

Dr n. farm. Joanna Zofia Stefańska
Warszawski Uniwersytet Medyczny
Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej
ul. Oczki 3, 02-007 Warszawa
e-mail: joanna.stefanska@wum.edu.pl

Załącznik nr 2

AUTOREFERAT W JĘZYKU POLSKIM



Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej
Warszawski Uniwersytet Medyczny

Warszawa 2016

1. Dane personalne

Imię i nazwisko: Joanna Zofia Stefańska

Miejsce zatrudnienia: Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej
Warszawski Uniwersytet Medyczny

Stanowisko: adiunkt

2. Wykształcenie i stopnie naukowe

2001 uzyskanie stopnia doktora nauk farmaceutycznych, tytuł rozprawy doktorskiej: Występowanie i rozprzestrzenianie się u *Staphylococcus aureus* determinant oporności na antybiotyki oraz inne związki o aktywności przeciwbakteryjnej. Promotor pracy: Dr hab. Grażyna Młynarczyk, recenzenci: Prof. dr hab. Danuta Dzierżanowska, Prof. dr hab. Stefan Tyski.

1996 specjalizacja I° z mikrobiologii

1987-1992 studia magisterskie na Wydziale Farmaceutycznym Akademii Medycznej w Warszawie (obecnie Warszawski Uniwersytet Medyczny), uzyskanie tytułu magistra farmacji. Praca magisterska pt. Badanie aktywności mutagennej wybranych flawonoidów i kwasów organicznych wobec *S. typhimurium* wykonana w Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej pod kierunkiem dr Bohdana Starościaka. Praca otrzymała I nagrodę w grupie tematycznej Biotechnologia w Konkursie Prac Magisterskich na Wydziale Farmaceutycznym w roku akademickim 1992/93.

1982-1986 I Liceum Ogólnokształcące im. Juliusza Słowackiego w Skarżysku Kamiennej

3. Dotychczasowe zatrudnienie

od 2001 r. adiunkt w Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej Akademii Medycznej w Warszawie (obecnie Warszawski Uniwersytet Medyczny)

od 1992 r. asystent w Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej Akademii Medycznej w Warszawie

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a. Tytuł osiągnięcia:

Podstawy molekularne i charakterystyka aktywności przeciwdrobnoustrojowej wybranych nowych pochodnych tiomocznika oraz naturalnego jonoforu karboksylowego – salinomycyny.

b. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

HJS1 Stefańska J.*, Szulczyk D., Koziol A.E., Mirosław B., Kedzierska E., Fidecka S., Busonera B., Sanna G., Giliberti G., La Colla P., Struga M.: Disubstituted thiourea derivatives and their activity on CNS: synthesis and biological evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2012, 55: 205-213.

IF = 3,499 MNiSW/KBN = 35

HJS2 Stefańska J., Stepień K., Bielenica A., Szulczyk D., Mirosław B., Koziol A.E., Sanna G., Iuliano F., Madeddu S., Józwiak M., Struga M.: Antimicrobial and anti-biofilm activity of thiourea derivatives incorporating 3-amino-1H-1,2,4-triazole scaffold. *Medicinal Chemistry* 2016; [ahead of print] DOI: [10.2174/1573406412666151204003146](https://doi.org/10.2174/1573406412666151204003146)

IF = 1,363 MNiSW/KBN = 20

HJS3 Stefańska J., Nowicka G., Struga M., Szulczyk D., Koziol A.E., Augustynowicz-Kopeć E., Napiorkowska A., Bielenica A., Filipowski W., Filipowska A., Drzewiecka A., Giliberti G., Madeddu S., Boi S., La Colla P., Sanna G.: Antimicrobial and anti-biofilm activity of thiourea derivatives incorporating a 2-aminothiazole scaffold. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 2015, 63(3): 225-236.

IF = 1,164 MNiSW/KBN = 20

HJS4 Antoszczak M., Popiel K., **Stefańska J.***, Wietrzyk J., Maj E., Janczak J., Michalska G., Brzezinski B., Huczyński A.: Synthesis, cytotoxicity and antibacterial activity of new esters of polyether antibiotic – salinomycin. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2014, 76: 435-444.

IF = 3,447 MNiSW = 40

HJS5 Antoszczak M., Maj E., **Stefańska J.**, Wietrzyk J., Janczak J., Brzezinski B., Huczyński A.: Synthesis, antiproliferative and antibacterial activity of new amides of salinomycin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2014, 24(7): 1724–1729.

IF = 2,420 MNiSW/KBN = 30

HJS6 Antoszczak M., Maj E., Napiórkowska A., **Stefańska J.**, Augustynowicz-Kopeć E., Wietrzyk J., Janczak J., Brzezinski B., Huczyński A.: Synthesis, anticancer and antibacterial activity of salinomycin *N*-benzyl amides. *Molecules* 2014, 19(12): 19435-19459.

IF = 2,416 MNiSW/KBN = 30

HJS7 **Stefańska J.**, Antoszczak M., Stępień K., Bartoszcze M., Mirski T., Huczyński A.: Tertiary amides of Salinomycin: A new group of antibacterial agents against *Bacillus anthracis* and methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2015, 25(10): 2082-2088.

IF = 2,420 MNiSW/KBN = 25

HJS8 **Stefańska J.***, Stępień K., Huczyński A. Tyski S.: Activity of natural polyether ionophores: monensin and salinomycin against clinical *S. epidermidis* strains. *Polish Journal of Microbiology* 2015, 64(3): 273-278.

IF = 0,697 MNiSW/KBN = 15

HJS9 **Stefańska J.***: Przeciwdrobnoustrojowe właściwości naturalnych jonoforów karboksylowych i ich pochodnych. *Postępy Mikrobiologii* 2015, 54(2): 175-183.

IF = 0,286 MNiSW/KBN = 15

* - jako autor korespondencyjny

Sumaryczny **Impact Factor** wg. roku opublikowania – **17,712**

Liczba punktów **MNiSW/KBN** – **230**

Liczba cytowań – **39**

c. Omówienie celu naukowego w/w prac, uzyskanych wyników i ich ewentualnego wykorzystania

Od początku zatrudnienia w Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej moje zainteresowania naukowe koncentrowały się na poszukiwaniu nowych związków o aktywności przeciwdrobnoustrojowej (zwłaszcza przeciwegronkowcowej), zarówno wśród nowo syntetyzowanych związków chemicznych, jak i wśród różnego rodzaju substancji pochodzenia naturalnego i ich pochodnych. Tematyka ta doskonale wpisywała się w główny nurt badań prowadzonych w Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej. Prowadząc badania do rozprawy doktorskiej rozpoczęłam kolekcjonowanie szczepów bakteryjnych, zwłaszcza z rodzaju *Staphylococcus* o zróżnicowanej lekowrażliwości, w tym izolowanych z różnych materiałów, zarówno ze środowiska, od nosicieli, jak i od osób hospitalizowanych. W tym czasie podjęłam również owocną współpracę z kilkoma jednostkami naukowymi na uczelni.

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych w 2001 roku moja działalność naukowa skupiła się na badaniach aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej różnych pochodnych tiosemikarbazydu, triazolu, tiomocznika i naturalnych jonoforów karboksylowych: kwasu lasalowego, monenzyny i salinomycyny.

Problem lekooporności drobnoustrojów

Penicylina – pierwszy antybiotyk, została odkryta w 1928 roku przez szkockiego lekarza i bakteriologa Aleksandra Fleminga, a rozwój szeroko pojętej antybiotykoterapii rozpoczął się w latach 40-tych XX wieku. Jednak w dość krótkim czasie od wprowadzenia do lecznictwa preparatów przeciwdrobnoustrojowych zaobserwowano zjawisko lekooporności, które obecnie stanowi bardzo poważny problem i ogromne wyzwanie współczesnej medycyny. Trudno sobie wyobrazić odległe skutki tego zjawiska, gdyż może się zdarzyć powrót do sytuacji sprzed odkrycia antybiotyków, gdy utrudnione będzie zwalczanie różnego rodzaju zakażeń bakteryjnych czy przeprowadzanie zabiegów chirurgicznych wymagających prewencyjnego zastosowania antybiotykoterapii a nawet błaha infekcja będzie stanowić dla chorego śmiertelne zagrożenie.

Oporność na antybiotyki powstaje na skutek zmian ewolucyjnych zachodzących w komórkach bakteryjnych w wyniku ekspozycji na substancje o aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Efektem tego są różnego rodzaju mechanizmy umożliwiające bakteriom przeżywanie w niekorzystnych warunkach, np. blokowanie dostępu leku do komórki (zmiany receptorów) czynne jego usuwanie (tzw. efflux) czy rozkład enzymatyczny (np. β -laktamazy). Przyczyn lekooporności upatruje się głównie w niewłaściwym stosowaniu oraz nadużywaniu substancji przeciwdrobnoustrojowych, nie tylko w lecznictwie (zarówno szpitalnym jak i pozaszpitalnym), ale także np. w weterynarii, kosmetologii czy dodawaniu ich do środków higienicznych.

Pomimo wielu działań zarówno organizacji światowych, takich jak WHO (ang. *World Health Organisation*), CDC (ang. *Centers for Disease Control and Prevention*), ECDC (ang. *European Centre for Disease Prevention and Control*), jak i inicjatyw krajowych (Narodowy Program Ochrony Antybiotyków), mających na celu edukację i ograniczenie zjawiska lekooporności, wciąż rośnie liczba szczepów wielolekoopornych, czyli opornych na co najmniej trzy klasy antybiotyków [55]. Największe zagrożenie stanowią wielolekooporne szczepy gronkowców (zarówno *S. aureus* jak i gronkowce koagulazo-ujemne), wankomycynooporne enterokoki czy pałeczki Gram-ujemne z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz pałeczki niefermentujące (np. *Pseudomonas aeruginosa*) wytwarzające karbapenemazy. Szczególnie niebezpieczne są zakażenia szpitalne, które dotyczą 5-20% osób hospitalizowanych, wśród których jest aż 45-60% pacjentów oddziałów intensywnej terapii [16].

W ciągu ostatnich 15 lat na świecie do lecznictwa (głównie zamkniętego i zwykle w ograniczonym zakresie terapeutycznym) wprowadzono kilka całkiem nowych leków przeciwbakteryjnych z grupy oksazolidynonów (linezolid, tedizolid), lipopeptydów (daptomycyna) i pleuromutylin (retapamulina). Znaczna liczba antybiotyków dopuszczonych do stosowania terapeutycznego po roku 2000 to nowe pochodne znanych już klas leków: cefalosporyn (V generacji - ceftobipiroł medokarilu, ceftarolina fosamilu), karbapenemów (biapenem, ertapenem, doripenem) oraz fluorochinolonów (gemifloksacyna, bezyfloksacyna) [30,31]. Kilka fluorowanych pochodnych chinolonów oraz pochodnych karbapenemów i cefalosporyn znajduje się też obecnie w fazie badań klinicznych [32]. Wysiłki mające na celu opracowanie nowych leków przeciwbakteryjnych wciąż są jednak niewystarczające, aby poradzić sobie z pojawianiem się kolejnych mechanizmów oporności [45].

Poszukiwanie nowych skutecznych klas antybiotyków/chemioterapeutyków, a także opracowywanie nowych, niekonwencjonalnych strategii walki z tym zjawiskiem stanowi priorytet w dziedzinie zdrowia publicznego. Metody poszukiwania substancji o potencjalnym działaniu terapeutycznym w ciągu ostatnich dziesięcioleci uległy znacznym zmianom. Niebagatelną rolę obecnie odgrywa wykorzystanie technik komputerowych do projektowania i oceny właściwości fizyko-chemicznych potencjalnie aktywnych cząstek, które mogą być w zasadzie stosowane na każdym etapie badań nad nowym lekiem. Pojęcie QSAR/SAR (ang. *Quantitative structure-activity relationship*) obejmuje różne techniki wykorzystywane do poszukiwania korelacji między strukturą chemiczną cząsteczki a zdefiniowanym procesem zachodzącym z jej udziałem. Jednak prowadzone *in vitro* klasyczne metody badania aktywności biologicznej, stosowane np. do sprawdzenia działania przeciwbakteryjnego, przeciwnowotworowego czy mutagennego, pozwalają potwierdzić, czy przyjęte na wstępie założenia były słuszne i czy (i jakie) mają przełożenie na rzeczywistość. Ten etap jest niezbędny zanim rozpocznie się kolejny etap pracy nad nowym lekiem – badania kliniczne kilku faz. Zwykle efekt syntezy nowych związków jest wypadkową wielokierunkowych badań nad aktywnością biologiczną określonych substancji.

Wybrane do badań grupy związków i ich aktywność przeciwdrobnoustrojowa

Tematyka związana z poszukiwaniami nowych związków aktywnych biologicznie od początku mojej kariery naukowej była mi bardzo bliska, a jako farmaceuta-mikrobiolog postanowiłam skupić się na substancjach, które byłyby skuteczne w walce z wielolekoopornymi szczepami bakteryjnymi.

Dzięki nawiązanej współpracy z Katedrą Chemii WUM oraz Wydziałem Chemii UAM w Poznaniu w obszarze moich zainteresowań naukowych znalazły się między innymi dwie duże grupy związków: **pochodne tiomocznika** oraz naturalne jonofory karboksylowe, w tym **salinomycyna i jej nowe pochodne**.

Głównymi założeniami mojej pracy badawczej było scharakteryzowanie w jak najszerszym stopniu aktywności przeciwbakteryjnej i/lub przeciwgrzybiczej nowych związków. Wstępne badania prowadziłam na grupie szczepów wzorcowych bakterii i grzybów drożdżopodobnych, pochodzących

z międzynarodowych kolekcji drobnoustrojów ATCC (*American Type Culture Collection*) i NCTC (*National Collection of Type Cultures*, Londyn, Wielka Brytania).

Ponieważ w sferze moich głównych zainteresowań od dawna znajdują się bakterie Gram-dodatnie, dla związków aktywnych przeprowadziłam również badania działania przeciwostronkowcowego, z wykorzystaniem szczepów *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis* o zróżnicowanej lekowrażliwości (w tym wielolekoopornych), izolowanych z różnych materiałów od osób hospitalizowanych. W badaniach mikrobiologicznych nowych związków wykorzystałam metody rekomendowane przez Clinical and Laboratory Standards Institute [10,11,12].

