

Załącznik nr 2



Anna Maria Bielenica

Autoreferat

Katedra i Zakład Biochemii

I Wydział Lekarski

Warszawski Uniwersytet Medyczny

Warszawa 2018

1. Imię i nazwisko

Anna Maria Bielenica (nazwisko panięskie: Wojciechowska)

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

2001 r. – dyplom magistra nauk chemicznych, Uniwersytet Warszawski, Wydział Chemii, Pracownia Analizy Przepływowej i Chromatografii, tytuł pracy magisterskiej: „Zastosowanie biocujników enzymatycznych i DNA do oznaczania wybranych związków organicznych”, promotor: Prof. dr hab. Marek Trojanowicz

2009 r. – stopień doktora nauk farmaceutycznych, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Wydział Farmaceutyczny, tytuł rozprawy doktorskiej: „Synteza *N*-podstawionych pochodnych policyklicznych imidów o spodziewanym działaniu farmakologicznym”, promotor: Prof. dr hab. Jerzy Kossakowski

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

od 10.2013 – adiunkt, Katedra i Zakład Biochemii, I Wydział Lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny

09.2013 – 03.2012 – adiunkt, Katedra i Zakład Chemii Medycznej, I Wydział Lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny

02.2012 – 10.2006 – starszy wykładowca, Katedra i Zakład Chemii Medycznej, I Wydział Lekarski, Akademia Medyczna w Warszawie (obecnie Warszawski Uniwersytet Medyczny)

09.2006 – 10.2003 – wykładowca, Katedra i Zakład Chemii Medycznej, I Wydział Lekarski, Akademia Medyczna w Warszawie

09.2003 – 10.2001 – asystent, Katedra i Zakład Chemii Medycznej, I Wydział Lekarski, Akademia Medyczna w Warszawie

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.)

a) tytuł osiągnięcia naukowego

1,3-Dwupodstawione pochodne tiomocznika – modyfikacje strukturalne a bioaktywność

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

H1. 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 and antimicrobial activity of thiourea derivatives incorporating 3-(trifluoromethyl)phenyl moiety. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2015, 101, 111–125.

IF = 3.902, Punkty MNiSW = 40

H2. Bielenica A.*, Stępień K., Napiórkowska A., Augustynowicz-Kopeć E., Krukowski S., Włodarczyk M., Struga M. Synthesis and antimicrobial activity of 4-chloro-3-nitrophenylthiourea derivatives targeting bacterial type II topoisomerases. *Chemical Biology & Drug Design* 2016, 87, 905–917.

IF = 2.396, Punkty MNiSW = 25

H3. Bielenica A.*, Stępień K., Sawczenko A., Lis T., Koziół A.E., Madeddu S., Collu D., Iuliano F., Kośmider A., Struga M. Synthesis, structural studies and biological evaluation of halogen derivatives of 1,3-disubstituted thiourea. *Letters in Drug Design & Discovery* 2017, 14, 636–646.

IF = 1.170, Punkty MNiSW = 15

H4. Bielenica A.*, Kędzierska E., Koliński M., Kmiecik S., Koliński A., Fiorino F., Severino B., Magli E., Corvino A., Rossi I., Massarelli P., Koziół A.E., Sawczenko A., Struga M. 5-HT₂ receptor affinity, docking studies and pharmacological evaluation of a series of 1,3-disubstituted thiourea derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2016, 116, 173–186.

IF = 4.519, Punkty MNiSW = 40

H5. Bielenica A., Sanna G., Madeddu S., Struga M., Józwiak M., Kozioł A.E., Sawczenko A., Materek I.B., Serra A., Giliberti G. New thiourea and 1,3-thiazolidin-4-one derivatives effective on the HIV-1 virus. *Chemical Biology & Drug Design* 2017, 90, 883-891.

IF = 2.396, Punkty MNiSW = 25

H6. Bielenica A.*, Szulczyk D., Olejarz W., Madeddu S., Giliberti G., Materek I.B., Kozioł A.E., Struga M. 1*H*-Tetrazol-5-amine and 1,3-thiazolidin-4-one derivatives containing 3-(trifluoromethyl)phenyl scaffold: Synthesis, cytotoxic and anti-HIV studies. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2017, 94, 804–812.

IF = 2.759, Punkty MNiSW = 25

H7. Bielenica A.*, Drzewiecka-Antonik A., Rejmak P., Stefańska J., Koliński M., Kmieciak S., Lesyng B., Włodarczyk M., Pietrzyk P., Struga M. Synthesis, structural and antimicrobial studies of type II topoisomerase-targeted copper(II) complexes of 1,3-disubstituted thiourea ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2018, DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2018.01.005.

IF = 3.348 , Punkty MNiSW = 35

Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF) artykułów naukowych (**H1-H7**) wchodzących w skład cyklu w postępowaniu habilitacyjnym wynosi **20.49**, co odpowiada **205** punktom MNiSW.

* – prace, w których występowałam w roli autora korespondencyjnego

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

Wprowadzenie i cel naukowy prowadzonych badań

1,3-Dwupodstawiony układ tiomocznika jest strukturą o dużym potencjale aktywności wielokierunkowej. Racjonalnie zaplanowane modyfikacje struktury pochodnych tiomocznikowych pozwalają otrzymać szeroką pulę związków o wysokim działaniu

farmakologicznym oraz niskich efektach niepożądanych. Z doniesień literaturowych wynika, że wprowadzenie grupy elektronoakceptorowej (np. atomu chlorowca) w strategiczną część cząsteczki wyraźnie wpływa na jej aktywność biologiczną, powodując zwiększenie lipofilowości, a co za tym idzie - szybkości absorpcji i transportu substancji *in vivo*. Obecność silnie elektroujemnego podstawnika zmienia również właściwości sąsiednich grup funkcyjnych, co wpływa na reaktywność, stabilność metaboliczną i charakter chemiczny cząsteczki [1-3]. Wysoka stabilność z kolei zwiększa biodostępność związku, co przekłada się na jego korzystne parametry farmakokinetyczne. Z tych względów fluorowc pochodne stanowią około 20% całkowitej liczby leków dostępnych obecnie na światowym rynku [2], z czego najlepiej sprzedającymi się są działająca antybakteryjnie cyprofloksacyna i antydepresyjna fluoksetyna.

Jednym z najpoważniejszych zagrożeń dla zdrowia publicznego jest problem lekooporności, wynikający z błędnego stosowania i nadużywania klasycznych antybiotyków. Szczególnym zagrożeniem są szczepy metycyliny-opornego gronkowca skórno (MRSE) oraz tzw. patogeny alarmowe - szczepy gronkowca złocistego opornego na metycylinę (MRSA) lub glikopeptydy (VRSA, VISA), lekooporne enterokoki czy pałeczki gram ujemne, będące głównymi czynnikami etiologicznymi zakażeń wewnątrzszpitalnych. Leczenie infekcji przez nie wywołanych trwa dłużej i wymaga zwykle terapii wielolekowej, co zwiększa ryzyko wystąpienia silnych efektów ubocznych oraz zakażeń wtórnych. Dlatego poszukiwanie nowych chemioterapeutyków skutecznych nie tylko wobec mikroorganizmów planktonicznych, ale również tworzących biofilm, stanowi nieustające wyzwanie dla współczesnej chemii medycznej. Podjęto zatem udane próby wyłonienia związków o aktywności przeciwdrobnoustrojowej wśród fluorowcowanych pochodnych tiomocznika zawierających układy heterocykliczne [4-6]. Wykazano, że ta grupa związków posiada również właściwości cytotoksyczne oraz przeciwproliferacyjne [7]. Przypuszcza się także, że ugrupowanie tiomocznikowe przyłączone bezpośrednio do alifatycznego atomu węgla może być elementem strukturalnym substancji regulujących działanie ośrodkowego układu nerwowego [6]. Z kolei dwupodstawione układy tiomocznika zastosowane jako ligandy kompleksujące jony metali prowadzą do powstania potencjalnych chemioterapeutyków o profilu przeciwbakteryjnym [8] i cytotoksycznym [9].

Cyklizacja układu tiomocznika przyczynia się do usztywnienia cząsteczki i zmiany położenia wolnych par elektronowych w jej obrębie, wynikiem czego może być zwiększona bioaktywność otrzymanych związków. Można oczekiwać, że pochodne 1,3-tiazepiny, tetrazolu czy tiazolidyny zsyntetyzowane z dwupodstawionych pochodnych tiomocznika,

powinny być co najmniej tak aktywne, jak ich liniowe odpowiedniki. Dowiedziono, że cykliczne pochodne tiomocznika zawierające podstawniki z grupy fluorowców również wykazują działanie przeciwdrobnoustrojowe [10]. Znana jest także aktywność przeciwpsychotyczna pochodnych tiazepiny [11]. Z kolei w terapii wirusa HIV-1 stosowana jest pochodna benzodiazepintionu (8-chloroTIBO), zawierająca cykliczny układ tiomocznika [12]. Trudność reakcji cyklokondensacji powoduje jednak, że takie kilkuczłonowe układy heterocykliczne są rzadko badany pod kątem aktywności elementem strukturalnym, a przez to niezbyt często stosowanym w leczeniu.

Wysoka różnorodność możliwych do otrzymania pochodnych oraz szerokie spektrum potencjalnych właściwości farmakologicznych sprawiły, że w grupie halogenowanych 1,3-dwupodstawionych pochodnych tiomocznika rozpoczęłam poszukiwanie struktur chemicznych, które mogą znaleźć zastosowanie w farmakologii. Realizując założony cel, zaplanowałam i przeprowadziłam reakcje syntezy liniowych pochodnych tiomocznika, zmodyfikowałam strukturę wybranych z nich, a następnie koordynowałam wieloosrodkowe badania aktywności otrzymanych związków. Oceeniłam również wpływ zmieniających się elementów terminalnych cząsteczek na ich działanie *in vivo* i *in vitro*. Efektem poszerzonych badań miało być ponadto ustalenie mechanizmu działania najaktywniejszych nowych pochodnych. Zebrane doświadczenia miały umożliwić porównanie potencjału biologicznego obu otrzymanych form: liniowej i cyklicznej, a także liniowej wolnej i skoordynowanej z jodem miedzi (II). Przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe obejmuje cykl 7 prac opublikowanych w latach 2015-2018.

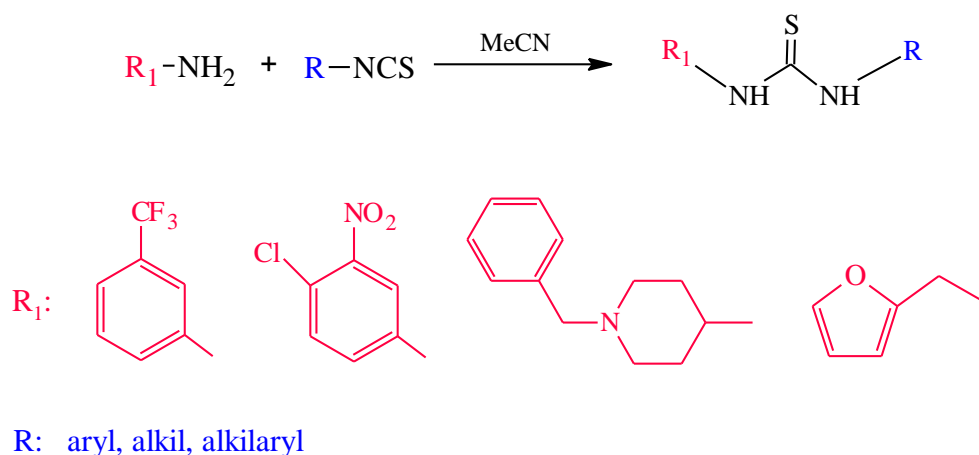
Omówienie wyników badań

Moje pierwsze prace eksperymentalne związane z poszukiwaniem substancji bioaktywnych w grupie pochodnych tiomocznika rozpoczęłam od zaprojektowania i syntezy związków zawierających układ 4*H*-1,2,4-triazolu [13]. Za słusznością tej ścieżki syntetycznej, bazującej na układach heterocyklicznych, przemawiały doświadczenia grupy badawczej, z którą związałam się po uzyskaniu stopnia doktora [6,14], a także prace innych autorów [15]. Wstępne testy farmakologiczne wykazały słabą aktywność przeciwdrobnoustrojową nowych halogenopochodnych, ale i ich wyraźny wpływ na ośrodkowy układ nerwowy myszy – silniejszy niż opisanych w tym czasie pochodnych imidowych mocznika [16] i tiomocznika [17]. Co więcej, cyklizacja ugrupowania tiomocznikowego wspomnianych układów 4*H*-1,2,4-triazolu do pierścienia tetrazolu pozwoliła na uzyskanie nowych związków silnie hamujących

wzrost bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych (dane nie publikowane). W badanej serii pochodnych największy potencjał biologiczny wykazały substancje zawierające podstawniki o charakterze elektronoakceptorowym.

Dostrzegając ogromny potencjał fluorowanych pochodnych jako związków bioaktywnych, zaplanowałam połączenie reszty 3-(trifluorometylo)fenylowej z układem tiomocznika (**H1**). Sugerowałam się przy tym parametrami fizykochemicznymi grupy trifluorometylowej, które w istotny sposób wyróżniają ją spośród innych podstawników zmniejszających gęstość elektronową w pierścieniu fenyłowym. Jej wysoki współczynnik lipofilowości przyczynia się do szybszej i bardziej równomiernej dystrybucji substancji w organizmie, a tym samym podwyższonej aktywności. Mimo, że sama ta grupa związana z pierścieniem aromatycznym jest bierna chemicznie, co znacznie wydłuża biologiczny czas półtrwania związku, jej obecność powoduje zwiększenie reaktywności sąsiednich ugrupowań, szczególnie podatności na atak odczynników nukleofilowych. Silnie ujemny efekt indukcyjny spowodowany wprowadzeniem atomów fluoru zwiększa kwasowość, co korzystnie wpływa na szereg właściwości fizycznych i chemicznych substancji, takich jak rozpuszczalność, przepuszczalność przez błony biologiczne, powinowactwo do białek [1,18]. W celu sprawdzenia, czy do wywołania odpowiedzi biologicznej niezbędna jest obecność fluorowca w obu terminalnych fragmentach cząsteczki R i R₁ (**Rys.1.**), otrzymana przez mnie seria pochodnych charakteryzowała się różnorodnością strukturalną. Do reakcji kondensacji wybrałam fenyloizotiocyaniany zawierające podstawniki zarówno zmniejszające, jak i zwiększające gęstość elektronową w pierścieniu, a także ugrupowania alkilowe, alkilo(hetero)arylowe oraz cykliczne. Na drodze wysoko wydajnej syntezy prowadzonej w łagodnych warunkach uzyskałam związki, których strukturę potwierdziłam za pomocą widm spektralnych. Kolejnym etapem prac było scharakteryzowanie w jak najszerszym stopniu profilu aktywności przeciwdrobnoustrojowej otrzymanych pochodnych. Badania te zostały wykonane we współpracy z Zakładem Mikrobiologii Farmaceutycznej WUM. Uzyskane wyniki zapoczątkowały kierunek poszukiwań w rodzinie dwupodstawionych halogenopochodnych tiomocznika substancji o wysokiej efektywności działania biologicznego, który kontynuuję do dziś. Już wstępne rezultaty badań wykazały, że ponad 60% zsyntetyzowanych związków wykazuje zdecydowaną aktywność przeciw standardowym szczepom bakterii Gram-dodatnich. Największy potencjał, porównywalny do referencyjnej cyprofloksacyny, zauważyłam w grupie *N*-arylotiomocznikowych pochodnych, zawierających fragmenty: 3-chloro-4-fluorofenyłowy, 3-bromofenyłowy, 3,4-dichlorofenyłowy i 3-fluorofenyłowy. Teoretyczny współczynnik lipofilowości CLog P wyznaczony

dla tych pochodnych przyjmował wartości optymalne, przy czym aktywność wzrastała proporcjonalnie do lipofilowości. Uzyskane dane potwierdzały słusność wcześniej postawionej hipotezy. Wysoka aktywność przeciwbakteryjna wymagała obecności nie tylko grupy trifluorometylowej z jednej strony cząsteczki, ale i słabo elektronoakceptorowych atomów chlorowca w pozycjach *meta*- i/lub *para*- terminalnego pierścienia aromatycznego. W stosunku do większości szczepów bakteryjnych, silniejszy wpływ hamujący zaobserwowano dla dihalogenopochodnych, w porównaniu do związków monochlorowcopodstawionych. W tej ostatniej grupie, większą aktywność przeciwdrobnoustrojową wykazała pochodna 3-bromofenylova niż z 3-fluorofenylova. Mogło być to spowodowane nieco odmiennym oddziaływaniem większego i bardziej polaryzowalnego atomu bromu w centrum aktywnym enzymów z grupy bakteryjnych topoisomراز. Według doniesień innych autorów dotyczących odmiennych białek enzymatycznych [2], atom bromu chętniej niż fluor angażuje się w liniowe oddziaływania C-Br...C=O (tzw. „wiązania halogenowe”), w których grupa karbonylova pochodzi z wiązań peptydowych lub łańcuchów bocznych aminokwasów. Zaobserwowałam również, że wprowadzenie atomu chlorowca w pozycję *orto*- lub obecność podstawnika elektronodonorowego w pierścieniu fenylowym obniżało aktywność przeciwbakteryjną. Wśród układów *N*-alkilotiomocznikowych, jedynie pochodne z krótkim fragmentem alkilofenylowym działały hamująco na wzrost bakterii Gram-dodatnich. Połączenie grup alicyklicznych lub alifatycznych o dużej objętości z pierścieniem benzenu przekładało się na niekorzystny wzrost hydrofobowości związku, co w rezultacie prawdopodobnie korelowało z niską absorpcją i przepuszczalnością przez błony komórkowe. Pochodne niearomatyczne z kolei, ze względu na zbyt niską lipofilowość, pozbawione były właściwości przeciwbakteryjnych. Jak dotąd, w grupie niesymetrycznych 1,3-dwupodstawionych pochodnych tiomocznika, analogów izoksyłu, znaleziono szereg substancji hamujących wzrost bakterii z rodzaju *Mycobacterium tuberculosis* [19]. W badaniach przesiewowych *in vitro* przeprowadzonych w Zakładzie Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie na zsyntetyzowanych przez mnie pochodnych nie natrafiono jednak na substancję o zadowalającej aktywności przeciwgruźliczej.



