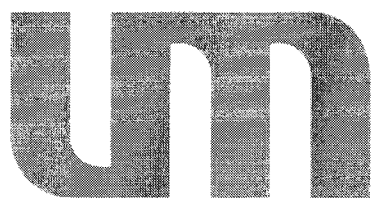


Załącznik 2



MEDICAL
UNIVERSITY
OF LODZ

Dr n. farm. Katarzyna Błaszczak-Świątkiewicz

**AUTOREFERAT
DO WNIOSKU O PRZEPROWADZENIE POSTĘPOWANIA
HABILITACYJNEGO**

ŁÓDŹ 2015

Spis treści

1. Imię i Nazwisko	1
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytuł rozprawy doktorskiej	1
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	1
4. Wykaz osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003.....	1
4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego.....	2
4.2 Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego	2
4.3 Uzasadnienie badań	3
4.4 Cel i założenie projektu	7
4.5 Osiągnięcia projektu	9
4.5.1 Część syntetyczna	9
4.5.1.1 Synteza pochodnych benzimidazolu	10
4.5.1.2 Synteza pochodnych benzimidazolo-4,7-dionu.....	12
4.5.2 Część analityczna	15
4.5.2.1 Analiza trwałości pochodnych benzimidazolu i N-tlenku benzimidazolu	16
4.5.2.2 Analiza trwałości pochodnych benzimidazolo-4,7-dionu i N-tlenku benzimidazolo-4,7-dionu.....	17
4.5.3 Badania <i>in vitro</i>	19
4.5.3.1 Ocena wpływu pochodnych benzimidazolu i benzimidazolo-4,7-dionu na aktywność topoizomerazy I.....	19
4.5.3.2 Ocena molekularnych mechanizmów aktywności biologicznej pochodnych benzimidazolu i benzimidazolo-4,7-dionu	21
4.5.3.2.1 Ocena wybranych parametrów aktywności biologicznej pochodnych benzimidazolu	22
4.5.3.2.2 Ocena wybranych parametrów aktywności biologicznej pochodnych benzimidazolo-4,7-dionu	24
4.5.3.2.3 Ocena aktywności biologicznej pochodnych tetrahydroakrydyny	26
4.6 Podsumowanie wyników badań stanowiących podstawę habilitacji	27
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych	29
5.1 Tematyka badań przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych	29
5.2 Tematyka badań po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych.....	30
5.3 Współpraca naukowa z polskimi i zagranicznymi placówkami naukowymi	35
5.4 Podsumowanie.....	35

DANE OSOBOWE

1. Imię i nazwisko: Katarzyna Błaszczak-Świątkiewicz

Miejsce pracy: Katedra Chemii Farmaceutycznej, Zakład Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji, Uniwersytet Medyczny w Łodzi. Wydział Farmaceutyczny

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

1997r - mgr farmacji - Wydział Farmaceutyczny Akademii Medycznej w Łodzi

2000r - specjalista I stopnia z zakresu farmacji aptecznej – Akademia Medyczna w Łodzi

2005r - doktor nauk farmaceutycznych - Wydział Farmaceutyczny Akademii Medycznej w Łodzi, rozprawa doktorska pt: „Nowe pochodne chinazoliny o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej” – praca wyróżniona przez Radę Wydziału Farmaceutycznego

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych związane z etapami rozwoju naukowego

1997-2006 Asystent w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej i Analizy Leków Katedry Chemii Farmaceutycznej i Biochemii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Od 2006 Adiunkt w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji Katedry Chemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

4. Osiągnięcia wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003r.

o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65 poz. 595 ze zm.)

Podjęmowane przeze mnie problemy badawcze skupiają się wokół złożonej tematyki walki z chorobą nowotworową. Wybrany aspekt poznawczy moich badań dotyczy wykorzystania bioredukcyjnych czynników w selektywnej strategii przeciwnowotworowej, znoszącej lekooporność. Realizacja oceny molekularnych mechanizmów działania potencjalnych proleków poprzedzona została badaniami syntetyczno-analitycznymi nowych heterocyklicznych związków wzbogaconych o charakterystyczne połączenia chemiczne o bioredukcyjnych właściwościach.

Mój rozwój naukowy dokumentuję publikacjami w międzynarodowych i krajowych czasopismach z dziedziny farmacji medycznej. Opublikowałam siedemnaście prac o łącznym współczynniku wpływu IF 15,714 i punktacji wg MNiSW wynoszącej 244 pkt. Swoje doświadczenie i zdobytą wiedzę prezentowałam na międzynarodowych konferencjach w kraju i za granicą.

4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego

Poszukiwanie nowych strategii terapii przeciwnowotworowej w aspekcie znoszenia lekooporności

4.2 Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

Cykl interdyscyplinarnych badań dokumentujących mój wkład pracy naukowej na rzecz poszukiwań nowych strategii przeciwnowotworowych, zawarłam w następujących publikacjach:

1. **K. Błaszczak-Świątkiewicz**, E.Mikiciuk-Olasik: Application of HPLC method for investigation of stability of new benzimidazole derivatives. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 34, 1901-1912 (2011).
2. **K. Błaszczak-Świątkiewicz**, M. Mirowski, K. Kaplińska, R. Kruszyński, A. Trzęsowska-Kruszyńska, E. Mikiciuk-Olasik: New benzimidazole derivatives with potential cytotoxic activity – study of their stability by RP-HPLC. Acta Biochemica Polonica, 59, 2, 279-288 (2012).
3. **K. Błaszczak-Świątkiewicz**, E.Mikiciuk-Olasik: New benzimidazole derivatives as topoisomerase I inhibitors – synthesis and fluorometric analysis. Acta Poloniae Pharmaceutica in Drug Research, 70, 3, 451-458 (2013).
4. **K. Błaszczak-Świątkiewicz**, P. Olszewska and E. Mikiciuk-Olasik: Antiproliferative activity of new benzimidazole derivatives. Acta Biochemica Polonica, 427, 60 (2013).

5. **K. Błaszczak-Świątkiewicz**, P. Olszewska, E. Mikiciuk-Olasik: Biological approach of anticancer activity of new benzimidazole derivatives. *Pharmacological Reports*, 66, 100-106 (2014).
6. **K. Błaszczak- Świątkiewicz**, DC. Almeida, MJ. Perry, E. Mikiciuk-Olasik: Synthesis, anticancer activity and UPLC analysis of the stability of new benzimidazole-4,7-dione derivatives. *Molecules*, 19, 400-413 (2014).
7. **K. Błaszczak-Świątkiewicz**, **E. Mikiciuk-Olasik**: Biological evaluation of the activity of some benzimidazole-4,7-dione derivatives. *Molecules*, special issue 19, 15361-15373 (2014)
8. P. Olszewska, E. Mikiciuk-Olasika, **K. Błaszczak-Świątkiewicz**, J. Szymański, P. Szymański: Novel tetrahydroacridine derivatives inhibit human lung adenocarcinoma cell growth by inducing G1 phase cell cycle arrest and apoptosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 68, 8. 959–967 (2014)
9. **K. Błaszczak-Świątkiewicz**, **E. Mikiciuk-Olasik**: Some Characteristics of Activity of Potential Chemotherapeutics - Benzimidazole Derivatives. *Advances in Medical Sciences*. 60, 125-132 (2015)

Łączny Impact Factor dla tych prac wynosi :13,4. Punktacja MNiSW: 190 pkt.

4.3 Uzasadnienie badań

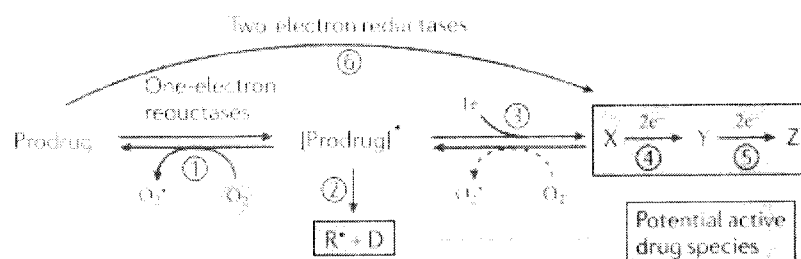
Omówienie zagadnień teoretycznych prezentowanego projektu naukowego przygotowałam w oparciu o przegląd literatury wykorzystany w powyższych publikacjach oraz w trzech pracach przeglądowych, których jestem współautorem:

1. **K. Błaszczak Świątkiewicz**, E. Mikiciuk-Olasik: Rola hipoksji w postęпах w diagnostyce i terapii chorób nowotworowych. *Wiadomości Chemiczne* 62, 11-12: 1065-1089 (2008)
2. **K. Błaszczak-Świątkiewicz**, P. Olszewska, E. Mikiciuk-Olasik: Wpływ hipoksji na zmiany metabolizmu komórek nowotworowych. *Nowotwory Journal of Oncology*, 62, 4, 188-195 (2012)
3. **K. Błaszczak-Świątkiewicz**, P. Olszewska, E. Mikiciuk-Olasik: Zastosowanie nanocząsteczek w leczeniu i diagnostyce nowotworów. *NOWOTWORY Journal of Oncology*, 63, 4, 320–330 (2013).

Koncepcja prezentowanych badań dotyczyła aspektu przeciwnowotworowego z wykorzystaniem cytotoksycznej aktywności czynników bioredukcyjnych. Specyfika tych czynników polega na ich wysokiej selektywności do komórek nowotworowych w stanie głębokiego niedotlenienia. Wspomniana hipoksja to obiecujący punkt uchwytu terapii przeciwnowotworowej [1-3]. Podążając za światowym nurtem naukowym łączącym idee wykorzystania bioredukcyjnych proleków i strategii znoszącej lekooporność postanowiłam zaprojektować i otrzymać nowe związki heterocykliczne z grupy bioredukcyjnych proleków. Projektując nowe połączenia chemiczne o właściwościach bioredukcyjnych zawarłam w ich strukturze właściwości dwóch niezbędnych komponentów: wyzwalacza i efektora aktywności biologicznej. Wyzwalacz charakteryzuje się zdolnością do szybkiej reakcji redukcji w niedotlenionych komórkach guza przez co ogranicza aktywację proleku do miejsc chorobowo zmienionych. Efektor zaś, po aktywacji, z uwagi na możliwość wystąpienia w środowisku biologicznym istotnych ograniczeń jego cytotoksyczności, odznacza się wysokim potencjałem aktywności biologicznej. Dodatkowo posiada zdolność zabijania proliferujących komórek na różnym etapie ich rozwoju oraz w skrajnych wartościach pH otoczenia. Poniżej przedstawiłam schemat powstawania cytotoksycznych substancji

1-3.

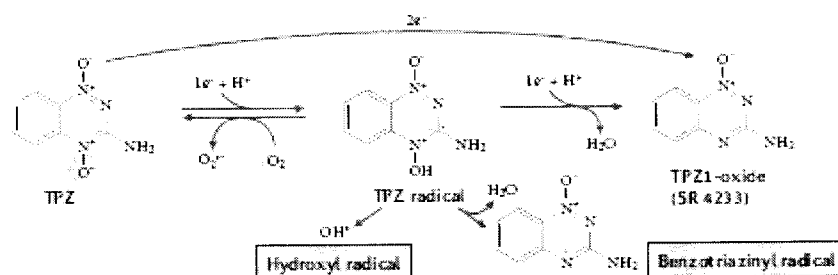
Schemat 1: Szlak bioredukcyjnych przemian proleku do cytotoksycznych metabolitów [4].