Ciężkie uogólnione zakażenia wielolekoopornymi szczepami gronkowców, zwłaszcza *S. epidermidis*, często związane są z kolonizacją przez ten drobnoustrój wyrobów medycznych (implantów, cewników, protez) czy przyrządów diagnostycznych i tworzeniem na ich powierzchni złożonej struktury biofilmu [14,15,36,37]. Komórki bakteryjne żyjące w biofilmie są, w porównaniu z formami planktonowymi, bardziej odporne na antybiotyki i chemioterapeutyki [2,20] oraz środki antyseptyczne czy dezynfekcyjne powszechnie stosowane w lecznictwie [7]. Stwarza to dodatkowe problemy terapeutyczne, niekiedy nawet konieczne jest usunięcie implantu i długa antybiotykoterapia. Biofilm może być wytwarzany przez wiele gatunków bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, i wciąż brak jest skutecznych metod walki z nim. Dlatego tak ważne jest poszukiwanie nowych związków, które byłyby skuteczne w zwalczaniu biofilmu. Mogłyby one być wykorzystane np. do pokrywania powierzchni biomateriałów czy np. odzieży ochronnej, w celu zapobiegania osadzaniu się na nich drobnoustrojów, a tym samym uniemożliwienia tworzenia na ich powierzchni trudnego do eradykacji biofilmu [33]. Najbardziej pożądane byłyby związki wykazujące jednocześnie działanie antyadhezyjne i przeciwdrobnoustrojowe.

Biofilm tworzony przez szczepy gronkowców, zarówno koagulazododatnich jak i koagulazo-ujemnych oraz metody jego zwalczania od kilku lat znajdują się w obszarze moich zainteresowań i prac naukowych. W przypadku najbardziej aktywnych związków, zarówno z grupy pochodnych tiomocznika, jak i salinomycyny, przeprowadziłam badania ich zdolności do hamowania tworzenia biofilmu przez kliniczne szczepy gronkowców. W badaniach tych korzystałam ze spektrofotometrycznego oznaczenia ilości biofilmu

z zastosowaniem barwienia solą tetrazoliową (MTT) żywych komórek bakteryjnych.

W różnych ośrodkach na całym świecie prowadzone są badania nad potencjalnymi mechanizmami działania różnych związków chemicznych, w tym układów heterocyklicznych (pochodnych tiosemikarbazidu, imidazolu czy tiomocznika) a w piśmiennictwie są dostępne dane o ich wpływie na topoizomerazy bakteryjne [5,17,44,49,53]. Dlatego, na podstawie wyników przeprowadzonych badań aktywności przeciwgronkowcowej wyselekcjonowałam kilka pochodnych tiomocznika, dla których we współpracy z dr Małgorzatą Wrzosek z Zakładu Farmakogenomiki WUM przeprowadziłam badania potencjalnego działania hamującego aktywność bakteryjnych topoizomeraz z zastosowaniem testu *Decatenation assay* firmy Inspiralis.

Tiomocznik (tiokarbamid) to znany związek organiczny, strukturalny analog mocznika, w zasadzie nie spotykany w przyrodzie, w którym atom tlenu jest zastąpiony siarką. Jak wynika z wielu badań niepodstawiony tiomocznik jest toksyczny, LD₅₀ po podaniu doustnym dla szczurów wynosi ok. 125 mg/kg m.c. [39], jednak jego niektóre pochodne są obecne w wielu gałęziach przemysłu, np. przy produkcji tkanin, tworzyw sztucznych czy środków ochrony roślin [56].

Ugrupowanie tiomocznikowe w formie cyklicznej spotykane jest w produktach leczniczych, takich jak np. Tyrosan stosowany w leczeniu nadczynności tarczycy, Tiopental – lek używany do znieczulenia ogólnego czy Faringosept – stosowany przy zapaleniach gardła, zawierający związek bakteriostatyczny, ambazon [42].

Z badań prowadzonych od wielu lat na całym świecie wynika, że pochodne tiomocznika (także kompleksy z metalami) wykazują potencjalnie korzystne szerokie działanie biologiczne, w tym przeciwbakteryjne [4,13,29,33,47,48,51], przeciwwirusowe [28,35], przeciwnowotworowe [34].

Układ tiomocznika zajmuje ważną pozycję wśród związków chemicznych poddawanych modyfikacjom w celu uzyskania pochodnych o jak najbardziej korzystnych właściwościach biologicznych. W wielu ośrodkach badawczych syntetyzowane są np. aryłowe i alkilowe pochodne, układ tiomocznika został również wykorzystany do modyfikacji oksazolidynonów, stosunkowo nowych związków o aktywności

przeciwbakteryjnej, do których należy stosowany w leczeniu zamkniętym Linezolid [3].

Z prowadzonych w wielu ośrodkach badań nad zależnością aktywności biologicznej substancji od jej struktury chemicznej wynika, że istotne znaczenie ma obecność i orientacja przestrzenna różnych grup funkcyjnych, które decydują o właściwościach związku. Cząsteczka 1,3-difenylotiomocznika w postaci niepodstawionej nie wykazuje np. aktywności przeciwdrobnoustrojowej [13], natomiast jej zmiany strukturalne mogą zdecydowanie poprawić aktywność biologiczną związku. Z danych przeanalizowanego przez mnie piśmiennictwa wynika, że wprowadzenie do cząsteczki atomu/atomów chlorowca jest jedną z najbardziej skutecznych metod poprawy lipofilności związku, a co za tym idzie jego biodostępności i aktywności [13,40]. Pochodne aryliotiomocznika podstawione fluorem wykazują zdecydowanie większą aktywność w porównaniu z innymi analogami, a wprowadzenie podstawników metylo-, fluoro-metylo- lub metoksy- do pierścienia benzenowego również może wpłynąć np. na zwiększenie działania przeciwbakteryjnego [47,52]. Z prac innych autorów wynika, że skuteczność przeciwbakteryjna i przeciwgrzybicza pochodnych tiomocznika ulega również zwiększeniu po wprowadzeniu do cząsteczki podstawników zmniejszających gęstości elektronową, np. grupy nitrowej przy atomach węgla C-2 i C-4 pierścienia fenyloвого [18,48].

W zespole dr hab. Marty Strugi z Zakładu Farmakogenomiki Wydziału Farmaceutycznego WUM we współpracy z dr Anną Bielenicą z Katedry i Zakładu Biochemii I Wydziału Lekarskiego podjęto szerokie prace mające na celu projektowanie i syntezę pochodnych tiomocznikowych o jak najszerszej aktywności biologicznej. W ramach tego programu badawczego powstało kilkadziesiąt pochodnych tiomocznika o różnych strukturach chemicznych, które poddano szerokim badaniom aktywności przeciwdrobnoustrojowej, w tym niektóre także przeciwwirusowej i przeciwgruźliczej oraz ich wpływ na tworzenie bakteryjnego biofilmu.

Ponieważ triazole stanowią dużą, interesującą grupę związków o zróżnicowanej aktywności biologicznej, jednym z kierunków modyfikacji tiomocznika była synteza kilkunastu nowych **1,2,4-triazolowych pochodnych tiomocznika**. Synteza i badania biologiczne tych związków zostały przedstawione w pracy opublikowanej w *European Journal of Medicinal*

Chemistry [HJS1]. Badania mikrobiologiczne przeprowadziłam wstępnie na szczepach wzorcowych bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych i grzybów drożdżopodobnych, kolejnym krokiem było sprawdzenie ich aktywności wobec szczepów klinicznych. Wstępne badania wykazały, że 8 spośród 10 badanych nowych związków było aktywnych wobec szczepów wzorcowych bakterii Gram-dodatnich z rodzajów: *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Enterococcus*. Wartości MIC tych pochodnych były zróżnicowane i wynosiły od 6,25 µg/ml do 400 µg/ml, najbardziej wrażliwe okazały się szczepy *Bacillus subtilis* i *B. cereus* oraz *Micrococcus luteus*, a najbardziej oporny był *Enterococcus hirae*. Żaden spośród badanych związków nie wykazał aktywności wobec bakterii Gram-ujemnych i grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida*. Ponieważ działanie związków było skierowane na bakterie Gram-dodatnie, aktywne pochodne w dalszym etapie poddałam badaniom na grupie klinicznych szczepów z rodzaju *Staphylococcus*. W grupie tej znalazły się szczepy metycylinowrażliwe i metycylinooporne z gatunków *S. aureus* oraz *S. epidermidis*. Były to izolaty pochodzące z różnych materiałów klinicznych od pacjentów hospitalizowanych w jednym z warszawskich szpitali. W przypadku szczepów MSSA uzyskane wartości MIC siedmiu związków wynosiły od 12,5 µg/ml do 50 µg/ml, w przypadku szczepów metycylinoopornych uzyskane wartości MIC były wyższe i mieściły się w granicach: 12,5 µg/ml–100 µg/ml dla szczepów MRSA oraz 12,5 µg/ml–200 µg/ml dla izolatów MRSE. Jedna pochodna okazała się praktycznie nieaktywna (MIC > 400 µg/ml).

Badania mikrobiologiczne 1,2,4-triazolowych pochodnych tiomocznika objęły również sprawdzenie ich potencjalnej aktywności przeciwwirusowej wobec wirusa HIV-1 oraz cytotoksyczności na komórkach MT-4. Badania te zostały przeprowadzone na Wydziale Nauk Biomedycznych i Technologii Uniwersytetu Cagliari w Monserrato we Włoszech pod kierunkiem Prof. Paulo LaColla, jednak żaden z badanych związków nie wykazał wybiórczego działania przeciwwirusowego.

Analiza uzyskanych wyników badań mikrobiologicznych pozwoliła na wyciągnięcie wniosku, że aktywność tych związków jest w znacznym stopniu determinowana obecnością i położeniem określonych podstawników. Tylko pochodne zawierające układ heterocykliczny podstawiony atomem fluoru, jodu, bromu lub grupą metoksyłową wykazywały aktywność przeciwbakteryjną. Najsilniejsze działanie przeciwbakteryjne zaobserwowano

dla pochodnych zawierających podstawniki w pozycji *meta* i *para*: 1-(4-chlorofenylo)-3-(1*H*-1,2,4-triazol-3-ilo)tiomocznika oraz 1-(3-fluorofenylo)-3-(1*H*-1,2,4-triazol-3-ilo)tiomocznika.

Kontynuacją tematyki przedstawionej powyżej jest artykuł zaakceptowany w 2015 roku do publikacji w czasopiśmie *Medicinal Chemistry [HJS2]* traktujący o aktywności mikrobiologicznej 21 nowych **pochodnych tiomocznika zawierających układ aminotriazolu**. Spośród poddanych wstępnym badaniom związków zróżnicowaną aktywność przeciwbakteryjną i/lub przeciwgrzybiczą uzyskałam w przypadku 13 pochodnych. Siedem związków wykazało silne i umiarkowane działanie przeciwbakteryjne wobec szczepów Gram-dodatnich, nie były one aktywne wobec pałeczek Gram-ujemnych i drożdżaków z rodzaju *Candida*. Dla tych związków wartości MIC wobec szczepów wzorcowych z rodzaju *Staphylococcus* wynosiły od 4 do 32 µg/ml. Sześć spośród badanych związków wykazało umiarkowane działanie przeciwgrzybicze na wzorcowe szczepy *Candida albicans* i *Candida parapsilosis*, a otrzymane wartości MIC wynosiły od 64 do 128 µg/ml. Pochodne te w badanym zakresie stężeń nie wykazały aktywności przeciwbakteryjnej wobec użytych szczepów.

Kolejnym krokiem była ocena aktywności badanych związków wobec metycyloopornych szczepów klinicznych *Staphylococcus aureus* (MRSA) i *Staphylococcus epidermidis* (MRSE). W większości przypadków uzyskane wartości MIC wahały się od 4 do 64 µg/ml, tylko 2 pochodne były bardziej aktywne (MIC 4-16 µg/ml).

Badania mikrobiologiczne wykazały wyraźną aktywność halogenowych pochodnych aryliotiomocznika wobec form planktonowych gronkowców, dlatego też dla wybranych, najsilniej działających 2 pochodnych: 1-(3-chloro-4-metylofenylo)-3-(1*H*-1,2,4-triazol-3-ilo)tiomocznika oraz 1-(4-fluoro-3-chlorofenylo)-3-(1*H*-1,2,4-triazol-3-ilo)tiomocznika przeprowadziłam badanie ich wpływu na tworzenie biofilmu przez kliniczne szczepy MRSE. Niezależnie od ilości tworzonego przez badane szczepy biofilmu obydwa związki wykazały wyraźny hamujący wpływ na to zjawisko. Pochodna zawierająca w pierścieniu fenylowym podstawnika 2 atomy - chloru i fluoru, w najwyższym zastosowanym stężeniu (32 µg/ml) hamowała tworzenie biofilmu przez szczepy *S. epidermidis* od 40 do 60% w porównaniu z kontrolą. Dla porównania, związek referencyjny – cyprofloksacyna, w takim samym stężeniu powodowała spadek tworzenia biofilmu gronkowcowego od 10 do 50%, tylko

w przypadku jednego szczepu było to 90%. Obliczone wartości stężenia hamującego w 50% tworzenie biofilmu (IC_{50}) dla tej pochodnej, zależnie od szczepu, wahały się od 2 do 6 $\mu\text{g/ml}$, podczas gdy IC_{50} cyprofloksacyny było kilkakrotnie wyższe.

W przeprowadzonych na Uniwersytecie Cagliari w Monserrato we Włoszech badaniach pochodne tiomocznika z układem 2-aminotriazolu nie wykazały aktywności wobec wirusa HIV-1.

Analiza zależności budowy chemicznej związków i ich aktywności mikrobiologicznej pozwoliła wyciągnąć wniosek, że pochodne *N*-arylotiomocznika odznaczają się aktywnością przeciwbakteryjną, natomiast te z podstawnikami alkilowymi nie mają takiego działania. Pochodne posiadające w pozycji *para* i/lub *meta* pierścienia benzenowego słabo dezaktywujące atomy chloru lub fluoru okazały się najbardziej aktywne w stosunku do bakterii. Najsilniejsze działanie uzyskano w przypadku dwóch związków: 1-(3-chloro-4-metylofenylo)-3-(1*H*-1,2,4-triazol-3-ilo)tiomocznika oraz 1-(4-fluoro-3-chlorofenylo)-3-(1*H*-1,2,4-triazol-3-ilo)tiomocznika. Ponadto zaobserwowano, że związek dwupodstawiony atomem halogenowca był bardziej aktywny od pochodnych jednopodstawionych, ze względu na silniejszy efekt elektroujemny. Oznacza to, że istotne znaczenie oprócz obecności określonych podstawników, w aktywności biologicznej związku odgrywa też rozkład potencjału elektrostatycznego wokół cząsteczki. Umiarkowane działanie przeciwgrzybicze uzyskano jedynie w przypadku *N*-alkilo pochodnych tiomocznika zawierających układ 1,2,4-triazolu.

