales, H. C. Managing Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia. *Psychiatric Clinics of North America* **2018**, *41* (1), 127–139. <https://doi.org/10.1016/j.psc.2017.10.010>.
- (69) Lorke, D. E.; Lu, G.; Cho, E.; Yew, D. T. Serotonin 5-HT $_2A$ and 5-HT $_6$ Receptors in the Prefrontal Cortex of Alzheimer and Normal Aging Patients. *BMC Neurosci* **2006**, *7* (1), 36. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-7-36>.
- (70) Hashemi-Firouzi, N.; Komaki, A.; Soleimani Asl, S.; Shahidi, S. The Effects of the 5-HT $_7$ Receptor on Hippocampal Long-Term Potentiation and Apoptosis in a Rat Model of Alzheimer's Disease. *Brain Research Bulletin* **2017**, *135*, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.10.004>.
- (71) Watkins, P. B. Drug Safety Sciences and the Bottleneck in Drug Development. *Clin Pharmacol Ther* **2011**, *89* (6), 788–790. <https://doi.org/10.1038/clpt.2011.63>.
- (72) Hiu, T.; Farzampour, Z.; Paz, J. T.; Wang, E. H. J.; Badgely, C.; Olson, A.; Micheva, K. D.; Wang, G.; Lemmens, R.; Tran, K. V.; Nishiyama, Y.; Liang, X.; Hamilton, S. A.; O'Rourke, N.; Smith, S. J.; Huguenard, J. R.; Bliss, T. M.; Steinberg, G. K. Enhanced Phasic GABA Inhibition during the Repair Phase of Stroke: A Novel Therapeutic Target. *Brain* **2016**, *139* (2), 468–480. <https://doi.org/10.1093/brain/awv360>.
- (73) García-Santos, G.; Herrera, F.; Martín, V.; Rodríguez-Blanco, J.; Antolín, I.; Fernández-Marí, F.; Rodríguez, C. Antioxidant Activity and Neuroprotective Effects of Zolpidem and Several Synthesis Intermediates. *Free Radical Research* **2004**, *38* (12), 1289–1299. <https://doi.org/10.1080/10715760400017343>.
- (74) Clarkson, A. N.; Huang, B. S.; MacIsaac, S. E.; Mody, I.; Carmichael, S. T. Reducing Excessive GABA-Mediated Tonic Inhibition Promotes Functional Recovery after Stroke. *Nature* **2010**, *468* (7321), 305–309. <https://doi.org/10.1038/nature09511>.
- (75) Nietz, A.; Krook-Magnuson, C.; Gutierrez, H.; Klein, J.; Sauve, C.; Hoff, I.; Christenson Wick, Z.; Krook-

- Magnuson, E. Selective Loss of the GABA_{Aα1} Subunit from Purkinje Cells Is Sufficient to Induce a Tremor Phenotype. *Journal of Neurophysiology* **2020**, *124* (4), 1183–1197. <https://doi.org/10.1152/jn.00100.2020>.
- (76) Ball, S. T. E.; Taylor, R.; McCollum, C. N. Resistance to Antiplatelet Therapy Is Associated With Symptoms of Cerebral Ischemia in Carotid Artery Disease. *Vasc Endovascular Surg* **2020**, *54* (8), 712–717. <https://doi.org/10.1177/1538574420947235>.
- (77) Wang, J.-S.; Cheng, L.-J. Effect of Strenuous, Acute Exercise on α_2 -Adrenergic Agonist–Potentiated Platelet Activation. *ATVB* **1999**, *19* (6), 1559–1565. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.19.6.1559>.
- (78) Béres, B. J.; Tóth-Zsámboki, E.; Vargová, K.; László, A.; Masszi, T.; Kerecsen, G.; Préda, I.; Kiss, R. G. Analysis of Platelet Alpha2-Adrenergic Receptor Activity in Stable Coronary Artery Disease Patients on Dual Antiplatelet Therapy. *Thromb Haemost* **2008**, *100* (5), 829–838.
- (79) Uchiyama, S.; Ozaki, Y.; Satoh, K.; Kondo, K.; Nishimaru, K. Effect of Sarpogrelate, a 5-HT_{2A} Antagonist, on Platelet Aggregation in Patients with Ischemic Stroke: Clinical-Pharmacological Dose-Response Study. *Cerebrovasc Dis* **2007**, *24* (2–3), 264–270. <https://doi.org/10.1159/000105135>.
- (80) Heal, D. J.; Smith, S. L.; Fisas, A.; Codony, X.; Buschmann, H. Selective 5-HT₆ Receptor Ligands: Progress in the Development of a Novel Pharmacological Approach to the Treatment of Obesity and Related Metabolic Disorders. *Pharmacology & Therapeutics* **2008**, *117* (2), 207–231. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.08.006>.
- (81) Wilkinson, D.; Windfeld, K.; Colding-Jørgensen, E. Safety and Efficacy of Idalopirdine, a 5-HT₆ Receptor Antagonist, in Patients with Moderate Alzheimer’s Disease (LADDER): A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 2 Trial. *The Lancet Neurology* **2014**, *13* (11), 1092–1099. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70198-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70198-X).

.....
(podpis wnioskodawcy)