

AUTOREFERAT

**Zastosowanie elektroforezy kapilarnej (CE) w
badaniach kinetyki i aktywności enzymatycznej
fosfatazy zasadowej, fosfatazy kwaśnej,
acetylocholinoesterazy i katalazy z wykorzystaniem
pochodnych aminoalkanoli.**

Błażej Grodner

Zakład Biochemii i Farmakogenomiki

Wydział Farmaceutyczny

Warszawski Uniwersytet Medyczny

Warszawa 2023

1. Dane personalne

Imię i nazwisko: Błażej Grodner

Miejsce zatrudnienia: Zakład Biochemii i Farmakogenomiki, Wydział Farmaceutyczny
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej,
Warszawski Uniwersytet Medyczny.

Stanowisko: Adiunkt badawczo-dydaktyczny

2. Posiadane stopnie naukowe i dyplomy

Dyplom magistra farmacji - uzyskany w dniu 6 października 2000 r., na podstawie pracy
Magisterskiej pt. „Markery nowotworowe CEA i CA 19.9 w raku jelita grubego”. Praca
została wykonana w Katedrze i Zakładzie Biochemii i Chemii Klinicznej Wydziału
Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Warszawie. Promotorem pracy był Pan Prof. dr
hab. n. farm. Jan Pachecka. Stopień naukowy doktora nauk farmaceutycznych - uzyskany w
dniu 12 grudnia 2007 r. na podstawie rozprawy doktorskiej pt. „Walidacja i próba
zastosowania metody oznaczania enancjomerów mianseryny w surowicy krwi techniką
elektroforezy kapilarnej”. Praca została wykonana w Katedrze i Zakładzie Biochemii i
Chemii Klinicznej Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Warszawie.
Promotorem pracy był Pan Prof. dr hab. n. farm. Jan Pachecka.

3. Dotychczasowy przebieg zatrudnienia w jednostkach naukowych

Po ukończeniu studiów, od dnia 10.10.2000r. rozpocząłem studia doktoranckie na Wydziale
Farmaceutycznym Akademii Medycznej w Warszawie. Po ukończeniu studiów obroniłem
pracę doktorską wykonaną w Katedrze i Zakładzie Biochemii i Chemii Klinicznej, pod
kierunkiem Pana Prof. dr hab. n. farm. Jana Pachecka. Od 2007 r. do chwili obecnej
zatrudniony jestem na etacie adiunkta w Zakładzie Biochemii i Farmakogenomiki Wydziału
Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z 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.)

a) tytuł osiągnięcia naukowego:

Zastosowanie elektroforezy kapilarnej CE w badaniach kinetyki i aktywności enzymatycznej fosfatazy zasadowej, fosfatazy kwaśnej, acetylocholinoesterazy i katalazy z wykorzystaniem pochodnych aminoalkanoli.

b) autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa:

Osiągnięciem naukowym, będącym podstawą postępowania habilitacyjnego, jest spójny tematycznie cykl siedmiu publikacji anglojęzycznych prac badawczych opublikowanych po uzyskaniu stopnia naukowego doktora. Dla każdej pracy podano współczynnik oddziaływania czasopisma (Impact Factor) oraz punktację MNiSW. Wartości powyższych współczynników zostały potwierdzone przez Bibliotekę Główną Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

H1. Błażej Grodner*, Jacek Łukaszkievicz, Bożena Kuran, Mariola Krawiecka, „Capillary electrophoresis separation of aminoalkanol derivatives of 1,7-dimethyl-8,9-diphenyl-4-azatricyclo[5.2.1.0]dec-8-ene-3,5,10-trione as potential anticancer drugs”, Journal of Separation Science, 37 (23), 3564 - 3570, 2014. **IF = 2,737, MNiSW = 30**

Wkładem własnym prowadzącym do powstania niniejszej pracy było zaprojektowanie koncepcji badań, opracowanie metody analitycznej, zastosowanie opracowanej metodologii w technice elektroforezy kapilarnej, wykonanie pomiarów, główna (generalna) analiza danych, przygotowanie manuskryptu oraz korespondencja z recenzentami i edytorem pracy.

Mój udział procentowy szacuję na 75 %.

Oświadczenia współautorów w Załączniku 1.

H2. Błażej Grodner*, Jacek Łukaszkievicz, Mariola Napiórkowska, „Determination of the stereoisomers in aqueous medium and serum and validation studies of racemic aminoalkanol derivatives of 1,7-dimethyl-8,9-diphenyl-4-azatricyclo[5.2.1.0(2,6)]dec-8-ene-3,5,10-trione, potential new anticancer drugs, by capillary electrophoresis”, Journal of Separation Science, 39 (16), 3246 - 3253, 2016. **IF = 2,557, MNiSW = 30**

Wkładem własnym prowadzącym do powstania niniejszej pracy było zaprojektowanie koncepcji badań, opracowanie metody analitycznej, zastosowanie opracowanej metodologii w technice elektroforezy kapilarnej, wykonanie pomiarów, generalna analiza danych, przeprowadzenie optymalizacji i walidacji metody, przygotowanie manuskryptu, przeprowadzenie korekty pracy oraz korespondencja z recenzentami i edytorem.

Mój udział procentowy szacuję na 80 %.

Oświadczenia współautorów w Załączniku 2.

H3. Błażej Grodner*, Mariola Napiórkowska, „Characterization and inhibition studies of tissue nonspecific alkaline phosphatase by aminoalkanol derivatives of 1,7-dimethyl-8,9-diphenyl-4-azatricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-ene-3,5,10-trione, new competitive and non-competitive inhibitors, by capillary electrophoresis”, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 43, 285 - 290, 2017. **IF = 2,831, MNiSW = 35**

Wkładem własnym prowadzącym do powstania niniejszej pracy było zaprojektowanie koncepcji badań, szczegółowe opracowanie metody analitycznej, zastosowanie opracowanej metodologii w technice elektroforezy kapilarnej, wykonanie pomiarów, generalna analiza danych zastosowanej metody, przeprowadzenie pełnej optymalizacji i walidacji metody, przeprowadzenie i szczegółowa analiza wyników badań kinetyki enzymatycznej, przygotowanie manuskryptu, przeprowadzenie korekty pracy oraz korespondencja z recenzentami i edytorem.

Mój udział procentowy szacuję na 90 %.

Oświadczenia współautorów w Załączniku 3.

H4. Błażej Grodner*, Mariola Napiórkowska, „Capillary electrophoresis for the investigation of two novel aminoalkanol derivatives of 1,7-diethyl-8,9-diphenyl-4-azatricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-ene-3,5,10-trione as potential anticancer drugs in water solution and serum”, Journal of Separation Science, 43 (3), 648 - 656, 2020. **IF = 3,645, MNiSW = 70**

Wkładem własnym prowadzącym do powstania niniejszej pracy było zaprojektowanie koncepcji badań, opracowanie metody analitycznej, zastosowanie opracowanej metodologii w technice elektroforezy kapilarnej, wykonanie pomiarów, główna analiza danych, przeprowadzenie optymalizacji i walidacji metody, przygotowanie manuskryptu, przeprowadzenie korekty pracy oraz korespondencja z recenzentami i edytorem.

Mój udział procentowy szacuję na 90 %.

Oświadczenia współautorów w Załączniku 4.

H5. Błażej Grodner*, Mariola Napiórkowska, „Dual 2-Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin and 5,10,15,20-Tetrakis (4-Hydroxyphenyl) Porphyrin System as a Novel Chiral-Achiral Selector Complex for Enantioseparation of Aminoalkanol Derivatives with Anticancer Activity in Capillary Electrophoresis”, Molecules, 26 (993), 1 - 16, 2021. **IF = 4,927, MNiSW = 140**

Wkładem własnym prowadzącym do powstania niniejszej pracy było zaprojektowanie koncepcji badań, opracowanie metody analitycznej, zastosowanie opracowanej metodologii w technice elektroforezy kapilarnej, wykonanie pomiarów, główna analiza danych,

przeprowadzenie optymalizacji i walidacji metody, przygotowanie manuskryptu, przeprowadzenie korekty pracy oraz korespondencja z recenzentami i edytorem.

Mój udział procentowy szacuję na 90 %.

Oświadczenia współautorów w Załączniku 5.

H6. Błażej Grodner*, Mariola Napiórkowska, Dariusz Maciej Pisklak, „Kinetic Studies of Newly Patented Aminoalkanol Derivatives with Potential Anticancer Activity as Competitive Inhibitors of Prostate Acid Phosphatase”, *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (21), 11761-11777, 2021; <https://doi.org/10.3390/ijms222111761>. **IF = 6,208, MNiSW = 140**

Wkładem własnym prowadzącym do powstania niniejszej pracy było zaprojektowanie koncepcji badań, szczegółowe opracowanie metody analitycznej, zastosowanie opracowanej metodologii w technice elektroforezy kapilarnej, wykonanie pomiarów, generalna analiza danych zastosowanej metody, przeprowadzenie pełnej optymalizacji i walidacji metody, przeprowadzenie i szczegółowa analiza wyników badań kinetyki enzymatycznej, przygotowanie manuskryptu, przeprowadzenie korekty pracy oraz korespondencja z recenzentami i edytorem.

Mój udział procentowy szacuję na 85 %.

Oświadczenia współautorów w Załączniku 6.

H7. Błażej Grodner*, Mariola Napiórkowska, Dariusz Maciej Pisklak, „In Vitro and In Silico Kinetic Studies of Patented 1,7-diEthyl and 1,7-diMethyl Aminoalkanol Derivatives as New Inhibitors of Acetylcholinesterase”, *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 270-289, 2022; <https://doi.org/10.3390/ijms23010270>. **IF = 6,208, MNiSW = 140**

Wkładem własnym prowadzącym do powstania niniejszej pracy było zaprojektowanie koncepcji badań, szczegółowe opracowanie metody analitycznej, zastosowanie opracowanej metodologii w technice elektroforezy kapilarnej, wykonanie pomiarów, generalna analiza danych zastosowanej metody, przeprowadzenie pełnej optymalizacji i walidacji metody, przeprowadzenie i szczegółowa analiza wyników badań kinetyki enzymatycznej, przygotowanie manuskryptu, przeprowadzenie korekty pracy oraz korespondencja z recenzentami i edytorem.

Mój udział procentowy szacuję na 85 %.

Oświadczenia współautorów w Załączniku 7.

H8. Błażej Grodner*, Mariola Napiórkowska, Dariusz Maciej Pisklak, „Catalase inhibition by aminoalkanol derivatives with potential anti-cancer activity. In vitro and in silico studies using capillary electrophoresis method.”, *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), 7123-7140, 2022 <https://doi.org/10.3390/ijms23137123>. **IF = 6,208, MNiSW = 140**

Wkładem własnym prowadzącym do powstania niniejszej pracy było zaprojektowanie koncepcji badań, szczegółowe opracowanie metody analitycznej, zastosowanie opracowanej metodologii w technice elektroforezy kapilarnej, wykonanie pomiarów, generalna analiza danych zastosowanej metody, przeprowadzenie pełnej optymalizacji i walidacji metody, przeprowadzenie i szczegółowa analiza wyników badań kinetyki enzymatycznej, przygotowanie manuskryptu, przeprowadzenie korekty pracy oraz korespondencja z recenzentami i edytorem.

Mój udział procentowy szacuję na 85 %.

Oświadczenia współautorów w Załączniku 8.

Sumaryczny współczynnik oddziaływania (**Impact Factor**) publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego w postępowaniu habilitacyjnym wynosi: **35,321**, a punktacja **MNiSW: 725**.

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania:

Wstęp

Oczekiwania jakie wiąże się z wprowadzeniem do leczenia pochodnych aminoalkanoli ogromnie zainspirowały mnie do podjęcia dwukierunkowych badań tych związków.

W części pierwszej omawianego cyklu habilitacyjnego skupiłem się nad kierunkiem analitycznym ich badań. Tu za cel postawiłem sobie opracowanie metod elektroforezy kapilarnej (CE) umożliwiających oznaczanie tych nowych związków w roztworach wodnych – będących podstawą i punktem wyjścia do jakościowego i ilościowego ich oznaczania. Po pomyślnie zakończonych badaniach przystąpiłem do opracowania metod CE pozwalających badać pochodne aminoalkanoli w materiale biologicznym – surowicy – chcąc w ten sposób wykazać możliwość zastosowania opracowanych metod do badań monitorowania stężeń pochodnych aminoalkanoli, biodostępności i innych parametrów farmakokinetycznych w materiale pochodzącym od potencjalnego pacjenta. Ostatnim wyzwaniem jakim postawiłem sobie w cyklu analitycznym było opracowanie metod CE do jakościowego i ilościowego oznaczania poszczególnych form enancjomerycznych pochodnych aminoalkanoli w

roztworach wodnych i surowicy, co ogromnie poszerza możliwości badawcze wspomnianych związków.

Zakończone z dużym powodzeniem badania analityczne zainspirowały mnie do dalszego rozwoju nowatorskich metod elektroforezy kapilarnej w kierunku badań biochemicznych. Dlatego też w drugiej części niniejszego cyklu habilitacyjnego skupiłem się na badaniach kinetyki enzymatycznej wybranych klas enzymów w obecności pochodnych aminoalkanoli z zastosowaniem opracowanych przeze mnie metod CE. Cel ten podyktowany był chęcią uzyskania odpowiedzi dotyczącej wpływu pochodnych aminoalkanoli jako potencjalnych leków na aktywność enzymatyczną fosfatazy zasadowej, fosfatazy kwaśnej, acetylocholinoesterazy i katalazy.

Elektroforeza kapilarna

Elektroforeza kapilarna (*Capillary Electrophoresis*, CE) polega na migracji cząsteczek, definiowanej jako transport cząsteczek w roztworze elektrycznie naładowanych cząstek pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego [1]. Podczas tego transportu następuje rozdział mieszaniny na poszczególne składniki, a przebiega on w cienkiej kapilarze wypełnionej buforem separacyjnym. Podstawą rozdziałów elektroforetycznych jest różnica w prędkościach migracji cząstek obdarzonych ładunkiem w stałym polu elektrycznym. Kationy o ładunku dodatnim są przyciągane przez katodę (–), a aniony – przez anodę (+). Prędkość migracji $v[\text{cm} \times \text{s}^{-1}]$ w kierunku elektrod jest różna dla różnych cząsteczek i zależy od natężenia pola elektrycznego $E \times [\text{V}/\text{cm}]$ oraz ruchliwości elektroforetycznej:

$$v = \mu_{\text{ef}} E$$

Natomiast ruchliwość danego jonu, $\mu_{\text{ef}} [\text{m}^2 \times \text{V}^{-1} \times \text{s}^{-1}]$, to stała charakterystyczna dla tego jonu określona przez siłę elektryczną, której doświadcza cząsteczka, równoważoną przez opór tej cząsteczki wynikający z siły tarcia.

$$\mu_{\text{ef}} = q / (6 \times \pi \times r \times \eta)$$

Ta ruchliwość jest proporcjonalna do wartości ładunku cząsteczki (q), a odwrotnie proporcjonalna do lepkości środowiska (η) i promienia cząsteczki (r). Oznacza to, że im mniejsza cząsteczka i im większy jej ładunek, tym większa jest szybkość migracji. Efektywna ruchliwość danego jonu często mocno zależy od pH i składu buforu roboczego [2]. Migracja cząsteczek przebiega w kierunku wylotu kapilary, na której końcu znajduje się detektor

rejestrujący pojawianie się kolejnych frakcji rozdzielanych cząsteczek. Często też stosuje się dodatkową charakterystykę, tzw. średnią ruchliwość elektroforetyczną, dla substancji składających się z kilku składników, które są ze sobą w dynamicznej równowadze. Komponenty tej substancji wykazują różne wartości ruchliwości lub nie mogą być rozdzielone elektroforetycznie i substancja porusza się jako całość w polu elektrycznym.

Podstawowym czynnikiem działania, charakterystycznym tylko dla metody elektroforezy kapilarnej, jest przepływ elektroosmotyczny (EOF). Dodatkowo wpływa on na rozdział mieszaniny cząsteczek. EOF to masowy przepływ cieczy w kapilarze. Wynika z wpływu przyłożonego pola elektrycznego na podwójną warstwę elektryczną utworzoną z jonów roztworu. To podwójna warstwa elektryczna na granicy faz między roztworem a ścianą kapilary o licznych grupach silanolowych (SiOH), które mogą występować w formie anionowej (SiO^-) [3]. Przyłożenie napięcia do kapilary wypełnionej elektrolitem powoduje przepływ roztworu wzdłuż kapilary. Ten przepływ skutecznie przemieszcza jony rozpuszczonej substancji wzdłuż kapilary, w kierunku detektora. Pojawia się on w wyniku jonizacji kwaśnych grup silanolowych po wewnętrznej stronie kapilary w kontakcie z roztworem buforowym. Przy wysokim pH te grupy ulegają dysocjacji, co powoduje powstanie ujemnie naładowanej powierzchni. Aby zachować elektroobojętność, kationy gromadzą się blisko powierzchni. Po przyłożeniu napięcia migrują do katody. Występujące w roztworze cząsteczki wody solwatujące kationy również się poruszają, powodując przepływ „netto” roztworu wzdłuż kapilary. Ten efekt można uznać za „pompę elektryczną”. Zakres przepływu elektroosmotycznego wiąże się z ładunkiem na kapilarze, lepkością buforu oraz stałą dielektryczną buforu i wyraża się w postaci równania:

$$\mu_{\text{EOF}} = (\epsilon\zeta/\eta)$$

gdzie: μ_{EOF} = ruchliwość EOF, η = lepkość, a ζ = potencjał zeta (ładunek na powierzchni kapilarnej).

Kolejnymi ważnymi parametrami w CE są: ruchliwość, czas migracji i rozdzielczość. Czas potrzebny na dotarcie substancji rozpuszczonej do punktu detekcji nazywa się czasem migracji. Określa się go przez iloraz odległości i prędkości poruszania się danej cząsteczki:

$$t_m = L^2/\mu V$$

gdzie:

μ – ruchliwość elektroforetyczna

V – przyłożone napięcie

L – całkowita długość kapilary.

Jak wspomniano wcześniej, ruchliwość elektroforetyczna μ_{ef} to wielkość charakterystyczna dla danej cząsteczki. Jest ona tym większa, im mniejszy jest promień cząsteczki i im większa jest gęstość ładunku w danej cząsteczce.