Kolejną interesującą grupę związków o szerokiej aktywności biologicznej stanowią **1,3-tiazole**. Z uwagi na fakt, że szereg związków o aktywności przeciwbakteryjnej (np. sulfatiazol, aztreonam czy ceftriaxon) zawiera układ amino-1,3-tiazolu [1,27,54], został on wykorzystany do zaprojektowania i syntezy szeregu nowych **pochodnych tiomocznika z układem 2-aminotiazolu** o potencjalnej aktywności przeciwdrobnoustrojowej. W pracy opublikowanej w 2015 w czasopiśmie Chemical and Pharmaceutical Bulletin [HJS3] przedstawiono syntezę kilkunastu nowych pochodnych oraz wyniki badania ich aktywności biologicznej, w tym przeciwbakteryjnej, przeciwgrzybiczej, przeciwgruźliczej i przeciwwirusowej.

Wstępne badania aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej metodą krążkowo-dyfuzyjną wykazały aktywność 11 związków wobec grupy szczepów wzorcowych, w tym 5 w niewielkim stopniu hamowało wzrost szczepów *Candida albicans* i *Candida parapsilosis*. Żaden związek nie hamował wzrostu bakterii Gram-ujemnych. W dalszym etapie badań wyznaczyłam wartości najmniejszego stężenia tych związków hamującego wzrost wzorcowych szczepów bakterii i grzybów (MIC). Najsilniejsze działanie przeciwbakteryjne uzyskano w przypadku 3 pochodnych, ich wartości MIC wynosiły od 2 do 16 µg/ml, dla 7 związków w przypadku większości szczepów wzorcowych uzyskano średnie wartości MIC w granicach 16-32 µg/ml, jeden związek działał śladowo (MIC128-512 µg/ml). Najbardziej opornymi szczepami okazały się *Enterococcus hirae* i *Enterococcus faecalis*, wartości najmniejszego stężenia trzech najaktywniejszych związków hamującego wzrost tych bakterii wynosiły od 16 do 32 µg/ml, natomiast pozostałych – od 64 do > 512 µg/ml. Uzyskane wartości MIC pięciu związków działających na grzyby (w tym tylko jednego o silnym działaniu przeciwbakteryjnym) wynosiły od 64 do 512 µg/ml.

Ponieważ działanie badanych pochodnych było skierowane na bakterie Gram-dodatnie, następnym etapem badań *in vitro* było sprawdzenie ich działania wobec metycylinoopornych klinicznych szczepów *Staphylococcus epidermidis* izolowanych z krwi osób hospitalizowanych. Badania te potwierdziły silne działanie 3 pochodnych, dla których uzyskano wartości MIC od 2 do 16 µg/ml (dla większości szczepów od 4 do 8 µg/ml). W przypadku większości szczepów klinicznych działanie to było lepsze lub porównywalne z aktywnością zastosowanego związku referencyjnego – cyprofloksacyny. Dla siedmiu pochodnych uzyskano wartości MIC od 16 do 128 µg/ml (średnio 32 µg/ml). Podobnie jak w przypadku szczepów wzorcowych jeden związek wykazał bardzo słabe działanie (MIC 128–256 µg/ml) wobec szczepów klinicznych *S. epidermidis*.

W badaniach na komórkach planktonowych aktywność przeciwgronkowcowa przebadanych kilku pochodnych tiomocznika z układem 2-aminotiazolu była wyraźna, więc kolejnym etapem moich badań było sprawdzenie ich zdolności do hamowania tworzenia biofilmu przez kliniczne metycylinooporne szczepy *S. epidermidis*. Do badań wytypowałam 2 pochodne o najlepszej aktywności przeciwbakteryjnej: 1-(3,4-dichlorofenylo)-3-(1,3-tiazol-2-ilo)tiomocznik oraz 1-(3-chloro-4-fluorofenylo)-3-

(1,3-tiazol-2-ilo)tiomocznik, dla których wartości MIC wynosiły od 4 do 8 µg/ml. Obydwie pochodne wyraźnie hamowały proces tworzenia biofilmu, zarówno w przypadku szczepów tworzących go na wysokim, jak i na niskim poziomie. Wartości IC₅₀ wynosiły od 0,35 do 7,32 µg/ml, podczas gdy dla cyprofloksacyny było to od 1,95 do 18,55 µg/ml. Obydwie pochodne zastosowane w stężeniu 8 µg/ml hamowały tworzenie biofilmu przez większość badanych szczepów w ponad 70%, a cyprofloksacyna w najwyższym zastosowanym stężeniu (16 µg/ml) hamowała go jedynie w około 40%.

W zespole Prof. dr hab. Ewą Augustynowicz-Kopeć w Zakładzie Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie przeprowadzono badania aktywności związków opisanych w tej pracy wobec szczepów *Mycobacterium tuberculosis* o różnej wrażliwości na leki przeciwgruźlicze. Najlepszą aktywność wykazały 2 pochodne zawierające podstawnik fenyłowy i 4-jodofenyłowy, a uzyskane wartości MIC wynosiły 12,5 µg/ml. Aktywność przeciwpłatkowa pozostałych związków była słabsza, wartości MIC wahały się od 25 do 100 µg/ml (średnio 25 µg/ml).

Pochodne tiomocznika z układem aminotiazolu w cząsteczce zostały także przebadane pod kątem ich potencjalnej aktywności przeciwwirusowej na Wydziale Nauk Biomedycznych i Technologii Uniwersytetu Cagliari w Monserrato we Włoszech. Badania objęły szereg wirusów, zarówno RNA jak i DNA, należących do różnych rodzin. Tylko jedna pochodna, 1-cyklohexyl-3-(1,3-tiazol-2-ilo)tiomocznik wykazała aktywność wobec wirusa HIV-1 i wirusa Coxackie B-5 (CVB-5).

Analiza wyników badań mikrobiologicznych potwierdziła zależność aktywności od obecności podstawnika/podstawników w pierścieniu fenyłowym. Wniosek, że podstawienie go atomem chloru, fluoru, bromu lub grupą metoksyłową czy trifluorometyłową zwiększa aktywność mikrobiologiczną w porównaniu z podstawnikami alifatycznymi, jest zgodny z wynikami badań własnych oraz innych autorów [18,40,52]. Najbardziej aktywna okazała się pochodna zawierająca podstawnik 3-chloro-4-fluorofenyłowy. Jak wynika z analizy wyników najsilniejsze działanie wykazały pochodne tiomocznika posiadające podstawniki elektronodonorowe („wciskające” elektron do pierścienia aromatycznego), takie jak atom chloru czy chloru i fluoru jednocześnie. Były to 3 związki: 1-(3,4-dichlorofenylo)-3-(1,3-tiazol-2-

ilo)tiomocznik, 1-(3-fluorofenylo)-3-(1,3-tiazol-2-ilo)tiomocznik oraz 1-(3-chloro-4-fluorofenylo)-3-(1,3-tiazol-2-ilo)tiomocznik.

Szczegółowa analiza potencjalnych korelacji struktury badanych pochodnych z ich aktywnością biologiczną (SAR) została przeprowadzona w Instytucie Elektroniki Wydziału Automatyki, Elektroniki i Informatyki Katedrze Biosensorów i Przetwarzania Sygnałów Wydziału Inżynierii Biomedycznej Politechniki Śląskiej. W ramach tej analizy przeanalizowano niektóre fizykochemiczne parametry związków, takie jak np. ciężar cząsteczkowy (M), powierzchnia (SA), logarytm współczynnika podziału ($\log P$), różnica między najwyższym zajęтым orbitalem molekularnym (HOMO) i najniższym niezajętym orbitalem molekularny (LUMO), energia całkowita (E_T), energia wiązania (E_B), energia izolowanych atomów (E_{IA}), energia elektronowa (E_E), oddziaływanie rdzeń-rdzeń (I_{C-C}), ciepło tworzenia (H_F), czy polaryzowalność (α). Na podstawie dokonanych obliczeń nie udało się jednak zaobserwować istotnych korelacji między najważniejszymi parametrami, takimi jak $\log P$, HOMO, LUMO, jednak zauważono zależność pomiędzy obliczoną energią całkowitą (E_T) i energią izolowanych atomów (E_{IA}). Pochodne tiomocznika dla których uzyskałam najniższe wartości MIC i najsilniejszy efekt hamujący tworzenie biofilmu, posiadały najniższe wartości tych parametrów w porównaniu z pozostałymi związkami.

Efektom pracy nad kolejnymi pochodnymi tiomocznika, w tym wypadku **dipodstawionymi, zawierającymi ugrupowanie 3-(trifluorometylo)fenylowe**, jest współautorstwo pracy opublikowanej w European Journal of Medicinal Chemistry [6]. W publikacji tej, obok wykonanych przeze mnie badań aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwbiofilmowej, znalazły się też wyniki badań aktywności przeciwprątkowej, cytotoksyczności i właściwości przeciwwirusowych, wykonane w kilku ośrodkach naukowych. W pracy tej przebadalam 31 pochodnych tiomocznika (w tym 25 zupełnie nowych struktur), wśród których znalazło się 20 związków z podstawnikami aromatycznymi i 11 z alifatycznymi. Aż 19 spośród badanych związków wykazało w badaniach wstępnych wyraźną aktywność przeciwbakteryjną (głównie wobec bakterii Gram-dodatnich) i dla nich wyznaczyłam wartości MIC. W przypadku 11 związków wartości najmniejszego stężenia hamującego wzrost wzorcowych szczepów gronkowców mieściły się w granicach 4-32 $\mu\text{g/ml}$. W przypadku trzech związków uzyskałam wyniki świadczące o działaniu porównywalnym

do cyprofloksacyny, która została użyta jako wzorcowy chemioterapeutyk przeciwbakteryjny. Dla 7 najbardziej aktywnych pochodnych wykonałam oznaczenia wartości najmniejszego stężenia hamującego (MIC) wzrost klinicznych szczepów *S. aureus* i *S. epidermidis*. Wyniki tych oznaczeń potwierdziły silne działanie przeciwgronkowcowe badanych związków, a wartości MIC mieściły się w granicach 0,25–16 µg/ml. Najbardziej aktywne okazały się trzy **pochodne halogenowe: 1-(3-chloro-4-fluorofenylo)-3-[3-(trifluorometylo)fenylo]tiomocznik, 1-(3,4-dichlorofenylo)-3-[3-(trifluoro-metylo)fenylo]tiomocznik oraz 1-(3-bromofenylo)-3-[3-(trifluoro-metylo)fenylo]tiomocznik**, których wartości MIC dla szczepów wynosiły od 0,25 do 2 µg/ml i były porównywalne do aktywności cyprofloksacyny wobec wzorcowych szczepów gronkowców. W przypadku niektórych szczepów klinicznych działanie tych związków było 128-256 razy wyższe niż leku referencyjnego. Aktywność przeciwbakteryjna dipodstawionych pochodnych tiomocznika z ugrupowaniem **3-(trifluorometylo)fenylowym** okazała się zdecydowanie wyższa niż badanych wcześniej związków zawierających strukturę 1,2,4-triazolu [HJS1]. Do badań nad wpływem związków na hamowanie tworzenia biofilmu przez kliniczne szczepy MRSA wybrałam 2 pochodne, które były najbardziej aktywne wobec komórek planktonowych gronkowców klinicznych. Obydwa związki w stężeniach 4-8 µg/ml hamowały tworzenie biofilmu w ponad 70%, podczas gdy cyprofloksacyna w takim samym stężeniu hamowała to zjawisko od 5 do 45%. Wartości IC₅₀ w przypadku pochodnej 1-(3-chloro-4-fluorofenylo)-3-[3-trifluorometylo]fenylo]tiomocznika wynosiły od 0,97 do 2,85 µg/ml, dla 1-(3-bromofenylo)-3-[3-trifluorometylo]fenylo]tiomocznika było to 1,98 do 5,0 µg/ml, a dla cyprofloksacyny IC₅₀ było zdecydowanie wyższe i wynosiło od 4,81 do 42,76 µg/ml.

Również dla tych 2 pochodnych zbadalam potencjalny mechanizm działania poprzez hamowanie gronkowcowej topoizomerazy IV. Okazało się, że obydwa związki w teście *Decatenation assay* wykazują inhibicyjne działanie porównywalne do cyprofloksacyny. Geometria cząsteczki, obecność atomów halogenowców w pierścieniu fenylowym i ich miejsce podstawienia przypuszczalnie w pewnym stopniu może determinować hamujący wpływ na aktywność topoizomerazy IV, a co za tym idzie działanie przeciwgronkowcowe tych pochodnych tiomocznika.

W badaniach przeprowadzonych w Instytucie Gruźlicy i Chorób Płuc aktywność badanych dipodstawionych pochodnych tiomocznika z ugrupowaniem 3-(trifluorometylo)fenylowym wobec szczepów *M. tuberculosis* okazała się słaba.

Analizując wyniki badań mikrobiologicznych można wysunąć kilka wniosków na temat zależności aktywność-struktura. Pochodne *N*-arylotiomocznika wykazały lepszą aktywność przeciwbakteryjną niż związki zawierające podstawniki alkilowe, a pochodne dipodstawione były bardziej aktywne niż jednopodstawione. O działaniu przeciwbakteryjnym decydowała obecność atomów halogenowca (chloru, fluoru, bromu) w pierścieniu fenylowym, przy czym aktywność była najsilniejsza jeśli znajdował się on w pozycji *meta* i/lub *para*. Na podstawie uzyskanych wyników można przedstawić wpływ podstawników na aktywność w kolejności malejącej: 3-chloro-4-fluorofenylo > 3-bromofenylo > 3,4-dichlorofenylo > 3-fluorofenylo > fenyloetylo > benzylo > 4-chlorofenylo. Związki zawierające podstawniki niearomatyczne cechowała niska lipofilność i były one pozbawione aktywności przeciwbakteryjnej.