Mechanizm cytotoksycznego działania bioredukcyjnych proleków opiera się na pośredniej (reakcja 1 i 3, schemat 1) lub bezpośredniej (reakcja 6, schemat 1) reakcji redukcji z udziałem dwu lub jednoelektronowej reduktazy. Pośrednia jednoelektronowa redukcja prowadzi do wytworzenia reaktywnego rodnika proleku. Specyfika tej reakcji polega na reoksydacji rodnika do proleku w warunkach

normotlenowych lub dalszej jego redukcji w warunkach hipoksji z wyzwoleniem toksycznych metabolitów (*produkt X, Y, Z, schemat 1*). W normoksji toksyczne metabolity posiadają zdolność powtórnego przejścia do form nietoksycznych. Szlak opisanych przemian zaprezentowałam z użyciem proleku - tirapazaminy (TPZ) – schemat 2 [10].

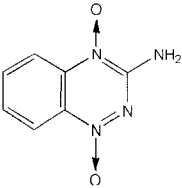
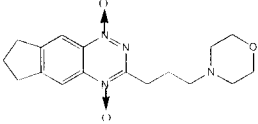
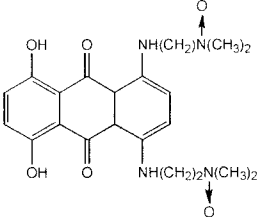
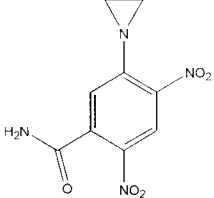
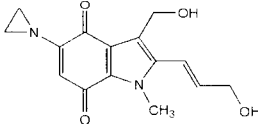
Schemat 2: Metabolizm tirapazaminy w warunkach normoksji i hipoksji [10].



Poważnym problemem terapii przeciwnowotworowej jest jej chemiooporność. Mimo, iż rozpoznano wiele przyczyn lekooporności nowotworowej to wciąż poszukuje się nowych związków i nowych strategii terapeutycznych wykorzystujących alternatywne punkty uchwytu przemian biochemicznych guzów celem zwiększenia wrażliwości tkanek patologicznych na aktywność chemioterapeutyków.

Znane i będące w trzeciej fazie badań klinicznych bioredukcyjne czynniki, pod względem budowy strukturalnej, należą do czterech grup połączeń chemicznych, a mianowicie są to: N-tlenki benzotriazyny, N-tlenki 5,8-dihydroksyantraceno-9,10-dionu, pochodne nitrobenzamidu oraz pochodne 1-*H*-indolo-4,7-dionu. Charakteryzują się one trzema zasadniczymi mechanizmami działania cytotoksycznego tj.: tworzą kompleksy z nicią DNA, hamują aktywność topoizomerazy oraz posiadają zdolność do tworzenia wewnątrzsiściowych połączeń z helisą DNA - potencjalne interkalatory [11]. Zestawienie właściwości wiodących bioredukcyjnych czynników prezentuje tabela 1.

Tabela 1: Właściwości strukturalne i biologiczne bioredukcyjnych proleków

Prolek	Struktura chemiczna	Grupa chemiczna	Mechanizm działania*	Mechanizm cytotoksyczności
TPZ		aromatyczne N-tlenki	1, 3 [R]	kompleks uszkadzający DNA
SN30000		aromatyczne N-tlenki	1, 3 [R]	kompleks uszkadzający DNA
AQ4N		alifatyczne N-tlenki	2, 5 [Y]	inhibitor topoizomerazy II
CB1954		nitrowe pochodne	1/2, 4, 5, 6 [Y, Z]	Interkalator
EO9		pochodne chinonu	1, 4 [X, Y]	Interkalator

* czynne cytotoksyny (R, X, Y, Z)

Wymienione powyżej struktury, ich budowa oraz aktywność biologiczna związana bezwarunkowo z obecnością specyficznych podstawników i grup chemicznych posłużyły mi jako matryca do zaprojektowania nowych połączeń heterocyklicznych o potencjalnych, selektywnych właściwościach cytotoksycznych.

Prezentowany projekt badawczy porusza problem wykorzystania nowych, potencjalnych bioredukcyjnych czynników jako substratów enzymatycznej terapii prolekowej. Zaletą proponowanej strategii przeciwnowotworowej jest jej wpływ na wczesną fazę rozwoju choroby co zwiększa potencjalne szanse lecznicze pacjentów.

4.4 Cel i założenia projektu

Założeniem projektu, który jest kontynuacją mojej specjalizacji w najnowszej chemioterapii było otrzymanie związków o selektywnej cytotoksyczności w warunkach bioredukcyjnych z możliwością oceny i porównania ich molekularnych mechanizmów biologicznego działania ze szczególnym uwzględnieniem badań w środowisku ubogotlenowym.

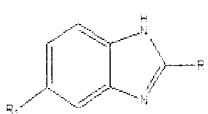
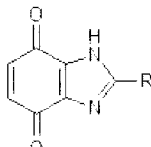
Założenia prezentowanej pracy badawczej realizowałam poprzez poszczególne etapy doświadczalne według następującego planu:

1. optymalizacja warunków otrzymywania czterech nowych grup związków chemicznych:
 - pochodnych benzimidazolu **celem** wykazania ich aktywności cytotoksycznej
 - pochodnych benzimidazol-4,7-dionu **celem** potwierdzenia ich aktywności cytotoksycznej
 - pochodnych N-tlenku benzimidazolu **celem** wskazania ich bioredukcyjnych właściwości
 - pochodnych N-tlenku benzimidazolo-4,7-dionu **celem** wykazania ich selektywnej aktywności cytotoksycznej uwarunkowanej hipoksją guza
2. ustalenie zakładanej struktury produktu pośredniego (zasady Schiffa) w syntezie pochodnych benzimidazolu
3. ustalenie struktury chemicznej produktów cyklokondensacji tj.: pochodnych benzimidazolu na drodze badań krystalograficznych
4. określenie trwałości wyizolowanych pochodnych benzimidazolu metodą HPLC:
 - walidacja i optymalizacja układu chromatograficznego
 - analiza trwałości wybranych pochodnych **celem** ustalenia optymalnego czasu niezbędnego do przeprowadzenia testów *in vitro* z udziałem pochodnych benzimidazolu oraz N-tlenku benzimidazolu
5. analiza trwałości wybranych pochodnych benzimidazolo-4,7-dionu w środowisku badań biochemicznych metodą UPLC:
 - walidacja i optymalizacja układu chromatograficznego

- wyznaczenie kinetycznych parametrów degradacji wybranych pochodnych **celem** ustalenia optymalnego czasu niezbędnego do przeprowadzenia testów *in vitro* z udziałem pochodnych benzimidazolo-4,7-dionu i N-tlenku benzimidazolo-4,7-dionu
1. ocena aktywności otrzymanych pochodnych benzimidazolu jako potencjalnych interkalatorów z grupy inhibitorów topoisomerazy I:
 - walidacja i optymalizacja metody fluorymetrycznej
 - analiza aktywności wybranych pochodnych **celem** ustalenia ich wpływu na stopień rozplątania helisy DNA
 2. ocena *in vitro* molekularnych mechanizmów działania wyizolowanych pochodnych benzimidazolu i benzimidazolo-4,7-dionu na wybranych liniach komórkowych:
 - test antyproliferacyjny **celem** określenia aktywności cytotoksycznej wszystkich czterech grup związków
 - test z użyciem enzymu kaspazy 3/7 **celem** określenia rodzaju cytotoksycznego działania wszystkich czterech grup struktur chemicznych w aspekcie apoptozy względnie nekrozy
 - test na uszkodzenie struktury DNA **celem** zaproponowania potencjalnego przeciwnowotworowego mechanizmu działania wszystkich czterech grup związków heterocyklicznych
 3. porównawcza analiza aktywności biologicznej testowanych pochodnych benzimidazolu i benzimidazolo-4,7-dionu.

Realizację zaplanowanych doświadczeń analityczno-biologicznych opisałam w tabeli 2.

Tabela 2: Zestawienie badań i założeń poszczególnych etapów realizacji projektu naukowego.

Cel badania	Typ badania	Pochodne bezimidazolu	Pochodne benzimidazolo- 4,7-dionu	
				
Określenie trwałości testowanych pochodnych w różnych środowiskach badawczych	Analiza chromatograficzna	+	+	
Określenie aktywności badanych związków jako inhibitorów topoisomerazy I	Analiza fluorymetryczna	+	+	
Określenie molekularnych mechanizmów działania związków:				
Aktywność biologiczna	cytotoksyczności	Test antyproliferacyjny	+	+
	sposobu zabijania komórek nowotworowych (apoptoza, nekroza)	Test na apoptozę	+	+
	uszkodzenia struktur komórki nowotworowej	Test na uszkodzenie struktury DNA	+	+

+ badania wykonane

4.5 Osiągnięcia projektu

4.5.1 Badania syntetyczne

Realizację wyznaczonych celów projektu rozpoczęłam od otrzymania pochodnych (N-metylideno)-o-fenylendiaminy, pochodnych benzimidazolu oraz N-tlenku benzimidazolu, a następnie pochodnych benzimidazolo-4,7-dionu i ich analogów o strukturze N-tlenku. Wszystkie zaplanowane związki otrzymałam

na drodze reakcji chemicznych opisywanych w literaturze, wprowadzając własne modyfikacje.

Jednorodność chemiczną otrzymanych pochodnych potwierdziłam metodą chromatografii HPTLC F₂₅₄. W identyfikacji związków analizowanych posłużyłam się wartościami R_f produktów i substratów reakcji.

Strukturę otrzymanych związków potwierdziłam analizą elementarną i spektroskopową: ¹H NMR, ¹³C NMR, IR oraz MS. Opisywane widma ¹H NMR, ¹³C NMR wykazują istotne różnice w strukturze poszczególnych grup chemicznych oraz potwierdzają zachodzące zmiany chemiczne. Ostateczny układ strukturalny produktów cyklokondensacji potwierdziła analiza krystalograficzna przeprowadzona przez zespół dr hab. Rafała Kruszyńskiego w Zakładzie Rentgenografii Strukturalnej i Krystalochemii Instytutu Chemii Ogólnej i Ekologicznej Politechniki Łódzkiej [załącznik 4, poz. 2, 6].

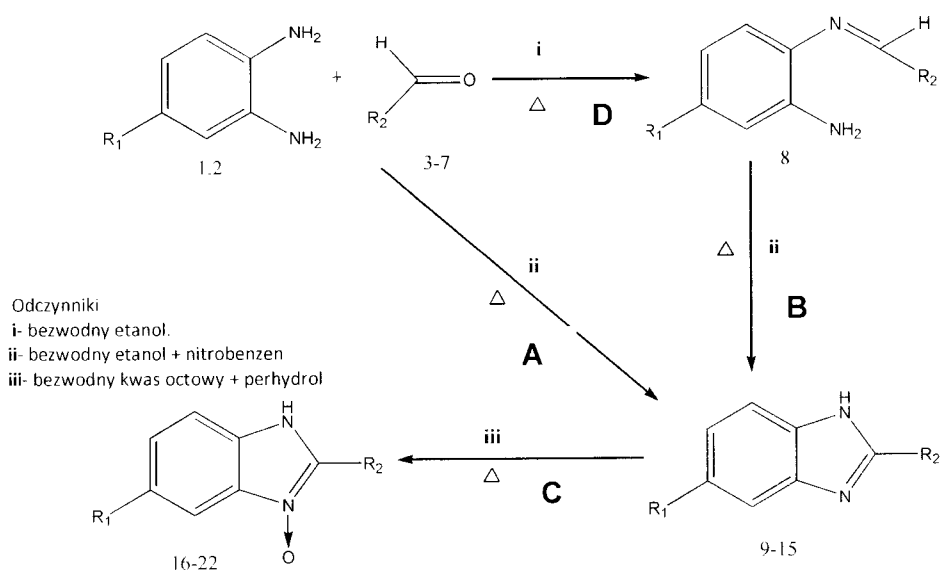
Szczegółowy przebieg syntez wszystkich otrzymanych związków opisałam w publikacjach [załącznik 4, poz. 3, 6].