Rozdzielczość składników próbki stanowi ostateczny cel opracowania metody separacji. Rozdzielczość pomiędzy dwoma pikami w rozdziale elektroforetycznym opisuje poniższe równanie:

$$R = 2 \frac{(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2}$$

gdzie $t_2 \geq t_1$

t_1 – czas migracji składnika 1 [s]

t_2 – czas migracji składnika 2 [s]

w_1 – szerokość pików składnika 1 [s]

w_2 – szerokość pików składnika 2 [s].

Rodzaje elektroforezy kapilarnej

Istnieje wiele odmian techniki elektroforezy kapilarnej szeroko opisywanych w literaturze. Do ich głównych rodzajów należą: elektroforeza strefowa (CZE), micelarna elektroforeza kapilarna (MEKC), żelowa elektroforeza kapilarna (GEC), izotachoforeza (ITP) oraz kapilarne ogniskowanie izoelektryczne (CIEF) [4].

Najprostszą i najczęściej stosowaną techniką elektroforezy kapilarnej jest strefowa elektroforeza kapilarna. W jej przypadku proces rozdzielania przebiega w kapilarze w całości wypełnionej jednolitym buforem. Po przyłożeniu napięcia proces separacji opiera się na

różnicach w ruchliwości elektroforetycznej analitów, które z kolei zależą od tego, jaki jest stosunek ładunku do wielkości cząsteczki [4, 5]

Chiralność w CZE

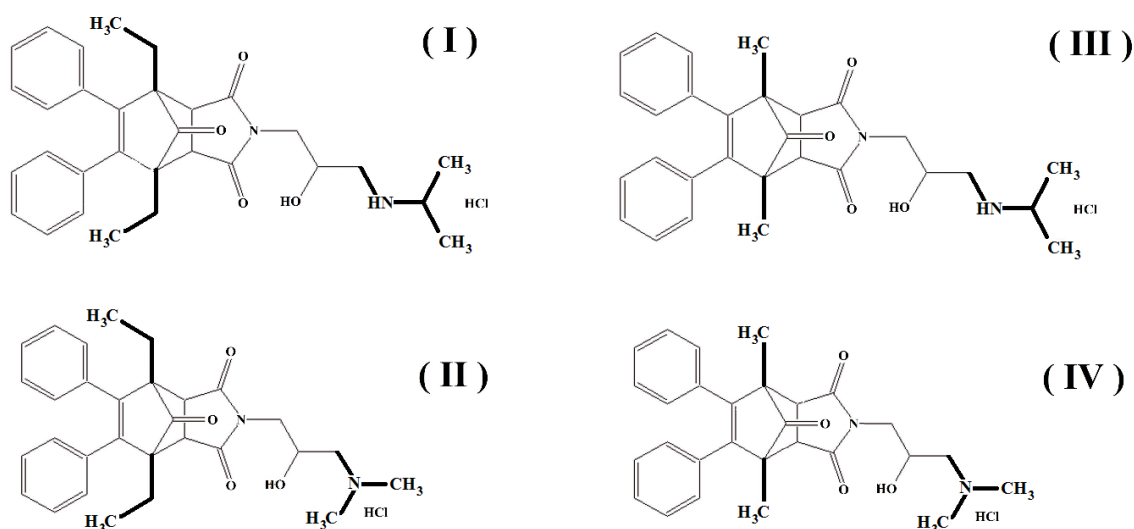
Analiza chiralna zyskuje coraz większe znaczenie zarówno w przemyśle farmaceutycznym, jak i spożywczym. Rozdziały chiralne, wykonywane często za pomocą HPLC i GC, mogą być skomplikowane i trudne do optymalizacji. Ponadto chiralne fazy stacjonarne są często drogie. W przeciwieństwie do nich analiza chiralna z zastosowaniem techniki CZE zwykle obejmuje dodanie chiralnego selektora do buforu roboczego. Selektorami mogą być na przykład: cyklodekstryny, etery koronowe, sole żółciowe, kompleksy miedzi(II) – asparaginian.

Najczęściej stosowanymi selektorami chiralnymi w CZE są cyklodekstryny (CD). To niejonowe cykliczne oligosacharydy składające się z sześciu, siedmiu lub ośmiu jednostek glukozy, nazywane odpowiednio: α -CD, β -CD i γ -CD. Cząsteczki cyklodekstryn przyjmują konformację krzesłkową i orientują się tak, że cząsteczka tworzy strukturę toroidalnego lub pustego stożka. Różnorodne rozpuszczalne i nierozpuszczalne w wodzie związki mogą wpasowywać się do tak utworzonej wnęki, tworząc kompleksy inkluzyjne [6, 7, 8, 9, 10]. Wnęka jest stosunkowo hydrofobowa, podczas gdy powierzchnia zewnętrzna – hydrofilowa. Na obwodzie znajdują się chiralne drugorzędowe grupy hydroksylowe. Selektywność chiralna wynika z włączenia hydrofobowej części substancji rozpuszczonej do wnęki, a także z wiązania wodorowego z chiralnymi ugrupowaniami hydroksylowymi. Różne pochodne CD, takie jak karboksyalkilowane, sukcyńlowane i rozpuszczalne zjonizowane polimery mogą być stosowane zarówno do zmiany selektywności, jak i poprawy właściwości detekcji badanych związków optycznie czynnych [11]. Co więcej, średnica cząsteczek cyklodekstryn jest również czynnikiem chiralnego rozpoznawania. Zastosowanie cząsteczek cyklodekstryn o różnych rozmiarach skutkuje bardzo różnymi enancjoselektywnościami [12]. Dzięki różnorodności grup funkcyjnych potencjalna liczba cząsteczek cyklodekstryn staje się niemal nieograniczona. Przez to nieograniczona staje się też liczba cząsteczek poddawanych chiralnej separacji z zastosowaniem wspomnianych cyklodekstryn [13, 14].

Zastosowanie elektroforezy kapilarnej w badaniach farmaceutycznych i biochemicznych pochodnych aminoalkanoli

Przed wprowadzeniem do badań klinicznych każda nowa substancja o potencjalnych właściwościach leczniczych musi przejść szereg testów toksykologicznych i biochemicznych, pozwalających na zastosowanie jej u docelowej grupy pacjentów. Nowymi, potencjalnymi substancjami leczniczymi o charakterze związków przeciwnowotworowych, przedstawionymi w niniejszym cyklu habilitacyjnym, są cztery pochodne dwóch par aminoalkanoli:

- izopropylamino-1,7-dietyl-8,9-difenyl-4azatricyklo [5.2.1.0^{2,6}] dek-8-en-3,5,10-trionu (I) i dimetyloamino-1,7-dietyl-8,9-difenyl-4azatricyklo [5.2.1.0^{2,6}] dek-8-en-3,5,10-trionu (II),
- izopropylamino-1,7-dimetyl-8,9-difenyl-4-azatricyklo [5.2.1.0^{2,6}] dek-8-en-3,5,10-trionu (III) i dimetyloamino-1,7-dimetyl-8,9-difenyl-4-azatricyklo [5.2.1.0^{2,6}] dek-8-en-3,5,10-trionu (IV) (rys. 1).



Rysunek 1. Wzory strukturalne pochodnych aminoalkanoli (I), (II), (III) i (IV).

Syntezę tych związków oraz ich właściwości cytotoksyczne w odniesieniu do komórek nowotworowych linii K562 i HeLa opisano w zgłoszeniu patentowym [15].

Każda substancja lecznicza, oprócz głównego kierunku działania terapeutycznego, może również posiadać wiele innych dodatkowych kierunków działań o pozytywnym lub negatywnym charakterze. Brak gruntownych i różnorodnych badań zwłaszcza nowych związków leczniczych może doprowadzić do wystąpienia nagłych i nieoczekiwanych działań, które mogą się pojawić u pacjenta po podaniu tych substancji. Ich wyjaśnianie może być długotrwałe, a co za tym idzie – negatywne w skutkach. Istnieje zatem realna potrzeba prowadzenia możliwie największej liczby badań przedklinicznych określających właściwości substancji, które mogą się stać potencjalnymi związkami leczniczymi.

Podstawą określania wszelkich możliwych cech i parametrów substancji leczniczych są metody ich badania i oznaczania zarówno w roztworach wodnych, jak i materiale biologicznym. Opracowanie metod jakościowego i ilościowego oznaczania tego rodzaju związków leczniczych odgrywa bardzo ważną rolę w ustalaniu zawartości danej substancji w określonej postaci leku. Wspomaga też ustalenie stopnia czystości, ilości ewentualnych zanieczyszczeń lub produktów rozkładu tego związku, co jest niezwykle ważne w badaniach farmaceutycznych. Natomiast oznaczanie wspomnianych substancji w materiale biologicznym pozwala na badanie ich parametrów biochemicznych i farmakologicznych.

Ciekawym i ważnym odkryciem ostatnich czasów stał się fakt, iż wiele związków chemicznych, w tym leków, występuje w postaci mieszaniny ich enancjomerów [16]. Oznacza to, że jeden związek (substancja lecznicza) występujący w postaci dwóch odmian enancjomerycznych nabywa cech związków optycznie czynnych. Konsekwencją tego jest najczęściej odmienne działanie biologiczne i farmakologiczne każdego z nich [17].

Biorąc pod uwagę, że w zdecydowanej większości substancje lecznicze produkuje się i podaje w postaci mieszaniny enancjomerów, bardzo ważne jest opracowywanie metod ich selektywnego badania w różnych układach analitycznych i materiale biologicznym. Dlatego metody oznaczania wspomnianych pochodnych aminoalkanoli, a także ich postaci optycznych są niezwykle cennym narzędziem w określaniu składu enancjomerycznego danej substancji. Wpływają też na określenie kierunku jej działania i stopnia działania leczniczego lub toksyczności [18]. Natomiast badanie stężeń określonych substancji oraz stężeń ich poszczególnych form enancjomerycznych w materiale biologicznym pozwala na szczegółowe badania efektywności terapeutycznej związku jako całości i poszczególnych jego izoform, a

także kierunku ich metabolizmu, parametrów farmakologicznych, farmakokinetycznych i biodostępności.

Istnieje wiele metod analitycznych do badania i oznaczania różnych związków chemicznych. Wśród najstarszych można wyróżnić chromatografię bibułową lub chromatografię cienkowarstwową (TLC) [19]. Jednak najbardziej rozpowszechnioną metodą wydaje się wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) oraz jej różne modyfikacje [20, 21]. W przypadku związków lotnych lub związków, które łatwo przekształcić w substancje lotne, najczęściej wykorzystywaną techniką jest chromatografia gazowa (GC) [22]. Należy także wspomnieć o metodzie rezonansu magnetycznego (NMR), również wykorzystywanej jako jedna z metod analitycznych, szczególnie w przypadku ustalania struktur związków [23]. Każda z wyżej wymienionych metod charakteryzuje się pewnymi zaletami i wadami oraz określonymi możliwościami wynikającymi z ich ograniczeń.

O ile wyżej wymienione techniki znalazły szerokie zastosowanie w farmacji, wydaje się, że elektroforeza kapilarna w badaniach farmaceutycznych i biochemicznych dotyczących analizy oraz interakcji wielu związków z funkcjonalnymi układami biologicznymi jest nadal niedocenianą techniką o ogromnych możliwościach aplikacyjnych. Zdarza się również, że wpływ wielu związków na aktywność enzymatyczną jest rzadko analizowany lub nawet pomijany w badaniach farmaceutycznych. Należy jednak pamiętać, że oddziaływanie różnych substancji z układami enzymatycznymi może wywierać ogromny wpływ na szereg powiązanych ze sobą procesów biochemicznych odgrywających dużą rolę w regulacji procesów metabolicznych, a co za tym idzie, wpływa na funkcjonowanie całego organizmu. Dlatego badania skutków oddziaływania potencjalnych substancji leczniczych z układami enzymatycznymi wydają się być niezwykle istotne z punktu widzenia możliwości ich przyszłego zastosowania klinicznego.

W niniejszej rozprawie przedstawiono nowe możliwości elektroforezy kapilarnej. Wykorzystano analizę farmaceutyczną – poprzez badanie oznaczania pochodnych aminoalkanoli i ich form enancjomerycznych w roztworach wodnych i materiale biologicznym – oraz analizę biochemiczną – poprzez badanie wpływu poszczególnych pochodnych na aktywność enzymatyczną kilku wybranych enzymów. Jak wspomniano wcześniej, do określenia stopnia aktywności danego enzymu pod wpływem działania danego związku chemicznego służą badania kinetyki enzymatycznej. Metodą niezmiennie stosowaną

w tym celu od lat jest spektrofotometryczny pomiar jednego zmiennego parametru w trakcie trwania reakcji [24, 25, 26, 27]. Opracowywanie nowych metod pozwalających na równoległe badanie wielu parametrów jest bardzo potrzebne i stanowi duże wyzwanie. Dzięki temu będzie można zwiększyć dokładność pomiarów i określić wzajemne zmiany i relacje między wszystkimi składnikami danej analizy biorącymi udział w reakcji.

Do tej pory elektroforezy kapilarnej nie stosowano do badań z zakresu kinetyki enzymatycznej i określania aktywności enzymów. Dlatego w niniejszej pracy podjęto nowatorskie zastosowanie techniki CE do badań kinetycznych reakcji enzymatycznych w oparciu o nowo opracowane metody CE. Dzięki badaniom [28, 29, 30, 31] okazało się, że technika CE daje ogromne możliwości rejestracji kinetycznych procesów reakcji zachodzących z udziałem określonych enzymów w obecności badanych substancji. Zastosowana technika i opracowana metodologia pokazały możliwość jednoczesnej rejestracji zmian parametrów wszystkich składników uczestniczących w przebiegu reakcji enzymatycznej. Wspomniane metody pozwalają na precyzyjne badanie i jednoczesne, ilościowe określanie zmian ubytku substratów i przyrostu produktów reakcji katalizowanej przez dany enzym. Pozwala to na podwójną kontrolę przebiegu reakcji oraz znaczne zwiększenie dokładności i pewności pomiarów. Co więcej, opracowane metody pozwalają na solidne jakościowe i ilościowe oznaczanie wszystkich reagentów biorących udział w reakcji. Duża czułość metody pozwala na bardzo precyzyjne określenie zmian aktywności enzymów nawet przy niezwykle małych różnicach w budowie chemicznej związków.

CEL BADAWCZY

Celem badawczym przedstawionego cyklu habilitacyjnego było:

- opracowanie szeregu metod elektroforezy kapilarnej umożliwiających oznaczanie pochodnych aminoalkanoli i ich form enancjomerycznych zarówno w roztworach wodnych jak i w surowicy,
- opracowanie i zastosowanie metod elektroforezy kapilarnej do badań kinetyki i aktywności enzymatycznej fosfatazy zasadowej, fosfatazy kwaśnej, acetylocholinoesterazy i katalazy w obecności wspomnianych pochodnych aminoalkanoli.

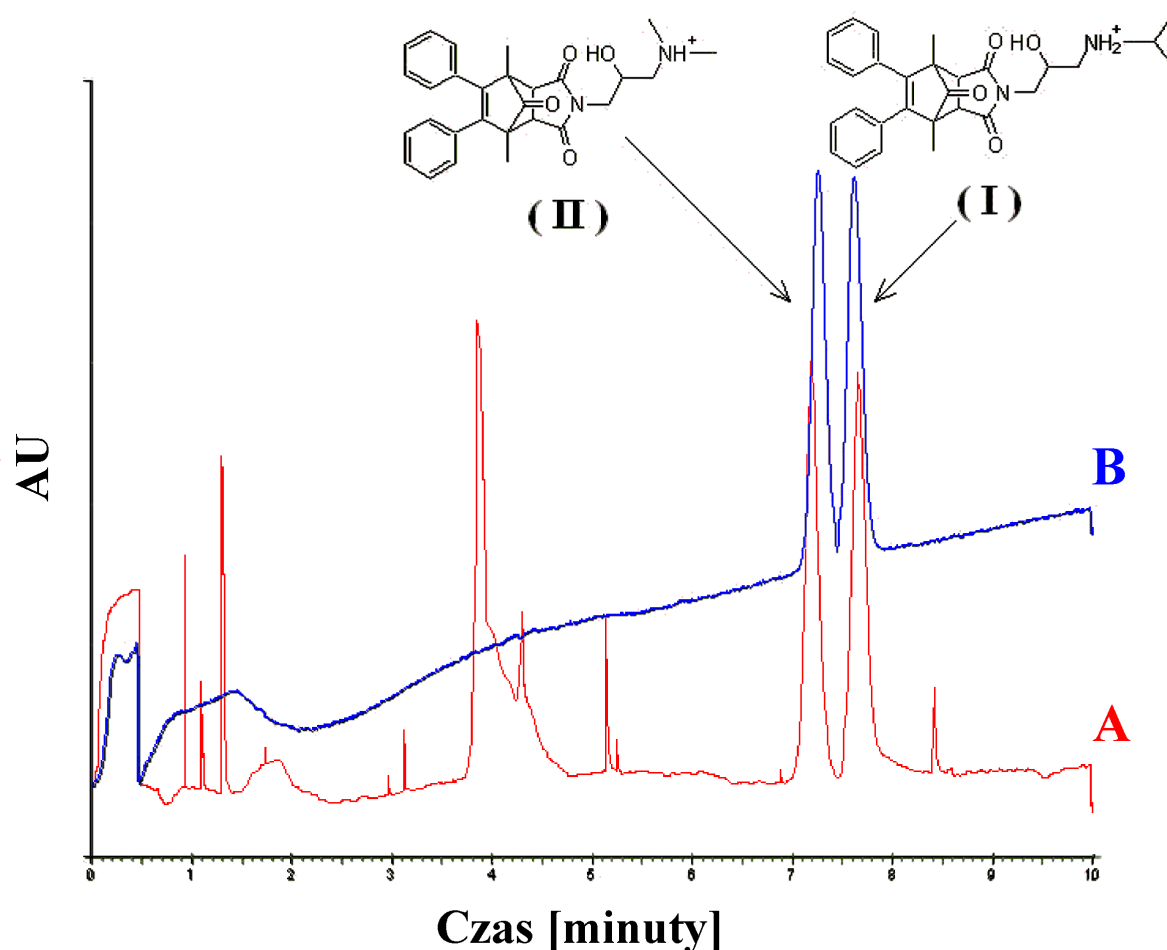
Próba wprowadzenia do lecznictwa nowych substancji o przewidywanym działaniu terapeutycznym wiąże się silnie z koniecznością opracowania metod analitycznych umożliwiających badanie tych substancji w materiale biologicznym (płynach ustrojowych), oraz w układach wodnych. Celem tych metod jest umożliwienie badania składu, zawartości danej substancji w różnych postaciach leków, składu enancjomerycznego, losów wspomnianych substancji w ustroju, monitorowaniu ich poziomu szczególnie w trakcie trwającej terapii, badaniu kierunku ich metabolizmu, szeregu parametrów biochemicznych, farmakokinetycznych oraz biodostępności, co przekłada się na uzyskanie najlepszych efektów terapeutycznych. Z tego względu, w analizie pochodnych aminoalkanoli technika elektroforezy kapilarnej może być stosowana z dużym powodzeniem. Omawiana technika ma wiele zalet w stosunku do powszechnie stosowanych metod HPLC. Po pierwsze Czas analizy przy zastosowaniu techniki CE jest zdecydowanie krótszy niż w przypadku większości metod HPLC. Ilościowa objętość odczynników stosowanych w CE jest znikoma w porównaniu z HPLC. Objętość próbki poddawanej analizie rzędu nano litrów w przypadku CE daje możliwość wielokrotnego wykonania powtórzenia pomiaru w danym analizie. Technika HPLC wymaga zastosowania zewnętrznego układu ciśnieniowego powodującego laminarny lub paraboliczny przepływ analitu skutkujący bardzo często pojawianiem się szerokich i rozmytych obrazów pików analizowanego związku. Wpływa to istotnie na dokładne określenie poziomu limitu detekcji i oznaczalności. Przewagą techniki CE jest płaski profil przepływu dzięki czemu sygnał pochodzący od analizowanej substancji daje obraz silnie zawężonego pików, co podnosi znacząco jakość uzyskiwanej rozdzielczości i oznaczalności. Ogromną przewagą nad techniką HPLC zyskuje elektroforeza kapilarna w przypadku oznaczania związków optycznie czynnych. Zastosowanie zmiennych ilości selektorów chiralnych bezpośrednio w analizie lub układzie separacyjnym daje nieporównywalnie większe możliwości w oznaczeniach związków optycznie czynnych przekładając się bezpośrednio na zdecydowanie lepszą jakość i szybkość uzyskiwanych wyników. Należy także dodać, że w technice elektroforezy kapilarnej używane są bardzo małe ilości selektorów chiralnych. Ważnym parametrem analitycznym jest czułość metody. Technika HPLC charakteryzuje się w większości przypadków lepszą czułością w porównaniu z CE. Jednak w przypadku techniki CE istnieje dodatkowa możliwość wtórnego zatężenia analizowanej próbki bezpośrednio w przestrzeni kapilary, co pozwala często na osiągnięcie lepszej lub podobnej czułości w porównaniu z HPLC. Największą jednak przewagą i zaletą omawianej

