



UNIwersytet Jagielloński
Collegium Medicum

Autoreferat

Karolina Słoczyńska

Wydział Farmaceutyczny
Zakład Biochemii Farmaceutycznej

Kraków 2023

Spis treści

1. Imię i nazwisko	4
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej	4
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych	4
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.....	5
4.1. Osiągnięcie naukowe stanowiące cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, zgodnie z art. 219 ust. 1 pkt. 2b ustawy	5
4.1.1. Tytuł osiągnięcia naukowego	5
4.1.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego	5
4.1.3. Prezentacja wyników stanowiących podstawę habilitacji	8
4.1.3.1. Wprowadzenie	8
4.1.3.1.1. Ocena bezpieczeństwa substancji o potencjalnym działaniu terapeutycznym	8
4.1.3.1.2. Metody alternatywne w ocenie bezpieczeństwa substancji	10
4.1.3.1.3. Wybrane punkty końcowe w badaniach nad bezpieczeństwem substancji	11
4.1.3.2. Założenia i cel pracy	14
4.1.3.3. Wyniki badań i dyskusja	15
4.1.3.4. Podsumowanie osiągnięcia naukowego	33
4.2. Pozostałe osiągnięcia naukowe	35
4.2.1. Odkrycie aktywności przeciwnowotworowej nowych metalokompleksów	35
4.2.2. Udowodnienie przydatności mikrobiologicznego testu <i>Vibrio harveyi</i> do skryningowej oceny aktywności mutagennej i antymutagennej nowych związków chemicznych o aktywności biologicznej.....	36
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.....	37
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę	39
7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej	42
8. Piśmiennictwo	47

1. Imię i nazwisko

Karolina Słoczyńska (nazwisko rodowe Stachura)

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

- | | |
|----------------|---|
| 2012, Luty | Uzyskanie tytułu doktora nauk farmaceutycznych
Specjalność: biochemia kliniczna
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków
Tytuł pracy: <i>Ocena wpływu wybranych związków o aktywności krążeniowej na parametry reologiczne i biochemiczne krwinek czerwonych</i>
Opiekun naukowy: prof. dr hab. Henryk Marona |
| 2006 – 2011 | Studia doktoranckie
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków |
| 2006, Czerwiec | Uzyskanie tytułu magistra analityki medycznej
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków
Tytuł pracy: <i>Wpływ analogu strukturalnego karwedilolu - enancjomeru S indololu na aktywność dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy we krwi ludzkiej</i>
Opiekun naukowy: dr hab. n. med. Marek Stępniewski, prof. UJ |
| 2001 – 2006 | Studia wyższe
Kierunek: analityka medyczna
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków |

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych

- | | |
|----------------|--|
| 2015 – obecnie | Adiunkt
Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków |
| 2014 – 2015 | Asystent
Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków |

2010 – 2014 Asystent
Pracownia Chemii Kosmetycznej, Zakład Chemii Bioorganicznej
Katedra Chemii Organicznej, Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

Przerwy w działalności naukowo-badawczej:

- okres przed doktoratem: 26.06.2009 r. - 30.09.2009 r. – nieobecność po urodzeniu dziecka (studia doktoranckie)
- okres po doktoracie: 05.03.2012 r. - 22.07.2012 r. – urlop macierzyński
23.07.2012 r. - 19.08.2012 r. – urlop macierzyński dodatkowy
01.06.2016 r. - 18.10.2016 r. – urlop macierzyński
19.10.2016 r. - 30.05.2017 r. – urlop rodzicielski
08.11.2017 r. - 27.03.2018 r. – urlop macierzyński
28.03.2018 r. - 06.11.2018 r. – urlop rodzicielski

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej

4.1. Osiągnięcie naukowe stanowiące cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2b ustawy

4.1.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Dobór i optymalizacja testów alternatywnych wykorzystywanych w ocenie bezpieczeństwa nowych substancji o zdefiniowanej aktywności biologicznej

4.1.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

H1 Słoczyńska K*, Waszkielewicz AM, Marona H. Preliminary assessment of mutagenic and anti-mutagenic potential of some aminoalkanolic derivatives of xanthone by use of the *Vibrio harveyi* assay. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2014, 768:8-13.

IF₂₀₁₄: 2,415; MEiN: 25

H2 Słoczyńska K*, Powroźnik B, Pękala E, Waszkielewicz AM. Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. *Journal of Applied Genetics* 2014, 55(2):273-285.

IF₂₀₁₄: 1,477; MEiN: 20

- H3 Słoczyńska K***, Pańczyk K, Waszkielewicz AM, Marona H, Pękala E. In vitro mutagenic, antimutagenic, and antioxidant activities evaluation and biotransformation of some bioactive 4-substituted 1-(2-methoxyphenyl)piperazine derivatives. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 2016, 30(12):593-601.
IF₂₀₁₆: 2,042; MEiN: 20
- H4 Słoczyńska K***, Wójcik-Pszczółka K, Canale V, Żmudzki P, Zajdel P, Pękala E. Biotransformation of 4-fluoro-N-(1-{2-[(propan-2-yl)phenoxy]ethyl}-8-azabicyclo [3.2.1]octan-3-yl)-benzenesulfonamide, a novel potent 5-HT₇ receptor antagonist with antidepressant-like and anxiolytic properties: in vitro and in silico approach. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 2018, 32(5):e22048.
IF₂₀₁₈: 2,965; MEiN: 20
- H5 Słoczyńska K**, Koczurkiewicz P*, Piska K, Powroźnik B, Wójcik-Pszczółka K, Kłaś K, Wyszowska-Kolatko M, Pękala E. Similar safety profile of the enantiomeric N-aminoalkyl derivatives of trans-2-aminocyclohexan-1-ol demonstrating anticonvulsant activity. *Molecules* 2019, 24(13):2505.
IF₂₀₁₉: 3,267; MEiN: 140
- H6 Popiół J**, Piska K, **Słoczyńska K***, Bień A, Żelaszczyk D, Gunia-Krzyżak A, Koczurkiewicz P, Wójcik-Pszczółka K, Marona H, Pękala E. Microbial biotransformation of some novel hydantoin derivatives: perspectives for bioremediation of potential sunscreen agents. *Chemosphere* 2019, 234:108-115.
IF₂₀₁₉: 5,778; MEiN: 140
- H7 Słoczyńska K***, Gunia-Krzyżak A, Koczurkiewicz P, Wójcik-Pszczółka K, Żelaszczyk D, Popiół J, Pękala E. Metabolic stability and its role in the discovery of new chemical entities. *Acta Pharmaceutica* 2019, 69(3):345-361.
IF₂₀₁₉: 1,375; MEiN: 40
- H8 Słoczyńska K***, Popiół J, Gunia-Krzyżak A, Koczurkiewicz-Adamczyk P, Żmudzki P, Pękala E. Evaluation of two novel hydantoin derivatives using reconstructed human skin model EpiskinTM: perspectives for application as potential sunscreen agents. *Molecules* 2022, 27(6):1850.
IF₂₀₂₂: 4,927; MEiN: 140

* autor korespondencyjny

Sumaryczny współczynnik wpływu (Impact Factor, IF) publikacji stanowiących podstawę habilitacji wynosi **24,246**, odpowiadająca mu suma punktów Ministerstwa Edukacji i Nauki (MEiN) to **545** punkty.

W publikacjach **H1-H4**, **H7** i **H8** jestem pierwszym i korespondencyjnym autorem, w publikacji **H5** jestem pierwszym autorem, natomiast w publikacji **H6** jestem autorem korespondencyjnym.

Wszystkie badania biologiczne opisane w pracach **H4**, **H5**, **H6**, **H8** i część badań opisanych w pracy **H3** zostały wykonane w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego UJ CM, natomiast badania opisane w pracy **H1** i część badań opisanych w pracy **H3** zostały zrealizowane w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Katedry Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego UJ CM w trakcie zatrudnienia w tej jednostce.

Badania finansowano z następujących źródeł:

1. Projekt pt.: *Ocena działania muta- i antymutagennego wybranych związków aktywnych w układzie krążeniowym oraz ośrodkowym układzie nerwowym*, nr K/DSC/000801, czas trwania: 2012 – 2013, finansowany przez UJ CM ze środków MNiSW w ramach dotacji celowej na rozwój młodych naukowców. Kierownik: dr Karolina Słoczyńska.
2. Projekt pt.: *Wstępna ocena metodami in vitro profilu aktywności mutagennej oraz antymutagennej wybranych związków o zdefiniowanej aktywności biologicznej*, nr K/DSC/001967, czas trwania: 2014 – 2015, finansowany przez UJ CM ze środków MNiSW w ramach dotacji celowej na rozwój młodych naukowców. Kierownik: dr Karolina Słoczyńska.
3. Projekt pt.: *Badania genotoksyczności i metabolizmu związków o zdefiniowanej aktywności w OUN z wykorzystaniem modeli in vitro*, nr K/DSC/003534, czas trwania: 2016 – 2017, finansowany przez UJ CM ze środków MNiSW w ramach dotacji na rozwój młodych naukowców. Kierownik: dr Karolina Słoczyńska.
4. Projekt pt.: *Biotransformacja in silico oraz in vitro nowych połączeń chemicznych o potencjalnej aktywności biologicznej*, nr K/DSC/005332, czas trwania: 2018, finansowany przez UJ CM ze środków MNiSW w ramach dotacji celowej na rozwój młodych naukowców. Kierownik: dr Karolina Słoczyńska.
5. Projekt pt.: *Modele komórkowe w ocenie wybranych parametrów ADMETox nowych związków o zdefiniowanej aktywności biologicznej*, nr K/ZDS/005488, czas trwania: 2015 – 2017, projekt statutowy finansowany przez UJ CM. Kierownik: prof. dr hab. Elżbieta Pękala.
6. Projekt pt.: *Badania biologiczne in vitro nowych związków aktywnych o potencjalnym zastosowaniu farmakologicznym*, nr K/ZDS/007826, czas trwania: 2018, projekt statutowy finansowany przez UJ CM. Kierownik: prof. dr hab. Elżbieta Pękala.
7. Projekt pt.: *Nowoczesna fotoprotekcja - opracowanie skutecznych i bezpiecznych filtrów UV w grupach pochodnych aryliidenohydantoiny i kwasu cynamonowego*,

nr 2016/21/B/NZ7/01756, czas trwania: 2017 – 2021, finansowany przez Narodowe Centrum Nauki. Kierownik: prof. dr hab. Elżbieta Pękała.

4.1.3. Prezentacja wyników stanowiących podstawę habilitacji

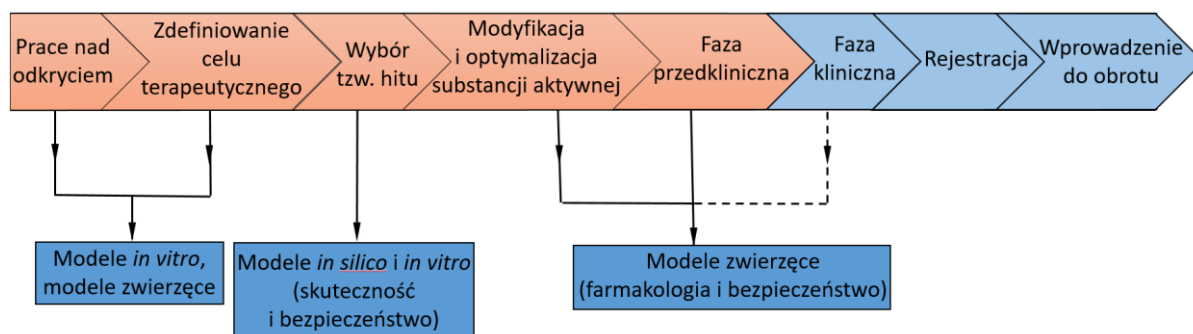
4.1.3.1. Wprowadzenie

Jednym z istotnych wyzwań stojących obecnie przed przemysłem farmaceutycznym jest odrzucenie obiecującego potencjalnego kandydata na lek, ze względu na nieprzewidziane działania niepożądane wykryte podczas przedklinicznych badań bezpieczeństwa zwierząt oraz badań klinicznych. Taka sytuacja powoduje znaczne wydłużenie czasu opracowania nowego, skutecznego leku, zwiększa koszty tego procesu i stanowi główną przyczynę niepowodzenia w procesie badawczo-rozwojowym produktu leczniczego. Podobny problem dotyczy sektora kosmetycznego i sytuacji, w której potencjalny surowiec kosmetyczny wykazuje nie opisane na wcześniejszych etapach prac badawczych niekorzystne działanie, uniemożliwiające zastosowanie w produktach kosmetycznych.

W świetle powyższych faktów oraz wobec restrykcyjnych wymagań dotyczących bezpieczeństwa stawianych nowym lekami przez agencje rejestrujące, podjęto powszechną dyskusję o **konieczności wczesnej oceny bezpieczeństwa nowych substancji o potencjale terapeutycznym** w celu usprawnienia procesu rozwoju nowych leków.

4.1.3.1.1. Ocena bezpieczeństwa substancji o potencjalnym działaniu terapeutycznym

Złożony proces w trakcie którego dochodzi do odkrycia i opracowania nowej substancji leczniczej (research and development, R&D), oprócz wysiłku niezliczonych naukowców wymaga olbrzymich nakładów finansowych i czasu. Ogólnie można wyróżnić cztery najbardziej kluczowe etapy tego procesu, takie jak: wczesna faza wstępna (early discovery), późna faza wstępna (late discovery), faza przedkliniczna (preclinical) i faza kliniczna (clinical). Badania przedkliniczne dostarczają ważnych danych dotyczących farmakodynamiki i parametrów ADME-Tox (absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity) cząsteczki (Rycina 1) [1].



Rycina 1. Kluczowe etapy w badaniach nad nowym lekiem (opracowano na podstawie [2]).

Skuteczność kandydata na lek jest niezbędna, ale może okazać się niewystarczającym czynnikiem, który zapewni sukces potencjalnej substancji leczniczej. Jako dwie główne przyczyny prowadzące do zaprzestania prac nad nowym lekiem, będącym już na etapie badań przedklinicznych lub klinicznych, podaje się niewystarczającą skuteczność oraz działanie toksyczne substancji [3, 4]. Przesłanki te mogą stanowić o niepowodzeniu leku także już po wprowadzeniu na rynek. Szacuje się, że jedynie 1 spośród puli 10 000 molekuł, które zostały objęte badaniami R&D stanie się lekiem dostępnym na rynku farmaceutycznym [5]. Zatem kluczowym jest, aby substancje wykazujące **efekty toksyczne były identyfikowane na wczesnych etapach badań** nad kandydatem na lek, co znaczenie skróciłoby czas oraz obniżyłoby koszty opracowania nowego leku. Aby osiągnąć te cele, badania bezpieczeństwa powinny być realizowane równolegle do badań optymalizujących korzystne działanie kandydata [6-9]. Wyniki badań z zakresu oceny bezpieczeństwa są wymagane przez agencje rejestrujące (Food and Drug Administration, European Medicines Agency) nie tylko do rejestracji i dopuszczenia substancji do obrotu, ale również do zatwierdzenia badań klinicznych leków oraz produktów higieny osobistej [2].

Z uwagi na fakt, że badania bezpieczeństwa odnoszą się do całego szeregu niekorzystnych efektów biologicznych, pełna ocena działania toksycznego danej substancji chemicznej jest procesem złożonym, opartym o zróżnicowane mechanizmy. Stąd też starając się uwzględnić różne rodzaje toksyczności, w badaniach *in vivo*, *in vitro* oraz *in silico* identyfikuje się tzw. **punkty końcowe** (endpoints). Wśród istotnych punktów końcowych wymienić należy m.in. działanie genotoksyczne, mutagenne, kancerogenne, teratogenne, hepatotoksyczne, kardiotoxyczne oraz drażniące. Równie istotne pozostają badania *in vitro* pozwalające na ocenę punktów końcowych niektórych parametrów ADME-Tox [5, 7, 10].

4.1.3.1.2. Metody alternatywne w ocenie bezpieczeństwa substancji

Testy oceny bezpieczeństwa prowadzone na zwierzętach (modele *in vivo*) opierają się na założeniu, że z uwagi na podobieństwa w fizjologii między zwierzętami i ludźmi obserwowany u tych organizmów efekt biologiczny może być zbliżony. Badania wykorzystujące modele zwierzęce są jednak pracochłonne, czasochłonne, kosztowne i budzą wątpliwości natury etycznej. Bez wątpienia nie mogą również zostać wykorzystane do badań przesiewowych leków, czy też rzeszy substancji wytwarzanych przez przemysł chemiczny [2].

Modele *in vitro* stanowią cenną alternatywę dla badań prowadzonych w warunkach *in vivo* i należą do **wysokowydajnych narzędzi badań przesiewowych**. W ostatnich latach w prawodawstwie europejskim obserwuje się rosnące zainteresowanie opracowaniem i walidacją **metod alternatywnych** służących ocenie bezpieczeństwa substancji chemicznych. Metody alternatywne to metody zgodne z **zasadą 3R** (replacement, reduction, refinement), mającą na celu zastąpienie i ograniczenie wykorzystywania zwierząt w eksperymentach oraz udoskonalenie metod badawczych z udziałem zwierząt. Zasada 3R, stanowiąca fundament etycznej dopuszczalności doświadczeń na modelu zwierzęcym, została sformułowana przez Russella i Burcha w 1959 r. [11]. Na rozwój metod alternatywnych wpływ miała także Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady „w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych” [12].