4.5.1.1 Synteza pochodnych benzimidazolu

W wyniku przeprowadzonych syntez ustaliłam i zoptymalizowałam sposób otrzymywania pochodnych benzimidazolu. Dowiodłam, że pochodne benzimidazolu można otrzymywać w dwojaki sposób, a mianowicie poprzez bezpośrednią i pośrednią kondensację pochodnej diaminy z aldehydem. Poprzez bezpośrednią cyklokondensację (etap A, schemat 3) pochodnej 2-fenylenodiaminy (związek 1 lub 2, schemat 3) z aldehydem (piperonalem, aldehydem naftoesowym, 2-nitrobenzaldehydem, 4-chlorobenzaldehydem oraz 2-karboksybenzaldehydem) (związek 3-7, schemat 3) uzyskałam pochodne benzimidazolu (związek 9-15, schemat 3). Te same pochodne benzimidazolu syntezowałam także poprzez cyklizację produktu pośredniego o charakterze zasady Schiffa – pochodnej (N-metylideno)-2-fenylenodiaminy (związek 8, etap B, schemat 3). Opracowałam również sposób syntezy pochodnych (N-metylideno)-2-fenylenodiaminy (związek 8, etap D, schemat 3). Dowiodłam sposobu otrzymywania pochodnych N-tlenku benzimidazolu (związek 16-22, etap C, schemat 3) na drodze bezpośredniej reakcji utleniania pochodnych benzimidazolu roztworem perhydrofluorowego w środowisku bezwodnego kwasu octowego.

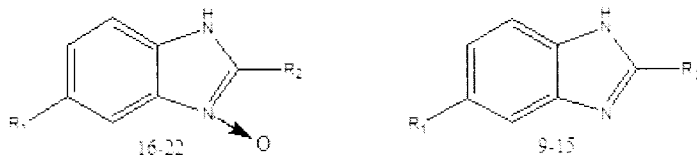
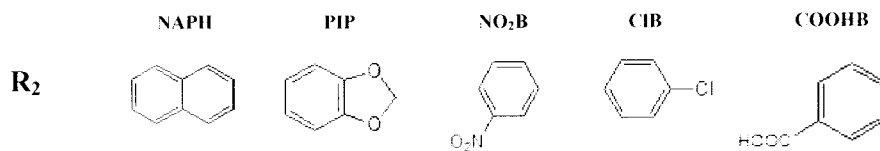
Ciąg syntetycznych przemian A-D przedstawia schemat 3.

Schemat 3: Synteza pochodnych benzimidazolu.



Struktury otrzymanych pochodnych benzimidazolu przedstawia rysunek 1.

Rysunek 1: Struktury otrzymanych pochodnych benzimidazolu: *podstawnik*:
 NAPH-2-naftyłowy, PIP-piperonyłowy, NO₂B-2-nitrofenyłowy, ClB-4-chlorofenyłowy,
 COOHB-2-karboksyfenyłowy

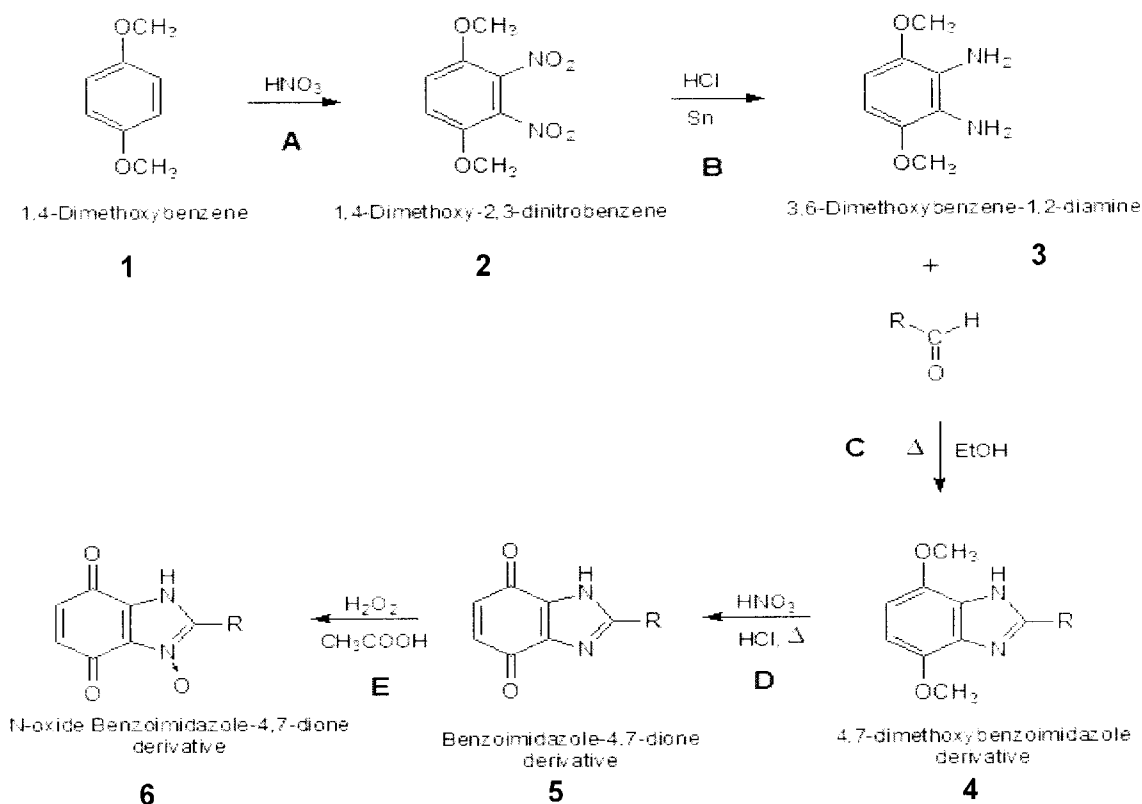
16 R₁=NO₂ R₂=ClB17 R₁=NO₂ R₂=NO₂B18 R₁=NO₂ R₂=PIF19 R₁=NO₂ R₂=NAPH20 R₁=Cl, R₂=PIF21 R₁=Cl, R₂=NAPH22 R₁=NO₂ R₂=COOHB9 R₁=NO₂ R₂=ClB10 R₁=NO₂ R₂=NO₂B11 R₁=NO₂ R₂=PIF12 R₁=NO₂ R₂=NAPH13 R₁=Cl, R₂=PIF14 R₁=Cl, R₂=NAPH15 R₁=NO₂ R₂=COOHB

4.5.1.2 Synteza pochodnych benzimidazolo-4,7-dionu

W wyniku przeprowadzonych reakcji chemicznych w drugiej grupie nowych połączeń heterocyklicznych ustaliłam optymalne warunki dla syntezy pochodnych benzimidazolo-4,7-dionu oraz ich analogów wzbogaconych o grupę N-tlenku. Zaprojektowane struktury postanowiłam uzyskać na drodze cyklokondensacji odpowiedniej diaminy aromatycznej z zaplanowanym aldehydem. Aby zrealizować to założenie przystąpiłam do ustalenia sposobu pozyskania 3,6-dimetoksybenzeno-1,2-diaminy (związek 3, etap B, schemat 4) – związku wyjściowego dla dalszych przegrupowań chemicznych. Ustaliłam, że substratem wyjściowym w syntezie pochodnych benzimidazolo-4,7-dionu będzie 1,4-dimetoksybenzen (związek 1, schemat 4). Związek ten poddałam standardowej reakcji nitrowania pierścienia benzenu dymiącym kwasem azotowym w celu otrzymania 1,4-dimetoksy-2,3-dinitrobenzenu (związek 2, etap A, schemat 4). Poprzez etap redukcji cyną w środowisku kwaśnym 1,4-dimetoksy-2,3-dinitrobenzenu do 3,6-dimetoksybenzeno-1,2-diaminy (związek 3, etap B, schemat 4) i cyklokondensacji diaminy (związek 3, etap C, schemat 4) z aldehydem (piperonalem, aldehydem naftoesowym, 2-nitrobenzaldehydem, 4-chloro-benzaldehydem oraz 2-karboksybenzaldehydem) (etap C, schemat 4), izolowałam pochodne 4,7-dimetoksybenzimidazolu (związek 4, schemat 4). Działając utleniającą mieszaniną dymiącego kwasu solnego i azotowego przekształciłam układ benzimidazolu do struktury benzimidazolo-4,7-dionu (związek 5, etap D, schemat 4). Ostatni etap wykonywanych przeze mnie przemian chemicznych polegał na przeprowadzeniu reakcji utleniania pierścienia benzimidazolo-4,7-dionu do N-tlenku w środowisku mieszaniny perhydrołu i bezwodnego kwasu octowego (związek 5, etap E, schemat 4).

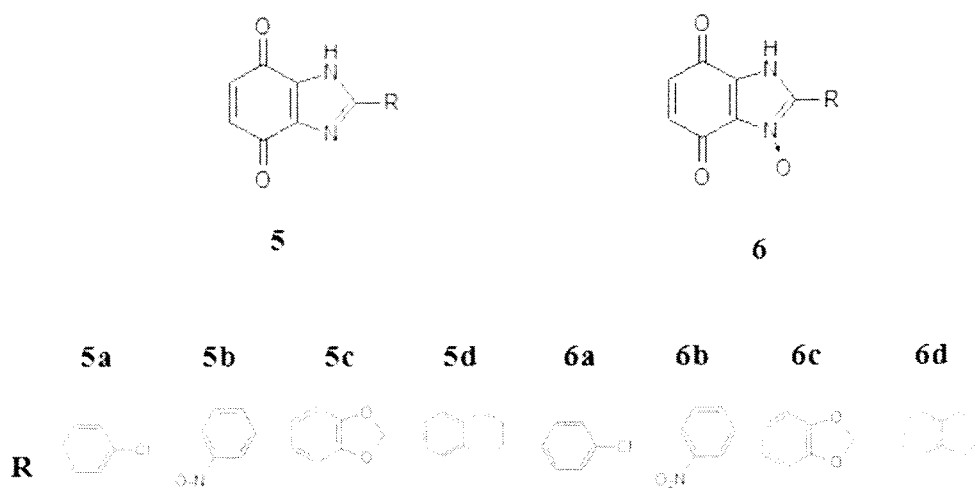
Ciąg syntetycznych przemian A-E przedstawia schemat 4.

Schemat 4: Synteza pochodnych benzimidazolo-4,7-dionu.



Struktury otrzymanych pochodnych benzimidazolo-4,7-dionu przedstawia rysunek 2.