Rys. 1. Synteza 1,3-dwupodstawionych pochodnych tiomocznika (**H1-H3**).

Badania przeciwdrobnoustrojowe najbardziej aktywnych układów (trifluorometylo)fenylotiomocznikowych obejmowały także testy na trudnych z punktu widzenia terapeutycznego szczepach klinicznych – metycyliny-opornych *Staphylococcus aureus* (MRSA) i *Staphylococcus epidermidis* (MRSE), izolowanych od pacjentów szpitali klinicznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Badane pochodne wykazały znacznie większą skuteczność (128-256-krotną) względem wybranych patogenów planktonicznych niż zastosowany antybiotyk kontrolny. Bardzo obiecujący profil przeciwegronkowcowy nowych związków postanowiłam zatem uzupełnić o sprawdzenie zdolności do hamowania wytwarzania biofilmu bakteryjnego przez standardowe, a przede wszystkim kliniczne szczepy *S. epidermidis*. Do tego celu wybrałam pochodne najskuteczniejsze wobec izolatów planktonicznych: 1-(3-chloro-4-fluorofenylo)-3-[3-(trifluorometylo)fenylo]tiomocznik i 1-(3-bromofenylo)-3-[3-(trifluorometylo)fenylo]tiomocznik. Pierwsza z nich w 70% blokowała formowanie biofilmu produkowanego przez większość gronkowców szpitalnych, natomiast w 84-95% zapobiegała powstawaniu biofilmu patogenów standardowych. Aktywność inhibicyjna drugiego użytego związku, pochodnej bromofenylotiomocznika, dochodziła do 80%. Zastosowana jako wzorzec cyprofloksacyna, w tym samym stężeniu skuteczna była w 5-45%, co dowodzi wysokiego potencjału halogenowanych dwupodstawionych pochodnych tiomocznika.

Ostatnim etapem badań nad rodziną liniowych pochodnych 3-(trifluorometylo)fenylotiomocznika było - dotychczas nie prowadzone na grupie tych związków - ustalenie mechanizmu działania przeciwbakteryjnego. Zostało dowiedzione, że właściwości przeciwdrobnoustrojowe fluorochinolonów drugiej generacji (w tym najsilniej działającej

cyprofloksacyny) opierają się na inhibitowaniu gyrazy DNA oraz topoizomerazy IV. Są to enzymy z grupy bakteryjnych topoizomeraz II, modulujących superhelikalny skręt nici DNA (gyraza) oraz rozdzielanie chromosomów (topoizomeraza IV) [20]. Biorąc pod uwagę podobieństwo profilu działania do cyprofloksacyny, zaplanowałam wstępne badania wpływu dwóch wymienionych wyżej nowych związków na katalityczną aktywność topoizomerazy IV izolowanej ze szczepu *S. aureus*. Obie badane substancje były silnymi inhibitorami tego enzymu, przy stężeniach 1 µg/ml i 4 µg/ml bardziej skutecznymi niż wzorcowy chemioterapeutyk. Testy zostały przeprowadzone we współpracy z Zakładem Biochemii i Farmakogenomiki Wydziału Farmaceutycznego WUM.

Ważnym aspektem badań nad omawianą grupą fluorowanych połączeń tiomocznika było również ustalenie, czy ich potencjał przeciwegonocowy jest powiązany z cytotoksycznością. Badania przeprowadzono w ramach trwającej od wielu lat współpracy z Wydziałem Nauk Biomedycznych Uniwersytetu Cagliari w Monserrato we Włoszech. Potwierdziły one korelację obu aktywności dla dichlorowco-, 4-chlorofenylo- i 3-bromofenylopo pochodnej, rozbieżność zaś w przypadku pozostałych substancji o znaczącej aktywności przeciwbakteryjnej. Z kolei cytotoksyczne wobec komórek MT-4 *para*-podstawione *N*-arylopo pochodne, zawierające podstawniki elektronoakceptorowe (-NO₂, -I, -CN), w testach przeciwdrobnoustrojowych wykazały działanie umiarkowane lub słabe. Jednocześnie żadna z nowo otrzymanych substancji nie wykazała aktywności przeciwwirusowej, ani nie hamowała w istotnym stopniu proliferacji komórek nowotworowych. Dodatkowo prześledziłam także wpływ dwóch najskuteczniejszych farmakologicznie związków na komórki prawidłowe. Doświadczenia te przeprowadzone zostały w Zakładzie Biochemii i Farmakogenomiki Wydziału Farmaceutycznego WUM na prawidłowej, unieśmiertelnionej linii komórkowej keratynocytów człowieka (HaCaT). Należy podkreślić, że po 24-godzinnej inkubacji zaobserwowany efekt był bardzo nieznaczny – nowe związki powodowały jedynie 10%-owy spadek żywotności komórek prawidłowych. Co więcej, pochodna 3-chloro-4-fluorofenylowa wywołała apoptozę jedynie 8% komórek, natomiast 3-bromofenylowa nie zmniejszała liczby komórek żywych. Uzyskane wyniki dowodzą, że zmiana podstawnika w terminalnym pierścieniu fenylowym pochodnej 3-(trifluorometylofenylo)tiomocznika w istotny sposób wpływa na siłę działania przeciwdrobnoustrojowego oraz poziom cytotoksyczności związku. Obecność w cząsteczce dwóch atomów chlorowca (Cl, F) lub jednego (Br, F) w pozycji *meta*- pozwala uzyskać pochodne o optymalnej lipofilowości, najwyższej aktywności przeciwegonocowej, a przy tym nietoksycznych wobec komórek prawidłowych.

Kontynuację przedstawionej powyżej tematyki stanowi praca opublikowana w 2016 roku na łamach *Chemical Biology & Drug Design* (**H2**). Bazując na obserwacjach wpływu rodzaju podstawnika pierścienia aromatycznego na aktywność przeciwbakteryjną (**H1**), zaplanowałam syntezę kolejnej serii pochodnych 1,3-diaryltiomocznika, w której substratem była 4-chloro-3-nitroanilina (**Rys.1**). Tym razem skupiłam się na układach zawierających przede wszystkim podstawniki elektronoakceptorowe. Zwarta grupa badana składała się z mono- i dwupodstawionych pochodnych, w której ugrupowania pierścienia fenyłowego miały charakter słabo (chlorowce) lub silnie (-NO₂, -CN, -CF₃) dezaktywujący. Wykorzystałam również substraty, w których atom chloru znajdował się w otoczeniu słabo aktywującej grupy metylowej. Opierając się na dowiedzionej już aktywności *N*-alkilodiatiomoczników, do badań dołączałam również pochodne z tej rodziny. Wszystkie nowe związki wykazały działanie przeciwbakteryjne, z czego 86% na poziomie wysokim. W obrębie tej grupy wartości najmniejszego stężenia hamującego (MIC) dla standardowych szczepów gronkowców wynosiły od 0.5 do 4 µg/ml, co stanowi potencjał równy referencyjnej cyprofloksacynie lub 50-25% jej aktywności. Prawie wszystkie pochodne działały silnie hamująco również na wzrost metycylino-opornych szczepów *S. epidermidis*, niewrażliwych na obecność leku kontrolnego. Osiągnięte przez najbardziej efektywne substancje wartości MIC były aż 16-64 razy niższe, niż określone dla wzorcowego antybiotyku. Tylko jeden szczep szpitalny z 10 wybranych do oznaczeń wykazał się opornością w stosunku do badanych układów tiomocznikowych.

Uzyskane wyniki potwierdziły słuszność poszukiwań substancji przeciwgronkowcowych w grupie fluorowc pochodnych. Najsilniejszym inhibitorem wzrostu tych bakterii okazały się związki zawierające pierścienie 3,4-dichloro-, 3-chloro-4-metylo-, 3-chloro-4-fluoro- oraz 2-fluorofenyłu. Kolejno, stopniowy spadek bioaktywności zaobserwowano w następującym szeregu podstawników pierścienia fenyłowego: 3-(trifluorometylo) = 4-jodo > 2-bromo = 4-bromo > 2,4-dichloro = 4-cyjano > 3-bromo > 3-chloro = 4-chloro > 5-chloro-2-metylo > 4-fluoro. Umiarkowaną aktywnością cechowały się pochodne *N*-alkilodiatylowe.

Wyjątkowa budowa ściany komórkowej prątków, niespotykana u innych grup bakterii, stanowi silną barierę przepuszczalności zarówno dla związków hydrofilowych jak i lipofilowych, co w konsekwencji powoduje wysoką odporność na działanie substancji leczniczych i dezynfekcyjnych. Elementem strukturalnym obecnie stosowanych leków tuberkulostatycznych, np. izoksylu i jego analogów, jest układ tiomocznika połączony z giętkim podstawnikiem alkilodiatylowym [21]. Kierując się tym, zaplanowałam ocenę

aktywności przeciwgruźliczej *in vitro* zsyntetyzowanych pochodnych. Badania zostały wykonane wobec szczepu standardowego H₃₇Rv *M. tuberculosis* i dwóch szczepów „dzikich” izolowanych od pacjentów chorych na gruźlicę, szczepu Spec. 210, opornego na kwas *p*-aminosalicylowy (PAS), izoniazyd (INH), etambutol (ETB) i rifampicynę (RMP) oraz szczepu Spec. 192, w pełni wrażliwego na stosowane tuberkulostatyki. Nowe pochodne 1-(4-chloro-3-nitrofenylo)-3-arylotiomocznika wykazały ogólnie działanie umiarkowane lub słabe, natomiast dwa związki zawierające ugrupowanie alkiloarylowe silnie hamowały wzrost prątków wywołujących gruźlicę. W stosunku do patogennych szczepów *M. tuberculosis* H₃₇Rv, *M. tuberculosis* 210 i *M. tuberculosis* 192 właściwości inhibicyjne benzyliotiomocznikowej pochodnej były równe lub nawet wyższe niż wzorcowego izoniazydu. Z kolei potencjał cząsteczki zawierającej fragment fenyletylowy był, zależnie od rodzaju *M. tuberculosis*, taki sam jak kontrolnego leku lub równy połowie jego właściwości hamujących. Uzupełnieniem badań była ocena wpływu obu związków na przeżywalność szczepów *M. bovis* (wywołujących klasyczną postać gruźlicy) oraz atypowych prątków niepatogennych, powodujących mikobakteriozy. Bardziej hydrofobowy związek, zawierający układ fenyletyliotiomocznika okazał się co najmniej równie skuteczny wobec przeważającej większości tych drobnoustrojów, co izoniazyd. Względem szczepów atypowych jego moc hamująca była dwu- lub czterokrotnie większa niż standardowego tuberkulostatyku. Pochodna benzyliowa dwukrotnie silniej niż związek kontrolny hamowała wzrost bakterii z rodzaju *M. xenopi* i *M. intracellulare*.

Następnie w celu wykluczenia potencjalnych substancji kancerogennych, najbardziej aktywne nowe pochodne zostały poddane testowi „rec-assay”, z użyciem dwóch genetycznie modyfikowanych szczepów *Bacillus subtilis*. Żaden ze związków nie wykazał aktywności mutagennej. Dowodzi to, że właściwości przeciwbakteryjne opisywanej grupy pochodnych tiomocznika nie były efektem ich genotoksyczności.

Celem wyjaśnienia mechanizmu aktywności, zaplanowałam zbadanie hamującego wpływu najbardziej obiecujących pochodnych na działanie gyrazy i topoisomerazy IV, wyizolowanych od *S. aureus*. Zamierzałam tym samym zweryfikować założenie, że poziom aktywności przeciwoznaczycowej związku jest proporcjonalny do intensywności hamowania przynajmniej jednego z tych enzymów. W grupie badanej znalazły się zatem nie tylko substancje o najniższych wartościach MIC w stosunku do bakterii Gram-dodatnich, ale także pochodne *N*-alkiloarylowe o mniejszej bioaktywności. Jak dotąd, takie badania na zróżnicowanej grupie dwupodstawionych układów tiomocznika nie były wykonywane. Przeprowadzone analizy wykazały brak ścisłej korelacji między aktywnością względem

topoizomera z grupy II (mierzonej jako IC_{50}), a wartością MIC. Największy wpływ na działanie bakteryjnej gyrazy, wyższy niż wzorcowa cyprofloksacyna, wykazał układ 3,4-dichlorofenylotiomocznika oraz, co zaskakujące, pochodna benzyłowa, której wysoki potencjał przeciwgruźliczy i umiarkowany przeciwgronkowcowy wykazałam w przedstawionej pracy. Wiadomo, że drobnoustroje z rodzaju *M. tuberculosis*, w przeciwieństwie do większości bakterii, posiadają tylko gyrazę DNA, która jest głównym celem molekularnym tuberkulostatyków [22]. Dlatego wysoka aktywność przeciwpłatkowa pochodnej *N*-benzyłotiomocznika może wynikać właśnie z jej znaczącego powinowactwa do tego białka enzymatycznego. Profil tego związku wydaje się być zatem zbliżony do moksyflokscyny, chinolonu trzeciej generacji, inhibitora wzrostu zarówno gronkowca złocistego, jak i prątków gruźlicy. Z analizy danych wynika ponadto, że pozostałe badane substancje działają albo przez samą topoizomerazę IV, albo należą do inhibitorów enzymów obu klas, nie są jednak efektywniejsze niż kontrolny lek. Dowodzi to, że mechanizm aktywności 1,3-difenylotiomocznikowych pochodnych nie został do końca określony i dotyczyć może także odmiennego oddziaływania na procesy życiowe komórki bakteryjnej.

Badania wpływu na tworzenie oraz eradykację biofilmu przez standardowe i kliniczne metycylino-oporne szczepy *S. epidermidis* zostały przeprowadzone dla dwóch najbardziej obiecujących pochodnych. W porównaniu z cyprofloksacyną, oba związki przy stężeniach 1-8 x MIC znacząco ograniczały rozwój biofilmu produkowanego przez izolaty szpitalne. Dla jednego ze szczepów, stężenie wymagane do 40-procentowego zahamowania kolonizacji bakterii było o połowę niższe, niż dla komórek planktonicznych. Z kolei drobnoustroje wykazujące niski poziom produkcji biofilmu były wrażliwe tylko na wysokie stężenia tiomocznikowych pochodnych (4-8 x MIC). Gronkowce skórne z rodzaju ATCC 35984 okazały się najmniej podatne na obecność badanych substancji, prawdopodobnie z powodu najsilniejszej tendencji do tworzenia biofilmu. Aktywność inhibicyjna 3-chloro-4-metylofenylowej pochodnej w stosunku do szczepów standardowych była równa wzorcowemu antybiotykwowi. Z kolei stężenie tego związku blokujące powstawanie biofilmu patogenów klinicznych (wyrażone jako IC_{50}) było od 6 do 172 razy niższe od wymaganego dla leku kontrolnego. Drugi badany związek, zawierający układ 3,4-dichlorofenylu, wobec szpitalnych szczepów *S. epidermidis* był również wielokrotnie efektywniejszy niż cyprofloksacyna. Analiza aktywności związków wobec dojrzałego biofilmu wykazała skuteczność przede wszystkim dichlorowcopochodnej. Substancja ta w ilości 2-8-krotnie przewyższającej wartość MIC usuwała powstały biofilm w 40-80%. Jej moc działania

w odniesieniu do izolatów standardowych była zbliżona do substancji wzorcowej, a w stosunku do klinicznych – 37-49 razy wyższa.

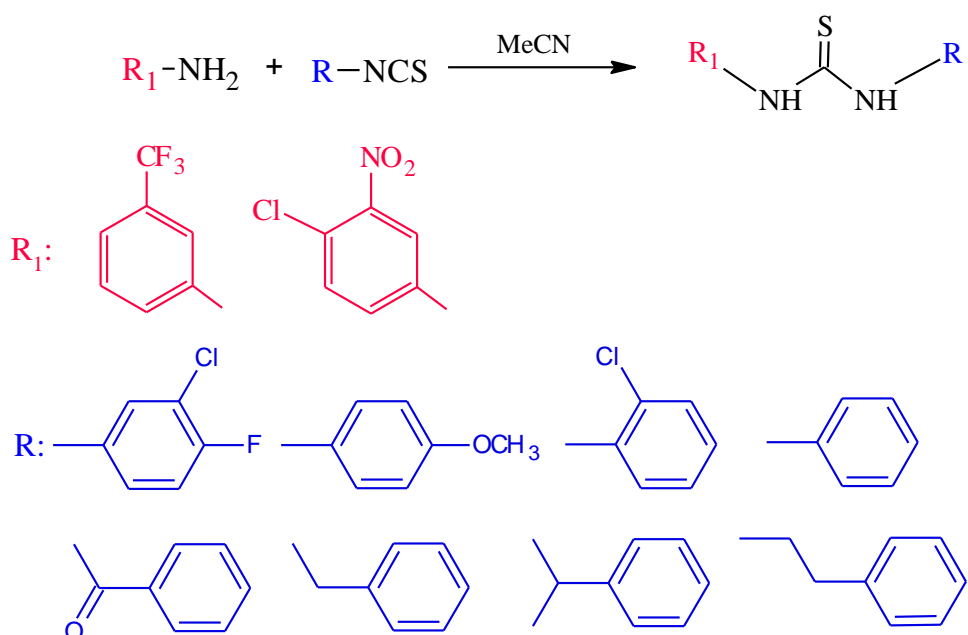
Podsumowując, najbardziej efektywną przeciwbakteryjnie grupę wśród 4-chloro-3-nitrofenyloctiamoczników stanowiły te dihalogenopochodne, w których strukturze znalazł się przynajmniej jeden atom chloru w pozycji C3 pierścienia aromatycznego. W przypadku związków jednopodstawionych, najsilniejsze działanie wykazały *orto*- i *para*- pochodne, zawierające atomy chlorowca lub grupę trifluorometylową. Istotne znaczenie w aktywności przeciwbakteryjnej związku ma zatem rozkład potencjału elektrostatycznego wokół cząsteczki – silniejszy efekt elektroujemny wywierają pochodne 1,3-difenylotiomocznika, w których w obu częściach terminalnych znajdują się podstawniki elektronoakceptorowe. Związki o właściwościach przeciwgruźliczych cechowała z kolei obecność niepodstawionego, hydrofobowego, krótkiego fragmentu alkiloarylowego.