Modele *in vitro* stanowią podstawowe narzędzia badawcze wykorzystywane we wstępnej ocenie bezpieczeństwa nowo syntezowanych połączeń chemicznych. Niewątpliwą zaletą tych badań są: relatywnie niski koszt, powtarzalność oraz możliwość uzyskania wyników w niezbyt odległym czasie. Dzięki temu testowaniu można poddawać całe biblioteki związków, dokonując selekcji pod względem możliwości wystąpienia niekorzystnego efektu końcowego.

Badania *in vitro* najczęściej opierają się na wykorzystaniu hodowli komórkowych, w tym komórek mikroorganizmów; hodowli tkankowych; enzymów; czy frakcji subkomórkowych pozyskanych z homogenatu tkankowego. Hodowle komórkowe to popularne narzędzia badawcze, umożliwiające oszacowanie zdolności nowo syntezowanych leków do wywierania określonego efektu terapeutycznego bądź toksycznego, jak również możliwości przenikania barier biologicznych czy aktywacji szlaków sygnałowych [4, 13].

Pracom badawczym prowadzonym w warunkach *in vitro* często towarzyszą **analizy *in silico***, pozwalające na ewaluację dużej liczby molekuł w bardzo krótkim czasie. Badania te wykorzystują programy komputerowe oraz techniki symulacyjne i mogą stanowić dopełnienie badań *in vitro* oraz *in vivo* [14, 15]. Ponadto, unikalną zaletą metod obliczeniowych

jest możliwość przewidywania niekorzystnego działania lub metabolizmu tych struktur chemicznych, które jeszcze nie zostały zsyntezowane [16]. Wykorzystanie modelowania komputerowego w badaniach bezpieczeństwa kandydatów na lek umożliwia identyfikację tych aktywności substancji, które powinny być poddane bardziej szczegółowej analizie w badaniach *in vitro* oraz *in vivo* [17].

Metody *in vitro* i *in silico* nie są doskonałe i nie oddają w pełni złożoności i mnogości procesów zachodzących w organizmach żywych, stanowią jednak **cenną alternatywę dla badań na modelu zwierzęcym** i pozwalają na stosunkowo szybkie i tanie badania przesiewowe, które mogą zostać wykorzystane na etapie badań przedklinicznych nowych substancji leczniczych i na wczesnych etapach badań potencjalnych surowców kosmetycznych.

4.1.3.1.3. Wybrane punkty końcowe w badaniach nad bezpieczeństwem substancji

Mutagenność i genotoksyczność

Ocena **właściwości mutagennych i genotoksycznych** to obowiązkowy etap postępowania związanego z wprowadzaniem do badań klinicznych kandydatów na lek. Badania te dotyczą indukcji kancerogenezy oraz możliwości wystąpienia wad dziedzicznych [18]. Warto podkreślić, że rzeczywista ocena działania rakotwórczego substancji może być szacowana jedynie w długotrwałych badaniach na zwierzętach, które prowadzone są w dalszych fazach badań nad nowym lekiem.

We wstępnej ocenie działania mutagennego i genotoksycznego substancji sięga się po testy *in vitro* wykorzystujące modele komórkowe, których źródłem są bakterie, grzyby, owady oraz ssaki. Testy te umożliwiają wykrycie uszkodzeń DNA, mutacji genowych lub aberracji chromosomowych będących efektem ekspozycji na czynnik toksyczny [19]. Światowym standardem w tej dziedzinie jest **test Ames** (test *Salmonella*, test rewersji mutacji w komórkach bakteryjnych), oparty o indukcję przez czynnik mutageny mutacji powrotnych w operonie *his* zmodyfikowanych genetycznie szczepów *Salmonella typhimurium* [20, 21]. Na podobnych założeniach opiera się **test *Vibrio harveyi***, wykorzystujący morskie bakterie wrażliwe na neomycynę [22-24].

Test mikrojądrowy *in vitro* w komórkach ssaków to narzędzie oceny **genotoksyczności**, umożliwiające detekcję czynników aneugenicznych oraz klastogennych. W cytoplazmie komórek znajdujących się w interfazie analizuje się obecność mikrojąderek – struktur powstających w wyniku nieprawidłowości, które towarzyszą podziałowi komórki [25, 26].

Do innych testów wykorzystywanych w ocenie działania mutagennego i genotoksycznego substancji zaliczamy m.in. testy mutacji genowych oraz aberracji chromosomowych w komórkach ssaków, test kometowy i SOS-Chromotest [27-32].

Związki chemiczne pozbawione aktywności mutagennej niejednokrotnie analizuje się w kierunku **działania antymutagennego**. Ta korzystna aktywność biologiczna może zostać wykorzystana jako komponenta działania chemoprewencyjnego [33-35]. Testy oceniające działanie antymutagenne stanowią najczęściej modyfikację testów mutagenności, a organizm testowy ekspozowany jest zarówno na badaną substancję, jak i na mutagen [27].

Działanie cytotoksyczne

Testy **cytotoksyczności** oparte o hodowle komórkowe *in vitro* stanowią kluczowy element wczesnych etapów badań nad rozwojem nowego leku. Zgodnie z definicją w odniesieniu do systemów hodowli komórkowych *in vitro*, substancja cytotoksyczna zakłóca przyczepność komórek, znacząco zmienia morfologię, niekorzystnie wpływa na tempo wzrostu lub powoduje śmierć komórek [36, 37].

Badania cytotoksyczności *in vitro* prowadzone są zazwyczaj w oparciu o tradycyjne, dwuwymiarowe, jednowarstwowe hodowle komórek na płaskich powierzchniach [13]. Na etapie badań przedklinicznych głównymi kierunkami badań potencjalnych przyszłych leków są: ocena **hepatotoksyczności**, **kardiotoksyczności** oraz **neurotoksyczności** [13]. Odpowiedzią komórek na kontakt z substancją o charakterze cytotoksycznym jest spadek żywotności, który oceniany jest m.in. za pomocą testu MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). W teście mitochondrialna dehydrogenaza bursztynianowa obecna w żywych komórkach, redukuje żółtą sól tetrazolową do nierozpuszczalnego formazanu [37-39].

Hepatotoksyczność to jedna z najczęstszych przyczyn niepowodzenia podczas rozwoju nowych potencjalnych leków, jak również powodów wycofania dostępnych na rynku farmaceutyków z obrotu [40]. Wątroba z uwagi na udział w procesie detoksykacji ksenobiotyków jest szczególnie narażona na toksyczne działanie leków. Popularne metody oceny hepatotoksyczności bazują przede wszystkim na wyizolowanych komórkach wątroby (hodowle pierwotne), komórkach wątroby hodowanych wspólnie z innymi typami komórek oraz wątrobowych ustabilizowanych liniach komórkowych [13, 40]. W badaniach sięga się najczęściej po wątrobowe linie komórkowe wywodzące się z tkanki nowotworowej takie jak: HepG2, Huh-7, HepaRG oraz Hep3B [41, 42].

Metabolizm (biotransformacja)

Ocena **przemian metabolicznych (biotransformacji)** kandydata na lek stanowi istotny etap badań przedklinicznych. Pozwala odpowiedzieć na pytania dotyczące **stabilności metabolicznej** substancji (wyznaczenie parametrów takich jak m.in. czas półtrwania oraz klirens wewnętrzny), jak również powstających **metabolitów**. Wiedza z zakresu metabolizmu cząsteczki jest niezbędna w celu poznania indywidualnej odpowiedzi organizmu na daną substancję oraz przewidywania interakcji lekowych. Szybkie tempo biotransformacji skraca czas ekspozycji na aktywny związek macierzysty i może prowadzić do powstawania aktywnych, nieaktywnych lub toksycznych (m.in. wykazujących działanie mutagenne lub kancerogenne) związków potomnych. Z drugiej strony, wysoka trwałość metaboliczna może sprzyjać niepożądanym interakcjom lekowym i wystąpieniu efektów toksycznych [10].

W ostatnim czasie badania nad biotransformacją *in vitro* ksenobiotyków, w tym potencjalnych leków zyskały na znaczeniu, gdyż pozwalają m.in. wyselekcjonować do dalszych badań *in vivo* optymalny model zwierzęcy. Podstawowe narzędzia badawcze w badaniach biotransformacji *in vitro* to: systemy komórkowe (izolowane hepatocyty, homogenat wątroby, skrawki wątroby), **subkomórkowe frakcje wątrobowe** (mikrosomalna, cytozolowa, S9), enzymy rekombinowane – systemy ekspresji cytochromów P450 (system bazujący na komórkach ssaczych, systemy z wykorzystaniem bakulowirusów, ekspresja w komórkach drożdży i bakterii) oraz **modele mikrobiologiczne** (grzyby i bakterie) [10, 43-49].

Uzupełnieniem metod *in vitro* są przewidujące metabolizm cząsteczki narzędzia ***in silico*** takie jak MetaSite, MetabolExpert, Meteor Nexus czy Admet Predictor. Oprogramowania identyfikują w analizowanej strukturze chemicznej najbardziej prawdopodobne miejsca metabolizmu, przewidują struktury potencjalnych metabolitów oraz pozwalają na wytypowanie izoform CYP450 zaangażowanych w metabolizm [50-52].

Modele mikrobiologiczne znalazły zastosowanie nie tylko jako narzędzie w badaniach metabolizmu leków. Z uwagi na zdolność niektórych grzybów do biodegradacji zanieczyszczeń takich jak farmaceutyki, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, barwniki tekstylne czy estrogeny, organizmy te mogą zostać wykorzystane w **procesach bioremediacji** [53-58]. Tego typu działanie zmniejsza ryzyko biokumulacji toksycznych substancji i ich metabolitów w środowisku naturalnym.

4.1.3.2. Założenia i cel pracy

Badania nad bezpieczeństwem nowych substancji o potencjalnym działaniu terapeutycznym to kluczowy etap w długotrwałym procesie opracowania nowego leku. Im szybciej zostaną wykazane ewentualne działania niepożądane kandydata na lek, tym mniejsze nakłady finansowe i czasowe zostaną poniesione. Także dla branży kosmetycznej istotna jest ocena bezpieczeństwa stosowania nowych surowców kosmetycznych. Istnieje zatem potrzeba **poszukiwania i optymalizacji metod i narzędzi badawczych, pozwalających na identyfikację substancji wykazujących niekorzystne efekty biologiczne** na możliwie wczesnych etapach badań nad kandydatem na lek/ surowiec kosmetyczny [59]. Szeroka gama prostych i szybkich testów, umożliwiających wstępną ocenę potencjalnych mutagenów, kancerogenów czy substancji cytotoksycznych, opartych o **modele *in vitro* oraz techniki *in silico*** to **alternatywa dla badań *in vivo*** prowadzonych przy użyciu modeli zwierzęcych. Metody alternatywne obejmują procedury zgodne z zasadą 3R, mającą na celu zastąpienie, ograniczenie i udoskonalenie metod wykorzystujących zwierzęta w eksperymentach.

W oparciu o przedstawione założenia, **celem przeprowadzonych przeze mnie prac był dobór i optymalizacja testów alternatywnych oceniających bezpieczeństwo nowych substancji o zdefiniowanej aktywności biologicznej.**

Badania bezpieczeństwa prowadzono w następujących obszarach:

- **mutagenność i genotoksyczność,**
- **biotransformacja i stabilność metaboliczna,**
- **fototoksyczność, działanie drażniące i przenikanie przez naskórek,**
- **bezpieczeństwo środowiskowe.**

W pierwszej kolejności badaniami objęto **nowo zsyntezowane związki chemiczne o ustalonej aktywności w ośrodkowym układzie nerwowym.** Do prac wyselekcjonowano:

- **aminoalkanolowe pochodne ksantonu** oraz ***trans*-2-aminocykloheksan-1-olu**, których aktywność przeciwdrgawkowa została potwierdzona w badaniach farmakologicznych *in vivo* przeprowadzonych w ramach programu poszukiwania nowych leków przeciwpadaczkowych (Antiepileptic Drug Development Program) w Narodowym Instytucie Zdrowia (National Institutes of Health, Bethesda, Rockville, MD, USA),
- **pochodne 1-(2-metoksyfenylo)piperazyny** o udowodnionej w badaniach *in vivo* aktywności przeciwdepresyjnej,

- **arylosulfonamidową pochodną aryloksyalkiloamin** wykazującą potencjał terapeutyczny w leczeniu afektywnych schorzeń typu depresyjnego i lękowego, co wykazały badania na zwierzętach.

Drugą grupę badanych związków stanowiły **nowe połączenia chemiczne o charakterze potencjalnych surowców kosmetycznych**. Badaniami objęto:

- **pochodne hydantoiny** wykazujące aktywność fotoprotekcyjną potwierdzoną badaniami *in vitro*.

4.1.3.3. Wyniki badań i dyskusja

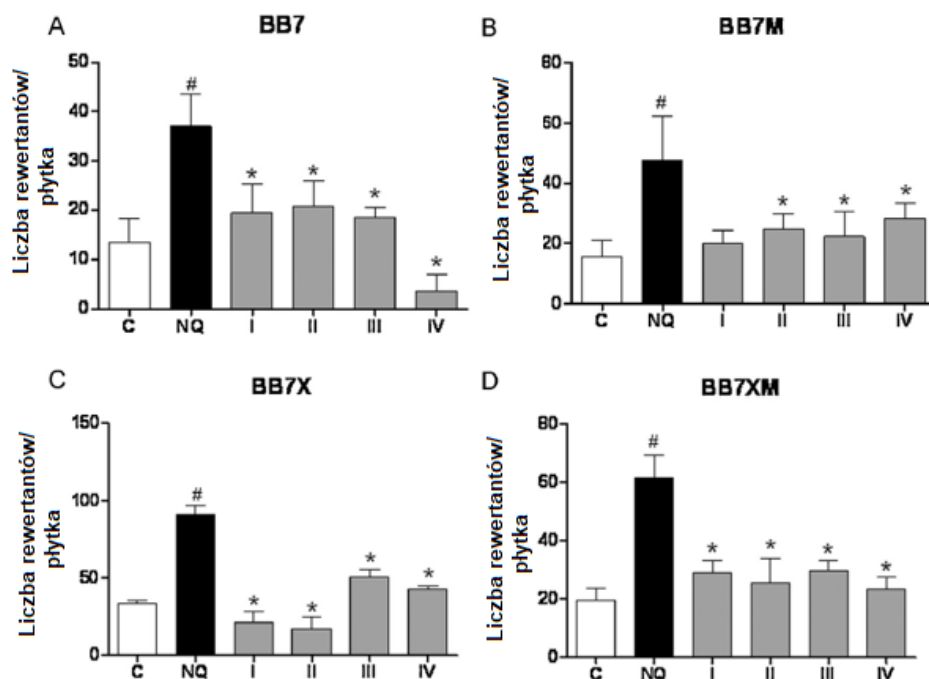
H1 Słoczyńska K, Waszkielewicz AM, Marona H. Preliminary assessment of mutagenic and anti-mutagenic potential of some aminoalkanolic derivatives of xanthone by use of the *Vibrio harveyi* assay. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2014, 768:8-13.

Celem badań podjętych w publikacji **H1** była ocena *in vitro* działania mutagennego i antymutagennego czterech aminoalkanolowych pochodnych ksantonu (I-IV) wykazujących działanie przeciwdrgawkowe. Tytułowe związki zostały zaprojektowane i zsyntezowane w Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych Wydziału Farmaceutycznego UJ CM [60-62], a następnie poddane badaniom farmakologicznym w kierunku aktywności przeciwdrgawkowej w ramach programu poszukiwania nowych leków przeciwpadaczkowych w Narodowym Instytucie Zdrowia w USA.

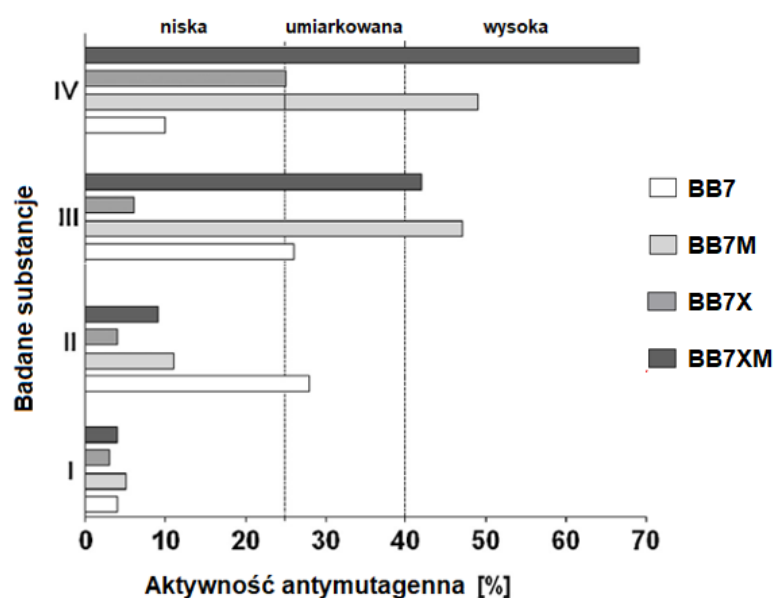
Jako model badawczy w pracy wykorzystano bakterie *Vibrio harveyi* wrażliwe na neomycynę. Test mutagenności *V. harveyi* został opracowany do detekcji zanieczyszczeń mutagennych środowiska [23, 63-65], z czasem jednak znalazł zastosowanie także w ocenie działania muta- i antymutagennego związków chemicznych [66-69]. W pracy **H1** wykorzystano cztery szczepy testowe *V. harveyi* (BB7, BB7M, BB7X i BB7XM) o odmiennej wrażliwości na działanie mutagenów, umożliwiające identyfikację szerokiego spektrum czynników modyfikujących strukturę DNA.