Przedmiotem kolejnych badań zgłoszonych w 2015 roku do publikacji w czasopiśmie Polish Journal of Microbiology było porównanie aktywności przeciwgronkowcowej kilku pochodnych tiomocznika różniących się strukturą. Praca jest kontynuacją badań aktywności opisanych powyżej pochodnych tiomocznika zawierających układ 1,3-tiazolu, 1,2,4-triazolu oraz pochodnych dipodstawionych z ugrupowaniem 3-(trifluorometylo)fenylowym. Ponieważ wyniki poprzednich prac dowiodły, że związki te działają głównie na bakterie Gram-dodatnie, kolejne badania przeprowadziłam na szczepach gronkowców *S. aureus* i *S. epidermidis*, zarówno wzorcowych jak i izolowanych z materiałów klinicznych. Jedna pochodna, 1-(3,4-dichlorofenylo)-3-[3-trifluorometylo]fenylo]tiomocznik, była już opisana wcześniej i w badaniach wykazała bardzo silne działanie przeciwbakteryjne (wartość MIC wobec szczepów klinicznych *S. epidermidis* wynosiła 1-2 µg/ml) [6]. Pozostałe 4 struktury były nowe: 1-(1-fenyloetylo)-3-[3-trifluorometylo]fenylo]tiomocznik; 1,3-bis(4-chloro-3-nitrofenylo)tiomocznik; 1-(2,3-dichlorofenylo)-3-(1,3-tiazol-2-ilo)tiomocznik oraz 1-(4-chloro-3-nitrofenylo)-3-(1*H*-1,2,4-triazol-3-ilo)tiomocznik.

Pierwszym etapem badań było oznaczenie wartości najmniejszego stężenia hamującego (MIC) wzrost wzorcowych i klinicznych szczepów

S. aureus (MRSA) i *S. epidermidis* (MRSE). Najsilniejsze działanie wykazała pochodna dipodstawiona z ugrupowaniem 3-(trifluorometylo)fenylowym, wartości MIC, zarówno dla szczepów wzorcowych jak i izolatów klinicznych, wynosiły od 0,5 do 1 µg/ml. Także wyraźne działanie przeciwbakteryjne uzyskano w przypadku 3-bis(4-chloro-3-nitrofenylo)tiomocznika, a wartości MIC wynosiły od 2 do 8 µg/ml. Pochodna dipodstawiona z układem 3-(trifluorometylo)fenylowym, ale nie zawierająca żadnego atomu chlorowca w pierścieniu wykazała słabsze działanie przeciwbakteryjne (MIC 16-32 µg/ml). Związek z układem 1,3-tiazolu działał również słabo, wartości MIC wahały się od 32 do 64 µg/ml, a pochodna 1,2,4-triazolu wykazała najslabsze działanie (MIC 64-256 µg/ml). Dla tych związków wyznaczyłam również wartości najmniejszego stężenia bakteriobójczego (MBC) i okazało się, że jedynie najbardziej aktywny związek działał bakteriobójczo w niskim stężeniu (MBC 4-8 µg/ml). W przypadku pozostałych związków wartości MBC wynosiły 256 µg/ml i powyżej.

Ponieważ aktywność przeciwdrobnoustrojowa związku może być związana z jego genotoksycznością, dla wszystkich 5 pochodnych tiomocznika wykonałam test (*rec-assay*) na genetycznie modyfikowanych szczepach *Bacillus subtilis* (H17 - *rec*⁺ i M45 - *rec*⁻) [26]. Żaden z badanych związków nie okazał się genotoksyczny w porównaniu z kontrolą, którą był NOQ – N-tlenek nitrochinoliny.

Badania wpływu na tworzenie biofilmu przez kliniczne metycylinooporne szczepy *S. aureus* i *S. epidermidis* izolowane z krwi przeprowadziłam dla 3 pochodnych tiomocznika, różniących się strukturą. Dwa związki o silnym działaniu na komórki planktonowe gronkowców bardzo wyraźnie hamowały tworzenie biofilmu. Pochodna 1-(3,4-dichlorofenylo)-3-[3-trifluorometylo]fenylo]tiomocznika w stężeniu 1 µg/ml hamowała formowanie biofilmu przez większość szczepów w zakresie od 40 do 90%, drugi związek - 1,3-bis(4-chloro-3-nitrofenylo)tiomocznik, hamował ten proces od 30 do 50%. Działanie trzeciego badanego związku (pochodnej z układem 1,2,4-triazolu) oraz cyprofloksacyny w najwyższym zastosowanym stężeniu (16 µg/ml) w większości przypadków nie przekroczyło 40%. W trakcie badań zaobserwowano, że biofilm powstający w obecności związków aktywnych był również dużo bardziej wrażliwy na mechaniczne uszkodzenia w trakcie procesu barwienia.

Ostatnim etapem moich badań mikrobiologicznych była próba sprawdzenia mechanizmu działania najsilniej działających związków poprzez wykonanie testu hamowania aktywności bakteryjnej topoizomerazy (ang. *Decatenation assay*). W przeprowadzonych testach pochodna dipodstawiona o stwierdzonej najsilniejszej aktywności przeciwgronkowcowej hamowała aktywność topoizomerazy IV *S. aureus* w stężeniu 32 µg/ml podobnie jak związek wzorcowy – cyprofloksacyna.

Analizując uzyskane wyniki badań mikrobiologicznych zauważono po raz kolejny, że na siłę działania związku ma wpływ rodzaj podstawnika przy azocie N1 cząsteczki tiomocznika. Najsilniej działał związek z ugrupowaniem 3-trifluorometylofenylowym, słabiej ten posiadający 4-chloro-3-nitrofenyl, a jeszcze słabiej pochodne 1,3-tiazolu i 1,2,4-triazolu. Interesująca była różnica w aktywności dwóch diopodstawionych pochodnych tiomocznika z ugrupowaniem 3-trifluorometylowym różniących się podstawnikiem przy azocie N2 tiomocznika. Wprowadzenie grupy alkilowej między tiomocznik i podstawnik aromatyczny zdecydowanie zmniejszyło aktywność przeciwbakteryjną związku. Potwierdziły się również wyniki poprzednich badań, zarówno własnych jak i innych autorów, że pochodne tiomocznika zawierające atom chlorowca w podstawniku aromatycznym wykazują zdecydowanie lepszą aktywność przeciwbakteryjną niż inne pochodne [HJS3, 6, 48,52].

Uzyskane wyniki badania hamującego wpływu dipodstawionych pochodnych tiomocznika z ugrupowaniem 3-(trifluorometylo)fenylowym na gronkowcową topoizomerazę IV sugerują, że może to być jeden z prawdopodobnych mechanizmów przeciwbakteryjnego działania tych związków [6]. Jest to więc dobry kierunek modyfikacji tiomocznika w celu poszukiwania nowych, skutecznych chemioterapeutyków przeciwgronkowcowych.

Salinomycyna i jej pochodne

Dzięki nawiązaniu w 2007 roku współpracy z Wydziałem Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, w grupie badanych przeze mnie związków znalazły się jonofory karboksylowe (nazywane także antybiotykami jonoforowymi), które stanowią wiodący temat prac badawczych zespołu dr hab. Adama Huczyńskiego.

Jednym z przedstawicieli tej interesującej grupy naturalnych substancji o szerokim i zróżnicowanym spektrum aktywności biologicznej, w tym przeciwdrobnoustrojowej [24] i przeciwpierwotniakowej [46] a także przeciwnowotworowej [25,49] jest **salinomycyna**. Wytwarzana jest przez promieniowce z gatunku *Streptomyces albus* i została po raz pierwszy wyizolowana w 1974 [43]. Charakterystyczną cechą antybiotyków jonoforowych jest zdolność do kompleksowania kationów metali jedno- lub dwuwartościowych i transportowania ich przez błony biologiczne. Salinomycyna, podobnie jak kwas lasalowy czy monenzyna **należy do jonoforów typu przenośnikowego**, nazywanych także antybiotykami politerowymi. Cząsteczka takiego związku dzięki obecności na jednym końcu grupy karboksylowej a na drugim grup hydroksylowych może tworzyć strukturę pseudocykliczną, stabilizowaną przez wiązania wodorowe. Powstaje hydrofilowa wnęka, we wnętrzu której kompleksowany jest kation metalu i w takiej postaci może być transportowany przez błony lipidowe z jednego środowiska hydrofilowego do drugiego. Prowadzi to do zaburzenia pH, zmiany ciśnienia osmotycznego, zaburzenia gradientu stężeń Na^+/K^+ i w efekcie deregulacji i zahamowania kluczowych czynności życiowych komórki. Jest to podstawa aktywności biologicznej, w tym także przeciwdrobnoustrojowej czy przeciwnowotworowej związku [19,24]. Ze względu na silne działanie kokcydiostatyczne wobec pasożytów z rodzaju *Eimeria* niektóre jonofory już w latach 70-tych ubiegłego wieku znalazły zastosowanie w rolnictwie, zwłaszcza w hodowli drobiu. Obecnie na rynku dostępnych jest kilka komercyjnych preparatów kokcydiostatyków, np. Rumensin firmy Elanco zawierający monenzynę czy Kokcisan firmy Krka z salinomycyną [8].

W dostępnym piśmiennictwie zdecydowanie brakuje doniesień dotyczących aktywności przeciwbakteryjnej salinomycyny i jej nowych pochodnych. Głównym przedmiotem badań prowadzonych w różnych ośrodkach naukowych była aktywność przeciwpierwotniakowa salinomycyny, a w ostatnich latach badacze skupiają się na jej działaniu przeciwnowotworowym. Dlatego też prowadzone przeze mnie badania mają charakter pionierski i zdecydowanie poszerzają wiedzę o biologicznych właściwościach tego ciekawego antybiotyku jonoforowego i jego nowych pochodnych.

Wstępne badania mikrobiologiczne prowadzone wobec szczepów wzorcowych bakterii Gram-dodatnich Gram-ujemnych i grzybów

drożdżopodobnych z rodzaju *Candida* pokazały, że podobnie jak inne związki z tej grupy (np. kwas lasalowy i monenzyna), salinomycyna wykazuje aktywność jedynie wobec bakterii Gram-dodatnich. Wynika to z różnicy w budowie ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich. Błona zewnętrzna i lipopolisacharyd stanowią w przypadku tych pierwszych barierę dla wielu związków o dużych rozmiarach cząsteczki, takich jak antybiotyki jonoforowe. W badaniach przedstawionych w dwóch publikacjach z 2012 roku [22,25] wykazałam silne działanie przeciwgronkowcowe salinomycyny. Uzyskane wartości MIC wobec szczepów wzorcowych *S. aureus* i *S. epidermidis* wynosiły od 1 do 2 µg/ml. W badaniach tych podobne wartości MIC uzyskałam dla metycylinowrażliwych i metycylinoopornych izolatów klinicznych *S. aureus*.

Od dawna wiadomo, że jedną z najprostszycy metod uzyskania aktywnych biologicznie związków jest modyfikacja chemiczna substancji o znanej aktywności. Interesujące wyniki badań chemicznych i biologicznych nowych pochodnych monenzyny skłoniły zespół dr Adama Huczyńskiego do podjęcia prac mających na celu uzyskanie nowych pochodnych innego antybiotyku jonoforowego - salinomycyny. Efektem tego była synteza różnych **estrów**, które zostały przebadane pod kątem działania biologicznego, w tym przeciwbakteryjnego i cytotoksyczności wobec komórek nowotworowych. Bardzo interesującym obiektem badań zarówno spektroskopowych jak i mikrobiologicznych, przedstawionych w pracy opublikowanej w 2012 roku w *Journal of Molecular Structure*, okazał się zsyntetyzowany po raz pierwszy **ester benzotriazolowy salinomycyny** [22]. Przeprowadzone przeze mnie wstępne badania wobec szczepów wzorcowych bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych i drożdżaków z rodzaju *Candida*, wykazały jedynie jego działanie przeciwgronkowcowe. Podobnie jak sama salinomycyna, związek ten nie działał na grzyby i bakterie Gram-ujemne (*P. vulgaris*, *B. bronchiseptica* i różne szczepy *Escherichia coli* oraz *Pseudomonas aeruginosa*). W dalszym etapie zbadałam jego aktywność wobec klinicznych szczepów *S. aureus*, zarówno metycylinowrażliwych i metycylinoopornych, izolowanych z różnych materiałów od pacjentów szpitalnych. Działanie estru benzotriazolowego okazało się podobnie do niemodyfikowanej salinomycyny, a uzyskane wartości MIC wahały się od 1 do 4 µg/ml. Z danych piśmiennictwa wynikało, że estry hydroksybenzotriazolu w zależności od warunków (polarności rozpuszczalnika czy stanu skupienia)

mogą występować w trzech formach tautomerycznych, natomiast ester benzotriazolowy salinomycyny występuje tylko w jednej formie O-acylowej. Potwierdziły to badania krystalograficzne i spektroskopowe. Obliczenia semiempiryczne pozwoliły na wyciągnięcie wniosku, że struktura ta, zarówno w postaci krystalicznej jak i po rozpuszczeniu, jest najbardziej korzystna energetycznie (najniższa wartość energii) w porównaniu z pozostałymi dwoma *N*-tlenkowo-*N*-acylowymi izomerami. Wszystkie trzy grupy OH w cząsteczce estru benzotriazolowego są zaangażowane w tworzenie wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych (niezależnie od formy tautomerycznej), dlatego też jego struktura molekularna jest podobna do niemodyfikowanej salinomycyny. Ma to przypuszczalnie istotny wpływ na aktywność przeciwbakteryjną tego związku.