Wysoka bioaktywność zaobserwowana w grupie dwupodstawionych układów tiomocznika (**H1**, **H2**) stała się inspiracją do dalszych badań, których wyniki opublikowałam w 2017 roku w *Letters in Drug Design & Discovery* (**H3**). Ich celem było sprawdzenie, w jaki sposób zastąpienie jednej terminalnej części fenylowej układem heterocyklicznym wpłynie na aktywność biologiczną. Prace syntetyczne zaplanowałam tak, aby wśród otrzymanych pochodnych znalazły się związki zawierające w swojej strukturze fragment furan-3-ylometylowy lub benzylopiperydynowy. Układy te połączyłam z elementem strukturalnym, którego działanie biologiczne zostało wcześniej dowiedzione – z halogenowanym ugrupowaniem aryloctiamocznika. Pozwoliło to na otrzymanie dwóch serii pochodnych tiomocznika, stanowiących zwartą, lecz różnorodną grupę badaną (**Rys.1.**).

W chemii medycznej pierścień furanowy z reguły nie jest grupą pożądaną, z uwagi na jego niestabilność metaboliczną i ryzyko generowania reaktywnych metabolitów. Dowiedziono jednak, że obecność atomów fluorowca w cząsteczce wpływa na wzrost stabilności tego układu [1]. Z drugiej strony, jak wykazała rentgenowska analiza strukturalna, wykonana we współpracy z Zakładem Krystalografii Wydziału Chemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, struktura cząsteczek zawierających układ furanylometylowy jest bardziej giętka niż pochodnych benzylopiperydynowych. Z tego względu podstawniki (alkilo)arylowe układu tiomocznikowego pochodnych furanowych mogą przyjmować zarówno konformacje *cis*, *cis*, jak i *trans*, *cis*, podczas gdy w grupie drugiej preferowane są tylko orientacje *cis*, *cis* wiązań C=S i N-H względem siebie. Wpływa to na rodzaj oddziaływań międzycząsteczkowych tworzonych przez tę część związku. W grupie nowo zsyntetyzowanych substancji jedynie trzy pochodne z ugrupowaniem benzylopiperydyny

wykazały umiarkowane działanie hamujące wzrost bakterii Gram-dodatnich. Wartości MIC względem szczepów gronkowców najbardziej aktywnej z nich - pochodnej 3,4-dichlorofenylotiomocznikowej – były na poziomie 16 µg/ml. Wybrane związki z rodziny pochodnych furylowych, zawierające podstawnik 3-chloro-4-fluorofenylowy oraz atomy chloru/fluoru w pozycji *orto*-, wykazały również słabą aktywność przeciwgrzybiczą. Wprowadzenie innych podstawników elektronoakceptorowych (grupy trifluorometylowej, atomu jodu) lub dodatkowych elektronodonorowych (grupy metylowej), powodowało utratę aktywności biologicznej. Patogeny Gram-ujemne nie wykazały wrażliwości na obecność opisywanych substancji. Analizując wyniki dodatkowych doświadczeń *in vitro*, cytotoksyczność związków tej serii określiłam jako umiarkowaną lub niską. Jedynie w grupie układów benzylopiperidynowych znalazły się dwie pochodne o wysokim potencjale cytotoksycznym wobec komórek MT-4 ($CC_{50} \approx 7 \mu\text{M}$) – 3,4-dichloroarylowa (co tłumaczyć może jej aktywność przeciwbakteryjną) oraz cząsteczka podstawiona atomem jodu w pozycji *para*- pierścienia aromatycznego. Co więcej, stężenie tych związków hamujące żywotność komórek ludzkiej ostrej białaczki limfoblastycznej typu T (CCRF-CEM) oraz typu B (CCRF-SB), a także ludzkich komórek limfoblastoidalnych B śledziony (WIL-2NS) plasowało się na tym samym poziomie. W tym stężeniu oba nowo zsyntetyzowane połączenia tiomocznika w około 15-30% hamowały także żywotność komórek nabłonkowego gruczołakoraka płuc człowieka (A549). Określony został jednocześnie wpływ związków na komórki prawidłowe HaCaT. Zaobserwowano, że po 24-godzinnej inkubacji żywotność tych komórek spadła o 30%, co według standardów ISO 10993-5 wskazuje na słabą aktywność cytotoksyczną substancji [23]. Badane pochodne użyte w wyższych stężeniach (14-21 µM) zwiększały śmiertelność zarówno komórek nowotworowych A549, jak i zdrowych, przy czym w przypadku linii A549 zanotowano zwiększony poziom proliferacji komórek.

Uzyskane wyniki dowodzą, że fluorowane pochodne tiomocznika o końcowych ugrupowaniach heterocyklicznych znacząco wpływają na żywotność, przeżywalność oraz wzrost komórek rakowych i prawidłowych. Związki nie wykazują jednak oczekiwanego działania przeciwbakteryjnego - wymaga ono obecności podstawionych układów aromatycznych z obu stron ugrupowania tiomocznikowego. Warto jednak nadmienić, że dalsze, nieopublikowane jeszcze modyfikacje strukturalne chlorowcopochodnych furanylometylowych – cyklizacja do układu tetrazolu – zaowocowały serią wysoko aktywnych inhibitorów bakteryjnych topoisomeras.



Rys.2. Synteza tiomocznikowych pochodnych 3-(trifluorometylo)aniliny oraz 4-chloro-3-nitroaniliny (**H4**).

Zróznicowane oddziaływanie pochodnych (tio)mocznika na ośrodkowy układ nerwowy gryzoni zostało dowiedzione w ostatnich latach [6,24,25], również w ramach pracy własnej [13]. Opisano ugrupowania *N*-arylotiomocznika, które podobnie jak atypowe opioidowe leki przeciwbólowe i substancje przeciwpsychotyczne, hamują reakcję „potrzęsania głową” u myszy (*head twitch responses*, HTR), wywołaną podaniem L-5-hydroksytryptofanu (L-5-HTP), co odpowiada zwierzęcemu modelowi aktywacji receptora 5-HT_{2A} [26]. W rodzinie ligandów (tio)mocznikowych znaleziono zarówno odwrotnych i częściowych agonistów tego receptora, jak też substancje o działaniu antagonistycznym. Stwierdzono również, że pochodne alkilofenylo(tio)mocznika posiadają właściwości przeciwdrgawkowe oraz uspokajające [24]. Mając zatem na uwadze silny wpływ, jaki mogą wykazywać 1,3-dwupodstawione pochodne tiomocznika na układ nerwowy [6,13,16], dziesięć zsyntetyzowanych przez siebie substancji przekazałam na badania powinowactwa do receptorów serotoninowych typu 5-HT₂ (**Rys.2.**). Wykonano je we współpracy z Wydziałem Farmacji Uniwersytetu Neapolitańskiego im. Fryderyka II w Neapolu we Włoszech. Rodzaj podstawników atomu azotu ugrupowania tiomocznikowego związków grupy badanej wybrałam kierując się ich możliwym wpływem na aktywność farmakologiczną. Znalazły się w tej grupie zarówno *N*-arylo-, jak i *N*-alkilarylotiomocznikowe pochodne 3-(trifluorometylo)aniliny [**H1**] oraz 4-chloro-3-nitroaniliny [**H2**]. Do rodziny arylotiomoczników

włączyłam te pochodne, których układy terminalne zawierały podstawniki elektronoakceptorowe i elektrondonorowe. Reprezentantami układów alkiloarylowych były z kolei związki zawierające fragment fenyloetylowy lub benzylowy. Doświadczeniom zostały poddane także pochodne z niepodstawionymi ugrupowaniami końcowymi (fenylowym, benzoilowym). W rezultacie otrzymałam obszerną i zróżnicowaną serię porównawczą.

Wyniki badań powinowactwa tych związków do receptorów 5-HT_{2A} i 5-HT_{2C} stały się podstawą materiału opublikowanego w 2016 roku w czasopiśmie *European Journal of Medicinal Chemistry* (**H4**). Dwie pochodne 3-(trifluorometylo)fenyloxiomocznika wiązały się z receptorem 5-HT_{2A} w stężeniach subnanomolarnych, niższych niż kontrolnie użyta ketanseryna. Wartość stałej inhibicji K_i pochodnej 3-chloro-4-fluorofenylowej wynosiła 0.043 nM, natomiast benzylowej osiągnęła wartość 0.60 nM. Co ważniejsze, związki charakteryzowały się również selektywnością – nie stwierdzono powinowactwa do receptorów 5-HT_{2C}. Chociaż testowana grupa była strukturalnie różnorodna, aktywne biologicznie związki stanowiły tylko te pochodne tiomocznika, które zawierały w pierścieniu ugrupowanie CF₃. Optymalna równowaga między lipofilowością a powinowactwem do receptora dla najaktywniejszych pochodnych została następnie potwierdzona drogą dokowania molekularnego. Było ono możliwe dzięki współpracy nawiązanej z Wydziałem Chemii Uniwersytetu Warszawskiego oraz Instytutem Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie. Wykorzystany model receptora 5-HT_{2A} został opracowany na podstawie modelowania homologicznego do struktury białkowej receptora β₂-adrenergicznego [27]. Analiza wyników dowiodła, że ligandy tiomocznikowe mogą zajmować dwa różne regiony w miejscu wiążącym receptora serotoninowego. Związki pierwszej grupy lokowały się w górnej części kieszeni wiążącej – należały do nich pochodne, które w testach *in vitro* nie wykazały powinowactwa do receptora 5-HT_{2A}. Łączyły się one za pomocą wiązań wodorowych z resztami aminokwasowymi pętli zewnątrzkomórkowej (ECL) białka receptorowego, głównie Trp141 (ECL I) i Cys227 (ECL II), a także tworzyły oddziaływania typu π-π z Trp151. Wyznaczone przez mnie wartości ClogP wskazują ponadto, że takie nieaktywne pochodne tiomocznika charakteryzowały się najwyższą hydrofilowością, co uniemożliwiać może przekroczenie bariery krew-mózg. Z kolei dwie substancje silnie wiążące się z receptorem 5-HT_{2A}, a także ich bliskie analogi - 1-(2-chlorofenylo)-3-[3-(trifluorometylo)fenylo]tiomocznik i S-1-(4-chloro-3-nitrofenylo)-3-(1-fenyloetylo)tiomocznik, głębiej penetrowały wewnątrz miejsca docelowego, zatrzymując się w jego niższej części. Stabilizację aktywnego ligandu zapewniały tu przede wszystkim wiązania wodorowe z resztą Asp155 oraz Tyr370, jak również oddziaływania typu π-π utworzone

z Phe339. Co więcej, obliczenia wskazują, że konformacja pochodnej benzylovej przyjmowana w kieszeni receptora 5-HT_{2A} była jedną z najniższych energetycznie w całej badanej serii. Na bazie uzyskanych danych eksperymentalnych opracowany został następnie trójpunktowy model farmakoforowy receptora 5-HT_{2A}. Złożony z dwóch miejsc aromatycznych oraz jednego miejsca donora wiązania wodorowego, wymagał odległości 4.3-4.9 Å między grupą NH ugrupowania tiomocznikowego, a centrami aromatycznymi. Schemat ten jest zgodny z modelami antagonistów tego receptora zaproponowanymi przez innych autorów [28]. Różnice w odległości między kluczowymi punktami modelu - w porównaniu z ustaleniami Mokrosza [29] lub Klabunde i Eversa [30], podanych dla pochodnych arylopiperazynylowych, wynikają z odmiennej struktury chemicznej badanych ligandów. Podsumowując, obliczenia teoretyczne potwierdzają kluczową rolę obu podstawników układu tiomocznikowego. Aktywny ligand receptora 5-HT_{2A} powinien posiadać terminalny układ 3-(trifluorometylo)fenylu, a z drugiej strony – ugrupowanie (di)chlorowcoarylowe lub benzylove. Modelowanie molekularne pozwala przewidzieć, że zmiana podstawnika na elektronodonorowy (*p*-metoksy) lub wydłużenie łącznika alkilowego spowoduje znaczący spadek aktywności. Z kolei grupę wykazującą słabe powinowactwo do receptora stanowiły pochodne 4-chloro-3-nitroaniliny. W strukturze tych związków obecność niepodstawionego układu aromatycznego (fenylovego, benzylovego, benzoilowego) skutkowała całkowitą utratą działania biologicznego. Należy podkreślić, że dokowanie ligand tiomocznikowy - receptor 5-HT_{2A} zostało przeprowadzone i opisane po raz pierwszy, przy czym wyniki badań *in vitro* i *in silico* bardzo dobrze ze sobą korelowały.

Analizując powyższe dane eksperymentalne, 7 pochodnych wyselekcjonowałam na badania aktywności na ośrodkowy układ nerwowy, które przeprowadzono w Katedrze i Zakładzie Farmakologii z Farmakodynamiką Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Przebadane zostały substancje o wysokim powinowactwie do receptora 5-HT_{2A}, jak również ligandy preferujące korzystną lokalizację w centrum aktywnym oraz ich bliskie analogi strukturalne. Wstępne badania behawioralne wykazały, że nowe pochodne nie zaburzają koordynacji ruchowej oraz nie powodują zwiotczenia mięśni zwierząt doświadczalnych. W celu dokładnego wyznaczenia profilu powinowactwa do receptora 5-HT_{2A}, zaplanowałam badanie wpływu tych związków na aktywację neuronów serotoninowych. Zmniejszenie epizodów „potrzęsania głową” u myszy (HTR), indukowanych podaniem 5-HTP [26], wskazało na antagonistyczny względem receptorów 5-HT_{2A} profil wszystkich testowanych substancji. Cztery z nich, podane w dawce równej 0.1ED₅₀, zmniejszały w sposób istotny statystycznie zjawiska „head twitch” o 70.5-89%. W tej grupie najwyższą wartość osiągnął

1-(4-chloro-3-nitrofenylo)-3-(1-feniloetylo)tiomocznik, któremu przypisano głębszą, korzystną energetycznie pozycję w kieszeni wiążącej. Z uwagi na fakt, że doświadczenie przeprowadzone w obecności 5-HTP jest testem niespecyficznym, ponieważ także ligandy receptorów adrenergicznych mogą zaburzać wspomniane epizody, dla dwóch najaktywniejszych *in vitro* pochodnych przeprowadzono analogiczne badanie z wykorzystaniem 2,5-dimetoksy-4-jodoamfetaminy (DOI) [31]. Wiadomo, że działanie tego agonisty receptora 5-HT_{2A} jest znoszone głównie przez jego selektywnych antagonistów [31]. Wykonany test behawioralny jednoznacznie potwierdził antagonistyczny, zależny od dawki, profil obu substancji. Działanie hamujące pochodnej benzylowej było wyższe niż 3-chloro-4-fluorofenylotiomocznikowej – zjawiska „potrzęsania głową” uległy zmniejszeniu o 72% i 69%, przy dawce substancji wynoszącej odpowiednio 0.1ED₅₀ lub 0.05ED₅₀. Wynik ten jest zgodny z przewidzianym na drodze dokowania silniejszym sposobem wiązania pochodnej alkilowej w miejscu aktywnym receptora. Chociaż stała inhibicji K_i substancji zawierającej układ 3-chloro-4-fluorofenylo jest kilkanaście razy wyższa niż tej z ugrupowaniem benzylowym, a także dla wzorcowej ketanseryny, jej biodostępność wydaje się być niższa, co tłumaczyłoby słabszy efekt hamujący epizody HT w teście *in vivo* z podaniem DOI. Badania na zwierzętach wykazały ponadto, że niemal wszystkie pochodne 3-(trifluorofenylo)-tiomocznika w ilości odpowiadającej 0.1ED₅₀ hamują hiperaktywność zwierząt wywołaną dootrzewnowym podaniem amfetaminy – dla najbardziej skutecznych związków o 42-47%. Pozwala to przypuszczać, że w mechanizm działania tych substancji zaangażowany jest układ monoaminergiczny w mózgu. Z kolei podstawowa aktywność motoryczna myszy hamowana była w stopniu znaczącym tylko przez pochodną 2-chlorofenylotiomocznikową. Siedem badanych pochodnych wykazało działanie antynocyceptywne w „teście przeciągania”, istotne statystycznie zarówno w dawce równej 0.1ED₅₀ (wszystkie pochodne), jak i 0.05ED₅₀ (cztery substancje). W celu ustalenia korelacji między wspomnianym efektem przeciwbólowym a układem opioidalnym, test ten został wykonany w obecności naloksonu, nieselektywnego antagonisty receptorów opioidowych. Nie wpływał on na efekt wywoływany przez badane substancje, niezależnie od ich dawki, co sugeruje brak powiązania aktywności związków z endogennym układem opioidowym. Uwzględniając możliwy przeciwdrgawkowy kierunek aktywności nowych substancji, ich działanie zmierzono w teście drgawek wywołanych podaniem pentetrazolu. Spodziewany efekt zaobserwowano dla trzech układów *N*-alkilofenylotiomocznika o znacznej lipofilowości, co potwierdza ustalenia innych autorów [24]. Pochodna 3-(trifluorometylo)fenylotiomocznika podstawiona układem 2-feniloetylowym, podana w dawce odpowiadającej 0.1ED₅₀, w 47% zmniejszała ilość drgawek tonicznych,

natomiast pochodna benzyłowa chroniła gryzonie zarówno przed drgawkami klonicznymi (w 40%), jak i tonicznymi (w 47%). Jednocześnie wspomniane połączenia tiomocznika, w znaczącym stopniu w porównaniu z próbą kontrolną, obniżały ryzyko śmierci zwierząt. Podobnym profilem aktywności wykazał się 1-benzylo-3-(4-chloro-3-nitrofenylo)tiomocznik, który w 50-43% redukował ilość epizodów padaczkowych oraz śmiertelność myszy. Znane jest powiązanie układu serotonergicznego z regulacją temperatury ciała w podwzgórzu [32] – agoniści receptorów 5-HT₂ i antagoniści 5-HT_{1A} wywołują hipertermię, podczas gdy hipotermia może być związana z blokującym wpływem związku na receptory 5-HT₂ oraz pobudzającym na 5-HT_{1A} [33]. Pochodna 3-chloro-4-fluorofenyłowa podwyższała temperaturę ciała myszy od 30 do 180 minuty doświadczenia, a obecność w cząsteczce układu 4-metoksyfenyłu zwiększała ją w 30, 60 i 90 minucie. Z kolei obie pochodne *N*-alkilofenylo-3-(4-chloro-3-nitrofenylo)tiomocznika w sposób istotny statystycznie obniżały temperaturę ciała zwierząt. Dowodzi to, że działanie związków przebiega na drodze stymulacji receptorów serotonergicznym.