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń wykazano, że związki I-IV nie powodowały statystycznie istotnego wzrostu średniej liczby kolonii rewertantów względem próby kontrolnej wobec wszystkich testowanych szczepów (Rycina 2). Ponadto udowodniono, że związki III tj. (*R,S*)-*N*-metylo-1-amino-2-propanolowa pochodna 6-metoksyksantonu i IV tj. (*R*)-*N*-metylo-2-amino-1-butanolowa pochodna 7-chlorokksantonu (IV) odznaczają się wysoką

(> 40%) inhibicją działania mutagennego *N*-tlenku-4-nitrochinoliny (NQ) dla szczepów BB7M i BB7XM. Związek IV hamował działanie NQ na poziomie 69% (BB7XM) i 49% (BB7M), natomiast wskaźniki inhibicji dla związku III wyniosły 47% (BB7M) i 42% (BB7XM) (Rycina 3).



Rycina 2. Aktywność mutagenna związków I-IV w teście *Vibrio harveyi*. C – próba kontrolna bez mutagenu, NQ – próba z *N*-tlenkiem-4-nitrochinoliny. Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ odchylenie standardowe, (*) różnica statystycznie istotna w stosunku do próby z NQ, (#) różnica statystycznie istotna w stosunku do próby kontrolnej, $p < 0.05$.



Rycina 3. Aktywność antymutagenna związków I-IV w teście *Vibrio harveyi*. Wyniki wyrażono jako % inhibicji mutagenu wzorcowego *N*-tlenku-4-nitrochinoliny.

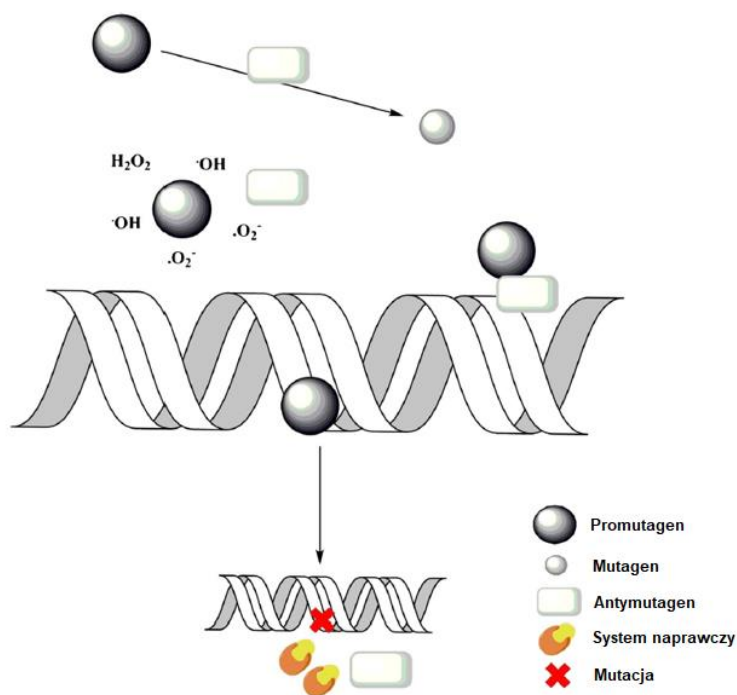
Podsumowując, wyselekcjonowane aktywne biologicznie aminoalkanolowe pochodne ksantonu nie wykazały efektu mutagennego w teście *Vibrio harveyi*, mogą zatem zostać włączone do dalszych badań na modelach *in vivo*. Ponadto, dwa z badanych związków (III i IV) odznaczały się działaniem antymutagennym, przypuszczalnie związanym z bezpośrednim efektem ochronnym wobec DNA. Doniesienia literaturowe potwierdzają aktywność przeciwnowotworową niektórych pochodnych ksantonu. Warto podkreślić, że praca stanowi kolejny przykład wykorzystania testu *Vibrio harveyi* w ocenie działania mutagennego i antymutagennego substancji o potencjalnym działaniu terapeutycznym.

H2 Słoczyńska K, Powroźnik B, Pękała E, Waszkielewicz AM. Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. *Journal of Applied Genetics* 2014, 55(2):273-285.

Z uwagi na realizowane prace badawcze z zakresu oceny działania antymutagennego związków chemicznych, w pracy przeglądowej **H2** w oparciu o dane literaturowe zebrano informacje dotyczące potencjalnych mechanizmów działania antymutagenów. Omówiono także narzędzia badawcze stosowane w ocenie działania mutagennego i antymutagennego substancji.

Według Novick i Szilard [70] termin „antymutagen” odnosi się do substancji (czynników) wykazujących zdolność do zmniejszania tempa lub częstotliwości powstawania indukowanych lub spontanicznych mutacji. Istnieją różne systemy klasyfikacji antymutagenów, w tym podział na naturalne i syntetyczne, czy desmutageny i bioantymutageny. Desmutageny działają pozakomórkowo, inaktywują czynniki mutagenne zanim dotrą one do DNA, natomiast bioantymutageny są aktywne wewnątrz komórki i uczestniczą w procesach naprawczych w sytuacji, kiedy doszło już do uszkodzenia materiału genetycznego.

Uwzględniając mechanizm działania, wśród antymutagenów możemy wyróżnić: związki o aktywności antyoksydacyjnej, substancje hamujące aktywację mutagenów, czynniki blokujące oraz substancje, których mechanizm działania jest złożony. Przykładowe mechanizmy działania antymutagenów przedstawia Rycina 4.



Rycina 4. Mechanizmy działania związków o aktywności antymutagennej.

Działanie niektórych mutagenów wiąże się z wytwarzaniem reaktywnych form tlenu (RFT), dlatego też ich usuwanie stanowi ważną strategię antymutagenozy. Badania potwierdzają, że związki o aktywności antyoksydacyjnej poprzez eliminację RFT chronią materiał genetyczny przed uszkodzeniami oksydacyjnymi mogącymi prowadzić do mutacji. Inne substancje z tej grupy wpływają na aktywność enzymów antyoksydacyjnych oraz poziom zredukowanego glutationu. W tej grupie antymutagenów znajduje się m.in. kwas liponowy oraz niektóre organiczne związki selenu.

Aby promutageny mogły stać się mutagenami i zadziałać uszkodzająco względem materiału genetycznego, niezbędna jest aktywacja metaboliczna, często z udziałem enzymów z rodziny cytochromu P450. Aktywność antymutagenna substancji może zatem wynikać z hamowania konwersji promutagenu do mutagenu. Takim działaniem charakteryzują się m.in. nowo syntezowane związki heterocykliczne zawierające azot i tlen.

Antymutageny należące do tzw. czynników blokujących, takie jak m.in. cysteina i kwas galusowy, chronią przed mutagenezą chemiczną wchodząc w bezpośrednią interakcję z mutagenami zanim dojdzie do uszkodzenia DNA. Inne czynniki blokujące mogą uniemożliwiać mutagenowi połączenie się z materiałem genetycznym.

Wiele substancji o potencjale antymutagennym wykazuje złożony mechanizm działania, warunkujący skuteczność oraz wysoką efektywność względem różnorodnych mutagenów.

Takim działaniem odznaczają się m.in. niektóre nowo syntezowane β -aminoketony, heterocykliczne aminy aromatyczne, pochodne luteoliny, ksantony czy ekstrakty roślinne (*Acacia salicina*, *Mangifera indica* L.).

Badania oceniające aktywność antymutagenną substancji prowadzi się w oparciu o modyfikację standardowych testów mutagenności (test Ames, test *Vibrio harveyi*, SOS chromotest). Istotą modyfikacji jest jednoczesna ekspozycja organizmu testowego na badaną substancję oraz na mutagen. W opracowaniu dokonano zestawienia zalet i wad wybranych testów umożliwiających oszacowanie potencjału antymutagennego substancji.

Dodatkowo w pracy omówiono strategię oceny działania mutagennego substancji, ze zwróceniem szczególnej uwagi na kolejne fazy badań i testy stosowane w poszczególnych etapach. Zgłębiono również mechanizmy działania wybranych mutagenów (m.in. azydek sodu, 9-aminoakrydyna, *N*-tlenek-4-nitrochinoliny), stosowanych w testach bezpieczeństwa.

Dokonany przegląd literatury dowodzi, że rośnie zainteresowanie poszukiwaniem nowych substancji wykazujących potencjał antymutagenny, który może być ważną komponentą działania chemoprewencyjnego. Zebrane pozycje piśmiennictwa stanowiły cenną przesłankę do realizacji badań z zakresu oceny aktywności antymutagennej substancji (publikacje **H3** i **H5**), a także prób wyjaśnienia mechanizmu działania tych związków (publikacja **H3**).

H3 Słoczyńska K, Pańczyk K, Waszkielewicz AM, Marona H, Pękała E. In vitro mutagenic, antimutagenic, and antioxidant activities evaluation and biotransformation of some bioactive 4-substituted 1-(2-methoxyphenyl)piperazine derivatives. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology 2016, 30(12):593-601.

Istotą kolejnej publikacji – **H3** była ocena *in vitro* działania mutagennego i antymutagennego sześciu (1-6) 4-podstawnych pochodnych 1-(2-metoksyfenylo)piperazyny o aktywności przeciwdepresyjnej [71]. Badane związki zostały zsyntezowane w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Katedry Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego UJ CM. W ramach pracy przeprowadzono również badania *in vitro* szacujące zdolność połączeń 1-6 do usuwania wolnych rodników oraz biotransformację w modelach *in vitro* i *in silico*.

Jako narzędzie badawcze w ocenie działania muta- i antymutagennego wykorzystano test Ames (*Salmonella*). Zrealizowane prace wykazały, że związki 1-6 nie powodowały istotnego zwiększenia liczby rewertantów w odniesieniu do kontroli negatywnej w teście bez i z aktywacją metaboliczną. Ponadto udowodniono, że testowane związki charakteryzują się działaniem antymutagennym (Tabela 1). Najbardziej korzystny efekt antymutagenny

zaobserwowano dla związku 1, który silnie hamował działanie mutagenne azotku sodu w przypadku pięciu (TA1535) i dwóch (TA100) stężeń testowych. Zaobserwowano, że związki posiadające łącznik 1,3-propylowy między grupą fenoksyłową a N-(2-metoksyfenylo)piperazyną charakteryzują się silniejszą aktywnością antymutagenną niż pochodne z łącznikiem etoksyetylowym. Udowodniono, że efekt antymutageny 1-6 nie wynika z działania antyoksydacyjnego badanych połączeń, które charakteryzowały się niską zdolnością do eliminacji syntetycznego rodnika DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl).

Tabela 1. Aktywność antymutagenna związków 1-6 w teście Ames. Wyniki wyrażono jako % inhibicji mutagenu wzorcowego azotku sodu (NaN₃).

Liczba rewertantów					
<i>Salmonella typhimurium</i>					
Związek	Stężenie (µg/ płytka)	TA 100		TA1535	
		Średnia ± SD	Inhibicja (%)	Średnia ± SD	Inhibicja (%)
Kontrola negatywna		90 ± 5	-	8 ± 2	-
Kontrola pozytywna	5	552 ± 9	-	409 ± 5	-
1	4	314 ± 38**	52 ^c	164 ± 7**	61 ^c
	20	324 ± 35**	49 ^c	203 ± 6*	51 ^c
	100	369 ± 31**	40 ^b	238 ± 15**	43 ^c
	500	391 ± 28**	35 ^b	214 ± 16**	49 ^c
	1000	369 ± 32*	40 ^b	123 ± 21**	71 ^c
2	4	365 ± 14**	40 ^b	151 ± 12*	64 ^c
	20	384 ± 29**	36 ^b	200 ± 6**	52 ^c
	100	377 ± 19**	38 ^b	203 ± 13**	51 ^c
	500	307 ± 8*	53 ^c	213 ± 9**	49 ^c
	1000	435 ± 13**	25 ^b	296 ± 13*	28 ^b
3	4	343 ± 6**	45 ^c	161 ± 9**	62 ^c
	20	301 ± 4**	54 ^c	210 ± 12*	50 ^c
	100	374 ± 26**	39 ^b	222 ± 8*	47 ^c
	500	359 ± 21*	42 ^c	315 ± 4*	23 ^a
	1000	449 ± 18**	22 ^a	274 ± 20**	34 ^b
4	4	337 ± 11**	47 ^c	137 ± 9**	68 ^c
	20	303 ± 3*	54 ^c	208 ± 13*	50 ^c
	100	395 ± 13**	34 ^b	205 ± 16**	51 ^c
	500	409 ± 8**	31 ^b	338 ± 19*	18 ^a
	1000	457 ± 21**	21 ^a	355 ± 12**	13 ^a
5	4	395 ± 5**	34 ^b	283 ± 4*	31 ^b
	20	454 ± 12**	21 ^a	289 ± 6**	30 ^b
	100	464 ± 6**	19 ^a	283 ± 6**	31 ^b
	500	460 ± 12**	20 ^a	319 ± 5**	22 ^a
	1000	386 ± 6**	36 ^b	294 ± 4**	29 ^b
6	4	380 ± 3**	37 ^b	330 ± 7**	20 ^a
	20	408 ± 4**	31 ^b	299 ± 3**	27 ^b
	100	461 ± 4*	20 ^a	321 ± 6**	22 ^a
	500	393 ± 10**	34 ^b	343 ± 11**	16 ^a
	1000	373 ± 4**	39 ^b	372 ± 9*	9 ^a

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ istotność statystyczna względem kontroli dodatniej (NaN₃); wyniki wyrażono jako średnia ± odchylenie standardowe; ^a brak działania antymutagennego (inhibicja < 25%), ^b umiarkowane działanie antymutagenne (inhibicja 25% - 40%), ^c silne działanie antymutagenne (inhibicja > 40%).

W modelu mysich mikrosomów wątrobowych zidentyfikowano trzy główne metabolity związku 2 i cztery główne metabolity związku 6, będące w większości produktami hydroksylacji, która zaszła zarówno w podstawniku metylowym, jak i przy atomach węgla w pierścieniu aromatycznym (Tabela 2). Związek 6 charakteryzował się okresem półtrwania ($t_{1/2}$) wynoszącym 21,5 min oraz klirensiem wewnętrznym (Cl_{int}) równym 80,5 $\mu\text{l}/\text{mg min}$. Dla związku 2 $t_{1/2}$ wyniósł 30,3 min, a Cl_{int} 57,3 $\mu\text{l}/\text{mg min}$. Analiza ścieżki biotransformacyjnej *in silico* wykazała, że główne metabolity związku 2 powstały na drodze alifatycznej hydroksylacji lub utlenienia grupy metylowej do karbonylowej, a w przypadku związku 6 w wyniku dealkylacji.

Tabela 2. Główne metabolity związków 2 i 6 w modelu mysich mikrosomów wątrobowych; M0 - związek macierzysty.

Związek	Metabolit	ΔM	$[M+H]^+$	Czas retencji (min)	Zawartość wśród metabolitów (%)	Przemiana chemiczna
2	M0	-	355	5,63	-	-
	M1	+16	371	4,34	46	Alifatyczna hydroksylacja
	M2	+16	371	4,94	30	Alifatyczna hydroksylacja
	M3	-14	341	5,20	24	O-dealkilacja
6	M0	-	405	5,57	-	-
	M1	+16	421	4,75	38	Aromatyczna hydroksylacja
	M2	+16	421	4,62	35	Aromatyczna hydroksylacja
	M3	-14	391	5,18	19	O-dealkilacja
	M4	+16	421	4,51	8	Alifatyczna hydroksylacja

Podsumowując, wyniki badań opisanych w publikacji **H3** dowiodły braku potencjału mutagennego wybranych 4-podstawnych pochodnych 1-(2-metoksyfenylo)piperazyny w teście Ames. Jednocześnie wykazano aktywność antymutagenną połączeń 1-6, najkorzystniejszą dla związku 1. Badania biotransformacji *in vitro* wykazały, że wartości Cl_{int} dla związków 2 i 6 są niższe, niż te opisane w literaturze dla leku o działaniu przeciwdepresyjnym - imipraminy. Uzyskane wyniki mogą stanowić cenny krok poszerzający charakterystykę biologiczną wybranych pochodnych piperazyny.

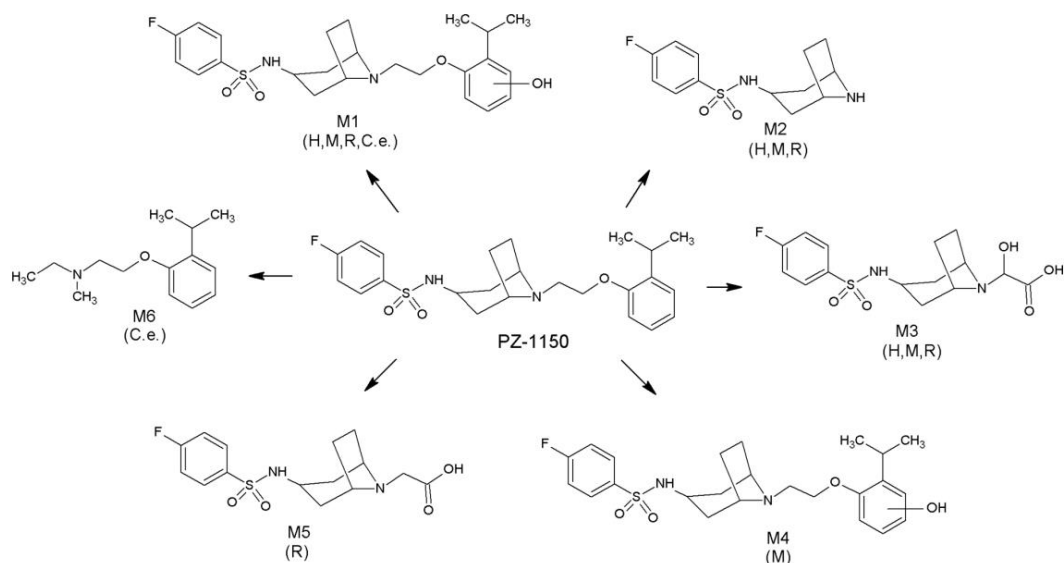
H4 Słoczyńska K, Wójcik-Pszczółka K, Canale V, Żmudzki P, Zajdel P, Pękala E. **Biotransformation of 4-fluoro-N-(1-{2-[(propan-2-yl)phenoxy]ethyl}-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-yl)-benzenesulfonamide, a novel potent 5-HT₇ receptor antagonist with antidepressant-like and anxiolytic properties: in vitro and in silico approach.** *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 2018, 32(5):e22048.