Rysunek 2: Struktury wyizolowanych pochodnych benzimidazolo-4,7-dionu: podstawnik: *a*: 4-chlorofenyłowy, *b*: 2-nitrofenyłowy, *c*: piperonyłowy, *d*: 2-naftyłowy.



Podsumowując, w wyniku przeprowadzonych syntez:

1. otrzymałam 14 nowych pochodnych benzimidazolu oraz 8 nowych pochodnych benzimidazolo-4,7-dionu
2. ustaliłam warunki reakcji utleniania pochodnych benzimidazolu i benzimidazolo-4,7-dionu do N-tlenku benzimidazolu względnie N-tlenku benzimidazolo-4,7-dionu
3. wyizolowałam produkt pośredni towarzyszący syntezie benzimidazoli celem potwierdzenia możliwości otrzymania produktów finalnych poprzez cyklizację wcześniej izolowanej zasady Schiffa
4. potwierdziłam budowę wszystkich otrzymanych heterocyklicznych układów kompleksową analizą strukturalną
5. badania krystalograficzne dostarczyły informacji na temat przestrzennej budowy pierścienia benzimidazolu ze szczególnym zwróceniem uwagi na fakt występowania wiązania NH w pierścieniu imidazolu w konformacji *trans* i *cis* w stosunku do grupy nitrowej – podstawnika w pierścieniu benzimidazolu. Można zatem uznać, że cząsteczka benzimidazolu posiadająca podstawnik nitrowy w pozycji 6 posiada konformację *cis*, a cząsteczka z podstawnikiem nitrowym w pozycji 5 znajduje się w konformacji *trans*.

Przestrzenny układ sieci krystalicznej struktury benzimidazolu przedstawia rysunek 3.

Rysunek 3: Analiza X-ray struktury benzimidazolu na przykładzie związku 9.



4.5.2 Badania analityczne

Z uwagi na zaplanowane badania biologiczne, które zamierzałam prowadzić w standardowych warunkach hodowli komórkowej z zastosowaniem rozpuszczalników organicznych nieodzownym było przeprowadzenie analizy trwałości nowych połączeń chemicznych w korelacji czasu ekspozycji związku do zastosowanego środowiska badań biochemicznych. Dlatego w kolejnym etapie projektu dokonałam analizy trwałości otrzymanych połączeń chemicznych metodą HPLC lub UPLC poprzedzonej optymalizacją i walidacją wybranej metody chromatograficznej.

Trwałość pochodnych benzimidazolu w 0,2% roztworze DMSO określiłam techniką HPLC, natomiast parametry kinetycznej degradacji pochodnych benzimidazolo-4,7-dionu w różnych rozpuszczalnikach określiłam metodą UPLC.

Szczegółowy opis analiz chromatograficznych wybranych związków zamieściłam w publikacjach [załącznik 4, poz.1-2,6].

4.5.2.1 Analiza trwałości pochodnych benzimidazolu i N-tlenku benzimidazolu

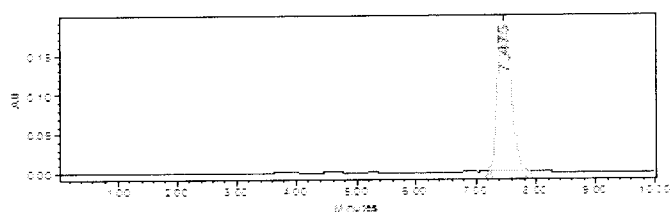
Problem naukowy dotyczył ustalenia trwałości wymienionych pochodnych w roztworze 0,2% DMSO – środowisku badań *in vitro*. W wyniku dokonanej optymalizacji i walidacji układu chromatograficznego ustaliłam, że związki należy analizować w układzie faz odwróconych RP-18 z zastosowaniem izokratycznej mieszaniny bufor/acetonytryl 1:1 (pH=4,5) jako fazy ruchomej, przy przepływie 1,0 mL/min i wykorzystaniu detektora UV monitorującego przebiegu analizy. Doświadczalnie ustaliłam czas t_0 oraz czasy retencji analizowanych związków. Ustaliłam liniowość metody w zakresie stężeń od 0,1 µg/mL do 0,1 mg/mL i współczynnika korelacji nie mniejszym niż $r^2=0,9995$. Precyzja i dokładność metody pozwoliły mi wyznaczyć trwałość pochodnych benzimidazolu i N-tlenku benzimidazolu, ze szczególnym uwzględnieniem uwolnienia połączenia N-tlenku w środowisku wodnym. Odzysk związków analizowanych zawierał się na poziomie 99,24-100%, w ściśle zaplanowanym czasie prowadzonych analizy, co dało mi podstawy do wysunięcia stwierdzenia, że 0,2% roztwory DMSO związków badanych wykazują jednorodność w czasie do 96h. Z punktu budowy strukturalnej spostrzegłam, że w czasie do 96h pochodne N-tlenku benzimidazolu nie wykazują rozpadu do ich analogicznych struktur pozbawionych ugrupowania N-tlenku.

Parametry selektywności i specyficzności metody prezentuję w tabeli 1 oraz na rysunku 4.

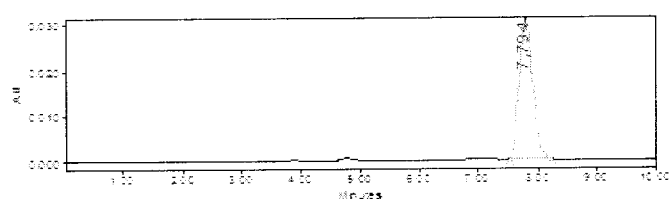
Tabela 1: Parametry analizy HPLC wybranych pochodnych benzimidazolu i N-tlenku benzimidazolu.

Stężenie 10 ³ [mg/mL]	Rt _[min]	k	n
zw. 11	7.475	3.7759e+00	5332
zw. 12	7.794	3.7202e+00	5636
zw. 18	4.611	1.9690e+00	3683
zw. 19	5.064	2.2607e+00	3208

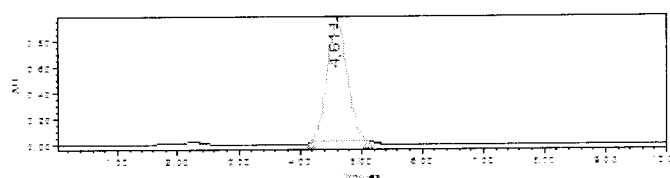
Rysunek 4: Chromatogramy pochodnych benzimidazolu
i N-tlenku benzimidazolu.



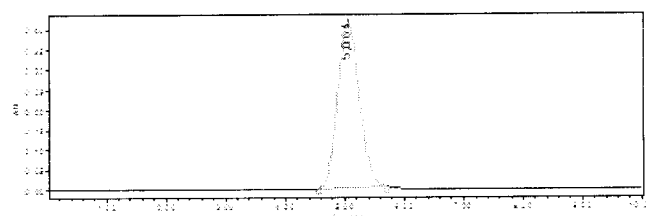
zw. 11



zw. 12



zw. 18



zw. 19

4.5.2.2 Analiza trwałości pochodnych benzimidazolo-4,7-dionu i N-tlenku benzimidazolo-4,7-dionu

W celu wykonania analizy trwałość pochodnych benzimidazolo-4,7-dionu i N-tlenku benzimidazolo-4,7-dionu dokonałam optymalizacji i walidacji metody RP-UPLC. W toku przeprowadzonych rozważań ustaliłam, że ze względu na polarność, związki będę analizować w układzie HSS-T3 (faza stacjonarna) oraz izokratycznej mieszaniny bufor/acetonitryl 70:30 (pH=2,4) (faza ruchoma). Uzyskałam specyficzne czasy retencji dla badanych związków wykorzystując do chromatograficznego rozdzielania mechanizm tworzenia form protonowych struktury pochodnej benzimidazolo-4,7-dionu.

Dla najlepszego rozdziału związków ustaliłam optymalny przepływ fazy ruchomej na poziomie 0,5mL/min. Wyzaczyłam liniowość metody w zakresie stężeń od 0,1µg/mL do 0,1mg/mL, współczynnik korelacji wyniósł nie mniej niż $r^2=0,9998$.

Założeniem analizy było określenie jednorodności otrzymanych przeze mnie nowych połączeń chemicznych. Wobec powyższego stabilność struktur wyznaczyłam czasem półtrwania $t_{1/2}$ oraz stopniem odzysku w konkretnych roztworach: wodzie; 0,9% NaCl; 0,2% DMSO i metanolu.

Wysoki stopień odzysku oraz długi okres półtrwania pochodnej benzimidazolo-4,7-dionu (związek 5b) w zastosowanych rozpuszczalnikach dowiodły trwałości tej struktury. Warto odnotowania pozostaje fakt, iż pochodna ta w roztworze wodnym i roztworze czystego metanolu nie uległa rozpadowi. Właściwość ta pozwala sklasyfikować pochodne benzimidazolo-4,7-dionu przed pochodnymi N-tlenku benzimidazolo-4,7-dion, choć te ostatnie charakteryzują się równie dobrymi parametrami stabilności. Uzyskane wyniki pozwoliły wyznaczyć optymalny czas (do 215h), w którym należy prowadzić testy *in vitro* z zastosowaniem środowiska 0,2% roztworu DMSO dla badanych pochodnych benzimidazolo-4,7-dionu i N-tlenku benzimidazolo-4,7-dionu.

Kinetyczne parametry degradacji pochodnej benzimidazolo-4,7-dionu i N-tlenku benzimidazolo-4,7-dionu prezentuje tabela 2.

Tabela 2: Kinetyczne parametry degradacji pochodnej benzimidazolo-4,7-dionu (5b) i N-tlenku benzimidazolo-4,7-dionu w wybranych roztworach (6b).

Związek 5b			
Solvent	k (h ⁻¹)	t _{1/2} (h)	R ²
0.9% NaCl	0,0003	130	0,97
H ₂ O	*	*	*
0.2% DMSO	0,0002	215	0,93
MeOH	*	*	*
Związek 6b			
Solvent	k (h ⁻¹)	t _{1/2} (h)	R ²
0.9% NaCl	0,0003	130	0,92
H ₂ O	0,0004	146	0,96
0.2% DMSO	0,00009	413	0,99
MeOH	0,0002	161	0,99

*brak rozkładu

4.5.3 Badania *in vitro*

4.5.3.1 Ocena wpływu pochodnych benzimidazolu i benzimidazolo-4,7-dionu na aktywność topoizomerazy I

Enzymy z grupy topoizomeraz, w trakcie procesów komórkowych takich jak: translacja, transkrypcja i replikacja, odgrywają bardzo ważną rolę dla zachowania stabilności struktury DNA. Naprężenia helisy DNA, które destabilizują strukturę są likwidowane przez topoizomerazy na zasadzie nacięć jednej (topoizomeraza I) lub obu nici DNA (topoizomeraza II). Aktywności topoizomeraz sprzyjają superhelikalne skręty lub zagięcia helisy zaś stopień skręcenia podwójnej nici DNA wpływa na szybkość reakcji cięcia. Topoizomeraza I łącząc się kowalencyjnie z końcem 3' i niekowalencyjnie z końcem 5' rozciętej helisy DNA tworzy tak zwany kompleks rozcinalny (*cleavable complex*). Tworzone wiązanie kowalencyjne z tymidyną, sąsiadującą z guaniną, wynika z powinowactwa enzymu do tego nukleozydu. W następstwie tego rozcięcia, nieprzecięta nie przechodzi przez wytworzone pęknięcie likwidując tym samym jedno oplecenie DNA. Ostatni etap procesu naprawczego to ponowne połączenie przeciętej nici DNA oraz odłączenie się topoizomerazy. Zaburzenie powyższego mechanizmu działania enzymu skutkuje śmiercią komórki na drodze nieprawidłowej replikacji, mutacji lub aberracji chromosomalnej. Dlatego wykorzystuje się topoizomerazę jako punkt uchwytu działania związków przeciwnowotworowych.