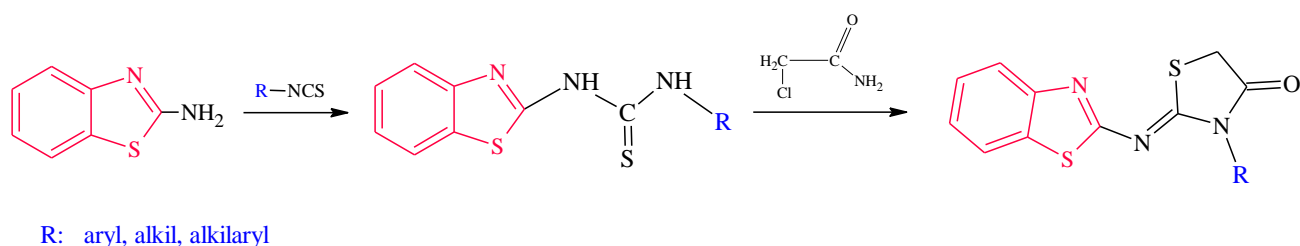
Wyniki modelowania molekularnego, powinowactwa do białek receptorowych i badań na zwierzętach przeprowadzone dla 1,3-dwupodstawionych pochodnych tiomocznika wykazały zgodność, i dowiodły wyraźnego wpływu tych związków na ośrodkowy układ nerwowy. Eksperymentalnie udowodnione zostało powinowactwo do receptora 5-HT_{1A}, a także powiązanie aktywności substancji z układem katecholaminy czy endogennym układem opioidowym. Działanie pochodnych zawierających ugrupowanie 3-trifluorometylofenyłowe było szersze niż 4-chloro-3-nitrofenylo-3-tiomocznikowych, przy czym najwyższy potencjał farmakologiczny zaobserwowałam dla pochodnych *N*-alkiloarylowych.

Potwierdzeniem istotnej roli, jaką w uzyskiwaniu zróżnicowanego efektu biologicznego odgrywa struktura podstawnika w pozycjach 1 i 3 ugrupowania tiomocznika, były wyniki badań aktywności pochodnych benzotiazolowych zawarte w artykule **H5**, która była kolejnym efektem współpracy z Wydziałem Nauk Biomedycznych Uniwersytetu Cagliari w Monserrato we Włoszech. Według danych literaturowych, zastąpienie podstawionego pierścienia fenyłowego większym układem heteroaromatycznym, przy jednoczesnym zwiększeniu giętkości drugiej grupy terminalnej, może zmienić profil aktywności pochodnej tiomocznikowej na przeciwwirusowy, w tym hamujący rozwój wirusa HIV [34]. Obecnie podstawę wielolekowej, wysoce aktywnej terapii antyretrowirusowej stanowią nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy (ang. *nucleoside reverse transcriptase inhibitors* – *NRTIs*), połączone z lekiem z grupy nienukleozydowych inhibitorów odwrotnej transkryptazy (ang. *non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors* –

NNRTIs), inhibitorów proteazy (ang. protease inhibitors – PIs) lub inhibitorów integrazy (ang. *integrase inhibitors* – INSTIs). Równoczesna terapia co najmniej trzema lekami antyretrowirusowymi zmniejsza bowiem ryzyko powstania mutacji odpornej na wszystkie jednocześnie stosowane chemioterapeutyki. W piśmiennictwie z zakresu chemii medycznej można odnaleźć wiele przykładów pochodnych 1-(tiazol-2-yl)tiomocznika, fenetylotiazolotiomocznika (PETT) i fenyloetylotiomocznika o udokumentowanej aktywności przeciw wirusowi HIV [35], których profil działania opiera się na hamowaniu odwrotnej transkryptazy (grupa NNRTI). Poszukując związków o takich właściwościach, w pierwszym etapie prac syntetycznych uzyskałam różnorodną grupę zawierającą układ 1-(1,3-benzotiazol-2-yl)-3-tiomocznika (**Rys.3.**). Terminalne podstawniki atomu N3 miały charakter aryłowy, alicykliczny, alkilowy oraz alkiloaryłowy, charakteryzowały się zatem różną objętością i lipofilowością, a także w odmienny sposób wpływały na giętkość całej cząsteczki. Dla trzech pochodnych wykonana została rentgenowska analiza strukturalna monokryształów. Pozwoliła ona na ustalenie, że konformacja przyjęta przez badane pochodne benzotiazolu jest stabilizowana przez wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe N-H...N fragmentów tiomocznika i pierścienia. Ekspozuje to oba atomy siarki i atom N1-H układu tiomocznika do oddziaływań międzycząsteczkowych, np. z białkiem receptorowym. Aktywność biologiczna tiomocznikowych pochodnych 2-aminobenzotiazolu była ściśle powiązana z rodzajem podstawnika terminalnego. Znaczącą cytotoksyczność wobec komórek MT-4 ($CC_{50} < 10 \mu\text{M}$) zaobserwowałam w grupie aryłowych pochodnych zawierających podstawniki elektronoakceptorowe (4-cyjano-, 4-jodo-, 2-bromo, 3-(trifluoro)-metylo) lub słabo elektronodonorowe (grupy alkilowe). Wprowadzenie do pierścienia fenyłowego atomów elektroujemnych (fluor, chlor) lub grup silnie elektronodonorowych, a także bezpośrednie połączenie układu tiomocznika z fragmentem alkilowym lub alicyklicznym zmniejszało aktywność cytotoksyczną związku. Równoległe z badaniem cytotoksyczności przeprowadzone zostały testy sprawdzające aktywność przeciw dzikiemu szczepowi wirusa HIV-1. Wyraźne działanie ($EC_{50}=1 \mu\text{M}$) wykazał 1-(1,3-benzotiazol-2-yl)-3-(1-fenyloetylo)-tiomocznik, co związane było z obecnością łańcucha alkilofenyłowego, zapewniającego wymaganą giętkość strukturalną. Jednocześnie związek ten charakteryzował się umiarkowaną cytotoksycznością, zbliżoną do leków kontrolnych, efawirenu i azydodymidyny. Następnie sprawdzono skuteczność nowej pochodnej względem kilku mutacji wirusa HIV, opornych na stosowane obecnie leki antyretrowirusowe. Jej działanie wobec odmian opornych na azydodymidynę (AZT) oraz względem szczepu wielolekoopornego (MDR) okazało się porównywalne z aktywnością na szczep dziki, z kolei

mniejszą efektywność wykazała wobec mutacji wirusa opornych na leki z grupy NNRTI. Wyniki te zasugerowały, że mechanizm działania pochodnej tiomocznikowej związany jest z jej inhibicyjnym wpływem na odwrotną transkryptazę retrowirusa. Przeprowadzony enzymatyczny test immunologiczny potwierdził tę hipotezę – zaobserwowany poziom inhibicji wynosił od 60% (przy 10 μM stężeniu związku) do 85% (50 μM).

Nowe pochodne benzotiazolu o znaczącej cytotoksyczności względem MT-4 zostały dodatkowo przebadane w kierunku aktywności przeciw wybranym wirusom RNA (z rodzin *Flaviviridae*, *Picornaviridae*, *Paramyxoviridae* i *Rhabdoviridae*) i DNA (*Poxviridae*, *Herpesviridae*), a także przeciwko szczepom bakteryjnym i grzybiczym. Żadna z testowanych pochodnych nie była aktywna wobec tych drobnoustrojów. Z kolei działanie przeciwproliferacyjne tych związków wobec nowotworów hematologicznych i guzów litych plasowało się na poziomie porównywalnym z cytotoksycznością względem komórek MT-4. Aktywność cytostatyczną najbardziej obiecującej pochodnej - 1-(1,3-benzotiazol-2-yl)-3-(2-bromofenyl)tiomocznika, wobec większości linii komórkowych zaobserwowano w stężeniu niższym niż 3 μM .



Rys.3. Synteza tiomocznikowych i cyklicznych pochodnych 1,3-benzotiazolo-2-aminy (**H5**).

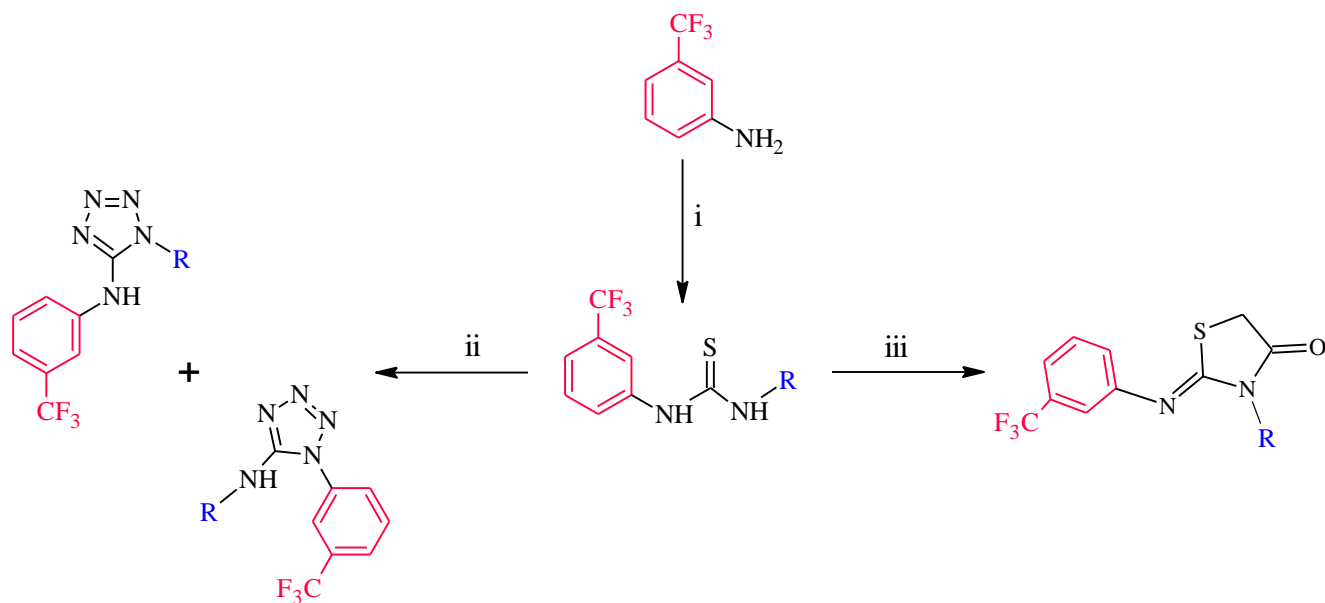
Obiecującą grupą związków biologicznie czynnych są 2,3-dwupostawione pochodne 1,3-tiazolidyn-4-onu, powstałe na drodze cyklizacji ugrupowania tiomocznikowego. Ich zróżnicowane zastosowanie w chemii medycznej obejmuje przede wszystkim działanie przeciwnowotworowe [36], przeciwbakteryjne [10] oraz hamujące rozwój wirusa HIV [37]. W przypadku aktywności przeciwretrowirusowej, istotne znaczenie ma całkowita lipofilowość cząsteczki oraz elektroujemny charakter podstawników w pozycjach *meta*- i *para*- aryłowego fragmentu terminalnego [38]. Obecność atomów fluorowca ogranicza bowiem rotację ligandu i stabilizuje jego konformację „butterfly-like” w centrum aktywnym odwrotnej transkryptazy wirusa [39].

Spodziewając się, że przekształcenie układów tiomocznika o poznanej aktywności w formy cykliczne pozwoli odnaleźć pochodne o znaczącej aktywności cytotoksycznej

i przeciwwirusowej, otrzymałam serię 1,3-benzotiazol-2-yłowych pochodnych, zawierających układ tiazolidynonu (**Rys. 3.**). Reakcje przeprowadziłam wykorzystując tylko aktywne cytotoksycznie pochodne 1-(1,3-benzotiazol-2-ylo)-3-tiomocznika, wyłonione z pierwszego etapu syntezy. Zakładałam, że mieszanina poreakcyjna zawierać będzie dwa izomeryczne produkty, różniące się układem podstawników przy atomach N2 i N3 tiazolidynonu [40]. Cyklizacja, której przebieg potwierdziła rentgenowska analiza strukturalna, doprowadziła jednak do powstania jedynie pochodnych 2-iminotiazolidyno-4-onu. Formowaniu takich produktów sprzyjał polarny aprotyczny rozpuszczalnik (acetonitryl), reaktywny odczynnik acylujący (chloroacetamid) oraz wysoka temperatura reakcji. Dodatkowo, duży polarny pierścień benzotiazolu jako fragment terminalny był także jednym z czynników decydujących o podstawieniu przy atomie N2 2-imino-4-tiazolidynonu. Za wyjątkiem pochodnej 2-bromofenyłowej, przeprowadzenie liniowych układów tiomocznika w związku pierścieniowe doprowadziło do spadku aktywności cytotoksycznej względem komórek MT-4. Chociaż działanie przeciwproliferacyjne wskazanej bromopochodnej było ogólnie słabsze niż jej liniowych analogów, to w przeciwieństwie do nich nie wykazała ona toksyczności względem prawidłowych ludzkich fibroblastów. Ponadto zarówno tiomocznikowa, jak i tiazolidynowa pochodna 2-bromofenyłu wyraźnie hamowały proliferację komórek ostrej białaczki limfoblastycznej. Cyklizacja wydaje się zatem racjonalnym kierunkiem modyfikacji ugrupowania tiomocznika w celu poszukiwania nowych, skutecznych chemioterapeutyków cytostatycznych. Z drugiej strony, usztywnienie struktury cząsteczki na drodze tej przemiany prawdopodobnie uniemożliwia przybranie wymaganej zgiętej konformacji w centrum aktywnym białka receptorowego, co skutkuje zanikiem aktywności przeciwwirusowej.

W celu poszerzenia wiedzy o wpływie modyfikowania struktury pochodnych tiomocznika na ich aktywność biologiczną, zsyntetyzowałam kolejne serie zawierające układy pierścieniowe. Przedmiotem badań strukturalnych oraz bioaktywności opublikowanych w *Biomedicine & Pharmacotherapy* (**H6**) były pochodne 1,3-tiazolidyno-4-onu oraz 1*H*-tetrazol-5-yłu, bazujące na czynnych biologicznie 3-(trifluorometylo)fenylotiomocznikach (**H1**) (**Rys.4.**). W grupie wyjściowej znalazły się zatem pochodne o terminalnych pierścieniach aromatycznych zawierające jeden lub dwa podstawniki elektroujemne, głównie w pozycjach *meta*- i *para*-. Ze względu na zakładaną giętkość strukturalną, do badań dołączyłam także pochodną benzylotiomocznikową. Planując syntezę podstawionych tetrazoli miałam na uwadze ich możliwą do przewidzenia aktywność przeciwbakteryjną [41], przeciwnowotworową [42] i przeciwwirusową [43]. Za racjonalnością tej ścieżki syntetycznej

przemawiał również fakt, że udokumentowaną zdolność hamującą wzrost komórek nowotworowych posiadają 1,2-diarylowe pochodne tetrazoli obdarzone zarówno podstawnikami elektronodonorowymi, jak i elektronoakceptorowymi [44]. Pierwszą grupę związków, pochodne 5-aminotetrazolu, uzyskałam wykorzystując nukleofilowy atak jonu azydkowego na układ tiomocznika, aktywowany uprzednio jonem rtęci (II). Otrzymany w ten sposób azydek guanylu ulegał następnie elektrocyklizacji, dając dwa izomeryczne związki [45]. Produkty główne stanowiły *N*-podstawione 1-[3-(trifluorometylo)fenylo]-1*H*-tetrazolo-5-aminy, zebrałam również niewielkie ilości 1-podstawionych *N*-[3-(trifluorometylo)fenylo]-1*H*-tetrazolo-5-amin. Równoległe te same wyjściowe fenylotiomoczniki zawierające podstawnik 3-(trifluoro)metylowy poddałam reakcji z chloroacetamidem, co pozwoliło na otrzymanie odpowiednich 1,3-tiazolidyno-4-onów. Struktury otrzymanych pochodnych potwierdzono za pomocą rentgenowskiej analizy strukturalnej. Wykazała ona także, że badane trójpierścieniowe pochodne tiomocznika charakteryzują się giętkością konformacyjną, która może ułatwić nawiązywanie oddziaływań międzycząsteczkowych.



R: aryl, benzyl

Rys. 4. Synteza cyklicznych pochodnych 3-(trifluorometylo)aniliny (i: R-NCS, MeCN; ii: NaN₃, HgCl₂, Et₃N, DMF; iii: chloroacetamid, MeCN) (**H6**).