Kolejna praca – **H4** dotyczyła badań nad metabolizmem 4-fluoro-N-(1-{2-[(propan-2-yl)fenoksy]etylo}-8-azabicyklo[3.2.1]oktan-3-ylo)-benzenosulfonamidu (PZ-1150), nowego

antagonisty receptora 5-HT₇, wykazującego aktywność przeciwdepresyjną i przeciwłękową [72]. PZ-1150 został zaprojektowany i zsyntezowany w Katedrze Chemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego UJ CM. W badaniach nad biotransformacją PZ-1150 wykorzystano modele *in vitro*: mikrosomalny i mikrobiologiczny (*Cunninghamella*) oraz model *in silico* – oprogramowanie MetaSite.

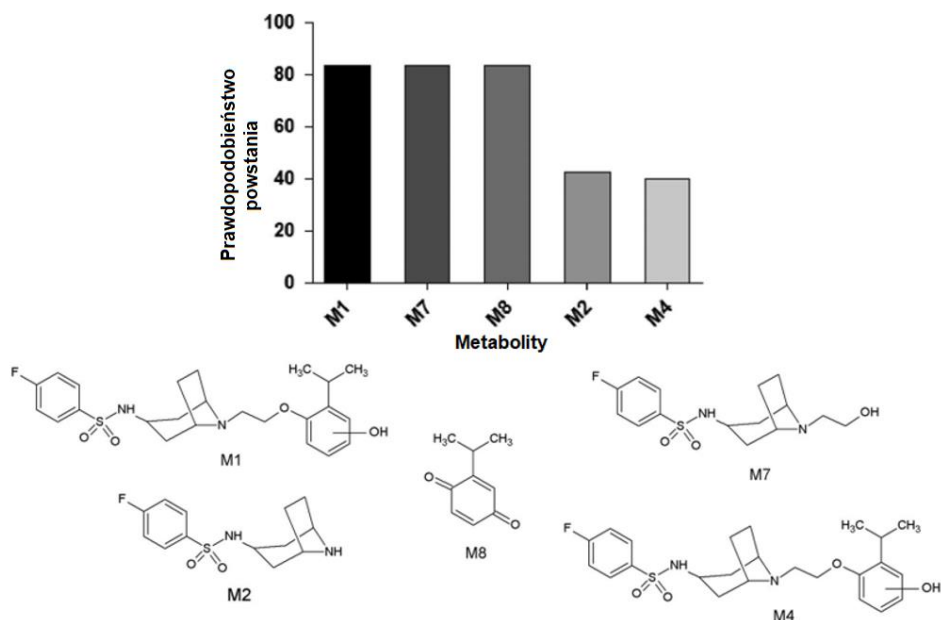
W modelu mikrosomalnym posłużono się mikrosomami wątrobowymi pochodzącymi od ludzi (human liver microsomes, HLMs), myszy (mouse liver microsomes, MLMs) i szczurów (rat liver microsomes, RLMs). W toku badań udokumentowano powstanie trzech głównych metabolitów (M1-M3), stanowiących produkty aromatycznej hydroksylacji; *N*-dealkilacji; *O*-dealkilacji i hydroksylacji (Rycina 5). Dodatkowo inkubacja z MLMs prowadziła do powstania kolejnego produktu aromatycznej hydroksylacji (M4) pierścienia benzenowego, podczas gdy pod wpływem RLMs powstał dodatkowy metabolit będący produktem *O*-dealkilacji (Rycina 5). W modelu HLMs PZ-1150 wykazał najwyższą wartość *in vitro* $t_{1/2}$ równą 64 min i w efekcie najniższą wartość $Cl_{int,micr}$ (54,1 μ l/mg min), w porównaniu z MLMs ($t_{1/2}$ = 21 min, $Cl_{int,micr}$ = 166,6 μ l/mg min) i RLMs ($t_{1/2}$ = 6 min, $Cl_{int,micr}$ = 577,5 μ l/mg min). Na podstawie $Cl_{int,micr}$ wyznaczono wartość klirensu wewnętrznego (Cl_{int}), która wyniosła dla HLMs 48,7 ml/min kg i klirens wątrobowy (Cl_H) o wartości 14,7 ml/min kg.

Po siedmiu dniach inkubacji w modelu *Cunninghamella echinulata* około 70% związku macierzystego zostało zmetabolizowane do dwóch głównych metabolitów (M1 i M6) (Rycina 5). M1 stanowił metabolit dominujący i był tożsamy z metabolitem M1 uzyskanym w modelu mikrosomalnym, podczas gdy M6 stanowił nowy metabolit, powstały w następstwie dealkilacji związku macierzystego.



Rycina 5. Ścieżka metaboliczna PZ-1150 w modelu mikrosomalnym (H – mikrosomy ludzkie, M – mikrosomy mysie, R – mikrosomy szczurze) oraz *Cunninghamella echinulata* (C. e.).

Program MetaSite wysymulował główne metabolity PZ-1150, które powstały na skutek aromatycznej hydroksylacji (M1), *o*-*O*-dearylacji (M7) i *p*-*O*-dearylacji (M8). M2 to produkt *N*-dealkilacji, a M4 aromatycznej hydroksylacji (Rycina 6). Oprogramowanie MetaSite wykorzystano także do identyfikacji izoform cytochromu P450 uczestniczących w metabolizmie PZ-1150. Analiza wykazała zaangażowanie 9 izoform CYP450 (CYP1A1, 1A2, 2B6, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4 i 3A5).



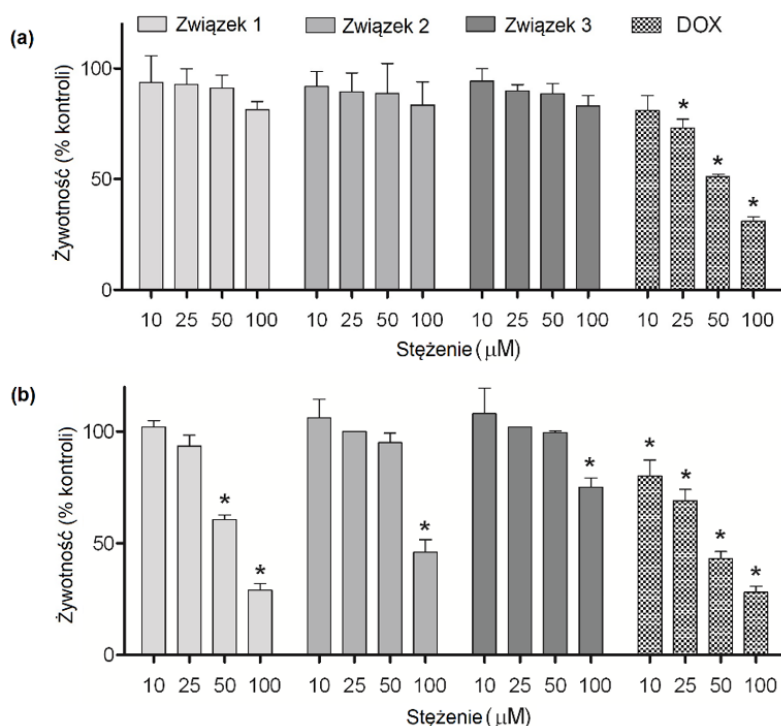
Rycina 6. Symulacja ścieżki metabolicznej PZ-1150 przy użyciu oprogramowania MetaSite.

Reasumując, biotransformacja PZ-1150 w modelu mikrosomalnym prowadziła do powstania pięciu metabolitów, podczas gdy w modelu *Cunninghamella* zidentyfikowano tylko dwa główne metabolity. Niezależnie od zastosowanego modelu główny metabolit stanowił produkt hydroksylacji pierścienia fenyłowego. Analiza *in silico* potwierdziła dane uzyskane w warunkach *in vitro*, gdyż trzy wysymulowane metabolity zostały zidentyfikowane w modelu mikrosomalnym. Na podstawie wyznaczonych w modelu mikrosomalnym parametrów stabilności metabolicznej można uznać, że związek PZ-1150 należy do związków o wysokiej wartości klirensu. Badania potwierdziły skuteczność modeli mikrosomalnego i mikrobiologicznego w ocenie metabolizmu związków chemicznych oraz zasadność zestawienia wyników uzyskanych w warunkach *in vitro* z symulacją *in silico*.

H5 Słoczyńska K, Koczurkiewicz P, Piska K, Powroźnik B, Wójcik-Pszczółka K, Kłaś K, Wyszowska-Kolatko M, Pękala E. Similar safety profile of the enantiomeric N-aminoalkyl derivatives of trans-2-aminocyclohexan-1-ol demonstrating anticonvulsant activity. *Molecules* 2019, 24(13):2505.

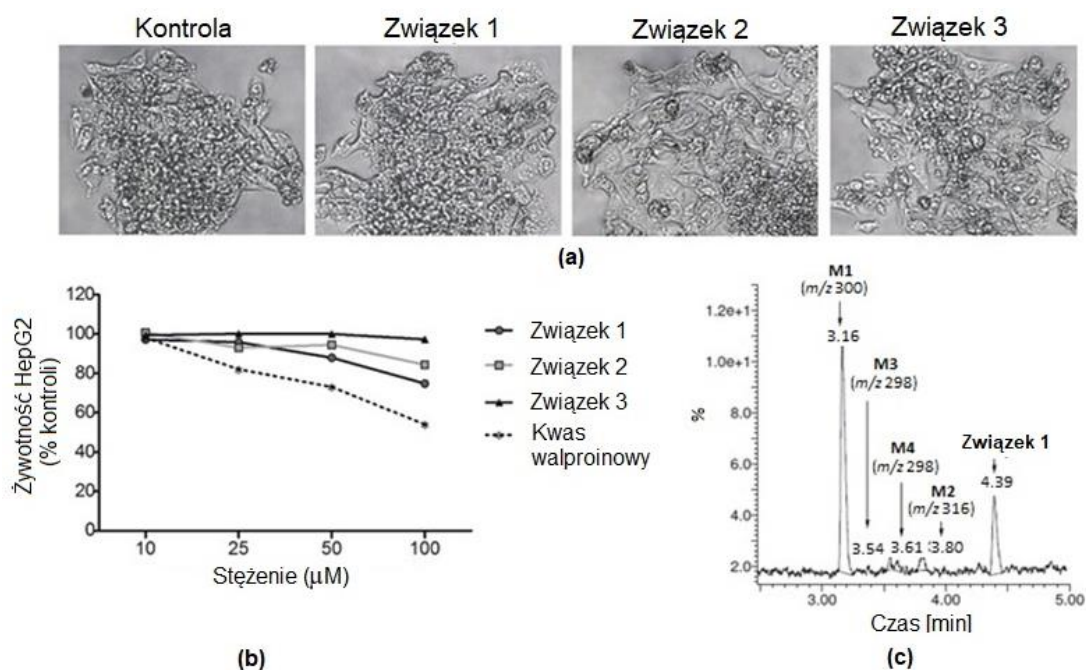
Publikacja **H5** stanowi kontynuację badań z zakresu oceny bezpieczeństwa wybranych związków o zdefiniowanej aktywności biologicznej. Tym razem badania dotyczyły trzech nowych chiralnych *N*-aminoalkilo pochodnych *trans*-2-aminocykloheksan-1-olu o aktywności przeciwdrgawkowej. Synteza oraz badania potwierdzające działanie przeciwdrgawkowe związków: 1 (enancjomer *R*), 2 (enancjomer *S*) i 3 (racemat) zostały opisane w pracy autorstwa Kubowicz i wsp. [73]. Istotą pracy **H5** było porównanie profilu bezpieczeństwa obu enancjomerów. W tym celu wykonano badania *in vitro* z zakresu oceny cytotoksyczności, hepatotoksyczności, mutagenności oraz interakcji z glikoproteiną P (P-gp). Dodatkowo oceniono działanie mutagenne i antymutagenne badanych połączeń chemicznych.

Ocenę działania cytotoksycznego związków 1-3 przeprowadzono w oparciu o ludzkie prawidłowe astrocyty i komórki glejaka gwiaździstego, posługując się testami MTT i LDH (lactate dehydrogenase). Badania wykazały, że testowane połączenia nie miały istotnego wpływu na żywotność linii astrocytów, jednocześnie komórki glejaka inkubowane z wyższymi stężeniami obu enancjomerów odznaczały się spadkiem żywotności (Rycina 7). Wyniki testu LDH były porównywalne. Racemat okazał się mniej cytotoksyczny niż enancjomery.



Rycina 7. Wpływ związków 1-3 na żywotność prawidłowych astrocytów (a) i komórek glejaka gwiaździstego (b). Wyniki (średnia $\pm$ SEM ($p < 0.05$)) przedstawiono jako procent kontroli. Żywotność zbadano po 24 h przy użyciu testu MTT. Dokсорubicyna (DOX) – kontrola dodatnia.

Hepatotoksyczność związków 1-3 oszacowano wobec linii komórkowej ludzkiego nowotworu wątrobowo-komórkowego HepG2 w teście MTT. Podczas 24 h inkubacji z badanymi związkami w zakresie stężeń do 100 μ M nie zaobserwowano istotnego spadku żywotności komórek, nie stwierdzono również zmian w ich morfologii (Rycina 8). Hepatotoksyczność związków 1-3 oszacowano również na podstawie analizy produktów powstałych w wyniku inkubacji z ludzkimi mikrosomami w obecności glutationu. Analiza chromatograficzna próby badanej nie wykazała obecności sygnałów mogących świadczyć o tworzeniu przez badane związki adduktów z glutationem (Rycina 8). Główne metabolity związków 1-3 stanowiły produkty hydroksylacji i karbonylacji związków macierzystych.



Rycina 8. Wpływ związków 1-3 na morfologię (a) i żywotność (b) hepatocytów. Wyniki (średnia $\pm$ SEM ($p < 0.05$)) przedstawiono jako procent kontroli. Żywotność zbadano po 24 h przy użyciu testu MTT; przykładowy chromatogram związku 1 i jego metabolitów powstałych podczas inkubacji 1 z ludzkimi mikrosomami w obecności NADPH i zredukowanego glutationu.

Aktywność mutagenną i antymutagenną połączeń 1-3 oszacowano w teście Ames i *Vibrio harveyi*. Zarówno enancjomery jak i racemat nie wykazały potencjału mutagennego w zastosowanych systemach testowych. Dodatkowo badane związki cechowały się wysoką lub umiarkowaną aktywnością antymutagenną wobec zastosowanych mutagenów chemicznych w obu testach.

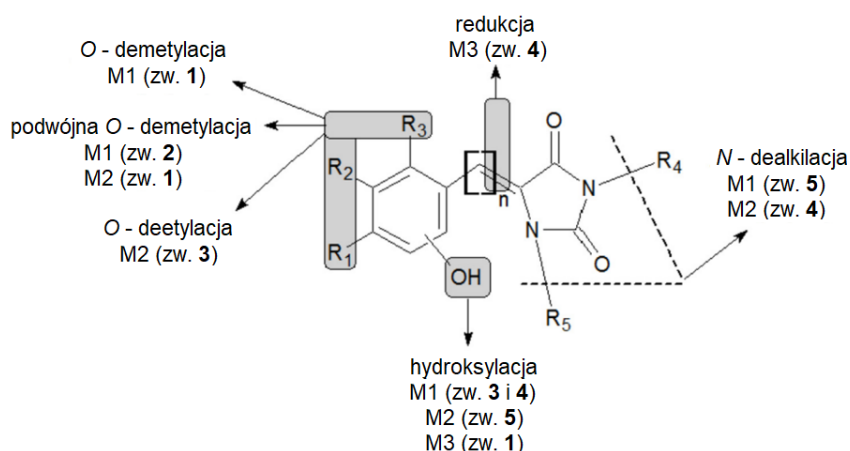
Ostatnim etapem prac była ocena interakcji związków 1-3 z P-gp, za pomocą komercyjnego testu P-gp-Glo TM wobec werapamilu jako kontroli dodatniej. Badania wykazały, że oba enancjomery wykazują zdolność hamowania P-gp, przy czym enancjomer *R* charakteryzował się silniejszym efektem niż enancjomer *S*.

Podsumowując zrealizowane w ramach publikacji **H5** prace badawcze, nowo zsyntezowane pochodne *trans*-2-aminocykloheksan-1-olu wydają się być obiecującymi kandydatami w badaniach nad rozwojem nowych leków o aktywności przeciwdrgawkowej. Enancjomery charakteryzują się podobnym profilem bezpieczeństwa, różni je przebieg ścieżki biotransformacyjnej oraz aktywność farmakologiczna.

H6 Popiół J, Piska K, **Słoczyńska K**, Bień A, Żelaszczyk D, Gunia-Krzyżak A, Koczurkiewicz P, Wójcik-Pszczola K, Marona H, Pękala E. **Microbial biotransformation of some novel hydantoin derivatives: perspectives for bioremediation of potential sunscreen agents.** *Chemosphere* 2019, 234:108-115.