Istotną aktywność w tym kierunku wykazują pochodne benzimidazolu [18-20]. Wobec powyższego zaprojektowałam doświadczenie oceny aktywności otrzymywanych przeze mnie pochodnych benzimidazolu i benzimidazolo-4,7-dionu jako potencjalnych inhibitorów topoizomerazy I [załącznik 4, poz. 3]. Przeprowadziłam test z użyciem bromku etydyny jako markera stopnia relaksacji DNA. Stopień inhibicji topoizomerazy I badałam metodą fluorymetryczną. Podstawą oznaczeń była intensywność fluorescencji bromku etydyny, która wzrasta po połączeniu się z łańcuchem DNA. Związek ten jako interkalator wnika w helisę DNA, przy czym w większym stopniu wiąże się on z DNA superhelikalnym niż zrelaksowanym. Z powyższego wynika, że im większa intensywność badanej próby tym większy procentowy udział superhelikalnego DNA. Wzrost superhelikalnego DNA świadczy o zahamowaniu aktywności enzymu.

Odwrotnie, spadek intensywności badanej próby świadczy o większym procentowym udziale zrelaksowanego DNA czyli o braku inhibicji topoisomerazy I [20].

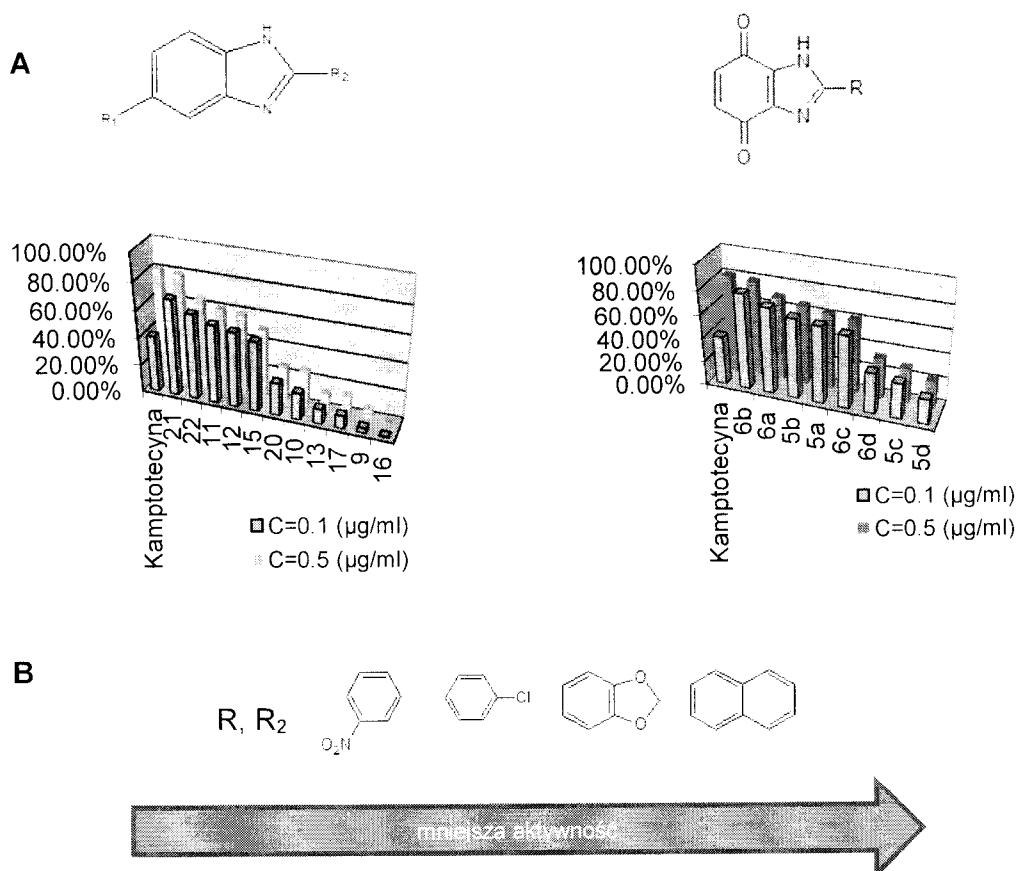
Dokonałam optymalizacji i walidacji metody. Ustaliłam dokładność analizy z odzyskiem na poziomie 99,61-100,51% i liniowością w zakresie od 0,1 µg/m – 2 µg/mL bromku etydyny, przy współczynniku korelacji nie mniejszym niż $r^2=0,9994$. Przeprowadzone oznaczanie intensywności bromku etydyny poprzedziłam godziną inkubacją mieszaniny badanego związku, roztworu DNA i jednej jednostki topoisomerazy I w temperaturze 37°C. Procentowy stopień zahamowania aktywności enzymu pod wpływem badanego związku porównałam z procentowym stopniem zahamowania aktywności enzymu pod wpływem aktywności kamptotecyny, substancji wzorcowej posiadającej udowodnioną aktywność jako inhibitor ludzkiej topoisomerazy I.

Przeprowadzona analiza wykazała, że pochodnych benzimidazolu w stężeniu 0,1 µg/mL oraz 0,5 µg/mL hamują aktywności topoisomerazy I. Przy czym aktywność związków w stężeniu 0,1 µg/mL była zdecydowanie wyższa niż aktywność kamptotecyny w tym samym stężeniu. Najwyższy stopień aktywności wykazały pochodne N-tlenku 5-nitrobenzimidazolu zawierające w swojej strukturze dodatkowo pierścień 2-nitrofenylowy względnie 4-chlorofenylowy (stopień inhibicji przy stężeniu 0,5 µg/mL wyniósł odpowiednio 79% i 81%). Dodatkowo na uwagę zasługuje fakt, iż pochodne o charakterze N-tlenku wykazały przewagę aktywności nad swoimi analogami strukturalnymi bez ugrupowania N-tlenku.

W zestawieniu aktywności pochodnych benzimidazolu w stosunku do aktywności pochodnych benzimidazolo-4,7-dionu w obu zastosowanych stężeniach (0,1 µg/mL oraz 0,5 µg/mL) wyższy stopień inhibicji wykazały pochodne benzimidazolo-4,7-dionu. W stężeniu 0,1 µg/mL związki te przewyższyły aktywność kamptotecyny, natomiast w stężeniu 0,5 µg/mL wykazały aktywność na poziomie zbliżonym do kamptotecyny. Zależność aktywności od struktury w tej klasie pochodnych kształtuje się identycznie jak w grupie pochodnych benzimidazolu. Wynika z tego, że N-tlenek 2-(2-nitrofenyleno)benzimidazolo-4,7-dionu posiada największą zdolność do inhibicji topoisomerazy I (zw. 6b 80%). W następnej kolejności klasyfikuje się: N-tlenek 2-(4-chlorofenyleno)benzimidazolo-4,7-dionu (zw. 6a 65%) przed 2-(2-nitrofenyleno)benzimidazolo-4,7-dionem (zw. 5b 60%) i 2-(4-chlorofenyleno)benzimidazolo-4,7-dionem (zw. 5a 59%).

Wyniki przeprowadzonej analizy prezentuję w postaci rysunku 5.

Rysunek 5: (A) Stopień zahamowania aktywności topoisomerazy I pod wpływem aktywności pochodnych benzimidazolu i benzimidazolo-4,7-dionu; (B) Zależność aktywności badanych związków od rodzaju podstawnika w pozycji 2 układu benzimidazolu i benzimidazolo-4,7-dionu.



4.5.3.2 Ocena molekularnych mechanizmów aktywności biologicznej badanych związków

W ostatnim etapie badań podjęłam się oceny aktywności biologicznej *in vitro* badanych związków na wybranych liniach komórek nowotworowych: ludzkiego czerniaka złośliwego WM115 oraz ludzkiego gruczolaka płuc A549. Analiza pochodnych benzimidazolu i benzimidazolo-4,7-dionu dotyczyła kwestii ich działania antyproliferacyjnego z użyciem testu WST w warunkach normoksji i hipoksji ze szczególnym zwróceniem uwagi na aktywność pochodnych N-tlenku benzimidazolu

i N-tlenku benzimidazolo-4,7-dionu w warunkach niedotlenienia. Test z użyciem enzymu kaspazy 3/7 zastosowałam do określenia śmierci komórek na drodze apoptozy. Natomiast jako czułego markera uszkodzeń struktury DNA użyłam test na fosforylację histonów H2AX seryny 139 - jednego z pierwszych dowodów modyfikacji chromatyny w odpowiedzi na uszkodzenie helisy DNA. Związkami referencyjnymi była tirapazamina i etopozyd.

Hodowle prowadziłam w warunkach normaksji (5% CO₂, 37°C) i hipoksji (1% O₂, 5% CO₂, 37°C), według standardowych procedur hodowlanych. Szczegółowy opis prowadzonych hodowli oraz testów *in vitro* wybranych związków zamieściłam w publikacjach [załącznik 4, poz. 4-5,7-9].

4.5.3.2.1 Ocena wybranych parametrów aktywności biologicznej pochodnych benzimidazolu

Wyniki przeprowadzonych przeze mnie testów dostarczyły interesujących i obiecujących spostrzeżeń, a mianowicie cztery pochodne benzimidazolu (zw. 9, 11, 16, 18) wykazały aktywność cytotoksyczną w warunkach normotlenowych, a trzy z nich (zw. 10, 12, 17) posiadają wyższą aktywność cytotoksyczną w warunkach hipoksji.

Skriningowy test późnej apoptozy zależnej od kaspazy 3/7 dowiódł, iż pochodne benzimidazolu w testowanych stężeniach w warunkach normoksji powodują zahamowanie wzrostu komórek linii A549, raczej na drodze zahamowania ich proliferacji bez wpływu na proces apoptozy. Próbę wyjaśnienia tego zjawiska podjęłam przeprowadzając test na fosforylację histonu H2AX. Zauważyłam, że związki te wywołują szybką i silną cytotoksyczność przebiegającą jednak bez uszkodzeń DNA na drodze fosforylacji histonu H2AX, co w połączeniu z ich zdolnością do hamowania aktywności topoizomerazy I może sugerować ich interkalacyjne właściwości zwłaszcza jeśli będe rozważać związek 11 i 12 jako potencjalne interkalatory.

Zaobserwowałam, że odmiennie do normoksji, aktywność testowanych związków w hipoksji sprzyja przeżywalności komórek ludzkiego gruczolaka płuc A549 na drodze przewagi apoptozy w stosunku do nekrozy komórek. Badane pochodne w hipoksji wykazały wyższy poziom uszkodzenia łańcucha DNA niż w normoksji. Związek 17 spowodował 2,5-krotny wzrost uszkodzeń DNA w odniesieniu do próby

kontrolnej. Zbliżony poziom uszkodzeń DNA (wzrost prawie dwukrotny w stosunku do próby kontrolnej) wykazał związek 16 i 10.

Reasumując, uzyskane wyniki pozwalają wysunąć tezę, iż pochodne 5-nitrobenzimidazolu wzbogacone o podstawnik 2-nitrofenylowy oraz 4-chloro-fenylowy to potencjalne bioredukcyjne związki, o selektywnej, cytotoksycznej aktywności w warunkach niedotlenienia.

Dodatkowo zauważyłam, że wartość IC_{50} dla związku 9 ($IC_{50}=22.42\pm 0.75\mu M$) i cisplatyny ($IC_{50}=18.2\pm 4.3\mu M$) względem komórek WM 115 są zbliżone co może świadczyć o potencjalnych silnych właściwościach cytotoksycznych związku [21-22].

Dlatego kwestia toksyczności tej grupy związków stanowiła moje kolejne zainteresowanie. Uznana metodą, która pozwala wstępnie określić toksyczność związku chemicznego dla struktur komórkowych jest test *in vitro* na erytrotoksyczność metodą Duncana. Ocena biozgodności, przeprowadzona przez dr. Joannę Sikorę z Zakładu Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, polegała na zbadaniu substancji lub materiału pod kątem bezpieczeństwa jego stosowania w żywych organizmach. Za produkt o dużej biozgodności można uznać związek charakteryzujący się brakiem toksyczności, brakiem wpływu na układ odpornościowy organizmu oraz nie wywołujący hemolizy. W pierwszym etapie badań oceniona została biozgodność nowo zsyntetyzowanych związków. W tym celu odpowiednio przygotowane ludzkie erytrocyty inkubowano w temperaturze 37°C przez 1 godzinę z nowymi pochodnymi benzimidazolu w pięciu stężeniach: 2µg/mL, 10µg/mL, 50µg/mL, 100µg/mL, 150µg/mL. W takich samych warunkach wykonano badania z substancjami wzorcowymi: kamptotecyną i tirapazminą. Jako 100% hemolizy czerwonych krwinek przyjęto absorbancję próby zawierającej 0.2 % roztwór tritonu X. Ponieważ badania były prowadzone na ludzkich erytrocytach, uwzględniono występowanie znacznych różnic osobniczych i dla każdego związku przeprowadzono badania pięciokrotnie na różnych próbach krwi, dokonując dwukrotnego pomiaru absorbancji dla każdej z nich. Zgodnie z danymi literaturowymi [23] substancję uznaje się za potencjalnie bezpieczną jeżeli % hemolizy, którą wywołuje nie przekracza 10%. Dlatego związki: 10, 17 i 16 w zakresie stężenia od 2 do 100µg/mL można uznać za biozgodne. Natomiast przy stężeniu 150µg/mL związki te powodowały hemolizę większą niż 10%. Związek 9 okazał się biozgodny w całym badanym zakresie stężeń (% hemolizy nie przekroczył wartości 10%).

Porównując wpływ badanych związków i tirapazaminy (substancji wzorcowej) na integralność błony erytrocytarnej, można stwierdzić, że nowo zsyntetyzowane związki wykazują słabe działanie niepożądane na błonę komórek erytrocytarnych. Tirapazamina już w najniższym badanym stężeniu 2 µg/mL spowodowała hemolizę większą niż 10%. Druga substancja wzorcowa - kamptotecyna w badanym zakresie stężeń nie wykazała niekorzystnego wpływu na integralność błony erytrocytarnej. Wyznaczony % hemolizy erytrocytów nie różnił się istotnie od próby inkubowanej z samym rozpuszczalnikiem (DMSO).

Wyniki testu erytrotoksyczności wskazują, że badane nowo zsyntetyzowane związki można uznać za potencjalnie biozgodne, co może mieć korzystne znaczenie w przypadku dalszych badań tych związków na zwierzętach.

4.5.3.2.2 Ocena wybranych parametrów aktywności biologicznej pochodnych benzimidazolo-4,7-dionu

Kontynuując badania biologiczne wykorzystujące hipoksję jako punkt uchwytu działania nowych związków z grupy pochodnych benzimidazolo-4,7-dionu, poddałam te substancje analizie cytotoksycznej testem WST. Próby ustalenia molekularnych mechanizmów zaburzeń proliferacji komórek nowotworowych przeprowadziłam z użyciem testu na uszkodzenie helisy DNA. Sposób rozpadu komórki nowotworowej określiłam testem na apoptozę. Powyższe testy przeprowadzone były względem dwóch linii komórek nowotworowych (WM 115 oraz A549) celem poszerzenia spektrum badań biologicznych.

Wyniki doświadczeń potwierdziły aktywność cytotoksyczną pochodnych benzimidazolo-4,7-dionu względem obu linii komórkowych zarówno w warunkach normoksji jak i hipoksji. Najlepsze właściwości antyproliferacyjne w korelacji normoksja/hipoksja wykazał związek 6b, którego współczynnik cytotoksyczności O/H wyniósł 4,31. Parametr ten klasyfikuje związek 6b na poziomie aktywności zbliżonej do tirapazaminy, dla której współczynnik cytotoksyczności O/H, wyznaczony doświadczalnie, wyniósł 4,61. Związki 6a, 6d, 5b, 5d scharakteryzowałam jako potencjalne cytotoksyczne czynniki ze szczególnym uwzględnieniem ich powinowactwa do komórek w stanie niedotlenienia.

Zastosowany test na apoptozę wykazał, że badane pochodne benzimidazolo-4,7-dionu sprzyjają apoptozie komórek zarówno w warunkach normotlenowych jak i niedotlenienia. Wynika z tego, że cytotoksyczność tych związków nie zaburza

zaprogramowanej, naturalnej apoptotycznej drogi umieralności komórki nowotworowej. Właściwość ta może mieć wpływ na siłę cytotoksycznego działania w pierwszej, wczesnej fazie rozwoju guza, w której to molekularne przemiany biochemiczne, które prowadzą do proliferacji unaczynienia guza są jeszcze bardzo słabe.

Test dotyczący uszkodzenia materiału genetycznego komórki nowotworowej pod wpływem wybranych pochodnych benzimidazolo-4,7-dionu dowiódł, że najlepszą aktywność w tym kierunku posiada związek 6b oraz 6a, a to prawdopodobnie za sprawą podstawnika 2-nitrofenylowego względnie 4-chlorofenylowego oraz ugrupowania N-tlenku.

Apoptotyczną umieralnością badanych komórek, połączoną ze zniszczeniem struktury DNA potwierdziłam klasyfikację pochodnych N-tlenku benzimidazolo-4,7-dionu jako wiodące struktury z racjonalnym, dalszym ich wykorzystaniem jako potencjalne inhibitory czynnika HIF-1 odpowiedzialnego za zdolności przystosowawcze komórki patologicznej do stanu głębokiej hipoksji.

Porównanie aktywności obu badanych grup związków to ostatni etap mojej pracy. Wyniki przeprowadzonych przeze mnie doświadczeń wskazały jednoznacznie, że zdecydowanie najlepsze właściwości cytotoksyczne posiadają pochodne N-tlenku benzimidazolo-4,7-dionu oraz N-tlenku benzimidazolu. Te dwie grupy pochodnych o strukturze N-tlenku charakteryzują się wysoką selektywnością do komórek nowotworowych w stanie niedotlenienia co potwierdził wysoki poziom uszkodzenia struktury DNA w warunkach hipoksji (2,75 raza więcej uszkodzonych komórek niż w próbie kontrolnej) w stosunku do poziomu uszkodzenia struktury DNA w warunkach normoksji (1,6 raza więcej uszkodzonych komórek niż w próbie kontrolnej) oraz zdecydowanie większy odsetek umieralności komórek nowotworowych na drodze zaprogramowanej apoptozy w warunkach hipoksji niż normoksji. Są to cechy odróżniająca te związki od ich analogów strukturalnych nie posiadających wiązania N-tlenku. Związki 9, 16 i 5a wykazały silną cytotoksyczność zarówno w warunkach normoksji jak i hipoksji co dowodzi ich niskiej selektywności.

4.5.3.2.3 Ocena aktywności biologicznej pochodnych tetrahydroakrydyny

Inną testowaną przez mnie grupą pochodnych obdarzonych potencjalną zdolnością do inhibicji aktywności topoizomerazy były pochodne tetrahydroakrydyny. Związki te to analogi strukturalne pochodnych akrydyny, które posiadają udowodnioną aktywność interkalacyjną struktury DNA.

Z szeregu szesnastu nowych pochodnych, otrzymanych przez dr hab. Pawła Szymańskiego z Zakładu Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, do badań *in vitro* wybrano związki z grupy pochodnych tetrahydroakrydyny wyróżnione podstawnikiem hydrazynonikotynowym lub fluorobenzoesowym. Przeprowadzone badania miały na celu określenie cytotoksycznego wpływu wymienionych pochodnych na wzrost i procesy życiowe komórek ludzkiego gruczolaka płuc A549 oraz porównanie aktywności obu wymienionych grup nowych substancji chemicznych. Przeprowadzony test antyproliferacyjny WST-1 potwierdził wyższą aktywność cytotoksyczną pochodnych kwasu fluorobenzoesowego w stosunku do pochodnych kwasu hydrazynonikotynowego. Ponadto zaobserwowano korelację wzrostu siły działania cytotoksycznego do długości łańcucha alifatycznego w strukturze pochodnych tetrahydroakrydyny z podstawnikiem fluorobenzoesowym. Przeprowadzony skrining siły cytotoksycznego działania obu wymienionych grup pochodnych pozwolił wyselekcjonować związki najbardziej skuteczne celem określenia ich wpływu na proces podziału komórkowego w fazie G0/1 oraz apoptozę komórki nowotworowej. Były to:

związek 5 - 6-hydrazyno-N-[7-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-ylamino)heptylo]-
nikotynamid – $IC_{50}=28,7\pm 3,5$;

związek 15 - 4-fluoro-N-[2-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-ylamino)oktano]be-
nzamid – $IC_{50}=13,4\pm 3,6$;

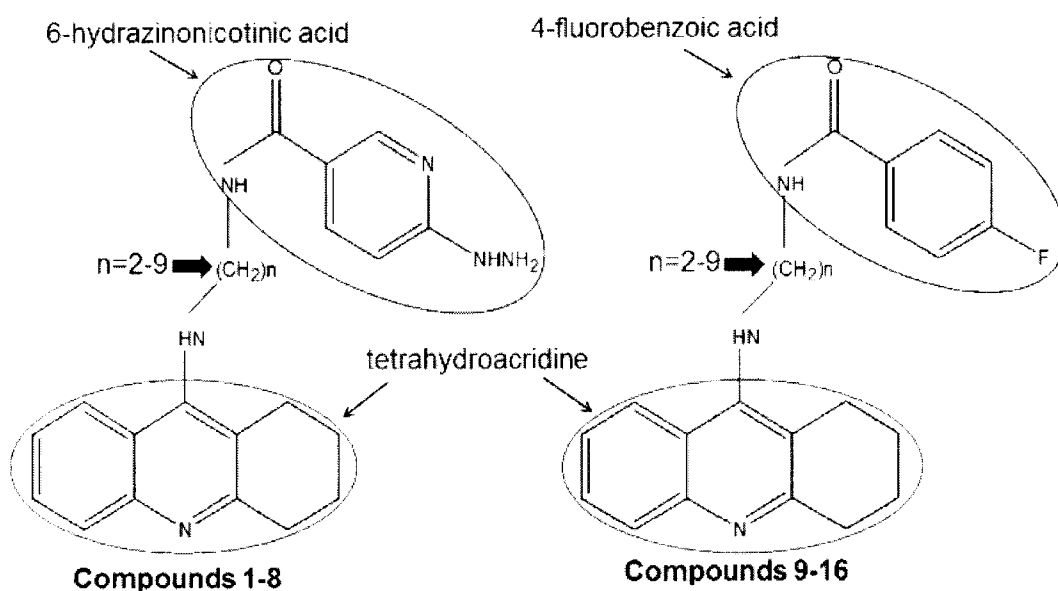
związek 16 - 4-fluoro-N-[2-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-ylamino)nonano]-
benzamid – $IC_{50}=8,5\pm 2,2$

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że zatrzymanie wzrostu komórek ludzkiego gruczolaka płuc A549, pod wpływem związku 15 i 16, następuje na skutek zahamowania cyklu komórkowego w fazie G0/1 oraz indukcji apoptozy zależnej od kaspazy 3/7. Uzyskane wyniki sugerują obiecujące właściwości przeciwnowotworowe w grupie pochodnych 4-fluoro-N-[ω -(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-ylamino)alkilo]benzamidu.

Struktury testowanych pochodnych tetrahydroakrydyny przedstawia rysunek 6.

Rysunek 6: Budowa strukturalna pochodnych tetrahydroakrydyny:

związek 5: $n=6$, związek 15: $n=8$, związek 16: $n=9$



4.6 Podsumowanie wyników badań stanowiących podstawę habilitacji

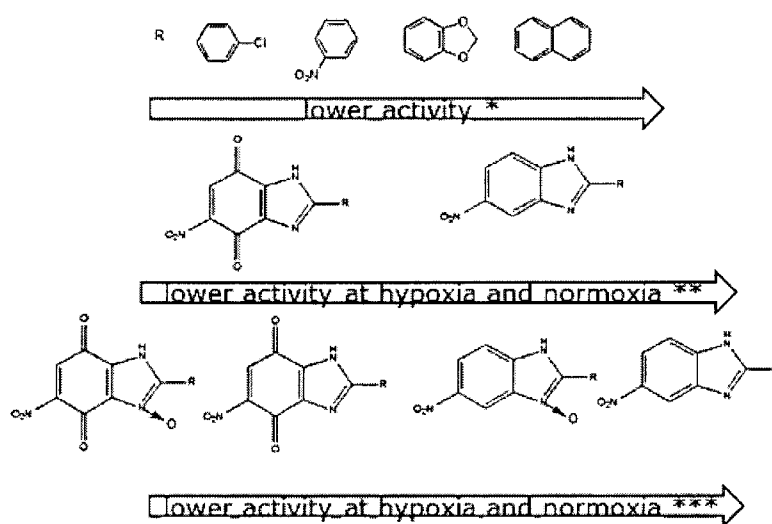
Główny cel realizowanego projektu skupiał się na określeniu zależności pomiędzy aktywnością biologiczną, a strukturą otrzymanych nowych związków heterocyklicznych celem wyselekcjonowania związku o najlepszych właściwościach bioredukcyjnych. Przeprowadzonymi eksperymentami dowiodłam, iż:

1. podstawnik 4-chlorofenyłowy w pozycji 2 układu benzimidazolu oraz benzimidazolo-4,7-dionu warunkuje najsilniejszą aktywność cytotoksyczną
2. klasyfikacja pozostałych podstawników w szeregu malejącej aktywności cytotoksycznej przedstawia się następująco: podstawnik: 2-nitrofenyłowy > piperonyłowy > naftyłowy
3. wszystkie związki posiadające jako podstawnik grupę nitrową w pozycji 5 układu benzimidazolu obdarzone są najwyższym potencjałem aktywności biologicznej w aspekcie selektywnego działania przeciwnowotworowego

4. dwie grupy chemiczne: N-tlenek oraz grupa nitrofenylowa występujące w jednej strukturze warunkują najsilniejszą aktywność cytotoksyczną w warunkach hipoksji
5. najlepsze parametry bioredukcyjne wykazały pochodne N-tlenku benzimidazolo-4,7-dionu przed pochodnymi N-tlenku benzimidazolu
6. z szeregu testowanych związków na uwagę zasługuje związek 17 i 5b. cytotoksyczność tych dwóch substancji w korelacji normoksja /hipoksja (O/H) jest zbliżona do analogicznego współczynnika O/H dla tirapazaminy i tym samym klasyfikują się te związki jako obiecujące czynniki bioredukcyjne
7. pochodne benzimidazolo-4,7-dionu powodują apoptotyczną śmierć komórek
8. prawdopodobny mechanizm cytotoksycznego działania pochodnych benzimidazolo-4,7-dionu to uszkodzenie struktury DNA
9. pochodne benzimidazolu zostały określone jako potencjalne interkalatory zaburzające strukturę DNA komórek guza na drodze hamowania aktywności topoisomerazy I.

Graficzny opis zależności aktywności biologicznej od budowy strukturalnej związku przedstawia rysunek 7.

Rysunek 7: Szereg aktywności pochodnych benzimidazolu i benzimidazolo-4,7-dionu w korelacji aktywność-struktura.



* sekwencja aktywności testowanych związków zależna od rodzaju podstawnika

** sekwencja aktywności testowanych pochodnych benzimidazolu i benzimidazolo-4,7-dionu

*** sekwencja aktywności testowanych pochodnych N-tlenku i ich analogów pozbawionych wiązania N-tlenku

Podsumowując swoje dotychczasowe osiągnięcia naukowe, pochodne benzimidazolu, a w szczególności pochodne benzimidazolo-4,7-dionu zasługują na uwagę jako potencjalne substancje przeciwnowotworowe. Wykazane właściwości cytotoksyczne w stosunku do komórek A549 i WM115 potwierdziły i powiększyły dotychczasową wiedzę na temat aktywności tych związków i możliwości ich wykorzystania jako czynników istotnych w pokonaniu bariery lekooporności guzów litych. Nowym spojrzeniem w tej materii jest fakt zastosowania pochodnych benzimidazolo-4,7-dionu, a zwłaszcza pochodnych N-tlenku benzimidazolo-4,7-dionu jako potencjalne bioredukcyjne proleki. Dlatego też pochodne benzimidazolo-4,7-dionu są nową, interesującą klasą związków, a ich właściwości stanowią moje dalsze wyzwanie naukowe w aspekcie ich zastosowania w terapii genowej z wykorzystaniem wektora adenowirusa kodującego nitroreduktazę niezbędną do aktywacji cytotoksycznych metabolitów.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

5.1 Tematyka badań przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych

Chemioterapia jest dziedziną nauk farmaceutycznych, która od lat ogromnie mnie pasjonuje. Będąc studentką wydziału farmacji Akademii Medycznej w Łodzi doświadczyłam zetknięcia z przeciwnowotworową tematyką badawczą bowiem uczestniczyłam w pracach koła naukowego zajmującego się wspomnianą tematyką. Współpraca ta zaowocowała moją dysertacją magisterską i dała mi możliwość kontynuowania rozpoczętych wówczas badań jako asystent Zakładu Chemii Farmaceutycznej i Analizy Leków. Myśl przewodnią moich badań naukowych to poszukiwanie selektywnej, wysoce specyficznej strategii przeciwnowotworowej, której punktem wyjścia są nowe substancje chemiczne o potencjalnych właściwościach cytotoksycznych. Postanowiłam wykorzystać fakt niedotlenienia środowiska guza nowotworowego jako punkt uchwytu działania moich nowych związków z grupy potencjalnych bioredukcyjnych czynników. Efektem zrealizowanych zamierzeń są pochodne chinazolinu z określoną aktywnością cytotoksyczną klasyfikowaną pomiędzy mitomycyną C a misonidazolem, których budowę i sposób działania zastrzegłam patentem. Badaniom syntetycznym towarzyszyła specjalizacja analityczna

w dziedzinie technik chromatograficznych. Ustaliłam jednorodność nowych pochodnych chinazoliny optymalnym układem chromatografii cienkowarstwowej TLC. Określiłam trwałość tych związków w środowisku badań biologicznych metodą HPLC, uprzednio poddaną optymalizacji i walidacji.

W centrum moich zainteresowań naukowych znalazły się również radiofarmaceutyki. Dlatego też drugim nurtem rozwijanych badań było poszukiwanie potencjalnych ligandów przeznaczonych do kompleksowania technetu, celem pozyskania nowych radiofarmaceutyków przeznaczonych do obrazowania czynności narządów, a zwłaszcza mózgu. Efektem tych badań są związki o charakterze zasad Schiffa, które z uwagi na swoje właściwości kompleksotwórcze i lipofilowe posłużyły jako ligandy dla radiofarmaceutyków w pracach badawczych prowadzonych w Ośrodku Badań Jądrowych POLATOM Otwock-Świerk.

Opisany powyżej dorobek naukowy zamieściłam w cyklu prac przeprowadzonych przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych, są to: 4 publikacje oryginalne, 1 publikacja przeglądowa oraz patent (zgłoszenie patentowe nr 331670, 2000), a także 9 wystąpień zjazdowych. (IF 2,314; 54 pkt. MNiSW).

5.2 Tematyka badań po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych, mój rozwój i specjalizację naukową dokumentuję 9 pracami doświadczalnymi, 3 pracami przeglądowymi, licznymi wystąpieniami na międzynarodowych zjazdach krajowych i zagranicznych oraz zgłoszeniem patentowym nr 395184 dokonany w roku 2012.

Łączny współczynnik wpływu IF i punktacja wg MNiSW wynoszą odpowiednio: 13,4; 190 pkt.

Czas po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych to dalsza moja specjalizacja w tematyce poznawania i wykorzystywania molekularnych mechanizmów nowotworzenia, bowiem nowotworzenie na skutek swojej złożonej specyfiki należy do wiodących patologii chorobotwórczych. W drodze kontynuacji interdyscyplinarnych badań podjęłam się prowadzenia doświadczeń dotyczących wpływu chemioterapeutyków na poszczególne szlaki przemian biochemicznych, które zachodzą

w komórkach nowotworowych. Poszukuję sposobów ograniczenia lekooporności jaka towarzyszy terapii przeciwnowotworowej oraz zwiększenia siły działania cytotoksycznego poprzez wpływ na poszczególne, specyficzne szlaki biochemiczne w wybranej strategii przeciwnowotworowej. Hipoksja jest cechą charakterystyczną wielu populacji nowotworów. Mimo, iż ogranicza ona skuteczną radio i chemioterapię to przez wielu naukowców, w tym również przeze mnie, wykorzystywana jest jako punkt uchwytu działania leków o bioredukcyjnym mechanizmie działania.

Bardzo ciekawym aspektem podjętym przeze mnie, podążającym w kierunku przezwyciężenia lekooporności jest wykorzystanie antyapoptotycznych szlaków jako kolejnego punktu uchwytu działania chemioterapeutyków. Wiadomym jest, że antyapoptotyczne przemiany warunkują komórkom nowotworowym nieśmiertelność poprzez zahamowanie apoptozy, a to z kolei przyczynia się do wzrostu lekooporności tkanek patologicznych. Zgodnie z rozwojem wiedzy w tej materii, prowadząc własne badania naukowe w omawianej klasie związków (pochodnych benzimidazolu oraz benzimidazolo-4,7-dionu) mogę z powodzeniem zaprezentować kolejny etap badań, którego głównym celem jest wykorzystanie strategii cytotoksycznej disulfiramu na wpływ aktywności chemioterapeutyków z grupy bioredukcyjnych proleków czyli pochodnych benzimidazolu i benzimidazolo-4,7-dionu. Zasadniczy problem dotyczy poszukiwań strategii zmniejszającej lub znoszącej lekooporność guzów litych.

Hipoksja wpływa nie tylko na etapy reakcji aktywacji proleku ale przede wszystkim zmienia biologię komórek poprzez wyzwolenie procesów adaptacyjnych takich jak stymulacja angiogenezą, erytropoezą czy alternatywnym metabolizmem komórek. Komórki nowotworowe charakteryzują się zdolnością do przeprogramowania swojego metabolizmu na glikolityczny, zahamowania fosforylacji oksydacyjnej i zwiększenia syntezy kwasów tłuszczowych de novo. Niedotlenienie powoduje aktywację czynnika transkrypcyjnego HIF-1, który odgrywa kluczową rolę w przeprogramowaniu metabolizmu komórek nowotworowych poprzez aktywację transkrypcji genów kodujących transportery glukozy i enzymy glikolityczne, co umożliwia zwiększenie glikolizy. Ponadto HIF-1 aktywuje kinazę dehydrogenazy pirogronianowej 1 (PDK1), która powoduje zmniejszenie oddychania mitochondrialnego. Przesunięcie oksydacyjnego metabolizmu w stronę glikolizy beztlenowej pozwala na utrzymanie homeostazy redoks i umożliwia przeżycie oraz proliferację komórek nowotworowych w warunkach niedotlenienia. Aktywacja

HIF-1 powoduje również zmniejszenie oddychania mitochondrialnego poprzez zwiększenie ekspresji PDK1 oraz indukcję autofagii mitochondriów zależnej od białka BNIP3. HIF-1 reguluje także równowagę między zużyciem tlenu, a produkcją ATP i toksycznych reaktywnych form tlenu (ROS) w odpowiedzi na hipoksję. W tkankach zdrowych wysoki poziom ROS aktywuje procesy uszkodzenia DNA, białek i tłuszczów czego następstwem jest zaprogramowana apoptoza komórek. W odróżnieniu od tkanek normalnych, komórki guza tolerują wysoki poziom ROS co prowadzi do ekspresji antyapoptotycznych białek, które chronią nowotwór przed chemioterapią. NFkB (nuclear factor-kappa B) jest kluczowym czynnikiem antyapoptotycznym i istotnym faktorem chemioterapii. Wiele nowotworów posiada podwyższoną aktywność tego czynnika białkowego. Aktywacja NFkB wyzwała serię molekularnych przemian w obrębie guza czego następstwem jest deregulacja genów kodujących antyapoptotyczne białka wyzwalająca lekooporność. Zastosowanie strategii wnikającej w zależność pomiędzy NFkB i ROS daje szansę na indukcję apoptozy komórek guza. Disulfiram, znany lek stosowany w leczeniu alkoholizmu, posiada właściwości cytotoksyczne i odwraca oporność lekową na drodze modyfikacji przemian ROS-NFkB. Właściwości te próbuję wykorzystywać jako alternatywę terapii tradycyjnej. U podstaw strategii z disulfiramem leży mechanizm zwiększenia wrażliwości tkanek patologicznych na aktywność chemioterapeutyków. Zgodnie z tymi oczekiwaniami, wykorzystanie bioredukcyjnych czynników w połączeniu z disulfiramem jest moim nowym spojrzeniem na problem chemiooporności. Dodatkowo, zaletą prezentowanej przeze mnie strategii jest jej aktywność w pierwszych, wczesnych etapach rozwoju choroby i w ten sposób wzrasta szansa na lepsze potencjalne rokowania lecznicze pacjentów [24].

Literatura:

1. W. R. Wilson and M. P. Hay, "Targeting hypoxia in cancer therapy," *Nature Reviews Cancer*, 11, 393-410, 2011.
2. W. A. Denny, "The role of hypoxia-activated prodrugs in cancer therapy," *The Lancet Oncology*, 1, 25-29, 2000.
3. J. M. Brown, "The Hypoxic Cell: A Target for Selective Cancer Therapy, Eighteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture," *Cancer Research*, 59, 5863-5870, 1999.

1. G. Chung-Faye, D. Palmer, D. Anderson, J. Clark, M. Downes, J. Baddeley, S. Hussain, P. I. Murray, P. Searle, L. Seymour, P. A. Harris, D. Ferry and D. J. Kerr, "Virus-directed, Enzyme Prodrug Therapy with Nitroimidazole Reductase: A Phase I and Pharmacokinetic Study of its Prodrug, CB1954," *Clinical Cancer Research*, 7, 2662-2668, 2001.
2. M. Tomasz, "Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective)," *Chemistry & Biology*, 2, 575-579, 1995.
3. B. G. Siim, F. B. Pruijn, J. R. Sturman, A. Hogg, M. P. Hay, J. M. Brown and W. R. Wilson, "Selective Potentiation of the Hypoxic Cytotoxicity of Tirapazamine by Its 1-N-Oxide Metabolite SR 4317," *Cancer Research*, 64, 736-742, 2004.
4. M. V. Papadopoulou and W. D. Bloomer, "NLCQ-1 (NSC 709257): Exploiting Hypoxia with a Weak DNA-Intercalating Bio-reductive Drug," *Clinical Cancer Research*, 9, 5714-5720, 2003.
5. L. H. Patterson and S. R. McKeown, "AQ4N: a new approach to hypoxia-activated cancer chemotherapy," *British Journal of Cancer*, 83, 1589-1593, 2000.
6. L. Garuti, M. Roberti, M. Malagoli, T. Rossi and M. Castelli, "Synthesis and Antiproliferative Activity of Some Benzimidazole-4,7-dione Derivatives," *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 10, 2193-2195, 2000.
7. I. Antonini, F. Claudi, G. Cristalli, P. Franchetti, M. Grifantini and S. Martelli, "Heterocyclic Quinones with Potential Antitumor Activity. "Synthesis and Antitumor Activity of Some Benzimidazole-4,7-dione Derivatives," *Journal of Medicinal Chemistry*, 31, 260-264, 1988.
8. L. Garuti, M. Roberti, D. Pizzirani, A. Pession, E. Leoncini, V. Cenci and S. Hrelia, "Differential antiproliferative activity of new benzimidazole-4,7-diones," *Il Farmaco*, 59, 663-668, 2004.
9. N. Boufatah, A. Gellis, J. Maldonado and P. Vanelle, "Efficient microwave-assisted synthesis of new sulfonylbenzimidazole-4,7-diones: heterocyclic quinones with potential antitumor activity," *Tetrahedron*, 60, 9131-9137, 2004.

- L. Weinberger and A. R. Day, "Syntheses of Dimethoxybenzimidazoles, Dihydroxybenzimidazoles and imidazo-p-benzoquinones", *The Journal of Organic Chemistry*, 24, 1451-1455, 1959.
- C.-K. Ryu, E.-H. Song, J.-Y. Shim, H.-J. You, K. U. Choi, I. H. Choi, E. Y. Lee and M. J. Chae, "Synthesis and Antifungal Activity of 2,5-Disubstituted-6-arylamino-4,7-benzimidazoles", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 13, 17-20, 2003.
- Jerchel D, Fischer H, Kracht M. "Zur darstellung der benzimidazole". *JustusLiebig's Annalen der Chemie* 575: 162, 1952.
- Preston PN. "Synthesis, reactions and spectroscopic properties of benzimidazoles", *Chem Rev* 74: 279-3145, 1974
- Panieres GC, Bonifas IA, Guadalupe JC, Lopez JE, Guadalupe G, Alvarez CT. "Synthesis of benzimidazoles in dry medium", *Synthetic Comm* 30: 2195, 2000.
- S. Jin, J. S. Kim, S.-P. Sim, A. Liu, D. S. Pilch, L. F. Liu and E. J. LaVoie, "Heterocyclic Bibenzimidazole Derivatives as Topoisomerase I Inhibitors." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 10, 719-723, 2000.
- A. S. Alpan, H. S. Gunes and Z. Topcu, "1H-Benzimidazole derivatives as mammalian DNA topoisomerase I inhibitors," *Acta Biochimica Polonica*, 54, 561-565, 2007.
- P. David Foglesong "Fluorometric methods employing low concentrations of ethidium bromide for DNA topoisomerase and endonuclease assays", *Analytical biochemistry*, 182, 284-288, 1989.
- D. W. Siemann and C. A. Hinchman, "Potentiation of cisplatin activity by the bioreductive agent tirapazamine," *Radiotherapy and Oncology*. 47, 215-220, 1998.
- Budzisz E., Miernicka M., Lorenz I.P., Mayer, P., Balcerzak E., Krajewska U., Rozalski M.: „Synthesis, X-ray structures and cytotoxic activity of platinum (II), palladium (II) and copper (II) complexes with chelating ligands”, *Eur. J. Med. Chem.* 45, 2613-2621, 2010.

Eur J Med Chem, 69: 601-8, 2013

- [25] P. Liu, S. Brown, T. Göktug, P. Channathodiyil, V. Kannappan, J-P. Hugnot, P-O Guicher, X. Bian, AL. Armesilla, JL Darling and W. Wang. "Cytotoxic effect of disulfiram/copper on human glioblastoma cell lines and ALDH-positive cancer-stem-like cells" *British Journal of Cancer* 1-10, 2012

5.3 Współpraca naukowa

Swoją pracę naukową prowadzę we współpracy z polskimi i zagranicznymi jednostkami naukowymi.

1. Dr hab. inż. Renata Mikołajczak, Ośrodek Radioizotopów POLATOM Narodowe Centrum Badań Jądrowych, Otwock
2. Dr hab. inż. Rafał Kruszyński, Zakład Rentgenografii Strukturalnej i Krystalochemii Instytutu Chemii Ogólnej i Ekologicznej Politechniki Łódzkiej
3. Prof. dr hab. inż. Tadeusz Bawczak, Zakład Rentgenografii Strukturalnej i Krystalochemii Instytutu Chemii Ogólnej i Ekologicznej Politechniki Łódzkiej
4. Dr n. farm. Marek Rożański, Zakład Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
5. Prof. dr hab. n. farm. Marek Mirowski, Zakład Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
6. Professor Maria de Jesus Perry, Department of Pharmaceutical Chemistry and Therapeutics, Faculty of Pharmacy of the University of Lisbon, Portugal
7. Professor Weiguang Wang, Research Institute in Healthcare Science, Faculty of Science and Engineering, University of Wolverhampton, Wolverhampton, Great Britain

5.4 Podsumowanie

Na mój całkowity dorobek naukowy składa się 13 prac oryginalnych o łącznej punktacji IF 15.714 (w tym po doktoracie ukazało się 9 prac - IF 13,4) oraz 4 prace poglądowe (3 z nich opublikowanych po doktoracie), które ukazały się w czasopiśmie z list MNISW o łącznej punktacji 244 pkt MNISW. Wyniki swoich badań przedstawiałam na 15 okazjach międzynarodowych w kraju i za granicą. Według bazy Web of Science moje prace były cytowane w literaturze 29 razy, wskaźnik Hirscha wynosi 3.