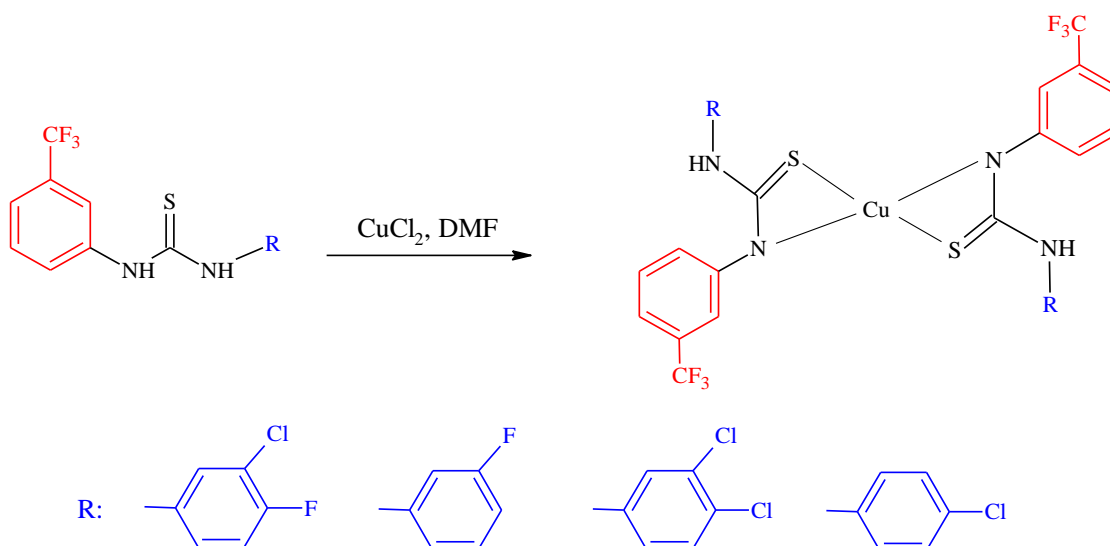
Zsyntetyzowane pochodne przekazałam na badania oceniające ich aktywność cytotoksyczną w stosunku do komórek MT-4. Jednocześnie badano także zdolność hamującą

rozwój wirusa HIV. W porównaniu z liniowymi analogami, cytotoksyczność substancji zawierających ugrupowanie tetrazolu zmalała 2-7-krotnie, a w grupie układów tiazolidynowych aktywność ta była od 2 do 15 razy słabsza. Takie obniżenie potencjału biologicznego może być uzasadnione zmieniającą się w wyniku przekształceń strukturalnych lipofilowością cząsteczek, która determinuje przepuszczalność przez błony biologiczne. Wyrażona jako $ClogP$, w niewielkim stopniu rosła dla układów tetrazolowych, a ulegała znacznemu obniżeniu w przypadku pochodnych tiazolidynowych. Przeciwną tendencję zmian lipofilowości zaobserwowałam jedynie dla cyklicznych pochodnych zawierających podstawnik benzyłowy. Na szczególną uwagę zasługuje jednak pochodna N-(4-nitrofenylo)tetrazolowa, która hamowała podział komórek MT-4 trzykrotnie silniej niż odpowiadająca jej łańcuchowa pochodna tiomocznikowa. Wysoki efekt cytostatyczny obserwowany dla połączeń układu tetrazolu z pierścieniem nitrofenylovym został już wcześniej zauważony [46]. Nowo zsyntetyzowany związek wykazywał wyraźną aktywność przeciwproliferacyjną i proapoptyczną w stosunku do ludzkich komórek gruczolaka płuc (A549) oraz czerniaka (HTB-140). W dużym stopniu ograniczał również ich migrację. Podczas 72-godzinnej inkubacji, pochodna tertazolu zwiększyła wrażliwość komórek gruczolaka na obecność leków referencyjnych - cisplatyny (o 10%) oraz doksorubicyny (o 4%). W przeciwieństwie do substancji kontrolnych, związek nie wpływał znacząco na podziały komórkowe prawidłowych keratynocytów (HaCaT), w rezultacie selektywność tej pochodnej była wyższa niż użytych wzorców. Otrzymane wyniki wskazują, że badana struktura może zatem stanowić punkt wyjścia w procesie poszukiwania nowego chemioterapeutyku przeciwnowotworowego. Z kolei brak inhibicyjnej aktywności nowych związków cyklicznych w kierunku wirusa HIV może być związany z ich niedostateczną giętkością strukturalną.

Kontynuację badań nad właściwościami biologicznymi pochodnych tiomocznika stanowił artykuł opublikowany w 2018 roku w *Journal of Inorganic Biochemistry* (**H7**). Przedstawione wyniki dotyczyły aktywności przeciwdrobnoustrojowej kompleksów miedzi (II) z aktywnymi 3-(trifluorometylo)fenylotiomocznikami (**Rys.5.**), które były tematem artykułu **H1**. Cztery wybrane do reakcji kompleksowania ligandy pochodziły z grupy mono- oraz dihalogenopochodnych, zawierających atomy fluoru i/lub chloru. Struktura powstałych związków koordynacyjnych oraz symetria oddziaływań metal-ligand zostały ustalone w współpracy z Instytutem Fizyki PAN w Warszawie, za pomocą połączonych technik spektroskopii w podczerwieni (FTIR), spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) oraz obliczeń kwantowo-mechanicznych metodą teorii

funkcjonału gęstości (DFT). Najbardziej prawdopodobny model strukturalny zakładał, że w jednordzeniowym układzie CuL_2 , donorami par elektronowych są atomy siarki oraz zdeprotonowane atomy azotu N1/N2 ugrupowania tiomocznikowego ligandu. W tym najbardziej preferowanym energetycznie, centrosymetrycznym modelu N_2S_2 , cząsteczki ligandu przyjmowały położenie *trans* w stosunku do atomu centralnego. Taki typ koordynacji, w którym jon Cu (II) stanowi element dwóch czteroczłonowych pierścieni (Cu-S-C-N) jest dość nietypowy dla tego pierwiastka [8,47]. Pozostałe modele strukturalne – typ N_4 , który zakładał chelatowanie przez cztery atomy azotu układu tiomocznika, oraz model N_2S , zostały wykluczone ze względu na znaczną niestabilność energetyczną.

Koordynacja ligandów tiomocznikowych z jonami metali przejściowych prowadzi często do wzrostu potencjału biologicznego układu, co może być użyteczną metodą obniżenia dawki substancji leczniczej [48,49]. Wśród poznanych dotąd chemioterapeutyków zawierających jon miedzi znajdują się zarówno substancje cytostatyczne [50], jak i aktywne przeciw bakteriom Gram-dodatnim i Gram-ujemnym [51]. Otrzymane przez mnie kompleksy tiomocznika wykazały wobec standardowych szczepów Gram-dodatnich działanie wysokie do umiarkowanego (MIC 2-8 $\mu\text{g/ml}$). Jednocześnie oznaczona aktywność hamująca wzrost bakterii Gram-ujemnych oraz grzybów była słaba, lecz wyższa niż zaobserwowana dla wyjściowych ligandów. Znaczący profil przeciwbakteryjny związków koordynacyjnych potwierdziły kolejne badania, wykonane na 14 klinicznych metycylino-opornych szczepach *S. aureus* oraz 16 izolatach *S. epidermidis*. W przypadku chelatów zawierających układy 3,4-dichloro-, 3-fluoro- oraz 4-chlorofenylotiomocznika, otrzymane wartości MIC były niższe niż dla odpowiadających im ligandów. W tej grupie najsilniejszy potencjał przeciwgronkowcowy wykazał kompleks dichloropochodnej. Jedyne koordynacja pochodnej 3-chloro-4-fluorofenylotiomocznika spowodowała obniżenie jej potencjału biologicznego. Warto podkreślić, że połowa badanych szczepów szpitalnych była bardziej wrażliwa na obecność testowanych substancji niż referencyjnej cyprofloksacyny. Co istotne, koordynacyjne układy tiomocznika, podobnie jak wyjściowe ligandy, nie wykazały właściwości genotoksycznych ani mutagennych.



Rys. 5. Synteza związków kompleksowych miedzi (II) z pochodnymi 3-(trifluorometylo)-fenyliotiomocznika (**H7**).

Badania profilu przeciwdrobnoustrojowego objęły także określenie wpływu substancji na wzrost biofilmu produkowanego przez szczepy gronkowców. Do analiz wybrano najaktywniejszy kompleks, pochodną 3,4-dichlorofenyłową. Związek użyty w stężeniu równym dwukrotności MIC (4 $\mu\text{g/ml}$) niemal całkowicie zapobiegał powstawaniu biofilmu szczepu standardowego *S. epidermidis* ATTC 12228 i dwóch klinicznych *S. aureus*. Zbliżoną skuteczność, na poziomie 90-80%, kompleks ten wykazywał wobec trzech mikroorganizmów o najwyższym poziomie produkcji biofilmu. W stosunku do przeważającej ilości szczepów tworzących biofilm oraz we wszystkich wybranych zakresach stężeń, aktywność pochodnej tiomocznika była wyższa niż leku kontrolnego, a w przypadku trzech izolatów – porównywalna do niego.

W celu określenia mechanizmu działania przeciwbakteryjnego, porównano wpływ wyjściowych dichlorowcopochodnych tiomocznika oraz ich kompleksów z miedzią na aktywność topoizomerazy IV i gyrazy DNA, wyizolowanych ze szczepów *S. aureus*. Badania wykazały, że główny cel molekularny ligandów oraz kompleksu z pierścieniem 3,4-dichlorofenyłowym stanowiła gyraza, natomiast pochodnej 3-chloro-4-fluorofenyliotiomocznika – topoizomeraza IV. W porównaniu z aktywnością cyprofloksacyny, aktywność inhibicyjna badanych pochodnych była 2-14 razy silniejsza. Wpływ pochodnej 3,4-chlorofenyłowej hamujący działanie bakteryjnej gyrazy wyraźnie korelował z określoną wcześniej aktywnością tego związku na szczepy kliniczne - zarówno planktoniczne, jak i wytwarzające biofilm.

W przypadku organicznych związków kompleksowych, często jedynie bioaktywny ligand odpowiada za oddziaływanie z białkiem enzymatycznym, co eliminuje jon metalu z bezpośredniego kontaktu z centrum aktywnym [52]. Hipoteza ta jest wysoce prawdopodobna w odniesieniu do badanych połączeń koordynacyjnych 3-(trifluorometylo)-fenylo-tiomocznika, ponieważ sól miedzi (II) użyta jako substrat nie wykazała aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Wzrost aktywności biologicznej substancji będący skutkiem skompleksowania może zatem wynikać ze zwiększonej w ten sposób hydrofilowości i biodostępności cząsteczki. Obecność kationu ułatwia również transport aktywny związku do wnętrza komórki [53]. Analiza budowy kieszeni wiążącej bakteryjnych topoizomeraz typu II wykazała, że jej wielkość nie pozwala na wiązanie całego kompleksu o ustalonej strukturze. W rezultacie zaproponowany został model wiązania monomerycznego ligandu, 1-(3,4-dichlorofenylo)-3-[3-(trifluorometylo)fenylo]tiomocznika, zakładający dysocjację kompleksu przed dotarciem do miejsca aktywnego enzymu. Ustalono, że dokowana cząsteczka wiążąc się z podjednostką B bakteryjnej gyrazy, hamowała jej aktywność ATPazową. Między grupami NH układu tiomocznika a resztami Asp81 i Thr173 tworzyły się wiązania wodorowe; z kolei pierścień z podstawnikiem 3-trifluorometylowym stabilizowany był za pomocą oddziaływań hydrofobowych z niepolarnymi resztami Ile86, Ile175 oraz Thr173. Analogiczny sposób wiązania monomerycznego ligandu zaobserwowano w miejscu aktywnym topoizomerazy IV. Kluczowe dla wywołania odpowiedzi biologicznej było również wiązanie wodorowe między ugrupowaniem tiomocznika a grupą $-\text{COO}^-$ Asp74, podczas gdy grupa 3-(trifluorometylo)fenylova angażowała się w oddziaływania typu $\text{CH}\dots\pi$ z sąsiednimi resztami Met79 i Pro80.

Najważniejsze osiągnięcia prowadzonych przeze mnie prac (wnioski)

- Zaplanowanie i otrzymanie serii 1,3-dwupodstawionych pochodnych tiomocznika o zróżnicowanej aktywności biologicznej, zależnej od charakteru chemicznego układów terminalnych.
- Ustalenie mechanizmu działania przeciwbakteryjnego pochodnych 3-(trifluorometylo)fenylo- i 4-chloro-3-nitrofenylo-tiomocznika (inhibitowanie topoizomerazy IV oraz gyrazy DNA), a także zaproponowanie modelu wiązania tych związków do obu topoizomeraz. Najbardziej obiecujące halogenopochodne wykazały aktywność wyższą niż lek referencyjny - zarówno wobec komórek planktonicznych, jak i tworzących biofilm,

jednocześnie pozbawione były właściwości genotoksycznych oraz nie wpływały na wzrost ludzkich komórek prawidłowych.

- Uzyskanie w grupie pochodnych *N*-alkiloarylowych zawierających układ 4-chloro-3-nitrofenylotiomocznika związków o wysokim potencjale przeciwegruźliczym, porównywalnym lub silniejszym niż lek kontrolny.
- Wykazanie antagonistycznego wpływu pochodnych 3-(trifluorometylo)fenylotiomocznika na aktywność receptorów 5-HT_{2A}, zarówno w testach *in vivo*, jak *in silico*, a także ich szerokiego oddziaływania na ośrodkowy układ nerwowy zwierząt laboratoryjnych.
- Wyselekcjonowanie z grupy cytotoksycznych pochodnych 1,3-benzotiazolotiomocznika związku hamującego wzrost wirusa HIV-1. Aktywność przeciwko dzikim szczepom wirusa, jak i mutacjom opornym na stosowane obecnie leki, była wynikiem hamującego wpływu na działanie odwrotnej transkryptazy retrowirusa.
- Przeprowadzenie cyklizacji dwupodstawionych pochodnych tiomocznika do układów 1,3-tiazolidyn-4-onu oraz 1*H*-tetrazol-5-ylu. Efektem zmian strukturalnych było obniżenie cytotoksyczności wszystkich związków, przy zachowaniu działania przeciwproliferacyjnego wybranych pochodnych.
- Otrzymanie związków kompleksowych miedzi (II) z aktywnymi pochodnymi 3-(trifluorometylo)fenylotiomocznika, o potencjale przeciwegronkowcowym równym lub wyższym w porównaniu do wyjściowych ligandów lub kontrolnego antybiotyku. Wykazano, że główny cel molekularny koordynacyjnych połączeń tiomocznika stanowiła bakteryjna gyraza.

Przedstawiona tematyka ma charakter interdyscyplinarny i łączy kompetencje wielu zespołów badawczych. Koordynowanie badań aktywności otrzymanych przeze mnie związków pozwoliło na wybranie tych, które bioaktywnością mogą konkurować z wzorcowymi chemioterapeutykami. Opisane dotychczas zależności między strukturą a profilem działania wskazują dalszy kierunek poszukiwań potencjalnych substancji leczniczych w grupie pochodnych tiomocznika.

Piśmiennictwo:

[1] Böhm H.J., Banner D., Bendels S., Kansy M., Kuhn B., Müller K., Obst-Sander U., Stahl M. Fluorine in medicinal chemistry. *Chembiochem*. 2004; 5: 637-643.

- [2] Müller K., Faeh C., Diederich F. Fluorine in pharmaceuticals: looking beyond intuition. *Science*. 2007; 317: 1881-1886.
- [3] Hagmann W.K. The many roles for fluorine in medicinal chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2008; 51: 4359-4369.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] Stefańska J., Szulczyk D., Koziół A.E., Mirosław B., Kędzierska 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.
- [7] Kumbhare R.M., Dadmal T., Kosurkar U., Sridhar V., Rao J.V. Synthesis and cytotoxic evaluation of thiourea and N-bis-benzothiazole derivatives: a novel class of cytotoxic agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2012; 22: 453-455.
- [8] Drzewiecka-Antonik A., Rejmak P., Klepka M.T., Wolska A., Pietrzyk P., Stępień K., Sanna G., Struga M. Synthesis, structural studies and biological activity of novel Cu(II) complexes with thiourea derivatives of 4-azatricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-ene-3,5-dione. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2017; 176: 8-16.
- [9] Reis D.C., Pinto M.C., Souza-Fagundes E.M., Wardell S.M., Wardell J.L., Beraldo H. Antimony(III) complexes with 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones: cytotoxicity against human leukemia cell lines. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2010; 45: 3904-3910.
- [10] El-Gaby M. S., El-Hag Ali G. A., El-Maghraby A. A., Abd El-Rahman M. T., Helal M. H. Synthesis, characterization and in vitro antimicrobial activity of novel 2-thioxo-4-thiazolidinones and 4,4'-bis(2-thioxo-4-thiazolidinone-3-yl)diphenylsulfones. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2009; 44: 4148-4152.
- [11] Compiani G., Nacci V., Bechelli S., Clani S.M., Carofalu A., Fiorini I., Wikstrom H., Deboer P., Liao Y., Tepper P.G., Cagnotto A., Mennini T. New antipsychotic agents with serotonin and dopamine antagonist properties based on a pyrrolo[2,1-b][1,3]benzothiazepine structure. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1998; 41: 3763-3772.