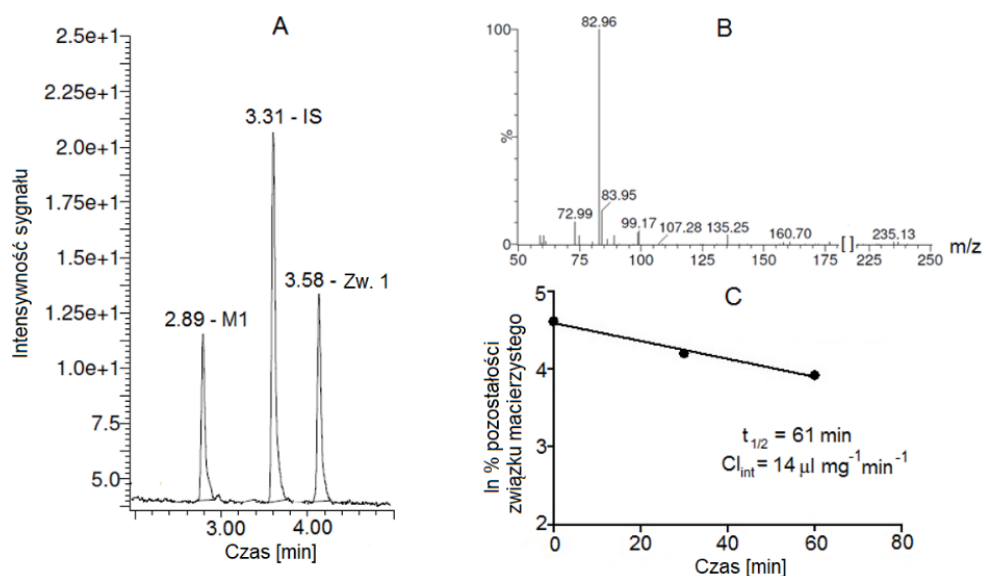
Pewną nowością dotyczącą publikacji **H6** jest ewaluacja związków, których aktywność biologiczna dotyczy sektora kosmetycznego, a nie farmaceutycznego. Istotą pracy była ocena bezpieczeństwa środowiskowego pięciu (1-5) nowych pochodnych hydantoiny o aktywności fotoprotekcyjnej w modelu grzyba środowiskowego *Cunninghamella echinulata*. Przeprowadzono także badania biotransformacji mikrosomalnej związku 1 oraz fotostabilności badanych połączeń, jak również oszacowano toksyczność *in silico* związków 1-5 oraz produktów ich biotransformacji. Tytułowe substancje zostały zaprojektowane i zsyntezowane w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej oraz Zakładzie Chemii Bioorganicznej Katedry Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego UJ CM i należą do pochodnych benzylidenohydantoiny (1-4), bądź cynamylidenohydantoiny (5).

Badania wykazały, że *C. echinulata* wykazuje zdolność do biotransformacji połączeń 1-5. Podczas 7 dniowej inkubacji najwyższe tempo przemian biotransformacyjnych zaobserwowano dla związków 2 i 3 (pozostałość związku macierzystego odpowiednio 18% i 24%). Z drugiej strony, najbardziej odporny na przekształcenia biochemiczne był związek 4 (61% pozostałość związku macierzystego), natomiast zastosowany w celach referencyjnych komercyjny filtr przeciwsłoneczny benzofenon-2 (BP-2) uległ przemianom biotransformacyjnym tylko w 6%. Kluczowymi kierunkami zaobserwowanych przekształceń chemicznych były: O-dealkilacja łańcuchów bocznych przyłączonych do pierścienia fenylu lub hydantoiny oraz hydroksylacja pierścienia fenylowego (Rycina 9).



Rycina 9. Proponowane kierunki biotransformacji związków 1-5 w modelu grzyba środowiskowego *Cunninghamella echinulata*.

Inkubacja związku 1 z mikrosomami mysimi prowadziła do powstania tylko jednego głównego metabolitu (M1) o m/z 235, będącego produktem *O*-dealkilacji jednego spośród dwóch podstawników metoksyowych w pierścieniu fenyłowym (Rycina 10). Wyznaczone dla związku 1 parametry $t_{1/2}$ i Cl_{int} (Rycina 10) pozwalają zaklasyfikować go do grupy substancji o średniej trwałości metabolicznej.



Rycina 10. Biotransformacja związku 1 w modelu mikrosomów mysich; A – chromatogram związku 1 i głównego metabolitu M1; B – widmo masowe M1; C – ubytek związku macierzystego w czasie; IS – standard wewnętrzny; $t_{1/2}$ – okres półtrwania *in vitro*; Cl_{int} – klirens wewnętrzny.

Dalsze badania wykazały, że związki 1, 2, 4 i 5 charakteryzują się wysoką fotostabilnością. W następstwie ekspozycji na światło słoneczne zaobserwowano jedynie procesy fotoizomeryzacji, nie stwierdzono natomiast obecności produktów fotodegradacji. Najwyższy poziom fotoizomeryzacji zaobserwowano dla związku 1 (36,03% izomeru *E* w roztworze).

Toksyczność związków 1-5 oraz ich głównych metabolitów oszacowano *in silico* przy użyciu oprogramowania OSIRIS Property Explorer. Analiza dowiodła, że badane połączenia charakteryzują się niskim prawdopodobieństwem wywołania efektu mutagennego, kancerogennego, drażniącego oraz niekorzystnego wpływu na reprodukcję. Z przeprowadzonej symulacji wynika także, że niektóre metabolity badanych związków mogą zwiększać ryzyko wystąpienia niekorzystnego wpływu na reprodukcję. Warto jednak podkreślić, że poza metabolitem M2 związku 3 należą one do pobocznych produktów biotransformacji.

Reasumując, wyniki zrealizowanych prac badawczych zachęcają do dalszych badań nad pochodnymi hydantoiny wykazującymi potencjał fotoprotekcyjny. Zaobserwowane

w następstwie ekspozycji na środowiskowy mikroorganizm *Cunninghamella echinulata* ścieżki biotransformacji substancji 1-5 mogą odzwierciedlać losy badanych związków w sytuacji uwolnienia do środowiska naturalnego.

H7 Słoczyńska K, Gunia-Krzyżak A, Koczurkiewicz P, Wójcik-Pszczółka K, Żelaszczyk D, Popiół J, Pękala E. **Metabolic stability and its role in the discovery of new chemical entities**. *Acta Pharmaceutica* 2019, 69(3):345-361.

W pracy przeglądowej **H7** w oparciu o dane literaturowe przedstawiono informacje dotyczące roli, jaką w procesie rozwoju nowych leków odgrywają badania nad stabilnością metaboliczną. Ponadto, w opracowaniu scharakteryzowano główne metody badania metabolizmu *in vitro* oraz dylematy dotyczące ekstrapolacji *in vitro-in vivo*.

Badania oceniające stabilność metaboliczną i ścieżki biotransformacji to kluczowy etap w procesie rozwoju nowych leków, gdyż dotyczą one farmakokinetycznej charakterystyki potencjalnej substancji leczniczej. W przypadku substancji podlegających szybkiej biotransformacji, skróceniu ulega czas ekspozycji na związek macierzysty i może dochodzić do powstawania aktywnych, nieaktywnych lub toksycznych metabolitów. Z drugiej strony, zbyt wysoka stabilność metaboliczna może sprzyjać interakcjom między lekami i wystąpieniu efektów toksycznych.

Stabilność metaboliczna określa podatność substancji na procesy biotransformacji i może zostać wyrażona przy pomocy kilku parametrów. Okres półtrwania ($t_{1/2}$) obrazuje czas, po upływie którego 50% związku macierzystego ulega biotransformacji, podczas gdy klirens wewnętrzny (wątrobowy) CL_{int} opisuje maksymalną, nieograniczoną przepływem wewnętrznym zdolność wątroby do metabolizowania leku. Na podstawie tej wielkości można oszacować, czy testowany związek będzie ulegał efektowi pierwszego przejścia. Badania metabolizmu w modelu mikrosomalnym pozwalają wyznaczyć mikrosomalny klirens wewnętrzny - $CL_{int,micr}$, na podstawie którego w oparciu o zawartość białek mikrosomalnych w wątrobie i masę wątroby wyznaczany jest parametr CL_{int} . W modelu mikrosomów mysich wartość $t_{1/2}$ większa lub równa 60 min cechuje substancje stabilne metabolicznie, natomiast $t_{1/2}$ poniżej 30 min charakteryzuje związki o niskiej stabilności metabolicznej. Leki różnią się między sobą wartościami klirensu. Wysoką wartością parametru odznaczają się m.in.: werapamil, propafenon, midazolam i diklofenak, natomiast do farmaceutyków o niskim klirensie zaliczamy m.in.: chinidynę, kłozapinę, deksametazon, prednizon, diazepam, zolpidem i tenoksykam.

Badania nad metabolizmem kandydatów na lek opierają się na systemach *in vitro* oraz *in vivo*. Bez wątpienia badania na modelu zwierzęcym stanowią najbardziej wartościowe źródło wiedzy na temat absorpcji, dystrybucji, metabolizmu i wydalania związku chemicznego oraz pozwalają na stworzenie pełnego profilu farmakologicznego substancji. Badania te są jednak czasochłonne, kosztowne i niekoniecznie zasadne w testowaniu dużej puli nowych związków chemicznych. Stąd też, rekomendowana strategia badawcza zaleca przeprowadzenie wstępnych badań biotransformacji w warunkach *in vitro*, co sprzyja doborowi optymalnego modelu zwierzęcego, który zostanie wykorzystany w dalszych pracach nad lekiem.

Ocenę stabilności metabolicznej *in vitro* prowadzi się zazwyczaj w oparciu o trzy modele badawcze: mikrosomy wątrobowe, hepatocyty i rekombinowane enzymy. Badania potwierdzają, że wyniki uzyskane w modelu mikrosomów mysich dobrze korelują z rezultatami testów w modelu mikrosomów ludzkich. Model hepatocytny bazuje na komórkach wątroby pochodzących od człowieka, myszy, szczura lub psa. Hodowle hepatocytów reprezentują kompleksowy system metaboliczny, wykazujący ekspresję enzymów I i II fazy metabolizmu oraz wszystkie konieczne fizjologicznie kofaktory. Modele analizy metabolizmu oparte o enzymy rekombinowane to systemy wykorzystujące najczęściej jako źródło specyficznych izoenzymów cytochromu P450 bakulowirusy lub ludzkie komórki limfoblastoidalne. Ten model badawczy pozwala na oszacowanie działania pojedynczych enzymów zaangażowanych w metabolizm. W badaniach *in vitro* wykorzystywane są modele badawcze zróżnicowane gatunkowo, co pozwala na analizę różnic międzygatunkowych w metabolizmie substancji, zarówno w odniesieniu do jej stabilności metabolicznej, jak również ścieżek biotransformacji.

Badania prowadzone w oparciu o mikrosomy i hepatocyty pozwalają na przewidywanie klirensu wątrobowego *in vivo* (*in vitro-in vivo* extrapolation, IVIVE). Procedura IVIVE wykorzystuje odpowiednie współczynniki skalujące, takie jak m.in. ilość miligramów białek mikrosomalnych w przeliczeniu na gram wątroby oraz liczbę hepatocytów przypadającą na gram wątroby.

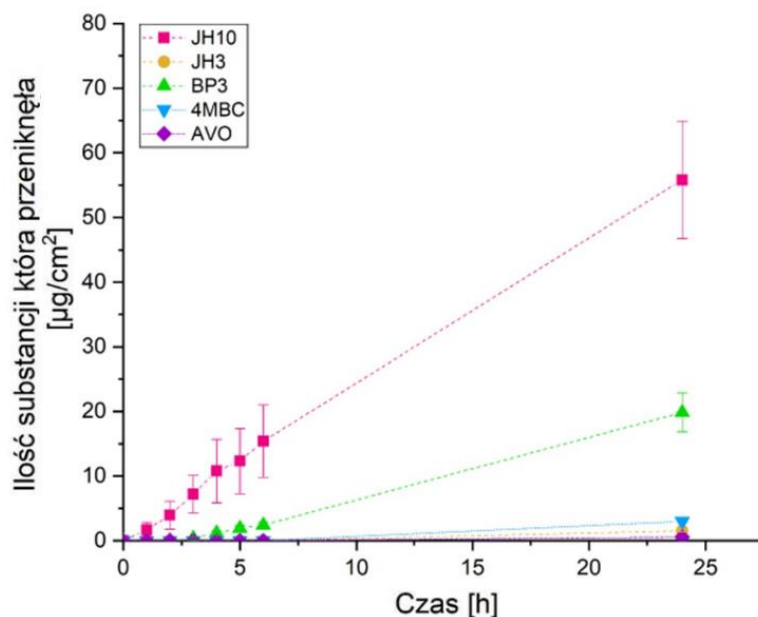
Przeprowadzona analiza piśmiennictwa dowodzi, że badania z zakresu oceny stabilności metabolicznej substancji, w tym kandydatów na lek stanowią kluczowy etap w procesie rozwoju nowych substancji leczniczych. W powstaniu tej pracy dużą rolę odegrały własne doświadczenia, zdobyte w trakcie realizacji badań nad biotransformacją związków aktywnych biologicznie (publikacje **H3**, **H4**, **H5** i **H6**).

H8 Słoczyńska K, Popiół J, Gunia-Krzyżak A, Koczurkiewicz-Adamczyk P, Żmudzki P, Pękala E. Evaluation of two novel hydantoin derivatives using reconstructed human skin model EpiskinTM: perspectives for application as potential sunscreen agents. *Molecules* 2022, 27(6):1850.

Publikacja **H8** stanowi kontynuację badań, których celem była ocena bezpieczeństwa nowych pochodnych hydantoiny o aktywności fotoprotekcyjnej, potencjalnych surowców kosmetycznych. Badaniami objęto opisane w publikacji **H6** związki o symbolach JH3 i JH10. Rezultaty badań potwierdzających działanie fotoprotekcyjne tytułowych pochodnych zostały opisane w pracy autorstwa Popiół i wsp. [74]. Dotychczasowe badania dowiodły, że związki te cechują się brakiem potencjału estrogennego i działania cytotoksycznego wobec wybranych linii komórek skóry oraz brakiem aktywności mutagennej w teście Amesa [74].

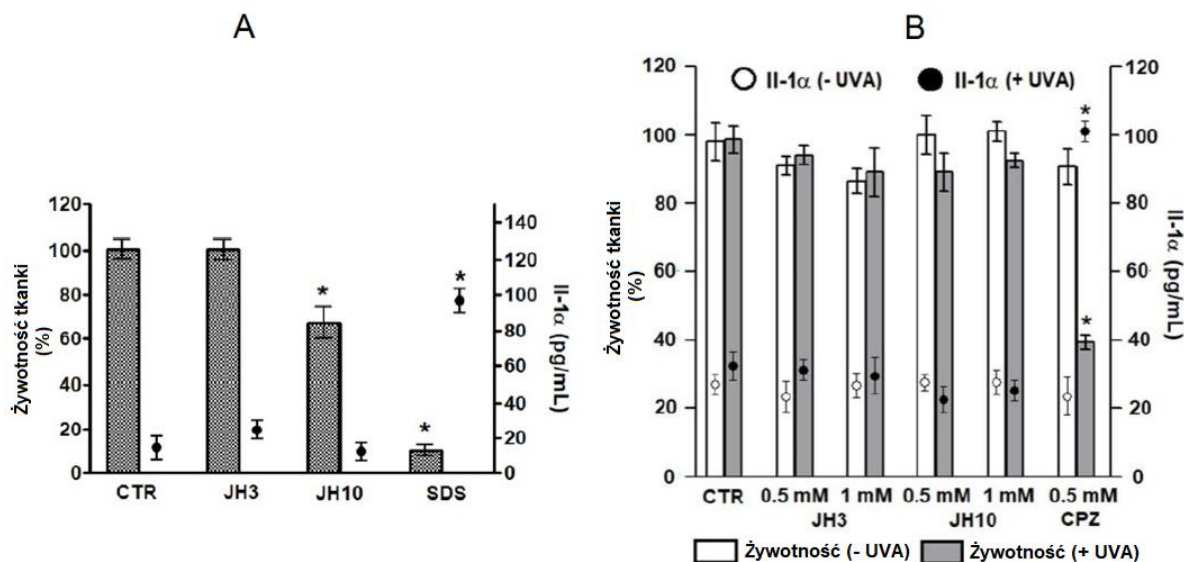
Celem publikacji **H8** była ocena przenikania, działania drażniącego i fototoksycznego związków o symbolach JH3 i JH10 w modelu zrekonstruowanego ludzkiego naskórka (reconstructed human epidermis, RHE) EpiskinTM. Dodatkowo dla obu połączeń chemicznych oszacowano genotoksyczność *in vitro*, wykonano biotransformację w modelu mikrosomalnym oraz wyznaczono chromatograficzny parametr lipofilowości (R_{M0}).

W toku zrealizowanych prac udokumentowano większą przenikalność JH10 w porównaniu do JH3 oraz zastosowanych w celach referencyjnych trzech komercyjnych filtrów UV (beznofenon-3 (BP-3), 3-(4-metylobenzylideno)kamfora (4MBC) oraz awobenzon (AVO)) (Rycina 11). Powyższe obserwacje mogą zostać częściowo wyjaśnione właściwościami fizyko-chemicznymi badanych połączeń, w tym wyznaczonymi doświadczalnie wartościami parametru R_{M0} .