Kolejne modyfikacje cząsteczki salinomycyny zaowocowały syntezą 12 nowych estrów, które zostały poddane badaniom na aktywność przeciwdrobnoustrojową i antyproliferacyjną wobec ludzkich linii komórek nowotworowych. Wyniki tych badań opublikowano w 2012 roku w *European Journal of Medicinal Chemistry* [HJS4]. Wśród nowych pochodnych były związki zdecydowanie różniące się podstawnikami estrowymi, co pozwoliło na lepszą ocenę zależności działania od struktury związku. Były to **pochodne estrowe** zawierające: **nasycony łańcuch alkilowy** (butylowy, metylowy), **łańcuch alkilowy z grupą 2-hydroksyetylową**, **nienasycony łańcuch alkilowy**, **łańcuch alkilowy z atomami chlorowca** (2,2,2-trifluoroetylowy i 6-bromoheksylowy), **pierścień aromatyczny** (benzylowy, α -naftylometylowy, β -naftylometylowy), **polarną grupę benzylową** (*p*-nitrobenzylowy i di-*o*-nitrobenzylowy) oraz **eter koronowy**. Spośród wszystkich dwunastu przebadanych przez mnie estrów jedynie trzy pochodne wykazały wyraźne działanie wobec wzorcowych szczepów gronkowców *S. aureus* i *S. epidermidis* (wartości MIC od 1 do 64 $\mu\text{g/ml}$). Pozostałe były w zasadzie nieaktywne (MIC \geq 256 $\mu\text{g/ml}$). Tylko jedna pochodna (2,2,2-trifluoroetylowa) wykazała śladową aktywność wobec wzorcowych szczepów grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida* (*C. albicans* i *C. parapsilosis*). Zarówno salinomycyna jak i żaden ester nie działały na bakterie Gram-ujemne, których ściana komórkowa uniemożliwia przenikanie do wnętrza komórki dużych hydrofobowych cząsteczek, co było zgodne z wynikami wcześniejszych badań [21,22,23,24]. Kolejnym etapem badań było sprawdzenie, czy salinomycyna i jej trzy aktywne estrowe pochodne wykazują działanie wobec klinicznych

szczepów gronkowców. W grupie badanej znalazły się szczepy metycylinooporne *S. aureus* i *S. epidermidis* (MRSA i MRSE), izolowane z różnych materiałów od pacjentów hospitalizowanych w jednym z klinicznych szpitali w Warszawie. Izolaty te okazały się bardziej odporne na salinomycynę w porównaniu z badaniami prowadzonymi wcześniej (w tym dla szczepów metycylinowrażliwych), a uzyskane wartości MIC wynosiły od 8 do 16 µg/ml. Dla estru zawierającego nienasycony łańcuch alifatyczny w przypadku siedmiu szczepów MRSA uzyskano wartość MIC równą 32 µg/ml, dla dwóch szczepów – 64 µg/ml a dla jednego – 128 µg/ml. Izolaty MRSE były nieco bardziej odporne na ten związek, MIC mieściło się w granicach 64-256 µg/ml. Pochodna zawierająca grupę di-*o*-nitrobenzylową wykazała silniejsze działanie, wartości najmniejszego stężenia hamującego wzrost szczepów MRSA wahały się od 8 do 16 µg/ml a szczepów MRSE – od 4 do 8 µg/ml. Najbardziej aktywny okazał się ester z łańcuchem alkilowym zawierającym atomy fluoru - pochodna 2,2,2-trifluoroetylowa, dla której uzyskane wartości MIC wynosiły: 1-0,5 µg/ml w przypadku szczepów MRSA i 2-4 µg/ml dla szczepów MRSE. Pochodna ta była bardziej aktywna od niemodyfikowanej salinomycyny a także zastosowanego leku referencyjnego – cyprofloksacyny (MIC 32-64 µg/ml). Równolegle w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu przeprowadzone zostały badania aktywności antyproliferacyjnej salinomycyny i jej nowych estrów, zarówno na kilku liniach komórek nowotworowych (w tym wielolekoopornych), jak i na komórkach prawidłowych. Okazało się, że zarówno salinomycyna, jak i jej niektóre pochodne (butylowa, α -naftylometylowa i 2,2,2-trifluoroetylowa) wykazują wyraźne działanie przeciwnowotworowe.

Analiza zależności działania badanych estrowych pochodnych salinomycyny od ich budowy pozwoliła zaobserwować pewne prawidłowości. Wyraźna zmiana aktywności związku następowała przy modyfikacji podstawnika w grupie estrowej. Najsilniejsze działanie, zarówno przeciwbakteryjne jak i antyproliferacyjne wykazał ester trifluoroetylowy, był on bardziej aktywny od niemodyfikowanej salinomycyny, co prawdopodobnie jest związane z obecnością atomów chlorowca (w tym przypadku fluoru) w cząsteczce, którego wprowadzenie wpływa na poprawę jej lipofilności. Jest to zgodne z wynikami wcześniejszych badań różnych związków chemicznych, także prowadzonych przez mnie nad pochodnymi tiomocznika [HJS2, HJS3, HJS4, 6]

Kolejne modyfikacje salinomycyny polegały na otrzymaniu jej nowych **amidów**. W czasopiśmie *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* w 2012 roku opublikowana została praca opisująca syntezę i badania właściwości przeciwdrobnoustrojowych nowych ośmiu amidowych pochodnych salinomycyny [24]. Związki posiadały różne podstawniki: **nienasycony łańcuch alkilowy** (amid allilowy), **pierścień aromatyczny** (fenylamid), **eter koronowy** (amid bezo-15-korona-5), **łańcuch alkilowy** (butyloamid), **łańcuch alkilowy zawierający pierścień heterocykliczny** (3-morfolinopropylamid), **grupę alkilowo-arylową** (benzylamid), **aminę biogenną** (amid tryptaminy) oraz **łańcuch alkilowy zawierający eteryczne atomy tlenu** (3,6,9-trioksadecyloamid). Wszystkie te związki poddałam badaniom aktywności przeciwbakteryjnej wobec ziarenkowców Gram-dodatnich i pałeczek Gram-ujemnych oraz przeciwgrzybiczą wobec szczepów *Candida albicans* i *C. parapsilosis*. Tylko 2 spośród badanych amidów wykazały wyraźną aktywność przeciwgronkowcową, żaden nie działał na pałeczki Gram-ujemne z rodzajów *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Proteus* i *Bordetella* a także na drożdżaki. Najsilniejsze działanie uzyskałam w przypadku fenyloamidu salinomycyny, a wartości MIC dla szczepów wzorcowych *S. aureus* i *S. epidermidis* oraz klinicznych (w tym metycylinowrażliwych - MSSA i metycylinoopornych – MRSA) wynosiły od 2 do 4 µg/ml. Aktywność tego związku była tylko nieco mniejsza niż salinomycyny (MIC 1- 2 µg/ml) i porównywalna do działania monenzyny zastosowanej jako wzorcowy antybiotyk polieteryowy. Inna pochodna - 3-morfolinopropylamid był mniej aktywny, w tym przypadku wartości MIC wobec wszystkich użytych szczepów gronkowców wynosiły 32-64 µg/ml. Dla pozostałych badanych amidów salinomycyny wartości MIC wynosiły 256 µg/ml i powyżej.

Badania chemiczne potwierdziły, że amidy salinomycyny mają pseudocykliczną strukturę, która jest stabilizowana przez wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe, jednak najlepszą aktywność przeciwdrobnoustrojową wykazał amid zawierający w cząsteczce pierścień aromatyczny. Podstawnik benzylowy obecny w cząsteczce związku determinuje jego aktywność przeciwdrobnoustrojową ponieważ wszystkie amidy alifatyczne były nieaktywne.

W celu poszerzenia wiedzy o wpływie modyfikacji cząsteczki salinomycyny na jej aktywność i znaczeniu podstawników została zsyntetyzowana kolejna grupa pochodnych amidowych. Przedmiotem badań

chemicznych oraz aktywności przeciwdrobnoustrojowej i antyproliferacyjnej opublikowanych w *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* [HJS5] było osiem nowych amidów oraz trzy dimery salinomycyny. **Badane związki były zróżnicowane, tak by była możliwa analiza zależności aktywności biologicznej od struktury.** W grupie badanej znalazły się pochodne zawierające w cząsteczce różne podstawniki: **nienasycony łańcuch alkilowy** (propargyloaminowy), **łańcuch alkilowy z atomami tlenu** (2-(2-aminoetoksy)etanolowy), **aminy biogenne** (cysteamina, putrescyna, histamina, dopamina), **fluorowany pierścień aromatyczny** (4-fluorobenzylamina) i **eter koronowy** (2-aminoetylo-15-korona-5). Aby sprawdzić, czy dimer cząsteczki biologicznie aktywnej będzie wykazywał zwiększoną aktywność biologiczną, zsyntetyzowane zostały również trzy **dimery salinomycyny**. Są to symetryczne cząsteczki salinomycyny połączone ze sobą łącznikami o różnej długości łańcucha: 1,4-butyldiaminą; 4,4'-diaminobifenylem i *p*-fenylenodiaminą. Wszystkie związki przebadalam wstępnie na aktywność przeciwbakteryjną wobec wzorcowych szczepów gronkowców, pałeczek Gram-ujemnych oraz drożdżaków z rodzaju *Candida*. W badaniach tych okazało się, że jedynie trzy amidowe pochodne salinomycyny z łańcuchem alkilowym zawierającym atomy siarki, tlenu i azotu a także jeden z dimerów z łańcuchem 4,4'-diaminobifenylowym wykazały działanie przeciwgronkowcowe. Było ono zdecydowanie mniejsze niż niemodyfikowanej salinomycyny, a wartości MIC wynosiły od 16 do 64 µg/ml. W przypadku pozostałych związków najmniejsze stężenie hamujące było równe lub większe od 256 µg/ml. Żaden spośród badanych związków nie był aktywny wobec bakterii Gram-ujemnych i grzybów drożdżopodobnych. Aktywne amidy i dimer przebadalam również wobec klinicznych metycylinoopornych szczepów *S. epidermidis*, i w tym przypadku wartości MIC były podobne – od 32 do 64 µg/ml. Ich aktywność była niższa niż salinomycyny (MIC 8-16 µg/ml) i leku referencyjnego – cyprofloksacyny (MIC 0,125 do 16 µg/ml). W badaniach przeprowadzonych w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu wyraźną aktywność antyproliferacyjną wobec komórek nowotworowych (w tym lekoopornych) wykazały dwa amidy: zawierający dopaminę oraz podstawnik 4-fluorobenzylowy, cechowała je również niska cytotoksyczność wobec prawidłowych fibroblastów mysich. **Szczegółowa analiza strukturalna związków potwierdziła pseudocykliczną strukturę amidów, która**

w dużym stopniu decyduje o właściwościach antybiotyków jonoforowych. Badania spektroskopowe potwierdziły, że modyfikacja grupy karboksylowej salinomycyny pozwoliła na otrzymanie związków, które w przeciwieństwie do niemodyfikowanej salinomycyny, wykazały też zdolność kompleksowania jonów metali dwuwartościowych takich jak: Mg^{2+} , Ca^{2+} czy Ba^{2+} w różnych stosunkach stechiometrycznych. Badane dimery salinomycyny kompleksowały jedynie kationy jednowartościowe [HJS5].

Kolejną grupą badanych pochodnych salinomycyny były jej jednopodstawione **amidy N-benzylowe**. Szerokie badania chemiczne oraz biologiczne, w tym działania przeciwbakteryjnego, przeciwpłatkowego i antyproliferacyjnego, zostały opublikowane w 2014 roku w czasopiśmie *Molecules* [HJS6]. Dwanaście nowych związków zawierało w pierścieniu atomy **fluoru, bromu, chloru a także grupę nitrową w różnych położeniach – orto, meta i para (izomeryczne pochodne)**. Wyniki przeprowadzonych badań mikrobiologicznych potwierdziły wyraźną aktywność przeciwgronkowcową salinomycyny, chociaż metycylinooporne izolaty kliniczne *S. aureus* i *S. epidermidis* okazały się bardziej odporne w porównaniu ze szczepami wzorcowymi (MIC od 8 do 16 $\mu\text{g/ml}$). Spośród dwunastu przebadanych amidów jedynie dwa wykazały aktywność wobec badanych szczepów gronkowców, ale była ona mniejsza niż związku macierzystego. Były to amidy z podstawionym fluorem i grupą nitrową w pozycji para. Zdecydowanie silniejsze działanie wykazała fluoropochodna, dla której wartości MIC wobec badanych szczepów wahały się od 16 do 64 $\mu\text{g/ml}$ i były one porównywalne z działaniem cyprofloksacyny. Amid z grupą nitrową działał bardzo słabo (MIC 128-256 $\mu\text{g/ml}$). W przypadku pozostałych dziewięciu związków wartości MIC były równe lub powyżej 256 $\mu\text{g/ml}$. Salinomycyna oraz jej nowe N-benzylowe amidy poddane zostały również badaniom aktywności wobec prątków gruźlicy w Instytucie Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie. Okazało się, że podobnie jak w badaniach działania przeciwgronkowcowego najbardziej aktywne były pochodne zawierające w podstawniku fluor i grupę nitrową w pozycji *para* pierścienia benzylowego. Działania to było niższe niż niemodyfikowanego związku wyjściowego. Wartości najmniejszego stężenia salinomycyny hamującego wzrost szczepów *M. tuberculosis*: wzorcowego i wrażliwego na izoniazyd wynosiły 25 $\mu\text{g/ml}$, a dla szczepu opornego na izoniazyd – 50 $\mu\text{g/ml}$. W przypadku najsilniej

działających amidów wartości MIC dla badanych szczepów *M. tuberculosis* wynosiły 50 µg/ml.

W badaniach przeprowadzonych w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu najsilniejsze działanie cytotoksyczne na lekooporne komórki raka jelita grubego wykazała salinomycyna oraz jej pochodne zawierające fluor i grupę nitrową w położeniu *orto* i było ono silniejsze w porównaniu z zastosowanymi lekami – doksorubicyną i cisplatyną. Amidy te były również mniej toksyczne w stosunku do zdrowych fibroblastów mysich niż wzorcowe cytostatyki. Najmniej aktywne były pochodne z podstawnikami w pozycji *para*.

Przeprowadzona szeroka analiza chemiczna i badania spektroskopowe wszystkich opisanych pochodnych salinomycyny pozwoliły na określenie ich właściwości kompleksujących. Również w tym przypadku otrzymane jednopodstawione amidy *N*-benzylowe wykazały zdolność kompleksowania kationów, zarówno metali jedno- jak i dwuwartościowych, w przeciwieństwie do niemodyfikowanej salinomycyny, która kompleksuje tylko kationy jednowartościowe. Może to mieć również wpływ na aktywność biologiczną nowych związków. Uzyskane wyniki badań biologicznych pozwoliły na analizę zależności struktura-aktywność (SAR). Najsilniejsze przeciwbakteryjne (przeciwgronkowcowe i przeciwprątkowe) działanie wykazały amidy zawierając atom fluoru i grupę nitrową w pozycji *para*, które miały najsłabszą aktywność przeciwnowotworową. Różnice aktywności biologicznej wobec komórek bakteryjnych w porównaniu z aktywnością wobec komórek nowotworowych mogą być z jednej strony powiązane z efektem Warburga, czyli upośledzeniem czynności mitochondriów w komórkach nowotworowych, z drugiej zaś strony z odmiennym mechanizmem transportu jonów przez błony komórek eukariotycznych i prokariotycznych przez antybiotyki jonoforowe, w tym salinomycynę i jej pochodne. W piśmiennictwie opisane są trzy różne mechanizmy tego transportu: elektroobojętny (z utrzymaniem niezmiennego potencjału błonowego), transport elektrogenny (ze zmianą potencjału) oraz biomimetyczny, który ma miejsce w przypadku jonoforów ze zmodyfikowaną chemicznie grupą hydroksylową (takich jak np. amidy *N*-benzylowe) [23,25]. W kwaśnym środowisku komórek nowotworowych nie może zachodzić transport o charakterze elektroobojętym, preferowany jest mechanizm biomimetyczny. Natomiast w komórkach bakteryjnych transport jonów przez jonofory zachodzi z wykorzystaniem mechanizmu elektroobojętnego lub

elektrogenego. Potwierdzają to różnice w wynikach badań aktywności przeciwnowotworowej i przeciwbakteryjnej amidów, zarówno wobec metycylinoopornych gronkowców jak i prątków gruźlicy [HJS6].