- [12] Kroeger Smith M.B., Rouzer C.A., Taneyhill L.A., Smith N.A., Hughes S.H., Boyer P.L., Janssen P.A., Moereels H., Koymans L., Arnold E., Ding J., Das K., Zhang W. Molecular modeling studies of HIV-1 reverse transcriptase nonnucleoside inhibitors: total energy of complexation as a predictor of drug placement and activity. *Protein Science*. 1995; 4(10): 2203-2222.
- [13] Bielenica A., Kędzierska E., Fidecka S., Małuszyńska H., Mirosław B., Koziół A.E., Stefańska J., Madeddu S., Giliberti G., Sanna G., Struga M. *Letters in Drug Design & Discovery*. 2015; 12: 263-276.
- [14] Stefańska J., Nowicka G., Struga M., Szulczyk D., Koziół A.E., Augustynowicz-Kopeć E., Napiórkowska 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 & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*. 2015; 63(3): 225-236.
- [15] Sumangala V., Poojary B., Chidananda N., Arulmoli T., Shenoy S. Facile synthesis, cytotoxic and antimicrobial activity studies of a new group of 6-aryl-3-[4-(methylsulfonyl)benzyl]-7H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazines. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2012; 54: 59–64.
- [16] Struga M., Kossakowski J., Kędzierska E., Fidecka S., Stefańska J. Synthesis and pharmacological activity of urea and thiourea derivatives of 4-azatricyclo[5.2.2.0(2,6)]undec-8-ene-3,5-dione. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*. 2007; 55(5): 796-799.
- [17] Struga M., Kossakowski J., Koziół A.E., Kędzierska E., Fidecka S., La Colla P., Ibba K., Coullu G., Sanna G., Secci B., Loddo R. Synthesis, pharmacological and antiviral activity of 1,3-thiazepine derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2009; 44: 4960-4969.
- [18] Mahar Doan K.M., Humphreys J.E., Webster L.O., Wring S.A., Shampine L.J., Serabjit-Singh C.J., Adkison K.K., Polli J.W. Passive permeability and P-glycoprotein-mediated efflux differentiate central nervous system (CNS) and non-CNS marketed drugs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2002; 303(3): 1029-1037.
- [19] Bhowruth V., Brown A.K., Reynolds R.C., Coxon G.D., Mackay S.P., Minnikin D.E., Besra G.S. Symmetrical and unsymmetrical analogues of isoxyl; active agents against *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2006; 16: 4743-4747.
- [20] Anderson V.E., Gootz T.D., Osheroff N. Topoisomerase IV catalysis and the mechanism of quinolone action. *Journal of Biological Chemistry*. 1998; 273: 17879-17885.

- [21] Phetsuksiri B., Baulard A.R., Cooper A.M., Minnikin D.E., Douglas J.D., Besra G.S., Brennan P.J. Antimycobacterial activities of isoxyl and new derivatives through the inhibition of mycolic acid synthesis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999; 43(5): 1042-1051.
- [22] Mdluli K., Ma Z. *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase as a target for drug discovery. *Infectious Disorders - Drug Targets*. 2007; 7: 159–168.
- [23] ISO 10993-5:2009. Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity; International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2009.
- [24] Kaymakçioğlu B.K., Rollas S., Korcegez E., Arıcıoğlu F. Synthesis and biological evaluation of new N-substituted-N'-(3,5-di/1,3,5-trimethylpyrazole-4-yl)thiourea/urea derivatives. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005; 26: 97-103.
- [25] Anzini M., Chelini A., Mancini A., Cappelli A., Frosini M., Ricci L., Valoti M., Magistretti J., Castelli L., Giordani A., Makovec F., Vomero S. Synthesis and biological evaluation of amidine, guanidine, and thiourea derivatives of 2-amino(6-trifluoromethoxy)benzothiazole as neuroprotective agents potentially useful in brain diseases. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2010; 53(2): 734-744.
- [26] Sun H.L., Zheng J.W., Wang K., Liu R.K., Liang J.H. Tramadol reduces the 5-HTP-induced head-twitch response in mice via the activation of mu and kappa opioid receptors. *Life Sciences*. 2003; 72: 1221-1230.
- [27] Gandhimathi A., Sowdhamini R. Molecular modelling of human 5-hydroxytryptamine receptor (5-HT_{2A}) and virtual screening studies towards the identification of agonist and antagonist molecules. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*. 2016; 34: 952-970.
- [28] Bielenica A., Koziol A.E., Struga M. Computational methods in determination of pharmacophore models of 5-HT(1A), 5-HT(2A) and 5-HT(7) receptors. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 2013; 13: 933-951.
- [29] Mokrosz J.L., Strekowski L., Duszyńska B., Harden D.B., Mokrosz M.J., Bojarski A.J. Structure-activity relationship studies of CNS agents. Part 14: Structural requirements for the 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptor selectivity of simple 1-(2-pyrimidinyl)piperazine derivatives. *Pharmazie*. 1994; 49: 801-806.
- [30] Klabunde T., Evers A. GPCR antitarget modeling: pharmacophore models for biogenic amine binding GPCRs to avoid GPCR-mediated side effects. *Chembiochem*. 2005; 6: 876-889.
- [31] Jones B.J., Blackburn T.P. The medical benefit of 5-HT research. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2002; 71: 555-568.

- [32] Feldberg W., Myers R.D. A new concept of temperature regulation by amines in the hypothalamus. *Nature*. 1963; 200: 1325-1328.
- [33] Hjorth S. Hypothermia in the rat induced by the potent serotonergic agent 8-OH-DPAT. *Journal of Neural Transmission*. 1985; 61: 131-135.
- [34] Paris K.A., Haq O., Felts A.K., Das K., Arnold E., Levy R.M. Conformational landscape of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase non-nucleoside inhibitor binding pocket: lessons for inhibitor design from a cluster analysis of many crystal structures. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2009; 52: 6413-6420.
- [35] D’Cruz O.J., Qazi S., Yiv S., Uckun F.M. A novel vaginal microbicide containing the rationally designed anti-HIV compound HI-443 (N'-[2-(2-thiophene)ethyl]-N'-[2-(5-bromopyridyl)] thiourea]). *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2012; 21: 265-279.
- [36] Appalanaidu K., Kotcherlakota R., Dadmal T.L., Bollu V.S., Kumbhare R.M., Patra C.R. Synthesis and biological evaluation of novel 2-imino-4-thiazolidinone derivatives as potent anti-cancer agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2016; 26: 5361- 5368.
- [37] Chen H., Bai J., Jiao L., Guo Z., Yin Q., Li X. Design, microwave-assisted synthesis and HIV-RT inhibitory activity of 2-(2,6-dihalophenyl)-3-(4,6-dimethyl-5-(un)substituted-pyrimidin-2-yl)thiazolidin-4-ones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2009; 17: 3980-3986.
- [38] Rawal R.K., Solomon V.R., Prabhakar Y.S., Katti S.B., De Clercq E. Synthesis and QSAR studies on thiazolidinones as anti-HIV agents. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. 2005; 8: 439–443.
- [39] Rawal R.K., Kumar A., Siddiqi M.I., Katti S.B. Molecular docking studies on 4-thiazolidinones as HIV-1 RT inhibitors. *Journal of Molecular Modeling*. 2007; 13: 155–161.
- [40] Bolli M.H., Abele S., Binkert C., Bravo R., Buchmann S., Bur D., Gatfield J., Hess P., Kohl C., Mangold C., Mathys B., Menyhart K., Müller C., Nayler O., Scherz M., Schmidt G., Sippel V., Steiner B., Strasser D., Treiber A., Weller T. 2-Imino-thiazolidin-4-one derivatives as potent, orally active S1P1 receptor agonists. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2010; 53: 4198-4211.
- [41] Dai L.L., Zhang H.Z., Nagarajan S., Rasheeda S., Zhou C.H. Synthesis of tetrazole compounds as a novel type of potential antimicrobial agents and their synergistic effects with clinical drugs and interactions with calf thymus DNA. *MedChemComm*. 2015; 6: 147–154.
- [42] Kumar C.N.S.S.P., Parida D.K., Santhoshi A., Kota A.K., Sridhar B., Rao V.J. Synthesis and biological evaluation of tetrazole containing compounds as possible anticancer agents. *MedChemComm*. 2011; 2: 486–492.

- [43] Muraglia E., Kinzel O.D., Laufer R., Miller M.D., Moyer G., Munshi V., Orvieto F., Palumbi M.C., Pescatore G., Rowley M., Williams P.D., Summa V. Tetrazole thioacetanilides: potent non-nucleoside inhibitors of WT HIV reverse transcriptase and its K103N mutant. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2006; 16: 2748–2752.
- [44] Romagnoli R., Baraldi P.G., Salvador M.K., Preti D., Aghazadeh Tabrizi M., Brancale A., Fu X.H., Li J., Zhang S.Z., Hamel E., Bortolozzi R., Basso G., Viola G. Synthesis and evaluation of 1,5-disubstituted tetrazoles as rigid analogues of combretastatin A-4 with potent antiproliferative and antitumor activity. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2012; 55: 475-88.
- [45] Batey R.A., Powell D.A. A general synthetic method for the formation of substituted 5-aminotetrazoles from thioureas: a strategy for diversity amplification. *Organic Letters*. 2000; 2: 3237-3240.
- [46] Arshad M., Bhat A.R., Pokharel S., Kim J.E., Lee E.J., Athar F., Choi I. Synthesis, characterization and anticancer screening of some novel piperonyl-tetrazole derivatives, *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2014; 71: 229–236.
- [47] Singh D.P., Pratap S., Shukla M. Solvent induced geometry transformation of trigonal planar Cu(I) complexes of N-((2/4-methoxy carbonyl) phenyl)-N'-(ethoxy/methoxy carbonyl) thiocarbamides to square-planar Cu(II) complexes: Synthesis, spectral, single crystal, DFT and in vitro cytotoxic study. *Inorganica Chimica Acta*. 2014; 423: 386–396.
- [48] Da Silva J.G., Azzolini L.S., Wardell S.M.S.V., Wardell J.L., Beraldo H. Increasing the antibacterial activity of gallium(III) against *Pseudomonas aeruginosa* upon coordination to pyridine-derived thiosemicarbazones. *Polyhedron*. 2009; 28: 2301–2305.
- [49] Reis D.C., Pinto M.C., Souza-Fagundes E.M., Wardell S.M., Wardell J.L., Beraldo H. Antimony(III) complexes with 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones: cytotoxicity against human leukemia cell lines. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2010; 45: 3904-3910.
- [50] Rauf M.K., Imtiaz-ud-Din, Badshah A., Gielen M., Ebihara M., Vos Dd., Ahmed S. Synthesis, structural characterization and in vitro cytotoxicity and anti-bacterial activity of some copper(I) complexes with N,N'-disubstituted thioureas. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2009; 103: 1135-1144.
- [51] Ajibade P.A., Zulu N.H. Metal complexes of diisopropylthiourea: synthesis, characterization and antibacterial studies. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011; 12: 7186-7198.
- [52] Kilpin K.J., Dyson P.J. Enzyme inhibition by metal complexes: concepts, strategies and applications. *Chemical Science*. 2013; 4: 1410-1419.

[53] Renfrew A.K. Transition metal complexes with bioactive ligands: mechanisms for selective ligand release and applications for drug delivery. *Metallomics*. 2014; 6: 1324-1335.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

a) Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora

Swoją działalność naukową rozpoczęłam na IV roku studiów, włączając się do prac doświadczalnych prowadzonych w Pracowni Analizy Przepływowej i Chromatografii Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, kierowanej przez Prof. dr hab. Marka Trojanowicza. Zapoznałam się tam z podstawami wykorzystania biocujników enzymatycznych do detekcji różnych substancji organicznych. Badania, które weszły w skład mojej pracy magisterskiej, wykonałam w dwóch ośrodkach naukowych - w Centrum Fitofarmacji (obecnie BAE – Biocujniki-Analizy-Środowisko) Uniwersytetu Perpignan we Francji oraz na Wydziale Chemii Uniwersytetu we Florencji we Włoszech. W laboratoriach Uniwersytetu w Perpignan, pod kierunkiem Prof. Jean-Louis Marty, brałam udział w opracowaniu amperometrycznej metody detekcji pestycydów w układzie przepływowym, opartej na inhibitowaniu esteraz cholinowych. Pracując na kilku typach biocujników, różniących się źródłem enzymu, porównywałam ich stabilność, możliwość regeneracji oraz czułość na obecność zanieczyszczeń tionofosforoorganicznych we wzbogaconych wodach naturalnych. Efektywność tej metody sprawdzałam za pomocą HPLC. Wyniki opisanych doświadczeń zostały opublikowane (O1). Z kolei pobyt na Uniwersytecie Florenckim, w grupie badawczej Prof. Marco Masciniego, wykorzystałam na zapoznanie się z efektywnością elektrochemicznych biocujników DNA, opartych na powinowactwie związków do struktury helikalnej. Przedstawiona praca magisterska wzięła udział w wydziałowym konkursie na najlepszą pracę dyplomową.

W październiku 2001 roku podjęłam pracę na stanowisku asystenta w Katedrze i Zakładzie Chemii Medycznej WUM, kierowanej przez Prof. dr hab. Jerzego Kossakowskiego, angażując się w realizację prowadzonych tam badań naukowych. Dotyczyły one poszukiwania nowych substancji o potencjalnym oddziaływaniu na ośrodkowy układ nerwowy w grupie N-podstawionych pochodnych imidów cyklicznych. Wykonywane prace doświadczalne dały mi możliwość zapoznania się z różnymi technikami stosowanymi w syntezie organicznej, a uzyskiwane wyniki zachęcały do nawiązywania współpracy z innymi ośrodkami naukowymi. Przeprowadzone badania umożliwiły mi sprecyzowanie

tematu pracy badawczej, co w przyszłości zaowocowało uzyskaniem stopnia naukowego doktora. Moja uwaga skupiła się na grupie arylopiperazynylowych pochodnych imidów, których modyfikacja strukturalna pozwoliłaby na otrzymanie związków o działaniu ukierunkowanym na układ nerwowy, w tym przeciwpsychotycznym i przeciwdepresyjnym. Wyjściowe imidy otrzymywałam na drodze reakcji Dielsa-Aldera, następnie podawałam alkielowaniu oraz sprzęganiu z (hetero)arylowymi pochodnymi piperazyny. Planując syntezę, modyfikowałam łańcuch węglowy, wprowadzając łącznik o różnej długości i giętkości, trzy- lub czteropunktowy. Zmieniałam także objętość grupy imidowej i terminalny podstawnik arylopiperazynylowy. Zwracałam przy tym uwagę na osiągnięte przez syntetyzowane związki teoretyczne parametry molekularne, które decydują o przepuszczalności przez błony biologiczne, szczególnie barierę krew-mózg. Skłaniały one do przypuszczeń, że otrzymane przez mnie substancje mogą charakteryzować się korzystną farmakokinetyką, przepuszczalnością, rozpuszczalnością i niską toksycznością. Zainteresowanie otrzymanymi przeze mnie związkami doprowadziło do przebadania pod kątem farmakologicznym około 80 % z tych, które włączyłam do rozprawy doktorskiej. Wstępnej ocenie aktywności na ośrodkowy układ nerwowy poddano 14 związków z grupy pochodnych 4-azatricyklo[5.2.2.0^{2,6}]undekan-3,5,8-trionu i 4-azatricyklo[5.2.1.0^{2,6}]dek-8-en-3,5-dionu. Nie wykazały one neurotoksyczności, a trzy z nich działały hamująco na ośrodkowy układ nerwowy zwierząt. Efektem wspomnianych prac badawczych były artykuły **O2, O3, O5, O7** i komunikaty **K1-K5, K7-K9, K11, K15-K19**. Wybrane pochodne zawierające układ 4-hydroksy-4-azatricyklo[5.2.1.0^{2,6}]dek-8-en-3,5-dionu bardzo słabo wiązały się do receptorów β -adrenergicznych (**O4, K14**). Z kolei profil powinowactwa do receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A} fenylopiperazynylowej pochodnej z tej serii okazał się zbliżony do tego, który wykazuje neuroleptyk arypiprazol (**O6**). Zainteresowałam się jednocześnie rozważaniem konformacji, jakie mogą przyjmować arylopiperazynyłowe pochodne w ciele stałym, a także rodzajem oddziaływań międzycząsteczkowych preferowanych przez te związki. Zostało ustalone, że syntetyzowane przez mnie substancje przyjmują w większości konformację zgiętą, a przyjęte odległości wewnątrzcząsteczkowe są zgodne z modelem farmakoforowym receptora 5-HT_{1A}. Wyniki badań strukturalnych otrzymanych pochodnych zostały zaprezentowane w postaci komunikatów **K10, K12, K13, K20, K21**.

Wśród układów imidowych poszukiwałam także tych, które mogłyby wykazywać działanie przeciwdrobnoustrojowe i cytotoksyczne, dlatego większość zsyntetyzowanych przeze mnie pochodnych została przebadana wielokierunkowo. Najsilniejszym profilem przeciwwirusowym wykazały się alkiłowe i 2-hydroksypropylowe pochodne 2,3-dihydro-5H-

[1,4]ditiino[2,3-*c*]pirolo-5,7(6*H*)-dionu oraz 10-(difenylometyleno)-4-azatricyklo[5.2.1.0^{2,6}]-dek-8-en-3,5-dionu, zawierające ugrupowania fenylo-, 4-fluorofenylo-, benzylo- i pirydyn-2-ylpiperazynylo-owe. Wywierały one wpływ hamujący wzrost szczepów wirusa żółtej febry, opryszczki typu 1 i coxsackie CVB-2. Równolegle oceniano cytotoksyczność związków wobec komórek MT-4; najniższą przypisano pochodnym 10-(difenylometyleno)-4-azatricyklo[5.2.1.0^{2,6}]-dek-8-en-3,5-dionu (**O3**, **O8**). Związki z tej serii charakteryzowały się również aktywnością w kierunku szczepów bakterii Gram-dodatnich oraz drożdżaków. Wyniki opisanych badań biologicznych opublikowałam już po obronie pracy doktorskiej (**O12**, **O14**, **O15**). Realizacja wymienionych testów aktywności możliwa była dzięki nawiązanej przez mnie współpracy z ośrodkami naukowymi w kraju i za granicą. Mimo, że w 2008 roku jako współwykonawca starałam się o finansowanie projektu badawczego pt. „Synteza N-podstawionych pochodnych cyklicznych imidów o spodziewanym działaniu farmakologicznym” (Wniosek nr 39039, 36. konkurs MNiSW), nie zostało mi ono przyznane.