Rycina 11. Przenikanie JH3, JH10 i komercyjnych filtrów UV w modelu zrekonstruowanego ludzkiego naskórka EpiSkin™; wyniki przedstawiono jako uśredniony procent zaabsorbowanej dawki ± odchylenie standardowe; ekspozycja 24 h, zastosowana dawka 10 mg/ cm²; BP3-benzofenon-3, 4MBC- 3-(4-metylobenzylideno)kamfora, AVO-awobenzon.

Dalsze badania w modelu RHE wykazały, że związki JH3 i JH10 nie wykazują działania drażniącego i fototoksycznego, gdyż ekspozycja na badane substancje nie wywołała spadku żywotności tkanki skórnej poniżej 50% oraz istotnego zwiększenia poziomu interleukiny 1 α (Il-1 α) wobec próby kontrolnej (Rycina 12).



Rycina 12. Działanie drażniące (A) i fototoksyczne (B) związków JH3 i JH10 w modelu zrekonstruowanego ludzkiego naskórka EpiSkin™; wyniki przedstawiono jako średnia ± odchylenie standardowe; A: * $p < 0.05$ istotność statystyczna względem kontroli negatywnej (CTR), SDS – siarczan dodecyłu sodu (kontrola pozytywna); B: * $p < 0.05$ istotność statystyczna względem naskórka nie poddanego naświetleniu, CPZ – chloropromazyna (kontrola pozytywna), rozpuszczalnik (kontrola negatywna, CTR); Il-1 α - interleukina 1 α .

W teście genotoksyczności *in vitro* nie udokumentowano pod wpływem badanych związków znacznego wzrostu liczby mikrojąder, pączków jądrowych, mostków dicentrycznych, czy indeksu podziału komórkowego w komórkach jajnika chomika chińskiego (CHO-K1) względem próby kontrolnej. Badania nad biotransformacją w modelu ludzkich mikrosomów wątrobowych wykazały, że kluczową przemianą chemiczną JH3 i JH10 jest hydroliza, co sugeruje, że enzymy inne niż rodzina cytochromu P450 odgrywają istotną rolę w biotransformacji wybranych pochodnych. Dla obu związków wyznaczono niską wartość $t_{1/2}$ równą ok. 5 min i odpowiadającą mu wysoką wartość Cl_{int} powyżej 172 $\mu\text{l}/\text{mg min}$.

Reasumując, związki JH3 i JH10 z uwagi na brak działania drażniącego i fototoksycznego względem tkanki skórnej oraz brak potencjału genotoksycznego można uznać za potencjalnych kandydatów do dalszych badań, których celem jest opracowanie skutecznych i bezpiecznych filtrów UV.

4.1.3.4. Podsumowanie osiągnięcia naukowego

W ramach osiągnięcia naukowego **dobrano, zoptymalizowano i dostosowano metodykę alternatywnych testów oceny bezpieczeństwa do ewaluacji nowych substancji o zdefiniowanej aktywności biologicznej**. Zaplanowanie i zrealizowanie serii prac badawczych umożliwiło opracowanie protokołów eksperymentalnych, które pozwoliły na uzyskanie rzetelnych i powtarzalnych wyników, jak również znalazły **zastosowanie we wstępnej ewaluacji bibliotek nowo syntezowanych związków** chemicznych pod kątem bezpieczeństwa stosowania.

W efekcie zrealizowano zadania badawcze, w ramach których:

1. Dobrano i zoptymalizowano testy alternatywne umożliwiające ocenę działania mutagennego i antymutagennego:

- nowych aminoalkanolowych pochodnych ksantonu (**H1**) i *trans*-2-aminocykloheksan-1-olu o aktywności przeciwdrgawkowej (**H5**),
- nowych pochodnych 1-(2-metoksyfenylo)piperazyny o aktywności przeciwdepresyjnej (**H3**),
- ponadto, opisano mechanizmy działania substancji wykazujących potencjał antymutageny (**H2**),

oraz właściwości genotoksycznych:

- nowych pochodnych hydantoiny wykazujących aktywność fotoprotekcyjną (**H8**).

2. Wytypowano i dostosowano metodykę testów alternatywnych pozwalających na **określenie przebiegu biotransformacji i struktur powstających metabolitów**:
 - nowych pochodnych 1-(2-metoksyfenylo)piperazyny o aktywności przeciwdepresyjnej (**H3**),
 - arylosulfonamidowej pochodnej aryloksyalkiloamin wykazującej potencjał terapeutyczny w leczeniu afektywnych schorzeń typu depresyjnego i lękowego (**H4**),
 - nowych pochodnych *trans*-2-aminocykloheksan-1-olu o aktywności przeciwdrgawkowej (**H5**),
 - wybranych pochodnych hydantoiny wykazujących aktywność fotoprotekcyjną (**H6**, **H8**).
3. Wyselekcjonowano i dostosowano testy alternatywne szacujące **stabilność metaboliczną**:
 - nowych pochodnych 1-(2-metoksyfenylo)piperazyny o aktywności przeciwdepresyjnej (**H3**),
 - arylosulfonamidowej pochodnej aryloksyalkiloamin wykazującej potencjał terapeutyczny w leczeniu afektywnych schorzeń typu depresyjnego i lękowego (**H4**),
 - nowych pochodnych hydantoiny o działaniu fotoprotekcyjnym (**H6**, **H8**),
 - ponadto, opisano znaczenie stabilności metabolicznej w poszukiwaniu nowych substancji o potencjale terapeutycznym (**H7**).
4. Wyselekcjonowano i zoptymalizowano metody alternatywne szacujące **działanie fototoksyczne i drażniące** oraz **przenikanie przez naskórek** nowych pochodnych hydantoiny wykazujących aktywność fotoprotekcyjną (**H8**).
5. Dobrano i zaadaptowano metodykę testów alternatywnych pozwalających na ocenę **bezpieczeństwa środowiskowego** wybranych pochodnych hydantoiny wykazujących aktywność fotoprotekcyjną (**H6**).

Wyniki zrealizowanych prac badawczych mają **charakter aplikacyjny**, ponieważ umożliwiły bardziej **racjonalną selekcję** nowo syntezowanych związków o zdefiniowanej aktywności w obrębie OUN do dalszych etapów badań przedklinicznych i klinicznych (ocena mutagenności i cytotoksyczności) oraz dostarczyły syntetykom **danych przydatnych do przeprojektowania cząsteczek**, w celu poprawy ich parametrów farmakokinetycznych (oszacowanie stabilności metabolicznej i ścieżek biotransformacji). W przypadku substancji o charakterze potencjalnych surowców kosmetycznych przeprowadzone prace badawcze

poszerzyły ich charakterystykę biologiczną (bezpieczeństwo stosowania oraz bezpieczeństwo środowiskowe) oraz wskazały kierunki dalszych badań, mających na celu m.in. optymalizację składu formułacji zawierających badane substancje.

4.2. Pozostałe osiągnięcia naukowe

4.2.1. Odkrycie aktywności przeciwnowotworowej nowych metalokompleksów

Od czasu odkrycia w 1965 r. cisplatyna stała się najczęściej stosowanym w praktyce klinicznej chemioterapeutyką. To z kolei przyczyniło się do intensywnego rozwoju badań nad jej pochodnymi. Obecnie w leczeniu funkcjonuje kilka kompleksów platyny. Jednak z uwagi na obserwowane efekty uboczne i lekooporność (pojawienie się niewrażliwości nowotworu na lek) prowadzone są intensywne prace badawcze nad nowymi kompleksami zawierającymi platynę, iryd, czy ruten. Stąd też, za **kolejne ważne osiągnięcie naukowe uważam odkrycie aktywności przeciwnowotworowej nowych kompleksów metali zawierających platynę bądź iryd**, które wydają się obiecujące jako **potencjalne leki w nowoczesnej terapii przeciwnowotworowej**. Prace badawcze prowadzone były w oparciu o zainicjowaną przeze mnie w 2020 roku **współpracę naukową z prof. Pavel Štarha z Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc, Czechy**. Badane związki zostały zsyntezowane przez zespół prof. Štarha. Natomiast aktywność cytotoksyczną związków oszacowano w wybranych modelach linii komórek nowotworowych w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej UJ CM.

Wyniki zrealizowanych prac badawczych opisano w cyklu publikacji, których jestem współautorem:

- Masaryk L, Koczurkiewicz-Adamczyk P, Milde D, Nemec I, **Słoczyńska K**, Pękala E, **Štarha P**. Dinuclear half-sandwich Ir(III) complexes containing 4,4'-methylenedianiline-based ligands: synthesis, characterization, cytotoxicity. *Journal of Organometallic Chemistry* 2021, 938:121748.
- Masaryk L, Zoufaly P, **Słoczyńska K**, Zahradnikova E, Milde D, Koczurkiewicz-Adamczyk P, **Štarha P**. New Pt(II) diiodido complexes containing bidentate 1,3,4 -thiadiazole - based ligands: Synthesis, characterization, cytotoxicity. *Inorganica Chimica Acta* 2022, 536:120891.
- Masaryk L, Orvoš J, **Słoczyńska K**, Herchel R, Moncol J, Milde D, Halaš P, Krikavova R, Koczurkiewicz-Adamczyk P, Pękala E, Fischer R, Nemec I, **Štarha P**. Anticancer half-

sandwich Ir(III) complex and its interaction with various biomolecules and their mixtures - a case study with ascorbic acid. *Inorganic Chemistry Frontiers* 2022, 9:3758-3770.

- Masaryk L, Weiser Drozdková D, **Słoczyńska K**, Moncol J, Milde D, Křikavová R, Popiół J, Pękala E, Ondrušková K, Nemec I, Smešný Trtková K, **Štarha P**. Anti-myeloma pro-apoptotic Pt(II) diiodido complexes. *Inorganic Chemistry Frontiers* 2023, 10:3307-3318.

4.2.2. Udowodnienie przydatności mikrobiologicznego testu *Vibrio harveyi* do skринingowej oceny aktywności mutagennej i antymutagennej nowych związków chemicznych o aktywności biologicznej

W 2000 roku naukowcy z Katedry Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego opracowali test mutagenności oparty na genetycznie zmodyfikowanych szczepach morskiej bakterii *Vibrio harveyi*. Test *V. harveyi* został opracowany przede wszystkim do oceny zanieczyszczeń mutagennych środowiska morskiego. Za **ważne osiągnięcie naukowe** uważam również **wykorzystanie po raz pierwszy testu *V. harveyi* w badaniach skринingowych mutagenności nowo syntetyzowanych związków chemicznych o zdefiniowanej aktywności biologicznej**. Ponadto, wykazałam dużą przydatność modyfikacji testu *Vibrio harveyi* w selekcji związków o wysokim potencjale antymutagennym. Badania te prowadzone były we współpracy z **prof. dr hab. Grzegorzem Węgrzynem z Katedry Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego**. Efektem osiągnięcia był skринing bibliotek nowo syntetyzowanych związków chemicznych o zdefiniowanej aktywności biologicznej, co udokumentowano w publikacjach:

- **Słoczyńska K**, Pękala E, Wajda A, **Węgrzyn G**, Marona H. Evaluation of mutagenic and antimutagenic properties of some bioactive xanthone derivatives using *Vibrio harveyi* test. *Letters in Applied Microbiology* 2010, 50(3):252-257.
- Powroźnik B, **Słoczyńska K**, Canale V, Grychowska K, Zajdel P, Pękala E. Preliminary mutagenicity and genotoxicity evaluation of selected arylsulfonamide derivatives of (aryloxy)alkylamines with potential psychotropic properties. *Journal of Applied Genetics* 2016, 57(2):263-270.
- Powroźnik B, **Słoczyńska K**, Marciniak K, Zajdel P, Pękala E. Preliminary safety assessment of new azinesulfonamide analogs of aripiprazole using prokaryotic models. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 2016, 6(3):377-384.

- Waszkielewicz AM, Gunia-Krzyżak A, Powroźnik B, **Słoczyńska K**, Pękala E, Walczak M, Bednarski M, Źesławska E, Nitek W, Marona H. Design, physico-chemical properties and biological evaluation of some new *N*-[(phenoxy)alkyl]- and *N*-{[(phenoxy)ethoxy]ethyl}aminoalkanols as anticonvulsant agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2016, (8):1793-1810.
- Marć MA, Domínguez-Álvarez E, **Słoczyńska K**, Żmudzki P, Chłoń-Rzepa G, Pękala E. *In vitro* biotransformation, safety and chemopreventive action of novel 8-methoxy-purine-2,6-dione derivatives. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2018, 184(1):124-139.

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

W latach 2007 – 2010 w ramach **stażu naukowego w Katedrze Rehabilitacji Klinicznej Akademii Wychowania Fizycznego w Krakowie** prowadziłam wielokierunkowe prace badawcze, których głównym celem była **ocena wpływu *in vitro* wybranych substancji aktywnych biologicznie na parametry reologiczne i biochemiczne ludzkich krwinek czerwonych** (red blood cells, RBC). Badania wykonywałam przez okres 15 miesięcy, od 2 do 3 razy w tygodniu, w zależności od dostępności materiału biologicznego pochodzącego od pacjentów. Zaświadczenie potwierdzające odbyty staż naukowy stanowi załącznik do *Wniosku*.

Kluczowym osiągnięciem badań był dobór i dostosowanie modelu erytrocytów do testowania *in vitro* wpływu substancji na parametry reologiczne RBC. Analiza piśmiennictwa wykazała, że najczęściej wykorzystywanym modelem w badaniach reologicznych są erytrocyty zdrowych dawców. W ramach badań własnych przeanalizowano odkształcalność i agregację m.in. RBC pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek (RBC przed i po dializie), pacjentów z przewlekłą niewydolnością żylną kończyn dolnych (RBC z żyły łokciowej i żyłaka), jak również subpopulacji „młodych” i „starych” RBC pacjentów z przewlekłą niewydolnością żylną kończyn dolnych.

Właściwości reologiczne najważniejszych przeanalizowanych potencjalnych modeli RBC opisano w publikacjach:

- **Stachura K**, Pietrzycka A, Marchewka A, Teległów A, Drożdż M, Stępniewski M, Marona H. Red blood cells deformability, aggregation parameters and plasma total

antioxidant activity in blood of patients before and after hemodialysis. *Acta Haematologica Polonica* 2008, 39(3):461-467.

- Pietrzycka A, **Słoczyńska K**, Telegów A, Marchewka A, Drożdż M, Stępniewski M, Marona H. Aggregation and elongation indices of erythrocytes of patients with chronic renal insufficiency relate to antioxidant capacity FRAP and CAT/SOD ratio values. *Nefrologia i Dializoterapia Polska* 2010, 14(1):22-26.
- **Słoczyńska K**, Kózka M, Marona H. Red blood cells deformability and aggregation in chronic venous disease patients with varicose veins. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 2013, 67:690-694.
- **Słoczyńska K**, Kózka M, Marona H. Rheological properties of young and aged erythrocytes in chronic venous disease patients with varicose veins. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 2015, 60(2):171-178.

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów do badań reologicznych *in vitro* **wytypowano trzy modele erytrocytarne o zróżnicowanej odkształcalności i agregacji.** Do prac włączono RBC pacjentów z przewlekłą niewydolnością żylną kończyn dolnych (krew z żyły łokciowej oraz z żyłaka pacjentów) oraz RBC zdrowych dawców (krew z żyły łokciowej). W oparciu o **wyselekcjonowane modele podjęto prace badawcze nad poszukiwaniem nowych substancji o korzystnym wpływie na parametry reologiczne RBC, które mogłyby znaleźć zastosowanie w terapii chorób przebiegających z zaburzeniami odkształcalności i agregacji erytrocytów** (m.in. choroby układu sercowo-naczyniowego, cukrzyca, przewlekła niewydolność nerek oraz nowotwory). Badania te pozwalają również na **identyfikację substancji wywierających niekorzystny wpływ na właściwości reologiczne krwinek czerwonych.**

Wyniki uzyskane dla wybranych substancji aktywnych biologicznie w oparciu o powyższe modele badawcze zostały opisane w publikacjach:

- **Słoczyńska K**, Kózka M, Pękała E, Marchewka A, Marona H. *In vitro* effect of pentoxifylline and lisofylline on deformability and aggregation of red blood cells from healthy subjects and patients with chronic venous disease. *Acta Biochimica Polonica* 2013, 60(1):129-135.
- Kózka M, **Słoczyńska K**, Szkaradek N, Waszkielewicz AM, Pękała E, Marona H. Effect of some newly synthesized xanthone and piperazine derivatives with cardiovascular activity on rheology of human erythrocytes *in vitro*. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 2017, 67(1):1-14.

Zastosowana strategia badawcza dowiodła, że krwinki o zaburzonej reologii (będącej konsekwencją przewlekłej niewydolności żylniej) pozwalają na **lepiej uwidocznienie zmiany parametrów reologicznych** pod wpływem testowanej substancji w stosunku do RBC zdrowych dawców. Stąd też zaproponowane rozwiązanie stanowiło **nowe, oryginalne podejście** w kwestii **poszukiwania i identyfikacji substancji o aktywności hemoreologicznej**.

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

Osiągnięcia dydaktyczne:

Promotor pomocniczy prac doktorskich:

- dr Beata Powroźnik, 2012 – 2016. Tytuł pracy: *Ocena mutagenności i antymutagenności związków o zdefiniowanej aktywności biologicznej z wykorzystaniem testów alternatywnych*. Promotor: prof. dr hab. Elżbieta Pękala. Obrona: 11 października 2016 r.

Promotor prac magisterskich:

- 8 prac - kierunek farmacja
- 10 prac - kierunek kosmetologia

Recenzent prac magisterskich:

- 5 prac - kierunek farmacja
- 13 prac - kierunek kosmetologia

Opieka naukowa nad studentami:

- Opieka naukowa nad stypendystami w kierowanym przeze mnie projekcie pt.: *Bioremediacja zanieczyszczeń wody wywołanych lekami i kosmetykami przez grzyby Cunninghamella - biotechnologiczna strategia oczyszczania środowiska*, finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu „Opus”, studenci farmacji: Aleksandra Murzyn i Justyna Orzeł (styczeń 2022 – styczeń 2023 r.). Udział studentów w International Medical Students' Conference, 13 – 15 kwietnia 2023 r., Kraków –

wystąpienie pt.: *Degradation of diclofenac by Cunninghamella species, in vitro toxicity evaluation of fungal transformation products.*

- Współopiekun (wraz z prof. dr hab. Henrykiem Maroną) Studenckiego Koła Chemii Medycznej przy Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych UJ CM (2007 – 2008). Prace koła zaowocowały udziałem studentów w konferencjach: Międzynarodowej Konferencji Studentów Uczelni Medycznych (Kraków, 2008) oraz XXII Ogólnopolskiej Konferencji Kardiologicznej (Gdańsk, 2008). Zaprezentowane w Krakowie zgłoszenie pt.: *Ocena aktywności mutagennej oraz antymutagennej aktywnych przeciwdrgawkowo połączeń przy użyciu testu Vibrio harveyi* otrzymało wyróżnienie w Sesji Farmaceutycznej.

Realizowane zajęcia dydaktyczne:

- Biochemia (kierunek farmacja): seminaria i ćwiczenia, 2015 – obecnie
- Biotechnologia w kosmetologii (kierunek kosmetologia): ćwiczenia, 2015 – obecnie
- Biochemia ogólna i medyczna (Studium Kształcenia Podyplomowego Wydziału Farmaceutycznego): wykłady, 2019 – obecnie
- Biology in Pharmaceutical Sciences (kierunek Drug Discovery and Development): wykłady i ćwiczenia, 2018 – obecnie
- Wybrane aspekty bezpieczeństwa farmakoterapii: terapia monitorowana, farmakogenetyka, metody *in vitro* w ocenie bezpieczeństwa leków (Szkoła Doktorska Nauk Medycznych i Nauk o Zdrowiu): wykłady, 2020 – obecnie
- Chemia organiczna (kierunek analityka medyczna): seminaria i ćwiczenia, 2012 – 2014
- Badania i rozwój innowacyjnych kosmetyków (kierunek kosmetologia): seminaria i ćwiczenia, 2011 – 2014
- Chemia surowców kosmetycznych (kierunek kosmetologia): seminaria i ćwiczenia, 2010 – 2014
- Fakultet: Wybrane zagadnienia z kosmetologii oraz chemii kosmetycznej (kierunek farmacja): seminaria, 2010 – 2014

Opracowanie materiałów dydaktycznych dla studentów:

- Współautorstwo podręcznika „*Chemia organiczna w laboratorium dla studentów analityki medycznej*”. Praca zbiorowa pod redakcją H. Marony, Wydawnictwo ZOZ Ośrodek UMEA SHINODA-KURACEJO, Kraków, 2016 (ISBN 978-83-936591-6-6).

- Opracowanie ćwiczeń komputerowych i laboratoryjnych z przedmiotu Chemia surowców kosmetycznych dla studentów I roku uzupełniających studiów magisterskich na kierunku Kosmetologia na Wydziale Farmaceutycznym UJ CM.

Staże dydaktyczne:

- Tygodniowy staż dydaktyczny w ramach programu ERASMUS+ (opiekun: prof. Pavel Kopel) w Mendel University in Brno, Faculty of AgriSciences, Department of Chemistry and Biochemistry, Brno, Czechy (czerwiec 2019 r.)

Osiągnięcia organizacyjne:

- Zespołowa Nagroda Rektora Uniwersytetu Jagiellońskiego za osiągnięcia organizacyjne – III stopnia (2020 r.)
- Członek Komitetu Organizacyjnego Konferencji Nowoczesna Kosmetologia - od Nauki do Biznesu, Wydział Farmaceutyczny Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków, 28 maja 2016 r.
- Członek Jury Sesji Farmaceutycznej 30th International Medical Students Conference Cracow 2022, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, maj 2022 r.
- Członek założyciel Sekcji Kosmetologii Oddziału Krakowskiego Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego (2016)
- Członek Komisji Rewizyjnej Towarzystwa Doktorantów Uniwersytetu Jagiellońskiego (2007)
- Przewodnicząca Studenckiego Koła Naukowego przy Samodzielnej Pracowni Radioligandów Wydziału Farmaceutycznego UJ CM (2005 – 2006)

Popularyzacja nauki:

Referaty wygłoszone na zaproszenie:

- **Słoczyńska K.** *Kiedy nasza skóra chce pić.* Referat wygłoszony podczas Zebrania Naukowego Polskiego Towarzystwa Nauk Żywnościowych, Kraków, 8 czerwca 2010 r.
- **Słoczyńska K.** *Wstępna ocena aktywności mutagennej i antymutagennej wybranych związków o zdefiniowanej aktywności biologicznej.* Referat wygłoszony podczas Zebrania Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, Kraków, 11 grudnia 2013 r.

Wykłady wygłoszone na zaproszenie:

- **Słoczyńska K.** *Bezpieczeństwo stosowania kosmetyków.* Wykład wygłoszony w ramach Akademii Jakości Życia, Małopolska Wyższa Szkoła im. Józefa Dietla w Krakowie, Kraków, 19 marca 2013 r.

Szkolenia przeprowadzone na zaproszenie:

VI Sesja Szkoleniowa Aptekarzy, 15 – 29 sierpnia 2010 r., Krynica-Zdrój, wygłoszenie cyklu wykładów w ramach kursu pn. *Produkty kosmetyczne – wybrane zagadnienia.*

Tematyka wykładów:

- *Nutrikosmetyki – charakterystyka i uzasadnienie stosowania*
- *Bezpieczeństwo stosowania kosmetyków. Pokosmetyczne zmiany skórne ze szczególnym uwzględnieniem zmian alergicznych*
- *Kosmetyki hipoalergiczne*

Prelekcje i prezentacje dla uczniów szkół ponadpodstawowych:

Przygotowanie prelekcji i prezentacji laboratorium dla uczniów szkół ponadpodstawowych w ramach wizyty na Wydziale Farmaceutycznym UJ CM (wrzesień 2022 r.).

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej

Nagrody i wyróżnienia:

2016	Nagroda Dziekana Wydziału Farmaceutycznego UJ CM za osiągnięcia naukowe za 2015 rok
2012	Wyróżnienie przez Radę Wydziału Farmaceutycznego UJ CM rozprawy doktorskiej pt. <i>Ocena wpływu wybranych związków o aktywności krążeniowej na parametry reologiczne i biochemiczne krwinek czerwonych</i>
2006	Nagroda Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych dla Najlepszego Absolwenta Analityki Medycznej Stacjonarnych Studiów II Stopnia Uniwersytetu Jagiellońskiego

Nagrody stypendialne:

2006 – 2007 Roczne stypendium Małopolskiej Fundacji Stypendialnej w ramach projektu: *Sapere Auso* pn. *Moja Inspiracja – Małopolska Innowacja* dla najlepszych absolwentów szkół wyższych kontynuujących naukę na studiach doktoranckich

Pozostałe nagrody i wyróżnienia:

2007 III nagroda w Sesji Farmakologicznej, wystąpienie podczas 4th International Science Conference of Students and Young Scientists „Young People and Perspective of Modern Medical Science”, Vinnytsya, Ukraina, 4 – 6 kwietnia 2007 r. Marona H, Szkaradek N, **Stachura K**, Waszkielewicz AM. *The anticonvulsant properties of some piperazine derivatives*.

2019 Wyróżnienie certyfikatem Wiley publikacji: Gunia-Krzyżak A, **Słoczyńska K**, Popiół J, Koczurkiewicz P, Marona H, Pękała E. *Cinnamic acid derivatives in cosmetics - current use and future prospects*. Int. J. Cosmet. Sci. 40(4):356-366, 2018 - jako “Top downloaded article 2017 – 2018, top 20 most read paper” International Journal of Cosmetic Science.

Wygłoszenie cyklu wykładów naukowych w uczelni zagranicznej:

W 2019 roku podczas tygodniowego stażu dydaktycznego w ramach programu **ERASMUS+**, **wygłosiłam w Mendel University in Brno, Faculty of AgriSciences, Department of Chemistry and Biochemistry, Brno, Czechy, cykl wykładów naukowych poświęconych realizowanym przeze mnie zagadnieniom naukowo - badawczym.**

Tematyka wykładów:

- *Biotransformation of bioactive compounds: in silico and in vitro approach* (3 godziny)
- *Safety evaluation of new chemical entities* (3 godziny)
- *Modern photoprotection – identification of the effective and safe UV filters in the groups of arylidenehydantoin and cinnamic acid derivatives* (2 godziny)

Współpraca naukowa:

Prowadzone przeze mnie prace naukowo-badawcze, jak również opisane w ramach prac H1-H8 osiągnięcie naukowe są w znacznej części efektem **współpracy z krajowymi i międzynarodowymi ośrodkami naukowo-badawczymi**. Nawiązanie tego typu współpracy umożliwiło mi przede wszystkim **rozbudowanie warsztatu pracy o nowe modele badawcze** i pogłębienie wiedzy dotyczącej badań nad bezpieczeństwem nowych związków chemicznych o zdefiniowanej aktywności biologicznej.

W 2013 roku zainicjowałam współpracę naukową z **dr Takehiko Nohmi z Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Hygienic Sciences, Tokio, Japonia** oraz **dr Kei-Ichi Sugiyama z Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences Kawasaki City, Kanagawa, Japonia**. Dzięki tej współpracy **zapoczątkowałam w macierzystej jednostce badawczej** badania z zakresu **oceny działania mutagennego i antymutagennego** związków chemicznych w oparciu o **referencyjny test Ames** (test *Salmonella*), stanowiący światowy standard w tej dziedzinie. Współpraca polegała przede wszystkim na konsultacji protokołów badawczych oraz uzyskanych wyników badań.

W ramach współpracy powstały następujące publikacje, których jestem współautorem:

- Waszkielewicz AM, Cegła M, Żesławska E, Nitek W, **Słoczyńska K**, Marona H. N-[(2,6-Dimethylphenoxy)alkyl]aminoalkanols-their physicochemical and anticonvulsant properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2015, 23(15):4197-4217.
- Szkaradek N, Rapacz A, Pytka K, Filipek B, Żelaszczyk D, Szafrński P, **Słoczyńska K**, Marona H. Cardiovascular activity of the chiral xanthone derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2015, 23(20):6714-6724.
- Gunia-Krzyżak A, Żesławska E, **Słoczyńska K**, Koczurkiewicz P, Nitek W, Żelaszczyk D, Szkaradek N, Waszkielewicz AM, Pękala E, Marona H. Anticonvulsant activity, crystal structures, and preliminary safety evaluation of N-trans-cinnamoyl derivatives of selected (un)modified aminoalkanols. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2016, 107:26-37.
- Powroźnik B, **Słoczyńska K**, Marciniec K, Zajdel P, Pękala E. Preliminary safety assessment of new azinesulfonamide analogs of aripiprazole using prokaryotic models. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 2016, 6(3):377-384.
- Maré MA, Domínguez-Álvarez E, **Słoczyńska K**, Żmudzki P, Chłoń-Rzepa G, Pękala E. *In vitro* biotransformation, safety and chemopreventive action of novel 8-methoxy-

purine-2,6-dione derivatives. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2018, 184(1):124-139.

W 2015 roku zapoczątkowałam współpracę naukową z **dr Barbarą Dmochowską** z Pracowni Chemii Cukrów Katedry Chemii Organicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. W ramach współpracy realizowałam prace badawcze dotyczące **oceny aktywności mutagennej nowych D-ksylopiranozydów**. Badane związki zostały zsyntezowane przez zespół dr Dmochowskiej, natomiast badania mutagenności zostały przeprowadzone w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego UJ CM.

Wyniki zrealizowanych w ramach współpracy prac badawczych opisano w pracy:

- Sikora K, Szweda P, **Słoczyńska K**, Samaszko-Fiartek J, Madaj J, Liberek B, Pękała E, **Dmochowska B**. Synthesis, antimicrobial and mutagenic activity of a new class of D-xylopyranosides. *Antibiotics* 2023, 12, 888.

W 2022 roku zapoczątkowałam również współpracę naukową z **dr Ivana Eichlerova** z Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Praga, Czechy. Efektem tej współpracy było **zainicjowanie w macierzystej jednostce badawczej badań biotransformacji** wybranych leków i surowców kosmetycznych przez grzyby z gatunku *Trametes versicolor*. Badania te prowadzone są w ramach realizowanego pod moim kierownictwem projektu badawczego pt.: *Bioremediacja zanieczyszczeń wody wywołanych lekami i kosmetykami przez grzyby Cunninghamella - biotechnologiczna strategia oczyszczania środowiska*, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu „Opus” (nr 2020/37/B/NZ7/02546).

Referaty wygłoszone w ramach kongresów/ konferencji:

Przed uzyskaniem stopnia doktora:

- 1 **Stachura K**, Biedroń P, Olszewska L, Krzyżanowska A, Kaleta M, Kłosowska K, Nowak N. Evaluation of the activities of Superoxide Dismutase (SOD) and Catalase (CAT) in patients affected with diabetes, patients with hypertension and those diagnosed with both conditions. 3rd International Scientific Congress of Medical Students and Young Doctors, Warszawa, 12 – 14 maja 2006 r. *Arch Med Sci.* 2006;2suppl.1:S114.
- 2 Marona H, **Stachura K**. Alternatywne metody oceny mutagenności substancji biologicznie aktywnych. XXI Ogólnopolskie Seminarium „Mechanizmy służące utrzymaniu życia i regulacji fizjologicznych”, Kraków, 15 marca 2007 r.

- 3 Marona H, Szkaradek N, **Stachura K**, Waszkielewicz AM. The anticonvulsant properties of some piperazine derivatives. 4th International Science Conference of Students and Young Scientists „Young People and Perspective of Modern Medical Science”, Vinnytsya, Ukraina, 4 – 6 kwietnia 2007 r. III nagroda Sesji Farmakologicznej.
- 4 **Stachura K**, Kózka M, Marona H. Red blood cells rheology in varicose veins patients. Rheological examination of red blood cells after incubation with pentoxifylline and lisofylline. 6th International Congress Central European Vascular Forum, Bratislava, Słowacja, 16 – 18 maja 2008 r.
- 5 **Stachura K**, Pękala E, Szkaradek N, Marona H. Mutagenic and antimutagenic activity of some active xanthone derivatives. Central European Congress of Life Sciences EUROBIOTECH 2008, Kraków, 17 – 19 października 2008 r. *Acta Biochim Pol.* 2008;55 suppl.4:50.
- 6 **Słoczyńska K**, Marona H. Nonenzymatic antioxidants suitable for dermatological applications. 18th International Symposium of Polish Network of Cellular and Molecular Biology „Molecular and physiological aspects of regulatory processes of the organism”, Kraków, 17 – 18 września 2009 r.

Po uzyskaniu stopnia doktora:

- 7 **Słoczyńska K**, Marona H. Bezpieczeństwo stosowania kosmetyków. II Konferencja Kosmetologii Medyczne Aspekty Kosmetologii, Małopolska Wyższa Szkoła im. Józefa Dietla, Kraków, 1 czerwca 2012 r.

Udział w szkoleniach i warsztatach:

- 26 – 27.04.2007 r. Pozyskiwanie środków finansowych na badania naukowe w zakresie nauk medycznych, Towarzystwo Doktorantów UJ CM
- 11.03.2009 r. Oznaczanie endotoksyn bakteryjnych, LAL Workshop, LONZA, Kraków
- 29.10.2012 r. Hodowle komórkowe. Analiza komórek, Merck Millipore, Kraków
- 26 – 27.09.2013 r. Badanie cytotoksyczności związków chemicznych, Pro-Science Polska, Gdańsk
- 03.11.2014 r. Nowelizacja ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, Kraków

- 25 – 28.03.2015 r. Przedsiębiorczość, szkolenie prowadzone przez firmę Fuentek w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, Fundacja na rzecz Nauki Polskiej, Kraków
- 16.10.2015 r. Tłuszcze w żywieniu człowieka – w poszukiwaniu prawdy, Ogólnopolskie Centrum Dietetyki Instytutu Żywności i Żywienia, Warszawa
- 22 – 23.10.2015 r. Zarządzanie zespołem naukowym – szkolenie prowadzone przez HFP Consulting w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, Fundacja na rzecz Nauki Polskiej, Kraków
- 16 – 17.11.2015 r. Pisanie tekstów naukowych – poziom zaawansowany, szkolenie prowadzone przez Jeana-Luca Lebruna w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, Fundacja na rzecz Nauki Polskiej, Kraków
- 12.12.2015 r. I Konferencja Medycyna Precyzyjna – Czy możemy leczyć w oparciu o genotyp? Organizowana przez Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum pod patronatem Małopolskiego Centrum Biotechnologii, Kraków
- 10.11.2016 r. Co w Scopusie piszczy? Pierwsze kroki. Szkolenie on-line Elsevier
- 24.11.2016 r. Ja, moi koledzy i nasza instytucja w bazie Scopus. Szkolenie on-line Elsevier
- 06.12.2016 r. Scopus jako pomocnik w pisaniu wniosków o granty. Szkolenie on-line Elsevier
- 15.12.2016 r. Jak mądrze i dobrze wybrać czasopismo? Szkolenie on-line Elsevier
- 21.02.2017 r. Zacytani po uszy w bazie ScienceDirect. Szkolenie on-line Elsevier
- 27.02.2017 r. Zgłaszanie czasopism do bazy Scopus krok po kroku”. Szkolenie on-line Elsevier
- 24.04.2017 r. Zgłaszanie poprawek do bazy Scopus. Szkolenie on-line Elsevier
- 19.05.2017 r. Baza Reaxys – nowy intuicyjny interfejs. Szkolenie on-line Elsevier

8. Piśmiennictwo

- [1] Smith DA. Discovery and ADMET: Where are we now. *Curr Top Med Chem.* 2011, 11:467-481.
- [2] Pridgeon CS, Schlott C, Wong MW, Heringa MB, Heckel T, Leedale J, Launay L, Gryshkova V, Przyborski S, Bearon RN, Wilkinson EL, Ansari T, Greenman J, Hendriks DFG, Gibbs S, Sidaway J, Sison-Young RL, Walker P, Cross MJ, Park BK, Goldring CEP. Innovative organotypic in vitro models for safety assessment: aligning with regulatory requirements and understanding models of the heart, skin, and liver as paradigms. *Arch Toxicol.* 2018, 92:557-569.

- [3] Di L, Obach RS. Addressing the challenges of low clearance in drug research. *AAPS J.* 2015, 17:352-357.
- [4] Kocherova I, Kempisty B, Hutchings G, Moncrieff L, Dompe C, Janowicz K, Petite J, Shibli JA, Mozdziak P. Cell-based approaches in drug development – a concise review. *Med J Cell Biol.* 2020, 8:44-49.
- [5] McKim Jr JM. Building a tiered approach to in vitro predictive toxicity screening: a focus on assays with in vivo relevance. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2010, 13:188-206.
- [6] Tsaïoun K, Bottlaender M, Mabondzo A, Alzheimer's Drug Discovery Foundation. ADDME-Avoiding Drug Development Mistakes Early: central nervous system drug discovery perspective. *BMC Neurol.* 2009, 9 Suppl 1:S1.
- [7] Wiśniowska B, Polak S. Modelowanie komputerowe w badaniach nad lekiem – przewidywanie potencjalnych działań toksycznych. *Farm Pol.* 2009, 65:445-452.
- [8] Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB, Philpott KL. Principles of early drug discovery. *Br J Pharmacol.* 2011, 162:1239-1249.
- [9] Ekert JE, Deakynne J, Pribul-Allen P, Terry R, Schofield C, Jeong CG, Storey J, Mohamet L, Francis J, Naidoo A, Amador A, Klein JL, Rowan W. Recommended guidelines for Developing, Qualifying, and Implementing Complex In Vitro Models (CIVMs) for drug discovery. *SLAS Discov.* 2020, 25:1174-1190.
- [10] Słoczyńska K, Gunia-Krzyżak A, Koczurkiewicz P, Wójcik-Pszczółka K, Żelaszczyk D, Popiół J, Pękala E. Metabolic stability and its role in the discovery of new chemical entities. *Acta Pharm.* 2019, 69:345-361.
- [11] Russell W, Burch R. *The Principles of Humane Experimental Technique.* Methuen, Londyn 1959.
- [12] Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych. *Dz.U. UE L 276/33 z 20.10.2010.*
- [13] Kłás K, Guzy P, Piska K, Wójcik-Pszczółka K, Koczurkiewicz P, Pękala E. Zastosowanie modeli in vitro w przedklinicznych badaniach bezpieczeństwa nowych kandydatów na leki. *Farm Pol.* 2018, 74:45-51.
- [14] Raies AB, Bajic VB. In silico toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity. *Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci.* 2016, 6:147-172.
- [15] Rim K-T. In silico prediction of toxicity and its applications for chemicals at work. *Toxicol Environ Health Sci.* 2020, 12:191-202.
- [16] Toropov AA, Toropova AP, Raska I Jr, Leszczynska D, Leszczynski J. Comprehension of drug toxicity: software and databases. *Comput Biol Med.* 2014, 45:20-25.
- [17] Valencia A, Prous J, Mora O, Sadrieh N, Valerio LG Jr. A novel QSAR model of *Salmonella* mutagenicity and its application in the safety assessment of drug impurities. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013, 273:427-434.
- [18] Guzman A, Garcia C, Marin AP, Proudlock RJ, Fernandez de Henestrosa AR, Ruiz MT, Marcos R. Evaluation of the genotoxic potential of three phenyltetrahydropyridinyl butylazole-derived sigma-receptor ligand drug candidates. *Mutat Res.* 2008, 653:91-98.
- [19] Eastmond DA, Hartwig A, Anderson D, Anwar WA, Cimino MC, Dobrev I, Douglas GR, Nohmi T, Phillips DH, Vickers C. Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme. *Mutagenesis.* 2009, 24:341-349.
- [20] Maron DM, Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res.* 1983, 113:173-215.
- [21] Mortelmans K, Zeiger E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res.* 2000, 455:29-60.
- [22] Czyż A, Szpilewska H, Dutkiewicz R, Kowalska W, Biniewska-Godlewska A, Węgrzyn G. Comparison of the Ames test and a newly developed assay for detection of mutagenic pollution of marine environments. *Mutat Res.* 2002, 519:67-74.
- [23] Węgrzyn G, Czyż A. Detection of mutagenic pollution of natural environment using microbiological assays. *J Appl Microbiol.* 2003, 95:1175-1181.
- [24] Podgórska B, Chęć E, Ułanowska K, Węgrzyn G. Optimisation of the microbiological mutagenicity assay based on genetically modified *Vibrio harveyi* strains. *J Appl Genet.* 2005, 46:241-246.

- [25] Kirsch-Volders M, Plas G, Elhajouji A, Lukamowicz M, Gonzalez L, Vande Loock K, Decordier I. The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Arch Toxicol.* 2011, 85:873-899.
- [26] Tilmant K, Gerets HH, De Ron P, Cossu-Leguille C, Vasseur P, Dhalluin S, Atienzar FA. The automated micronucleus assay for early assessment of genotoxicity in drug discovery. *Mutat Res.* 2013, 751:1-11.
- [27] Słoczyńska K, Powroźnik B, Pękala E, Waszkielewicz AM. Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. *J Appl Genet.* 2014, 55:273-285.
- [28] Fei C, Zhang J, Lin Y, Wang X, Zhang K, Zhang L, Zheng W, Wang M, Li T, Xiao S, Xue F, Wang C. Safety evaluation of a triazine compound nitromezuril by assessing bacterial reverse mutation, sperm abnormalities, micronucleus and chromosomal aberration. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2015, 71:585-589.
- [29] Guo X, Heflich RH, Dial SL, Richter PA, Moore MM, Mei N. Quantitative analysis of the relative mutagenicity of five chemical constituents of tobacco smoke in the mouse lymphoma assay. *Mutagenesis.* 2016, 31:287-296.
- [30] Kocak E. Investigation of potential genotoxic activity using the SOS Chromotest for real paracetamol wastewater and the wastewater treated by the Fenton process. *J Environ Health Sci Eng.* 2015, 13:66.
- [31] Yujra VQ, Moretti EG, Claudio SR, Silva MJ, Oliveira F, Oshima CT, Ribeiro DA. Genotoxicity and mutagenicity induced by acute crack cocaine exposure in mice. *Drug Chem Toxicol.* 2016, 39:388-391.
- [32] Girardello F, Custódio Leite C, Vianna Villela I, da Silva Machado M, Luiz Mendes Juchem A, Roesch-Ely M, Neves Fernandes A, Salvador M, Antonio Pêgas Henriques J. Titanium dioxide nanoparticles induce genotoxicity but not mutagenicity in golden mussel *Limnoperna fortunei*. *Aquat Toxicol.* 2016, 170:223-228.
- [33] Hoshina MM, Marin-Morales MA. Anti-genotoxicity and anti-mutagenicity of *Apis mellifera* venom. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2014, 762:43-48.
- [34] Subastri A, Harikrishna K, Sureshkumar M, Alshammari GM, Aristatile B, Thirunavukkarasu C. *Biomed Pharmacother.* 2017, 88:325-334.
- [35] Carneiro CC, Vêras JH, Góes BRL, Pérez CN, Chen-Chen L. Mutagenicity and antimutagenicity of *Salacia crassifolia* (mart. Ex. Schult.) G. Don. evaluated by Ames test. *Braz J Biol.* 2018, 78:345-350.
- [36] Niles AL, Moravec RA, Riss TL. Update on in vitro cytotoxicity assays for drug development. *Expert Opin Drug Discov.* 2008, 3:655-669.
- [37] Bácskay I, Nemes D, Fenyvesi F, Váradi J, Vasvári G, Fehér P, Vecsernyés M, Ujhelyi Z. Role of cytotoxicity experiments in pharmaceutical development. *Cytotoxicity, InTech*; 2018.
- [38] Dykens JA, Will Y. The significance of mitochondrial toxicity testing in drug development. *Drug Discov Today.* 2007, 12:777-785.
- [39] Méry B, Guy JB, Vallard A, Espenel S, Ardail D, Rodriguez-Lafrasse C, Rancoule C, Magné N. In vitro cell death determination for drug discovery: a landscape review of real issues. *J Cell Death.* 2017, 10:1179670717691251.
- [40] Bale SS, Verneti L, Senutovitch N, Jindal R, Hegde M, Gough A, McCarty WJ, Bakan A, Bhushan A, Shun TY, Golberg I, DeBiasio R, Usta BO, Taylor DL, Yarmush ML. In vitro platforms for evaluating liver toxicity. *Exp Biol Med (Maywood).* 2014, 239:1180-1191.
- [41] Dubbelboer IR, Pavlovic N, Heindryckx F, Sjögren E, Lennernäs H. Update on in vitro cytotoxicity assays for drug development. *Expert Opin Drug Discov.* 2008, 3:655-669.
- [42] Štampar M, Breznik B, Filipič M, Žegura B. Characterization of in vitro 3D cell model developed from human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line. *Cells.* 2020 28, 9:2557.
- [43] Jia L, Liu X. The conduct of drug metabolism studies considered good practice (II): in vitro experiments. *Curr. Drug Metabol.* 2007, 8:822-829.
- [44] Laine R. Metabolic stability: main enzymes involved and best tools to assess it. *Curr Drug Metab.* 2008, 9:921-927.
- [45] Pervaiz I, Ahmad S, Madni MA, Ahmad H, Khaliq FH. Microbial biotransformation: a tool for drug designing (Review). *Prikl Biokhim Mikrobiol.* 2013, 49:435-449.

- [46] Li AP. In vitro human hepatocyte-based experimental systems for the evaluation of human drug metabolism, drug-drug interactions, and drug toxicity in drug development. *Curr Top Med Chem.* 2014, 14:1325-1338.
- [47] Murphy CD. Drug metabolism in microorganisms. *Biotechnol Lett.* 2015, 37:19-28.
- [48] Knights KM, Stresser DM, Miners JO, Crespi CL. In vitro drug metabolism using liver microsomes. *Curr Protoc Pharmacol.* 2016, 74:7.8.1-7.8.24.
- [49] Piska K, Żelaszczyk D, Jamrozik M, Kubowicz-Kwaśny P, Pękala E. Cunninghamella biotransformation-similarities to human drug metabolism and its relevance for the drug discovery process. *Curr Drug Metab.* 2016, 17:107-117.
- [50] Peach ML, Zakharov AV, Liu R, Pugliese A, Tawa G, Wallqvist A, Nicklaus MC. Computational tools and resources for metabolism-related property predictions. 1. Overview of publicly available (free and commercial) databases and software. *Future Med Chem.* 2012, 4:1907-1932.
- [51] Cruciani G, Baroni M, Benedetti P, Goracci L, Fortuna CG. Exposition and reactivity optimization to predict sites of metabolism in chemicals. *Drug Discov Today Technol.* 2013, 10:e155-65.
- [52] Kazmi SR, Jun R, Yu MS, Jung C, Na D. In silico approaches and tools for the prediction of drug metabolism and fate: A review. *Comput Biol Med.* 2019, 106:54-64.
- [53] Cha CJ, Doerge DR, Cerniglia CE. Biotransformation of malachite green by the fungus *Cunninghamella elegans*. *Appl Environ Microbiol.* 2001, 67:4358-4360.
- [54] Felczak A, Bernat P, Różalska S, Lisowska K. Quinoline biodegradation by filamentous fungus *Cunninghamella elegans* and adaptive modifications of the fungal membrane composition. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2016, 23:8872-8880.
- [55] Zawadzka K, Bernat P, Felczak A, Lisowska K. Carbazole hydroxylation by the filamentous fungi of the *Cunninghamella* species. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2015, 22:19658-19666.
- [56] Aracagök YD, Göker H, Cihangir N. Biodegradation of micropollutant naproxen with a selected fungal strain and identification of metabolites. *Z Naturforsch C J Biosci.* 2017, 72:173-179.
- [57] Janicki T, Długoński J, Krupiński M. Detoxification and simultaneous removal of phenolic xenobiotics and heavy metals with endocrine-disrupting activity by the non-ligninolytic fungus *Umbelopsis isabellina*. *J Hazard Mater.* 2018, 360:661-669.
- [58] Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay. *Cold Spring Harb Protoc.* 2018, 2018.
- [59] MacGregor JT, Frötschl R, White PA, Crump KS, Eastmond DA, Fukushima S, Guérard M, Hayashi M, Soeteman-Hernández LG, Kasamatsu T, Levy DD, Morita T, Müller L, Schoeny R, Schuler MJ, Thybaud V, Johnson GE. IWGT report on quantitative approaches to genotoxicity risk assessment I. Methods and metrics for defining exposure-response relationships and points of departure (PoDs). *Mutat Res.* 2015, 783:55-65.
- [60] Marona H. Evaluation of some 2-substituted derivatives of xanthone for anti-convulsant properties. *Pharmazie.* 1998, 53:405-409.
- [61] Marona H. Synthesis and anticonvulsant effects of some aminoalkanolic derivatives of xanthone. *Pharmazie.* 1998, 53:672-676.
- [62] Szkaradek N, Gunia A, Waszkielewicz AM, Antkiewicz-Michaluk L, Cegła M, Szneler E, Marona H. Anticonvulsant evaluation of aminoalkanol derivatives of 2- and 4-methylxanthone. *Bioorg Med Chem.* 2013, 21:1190-1198.
- [63] Czyż A, Jasiecki J, Bogdan A, Szpilewska H, Węgrzyn G. Genetically modified *Vibrio harveyi* strains as potential bioindicators of mutagenic pollution of marine environments. *Appl Environ Microbiol.* 2000, 66:599-605.
- [64] Czyż A, Kowalska W, Węgrzyn G. *Vibrio harveyi* mutagenicity assay as a preliminary test for detection of mutagenic pollution of marine water. *Bull Environ Contam Toxicol.* 2003, 70:1065-1070.
- [65] Podgórska B, Pazdro K, Węgrzyn G. The use of the *Vibrio harveyi* luminescence mutagenicity assay as a rapid test for preliminary assessment of mutagenic pollution of marine sediments. *J Appl Genet.* 2007, 48:409-412.

- [66] Piosik J, Ulanowska K, Gwizdek–Wiśniewska A, Czyż A, Kapuściński J, Węgrzyn G. Alleviation of mutagenic effects of polycyclic aromatic agents (quinacrine mustard, ICR–191 and ICR–170) by caffeine and pentoxifylline. *Mutat Res.* 2003, 530:47-57.
- [67] Piosik J, Gwizdek-Wiśniewska A, Ulanowska K, Ochociński J, Czyż A, Węgrzyn G. Methylxanthines caffeine, pentoxifylline and theophylline decrease the mutagenic effect of daunomycin, doxorubicin and mitoxantrone. *Acta Biochim Pol.* 2005, 52:923-926.
- [68] Ulanowska K, Węgrzyn G. Mutagenic activity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J Appl Genet.* 2006, 47:85-87.
- [69] Dmochowska B, Piosik J, Woźniowska A, Sikora K, Wiśniewski A, Węgrzyn G. Mutagenicity of quaternary ammonium salts containing carbohydrate moieties. *J Hazard Mater.* 2011, 193:272-278.
- [70] Novick A, Szilard L. Anti-mutagens. *Nature.* 1952, 170:926-927.
- [71] Waszkielewicz AM, Pytko K, Rapacz A, Węlna E, Jarzyna M, Satała G, Bojarski A, Sapa J, Żmudzki P, Filipczak B, Marona H. Synthesis and evaluation of antidepressant-like activity of some 4-substituted 1-(2-methoxyphenyl)piperazine derivatives. *Chem Biol Drug Des.* 2015, 85:326-335.
- [72] Canale V, Kurczab R, Partyka A, Satała G, Lenda T, Jastrzębska-Więsek M, Wesołowska A, Bojarski AJ, Zajdel P. Towards new 5-HT₇ antagonists among arylsulfonamide derivatives of (aryloxy)ethyl-alkyl amines: Multiobjective based design, synthesis, and antidepressant and anxiolytic properties. *Eur J Med Chem.* 2016, 108:334-346.
- [73] Kubowicz P, Marona H, Pękala E. Synthesis, anticonvulsant activity and metabolism of 4-chloro-3-methylphenoxyethylamine derivatives of trans-2-aminocyclohexan-1-ol. *Chirality.* 2015, 27:163-169.
- [74] Popiół J, Gunia-Krzyżak A, Piska K, Żelaszczyk D, Koczurkiewicz P, Słoczyńska K, Wójcik-Pszczółka K, Krupa A, Kryczyk-Poprawa A, Żesławska E, Nitek W, Marona H, Pękala E. Discovery of novel UV-filters with favorable safety profiles in the 5-arylideneimidazolidine-2,4-dione derivatives group. *Molecules.* 2019, 24:2321.

Karolina Słoczyńska
.....
(podpis wnioskodawcy)