Wyniki dotychczasowych badań nad salinomycyną skłoniły zespół dr hab. A. Huczyńskiego do zaprojektowania i syntezy zupełnie nowych dziewięciu pochodnych – **amidów trzeciorzędowych**. Zostały one przebadane w kierunku aktywności przeciwgronkowcowej a także wobec laseczki wąglika *Bacillus anthracis*, a wyniki opublikowano w Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters w 2015 roku [HJS7]. W przeanalizowanym przeze mnie piśmiennictwie nie było dotąd żadnych danych na temat wpływu antybiotyków jonoforowych na tworzenie biofilmu gronkowcowego. W swojej pracy Charlebois i wsp. [9] przedstawił wyniki badań świadczące o hamującym wpływie niektórych kokcydiostatyków (np. narazyiny, salinomycyny i monenzyny) na tworzenie biofilmu przez beztlenowe laseczki *Clostridium perfringens*. Dlatego też badania mikrobiologiczne poszerzyłam o sprawdzenie inhibicyjnych właściwości salinomycyny i jej amidów na tworzenie biofilmu przez szczepy *S. epidermidis* izolowane z krwi pacjentów szpitalnych. Także w tym przypadku struktura badanych związków różniła się podstawnikami, były to: **krótkie łańcuchy alifatyczne** (dietyloamid, dipropyloamid, dibutyloamid), **długi łańcuch alifatyczny** (dioktyloamid), **łańcuchy alifatyczne zawierające heteroatomy** (bis(2-metoksyetylo)amid, dietanoloamid), **pierścień heterocykliczny** (amid morfoliny, amid piperazyny) **i aromatyczny** (dibenzylamid). Pięć spośród przebadanych przeze mnie amidów wykazało wyraźną aktywność przeciwbakteryjną, ale zgodnie z przewidywaniami była ona skierowana jedynie na bakterie Gram-dodatnie. Najsilniejsze działanie zaobserwowałam dla amidów dietylowego i dipropyloowego, wartości MIC wobec szczepów wzorcowych *S. aureus* i *S. epidermidis* wynosiły od 1 do 4 µg/ml. Związki te działały porównywalnie do salinomycyny (1-2 µg/ml), jednak było to działanie bakteriostatyczne, ponieważ wartości najmniejszego stężenia bakteriobójczego (MBC) były bardzo wysokie - od 128 do 256 µg/ml. Amidy dietanoloowy i dibutyloowy działały nieco słabiej (MIC = 4 µg/ml, MBC = 128-256 oraz MIC = 8 µg/ml, MBC ≥ 256 µg/ml, odpowiednio). Tylko jedna aromatyczna pochodna – dibenzylamid, wykazała działanie przeciwbakteryjne, uzyskane wartości MIC wobec wzorcowych szczepów gronkowców wynosiły 8-16 µg/ml, a MBC - 128-256 µg/ml. W badaniu na klinicznych metycylinoopornych szczepach

S. epidermidis najsilniejszym działaniem odznaczał się dietanoloamid (MIC od 2 do 4 µg/ml). Nieco słabiej działały amidy dietylowy i dipropyłowy (MIC 4-8 µg/ml) oraz dibutyloamid (MIC 4-16 µg/ml) i dibenzylamid (MIC 8-32 µg/ml). W większości przypadków było to działanie silniejsze niż leku referencyjnego – cyprofloksacyny (2-64 µg/ml). Dla wszystkich związków wykonałam również badania genotoksyczności w teście *rec*-assay z zastosowaniem genetycznie modyfikowanych szczepów *Bacillus subtilis* (H17 - *rec*⁺ i M45 - *rec*⁻). Żaden z badanych związków nie okazał się genotoksyczny, co pozwala wykluczyć ten mechanizm działania przeciwbakteryjnego salinomycyny i jej pochodnych.

Ponieważ salinomycyna i jej niektóre trzeciorzędowe amidy wykazały silne działanie na komórki planktonowe gronkowców, kolejnym etapem moich badań było sprawdzenie ich wpływu na tworzenie biofilmu przez te bakterie. Związki w stężeniach 1 i 4 µg/ml wyraźnie hamowały tworzenie biofilmu zarówno przez szczepy kliniczne jak i wzorcowe *S. epidermidis*, a ilość biofilmu wytworzonego w warunkach doświadczenia była od 50 do ponad 80% mniejsza w porównaniu z kontrolą. W większości przypadków działanie to było silniejsze niż referencyjnej cyprofloksacyny. Ponadto zaobserwowałam, że w obecności salinomycyny jak i jej pochodnych amidowych nie tylko ilość biofilmu powstającego na powierzchni płytek titracyjnych jest mniejsza, ale jest on zdecydowanie bardziej wrażliwy na mechaniczne uszkodzenia i odrywanie w trakcie procesu barwienia w porównaniu z kontrolą [HJS7].

Salinomycyna i jej nowe amidy trzeciorzędowe, które wykazały wyraźne działanie przeciwbakteryjne zostały także przebadane w Wojskowy Instytucie Higieny i Epidemiologii w Puławach na aktywność wobec szczepu *Bacillus anthracis*, który jest czynnikiem etiologicznym węgliką. Równolegle przebadane zostały jako związki referencyjne inne jonofory karboksylowe – monenzyna i kwas lasalowy. Podobnie jak w przypadku badań na gronkowcach, najsilniejsze działanie przeciwwąglkowe wykazały amidy dietylowy, dipropyłowy i dietanolowy (MIC 1-4 µg/ml), nieco mniej aktywne były amidy dibenzylowy (MIC = 32 µg/ml) i dibutyłowy (MIC = 64 µg/ml).

Na podstawie analizy otrzymanych wyników badań mikrobiologicznych można wyciągnąć kilka wniosków o zależności aktywności biologicznej od struktury związku. Najsilniejsze działanie przeciwwąglkowe i przeciwwąglkowe zaobserwowano dla amidów salinomycyny zawierających krótkie łańcuchy alifatyczne. Aktywność ta zdecydowanie zmniejszała się wraz

ze zwiększaniem długości łańcucha węglowego. Także amid zawierający krótki łańcuch etylenowy z dodatkowymi grupami hydroksylowymi (dietanoloamid) wykazał wyraźne działanie na bakterie Gram-dodatnie. Tylko jeden amid z pierścieniem aromatycznym działał umiarkowanie, natomiast pochodne heterocykliczne były praktycznie nieaktywne.

Kontynuację badań nad przeciwgronkowcowymi właściwościami salinomycyny stanowi artykuł opublikowany w 2015 w Polish Journal of Microbiology [HJS8]. Przedstawione wyniki dotyczą aktywności jonoforów karboksylowych – salinomycyny i monenzyny wobec klinicznych metycylinoopornych szczepów *S. epidermidis*, izolowanych z krwi osób hospitalizowanych w jednym z warszawskich szpitali. Przeprowadziłam też badania zdolności tych związków do hamowania tworzenia biofilmu gronkowcowego. Zgodnie z oczekiwaniami salinomycyna wykazała silne działanie przeciwgronkowcowe. Wartości jej najmniejszego stężenia hamującego (MIC) wzrost komórek planktonowych badanych bakterii wahały się od 0,5 do 2 µg/ml, a wartości stężenia bakteriobójczego (MBC) wynosiły od 4 do 32 µg/ml. Monenzyna działała nieco silniej (MIC w granicach 0,5-2 µg/ml, MBC – 2-16 µg/ml). Aktywność badanych jonoforów była w większości przypadków zdecydowanie wyższa niż zastosowanego chemioterapeutyku referencyjnego – cyprofloksacyny, dla którego uzyskane wartości MIC wahały się od 0,5 do 64 µg/ml, a MBC od 4 do ponad 256 µg/ml. W przeprowadzonych przeze mnie badaniach zarówno monenzyna jak i salinomycyna wykazały wyraźną zdolność hamowania tworzenia biofilmu przez badane szczepy *S. epidermidis*. Przy zastosowanym stężeniu 4 µg/ml (czyli 2×MIC) w przypadku monenzyny dla dziewięciu spośród dwunastu szczepów redukcja ilości powstałego biofilmu wynosiła od 70 do 90%, a dla salinomycyny – od 60 do ponad 90%. Takie samo stężenie cyprofloksacyny spowodowało spadek tworzenia biofilmu o ok. 60% tylko dla pięciu izolatów klinicznych.

Ponieważ od kilku lat prowadzę badania nad pochodnymi antybiotyków jonoforowych, a salinomycyna jest związkiem o wyraźnej aktywności biologicznej, w monoautorskiej pracy opublikowanej w Postęпах Mikrobiologii w 2015 roku [HJS9] dokonałam przeglądu dostępnego piśmiennictwa na temat właściwości przeciwdrobnoustrojowych wybranych jonoforów karboksylowych. Wszystkie omówione powyżej wyniki badań pokazują jednoznacznie, że celowe jest dalsze prowadzenie prac nad modyfikacją

salinomycyny i kontynuowanie badań strukturalnych, spektroskopowych i szerokich badań biologicznych nowych jej pochodnych.

Podsumowanie

Problematyka poruszana w omawianym cyklu publikacji, a także w innych pracach, których jestem współautorem, obejmuje szeroko zakrojone badania aktywności biologicznej różnych pochodnych tiomocznika oraz naturalnego antybiotyku jonoforowego – salinomycyny. Jedną ze składowych tych badań stanowią prowadzone przeze mnie oznaczenia aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej omawianych związków, ze szczególnym uwzględnieniem aktywności przeciwgronkowcowej. Prace te mają charakter interdyscyplinarny, obejmują sprawdzenie aktywności przeciwbakteryjnej, przeciwgrzybiczej, przeciwprątkowej, przeciwwirusowej i przeciwnowotworowej i łączą kompetencje wielu zespołów badawczych z różnych jednostek naukowych.

W kilku przypadkach przebadane przeze mnie związki wykazały aktywność przeciwgronkowcową porównywalną do działania chemioterapeutyków stosowanych w leczeniu. Na podstawie wyników badań wspólnie z kilkoma zespołami Chemików z różnych ośrodków badawczych, między innymi: z Zakładu Farmakogenomiki Wydziału Farmaceutycznego i Katedry i Zakładu Biochemii I Wydziału Lekarskiego WUM, Wydziału Chemii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu oraz Politechniki Śląskiej podjęłam próbę analizy zależności aktywności przeciwdrobnoustrojowej badanych związków od ich struktury chemicznej. W większości przypadków zróżnicowana struktura chemiczna związków pozwoliła na określenie, które cechy chemiczne ligandów, (np. obecność i położenie określonych podstawników i ich hydrofobowość/hydrofilowość) mogą mieć wpływ na aktywność i w jaki sposób zmieni się ona poprzez kolejne modyfikacje cząsteczki. Na podstawie przeprowadzonych przeze mnie badań mikrobiologicznych, w tym wpływu na tworzenie biofilmu, jak również testów na hamowanie aktywności bakteryjnych topoisomeraz można przypuszczać, że modyfikacje tiomocznika to dobry kierunek poszukiwań skutecznych substancji przeciwgronkowcowych. Także wyniki prac nad aktywnością przeciwbakteryjną salinomycyny i jej nowych pochodnych zachęcają do kontynuowania badań nad związkami z grupy jonoforów karboksylowych. Zespół Chemików z Uniwersytetu Adama Mickiewicza

w Poznaniu w ramach grantu MNiSW, którego jestem współwykonawcą, prowadzi aktualnie badania nad opracowaniem biokoniugatów antybiotyków jonoforowych o szerokiej aktywności biologicznej.

Przeprowadzone badania zdolności hamowania tworzenia biofilmu gronkowcowego przez wybrane, najbardziej „obiecujące” związki z obydwu grup stanowią dopiero początek moich badań nad efektywnymi metodami walki z tym zjawiskiem. Planuję również poszerzenie warsztatu badawczego o metody mikroskopowe do oceny biofilmu bakteryjnego. Wyniki badań aktywności wybranych pochodnych tiomocznika wobec gronkowcowej topoizomerazy IV są obiecujące i z pewnością będą również przeze mnie kontynuowane.

Tylko wielokierunkowe badania nowych związków, w tym również pochodnych substancji naturalnych, pozwalają na pełną ich charakterystykę, a także dają chemikom możliwość skuteczniejszej pracy nad projektowaniem i syntezą nowych pochodnych. Współautorstwo publikacji badaczy z różnych ośrodków naukowych jest wynikiem konstruktywnego podejścia do prowadzonych badań i pozwala na szersze spojrzenie na prace nad nowymi potencjalnymi lekami.

Przeprowadzone przeze mnie oznaczenia aktywności przeciwdrobnoustrojowej bardzo dużej grupy związków chemicznych, obejmującej kilkadziesiąt nowych pochodnych tiomocznika oraz kilkadziesiąt nowych pochodnych salinomycyny, stanowią cenny wkład w poszerzenie i uaktualnienie wiedzy o molekularnych podstawach ich aktywności. Dowodzą również, że droga prowadząca do otrzymania nowego związku o aktywności biologicznej jest bardzo długa, wymaga przebadania ogromnej liczby substancji i zaangażowania wielu specjalistów z różnych dziedzin naukowych. W pracy przeglądowej dotyczącej jonoforów karboksylowych zebrałam dostępne dane dotyczące aktywności mikrobiologicznej tej interesującej grupy związków pochodzenia naturalnego. Obecnie, na podstawie wyników badań własnych oraz zebranego w trakcie przygotowywania tej dysertacji piśmiennictwa, przygotowuję również pracę przeglądową dotyczącą aktywności przeciwdrobnoustrojowej pochodnych tiomocznika.

Wyniki zarówno moich badań, jak i badań prowadzonych przez inne zespoły, opublikowane w omówionych pracach naukowych są dużą bazą przydatnych informacji o właściwościach biologicznych testowanych pochodnych, które z pewnością zostaną wykorzystane do dalszych

poszukiwań skutecznych związków o aktywności biologicznej, w tym również przeciwdrobnoustrojowej.

Badania nad pochodnymi antybiotyków jonoforowych, których wyniki zamieszczone zostały w omówionych pracach były częściowo finansowane z grantów „luventus Plus” MNiSW (0179/IP3/2011/71 i IP2012 013272), w których byłam wykonawcą. Prowadząc badania korzystałam również z aparatury Centrum Badań Przedklinicznych i Technologii (CePT) zakupionej z dotacji Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego „Innowacyjna Gospodarka” na lata 2007-2013.