Mój dorobek przed uzyskaniem stopnia doktora obejmuje 8 publikacji oryginalnych, 2 artykuły pokonferencyjne oraz 19 komunikatów prezentowanych na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych. Całkowity IF artykułów opublikowanych przez obroną pracy doktorskiej wynosi 2.898, a ich wartość odpowiada 71 punktom MNiSW.

b) Działalność naukowa po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych, w ramach projektu własnego (nr 1M8/W1/10) kontynuowałam poszukiwania związków bioaktywnych w grupie N-podstawionych pochodnych bazujących na szkielecie imidowym. Efektem tych badań były artykuły i streszczenia zjazdowe dotyczące aktywności biologicznej układu 4-azatricykloundeka-3,5,8-trionu (**O9**), a także arylopiperazynyloalkilowych pochodnych 3-fenylopiperydynylo-2,6-dionu (**O13**), azaheksacyclo-18,20,22-trionu i indenoizoindolo-1,3,5-trionu (**O16**). Interesowałam się również analizą zmienności konformacyjnej otrzymanych przez mnie substancji w stanie stałym i w roztworze (**K22**, **K23**). W ramach współpracy wieloosrodkowej, syntetyzowane przeze mnie acetoksy pochodne imidów cyklicznych poddawane były badaniom strukturalnym, wykorzystującym metody dyfrakcji rentgenowskiej, techniki spektroskopii w podczerwieni (FTIR) i spektroskopii Ramana, a także obliczenia kwantowo-mechaniczne metodą teorii funkcjonału gęstości (DFT) (**O10**, **O11**, **O17**). W latach 2010-2011 byłam również współwykonawcą projektu badawczego (nr PNRF-103-AI-1/07), dotyczącego poszukiwań potencjalnych leków przeciwdepresyjnych

i przeciwlękowych w grupie *N*-alkiloarylowych i *N*-(alkilo)cyklicznych pochodnych 6-nitrokwipazyny. Moim zadaniem było opracowanie i optymalizacja warunków syntezy, przebiegającej m.in. na drodze katalizy międzyfazowej. Podsumowaniem mojego wieloletniego zainteresowania rodziną arylopiperazyn są prace poglądowe dotyczące modeli farmakoforowych i sposobu oddziaływania tych ligandów z receptorami serotoninowymi 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} i 5-HT₇ (**P1-P4**). Nawiązaniem do tej tematyki jest również rozpoczęta w ostatnich latach współpraca z Prof. Ferdinando Fiorino z Uniwersytetu Neapolitańskiego we Włoszech (**O21**), w ramach której wykonano następnie część badań stanowiących przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe (**H4**). Od roku 2012 ściśle współpracuję naukowo z dr hab. Martą Strugą (Katedra i Zakład Biochemii WUM, poprzednio Zakład Biochemii i Farmakogenomiki) i skupiona jestem na poszukiwaniu substancji bioaktywnych w grupie pochodnych tiomocznika. Realizując tę tematykę, w 2013 roku wystąpiłam o finansowanie projektu naukowego dotyczącego badań aktywności biologicznej otrzymywanych przez mnie pochodnych tiomocznikowych (konkurs Sonata 6, projekt nr 236535), jednak nie uzyskał on akceptacji. Kontynuuję i rozwijam współpracę z dr hab. Joanną Stefańską (Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej WUM). Jej rezultatem jest seria artykułów i komunikatów (**K34**, **K35**), dotyczących przeciwbakteryjnego profilu zsyntetyzowanych przeze mnie substancji, zawierających układy imidowe (**O20**), heterocykliczne (**O18**, **O19**, **O24**) lub aromatyczne (**O23**). Przy współudziale grupy badawczej Prof. Anny E. Kozioł z Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, szczegółowo określona została również struktura krystaliczna wybranych 1,3-dwupodstawionych pochodnych tiomocznika, zaprezentowana m.in. w formie doniesień zjazdowych **K24- K26**, **K28**, **K31-K33**. W ramach współpracy z dr Ewą Kędzierską (Katedra i Zakład Farmakologii z Farmakogenomiką Uniwersytetu Medycznego w Lublinie), zaprojektowałam i otrzymałam serię pochodnych tiomocznika, wykazujących działanie na ośrodkowy układ nerwowy zwierząt laboratoryjnych (**O18**, **K27**, **K30**). Niektóre halogenowane pochodne tiomocznika, opublikowane w artykułach **H1** i **H3**, zostały wytypowane na badania spektroskopowe, poparte obliczeniami kwantowo-mechanicznymi (metoda DFT) oraz dokowaniem do wybranych białek receptorowych. Badania teoretyczne wykonane zostały dzięki współpracy z Prof. Yohannanem Panickerem z Wydziału Fizyki Fatima Mata National College w Kerali w Indiach, i opublikowane w pracach **O22**, **O25**, **O26**. W chwili obecnej zajmuję się poszukiwaniem związków bioaktywnych w grupie cyklicznych pochodnych tiomocznika.

6. Pozostałe publikacje oryginalne

O1. Jeanty G., **Wojciechowska A.**, Marty J.L., Trojanowicz M. Flow-injection amperometric determination of pesticides on the basis of their inhibition of immobilized acetylcholinesterases of different origin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2002; 373(8): 691-695.

O2. Kossakowski J., **Wojciechowska A.** Synthesis of new *N*-substituted isoindoles with an expected anxiolytic and/or β -adrenolytic activity. Derivatives of 4-isobutoxy-4,7-ethano-3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-isoindole-1,3,6(2H)trione. *Annales UMCS. Sectio AA*. 2004; LIX: 98-107.

O3. Kossakowski J., **Wojciechowska A.** Koziół A.E. Synthesis of amino derivatives of 10-(diphenylmethylene)-4-azatricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-ene-3,5-dione as potential psychotropic and/or anti HIV agents. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*. 2006; 63(4): 261-264.

O4. Kossakowski J., **Wojciechowska A.** Synthesis of oxiran-2-ylmethyl and oxiran-2-ylmethoxy derivatives of some 4-azatricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-ene-3,5-diones as potential beta-adrenolytics. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*. 2006; 63(6): 485-490.

O5. Kossakowski J., **Wojciechowska A.**, Dybała I. Derivatives of 2,3-dihydro-5*H*-[1,4]dithiino[2,3-*c*]pyrrole-5,7(6*h*)-dione as potential anxiolytics. *Annals of Polish Chemical Society*. 2007;1: 249-252.

O6. Kossakowski J., **Bielenica A.**, Struga M., Koziół A.E. Synthesis and pharmacological evaluation of 4-[2-hydroxy-3-(4-phenyl-piperazin-1-yl)-propoxy]-4-azatricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-ene-3,5-dione. *Medicinal Chemistry Research*. 2008; 17(8): 507-514.

O7. Kossakowski J., **Bielenica A.**, Mirosław B., Koziół A.E., Dybała I., Struga M. 4-azatricyclo[5.2.2.0^{2,6}]undecane-3,5,8-triones as potential pharmacological agents. *Molecules*. 2008; 13(8): 1570-1583.

O8. Stefańska J., **Bielenica A.**, Struga M., Tyski S., Kossakowski J., Loddo R., Ibba C., Collu D., Marongiu E., La Colla P. Biological evaluation of 10-(diphenylmethylene)-4-azatricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-ene-3,5-dione derivatives. *Central European Journal of Biology*. 2009; 4(3): 362–368.

O9. **Bielenica A.**, Kossakowski J. 9-Methyl-3,5-dioxo-4-azatricyclo[5.2.2.0^{2,6}]undec-8-ene-1,8-diyl diacetate. *Molbank*. 2010; M685: 1-4.

O10. Varghese H.T., Panicker C.Y., Pillai K.M., Sheena M.Y., Raju K., Manojkumar T.K., **Bielenica A.**, Van Alsenoy C. Spectroscopic investigations and computational study of 4-(3-

bromopropyl)-4-azatricyclo[5.2.2.0^{2,6}]undecane-3,5,8-trione. *Spectrochimica Acta. Part A. Molecular and biomolecular spectroscopy*. 2010; 76(5): 513-522.

O11. Panicker C.Y., Varghese H.T., Pillai K.M., Mary Y.S., Raju K., Manojkumar T.K., **Bielenica A.**, Van Alsenoy C. Quantum chemical DFT study of 4-azatricyclo[5.2.2.0^{2,6}]undecane-3,5,8-trione. *Spectrochimica Acta. Part A. Molecular and biomolecular spectroscopy*. 2010; 75(5): 1559-1565.

O12. Stefańska J., **Bielenica A.**, Struga M., Tyski S., Kossakowski J., La Colla P., Tamburini E., Loddo R. Antimicrobial activity of 10-(diphenylmethylene)-4-azatricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-ene-3,5-dione derivatives. *Annals of Microbiology*. 2010; 60(1): 151-155.

O13. **Bielenica A.**, Kossakowski J., Struga M., Dybała I., Loddo R., Ibba C., La Colla P. Synthesis and biological evaluation of new 3-phenyl-1-[(4-arylpiperazin-1-yl)alkyl]-piperidine-2,6-diones. *Scientia Pharmaceutica*. 2011; 79: 225–238.

O14. **Bielenica A.**, Kossakowski J., Struga M., Dybała I., La Colla P., Tamburini E., Loddo R. Biological evaluation of novel 1,4-dithiine derivatives as potential antimicrobial agents. *Medicinal Chemistry Research*. 2011; 20(8): 1411-1420.

O15. **Bielenica A.**, Struga M., Mirosław B., Koziół A.E., Kossakowski J., Sanna G., La Colla P., Giliberti G. Synthesis and biological evaluation *N*-substituted polycyclic imides derivatives. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*. 2013; 70(5): 809-822.

O16. Szulczyk D., **Bielenica A.**, Dobrowolski M., Dobrzycki Ł., Krawiecka M., Kuran B., Struga M. Synthesis and structure evaluation of new complex butylarylpiperazin-1-yl derivatives. *Medicinal Chemistry Research*. 2014; 23(3): 1519-1536.

O17. Mirosław B., Koziół A.E., **Bielenica A.**, Dziuba K., Struga M. Substituent effect on supramolecular motifs in series of succinimide polycyclic keto derivatives - Spectroscopic, theoretical and crystallographic studies. *Journal of Molecular Structure*. 2014; 1074: 695-702.

O18. **Bielenica A.**, Kędzierska E., Fidecka S., Małuszyńska H., Mirosław B., Koziół A.E., Stefańska J., Madeddu S., Giliberti G., Sanna G., Struga M. Synthesis, antimicrobial and pharmacological evaluation of thiourea derivatives of 4*H*-1,2,4-triazole. *Letters in Drug Design & Discovery*. 2015; 12(4): 263-276.

O19. Stefańska J., Nowicka G., Struga M., Szulczyk D., Koziół A.E., Augustynowicz-Kopeć E., Napiórkowska 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 & Pharmaceutical Bulletin*. 2015; 63(3): 225-236.

O20. Bielenica A., Stefańska J., Koziół A.E. , Juliano F., Collu D., Sanna G., Józwiak M., Struga M. Thiourea derivatives of 4-azatricyclo[5.2.2.0^{2,6}]undec-8-ene-3,5- dione - synthesis and biological activity. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*. 2016; 73(3): 693-703.

O21. Fiorino F., Ciano A., Magli E., Severino B., Corvino A., Perissutti E., Frecentese F., Di Vaio P., Izzo A.A., Capasso R., Massarelli P., Nencini C., Rossi I., Kędzierska E., Orzelska-Górka J., **Bielenica A.**, Santagada V., Caliendo G. Synthesis, in vitro and in vivo pharmacological evaluation of serotonergic ligands containing an isonicotinic nucleus. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2016; 110: 133-150.

O22. Mary Y.S. , Aswathy V.V. , Panicker C.Y., **Bielenica A.**, Brzózka P., Savchenko O., Armakovic S., Armakovic S.J., Van Alsenoy C. Spectroscopic, single crystal XRD structure, DFT and molecular dynamics investigation of 1-(3-chloro-4-fluorophenyl)-3-[3-(trifluoromethyl) phenyl]thiourea. *RSC Advances*. 2016; 6: 111997-112015.

O23. Stefańska J., Stępień K., **Bielenica A.**, Wrzosek M., Struga M. Antistaphylococcal activity of selected thiourea derivatives. *Polish Journal of Microbiology*. 2016; 65(4): 451-460.

O24. Stefańska J., Stępień K., **Bielenica A.**, Szulczyk D., Mirosław B., Koziół A.E., Sanna G., Juliano F., Madeddu S., Józwiak M., Struga M. Antimicrobial and anti-biofilm activity of thiourea derivatives bearing 3-amino-1*H*-1,2,4-triazole scaffold. *Medicinal Chemistry*. 2016; 12(5): 478-488.

O25. Aswathy V.V., Mary Y. S., Jojo P.J., Panicker C. Y., **Bielenica A.**, Armakovic S., Armaković S.J., Brzózka P., Krukowski S., Van Alsenoy C. Investigation of spectroscopic, reactive, transport and docking properties of 1-(3,4-dichlorophenyl)-3-[3-(trifluoromethyl)phenyl] thiourea (ANF-6): Combined experimental and computational study. *Journal of Molecular Structure*. 2017; 1134: 668-680.

O26. Menon V.V., Mary Y.S., Mary Y.S., Panicker C.Y., **Bielenica A.**, Armaković S., Armaković S.J., Van Alsenoy C., Combined spectroscopic, DFT, TD-DFT and MD study of newly synthesized thiourea derivative. *Journal of Molecular Structure*, 2018; 1155: 184-195.

7. Prace przeglądowe

P1. Bielenica A., Kossakowski J. Zastosowanie metod obliczeniowych do wyznaczania budowy modeli farmakoforowych receptorów 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, oraz 5-HT₇. *Biuletyn Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego*. 2010; 1: 1-12.

P2. Bielenica A., Kossakowski J. Modele oddziaływań ligandów arylopiperazyńowych z receptorami serotoninowymi 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} i 5-HT₇. *Biuletyn Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego*. 2010; 2: 13-21.

P3. Bielenica A., Koziół A.E., Struga M. Computational methods in determination of pharmacophore models of 5-HT_{1a}, 5-HT_{2a} and 5-HT₇ receptors. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2013; 13(7): 933-951.

P4. Bielenica A., Koziół A.E., Struga M. Binding modes of chain arylpiperazines to 5-HT_{1a}, 5-HT_{2a} and 5-HT₇ receptors. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2013; 13(10): 1516-1539.

8. Udział w międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych

K1. Kossakowski J., **Wojciechowska A.** Synthesis of new *N*-substituted cyclic imides with an expected anxiolytic activity. Derivatives of 7-dimethylmethylenebicyclo[2.2.1]hept-5-ene-2,3-dicarboximide. The Third Multidisciplinary Conference on Drug Research, Piła, 13-16.05.2002.

K2. Pakosińska-Parys M., Prędką A., **Wojciechowska A.**, Ostrowska K., Kossakowski J. Synthesis of new compounds with expected β -adrenolytic activity. Derivatives of 1-acetyldibenzo[e.h]bicyclo[2.2.2]octane-2,3-dicarboximide. Ogólnopolska Konferencja Naukowa Młodych Medyków, Warszawa, 12-13.04.2002.

K3. Kossakowski J., **Wojciechowska A.** Synthesis of new *N*-substituted cyclic imides with an expected adrenolytic activity. Derivatives of 4-isobutoxy-4,7-ethano-3a,4,7,7a-tetrahydro-1*H*-isoindole-1,3,6(2*H*)trione. XLVI Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego, Lublin, 15-18.09.2003.

K4. Kossakowski J., **Wojciechowska A.** Synthesis of new *N*-substituted cyclic imides with an expected anxiolytic activity. Derivatives of 4-isobutoxy-4,7-ethano-3a,4,7,7a-tetrahydro-1*H*-isoindole-1,3,6(2*H*)trione. Polish-Austrian-German-Hungarian-Italian Joint Meeting on Medicinal Chemistry, Kraków, 15-18.10.2003.

K5. Kossakowski J., **Wojciechowska A.**, Struga M. Synthesis of amino derivatives of 8-diphenylmethylene-4,7-methano-3a,4,7,7a-tetrahydro-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)dione with an expected β -adrenolytic activity. XIX Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, Wrocław, 22-24.09.2004.

K6. Kossakowski J., Struga M., **Wojciechowska A.** Synthesis of urea and thiourea derivatives of 1*H*-isoindole-1,3 (2*H*)-dione as potential antiviral agents. XIX Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, Wrocław, 22-24.09.2004.

K7. Kossakowski J., **Wojciechowska A.** Synthesis of amino derivatives of 8-diphenylmethylene-4,7-methano-3a,4,7,7a-tetrahydro-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)dione with an expected psychotropic activity. XLVII Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego, Wrocław, 12-17.09.2004.

K8. Kossakowski J., **Wojciechowska A.** Synthesis of amino derivatives of 8-diphenylmethylene-4,7-methano-3a,4,7,7a-tetrahydro-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)dione with an expected psychotropic activity. Annals of the Polish Chemical Society, 2004; 3(2): 684-687.

K9. Kossakowski J., **Wojciechowska A.**, Koziół A.E. Synthesis of *N*-substituted 4-hydroxy-4-azatricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-ene-3,5-dione as potential anxiolytic agents. XLVIII Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego, 18-22.09.2005, Poznań, Annals of the Polish Chemical Society, 2005; I: 91-94.

K10. Hurkała B., Struga M., **Wojciechowska A.**, Kossakowski J., Koziół A.E. Struktury pochodnych imidowych kwasu bicyklo[2.2.2]okt-5-eno-2,3-dikarboksylowego. XLVIII Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego, Poznań, 18-22.09.2005.

K11. Kossakowski J., **Wojciechowska A.** Synthesis of new *N*-substituted derivatives of 4-hydroxy-4-azatricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-ene-3,5-dione as potential anxiolytic agents. XLVIII Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego, Poznań, 18-22.09.2005.

K12. Dybała I., Koziół A.E., **Wojciechowska A.**, Kossakowski J., Cybulski M. Rola cząsteczek wody w asocjacji cząsteczek analogów buspironu. 48. Konwersatorium Krystalograficzne, Wrocław, 29-30.06.2006.

K13. Dybała I., **Wojciechowska A.**, Kossakowski J. Badania strukturalne *N*-podstawionych pochodnych 4,7-ditiocyklohekseno-3,8-dikarboksyimidu. XLIX Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego, Gdańsk, 18-22.09.2006.

K14. Kossakowski J., **Wojciechowska A.**, Struga M. Design and synthesis of oxiran- 2-ylmethyl derivatives of 4-azatricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-ene-3,5-dione as potential

pharmacological agents. XLIX Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego, Gdańsk, 18-22.09.2006.

K15. Kossakowski J., **Wojciechowska A.**, Kuran B. Derivatives of 2,3-dihydro-5H-[1,4]dithiino[2,3-c]pyrrole-5,7(6H)-dione as potential anxiolytics. XLIX Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego, Gdańsk, 18-22.09.2006.

K16. Kossakowski J., Krawiecka M., Kuran B., Pakosińska – Parys M., **Wojciechowska A.** Synteza arylo- i heteroarylopiiperazynowych pochodnych układów azatricyklodekana jako potencjalnych ligandów receptorów 5HT. XLIX Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego, Gdańsk, 18-22.09.2006.

K17. Kossakowski J., Struga M., Mirosław B., Koziół A.E., **Wojciechowska A.** Synteza nowych pochodnych 4-amino-10-oksa-4-azatricyklo[5.2.1.0^{2,6}]dek-8-en-3,5-dionu. XLIX Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego, Gdańsk, 18-22.09.2006.

K18. Kossakowski J., **Wojciechowska A.** Synthesis of a series of 3-phenylpiperidine-2,6-dione derivatives as potential anxiolytics. V Multidyscyplinarna Konferencja Nauki o Leku. Darłówko Wschodnie, 15-17.05.2006.

K19. Kossakowski J., **Bielenica A.**, Struga M., Koziół A.E. 4-azatricyklo[5.2.2.0^{2,6}]undecane-3,5,8-triones as potential pharmacological agents. 50. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego, Toruń, 09-12.09.2007.

K20. Mirosław B., **Bielenica A.**, Struga M., Kossakowski J., Koziół A.E. Współzawodnictwo akceptorów wiązań wodorowych w kryształach wybranych amidów cyklicznych. 49 Konwersatorium Krystalograficzne. Wrocław, 28-30.06.2007.

K21. Mirosław B., **Bielenica A.**, Kossakowski J., Koziół A.E. Badania strukturalne cząsteczek i kryształów acetoksy pochodnych imidów cyklicznych. 51. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego oraz Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego, Opole, 7-11.09.2008.

K22. **Bielenica A.**, Zimniak A., Dybała I., Koziół A.E., Struga M. Conformational flexibility of buspirone analogues from X-ray in the solids and NMR in solution. XLIII Polish Seminar on Nuclear Magnetic Resonance and Its Applications. Kraków, 1-2.12.2010.

- K23.** Dybała I., Koziół A.E., **Bielenica A.**, Struga M., Kossakowski J. Analiza zmienności konformacyjnej w ciele stałym pochodnych buspironu. 52 Konwersatorium Krystalograficzne. Wrocław, 24-26.06.2010.
- K24.** **Bielenica A.**, Koziół A.E., Struga M. Synthesis of thiourea derivatives of 4-amino-4*H*-1,2,4-triazole. Vth Conversatory on Medicinal Chemistry, Lublin, 13-15.09.2012.
- K25.** Koziół A.E., **Bielenica A.**, Struga M., Małuszyńska H., Lis T. Asocjacja cząsteczek *N'*-pochodnych *N*-(4*H*-1,2,4-triazol-4-yl)tiomocznika. 55 Konwersatorium Krystalograficzne, Wrocław, 27-29. 06.2013.
- K26.** Koziół A.E., Mirosław B., Sawczenko A., Szulczyk D., **Bielenica A.**, Struga M., Małuszyńska H. Pochodne *N,N'*-dipodstawionego tiomocznika jako syntony supramolekularne. 56 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego, Siedlce, 16-20.09.2013.
- K27.** Kędzierska E., Fidecka S., **Bielenica A.**, Struga M. Synthesis and pharmacological evaluation of some novel thiourea derivatives incorporating 3-(trifluoromethyl)phenyl moiety. 3rd International Seminar on Behavioral Methods, Szczyrk, 18-20.09.2014.
- K28.** Sawczenko A., Koziół A.E., **Bielenica A.**, Lis T. Fluorowcopochodne *N*-(1-benzylpiperidyn-4-yl)-*N'*-(fenylo)tiomocznika. XI Warszawskie Seminarium Doktorantów Chemików - ChemSession'14, Warszawa, 16.05.2014.
- K29.** Sanna G., Madeddu S., Giliberti G., La Colla P., **Bielenica A.**, Koziół A.E., Struga M. A new benzothiazol thiourea derivative as nonnucleoside inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase. 13th National Conference of the Italian Society for Virology, Orvieto, Italy, 14-16.09.2015.
- K30.** Kędzierska E., **Bielenica A.**, Struga M., Orzelska J., Talarek S., Listos J., Fidecka S. Synthesis and pharmacological evaluation of some novel thiourea derivatives. International Conference: Pharmacy Today and Tomorrow – Theory and Practice, Lublin, 11-12.07.2015.
- K31.** Savchenko O., Koziół A.E., **Bielenica A.**, Lis T. Badania spektroskopowe nowych fluorowcopochodnych *N*-(1-benzylpiperidyn-4-yl)-*N'*-fenylo)tiomocznika. Nauka i przemysł – lubelskie spotkania studenckie, Lublin, 8.06.2015.
- K32.** Materek I.B., Koziół A.E., **Bielenica A.** Struktura krystaliczna pochodnej trifluorometylofenylowej. 57 Konwersatorium Krystalograficzne, Wrocław, 24-26.06.2015.
- K33.** Materek I.B., Koziół A.E., **Bielenica A.** Polimorfizm kryształów *N*-(4-metylo-fenylo)-1-[3-(trifluorometylo)fenylo]-1*H*-tetrazolo-5-aminy. 58 Konwersatorium Krystalograficzne, Wrocław, 22-24.06.2016.

K34. Stępień K., **Bielenica A.**, Wrzosek M., Struga M., Stefańska J. Przeciwbakteryjna aktywność wybranych pochodnych tiomocznika. XXVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów „Mikrobiologia – nowe wyzwania, nowe możliwości”, Bydgoszcz, 25-27.09.2016.

K35. Stępień K., Dobrzyńska K., **Bielenica A.**, Stefańska J. Ocena aktywności kompleksów pochodnych tiomocznika z miedzią wobec *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis*. Konferencja naukowa - 90 lat Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów „PTM wczoraj-dziś-jutro”, Kraków, 22-23.09.2017. – z wyróżnieniem.

9. Współpraca naukowa

a) Krajowe ośrodki naukowe

- Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej WUM; dr hab. Joanna Stefańska – w zakresie badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej zsyntetyzowanych związków
- Zakład Krystalografii Wydziału Chemii Uniwersytetu Marii Curie – Skłodowskiej w Lublinie; Prof. dr hab. Anna E. Kozioł – w zakresie badań strukturalnych zsyntetyzowanych związków
- Katedra i Zakład Farmakologii z Farmakogenomiką Uniwersytetu Medycznego w Lublinie; dr Ewa Kędzierska – w zakresie badań behawioralnych pochodnych tiomocznika na ośrodkowy układ nerwowy zwierząt
- Pracownia Teorii Biopolimerów Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego; dr hab. Sebastian Kmiecik oraz Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN; dr Michał Koliński - w zakresie modelowania molekularnego pochodnych tiomocznika do białek receptorowych
- Zakład Biochemii i Farmakogenomiki, Wydział Farmaceutyczny WUM; dr Małgorzata Wrzosek, mgr Marta Włodarczyk - w zakresie badań molekularnych mechanizmów aktywności przeciwdrobnoustrojowej związków oraz dr Wioletta Olejarz – w zakresie badań cytotoksyczności pochodnych tiomocznika

- Zakład Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie; Prof. dr hab. Ewa Augustynowicz-Kopeć, dr Agnieszka Napiórkowska – w zakresie określenia aktywności przeciwgruźliczej pochodnych tiomocznika
- Instytut Fizyki PAN w Warszawie; dr Aleksandra Drzewiecka-Antonik, dr Paweł Rejmak – w zakresie badań spektroskopowych i obliczeń kwantowo-mechanicznych kompleksowych pochodnych tiomocznika
- Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Wydział Farmaceutyczny WUM; mgr Sylwester Krukowski – w zakresie badań spektroskopowych pochodnych tiomocznika

b) Zagraniczne ośrodki naukowe

- Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione di Microbiologia e Virologia, Università degli Studi di Cagliari, Monserrato, Włochy; Prof. Paolo La Colla, dr Gabriele Giliberti, dr Giuseppina Sanna – w zakresie określenia aktywności cytotoksycznej, przeciwproliferacyjnej i przeciwwirusowej pochodnych tiomocznika, a także molekularnych mechanizmów aktywności przeciwwirusowej
- Dipartimento di Farmacia Università di Napoli “Federico II”, Neapol, Włochy; Prof. Ferdinando Fiorino oraz Dipartimento di Scienze Mediche, Chirurgiche e Neuroscienze Strada delle Scotte, Università di Siena, Siena, Włochy; Prof. Paola Massarelli – w zakresie badania powinowactwa pochodnych tiomocznika do receptorów serotoninowych
- Department of Physics, Fatima Mata National College, Kollam, Kerala, Indie, Prof. C. Yohannan Panicker, Prof. Y. Sheena Mary oraz Department of Chemistry, University of Antwerp, Belgia; Prof. Christian Van Alsenoy – w zakresie badań spektroskopowych i obliczeń kwantowo-mechanicznych zsyntetyzowanych związków

10. Udział w projektach badawczych

- 2010-2011, praca własna WUM pt. „Synteza N-podstawionych pochodnych cyklicznych imidów o spodziewanym działaniu farmakologicznym”

Nr projektu: 1M8/W1/10

Rola: wykonawca

- 2010-2011, projekt badawczy w ramach 1. edycji Polsko-Norweskiego Funduszu Badań Naukowych pt. ” Creating an academia-based platform to discover substances acting on serotonergic or glutamatergic systems as potential new antidepressant or anxiolytic drugs.”

Nr projektu: PNRF-103-AI-1/07

Rola: wykonawca

Badania wykonywane w celu realizacji prac wchodzących w skład cyklu w postępowaniu habilitacyjnym, zostały sfinansowane m.in. z następujących projektów badawczych:

- European Regional Development Fund within the Operational Programme “Innovative economy for 2007–2013” (prace **H2, H3, H4, H6**)
- Grant “Iuventus plus” Nr IP2012 016372, finansowany przez MNiSW (praca **H4**)
- Program operacyjny “Rozwój Polski Wschodniej „Development of Eastern Poland 2007-2013” Nr. POPW.01.03.00-06-009/11-00 (prace **H4, H6**)
- Międzynarodowy projekt badawczy EAGLE (FP7-REGPOT-2013-1, Nr 316014) (praca **H7**)
- Międzynarodowy projekt badawczy Nr 2819/7.PR/2013/2, współfinansowany przez MNiSW (praca **H7**)
- projekt w ramach Programu Innowacyjna Gospodarka Nr POIG.02.01.00-12-023/08 (praca **H7**)

11. Staże naukowe

12.2000 – 02.2001 – Centre for Phytopharmacy, University of Perpignan (obecnie: University of Perpignan Via Domitia’s Biosensors–Analyses–Environment (BAE)), Perpignan, Francja, pobyt w ramach INCO-Copernicus Projekt nr INCO ERB IC96 0804, „Biosensors for direct monitoring of environmental pollutants in the field”

10-11.2000 – Department of Chemistry, University of Florence, Florencja, Włochy, pobyt w ramach 5th Framework EC-LIFE QUALITY Projekt nr QLK3-2000-01311, “Evaluation/validation of novel biosensors in real environmental and food samples”

12. Nagrody i stypendia za działalność naukową

Jestem laureatką Nagród Naukowych JM Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w latach:

- 2017 - nagroda naukowa drugiego stopnia za współautorstwo pracy pt: „5-HT₂ receptor affinity, docking studies and pharmacological evaluation of a series of 1,3-disubstituted thiourea derivatives.”
- 2016 - nagroda naukowa drugiego stopnia za współautorstwo pracy pt: „Synthesis, cytotoxicity and antimicrobial activity of thiourea derivatives incorporating 3-(trifluoromethyl)phenyl moiety”.
- 2014 - nagroda indywidualna drugiego stopnia za autorstwo prac przeglądowych dotyczących modeli wiązania arylopipezazyn do receptorów serotoninowych
- 2009 - nagroda zespołowa trzeciego stopnia za współautorstwo publikacji dotyczących syntezy biologicznie czynnych pochodnych policyklicznych imidów
- 2005 – nagroda zespołowa drugiego stopnia za współautorstwo prac dotyczących syntezy nowych związków chemicznych o potencjalnym działaniu farmakologicznym

13. Kursy i szkolenia

03.2005 – ukończenie szkolenia dającego uprawnienia egzaminatora maturalnego z chemii przy OKE w Warszawie

06.2005 – ukończenie kursu pedagogicznego dla nauczycieli akademickich Akademii Medycznej w Warszawie (obecnie WUM)

01.2015 – ukończenie szkolenia przy OKE w Warszawie, umożliwiającego sprawdzanie egzaminu maturalnego z chemii w „nowej formule”

2005-2017 – uczestnictwo w corocznych szkoleniach egzaminatorów przy OKE w Warszawie, dopuszczające do sprawdzania egzaminu maturalnego z chemii w sesji wiosennej

14. Członkostwo w towarzystwach naukowych

Od 2014 roku jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Chemii Medycznej.

15. Działalność organizacyjna

Od 2012 roku wchodzę w skład osobowy Komisji Uczelnianego Egzaminu Wstępnego z chemii i/lub biologii – jako przewodnicząca (2012, 2014, 2015, 2017) lub jako członek (2016).

16. Recenzje prac naukowych

Od maja 2010 występowałam w roli recenzenta:

- 48 prac oryginalnych złożonych do publikacji w czasopismach o zasięgu międzynarodowym: *European Journal of Medicinal Chemistry* (5), *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (3), *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (4), *Medicinal Chemistry Research* (14), *Molecules* (6), *Medicinal Chemistry* (1), *Journal Of Enzyme Inhibition & Medicinal Chemistry* (1), *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry* (2), *Chemical Biology & Drug Design* (2), *Letters in Drug Design & Discovery* (2), *Arabian Journal of Chemistry* (1), *Crystals* (1), *Journal of Chemical Society of Pakistan* (2), *International Journal of Molecular Sciences* (1), *Polish Journal of Microbiology* (1), *Bulgarian Chemical Communications* (1), *International Journal of Infectious Diseases & Epidemiology* (1).
- 4 prac przeglądowych złożonych do publikacji w czasopismach o zasięgu międzynarodowym: *Letters in Organic Chemistry* (1), *Medicinal Research Reviews* (1), *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* (1), *Infection and Drug Resistance* (1).

17. Podsumowanie osiągnięć naukowo-badawczych

Mój dorobek naukowy obejmuje:

- 33 prace oryginalne (25 po uzyskaniu stopnia doktora), w tym 27 w czasopismach znajdujących się na liście *Journal Citation Reports (JCR)*. W 15 pracach byłam autorem pierwszym lub korespondencyjnym.
- 4 prace przeglądowe, z czego 2 zostały opublikowane w czasopismach indeksowanych w bazie *Journal Citation Reports (JCR)*. W każdej z nich byłam autorem pierwszym i korespondencyjnym.
- 35 streszczeń z doniesień zaprezentowanych na konferencjach naukowych
- udział w 2 projektach badawczych finansowanych przez WUM/ PNFBN
- sumaryczny współczynnik *Impact Factor* według listy *JCR* zgodnie z rokiem opublikowania: 55.775; łączna punktacja MNiSW: 664 pkt
- liczba wszystkich cytowań publikacji według bazy *Web of ScienceTM Core Collection*: 173 (204 wg bazy *Scopus*)

- liczba cytowań (bez autocytowań) według bazy *Web of Science*TM *Core Collection*: 138 (154 wg bazy *Scopus*)

- index Hirscha (*h-index*) według *Web of Science*TM *Core Collection*: 7 (8 wg bazy *Scopus*)

18. Działalność dydaktyczna i popularyzująca naukę

a) Działalność dydaktyczna

- od 2014 prowadzenie zajęć ćwiczeniowych i seminaryjnych z przedmiotu „Biochemia z elementami chemii” dla studentów II roku I Wydziału Lekarskiego i Wydziału Lekarsko-Dentystycznego

- w latach 2001 - 2013 prowadzenie zajęć ćwiczeniowych, seminaryjnych i wykładowych z przedmiotu „Chemia medyczna” dla studentów I roku I Wydziału Lekarskiego, II Wydziału Lekarskiego oraz Wydziału Lekarsko-Dentystycznego

- w latach 2003 - 2010 prowadzenie zajęć ćwiczeniowych, seminaryjnych i wykładowych z przedmiotu „Chemia medyczna” w języku angielskim dla studentów I roku Oddziału English Division, a także funkcja przedstawiciela Katedry i Zakładu Chemii Medycznej na posiedzeniach Rady Pedagogicznej

- w latach 2014-2017 pełnienie roli recenzenta 4 prac magisterskich, wykonanych w Zakładzie Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego WUM

- od 05.2005 pełnienie obowiązków egzaminatora maturalnego z chemii (poziom rozszerzony, od 2015 w „nowej formule”), przy Okręgowej Komisji Egzaminacyjnej w Warszawie. Od 2016 zaangażowanie w dodatkową funkcję weryfikatora (egzaminatora powtórnego sprawdzania).

b) Działalność popularyzująca naukę

- pełnienie roli recenzenta serii komunikatów zjazdowych sesji “Basic and Preclinical Sciences” w ramach Kongresu Naukowego Młodych Medyków (Warsaw International Medical Congress for Young Scientists) w latach 2014, 2015, 2017, 2018

- od roku 2001 prowadzenie wykładów z chemii na kursach przygotowawczych do egzaminu maturalnego

Bielenica Anna