techniki jest możliwość jednoczesnego oznaczania w danej próbce analitycznej zarówno związków polarnych o różnej biegunowości jak też związków niepolarnych. W tym przypadku przewaga techniki CE nad HPLC jest ogromna. Dlatego właśnie technika CE została wybrana przeze mnie do badań pochodnych aminoalkanoli w analizie farmaceutycznej i badaniach biochemicznych.

Do cyklu habilitacyjnego włączono serię ośmiu oryginalnych, pełnotekstowych artykułów (H-1 – H-8), omówionych poniżej.

H1. Capillary electrophoresis separation of aminoalkanol derivatives of 1,7-dimethyl-8,9-diphenyl-4-azatricyclo[5.2.1.0]dec-8-ene-3,5,10-trione as potential anticancer drugs; Błażej Grodner*, Jacek Łukaszewicz, Bożena Kuran, Mariola Krawiecka, Journal of Separation Science, 37 (23), 3564 - 3570, 2014.

Celem pracy było opracowanie metody elektroforezy kapilarnej do oznaczania i rozdzielania wybranych pochodnych aminoalkanoli. Wspomniana grupa związków wykazująca potencjalne działanie przeciw nowotworowe różni się budową podstawników w pozycjach 1 i 7 oraz obecnością ugrupowań izopropiloaminowego i dimetyloaminowego głównej struktury cząsteczki. Na podstawie przeprowadzonych analiz elektroforetycznych określiłem charakterystyczne czasy migracji dla pojedynczych form danych substancji występujących osobno a także dokonałem rozdziału i określiłem charakterystyczne czasy migracji dla pochodnych aminoalkanoli występujących we wspólnej mieszaninie potwierdzając w ten sposób kolejność pojawiających się sygnałów pochodzących od określonych pochodnych. W opracowanej przeze mnie metodzie dokonałem optymalizacji wszystkich parametrów umożliwiających uzyskanie najlepszych wyników rozdziału wspomnianych pochodnych. W tym celu opracowałem odpowiedni rodzaj i skład buforu separacyjnego (rodzaj użytych substancji, stężenie i pH) oraz przeanalizowałem w pełnym zakresie wszystkie zmienne parametry fizykochemiczne metody (napięcie, długość fali, temperatura, rodzaj i czas trwania nastrzyku próbki) mające ogromny wpływ na jakość i skuteczność rozdziału oznaczanych substancji.

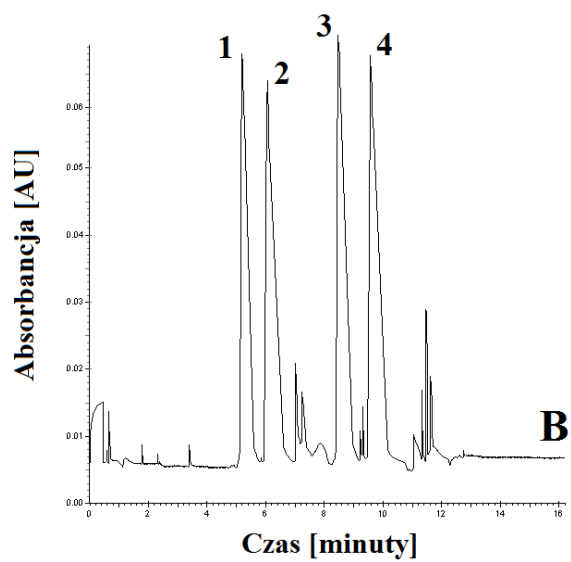
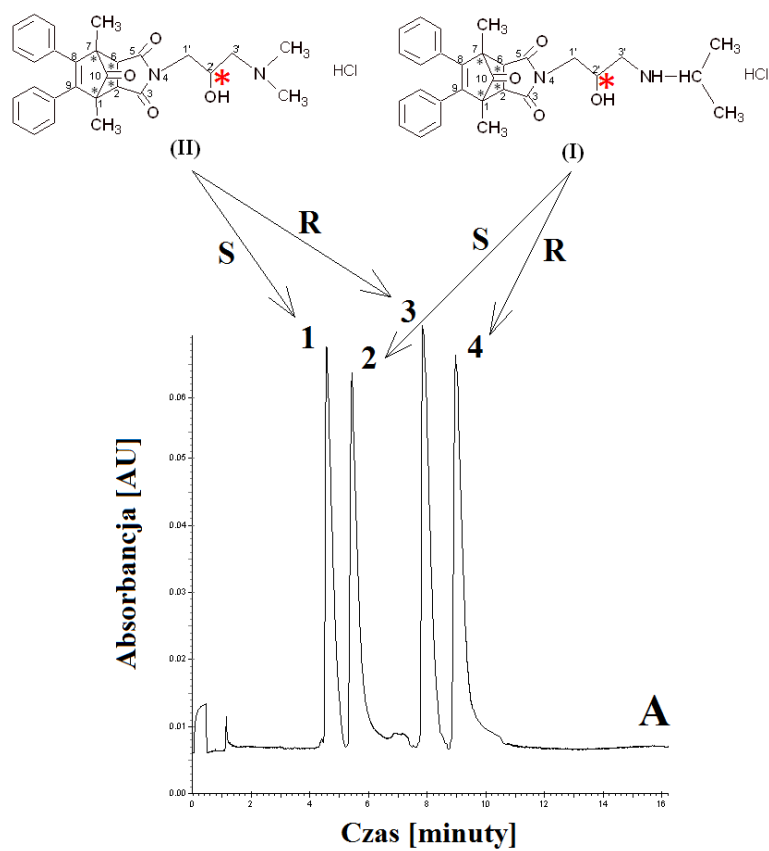


Rysunek 1. Rozdział pochodnych aminoalkanoli (I) i (II) w surowicy pacjenta (A), w surowicy standaryzowanej (Serostandard) (B). 25 mM bufor fosforanowy o pH =2.5, $\lambda = 200$ nm, napięcie separacyjne 10 kV, temperatura 25 °C.

Opracowałem także metodę ekstrakcji i przeprowadziłem pełną walidację metody oraz wykazałem możliwość jakościowego i ilościowego oznaczania pochodnych aminoalkanoli wykazując przy tym możliwość aplikacyjnego zastosowania metody.

H2. Determination of the stereoisomers in aqueous medium and serum and validation studies of racemic aminoalkanol derivatives of 1,7-dimethyl-8,9-diphenyl-4-azatricyclo[5.2.1.0(2,6)]dec-8-ene-3,5,10-trione, potential new anticancer drugs, by capillary electrophoresis, Błażej Grodner*, Jacek Łukaszewicz, Mariola Napiórkowska
Journal of Separation Science, 39 (16), 3246 - 3253, 2016.

Celem niniejszej pracy było opracowanie metody elektroforezy kapilarnej do separacji i oznaczania izomerów optycznych pochodnych aminoalkanoli w roztworach wodnych i surowicy. Dzięki opracowanej przeze mnie metodzie dokonałem rozdziału pochodnych aminoalkanoli na ich poszczególne enancjomery. W celu uzyskania enancjoselektywnej separacji wspomnianych pochodnych przeprowadziłem badania rodzaju selektora chiralnego umożliwiającego uzyskanie najlepszych parametrów rozdziału enancjomerów pochodnych aminoalkanoli. Badane pochodne zawierają w swojej strukturze 5 węgli asymetrycznych. Cztery z nich występują w głównej strukturze związku, w pozycjach 1,2,6 i 7, podczas gdy jeden (piąty) występuje w łańcuchu bocznym w pozycji 2'. Do rozdziału pochodnych aminoalkanoli na poszczególne enancjomery użyłem trzech pochodnych cyklodekstryn (α , β i γ). Po przeprowadzeniu wielu analiz do dalszych badań wybrałem i zastosowałem γ cyklodekstrynę, która umożliwiła osiągnięcie najlepszej rozdzielczości i czasu rozdziału oraz pozwoliła na uzyskanie najlepszego sygnału detekcji umożliwiającego osiągnięcie zadowalających poziomów limitu detekcji i oznaczalności. W niniejszej pracy wykazałem także iż rozdział pochodnych aminoalkanoli na poszczególne enancjomery przy zastosowaniu wspomnianych selektorów chiralnych odnosi się tylko do asymetrycznego atomu węgla występującego w podstawniku w pozycji 2'. Wydaje się zatem, że wszystkie trzy pochodne cyklodekstryn, a w szczególności γ cyklodekstryna, wykazują bardzo dobrą enancjoselektywność separacyjną tylko w stosunku do asymetrycznego atomu węgla występującego w podstawniku, podczas gdy w stosunku do pozostałych asymetrycznych atomów węgla występujących w głównej strukturze związku enancjoselektywność wspomnianych selektorów chiralnych wydaje się być żadna (zerowa). Dzięki temu zastosowane w opracowanej przeze mnie metodzie α , β i γ cyklodekstryny pozwalają na selektywną separację par enancjomerów tylko w odniesieniu do jednego, asymetrycznego atomu węgla występującego w pozycji 2'.

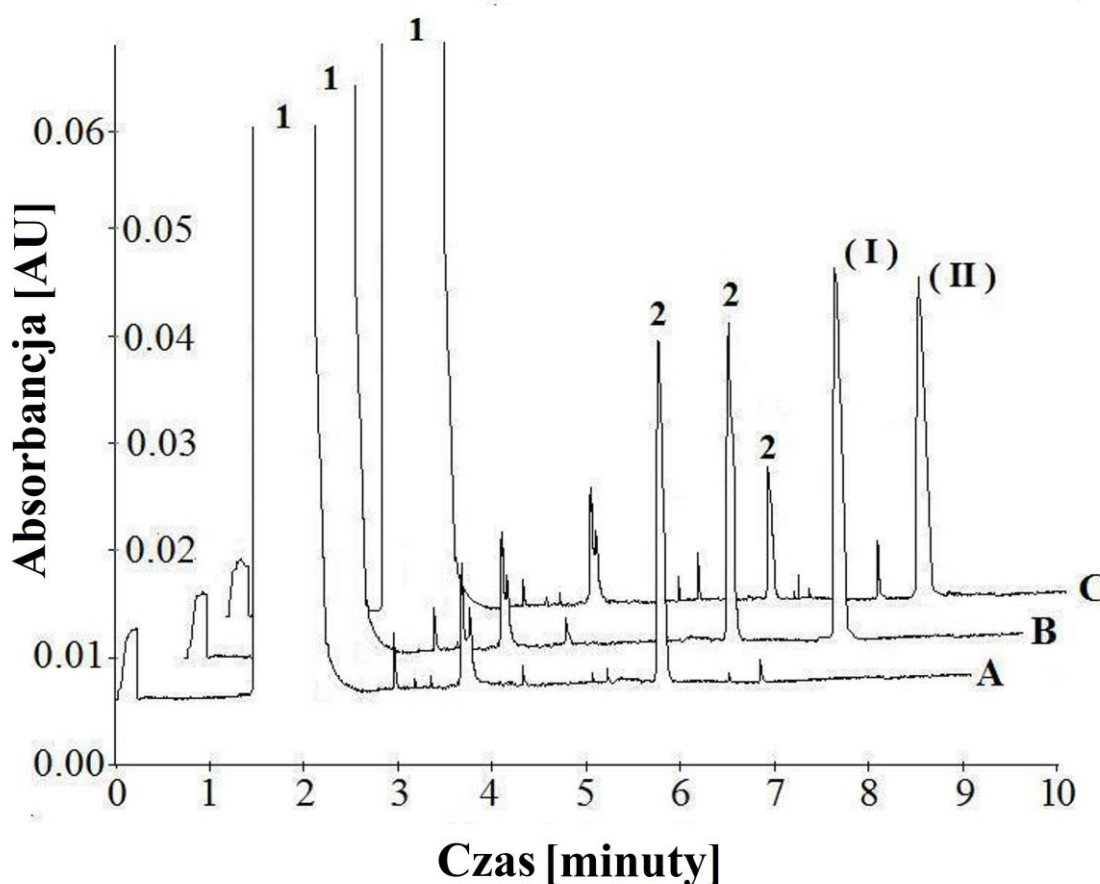


Rysunek 1. Rozdział pochodnych aminoalkanoli (I)S, (I)R i (II)S, (II)R w surowicy standaryzowanej (A), w surowicy pacjenta (B). 25 mM bufor fosforanowy o pH =2.5 z 5% stężeniem γ cyklodekstryn, $\lambda = 200$ nm, napięcie separacyjne 10 kV, temperatura 25 °C.

W niniejszej pracy przeprowadziłem także optymalizację metody polegającą na opracowaniu odpowiedniego rodzaju, składu i pH odpowiedniego układu separacyjnego oraz doboru najbardziej optymalnych parametrów fizykochemicznych (napięcie, długość fali, temperatura, rodzaj i czas trwania nastrzyku próbki) pozwalających na uzyskanie najlepszej rozdzielczości, limitu detekcji i oznaczalności. Przeprowadziłem także pełną walidację metody wykazując dużą przydatność aplikacyjną do jakościowych i ilościowych badań poziomu poszczególnych form enancjomerycznych pochodnych aminoalkanoli w fazie wodnej i materiale klinicznym (surowica).

H3. Characterization and inhibition studies of tissue nonspecific alkaline phosphatase by aminoalkanol derivatives of 1,7-dimethyl-8,9-diphenyl-4-azatricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-ene-3,5,10-trione, new competitive and non-competitive inhibitors, by capillary electrophoresis, Błażej Grodner*, Mariola Napiórkowska, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 43, 285 - 290, 2017.

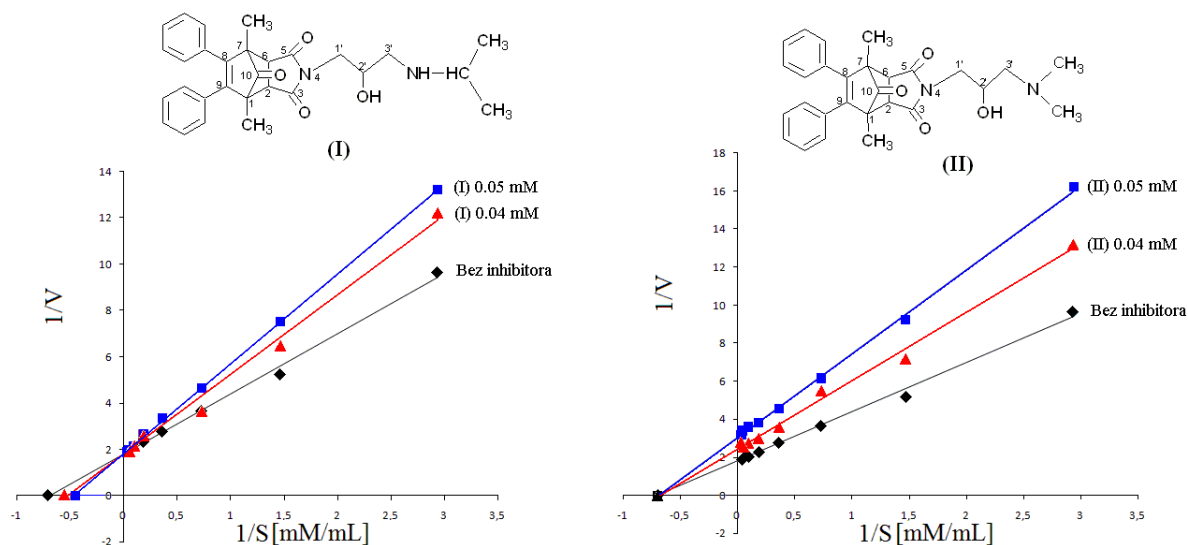
Celem niniejszej pracy było opracowanie nowatorskiej metody elektroforezy kapilarnej do badań parametrów kinetycznych reakcji enzymatycznej oraz zastosowanie opracowanej metody do określenia typu inhibicji enzymatycznej fosfatazy zasadowej pod wpływem działania pochodnych aminoalkanoli. W niniejszej pracy opracowałem i zastosowałem nowatorską metodę elektroforezy kapilarnej do badań wzajemnych zmian stężeń substratów (p-nitrofenylofosforanu) i produktów katalizowanej przez fosfatazę zasadową reakcji enzymatycznej (p-nitrofenolu) w obecności pochodnych aminoalkanoli. W tym celu opracowałem odpowiedni układ separacyjny umożliwiający rozdział i detekcję wszystkich, poszczególnych składników próbki (analizy) biorących udział w reakcji enzymatycznej oraz dokonałem optymalizacji wszystkich, możliwych parametrów fizykochemicznych w celu uzyskania najbardziej dokładnych wyników badań.



Rysunek 1. Elektroforegramy przedstawiające rozdział: (A) 46.00 mM/L p-nitrofenylofosforanu (PN-TE)(1), 0.01 mM/L produktu reakcji - p-nitrofenolu (PN-OL)(2) w 2 mL próbki inkubacyjnej, (B) 46.00 mM/L p-nitrofenylofosforanu (PN-TE)(1), 0.008 mM/L produktu reakcji - p-nitrofenolu (PN-OL)(2) w obecności 0.05 mM/L pochodnej (I) w 2 mL próbki inkubacyjnej, (C) 46.00 mM/L p-nitrofenylofosforanu (PN-TE)(1), 0.005 mM/L produktu reakcji - p-nitrofenolu (PN-OL)(2) w obecności 0.05 mM/L pochodnej (II) w 2 mL próbki inkubacyjnej.

Jednoczesne śledzenie zmian stężeń substratów i produktów reakcji katalizowanej przez enzym (w tym przypadku fosfatazę alkaliczną) w określonych odcinkach czasowych i zmiennych stężeniach pochodnych aminoalkanoli pozwoliło na precyzyjne określenie parametrów kinetycznych danej reakcji enzymatycznej. Opracowana przeze mnie metoda pozwoliła na jakościowe i ilościowe oznaczenie wszystkich składników reagującej mieszaniny na podstawie określonych czasów migracji i pomiarów zmian pól powierzchni pod pikami. Na podstawie uzyskanych wyników wyznaczyłem i określiłem szybkości reakcji

(V_{max}) oraz stałe Michaelisa-Menten (K_m) dla poszczególnych układów enzymatycznych zawierających pochodne aminoalkanoli. W przeprowadzonych przeze mnie badaniach wykazałem, że drobne różnice w budowie chemicznej cząsteczek pochodnych aminoalkanoli wywołują różny typ inhibicji fosfatazy zasadowej (rysunek 2).



Rysunek 2. Przebieg kinetyki enzymatycznej w postaci wykresów Lineweaver–Burk’a dla fosfatazy zasadowej hamowanej przez pochodne (I) i (II) o stężeniach: (♦) 0 mM; (▲) 0.04 mM; (■) 0.05mM.

Opierając się na uzyskanych wynikach wykazałem, że pochodna izopropyloaminowa z dwoma podstawnikami metylowymi (I) wykazywała kompetycyjny typ hamowania, podczas gdy pochodna dimetyloaminowa z dwoma podstawnikami metylowymi (II) niekompetycyjny typ hamowania aktywności fosfatazy alkalicznej (tabela 1).

Tabela 1. Określenie typu inhibicji fosfatazy zasadowej wywołanego przez pochodne (I) i (II) aminoalkanoli.

	Układ kontrolny (bez inhibitora)	Układ z inhibitorem (I)	Układ z inhibitorem (II)
Km	1.515	2.272	1.538
Vmax	1.808	1.818	3.038
Typ inhibicji		Kompetycyjny	Niekompetycyjny

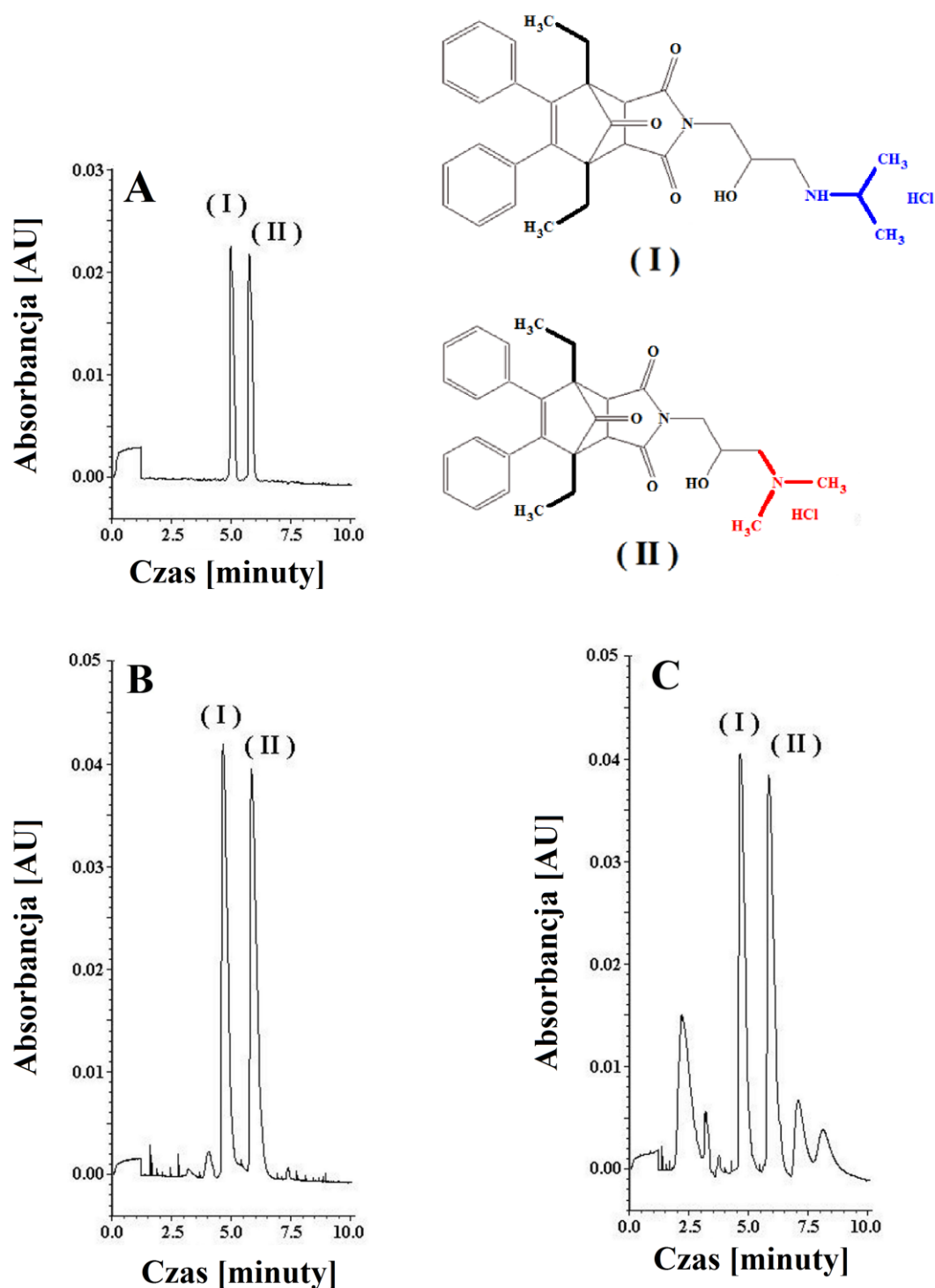
W niniejszej pracy dokonałem także pełnej walidacji metody wykazując przydatność aplikacyjną do badań kinetyki enzymatycznej z udziałem fosfatazy alkalicznej. Biorąc pod uwagę powszechność występowania fosfatazy alkalicznej w różnych narządach organizmu badanie wpływu pochodnych aminoalkanoli i określenie typu inhibicji tego enzymu w przeprowadzonych przeze mnie badaniach wydają się bardzo istotne z klinicznego punktu widzenia.

H4. Capillary electrophoresis for the investigation of two novel aminoalkanol derivatives of 1,7-diethyl-8,9-diphenyl-4-azatricyclo[5.2.1.0^{2,6}] dec-8-ene-3,5,10-trione as potential anticancer drugs in water solution and serum, Błażej Grodner*, Mariola Napiórkowska
Journal of Separation Science, 43 (3), 648 - 656, 2020.

Celem pracy było opracowanie metody rozdzielania i oznaczania nowych pochodnych aminoalkanoli o podstawnikach dietylowych w roztworach wodnych i surowicy z zastosowaniem techniki elektroforezy kapilarnej.

W niniejszej pracy wykazałem możliwość zastosowania opracowanej przeze mnie metody elektroforezy kapilarnej do rozdzielania oraz jakościowego i ilościowego oznaczania dietylowych pochodnych aminoalkanoli o potencjalnych właściwościach przeciwnowotworowych. Przeprowadziłem optymalizację metody badając wpływ wszystkich, możliwych parametrów na wzrost zdolności separacyjnych i oznaczalności wspomnianych pochodnych. W tym celu przebywałem kilka skonstruowanych przez siebie układów buforowych o różnym składzie, stężeniu i pH oraz przeprowadziłem analizę wpływu zmian temperatury, długości fali, napięcia oraz rodzaju i czasu nastrzyku próbki na jakość i poziom

oznaczalności. W niniejszej pracy do rozdziału pochodnych aminoalkanoli zastosowałem po raz pierwszy bufor boranowy, co znacznie poprawiło rozdzielczość i zdecydowanie skróciło czas rozdziału w porównaniu z przeprowadzonym w poprzedniej pracy rozdziałem pochodnych z podstawnikami dimetylowymi. Na podstawie uzyskanych w ten sposób wyników wybrałem, opisałem i zastosowałem w niniejszej pracy układ separacyjny umożliwiający uzyskanie jakościowo najlepszych wyników oznaczanych pochodnych (rysunek 1).



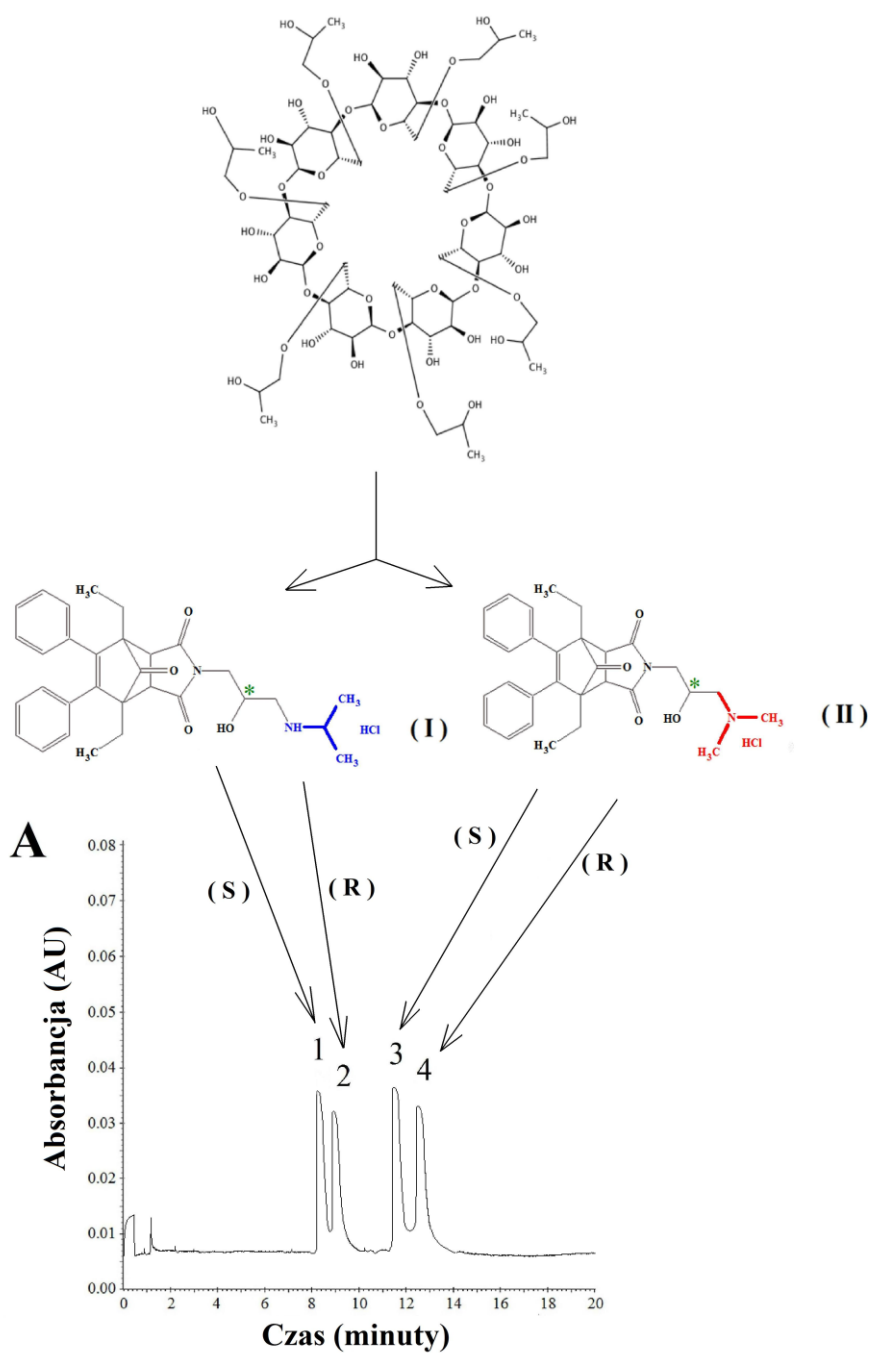
Rysunek 1. Rozdział pochodnych aminoalkanoli (I) i (II) w roztworze wodnym (A), surowicy standaryzowanej (B), w surowicy pacjenta (C). 50 mM bufor boranowy o pH =2.5, $\lambda = 200$ nm, napięcie separacyjne 15 kV, temperatura 20 °C.

Przeprowadziłem także badania oznaczalności pochodnych aminoalkanoli w roztworach wodnych wykazując możliwość wykorzystania opracowanej metody do przyszłej ich analizy w możliwych postaciach leków (rysunek 1A). W niniejszej pracy dokonałem również zastosowania opracowanej metody do jakościowego i ilościowego oznaczania dietylowych pochodnych aminoalkanoli w surowicy wykazując w ten sposób możliwość prowadzenia badań monitorowania poziomu pochodnych aminoalkanoli w materiale biologicznym (rysunek 1B i 1C). W przedstawionej przeze mnie pracy dokonałem pełnej walidacji metody rozdziału oraz jakościowego i ilościowego oznaczania pochodnych dietylowych aminoalkanoli wykazując przydatność aplikacyjną metody do badań wspomnianych pochodnych w możliwych preparatach farmaceutycznych oraz w materiale biologicznym pochodzenia klinicznego.

H5. Dual 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin and 5,10,15,20-Tetrakis (4-Hydroxyphenyl) Porphyrin System as a Novel Chiral-Achiral Selector Complex for Enantioseparation of Aminoalkanol Derivatives with Anticancer Activity in Capillary Electrophoresis, Błażej Grodner*, Mariola Napiórkowska, *Molecules*, 26 (993), 1 - 16, 2021.

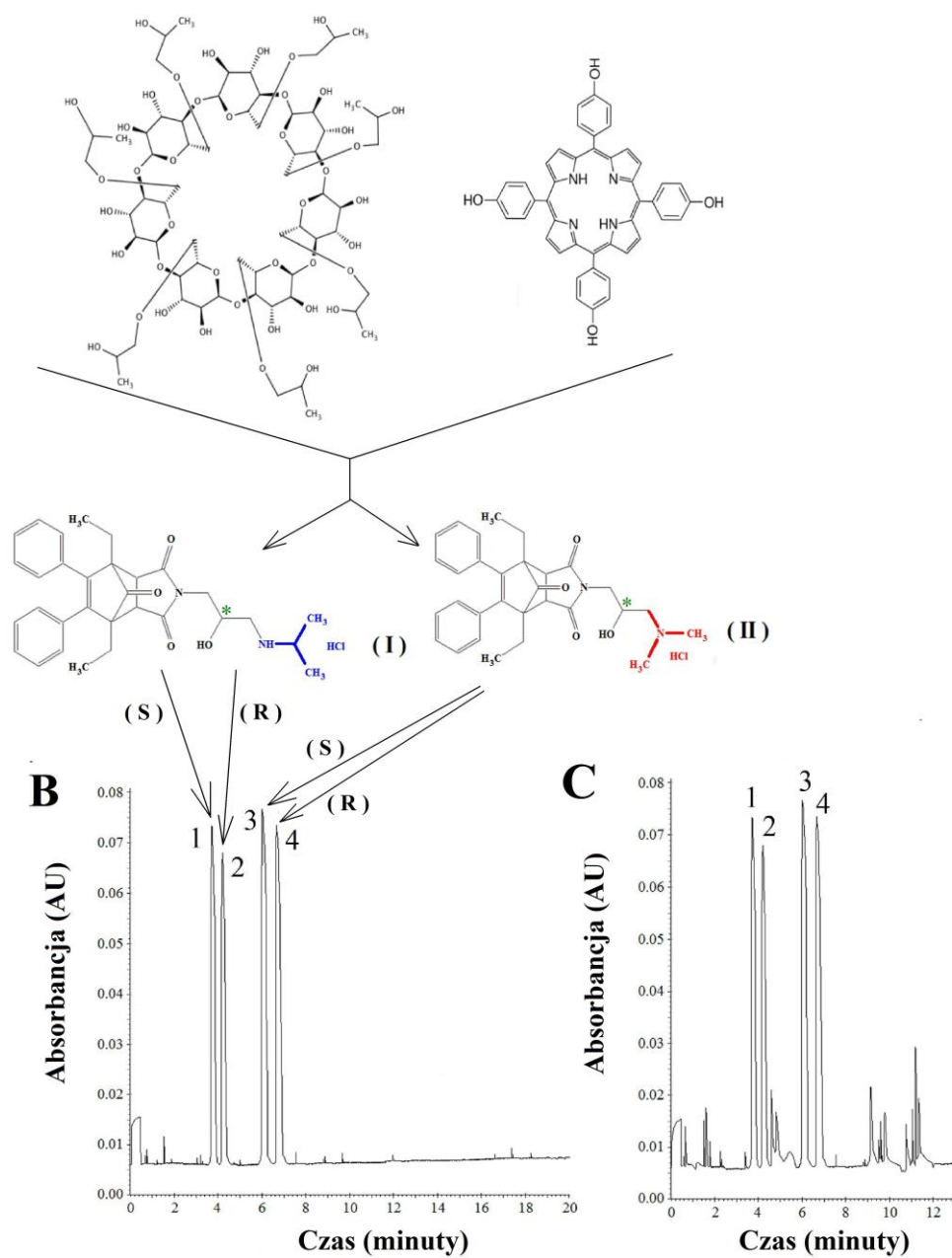
Celem pracy było opracowanie nowatorskiej metody elektroforezy kapilarnej do oznaczania optycznie czynnych form dietylowych pochodnych aminoalkanoli o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym.

W niniejszej pracy do wstępnej separacji enancjomerów pochodnych dietylowych aminoalkanoli zastosowałem jako selektor chiralny 2-hydroksypropylo-beta-cyklodekstrynę (2-HP- β -CD) oraz opracowałem odpowiedni układ separacyjny (bufor) umożliwiający uzyskanie podstawowego rozdziału oznaczanych enancjomerów (rysunek 1)



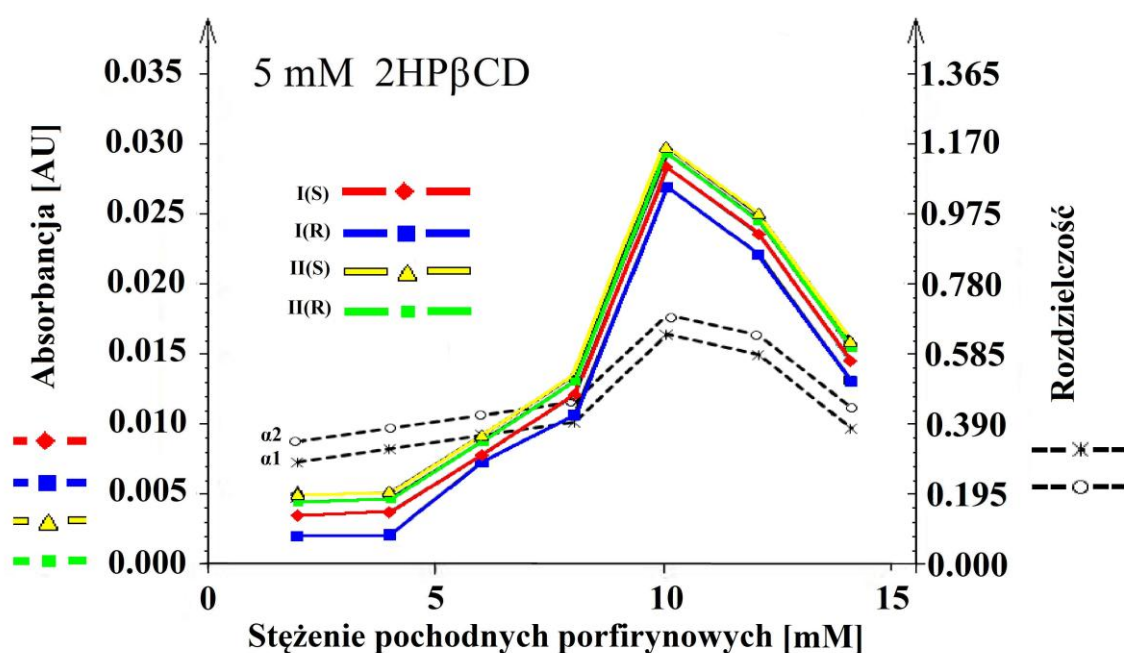
Rysunek 1. Rozdział elektroforetyczny enancjomerów I(S), II(S) i I(R), II(R) pochodnych aminoalkanoli z użyciem 5 mM/L 2-hydroksypropylo-β-cyklodekstryny jako selektora chiralnego. 25 mM bufor fosforanowy o pH = 2.5, $\lambda = 200$ nm, napięcie separacyjne 10 kV, temperatura 25 °C.

Czasami do rozdziału związków optycznie czynnych stosowane są podwójne układy selektorów chiralnych [23] typu chiral-chiral selector. Układy takie stosowane są w przypadkach gdy niemożliwe jest uzyskanie jakiegokolwiek rozdziału enancjomerów przy pomocy jednego selektora chiralnego. W tego typu układach trudno jest jednoznacznie stwierdzić, który z zastosowanych selektorów chiralnych ma wyraźny wpływ na zdolności separacyjne. W niniejszej pracy opracowałem odmienny układ separacji związków optycznie czynnych złożony z chiralnego (2-HP- β -CD) i achiralnego (porfiryna) typu selektorów (układ typu chiral-achiral selector). W przeprowadzonych badaniach wykazałem, że w opracowanym przeze mnie układzie typu chiral-achiral selector wyraźny wpływ na enancjomeryczną zdolność rozdzielczą ma 2-HP- β -CD, podczas gdy pochodna porfirynewa okazała się być w tym układzie silnym akceleratorem rozdziału enancjomerów pochodnych dietylowych aminoalkanoli. (rysunek 2).



Rysunek 2. Rozdział elektroforetyczny enancjomerów I(S), II(S) i I(R), II(R) pochodnych aminoalkanoli z użyciem 2-hydroksypropylo-β-cyclodekstryny i 5,10,15,20-tetrakis (4-hydroksyfenylo) porfiryny w stężeniach 5 i 10 mM, w 25 mM buforze fosforanowym o pH = 2.5, $\lambda = 200\text{nm}$, napięciu separacyjnym 10 kV, i temperaturze 25 °C.

Wykazałem w ten sposób, że wprowadzenie do chiralnego układu separacyjnego (2-HP- β -CD) związku achiralnego o budowie cyklicznej (w tym przypadku porfiryny) ma ogromny i zdecydowany wpływ na wyraźną poprawę parametrów rozdzielczości, limitów detekcji i oznaczalności oraz bardzo duże skrócenie czasu analizy. Jednocześnie wykazałem, że do poprawy parametrów rozdzielczych związków optycznie czynnych nie jest konieczne stosowanie dodatkowego selektora chiralnego. Przeprowadziłem także całkowitą analizę wszystkich parametrów wpływających na zdolność detekcji i rozdzielczości a zwłaszcza wpływu zmieniającego się stężenia pochodnych porfiryńowych w obecności ustalonego stężenia selektora chiralnego na wzrost wspomnianych parametrów rozdzielczości i detekcji badanych pochodnych aminoalkanoli (rysunek 3)



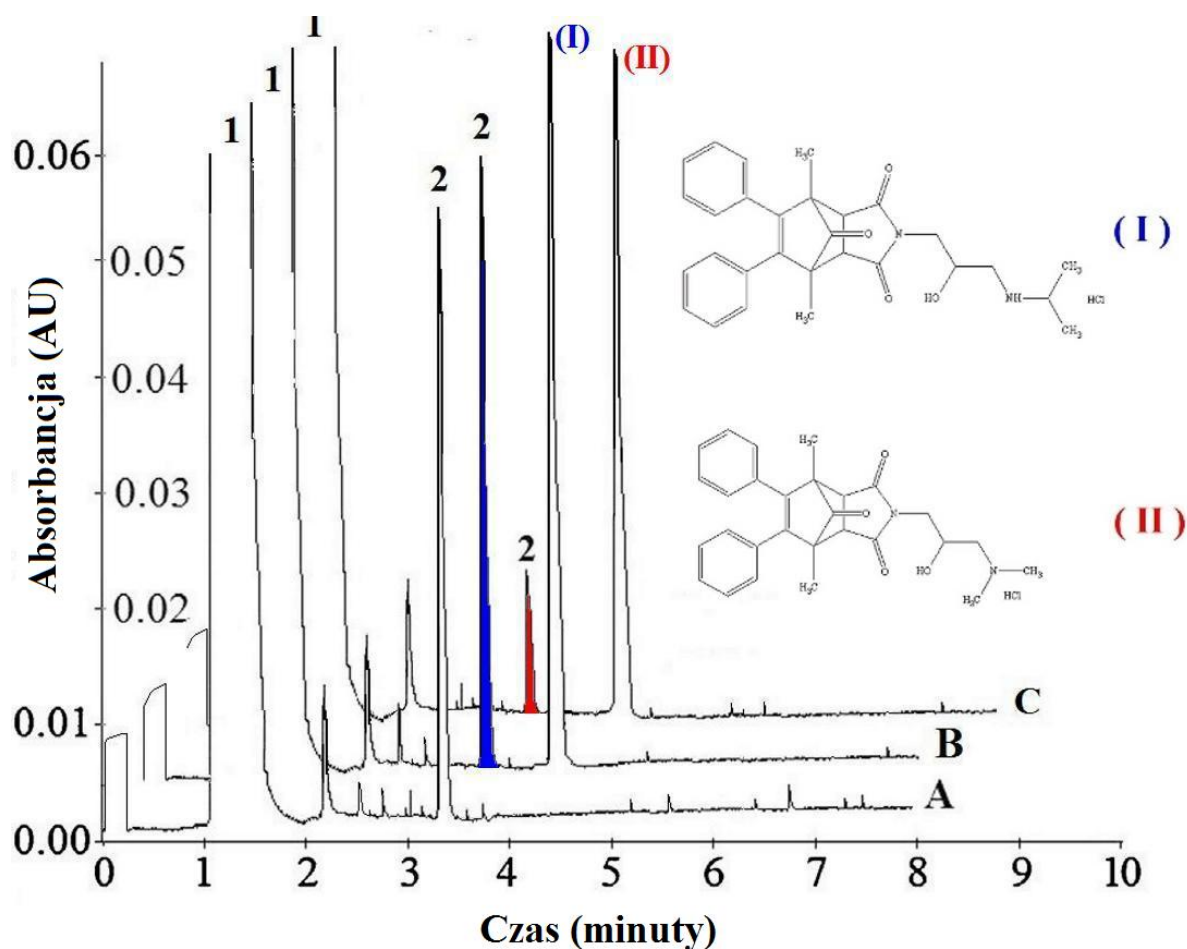
Rysunek 3. Wpływ stężenia 5,10,15,20-tetrakis (4-hydroksyfenylo) porfiryny przy stałym stężeniu 2-hydroksypropylo- β -cyclodekstryny (2HP β CD) (5 mM) na rozdzielczość ($\alpha 1$ i $\alpha 2$) i absorbancję (AU) enancjomerów I (S), I (R) and II (S), II (R) pochodnych aminoalkanoli.

W niniejszej pracy dokonałem pełnej optymalizacji i walidacji opracowanej przeze mnie metody wykazując możliwość jej aplikacyjnego zastosowania do badań optycznie czynnych form pochodnych dietylowych aminoalkanoli w roztworach wodnych i materiale biologicznym pochodzenia klinicznego (surowicy).

H6. Kinetic Studies of Newly Patented Aminoalkanol Derivatives with Potential Anticancer Activity as Competitive Inhibitors of Prostate Acid Phosphatase, Błażej Grodner*, Mariola Napiórkowska, Dariusz Maciej Pisklak International Journal of Molecular Sciences, 22 (21), 11761-11777, 2021.

Fosfataza kwaśna jest enzymem występującym dość powszechnie w wielu tkankach organizmu ludzkiego. Enzym ten występuje w kościach, wątrobie, śledzionie, nerkach, erytrocytach i płytkach krwi. Jednak w największych stężeniach fosfataza kwaśna występuje w komórkach nabłonkowych gruczołu krokowego (prostaty). Ponieważ enzym ten najczęściej związany jest z chorobami nowotworowymi gruczołu krokowego postanowiłem przeprowadzić badania wpływu pochodnych aminoalkanoli o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym na aktywność fosfatazy kwaśnej.

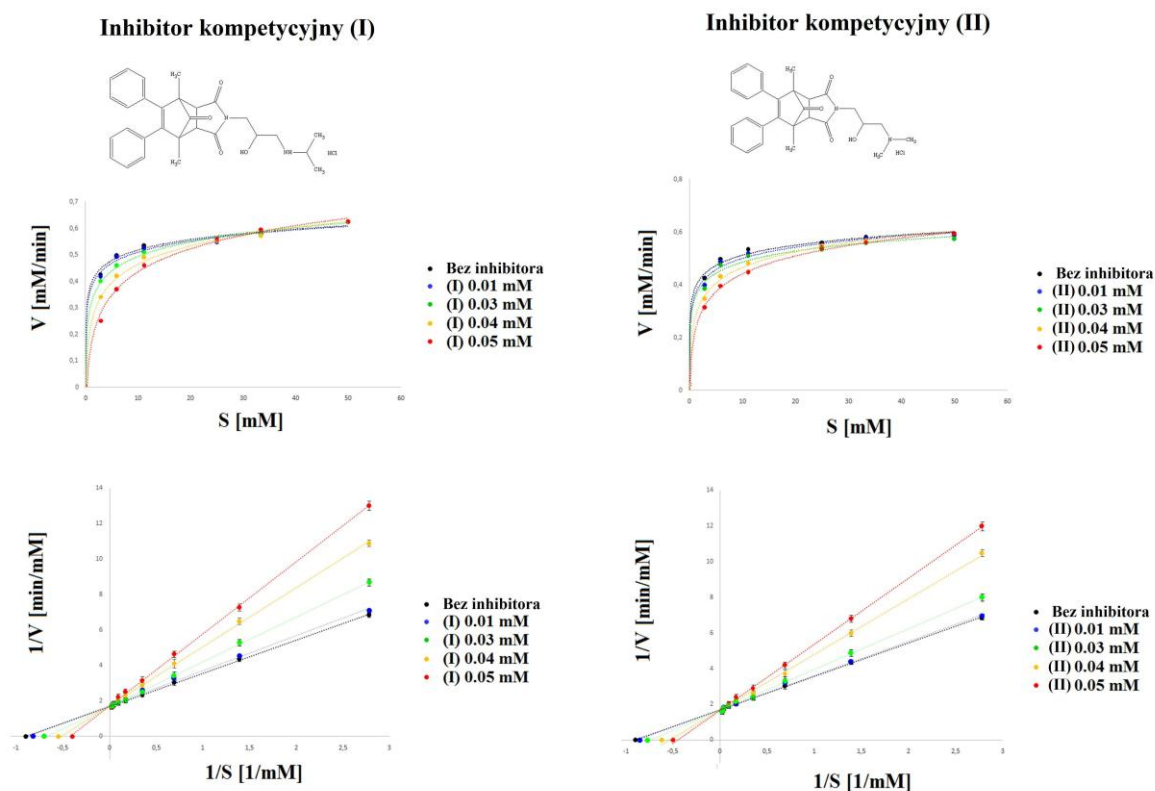
Dlatego celem mojej pracy było opracowanie metody elektroforezy kapilarnej do badań kinetyki enzymatycznej fosfatazy kwaśnej pod wpływem działania wspomnianych pochodnych aminoalkanoli. W niniejszej pracy przeprowadziłem szereg badań w celu opracowania najlepszego układu separacyjnego służącego do rozdzielania i pomiaru poszczególnych składników analizy uczestniczących w przebiegu kinetycznej reakcji enzymatycznej. Opracowany przeze mnie układ separacyjny (odpowiedni rodzaj buforu o określonym stężeniu i pH) zastosowałem do badań zmniejszającego się poziomu substratów (p-nitrofenylofosforanu) i jednoczesnego przyrostu stężenia produktów (p-nitrofenolu) w trakcie katalizowanej przez fosfatazę kwaśną reakcji enzymatycznej w obecności poszczególnych (I i II) pochodnych aminoalkanoli. Spośród przebadanych przeze mnie wielu parametrów fizykochemicznych metody (temperatura, długość fali, napięcie separacyjne, czas i rodzaj nastrzyku próbki) do opracowanej i opisananej przeze mnie metody wybrałem i zastosowałem te, które pozwoliły na uzyskanie najlepszych wyników rozdzielania i ilościowego oznaczania wszystkich składników mieszaniny reakcyjnej (rysunek 1).



Rysunek 1. Elektroforegramy przedstawiające rozdział: (A) 1.44 mM of p-nitrofenylofosforanu (PN-TE) (1) i 0.018 mM produktu reakcji - p-nitrofenolu (PN-OL) (2) w 2 mL próbki inkubacyjnej; (B) 1.44 mM PN-TE (1) i 0.018 mM produktu reakcji PN-OL (2) w obecności 0.05 mM pochodnej (I) w 2 mL próbki inkubacyjnej; (C) 1.44 mM PN-TE (1) i 0.009 mM produktu reakcji PN-OL (2) w obecności 0.05 mM pochodnej (II) w 2 mL próbki inkubacyjnej.

Dzięki opracowanej przeze mnie metodzie dla każdej z pochodnych wyznaczyłem szybkość maksymalną reakcji (V_{max}), stałą Michaelis'a-Menten (K_m), połowę maksymalnego stężenia hamującego (IC_{50}), stałą inhibicji (K_i), stałą katalityczną (k_{cat}) oraz wydajność katalityczną (k_{cat}/K_m) (rysunek 2, tabela 1), jednym słowem wszystkie parametry, które posłużyły do określenia charakterystyki i typu inhibicji wywołanej przez poszczególne (I i II) pochodne aminoalkanoli. Dodatkowo, w celu oszacowania konformacji bioaktywnej oraz

energii stabilizacji kompleksu białko ligand wykorzystano metodę dokowania molekularnego zaimplementowaną w programie AutoDock. Zestawienie wyników przedstawiłem w tabeli nr 1.



Rysunek 2. Wykresy Michaelis’a-Menten i Lineweaver’a-Burk’a przebiegów kinetycznych dla reakcji fosfatazy kwaśnej z p-nitrofenylo fosforanem hamowanej przez pochodne (I) i (II) aminoalkanoli w stężeniach: (•) 0.00 mM, (•) 0.01 mM, (•) 0.03 mM, (•) 0.04 mM and (•) 0.05 mM. Punkty przecięć z osiami $1/S$ i $1/Y$ wskazują na kompetycyjne typy inhibicji. Wartości kątów nachylen prostych świadczą o sile inhibicji poszczególnych pochodnych.

Tabela 1. Parametry kinetyczne charakteryzujące inhibicję fosfatazy kwaśnej przez pochodne (I) i (II).

	Układ bez inhibitora	Układ z inhibitorem kompetycyjnym (I)	Układ z inhibitorem kompetycyjnym (II)
Wartość kąta nachylenia	61.860	76.191	74.879
K_m [mM]	1.124	2.429	2.216
V_{max} [Mm/min]	0.600	0.597	0.598
K_i [mM]		0.786	0.924
k_{cat} [s⁻¹]	1.304*10 ⁻²	1.299*10 ⁻²	1.300*10 ⁻²
k_{cat}/K_m [M⁻¹s⁻¹]	1.160*10 ⁻²	0.549*10 ⁻²	0.595*10 ⁻²
IC₅₀ [mM]		0,037	0,039
Energia stabilizacji [kcal/M]		8.0	7.8

Na podstawie uzyskanych wyników pomiarów wykazałem, że mimo bardzo niewielkich różnic w budowie cząsteczek wszystkich pochodnych aminoalkanoli opracowana przeze mnie metoda pozwoliła bardzo dokładnie określić różnice w sile inhibicji, typ inhibicji, połowę maksymalnego stężenia hamującego IC₅₀ oraz siłę powinowactwa każdego z inhibitorów (pochodnych aminoalkanoli) do badanej fosfatazy kwaśnej. Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały wyraźnie, że pochodna izopropyloaminowa z dwoma podstawnikami metylowymi (I) jest silniejszym inhibitorem kompetycyjnym fosfatazy kwaśnej w stosunku do pochodnej dimetyloaminowej z dwoma podstawnikami metylowymi (II) oraz wykazuje silniejsze powinowactwo do centrum katalitycznego enzymu. Uzyskane wyniki są bardzo cenną wskazówką dotyczącą możliwości zastosowania wspomnianych pochodnych do odpowiedniej regulacji aktywności fosfatazy kwaśnej uczestniczącej w przebiegu niektórych

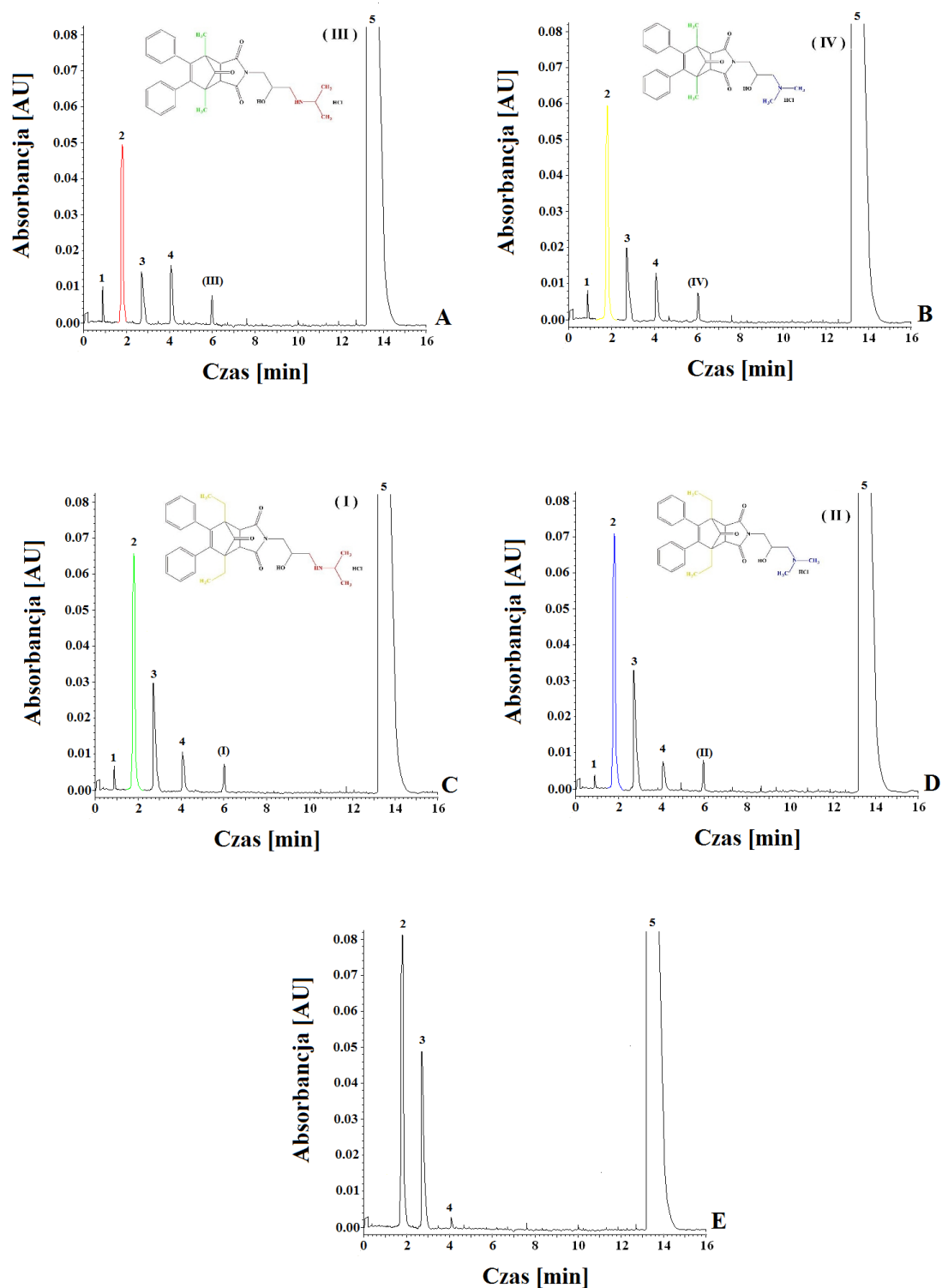
procesów chorobowych. W niniejszej pracy dokonałem także pełnej optymalizacji i walidacji metody wykazując jej dużą wartość aplikacyjną do badań kinetycznych fosfatazy kwaśnej.

H7. In Vitro and In Silico Kinetic Studies of Patented 1,7-diEthyl and 1,7-diMethyl Aminoalkanol Derivatives as New Inhibitors of Acetylcholinesterase, Błażej Grodner*, Mariola Napiórkowska, Dariusz Maciej Pisklak International Journal of Molecular Sciences, 23(1), 270-289, 2022.

Acetylocholina (ACh) jest związkiem działającym zarówno w ośrodkowym jak i w obwodowym układzie nerwowym, a jej funkcje uzależnione są od miejsca działania oraz od rodzaju receptora, z którym się łączy. Jej aktywność w autonomicznym układzie nerwowym moduluje działanie układu sercowo-naczyniowego co skutkuje rozszerzeniem naczyń krwionośnych, obniżeniem tętna oraz zmniejszeniem siły skurczu mięśnia sercowego. W układzie żołądkowo-jelitowym zwiększa perystaltykę żołądka i amplitudę skurczów przewodu pokarmowego. Natomiast w układzie moczowym zmniejsza pojemność pęcherza moczowego i zwiększa ciśnienie mikcji. Bardzo ważną funkcją acetylocholiny jest stymulacja wydzielnicza gruczołów w układzie oddechowym, które otrzymując impulsy przywspółczulne stymulują wydzielanie śluzu w oskrzelach. W ośrodkowym układzie nerwowym ACh odpowiada za procesy koncentracji, zapamiętywania i uczenia się a jej stężenie jest wyjątkowo niskie w mózgach osób z chorobą Alzheimera.

Acetylocholina jest szybko hydrolizowana i w ten sposób unieczynniana przez enzym zwany acetylocholinoesterazą (esterazą acetylocholinową – AChE). Podstawową funkcją acetylocholinoesterazy w synapsach cholinergicznym jest przerwanie neurotransmisji przez szybką hydrolizę acetylocholiny. Drastyczny spadek ilości acetylocholiny może stać się przyczyną chorób neurodegeneracyjnych, w których dochodzi do obumierania neuronów. W chorobie Alzheimera, z powodu niewystarczającej ilości acetylocholiny upośledzone jest przewodnictwo cholinergiczne. Pewną poprawę przynosi stosowanie inhibitorów AChE, które są selektywnymi inhibitorami miejsca anionowego w centrum aktywnym tego enzymu. Ponieważ istnieje ogromne zainteresowanie nowo powstającymi związkami mogącymi pełnić funkcje inhibitorów AChE celem niniejszej pracy było opracowanie i zastosowanie nowatorskiej metody elektroforezy kapilarnej do badań kinetyki enzymatycznej acetylocholinoesterazy z zastosowaniem dietylo i dimetylo pochodnych aminoalkanoli. W

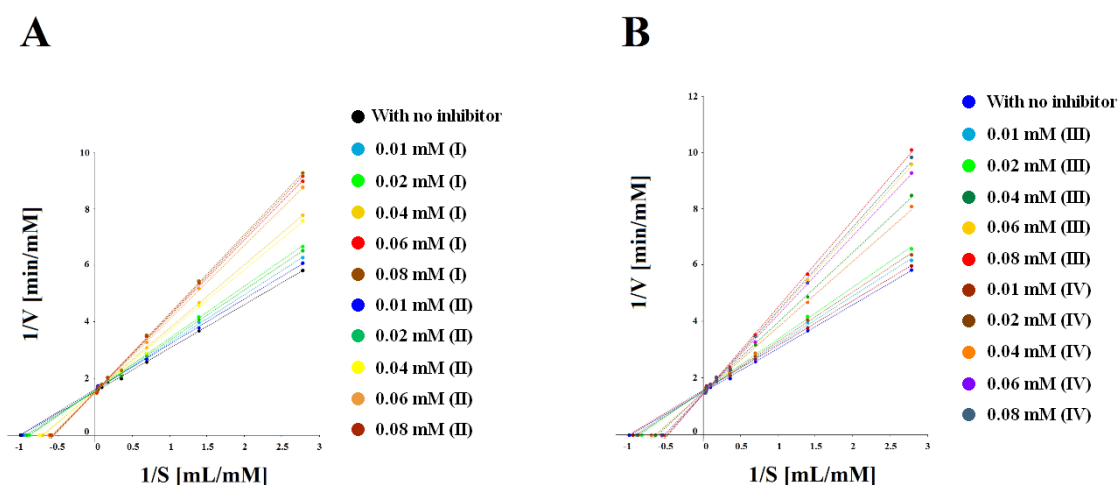
niniejszej pracy wykazałem, że opracowana przeze mnie metoda CE umożliwia wykonywanie pomiarów zmian stężeń substratów i produktów reakcji katalizowanej przez acetylocholinoesterazę w obecności wspomnianych dietylo i dimetylo pochodnych aminoalkanoli. Śledzenie ubytku substratów (acetylotiocholina i kwas 4,4 ditio-bis-nitrobenzoesowy) wykorzystywanych w przebiegu katalizowanej reakcji z jednoczesną analizą przyrostu stężeń powstających produktów (kwas 5-tio-2-nitrobenzoesowy i kwas 5-ditio-etylo-trimetyloamino-2-nitrobenzoesowy) w określonych odcinkach czasowych i w obecności zmiennych stężeń pochodnych (I, II, III i IV) aminoalkanoli, umożliwia w sposób precyzyjny określenie wszystkich, możliwych parametrów kinetycznych AChE. Wykazałem, że opracowana przeze mnie metoda CE umożliwia jakościowy i ilościowy jednoczesny pomiar wszystkich składników w danej próbce analitycznej biorących udział w katalizowanej przez enzym reakcji (rysunek 1)



Rysunek 1. Rozdziły elektroforetyczne składników mieszaniny reakcyjnej [(1) acetylotiocholina, (2) kwas 4,4 ditio-bis-nitrobenzoesowy, (3) kwas 5-tio-2-nitrobenzoesowy, (4) kwas 5-ditio-etylo-trimetyloamino-2-nitrobenzoesowy, (5) acetylocholinoesteraza]

biorących udział w badaniach przebiegu reakcji enzymatycznej katalizowanej przez acetylocholinoesterazę w obecności pochodnych (I) (rysunek C), (II) (rysunek D), (III) (rysunek A) i (IV) (rysunek B) oraz bez udziału pochodnych (rysunek E).

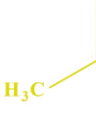
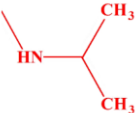
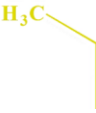
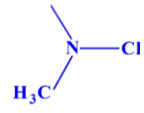
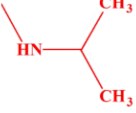
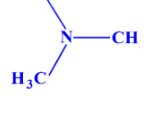
Co więcej, wykazałem też, że opracowana przeze mnie metoda odznacza się na tyle dużą czułością, że pozwala precyzyjnie określić różnice w sile inhibicji wszystkich czterech pochodnych aminoalkanoli oraz różnice w powinowactwie substratu i inhibitora do enzymu mimo bardzo niewielkich różnic w budowie ich cząsteczek (rysunek 2).



Rysunek 2. Wykresy Lineweaver’a–Burk’a przebiegów kinetycznych reakcji katalizowanych przez acetylocholinoesterazę w obecności zmiennych stężeń pochodnych (I),(II),(III) i (IV) aminoalkanoli.

Dzięki opracowanej przeze mnie metodzie wyznaczyłem wszystkie parametry kinetyczne (kąt nachylenia, V_{max} , K_m , K_i i IC_{50}) precyzyjnie określające rodzaj inhibicji a także różnice w sile inhibicji i powinowactwie substratu i inhibitora do badanego enzymu (tabela 1). Dodatkowo obliczono energie dokowania (kcal/mol) dla wszystkich pochodnych.

Tabela 1. Wpływ rodzaju podstawnika występującego w głównej strukturze pochodnych (I), (II), (III) i (IV) aminoalkanoli na siłę i rodzaj inhibicji (kąt nachylenia, Km, Vmax, IC₅₀, energię stabilizacji) oraz siłę powinowactwa (Ki) poszczególnych pochodnych do centrum aktywnego acetylocholinoesterazy.

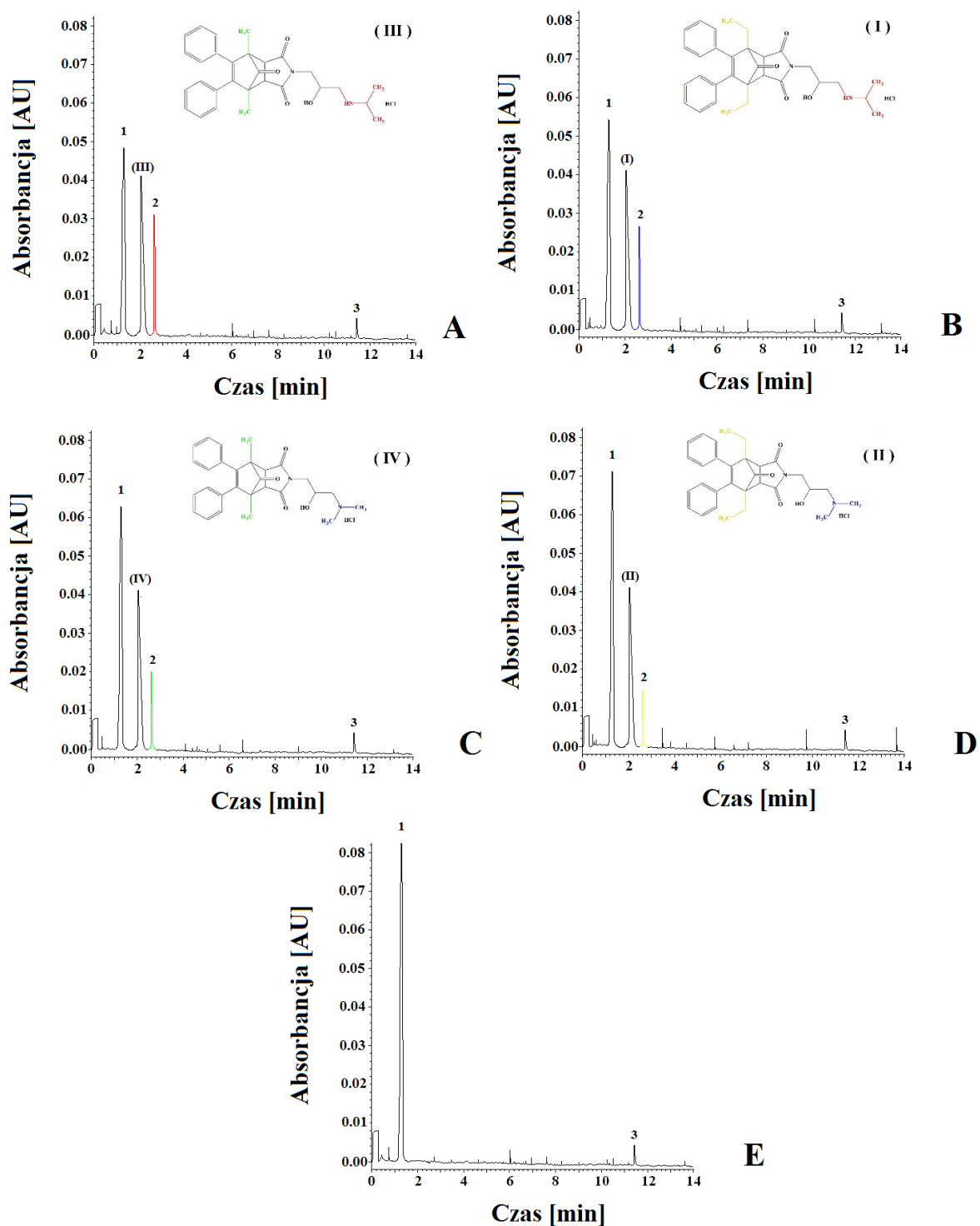
Składnik	R ₁	R ₂	R ₃	Kąt nachylenia [°]	Km [mM/mL]	Vmax [mM/min]	Ki [mM]	IC ₅₀ [mM]	Energia stabilizacji [kcal/mol]
Pochodna (I)				70.32	1.80	0.65	1.35	0.037	-8.1
Pochodna (II)				70.02	1.79	0.65	1.42	0.039	-8.5
Pochodna (III)				71.50	1.90	0.63	1.11	0.033	-8.9
Pochodna (IV)				70.40	1.83	0.64	1.22	0.035	-9.2

W przeprowadzonych przeze mnie badaniach wykazałem, że wszystkie pochodne dietylo i dimetylo aminoalkanoli są inhibitorami kompetycyjnymi AChE o różnej sile inhibicji i powinowactwie do centrum aktywnego enzymu wynikającego z różnic w budowie łańcuchów bocznych (metylowych i etylowych) oraz podstawników izopropylowych i dimetyloaminowych występujących w głównej strukturze wszystkich pochodnych. Z powyższych badań wynika iż najsilniejszym inhibitorem AChE jest pochodna (III) posiadająca w swojej strukturze dwa podstawniki metylowe oraz podstawnik izopropylaaminowy. Najslabszym zaś inhibitorem AChE jest pochodna (II) z dwoma podstawnikami etylowymi i podstawnikiem dimetyloaminowym. W niniejszej pracy przeprowadzone zostały także badania symulacji dynamiki molekularnej, które z dużym przybliżeniem dodatkowo potwierdzają uzyskane wyniki badań dotyczące wpływu pochodnych dietylowych i dimetylowych aminoalkanoli na aktywność enzymatyczną acetylocholinoesterazy. Dlatego opracowana przeze mnie metoda wydaje się być cennym

narzędziem w badaniach kinetycznych zmian aktywności AChE – enzymu szczególnie ważnego i odpowiedzialnego za szereg procesów biochemicznych i fizjologicznych w naszym organizmie. W niniejszej pracy dokonałem także pełnej optymalizacji wszystkich parametrów oraz pełnej walidacji metody wykazując w ten sposób jej dużą przydatność aplikacyjną.