Dalsze plany mojej działalności naukowej obejmują kontynuację poszukiwań, we współpracy z kilkoma grupami badawczymi, nowych związków przeciwbakteryjnych i przeciwbiofilmowych zarówno wśród substancji pochodzenia naturalnego, jak i związków syntetycznych, oraz badania mechanizmów ich działania.

Cytowane piśmiennictwo:

1. Annadurai S., Martinez R., Canney D.J., Eidem T., Dunman P.M., Abou-Gharbia M.: Design and synthesis of 2-aminothiazole based antimicrobials targeting MRSA. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2012, 24: 7719-7725.
2. Arciola C.R., Campoccia D., Gamberini S., Donati .E., Pirini V., Visai L., Speziale P., Montanaro L.: Antibiotic resistance in expolysaccharide-forming *Staphylococcus epidermidis* clinical isolated from orthopedic implant infections. *Biomaterial* 2005, 26: 6530-6535.
3. Arora V., Salunkhe M.M., Sinha N., Sinha R.K., Jain.: Synthesis and antibacterial activity of some aryloxy/thioaryloxy oxazolidinone derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2004, 14: 4647-4650.
4. Arslan H., Duran N., Borekci G., Ozer C.K., Akbay C.: Antimicrobial activity of some thiourea derivatives and heir nickel and copper complexes. *Molecules* 2009, 14: 519-527.
5. Basarab G.S., Manchester J., Bist S., Boriack-Sjodin P.A., Dangel B., Illingworth R., Sherer B.A., Sriram S., Uria-Nickelsen M., Eakin A.E.: 2013. Fragment-to-hit-to-lead discovery of a novel pyridylurea scaffold of ATP competitive dual targeting type II topoisomerase inhibiting antibacterial agents. *Journal of Medicinal Chemistry* 2013, 56:8712-8735.

6. Bielenica A., Stefańska J., Stępień K., Napiórkowska A., Augustynowicz-Kopeć E., Sanna G., Madeddu S., Boi S., Giliberti G., Wrzosek M., Struga M.: Synthesis, cytotoxicity, antimicrobial activity of thiourea derivatives incorporating 3-(trifluoromethyl)phenyl moiety. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2015, 101: 111-125.
7. Bridier A., Brandet R., Thomas V., Dubois-Brissonnet F.: Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling* 2011, 27: 1017-1032.
8. Callaway T.R., Edrington T.S., Rychlik J.L., Genovese K.J., Poole T.L., Jung Y.S., Bischoff K.M., Anderson R.C., Nisbed D.J.: Ionophores their use as ruminant growth promotants and impact on food safety. *Current Issues in Intestinal Microbiology* 2003, 4: 43-51.
9. Charlebois A., Jacques M., Archmbault M.: Biofilm formation of *Clostridium perfringens* and its exposure to low-dose antimicrobials. *Frontiers in Microbiology* 2014, 5: 183.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for Antimicrobial disk susceptibility tests; Approved Standard M07-A11. CLSI, Pennsylvania, USA 2012.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard M07-A9, CLSI, Pennsylvania, USA 2012.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute: Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; Approved guideline M26-A. CLSI, Pennsylvania, USA 1999
13. Cunha S., Macedo F.C. Jr., Costa, G.A.N., Rodrigues, M.T., Jr.; Verde, R.B.V.; de Souza Neta L.C., Vencato, I., Lariucci C., Sá F.P.: Antimicrobial activity and structural study of disubstituted thiourea derivatives. *Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly* 2007, 138: 511-516.
14. Donlan R.M., Costerton J.W.: Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* 2002, 15: 167-193.
15. Donlan R.M.: Biofilms and device-associated infections. *Emerging Infectious Diseases* 2001, 7: 277-281.
16. Dzierżanowska D: Postacie kliniczne zakażeń szpitalnych. Wyd. alfa-medica Press. Bielsko-Biała 2007: 40-62.
17. Ehmann D.M., Lahiri S.D.: Novel compounds targeting bacterial DNA topoisomerase/DNA gyrase. *Current Opinion in Pharmacology* 2014, 18: 76-83.
18. Faidallah H.M., Rostom S.A., Basaif S.A., Makki M.S., Khan K.A.: Synthesis and biological evaluation of some novel urea and thiourea derivatives of isoxazolo[4,5-d]pyridazine and structurally related thiazolo[4,5-d]pyridazine as antimicrobial agents. *Archives of Pharmacal Research* 2013, 36: 1354-1368.

19. Ferdani R., Gokel G.W.: Ionophores. in: Encyclopedia of supramolecular chemistry. red. Atwood J.L., Steed J.W. Marcel Dekker Inc. 2004, 760-766.
20. Høiby N., Bjarnsholt T., Givscov M., Molin S., Ciofu O.: Antibiotic resistance of bacterial biofilms. International Journal of Antimicrobial Agents 2010; 35: 322-332.
21. Huczyński A., Domańska A., Paluch I., Stefańska J., Brzezinski B.: Synthesis of new semi-synthetic dipodands and tripodands from naturally occurring polyether ionophores. Tetrahedron Letters 2008, 49: 5572-5575.
22. Huczyński A., Janczak J., Antoszczak M., Stefańska J., Brzezinski B.: X-ray, FT-IR, NMR and PM5 structural studies and antibacterial activity of unexpectedly stable salinomycin–benzotriazole intermediate ester. Journal of Molecular Structure 2012, 1022: 197-203.
23. Huczyński A., Janczak J., Łowicki D., Brzezinski B.: Monensin A acid complexes as a model of electrogenic transport of sodium cation. BBA-Biomembranes 2012, 1818: 2108-2119.
24. Huczyński A., Janczak J., Stefańska J., Antoszczak M., Brzezinski B.: Synthesis and antimicrobial activity of amide derivatives of polyether antibiotic - salinomycin. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2012, 22: 4697-4702.
25. Huczyński A.: Polyether ionophores – promising bioactive molecules for cancer therapy. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2012, 22: 7002-7010.
26. Kada T, K. Hirano and Y. Shirasu. 1980. *Bacillus subtilis* recassay test. In F. J. Seeres and A. Hollaender (eds.). *Chemical Mutagens* 6:149-173. Plenum Press, New York.
27. Kanehisa M., Goto S.: KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Nucleic Acids Research 2000, 28: 27-30.
28. Kang I.J., Wang L.W., Lee C.C., Lee Y.C., Chao Y.S., Hsu T.A., Chern J.H.: Design, synthesis, and anti-HCV activity of thiourea compounds. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2009, 19: 1950-1955.
29. Karaku S., Rollas S.: Synthesis and antituberculosis activity of new N-phenyl-N'-[4-(5-alkyl/arylamino-1,3,4-thiadiazole-2-yl)phenyl]thioureas. Farmaco 2002, 57: 577-581.
30. Karpiuk I., Tyski S.: Poszukiwanie nowych preparatów do terapii przeciwbakteryjnej. I. Nowe antybiotyki i chemioterapeutyki dopuszczone do obrotu. Przegląd Epidemiologiczny, 2012, 66, 567-573
31. Karpiuk I., Tyski S.: Poszukiwanie nowych preparatów do terapii przeciwbakteryjnej. II. Badania kliniczne; nowe antybiotyki β-laktamowe i inhibitory β-laktamaz. Przegląd Epidemiologiczny, 2013, 67, 135-140

32. Karpiuk I., Tyski S.: Poszukiwanie nowych preparatów do terapii przeciwbakteryjnej. III. Nowe chemioterapeutyki przeciwbakteryjne z grupy chinolonów w badaniach klinicznych. *Przegląd Epidemiologiczny*, 2013, 67, 557-561
33. Kazimierczuk Z., Chalimoniuk M., Laudy A.E., Moo-Puc R., Cedillo-Rivera R., Starosciak B.J., Chrapusta S.J.: Synthesis and antimicrobial and nitric oxide synthase inhibitory activities of novel isothiourea derivatives. *Archives of Pharmacal Research* 2010, 33: 821-830.
34. Li H.Q., Lv P.C., Yan T., Zhu H.L.: Urea derivatives as anticancer agents. *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry* 2009, 9: 471-480.
35. Li J., Tan Z., Tang S., Hewlett I., Pang R., He M., He S., Tian B., Chen K., Yang M.: Discovery of dual inhibitors targeting both HIV-1 capsid and human cyclophilin A to inhibit the assembly and uncoating of the viral capsid. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2009, 17: 3177-3188.
36. Mack D., Rohde H., Harris L.G., Davies A.P., Horstkotte M.A., Knobloch J.K.: Biofilm formation in medical device-related infection. *International Journal of Artificial Organs* 2006, 29: 343-359.
37. Maki D.G., Kluger D.M., Crinch C.J.: The risk of bloodstream infection in adults with different intravascular devices: A systematic review of 200 published prospective studies. *Mayo Clinic Proceedings* 2006, 81: 1159-1171.
38. Meng Ch., Qingsong Yu., Hongmin S.: Novel strategies for the prevention and treatment of biofilm related infections. *International Journal of Molecular Science* 2013, 14:18488-18501.
39. Mertschenk B., Beck F., Bauer W.: Thiourea and thiourea derivatives. in: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* 2002, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
40. Mishra A, Batra S.: Thiourea and guanidine derivatives as antimalarial and antimicrobial agents. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2013, 13: 2011-2025.
41. Mitani M., T. Yamanishi T., Miyazaki Y.: Salinomycin: a new monovalent cation ionophore. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1975, 66: 1231-1236.
42. Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer H.K., Ruth P., Schafer-Korting M.: *Farmakologia i Toksykologia*. MedPharm Polska, Wrocław 2012.
43. Myiazaki Y., Shibuya M., Sugawara H., Kawaguchi O., Hirsoe C.: Salinomycin, a new polyether antibiotic. *Journal of Antibiotics* 1974, 27(11): 814-821.
44. Ostrov D.A., Hernández Prada J.A, Corsino P.E, Finton K.A, Le N., Rowe T.C.: Discovery of novel DNA gyrase inhibitors by high-throughput virtual screening. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2007, 51: 3688-3698.

45. Penchovsky R., Traykovska M.: Designing drugs that overcome antibacterial resistance: where do we stand and what should we do? *Expert Opinion on Drug Discovery* 2015, 10(6): 631-650.
46. Ricketts A.P., Pfefferkorn E.R.: *Toxoplasma gondii*: susceptibility and development of resistance to anticoccidial drugs *in vitro*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1993, 37(11): 2358-2363
47. Saeed A., Abbas N., Rafique H., Rashid S., Hameed A.: Synthesis, characterization and antibacterial activity of some 1-aryl-3-aryl-thioureas. *Chemistry* 2009, 18: 152-158.
48. Saeed S., Rashid N., Jones P.G., Hussain R., Bhatti M.H.: Synthesis, spectroscopic characterization, crystal structure and antifungal activity of thiourea derivatives containing a thiazole moiety. *Central European Journal of Chemistry* 2010, 8: 550-558.
49. Schenk M., Aykut B., Teske C., Giese N.A., Weitz J., Welsch T.: Salinomycin inhibits growth of pancreatic cancer and cancer cell migration by disruption of actin stress fiber integrity. *Cancer Letters*. 2015 358(2):161-169.
50. Siwek A., Stączek P, Stefańska J.: Synthesis and structure-activity relationship studies of 4-arylthiosemicarbazides as topoisomerase IV inhibitors with Gram-positive antibacterial activity. Search for molecular basis of antibacterial activity of thiosemicarbazides. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2011, 46: 5717-5726.
51. Struga M., Rosolowski S., Kossakowski J., Stefanska J.: Synthesis and Microbiological activity of thiourea derivatives of azatricyclo[5.2.2.0^{2,6}]undec-8-ene-3,5-dione. *Archives of Pharmacal Research* 2010, 33: 47-54.
52. Suresha G.P., Suhas R., Kapfo W., Gowda D.C.: Urea/thiourea derivatives of quinazolinone-lysine conjugates: synthesis and structure-activity relationships of a new series of antimicrobials. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2011, 46: 2530-2540.
53. Tanitame A., Oyamada Y., Ofuji K., Fujimoto M., Suzuki K., Ueda T., Terauchi H., Kawasaki M., Nagai K., Wachi M., Yamagishi J.I.: Synthesis and antibacterial activity of novel and potent DNA gyrase inhibitors with azole ring. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2004,12: 5515-5524.
54. Vukovic N., Sukdolak S., Solujic S., Milosevic T.: Synthesis and antimicrobial evaluation of some novel 2-aminothiazole derivatives of 4-hydroxy-chromene-2-one. *Archiv der Pharmazie* 2008, 341: 491-496.
55. <http://www.antybiotyki.edu.pl>
56. <http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/rest/chemical/thiourea>

5. Inne osiągnięcia w działalności naukowo-badawczej

Przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych główny kierunek prowadzonych przeze mnie badań naukowych dotyczył aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej różnych związków, zarówno pochodzenia naturalnego izolowanych z materiału roślinnego, jak i syntetycznych. Zajmowałam się także badaniem środków dezynfekcyjnych, ich aktywnością przeciwdrobnoustrojową oraz mechanizmami ich działania, związanymi z aktywnym usuwaniem związków z komórki bakteryjnej (pompy efflux). Przedmiotem prowadzonych przeze mnie badań były również mechanizmy oporności gronkowców na różne środki przeciwbakteryjne oraz możliwość przenoszenia genów oporności między szczepami na drodze transdukcji. W roku 1996 uzyskałam tytuł specjalisty pierwszego stopnia z mikrobiologii.

Po uzyskaniu w 2001 roku stopnia doktora nauk farmaceutycznych kontynuowałam pracę nad badaniem mechanizmów lekooporności gronkowców oraz badaniem aktywności przeciwdrobnoustrojowej różnych związków chemicznych. W ramach współpracy z zespołem dr hab. Adama Huczyńskiego z Wydziału Chemii UAM w Poznaniu podjęłam szerokie badania nad antybiotykami jonoforowymi, początkowo była to monenzyna A i kwas lasalowy, później także salinomycyna oraz ich nowe pochodne. Wyniki wielokierunkowych badań, zarówno chemicznych jak i biologicznych, prowadzonych w kilku ośrodkach naukowych, zostały opublikowane dotychczas w 21 oryginalnych pracach w czasopiśmie znajdujących się na liście *Journal Citation Reports (JCR)* [prace HJS4-HJS8; załącznik 5, pozycje 2,4,16,18,22,25,27,28,31,32,42,43,48,52,53,54] były również prezentowane na kilku krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych [załącznik 5, pozycje 1K,3K,4K,5K,6K,16K,24K]. Za prace dotyczące przeciwdrobnoustrojowej aktywności antybiotyków jonoforowych zostałam czterokrotnie nagrodzona Nagrodami Naukowymi JM Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. W ramach współpracy z Wydziałem Chemii UAM zajmowałam się także badaniem nad ryfampicyną i josamycyną oraz ich nowymi pochodnymi a także pochodnymi gossypolu – naturalnej substancji izolowanej z bawełny. Również wyniki tych badań znalazły się w trzech pracach oryginalnych w międzynarodowych czasopiśmie naukowych [załącznik 5, pozycje 21,23,45].

W ramach trwającej od 2006 roku współpracy z naukowcami z Katedry Chemii Medycznej WUM (dr hab. Marta Struga – obecnie Zakład Farmakogenomiki Wydziału Farmaceutycznego i dr Anna Bielenica – obecnie Katedra i Zakład Biochemii I Wydziału Lekarskiego WUM) prowadzę badania różnych nowych związków organicznych, w tym heterocyklicznych pochodnych dionów oraz pochodnych tiomocznika. Współpraca ta do tej pory zaowocowała 14 wspólnymi pracami oryginalnymi, opublikowanymi w międzynarodowych czasopismach naukowych [prace HJS1-HJS3, załącznik 5, pozycje 1,5,17,35,37,44,46,50,55,56] oraz kilkoma doniesieniami na konferencje naukowe [załącznik 5, pozycje 13K,14K,15K,22K, 26K,29K,30K,31K].

Od wielu lat w zespole prof. dr hab. Moniki Wujec z Katedry i Zakładu Chemii Organicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie prowadzone są badania między innymi nad syntezą nowych pochodnych tiazolu i tiosemikarbazydu o aktywności biologicznej. W ramach nawiązanej przeze mnie w 2007 roku współpracy z tym zespołem powstało 15 oryginalnych prac opublikowanych w czasopismach z listy *JCR* [załącznik 5, poz. 6,8,10,11,13,14,15,24,26,29,30,38,40,41,47]. Cykl publikacji dotyczących molekularnych podstaw aktywności przeciwbakteryjnej grupy pochodnych hydrazydów kwasów (hetero)karboksylowych został wyróżniony w 2012 roku zespołową Nagrodą Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej. Synteza, wyniki badań enzymatycznych i mikrobiologicznych pochodnej 1-[(indol-2-yl)karbonylo]-4-(4-nitrofenylo)tiosemikarbazydu stanowią przedmiot polskiego patentu autorstwa zespołu w składzie: Siwek A, Stączek P., Paneth P., Stefańska J. (zgłoszenie nr P 390774, nr prawa wyłącznego 212639). Wyniki badań tej grupy związków były również prezentowane na kilku konferencjach o zasięgu krajowym i międzynarodowym [załącznik 5, poz. 2K,8K,9K,10K,12K,19K,20K,23K].

Od 2009 roku w ramach współpracy z Instytutem Katalizy i Fizykochemii Powierzchni PAN w Krakowie w obszarze prowadzonych przeze mnie badań znalazły się również nanocząstki metali – srebra i miedzi, których wyniki badań mikrobiologicznych były prezentowane na dwóch konferencjach naukowych [załącznik 5, poz. 17K,21K] i zostały opublikowane [załącznik 5, poz. 3,34].

Moja trwająca od początku kariery naukowej współpraca z naukowcami z Katedra Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii Wydziału

Farmaceutycznego WUM nad różnego rodzaju związkami izolowanymi z roślin leczniczych zaowocowała również kilkoma wspólnymi publikacjami [zał. poz. 7,19,60]. W bieżącym roku wspólna praca dotycząca badań metabolitów elagotanoidów została nagrodzona Nagrodą Naukową III stopnia JM Rektora WUM. W dorobku naukowym oprócz 65 prac oryginalnych posiadam również 7 prac przeglądowych, opublikowanych zarówno w czasopiśmie naukowych [praca HJS9, załącznik 5, poz. 58,62,66] jak i w Biuletynie Wydziału Farmaceutycznego WUM [załącznik 5, poz. 59,60,61]. Wykaz wszystkich jednostek naukowych z którymi obecnie współpracuję zamieściłam na str. 45.

a. Podsumowanie dorobku naukowego

Mój cały dorobek naukowy obejmuje:

- **68 prac oryginalnych** (65 po uzyskaniu stopnia doktora), w tym 63 w czasopiśmie znajdujących się na liście *Journal Citation Reports (JCR)*
- **7 prac przeglądowych** (6 po uzyskaniu stopnia doktora), w tym 1 w czasopiśmie z listy *Journal Citation Reports (JCR)*
- **41 komunikatów** prezentowanych na krajowych (36) i międzynarodowych (5) Konferencjach Naukowych (w tym 32 po uzyskaniu stopnia doktora)
- Sumaryczny **Impact Factor** wg listy *Journal Citation Reports (JCR)*, zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **119,046**; liczba punktów **MNiSW - 1560**
- Liczba **wszystkich cytowań** publikacji wg bazy Web of Science™ Core Collection z dn. 20.01.2016 r. wynosi **490** (wg bazy Scopus – 569)
- Liczba cytowań publikacji **bez autocytowań** wg bazy Web of Science™ Core Collection z dn. 20.01.2016 wynosi **367** (wg bazy Scopus – 448)
- **Indeks Hirsha (h)** wg Web of Science™ Core Collection wynosi **12** (wg bazy Scopus – 13)

Analiza bibliometryczna dorobku naukowego przygotowana przez Bibliotekę Główną Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego znajduje się w załączniku nr 7.

b. Wykaz pozostałych publikacji naukowych (nie wchodzących w skład cyklu) z opisem indywidualnego wkładu w ich autorstwo oraz komunikatów z krajowych i międzynarodowych konferencji naukowych zamieściłam w załączniku nr 5.

c. nagrody otrzymane za działalność naukową

2001 r. - Zespołowa Nagroda Naukowa JM Rektora AM w Warszawie II°

2008 r. - Zespołowa Nagroda Naukowa JM Rektora WUM III°

2009 r. - Zespołowa Nagroda Naukowa JM Rektora WUM III°

2010 r. - Zespołowa Nagroda Naukowa JM Rektora WUM II°

2011 r. - Indywidualna Nagroda Naukowa JM Rektora WUM III°

2012 r. - Zespołowa Nagroda Naukowa Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej

2013 r. - Indywidualna Nagroda Naukowa JM Rektora WUM III°

2014 r. - Nagroda JM Rektora WUM za całokształt dorobku

d. udział w projektach badawczych

lata 2008-2009 Grant badawczy WUM realizowany w Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej: Badanie biofilmu – struktury istotnej w rozwoju zakażeń bakteryjnych.

Nr projektu: FW15/W3/08

Rola: wykonawca projektu

lata 2012-2013 Grant „luventus Plus” finansowany przez MNiSW: Badania strukturalne i spektroskopowe drogą do wyjaśnienia działania antybakteryjnego antybiotyków jonoforowych i ich pochodnych.

Nr projektu: 0179/IP3/2011/71

Rola: wykonawca projektu

lata 2013-2015 Grant „luventus Plus” finansowany przez MNiSW: Synteza, badania strukturalne, aktywność przeciwbakteryjna oraz przeciwnowotworowa biokoniugatów antybiotyków jonoforowych.

Nr projektu: IP2012 013272

Rola: wykonawca projektu

6. Działalność dydaktyczna i w zakresie popularyzacji nauki

a. prowadzone zajęcia dydaktyczne

W całym okresie zatrudnienia w Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej (od 1993 r.) prowadzę zajęcia dydaktyczne z mikrobiologii dla studentów III roku Wydziału Farmaceutycznego. Od 2008 roku jestem koordynatorem tych zajęć. W latach 1993–1998 prowadziłam zajęcia dydaktyczne dla studentów V roku Wydziału Farmaceutycznego, kierunku Analityka Kliniczna, a w roku akademickim 2006/2007 zajęcia dla studiów licencjackich Oddziału Analityki Medycznej przy Wydziale Farmaceutycznym. Od 2004 do 2008 roku w ramach umowy międzyuczelnianej prowadziłam również zajęcia z mikrobiologii dla studentów Wydziału Ekologii Wyższej Szkoły Ekologii i Zarządzania w Warszawie. W bieżącym roku akademickim prowadzę zajęcia z mikrobiologii dla studentów III roku kierunku Analityka Medyczna oraz kierunku Farmacja Wydziału Farmaceutycznego WUM.

b. opieka naukowa nad studentami

W latach 1995-2015 sprawowałam bezpośrednią opiekę nad 26 zakończonymi pracami magisterskimi (w tym nagradzonymi w Wydziałowym Konkursie Prac Magisterskich) i 1 pracą licencjacką, wykonywanymi w Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej WUM. W tym czasie również opiekowałam się bezpośrednio członkami Studenckiego Koła Naukowego przy Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej WUM (1-3 osoby rocznie). W 2015 roku recenzowałam 1 pracę magisterską. W bieżącym roku akademickim jestem bezpośrednim opiekunem 1 pracy magisterskiej oraz 2 członków Koła Naukowego przy ZMF.

c. osiągnięcia dydaktyczne i w zakresie popularyzacji nauki

współautorstwo i współredakcja skryptu: Wybrane zagadnienia z mikrobiologii farmaceutycznej. Zeszyt 1: Metody mikrobiologiczne w badaniach leków i środków dezynfekcyjnych, red. B.J. Starościak, J. Stefańska. Oficyna Wydawnicza AM Warszawa 1998

współredakcja skryptu: Wybrane zagadnienia z mikrobiologii farmaceutycznej. Zeszyt 2: Promieniowce, red. B.J. Starościak, J. Stefańska. Oficyna Wydawnicza AM Warszawa 1998

współautorstwo skryptu: Mikrobiologia praktyczna. Materiały do ćwiczeń dla studentów Wydziału Farmaceutycznego i Oddziału Analityki Medycznej, red. I.E. Maciąg, B.J. Starościak. Oficyna Wydawnicza AM Warszawa 2006 (oraz wcześniejsze wydania)

współautorstwo i współredakcja skryptu: Materiały do ćwiczeń i seminariów z mikrobiologii lekarskiej dla studentów III roku Wydziału Farmaceutycznego oraz Oddziału Analityki Medycznej (cz. 1 i 2), red. J. Stefańska, B.J. Starościak. Oficyna Wydawnicza AM Warszawa 2006 (oraz wcześniejsze wydania)

współautorstwo recenzji książki: Ernest Baumler „Wielkie leki”, recenzję opublikowano w czasopiśmie Farmacja Polska, 52(24): 1198-1199 (1996)

współautorstwo haseł i zdjęć z mikrobiologii do encyklopedii opublikowanej przez Wydawnictwa Szkolne i Pedagogiczne: Encyklopedia Szkolna - Biologia, Warszawa 1999 - wyd. I, 2005 - wyd. II.

wyłoszenie wykładu pt. Poszukiwanie nowych związków o aktywności przeciwdrobnoustrojowej na II Konferencji Naukowej Wydziału Farmaceutycznego WUM, 18.12.2009

W 2009 roku przygotowywałam materiały i prezentacje oraz wspólnie z dr Bohdanem Starościakiem wykład pt. Nowe leki przeciwbakteryjne i nowe życie starych leków, w ramach dyskusji panelowych Spotkań Klubowych Farmaceutów w czasie XIII Festiwalu Nauki, 21.09.2009

Mój dorobek obejmuje również współautorstwo **patentu**: Nowa pochodna 1,4-dipodstawionego tiosemikarbazydu oraz sposób jej wytwarzania. Autorzy: Siwek A., Stączek P., Paneth P., Stefańska J. Zgłoszenie Patentowe P-390774. Biuletyn Urzędu Patentowego 2011, Nr 20(985), s. 16; nr prawa wyłącznego: Patent RP Nr PL212639(B1) – 2012-11-30; zakres terytorialny ochrony patentowej: Polska

udział w zespołach eksperckich i konkursowych

Od 2007 r. jestem członkiem Rady Pedagogicznej III roku kierunku Farmacja Wydziału Farmaceutycznego WUM.
Od 2013 r. biorę udział w Radzie Programowej - Biomedyczne i Humanistyczne Podstawy Farmacji, na Wydziale Farmaceutycznym WUM.

nagrody za działalność dydaktyczną

Za współautorstwo skryptów otrzymałam dwie nagrody dydaktyczne:

1998 r. - Zespołowa Nagroda Dydaktyczna II stopnia JM Rektora AM

2007 r. - Zespołowa Nagroda Dydaktyczna II stopnia JM Rektora AM

recenzowanie publikacji w międzynarodowych i krajowych czasopismach naukowych

Pełniłam rolę recenzenta prac zgłoszonych do publikacji w następujących czasopismach: Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy (1), European Journal of Medicinal Chemistry (1), Chinese Chemical Letters (3), Postępy Mikrobiologii (3), Forum Zakażeń (1), Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej (1).

8. Staże w zagranicznych lub krajowych ośrodkach akademickich lub naukowych

W okresie 06-31.10.2015 odbyłam staż naukowy w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie w zakresie badania specyficzności gronkowcowych białek bakteriolitycznych.

9. Szkolenia i inne

W latach 1995-1998 odbyłam kilkanaście kursów i szkoleń specjalizacyjnych w zakresie mikrobiologii klinicznej realizowanych w różnych krajowych szpitalach i ośrodkach klinicznych.

W 2015 r. odbyłam szkolenie z zakresu doskonalenia dydaktycznego w ramach projektu Q: Kultura Jakości Uczelni. Rozwój Systemu Zarządzania Jakością Kształcenia i Warszawskim Uniwersytecie Medycznym, współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach europejskiego Funduszu Społecznego.

O 2012 roku opracowuję również sylabusy z przedmiotu Mikrobiologia dla III roku kierunku Farmacja Wydziału Farmaceutycznego WUM.

W roku 2009 otrzymałam Medal za Zasługi dla Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

10. Udział w komitetach redakcyjnych i radach naukowych czasopism

Brak

11. Członkostwo w międzynarodowych i krajowych organizacjach i towarzystwach naukowych

Członek Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów

Członek Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych

Członek Sekcji Chemioterapii Polskiego Towarzystwa Lekarskiego

12. Jednostki naukowe, z którymi współpracuję w ramach prowadzonych badań

Zakład Farmakogenomiki, Katedra Biochemii i Chemii Klinicznej Wydziału Farmaceutycznego WUM

Katedra Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii Wydziału Farmaceutycznego WUM

Katedra i Zakład Biochemii I Wydziału Lekarskiego WUM

Instytut Farmaceutyczny w Warszawie

Wydział Chemii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu

Katedra i Zakład Chemii Organicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni PAN w Krakowie

Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie