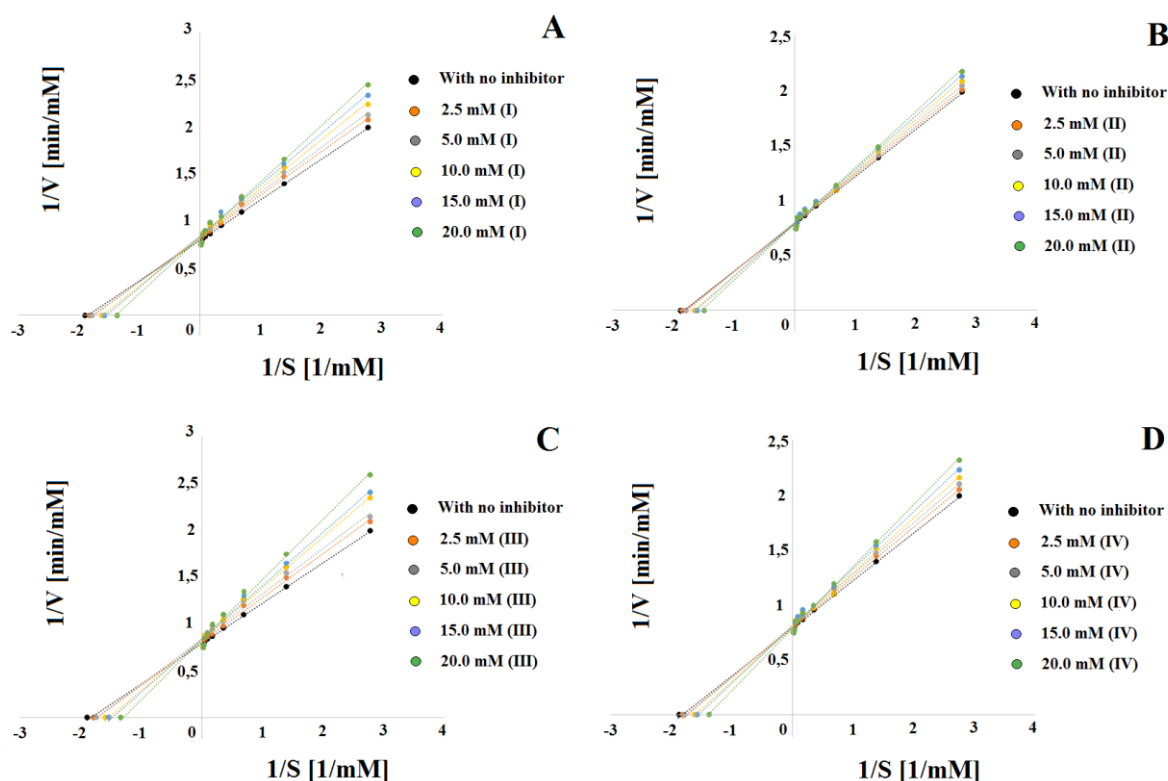
H8. Catalase inhibition by aminoalkanol derivatives with potential anti-cancer activity. In vitro and in silico studies using capillary electrophoresis method., Błażej Grodner*, Mariola Napiórkowska, Dariusz Maciej Pisklak International Journal of Molecular Sciences, 23(13), 7123-7140, 2022.

Katalaza jest enzymem katalizującym proces rozkładu nadtlenu wodoru do wody i tlenu. Podstawową jej funkcją jest ochrona komórek i jej struktur przed powstającymi w naszym organizmie reaktywnymi formami tlenu powstającymi w procesach metabolicznych. Dlatego też katalaza jest bardzo rozpowszechniona w wielu organach i strukturach ludzkiego organizmu jak na przykład w wątrobie, nerce, leukocytach i erytrocytach, Katalaza występuje także u bakterii tlenowych gdzie spełnia u nich również funkcje ochronne. Ponieważ spora ilość substancji, związków leczniczych wprowadzanych do organizmu człowieka może w różny sposób oddziaływać na aktywność wielu enzymów dlatego celem niniejszej pracy było opracowanie i zastosowanie metody elektroforezy kapilarnej do pomiarów kinetycznych katalazy oraz badanie wpływu pochodnych aminoalkanoli na aktywność tego enzymu. W niniejszej pracy wykazałem, że dzięki opracowanej przeze mnie metodzie CE możliwe jest jednoczesne jakościowe i ilościowe oznaczanie wszystkich reagentów (składników) mieszaniny reakcyjnej w przebiegu reakcji katalizowanej przez katalazę. Dzięki opracowanej metodzie przeprowadziłem pomiary wzajemnych zmian stężeń substratów (gwajakol) i produktów reakcji (tertagwajakol) podczas trwania procesu w obecności enzymu i czterech (I, II, III, IV) pochodnych aminoalkanoli (rysynek 1) oraz wyznaczyłem wszystkie parametry kinetyczne (V_{max} , K_m , K_i i IC_{50} , stałą inhibicji (K_i)) (rysunek 2, tabela 1) umożliwiające precyzyjne określenie siły i typu inhibicji oraz stopnia powinowactwa inhibitora do centrum aktywnego enzymu. Dodatkowo dla każdej z pochodnych wyznaczono energie dokowania (tabela 1).



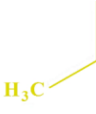
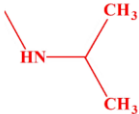
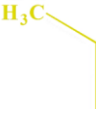
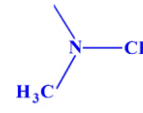
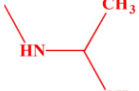
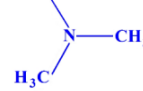
Rysunek 1. Rozdziály elektroforetyczne składników mieszaniny reakcyjnej [(1) gwajakol, (2) tetragwajakol, (3) katalaza] biorących udział w badaniach przebiegu reakcji

enzymatycznej katalizowanej przez katalazę w obecności pochodnych (I) (rysunek B), (II) (rysunek D), (III) (rysunek A) i (IV) (rysunek C) oraz bez udziału pochodnych (rysunek E).



Rysunek 2. Wykresy Lineweaver'a–Burk'a przebiegów kinetycznych reakcji katalizowanych przez katalazę w obecności zmiennych stężeń pochodnych (I) (rysunek A), (II) (rysunek B), (III) (rysunek C) i (IV) (rysunek D) aminoalkanoli.

Tabela 1. Wpływ rodzaju podstawnika występującego w głównej strukturze pochodnych (I), (II), (III) i (IV) aminoalkanoli na siłę i rodzaj inhibicji (kąt nachlenia, K_m , V_{max} , IC_{50} , energię stabilizacji) oraz siłę powinowactwa (K_i) poszczególnych pochodnych do centrum aktywnego katalazy.

Składnik	R ₁	R ₂	R ₃	Kąt nachyleńa [°]	K_m [mM/mL]	V_{max} [mM/min]	K_i [mM]	IC_{50} [mM]	Energia stabilizacji [kcal/mol]
Pochodna (I)				30.75	0.73	1.25	1.61	11.40	-8.6
Pochodna (II)				27.06	0.64	1.24	3.04	12.80	-8.4
Pochodna (III)				32.68	0.77	1.25	1.32	10.30	-8.9
Pochodna (IV)				29.27	0.71	1.26	1.79	12.20	-8.2

W niniejszej pracy wykazałem, że wysoka czułość opracowanej przeze mnie metody pozwala na precyzyjne określenie siły każdego z czterech inhibitorów (pochodnych aminoalkanoli) mimo bardzo małych różnic w budowie chemicznej ich cząsteczek. Wykazałem, że wszystkie pochodne aminoalkanoli są inhibitorami kompetycyjnymi katalazy o różnej sile działania wynikającej z różnego stopnia powinowactwa wspomnianych inhibitorów do centrum aktywnego enzymu uzależnionego od wzajemnej obecności podstawników metylowych i etylowych oraz izopropylaminowych i dimetyloaminowych w głównej strukturze cząsteczki wszystkich czterech pochodnych aminoalkanoli. W przeprowadzonych przeze mnie badaniach wykazałem również, że wszystkie, wspomniane pochodne aminoalkanoli są słabymi inhibitorami katalazy, co przypadku możliwego ich zastosowania w leczeniu jest ich zaletą w odniesieniu do pełnionych przez katalazę funkcji. W niniejszej pracy

zastosowano również metody dokowania molekularnego poszczególnych aminoalkanoli do centrum aktywnego enzymu (tabela 1) potwierdzając z dużym przybliżeniem zgodność wyników uzyskanych dzięki metodzie CE. W niniejszej pracy dokonałem także pełnej optymalizacji i walidacji opracowanej przeze mnie metody wykazując w ten sposób jej duży potencjał aplikacyjny.

Podsumowanie

W pracach wchodzących w skład cyklu habilitacyjnego wykazałem, że:

1. Analiza rozdziałów elektroforetycznych pozwala na określenie jakościowe i ilościowe pochodnych aminoalkanoli zarówno w roztworach wodnych jak i w materiale biologicznym.
2. Odpowiedni dobór selektorów chiralnych i parametrów metody CE pozwala na doskonałą separację oraz jakościowe i ilościowe oznaczanie enancjomerycznych form pochodnych aminoalkanoli w roztworach wodnych i surowicy.
3. Zastosowanie zmodyfikowanego układu złożonego z chiralnego i achiralnego rodzaju selektora pozwoliło na znaczne przyspieszenie rozdziału enancjomerów pochodnych aminoalkanoli oraz znaczne obniżenie limitu detekcji i oznaczalności a także istotny wzrost rozdzielczości badanych pochodnych.
4. Opracowane metody CE pozwalają na precyzyjne prowadzenie badań kinetycznych opisanych enzymów dzięki możliwości jednoczesnego pomiaru wszystkich składników analizy oraz wzajemnych zmian stężeń substratów i produktów reakcji biorących udział w badaniach kinetycznych enzymów.
5. Dzięki opracowanym metodom CE możliwe jest wyznaczenie wszystkich parametrów kinetycznych określających typ inhibicji enzymatycznej, siłę inhibicji, siłę powinowactwa inhibitorów do enzymów, szybkość maksymalną reakcji (V_{max}), stałą Michaelis'a-Menten (K_m), połowę maksymalnego stężenia hamującego (IC_{50}), stałą inhibicji (K_i), stałą katalityczną (k_{cat}), oraz wydajność katalityczną (k_{cat}/K_m).

6. Rodzaj i siła inhibicji pochodnych aminoalkanoli zależy od ich budowy i rodzaju enzymów, z którymi oddziałują.
7. Wszystkie badane pochodne aminoalkanoli są inhibitorami fosfatazy zasadowej, fosfatazy kwaśnej, acetylocholinoesterazy i katalazy.
8. W przypadku fosfatazy zasadowej pochodne aminoalkanoli wywierają kompetycyjny i niekompetycyjny typ inhibicji zależny od rodzaju podstawników występujących w głównej strukturze cząsteczek.
9. W przypadku fosfatazy kwaśnej, acetylocholinoesterazy i katalazy wszystkie pochodne aminoalkanoli wykazały kompetycyjny typ inhibicji o różnej sile wynikającej z różnic w budowie podstawników występujących w głównych strukturach cząsteczek pochodnych aminoalkanoli.

Dokonałem także pełnych optymalizacji i walidacji opracowanych metod, co stanowi podstawę do ich zastosowania w badaniach składu jakościowego, ilościowego i enancjomerycznego pochodnych aminoalkanoli w możliwych postaciach preparatów leczniczych oraz w materiale biologicznym – surowicy a także w badaniach szeroko pojętej kinetyki enzymatycznej.

Plan badawczy kontynuacji podjętej tematyki.

Problematyka prac przedstawionych do oceny w rozprawie habilitacyjnej jest podstawą do dalszego rozwijania metodologii związanej z wykorzystaniem elektroforezy kapilarnej (CE). Zdając sobie sprawę z ogromnych możliwości jakie może dawać wspomniana technika planuję intensywnie rozszerzyć możliwości jej zastosowania do badań farmaceutycznych i biochemicznych. Ponieważ ze wspomnianymi pochodnymi wiąże się duże nadzieje planuję w pierwszym rzędzie przeprowadzenie badań ich wpływu na aktywność możliwie największej liczby enzymów odgrywających główne role w regulacji istotnych szlaków metabolicznych. Planuję także zbadać wpływ wspomnianych pochodnych na wybrane grupy izoenzymów, to jest enzymów katalizujących ten sam rodzaj reakcji chemicznej, lecz różniących się budową, właściwościami katalitycznymi, lokalizacją narządową oraz sposobem regulacji ich aktywności. Wykorzystując technikę elektroforezy kapilarnej planuję również

przeprowadzenie badań dotyczących monitorowania procesów uwalniania pochodnych aminoalkanoli i ich form enancjomerycznych z różnych postaci leków. Najważniejszym celem moich przyszłych prac będzie badanie wpływu poszczególnych form enancjomerycznych na aktywności enzymatyczne a także badania kierunku ich metabolizmu i określenia parametrów farmakokinetycznych i farmakodynamicznych z wykorzystaniem techniki CE.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

Po obronie pracy magisterskiej rozpocząłem studia doktoranckie w Katedrze i Zakładzie Biochemii i Chemii Klinicznej na wydziale Farmaceutycznym Akademii Medycznej w Warszawie (obecnie Warszawski Uniwersytet Medyczny) pod kierunkiem Pana Prof. Jana Pachecka. Tematyka mojej pracy dotyczyła opracowania i zastosowania metody CE do badań enancjomerów mianseryny w materiale biologicznym - surowicy. Problematyka zapoczątkowana w pracy doktorskiej zainspirowała mnie do prowadzenia badań w kierunku rozwoju metod związanych technikami elektroforezy kapilarnej oraz praktycznego ich zastosowania. Wyniki badań dotyczących tematu pracy doktorskiej opublikowane zostały w pracy pod tytułem „A simpler and faster capillary electrophoresis method for determination of mianserin enantiomers in human serum” (A1). Po obronie pracy doktorskiej kontynuowałem tematykę badań związanych z elektroforezą kapilarną, ale w kierunku opracowywania nowych jej metod dla całkowicie nowych grup związków oraz opracowywaniem nowatorskich metod elektroforezy kapilarnej do badań kinetyki enzymatycznej; zainteresowany byłem wykorzystaniem elektroforezy kapilarnej do badań wpływu wspomnianych związków na aktywność enzymatyczną oraz możliwością badania tych związków w materiale biologicznym.

6. Publikacje oryginalne niewchodzące w skład cyklu habilitacyjnego

A1: **Grodner Błażej**, Pachecka Jan. "A simpler and faster capillary electrophoresis method for determination of mianserin enantiomers in human serum." *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 2006, 63(1), 9-14.

Wkładem własnym prowadzącym do powstania niniejszej pracy było zaprojektowanie koncepcji badań, szczegółowe opracowanie metody analitycznej, zastosowanie opracowanej metodologii w technice elektroforezy kapilarnej, wykonanie pomiarów, generalna analiza danych zastosowanej metody.

Mój udział oceniam na 85%.

A2: Mianowska Aleksandra, **Grodner Błażej**, Pachecka Jan. „Zastosowanie krioprezerwacji izolowanych wysp trzustkowych w terapii cukrzycy.” *Farmaceutyczny Przegląd Naukowy*, 2010, 7(10), 22-27.

Wkładem własnym w niniejszej pracy była generalna analiza danych oraz udział w redagowaniu tekstu.

Mój Udział oceniam na 25%.

A3: **Grodner Błażej**. „A Non-aqueous Capillary Electrophoresis for Determination of Eugenol in Cloves and Dental Preparations”. *Chromatographia*, 2022, DOI: 10.1007/s10337-022-04195-3.

IF: 2.213

Wkładem własnym prowadzącym do powstania niniejszej pracy było zaprojektowanie koncepcji badań, szczegółowe opracowanie metody analitycznej, zastosowanie opracowanej metodologii w technice elektroforezy kapilarnej, wykonanie pomiarów, generalna analiza danych zastosowanej metody, przeprowadzenie pełnej optymalizacji i walidacji metody, przeprowadzenie i szczegółowa analiza wyników badań kinetyki enzymatycznej, przygotowanie manuskryptu, przeprowadzenie korekty pracy oraz korespondencja z recenzentami i edytorem.

Mój udział to 100%

A4: **Grodner Błażej**, Małgorzata Jelińska. „RAPID DETERMINATION OF MANGANESE IN FRESH PARSLEY LEAVES AND ROOTS USING CAPILLARY ELECTROPHORESIS METHOD”. Prospects in Pharmaceutical Sciences, 2023, 21(1), 5-8.

Wkładem własnym prowadzącym do powstania niniejszej pracy było zaprojektowanie koncepcji badań, szczegółowe opracowanie metody analitycznej, zastosowanie opracowanej metodologii w technice elektroforezy kapilarnej, wykonanie pomiarów, generalna analiza danych zastosowanej metody, przeprowadzenie korekty pracy oraz korespondencja z recenzentami i edytorem.

Mój udział oceniam na 90%

7. Publikacje przeglądowe niewchodzące w skład cyklu habilitacyjnego

B1: Sitkiewicz Dariusz, Sygitowicz Grażyna, Białek Sławomir, **Grodner Błażej**. „Grelina – czyli przez żołądek do serca.”, In Vitro Explorer, 2010. 1(10), 9-14.

Wkładem własnym w niniejszej pracy był udział w analizie literatury i redagowaniu tekstu.

Mój udział oceniam na 10%

B2: **Grodner Błażej**, Sitkiewicz Dariusz. „Enancjomery: nowy problem w farmakoterapii depresji?”, Psychiatria Polska, 2013, 47(3), 511-518.

IF: 0.753

Wkładem własnym prowadzącym do powstania niniejszej pracy było zaprojektowanie i koncepcja pracy, przygotowanie i analiza literatury, redakcja tekstu, przeprowadzenie korekty pracy oraz korespondencja z recenzentami i edytorem.

Mój udział oceniam na 95%

8. Publikacje oryginalne opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora

C1: **Grodner Błażej**, Pachecka Jan. "A simpler and faster capillary electrophoresis method for determination of mianserin enantiomers in human serum." Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research, 2006, 63(1), 9-14.

9. Udział w konferencjach

Konferencje międzynarodowe

D1: 12th International Congress of. *Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology*. October 2 – 6, 2011. *Stuttgart, Germany*. **Błażej Grodner**, Dariusz Sitkiewicz, Determination of mianserin enantiomers in human serum by capillary electrophoresis.

D2: : International Conference on Enzymology & Molecular Biology (ICEMB). December 10, 2022 virtual conference. **Błażej Grodner**, Mariola Napiórkowska, Dariusz Maciej Pisklak. In Vitro and In Silico Kinetic Studies of Patented 1,7-diEthyl and 1,7-diMethyl Aminoalkanol Derivatives as New Inhibitors of Acetylcholinesterase.

D3: 1461st International Conference on Medical, Biological and Pharmaceutical Sciences (ICMBPS). February 02, 2023. **Błażej Grodner**, Mariola Napiórkowska, Dariusz Maciej Pisklak Kinetic studies of aminoalkanol derivatives as new inhibitors of acetylcholinesterase.

D4: ICEDD 2023: 17. International Conference on Enzymes in Drug Discovery February 16-17, 2023 London, United Kingdom. **Błażej Grodner**, Mariola Napiórkowska, Dariusz Maciej Pisklak In Vitro and in silico kinetic studies of 1,7-diEthyl and 1,7-diMethyl aminoalkanol derivatives as new inhibitors of acetylcholinesterase.

D5: 22nd International Conference on Medicinal and Pharmaceutical Chemistry March 15-16 2023 Vancouver, Canada. **Błażej Grodner**, Mariola Napiórkowska, Dariusz Maciej Pisklak Aminoalkanol Derivatives as New Inhibitors of Acetylcholinesterase

Konferencje krajowe

E1: XVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej Warszawa 15-18 września, 2013, **Błażej Grodner**, Dariusz Sitkiewicz, Zastosowanie elektroforezy kapilarnej do terapeutycznego monitorowania stężenia enancjomerów fluoksetyny i norfluoksetyny.

E2: XXXVII Ogólnopolskie seminarium na temat Magnetycznego Rezonansu Jądrowego i jego zastosowań, Kraków, 1-2.12.2004, D.M. Pisklak, **B. Grodner**, J. Pachecka, I. Wawer, Badanie mianseryny leku przeciwdepresyjnego metodą ^{13}C CP MAS NMR

10. Staże naukowe

W lipcu 2022 r. odbyłem miesięczny staż naukowy w Narodowym Instytucie Leków w Warszawie, w Zakładzie Leków Syntetycznych pod kierunkiem Pani Prof. dr hab. Katarzyny Michalskiej.

11. Recenzje prac w wysoko punktowanych czasopismach zagranicznych

Byłem recenzentem 12 prac w następujących, wysoko punktowanych czasopismach anglojęzycznych:

-International Journal of Molecular Science

-Molecules

-Water

- Biomedicines

- Sustainability

12. Szkolenia i sympozja

- Biochemical Society Jan 26 2023. Developments in the Immune System and Immunotherapies.

- Labroots webinar Feb 09, 2023. A Modern Approach to Screening for Monoclonal Gammopathies using Digital Workflows.

- Labroots webinar Mar 08, 2023 Boost microbial detection sensitivity with unbiased human host DNA and RNA depletion.

- Labroots webinar Mar 15, 2023 HbA1c for monitoring glycemic control in 2023 and in the future.

- ACS-webinar March 9, 2023 Nature's Lipid Nanoparticles: Exosomes in Drug Delivery and Therapeutics.

13. Współpraca naukowa

- Katedra Biochemii Wydziału Lekarskiego WUM: dr Mariola Napiórkowska – w zakresie badania związków o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym (8 wspólnych publikacji).
- Zakład Chemii Fizycznej Wydziału Farmaceutycznego WUM: dr hab. Dariusz, Maciej Pisklak – w zakresie badań oddziaływań pochodnych aminoalkanoli na wybrane układy enzymatyczne (3 wspólne publikacje).
- Zakład Bromatologii Wydziału Farmaceutycznego WUM: dr Małgorzata Jelińska – w zakresie badań zawartości jonów manganu w surowcach roślinnych: liście i korzenie pietruszki (1 wspólna publikacja).
- Zakład Chemii Organicznej i Fizycznej WUM: dr hab. Teresa Żołek - w zakresie badań dotyczących izomerów nowych analogów witaminy D₃ (1 wspólna publikacja : „Nonaqueous capillary electrophoretic separation of analogs of 1,24R-dihydroxyvitamin D₃ derivative” wysłana do publikacji)
- Zakład Chemii Leków Wydziału Farmaceutycznego WUM: prof. dr hab. Andrzej Kutner - w zakresie badań dotyczących izomerów nowych analogów witaminy D₃ (1 wspólna publikacja : „Nonaqueous capillary electrophoretic separation of analogs of 1,24R-dihydroxyvitamin D₃ derivative as predicted by quantum chemical calculations” wysłana do publikacji)
- Katedra i Zakład Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego WUM: prof. dr hab. Franciszek Herold, dr Marek Król, dr Grzegorz Ślifirski, dr Piotr Ślifirski – w zakresie badań dotyczących nowych, potencjalnych leków przeciwdepresyjnych o podwójnej wiązalności do rec.5-HT_{1A} i SER. (1 wspólna publikacja: „Determination of new derivatives of 4-aryl-pyrido[1,2-c]pyrimidine with a high affinity to 5-HT_{1A} receptor and SERT protein as a new antidepressant drugs by capillary electrophoresis method.” wysłana do czasopisma).
- Zakład Alergologii i Immunologii Klinicznej Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego WUM: dr hab. Edyta Krzych-Fałta – w zakresie badań poziomu alergenów metodą

elektroforezy kapilarnej (1 wspólna publikacja: „Methodological Principles of Nasal Food Challenge”. Praca wysłana do recenzji)

14. Otrzymane nagrody za działalność naukową

- w roku 2022: Nagroda naukowa III stopnia J.M. Rektora WUM za pracę dotyczącą badań wpływu pochodnych aminoalkanoli na aktywność enzymatyczną fosfatazy kwaśnej i acetylocholinoesterazy z zastosowaniem techniki elektroforezy kapilarnej;
- w roku 2018: Nagroda naukowa III stopnia J.M. Rektora WUM za pracę dotyczącą badań pochodnych aminoalkanoli z zastosowaniem techniki elektroforezy kapilarnej.

15. Otrzymane odznaczenia

- Brązowy Krzyż Zasługi przyznany przez Prezydenta Rzeczypospolitej Polskiej.
- Medal Brązowy Za Długoletnią Służbę przyznany przez Prezydenta Rzeczypospolitej Polskiej.
- Medal Komisji Edukacji Narodowej przyznany przez Ministra Edukacji Narodowej.

16. Działalność dydaktyczna

a) **Opieka nad pracami magisterskimi:** Byłem opiekunem naukowym 11 prac magisterskich zrealizowanych w Katedrze i Zakładzie Biochemii i Chemii Klinicznej oraz Zakładzie Biochemii i Farmakogenomiki. Tematyka prac dyplomowych dotyczyła głównie opracowywania i zastosowania metod elektroforezy kapilarnej w badaniach farmaceutycznych. W latach 2010-2011 byłem również recenzentem dwóch prac magisterskich zrealizowanych na Wydziale Farmaceutycznym WUM.

b) **Opieka nad studentką w kole naukowym:** W latach 2010-2012 pełniłem funkcję opiekuna pracy dotyczącej badań enancjomerów fluoksetyny i norfluoksetyny. Praca została zakończona obroną pracy magisterskiej pt. ”Walidacja metody oznaczania enancjomerów fluoksetyny i norfluoksetyny za pomocą techniki elektroforezy kapilarnej”.

c) **Zajęcia dydaktyczne:** W latach 2010-2014 prowadziłem zajęcia na kierunku Analityki Klinicznej z zakresu opracowywania i walidacji metod analitycznych.

d) **Prowadzone zajęcia dydaktyczne:** W ramach zajęć dydaktycznych prowadzę seminaria i ćwiczenia laboratoryjne z przedmiotu „Biochemia” dla studentów II roku kierunku farmaceutycznego oraz dla studentów I roku kierunku fizjoterapii.

e) Twórca pierwszego, multimedialnego cyklu wykładów wstępnych z biochemii dla studentów III roku farmacji.

17. Działalność organizacyjna

W latach 2008 i 2009 byłem dwukrotnie członkiem komisji egzaminacyjnej na Wydziale Farmaceutycznym.

18. Członkostwo w towarzystwach naukowych

Jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej (PTDL).

19. Wykład na zaproszenie

W dniu 02.03.2023 wygłosiłem wykład na zaproszenie pt. „Elektroforeza kapilarna w diagnostyce laboratoryjnej” podczas posiedzenia referatowego organizowanego przez Zarząd Oddziału Warszawskiego PTDL.

20. Aktywność w zagranicznych czasopismach naukowych

Jestem głównym organizatorem wydania specjalnego w wysoko punktowanym czasopiśmie zagranicznym „Molecules” jako Guest Editor.

Literatura.

- [1] Werner G. Kuhr and Curtis A. Monnig. Capillary Electrophoresis. Anal. Chem. 1992, 64, 389 R-407 R.
- [2] Robert L. St. Claire Capillary Electrophoresis Anal. Chem. 1996, 68, 12, 569–586.
- [3] A Shallan, R Guijt, and M Breadmore. Capillary Electrophoresis: Basic Principles. Encyclopedia of Forensic Sciences, Second Edition, 2013, 549-559. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-382165-2.00241-5>.
- [4] Z Kalaycıoğlu, FB Erım, Capillary Electrophoresis: Basic Principles. Current and Future Developments in Food Science, Chapter 1, 2022, Vol 2, 1-31.
- [5] Serena Orlandini , Roberto Gotti , Sandra Furlanetto. Multivariate optimization of capillary electrophoresis methods: A critical review. JPBA, 87, 2014, 290-307.
- [6] Manjiri Lele, Subodh M. Lele, John R. Petersen, Amin Mohammad, John R. Petersen, Amin A. Mohammad Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis. Humana Press, Year: 2001.
- [7] Allan Hedges, Chapter 22 - Cyclodextrins: Properties and Applications, James BeMiller, Roy Whistler, In Food Science and Technology, Starch (Third Edition), Academic Press, 2009, 833-851, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-746275-2.00022-7>.
- [8] P.R Mishra, Mamata Mishra, A. Namdeo, N.K. Jain. Pharmaceutical Potential of Cyclodextrin. Indian J. Pharm. Sci., 1999, 61(4), 193-198.
- [9] Helmut Viernsteina, Peter Wolschannb. Cyclodextrin inclusion complexation and pharmaceutical applications. ScienceAsia 46 (2020): 1–9.
- [10] Simone Braga Carneiro, Fernanda Ílary Costa Duarte, Luana Heimfarth, Jullyana de Souza Siqueira Quintans, Lucindo José Quintans-Júnior, Valdir Florêncio da Veiga Júnior, and Ádley Antonini Neves de Lima. Cyclodextrin–Drug Inclusion Complexes: In Vivo and In Vitro Approaches. Int J Mol Sci. 2019; 20(3): 642.
- [11] Szente, Lajos; Szejtli, Jozsef. Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties, and trends in development. Advanced drug delivery reviews, 1999, 36.1: 17-28.

- [12] Fanali, Salvatore. Enantioselective determination by capillary electrophoresis with cyclodextrins as chiral selectors. *J. Chromatogr. A*, 2000, 875.1-2: 89-122.
- [13] Pavel Rezanka, Klara Navratilova, Michal Rezanka, Vladimír Kral, David Sykora. Application of cyclodextrins in chiral capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2014, 35, 2701–2721.
- [14] Françoise Bressolle, Michel Audran, Tuyet-Nga Pham, Jean-Jacques Vallon. Cyclodextrins and enantiomeric separations of drugs by liquid chromatography and capillary electrophoresis: basic principles and new developments. *J. Chromatogr. B*, 687 (1996) 303-336.
- [15] Kuran, B.; Krawiecka, M.; Kossakowski, J.; Cieślak, M.; Kaźmierczak-Barańska, J.; Królewska, K.; Nawrot, B. Synthesis and biological activity of novel series of heterocyclic compounds containing succinimide moiety. Patent application P-400000 (PL), 2012.
- [16] Lien Ai Nguyen, Hua He, Chuong Pham-Huy. Chiral Drugs: An Overview. *Int J Biomed Sci.* 2006; 2(2): 85–100.
- [17] Jonathan McConathy, Michael J. Owens. Stereochemistry in Drug. Action. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry.* 2003; 5(2): 70–73.
- [18] Scott, A.K. Stereoisomers and Drug Toxicity. *Drug-Safety* 8, 149–159 (1993).
- [19] Gunter. Zweig and Joseph. Sherma. Paper and thin-layer chromatography *Anal. Chem.* 1980, 52, 5, 276–289.
- [20] Leonardo Perez de Souza, Saleh Alseekh, Federico Scossa & Alisdair R. Fernie Ultra-high-performance liquid chromatography high-resolution mass spectrometry variants for metabolomics research *Nature Methods*, 2021, 18, 733–746.
- [21] A.Escarpa, C.González. High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties *J.Chromatogr. A*, 823, 1–2, 1998, 331-337.
- [22] PhilipMarriott, RobertShellie Principles and applications of comprehensive two-dimensional gas chromatography *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 21, 9–10, 2002, 573-583.

- [23] Elad Harel, Leif Schröder, and Shoujun Xu Novel Detection Schemes of Nuclear Magnetic Resonance and Magnetic Resonance Imaging: Applications from Analytical Chemistry to Molecular Sensors Annual Review of Analytical Chemistry, 2008, 1:133-163.
- [24] George L. Ellman, K. Diane Courtney, Valentino Andres Jr. Robert M. Featherstone... A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology, 7(2), 1961, 88-90.
- [25] Pomerantz, S. H. The tyrosine hydroxylase activity of mammalian tyrosinase. J. Biol. Chem. 1966, 241, 161–168.
- [26] El-Bayoumi, M. A.; Frieden, E. A spectrophotometric method for the determination of the catecholase activity of tyrosinase and some of its applications. J. Am. Chem. Soc. 1957, 79, 4854–4858.
- [27] Fatemeh Mirazizi, Azita Bahrami, Kamahldin Haghbeen, Hossein Shahbani Zahiri, Mehdi Bakavoli, and Raymond L. Legge. Rapid and direct spectrophotometric method for kinetics studies and routine assay of peroxidase based on aniline diazo substrates. J Enzyme Inhib Med Chem, 2015, 1–8, DOI: 10.3109/14756366.2015.1103234.
- [28] Błażej Grodner*, Mariola Napiórkowska, „Characterization and inhibition studies of tissue nonspecific alkaline phosphatase by aminoalkanol derivatives of 1,7-dimethyl-8,9-diphenyl-4-azatricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-ene-3,5,10-trione, new competitive and non-competitive inhibitors, by capillary electrophoresis”, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 43, 285 - 290, 2017.
- [29] Błażej Grodner*, Mariola Napiórkowska, Dariusz Maciej Pisklak, „Kinetic Studies of Newly Patented Aminoalkanol Derivatives with Potential Anticancer Activity as Competitive Inhibitors of Prostate Acid Phosphatase”, International Journal of Molecular Sciences, 22 (21), 2021, 11761-11777.
- [30] Błażej Grodner*, Mariola Napiórkowska, Dariusz Maciej Pisklak, „In Vitro and In Silico Kinetic Studies of Patented 1,7-diEthyl and 1,7-diMethyl Aminoalkanol Derivatives as New Inhibitors of Acetylcholinesterase”, International Journal of Molecular Sciences, 23(1), 2022, 270-289. <https://doi.org/10.3390/ijms23010270>.

[31] Błażej Grodner*, Mariola Napiórkowska, Dariusz Maciej Pisklak, „Catalase inhibition by aminoalkanol derivatives with potential anti-cancer activity. In vitro and in silico studies using capillary electrophoresis method.”, International Journal of Molecular Sciences, 23(13), 2022, 7123-7140. <https://doi.org/10.3390/ijms23137123>



Błażej Grodner

Katedra i Zakład Biochemii i Farmakogenomiki

Wydział Farmaceutyczny

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego