

**Katedra i Zakład Chemii i Analizy Leków**  
**Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej**  
**Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach**

**dr n. farm. Dorota Wrześniok**

**Dokumentacja o wszczęcie postępowania habilitacyjnego**  
**w dziedzinie nauk farmaceutycznych**

**Załącznik 2**

**Autoreferat**

**Sosnowiec 2013**

## SPIS TREŚCI

1. IMIĘ I NAZWISKO.....	3
2. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE .....	3
3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH .....	3
4. OSIĄGNIĘCIE STANOWIĄCE PODSTAWĘ HABILITACJI .....	3
4.1. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO .....	3
4.2. WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ HABILITACJI.....	4
4.3. OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO WW. PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW.....	5
4.3.1. WSTĘP.....	5
4.3.2. CEL BADAŃ.....	8
4.3.3. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ.....	8
4.3.4. PODSUMOWANIE.....	12
5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO – BADAWCZYCH.....	13
5.1. OSIĄGNIĘCIA POZNAWCZE.....	14
5.2. WSPÓŁPRACA NAUKOWA.....	20
5.3. NAGRODY OTRZYMANE ZA DZIAŁALNOŚĆ NAUKOWĄ.....	20

**1. IMIĘ I NAZWISKO** Dorota Wrześniok**2. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE**

- a) Dyplom i tytuł magistra chemii, Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii, 1996. Praca magisterska pt. „Opracowanie algorytmu i programu komputerowego generującego diagramy antysymetryzowane w wielociałowym rachunku zaburzeń” wykonana pod kierunkiem Prof. dr hab. Stanisława Kucharskiego.
- b) Dyplom i stopień doktora nauk farmaceutycznych w specjalności chemia leków (z wyróżnieniem), Śląska Akademia Medyczna (obecnie Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach), Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, 2004. Rozprawa doktorska pt. „Oddziaływanie antybiotyków aminoglikozydowych z melaniną” wykonana pod kierunkiem Prof. dr hab. Ewy Buszman.

**3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH**

Od 1.10.1996 jestem pracownikiem Katedry i Zakładu Chemii i Analizy Leków Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

1.10.1996 – 30.09.1998 Stanowisko: pracownik naukowo-techniczny - chemik

1.10.1998 – 30.09.2004 Stanowisko: asystent

1.10.2004 – obecnie Stanowisko: adiunkt

**4. OSIĄGNIĘCIE STANOWIĄCE PODSTAWĘ HABILITACJI – WYNIKAJĄCE Z ART. 16, UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ.U. NR 65, POZ. 595, Z PÓŹN. ZM.)****4.1. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO**

**„Wpływ antybiotyków aminoglikozydowych na procesy biochemiczne w melanocytach prawidłowych”**

## 4.2. WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ HABILITACJI

Podstawę habilitacji stanowi cykl dziewięciu prac opublikowanych w latach 2007-2013 o sumarycznym IF wynoszącym **11.037** (pkt. MNIi = **156**). W ośmiu z wybranych publikacji jestem pierwszym autorem.

- H1** Buszman E., **Wrześniok D.**, Wowra A., Kosmala D.: Oddziaływanie streptomycyny i dihydrostreptomycyny z melaniną w obecności jonów  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$ . *Ann. Acad. Med. Siles.* 2007, 61(5): 365-371. (MNIi/MNiSW: **6**)
- H2** **Wrześniok D.**, Buszman E., Lakota D.: Interaction of amikacin and tobramycin with melanin in the presence of  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  ions. *Acta Pol. Pharm. – Drug Res.* 2011, 68(4): 493-498. (IF: **0.663**; MNIi/MNiSW: **15**)
- H3** **Wrześniok D.**, Buszman E., Grzegorzczak M., Grzegorzczak A., Hryniewicz T.: Impact of metal ions on netilmicin-melanin interaction. *Acta Pol. Pharm. – Drug Res.* 2012, 69(1): 41-44. (IF: **0.665**; MNIi/MNiSW: **15**)
- H4** **Wrześniok D.**, Buszman E., Miernik-Biela E.: Amikacin, kanamycin and tobramycin binding to melanin in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  ions. *Acta Pol. Pharm. – Drug Res.* 2012, 69(6): 1035-1041. (IF: **0.665**; MNIi/MNiSW: **15**)
- H5** **Wrześniok D.**, Beberok A., Otręba M., Buszman E.: Modulation of melanogenesis and antioxidant defense system in melanocytes by amikacin. *Toxicol. In Vitro* 2013, 27: 1102-1108 (IF: **2.650**; MNIi/MNiSW: **30**)
- H6** **Wrześniok D.**, Beberok A., Otręba M., Buszman E.: Netilmicin-induced modulation of melanogenesis in HEMa-LP melanocytes. *Acta Pol. Pharm. – Drug Res.* 2013, 70(5): 803-808. (IF: **0.665**; MNIi/MNiSW: **15**)
- H7** **Wrześniok D.**, Otręba M., Beberok A., Buszman E.: Viability of human melanocytes HEMa-LP exposed to amikacin and kanamycin. *Indian J. Pharm. Sci.* 2013, 75(1): 102-106. (IF: **0.338**; MNIi/MNiSW: **15**)

**H8 Wrześniok D.**, Otręba M., Beberok A., Buszman E.: Impact of kanamycin on melanogenesis and antioxidant enzymes activity in melanocytes - an in vitro study. *J. Cell Biochem.* 2013, DOI: 10.1002/jcb.24623 (**IF: 3.062; MNIi/MNiSW: 30**)

**H9 Wrześniok D.**, Beberok A., Otręba M., Buszman E.: Effect of streptomycin on melanogenesis and antioxidant status in melanocytes. *Mol. Cell Biochem.* 2013, DOI: 10.1007/s11010-013-1756-x (**IF: 2.329; MNIi/MNiSW: 15**)

### **4.3. OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO WW. PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW**

#### **4.3.1. WSTĘP**

Biopolimery melaninowe to wielkocząsteczkowe związki organiczne zaliczane do pigmentów naturalnych, szeroko rozpowszechnione zarówno w świecie roślinnym, jak i zwierzęcym. Barwnik ten determinuje kolor oczu, skóry i włosów u człowieka. Fizjologicznie melaniny występują między innymi w skórze, oku, uchu wewnętrznym, pniu mózgu i oponach mózgowych.

Melaniny wykazują zdolność pochłaniania promieniowania elektromagnetycznego z zakresu ultrafioletu i światła widzialnego. Odgrywają ważną rolę w ochronie komórek przed działaniem czynników utleniających, redukujących i promieniowania. Wykazano, że obecność melanin w tkankach jest ważnym składnikiem systemu ochronnego, zabezpieczającego przed toksycznym wpływem reaktywnych form tlenu oraz innych wolnych rodników. Biopolimery melaninowe wykazują ponadto zdolność wiązania wielu związków chemicznych, między innymi jonów metali, policyklicznych węglowodorów aromatycznych i substancji leczniczych.

W normalnych warunkach leki są zazwyczaj wydalane z organizmu do około jednego tygodnia od momentu podania pojedynczej dawki. Stwierdzono jednakże, że podanie związków o udowodnionym powinowactwie do melaniny, powoduje wydłużenie okresu kumulacji i retencji tych leków nawet do kilku lat. Kumulacja substancji leczniczych w tkankach upigmentowanych organizmu może wpływać na metabolizm i efekt terapeutyczny stosowanych leków, a także leży u podstaw wielu powikłań polekowych, takich jak nadpigmentacja skóry, zaburzenia słuchu, ogólna melanoza lub toksyczna retinopatia.

Powinowactwo do polimerów melaninowych wykazuje wiele substancji leczniczych, do których zalicza się między innymi leki psychotropowe, przeciwmalaryczne, miejscowo znieczulające i antybiotyki aminoglikozydowe.

Aminoglikozydy stanowią dużą grupę związków chemicznych, spośród których wiele ma znaczenie lecznicze. Mechanizm działania antybiotyków aminoglikozydowych polega na hamowaniu syntezy białek bakteryjnych oraz na uszkodzeniu struktury błony cytoplazmatycznej. Działanie bakteriobójcze aminoglikozydów zależy od ich stężenia. W niższych stężeniach następuje głównie błędne rozszyfrowywanie kodu genetycznego, błędna translacja, w wyniku czego mogą zostać pominięte kodony terminalne syntezy, co prowadzi do powstania anormalnie długich cząsteczek białka. W wyższych stężeniach antybiotyki aminoglikozydowe powodują dodatkowo uszkodzenie błony cytoplazmatycznej bakterii, a tym samym przyczyniają się do wypływu niektórych jonów i związków niskocząsteczkowych.

Aminoglikozydy są lekami wysoce skutecznymi w leczeniu poważnych zakażeń, posocznic, zakażeń dróg moczowych, oddechowych, przewodu pokarmowego, łącznie z zapaleniem otrzewnej, zapalenia opon mózgowych, bakteryjnego zapalenia wsierdza oraz w zakażeniach skóry, kości i tkanek miękkich. Antybiotyki aminoglikozydowe odznaczają się znaczną skutecznością kliniczną, wszystkie mają podobny zakres działania i podobne właściwości farmakokinetyczne, ale wszystkie wykazują działanie toksyczne skierowane głównie na nerki oraz narząd słuchu i równowagi.

Wykazano, że nefrotoksyczne działanie aminoglikozydów jest odwracalne po odstawieniu leków, natomiast działanie ototoksyczne jest niejednokrotnie nieodwracalne. Kliniką konsekwencją terapii lekami tej grupy może być upośledzenie słuchu, a nawet głuchota. W oparciu o wyniki badań histologicznych kości skroniowych zwierząt, którym podawano aminoglikozydy stwierdzono, że ototoksyczne działanie tych leków wynika z uszkodzenia prążka naczyniowego i /lub komórek z nim sąsiadujących (komórek rzęsatych narządu Cortiego). Wszystkie aminoglikozydy charakteryzują się również tendencją do uszkodzenia jednego z odgałęzień VIII nerwu czaszkowego, unerwiającego narząd przedsionkowo-ślimakowy ucha wewnętrznego: gentamicyna i sisomicyna uszkodzają przede wszystkim nerw przedsionkowy, kanamycyna i amikacyna – nerw ślimakowy, natomiast streptomycyna uszkodza w jednakowym stopniu zarówno nerw przedsionkowy, jak i nerw ślimakowy. Toksyczność aminoglikozydów jest różna, ale w niektórych przypadkach jest tak duża, że uniemożliwia podawanie ogólne. Objawy ototoksyczności mogą pojawić się w ciągu 3-5 dni terapii, jak również ze znacznym opóźnieniem. W początkowym okresie ujawnia się

zaburzenie słyszenia wysokich tonów, które następnie może postępować na wszystkie częstotliwości. Utrata słuchu typowa dla aminoglikozydów jest symetryczna i obustronna, choć zarejestrowano przypadki uszkodzenia słuchu tylko po jednej stronie, szczególnie po terapii amikacyną lub kanamycyną.

Znaczenie fizjologiczne wiązania substancji leczniczych do biopolimerów melaninowych nie jest do końca poznane, ale przypuszcza się, że melanina chroni tkanki upigmentowane i tkanki sąsiadujące z nimi poprzez adsorpcję tych substancji, które następnie powoli są uwalniane w nietoksycznych stężeniach. Z drugiej strony długotrwała farmakoterapia może prowadzić do nawarstwiania się wysokich poziomów substancji leczniczych zmagazynowanych w melaninie, co w końcowym efekcie może powodować degenerację tkanek zawierających melaninę, a następnie uszkodzenia w otaczających tkankach.

Rezultaty przeprowadzonych dotychczas badań sugerują, że na działanie ototoksyczne leków może wpływać m.in. ich powinowactwo do melaniny ucha wewnętrznego, a wychwyt leku może być wprost proporcjonalny do ilości melaniny w upigmentowanych tkankach. Ze zdolności do tworzenia połączeń biopolimerów melaninowych z substancjami chemicznymi, w tym jonami metali i lekami, wynikają z jednej strony funkcje ochronne melanin (wiązanie substancji o charakterze toksycznym), z drugiej zaś kumulacja w tkankach upigmentowanych i występowanie określonych efektów toksycznych. Zachodzi zatem przypuszczenie, że biopolimery melaninowe mogą odgrywać istotną rolę w mechanizmach ototoksycznego działania antybiotyków aminoglikozydowych w wyniku wysokodawkowej i/lub długoterminowej terapii, z uwagi na możliwość kumulacji tych leków w melaninie ucha wewnętrznego.

Wyjaśnienie funkcji biopolimerów melaninowych w organizmie wymaga znajomości ich struktury i właściwości fizykochemicznych, uwarunkowanych obecnością w biopolimerze centrów aktywnych: wymiany jonowej i elektronowej oraz paramagnetycznych. W fizjologicznym pH polimery melaninowe są polianionami, zawierającymi liczne grupy karboksylowe i o-semichinony, czego konsekwencją jest powinowactwo sorpcyjne do wielu substancji organicznych i nieorganicznych o charakterze kationowym, w tym substancji leczniczych oraz jonów metali. W badaniach *in vitro*, które wchodziły w zakres mojej rozprawy doktorskiej, jak również zostały opracowane w formie publikacji wykazałam, że antybiotyki aminoglikozydowe tworzą trwałe kompleksy z modelową DOPA-melaniną, a ilości antybiotyków związanych z melaniną rosną wraz ze wzrostem stężenia początkowego leku oraz z wydłużaniem czasu inkubacji. Stwierdziłam ponadto, że w tworzeniu kompleksów

antybiotyków aminoglikozydowych z melaniną uczestniczą co najmniej dwie klasy niezależnych miejsc wiążących o wartościach stałych trwałości rzędu  $K_1 \sim 10^6 - 10^3 \text{ M}^{-1}$  i  $K_2 \sim 10^4 - 10^2 \text{ M}^{-1}$ . Zagadnienia dotyczące oddziaływania antybiotyków aminoglikozydowych z melaniną wymagały kontynuacji i stały się przedmiotem moich dalszych badań prowadzonych po uzyskaniu stopnia naukowego doktora.

#### 4.3.2. CEL BADAŃ

Rola jonów metali w kolejnych etapach melanogenezy, a także wysoka zawartość jonów metali w tkankach upigmentowanych, wskazuje na możliwość powstawania *in vivo* biopolimerów melaninowych o bardzo zróżnicowanej strukturze, właściwościach fizykochemicznych i funkcji biologicznej, w zależności od warunków biogeochemicznych i stopnia zanieczyszczenia środowiska.

Wiele substancji leczniczych podczas długotrwałej i/lub wysokodawkowej terapii podlega specyficznej interakcji z melaninami, czego następstwem może być kumulacja leków w tkankach bogatych w melaniny i miejscowy wzrost ich toksyczności. W świetle faktu obfitego występowania melanin w uchu wewnętrznym zachodzi przypuszczenie, że jednym z mechanizmów ototoksyczności aminoglikozydów może być ich kumulacja w melaninie ucha wewnętrznego oraz toksyczne oddziaływanie na procesy biochemiczne zachodzące w melanocytach.

Nadrzędnym celem moich badań było określenie charakteru oddziaływań między aminoglikozydami i melaniną w obecności jonów metali występujących fizjologicznie w organizmie oraz analiza wpływu tych antybiotyków na przeżywalność i procesy biochemiczne zachodzące w komórkach zawierających melanicę – melanocytach.

#### 4.3.3. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

W pierwszym etapie badań oceniałam wpływ jonów  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$  na wiązanie antybiotyków aminoglikozydowych do melanicę. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdziłam, że amikacyna, kanamycyna, netylmicyna, tobramycyna, streptomycyna i dihydrostreptomycyna tworzą kompleksy z biopolimerami melaninowymi zawierającymi jony metali, a ilość antybiotyku związanego z kompleksami [melanina- $\text{Cu}^{2+}$ ] i [melanina- $\text{Zn}^{2+}$ ] wzrasta wraz ze wzrostem stężenia początkowego leku. W tworzeniu wszystkich analizowanych kompleksów: antybiotyk-[melanina- $\text{Cu}^{2+}$ ] i antybiotyk-[melanina- $\text{Zn}^{2+}$ ] uczestniczy tylko jedna klasa miejsc wiążących o wartości stałej trwałości rzędu  $10^3 - 10^2 \text{ M}^{-1}$  [H1, H2, H3]. Porównując ilości antybiotyków aminoglikozydowych związanych



z melaniną w obecności i nieobecności jonów metali stwierdziłam ponadto, iż jony  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$  istotnie wpływają na oddziaływanie badanych leków z melaniną powodując zanik jednej klasy miejsc wiążących we wszystkich badanych kompleksach oraz obniżenie ilości antybiotyku związanego z biopolimerem melaninowym. Ocenie poddałam również kompleksy antybiotyków aminoglikozydowych z melaniną otrzymane w obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ . Analiza wiązania leków do melaniny przeprowadzona metodą Scatcharda, wykazała że w tworzeniu kompleksów trójskładnikowych: antybiotyk aminoglikozydowy-[melanina- $\text{Ca}^{2+}$ ] oraz antybiotyk aminoglikozydowy-[melanina- $\text{Mg}^{2+}$ ] jedynie dla kompleksu netylmicyny z melaniną występuje zanik jednej klasy miejsc wiążących [H3], a w pozostałych badanych układach zaobserwowałam obniżenie ilości leku związanego z melaniną i zmniejszenie trwałości kompleksów, jednakże w wiązaniu nadal uczestniczą co najmniej dwie klasy niezależnych miejsc wiążących [H4].

Kolejnym etapem badań była ocena wpływu wybranych antybiotyków aminoglikozydowych na przeżywalność oraz proces melanizacji melanocytów - komórek odpowiedzialnych za syntezę pigmentu. Wpływ amikacyny, kanamycyny, netylmicyny i streptomycyny na proces melanogenezy określiłam poprzez pomiar zawartości melaniny w melanocytach oraz oznaczenie aktywności tyrozynazy – głównego enzymu szlaku melanogenezy.

Ocenę wpływu amikacyny, kanamycyny, netylmicyny i streptomycyny na przeżywalność komórek przeprowadziłam z wykorzystaniem linii prawidłowych ludzkich melanocytów o niskiej pigmentacji pochodzących od dorosłego dawcy (HEMA-LP).

Oznaczenie cytotoksyczności wykonałam metodą spektrofotometryczną z wykorzystaniem testu WST-1, po 24-godzinnej inkubacji melanocytów z badanymi antybiotykami. Wykazałam, że amikacyna w stężeniach od 0,01 do 1,0 mM oraz kanamycyna i streptomycyna w stężeniach 0,01 i 0,1 mM nie wykazują istotnego wpływu na przeżywalność melanocytów w porównaniu do próby kontrolnej [H5, H8, H9]. Netylmicyna już w stężeniu 0,01 mM obniżyła przeżywalność komórek o 12%, a w stężeniu 0,05 mM - o 30% [H6]. Kanamycyna, streptomycyna i netylmicyna w stężeniu 1,0 mM powodują odpowiednio 10%, 16% i 85% obniżenie przeżywalności melanocytów w porównaniu do próby kontrolnej. Zastosowanie najwyższego stężenia analizowanych leków (10 mM) spowodowało obniżenie przeżywalności melanocytów o: 80% dla amikacyny, 92% dla kanamycyny, 74% dla streptomycyny oraz o 99% dla netylmicyny [H5, H6, H8, H9].

Na podstawie otrzymanych wartości stężeń  $\text{EC}_{50}$  (stężenie antybiotyku powodujące zmniejszenie populacji komórek o 50%) dla badanych aminoglikozydów wykazałam,

iż amikacynę, kanamycynę i streptomycynę charakteryzuje podobna cytotoksyczność ( $EC_{50} = 5 - 7,5 \text{ mM}$ ), natomiast netylmicyna wykazywała znacząco większą cytotoksyczność w stosunku do melanocytów linii HEMa-LP ( $EC_{50} = 0,075 \text{ mM}$ ), co można tłumaczyć wykazanim we wcześniejszych badaniach najsilniejszym, w porównaniu z innymi aminoglikozydami, wiązaniem netylmicyny do melaniny ( $K_1 \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$ ,  $K_2 \sim 10^3 \text{ M}^{-1}$ ) i w konsekwencji postulowanym oddziaływaniem na komórki upigmentowane.

Wydłużenie czasu inkubacji melanocytów z antybiotykiem znacząco wpłynęło na obniżenie przeżywalności komórek. Inkubacja melanocytów z roztworami amikacyny o stężeniu  $0,075 \text{ mM}$  i kanamycyny o stężeniu  $0,06 \text{ mM}$ , powodowała obniżenie przeżywalności komórek odpowiednio o 14% i 19% po 48 godz. oraz o 32% i 53% po 72 godz. Podobnie wzrost stężenia antybiotyku skutkuje obniżeniem przeżywalności melanocytów w stosunku do komórek kontrolnych. Największą aktywność antyproliferacyjną zaobserwowałam dla amikacyny w stężeniu  $7,5 \text{ mM}$  i kanamycyny w stężeniu  $6,0 \text{ mM}$ , po 72-godzinnej inkubacji z lekiem (odpowiednio 99 % i 97 % redukcja liczby żywych komórek). Zdjęcia melanocytów hodowanych przez 24 godz. w pożywce standardowej oraz w obecności amikacyny lub kanamycyny, wykonane mikroskopem kontrastowo-fazowym odwróconym Nikon TS100F, przy 200-krotnym powiększeniu, pozwoliły stwierdzić, iż badane aminoglikozydy w stężeniu  $EC_{50}$  i 10-krotnie niższym powodują, w porównaniu do kontroli, zanik morfologii dendrytycznej melanocytów, co obrazuje brak charakterystycznych długich wypustek. Zastosowanie leku o stężeniu 100-krotnie niższym od wartości  $EC_{50}$  nie wpływa znacząco na morfologię komórek [H7].

Do oceny wpływu badanych leków na zawartość melaniny oraz aktywność komórkowej tyrozynazy w melanocytach zastosowałam roztwory antybiotyków o stężeniu  $EC_{50}$  oraz 10-krotnie i 100-krotnie niższym, które nie były cytotoksyczne. Na podstawie otrzymanych wyników badań stwierdziłam, iż poddane analizie aminoglikozydy obniżają zawartość melaniny oraz powodują spadek aktywności komórkowej tyrozynazy w melanocytach prawidłowych. Stopień wpływu antybiotyków aminoglikozydowych na zawartość melaniny i aktywność tyrozynazy pogłębiał się wraz ze wzrostem stężenia leku. Najwyższe zastosowane stężenie spowodowało obniżenie zawartości melaniny o ok. 24% i obniżenie aktywności tyrozynazy o ok. 38% w przypadku melanocytów poddanych działaniu kanamycyny [H8] i ok. 48%-redukcję ilości melaniny i 31% obniżenie aktywności tyrozynazy dla komórek hodowanych w obecności streptomycyny [H9], w porównaniu do próby kontrolnej. Amikacyna i netylmicyna w stężeniu  $EC_{50}$  powodowały odpowiednio 26% i 29% redukcję zawartości melaniny oraz 29% i 24% obniżenie aktywności tyrozynazy

w melanocytach HEMa-LP, w porównaniu do hodowli prowadzonych w nieobecności leku [H5, H6].

W celach porównawczych oceniono także wpływ aminoglikozydów na aktywność tyrozynazy wzorcowej z grzyba, która jest powszechnie wykorzystywana w badaniach inhibitorów tego enzymu. Uzyskałam wyniki podobne, jak w przypadku wpływu analizowanych leków na aktywność komórkowej tyrozynazy [H5, H8, H9].

Ostatnim etapem badań była ocena wpływu antybiotyków aminoglikozydowych na aktywność enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (CAT) oraz peroksydazy glutationowej (GPx), stanowiących enzymatyczną barierę ochronną komórki przed stresem oksydacyjnym. Poprzez utrzymywanie równowagi pro- i antyoksydacyjnej, SOD, CAT i GPx chronią organizm przed niekorzystnym wpływem wolnych rodników biorących udział w patogenezie wielu chorób.

Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy i peroksydazy glutationowej w melanocytach oznaczyłam przy użyciu zestawów testowych firmy Cayman. Średnia aktywność enzymów w próbach kontrolnych wynosiła: SOD od  $2,44 \pm 0,12$  do  $2,88 \pm 0,19$  U/mg białka; CAT od  $1,48 \pm 0,11$  do  $1,75 \pm 0,12$  nmol/min/mg białka oraz GPx od  $48,22 \pm 1,41$  do  $48,74 \pm 0,84$  nmol/min/mg białka.

Uzyskane wyniki wskazują, że aktywność SOD w melanocytach inkubowanych w obecności amikacyny, kanamycyny i streptomycyny wzrasta wraz ze wzrostem stężenia leku i dla stężeń 10-krotnie niższych od  $EC_{50}$  oraz dla wartości  $EC_{50}$  wynosi odpowiednio: 128% i 166% dla amikacyny [H5], 135% i 162% dla kanamycyny [H8] oraz 165% i 212% dla streptomycyny [H9], w porównaniu do wartości kontroli (100%).

Aktywność CAT rośnie w obecności antybiotyku i dla stężeń 10-krotnie niższych od  $EC_{50}$  oraz dla wartości  $EC_{50}$  wynosi odpowiednio: 210% i 159% dla amikacyny [H5], 163% i 134% dla kanamycyny [H8] oraz 240% i 190% dla streptomycyny [H9] w porównaniu do wartości kontroli (100%).

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdziłam ponadto, że badane antybiotyki aminoglikozydowe w stężeniu  $EC_{50}$  powodują obniżenie aktywności GPx w melanocytach, natomiast dla stężenia dziesięć razy mniejszego zaobserwowano jedynie niewielki wzrost aktywności GPx w stosunku do kontroli. Dla stężeń 10-krotnie niższych od  $EC_{50}$  oraz dla wartości  $EC_{50}$  aktywność GPx wynosi odpowiednio: 109% i 89% dla amikacyny [H5], 103% i 70% dla kanamycyny [H8] oraz 115% i 85% dla streptomycyny [H9] w porównaniu do wartości kontroli (100%).

#### 4.3.4. PODSUMOWANIE

Dostępne piśmiennictwo omawia właściwości biopolimerów melaninowych i wykazuje ich szerokie spektrum funkcji biologicznych, jakie mogą one pełnić w wielu organizmach. Pomimo, iż wiedza na ten temat jest coraz szersza, różnorodność oddziaływań pomiędzy melaninami i związkami chemicznymi, w tym jonami metali i substancjami leczniczymi, implikuje kolejne problemy badawcze, a niniejsze badania kładły nacisk na poszerzenie wiedzy związanej z tym zagadnieniem. Na podstawie przeprowadzonych badań wysunęłam następujące wnioski:

1. Zanik jednej klasy miejsc wiążących oraz obniżenie sumarycznej liczby miejsc wiążących w kompleksach antybiotyków aminoglikozydowy – [melanina – jon metalu] w porównaniu do kompleksów otrzymanych w nieobecności jonów metali wskazują na blokowanie przez jony  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  miejsc aktywnych polimeru odpowiedzialnych za wiązanie substancji leczniczej. Konsekwencją tego jest zmniejszenie ilości substancji leczniczej związanej z melaniną, co może wpływać na działanie terapeutyczne, a także na działania niepożądane badanych leków. Uzyskane przeze mnie wyniki badań wskazują na możliwość modyfikacji *in vivo* mechanizmu działania antybiotyków aminoglikozydowych przez występujące w organizmie jony metali.
2. Modyfikacja procesu melanogenezy w obecności antybiotyków aminoglikozydowych może przyczyniać się do rozwoju zmian degeneracyjnych w obrębie tkanek upigmentowanych. Zaobserwowane obniżenie aktywności tyrozynazy, kluczowego enzymu w procesie biosyntezy melaniny, może prowadzić do obniżenia zawartości melaniny pełniącej funkcje ochronne w melanocytach. Taka sytuacja może być powodem wzrostu toksyczności badanych leków skierowanej na tkanki upigmentowane, w tym na narząd słuchu. Zróżnicowany wpływ amikacyny, kanamycyny, netylmicyny i streptomycyny na przeżywalność melanocytów prawidłowych oraz na zawartość melaniny i aktywność tyrozynazy w komórkach może tłumaczyć odmienne zdolności tych antybiotyków do wywoływania działań niepożądanych w obrębie tkanek upigmentowanych.
3. Zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych (SOD, CAT i GPx) w melanocytach w obecności amikacyny, kanamycyny i streptomycyny wskazują na generowanie reaktywnych form tlenu, głównie anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenu wodoru przez te antybiotyki, co prowadzi do obniżenia potencjału antyoksydacyjnego komórek. Obecność wysokich stężeń anionorodnika

ponadtlenkowego pociąga za sobą wzrost aktywności SOD, co z kolei zwiększa stężenie nadtlenu wodoru. Taka sytuacja prowadzi do przesunięcia równowagi antyoksydacyjno-prooksydacyjnej w stronę prooksydacyjną, a enzymy rozkładające nadtlenek wodoru: CAT i GPx mogą stać się niewydolne ze względu na zbyt dużą ilość substratu. Na podstawie otrzymanych wyników badań można stwierdzić, iż antybiotyki aminoglikozydowe mogą powodować obniżenie potencjału antyoksydacyjnego melanocytów, co w konsekwencji może zwiększać narażenie tkanek, zarówno upigmentowanych jak i znajdujących się w ich sąsiedztwie, na toksyczny wpływ reaktywnych form tlenu.

Wykazane w badaniach różnice w wiązaniu aminoglikozydów do melaniny w obecności jonów metali oraz wpływ antybiotyków na przeżywalność i procesy biochemiczne zachodzące w melanocytach prawidłowych przyczyniają się do wyjaśnienia mechanizmu toksycznego działania tych leków na tkanki upigmentowane. Otrzymane wyniki badań wskazują na istotną rolę melanin i melanocytów w ototoksycznym działaniu antybiotyków aminoglikozydowych, podczas wysokodawkowej i/lub długoterminowej terapii.

## **5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO - BADAWCZYCH**

Poza omówionym powyżej cyklem 9 publikacji wybranych jako podstawa do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego (łącna wartość IF = 11.037), mój dotychczasowy dorobek naukowy obejmuje 42 publikacje o łącznej wartości IF = 28.563 (w tym 34 prace oryginalne i 6 prac poglądowych oraz 2 rozdziały w książkach), a także 77 doniesień prezentowanych na międzynarodowych i krajowych konferencjach, sympozjach i zjazdach naukowych.

Sumaryczny impact factor moich publikacji naukowych według listy Journal Citation Reports wynosi 39.600, co stanowi 672 punkty MNI/MNiSW.

Indeks cytowań moich prac według bazy Web of Science wynosi 138, indeks Hirscha: 7.

Byłam recenzentem 2 prac w *Farmaceutycznym Przeglądzie Naukowym*.

Uczestniczyłam w realizacji następujących projektów badawczych:

1. „Badania mechanizmów oddziaływania substancji leczniczych z biopolimerami melaninowymi” (1997-1999) – wykonawca
2. „Oddziaływanie substancji leczniczych z biopolimerami melaninowymi” (2000-2011) - wykonawca
3. „Wpływ jonów metali na wiązanie substancji leczniczych do melaniny” (2000-2004) - wykonawca
4. „Oddziaływane antybiotyków aminoglikozydowych o działaniu ototoksycznym z melaniną” (2000-2002) - kierownik projektu
5. Grant KBN (promotorski) Nr 3 PO5F 026 24 pt. „Oddziaływanie antybiotyków aminoglikozydowych z melaniną” (2003-2004) – wykonawca
6. „Charakterystyka kompleksów antybiotyków aminoglikozydowych z melaniną i ich wpływ na powstawanie uszkodzeń narządu słuchu i równowagi” (2003-2004) - kierownik projektu
7. „Charakterystyka kompleksów antybiotyków aminoglikozydowych z melaniną otrzymanych w obecności jonów metali” (2005-2007) - kierownik projektu
8. „Wpływ jonów metali na oddziaływanie antybiotyków aminoglikozydowych z melaniną” (2008-2010) - kierownik projektu
9. „Wpływ wybranych substancji leczniczych na przeżywalność i proces melanizacji melanocytów” (2012-2014) - wykonawca

## **5.1 OSIĄGNIĘCIA POZNAWCZE**

Moją działalność naukową rozpoczęłam bezpośrednio po ukończeniu studiów w 1996 r. pod kierunkiem Prof. dr hab. n. farm. inż. Ewy Buszman, w Katedrze i Zakładzie Chemii i Analizy Leków, Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Śląskiej Akademii Medycznej/Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach. Prowadziłam głównie badania dotyczące oddziaływania substancji leczniczych, o udowodnionych działaniach niepożądanych skierowanych na tkanki upigmentowane, z melaniną.

W mojej dotychczasowej działalności naukowej mogę wyróżnić następujące kierunki badań:

- A. Oddziaływanie substancji leczniczych z biopolimerami melaninowymi w obecności i nieobecności jonów metali:
- opublikowane prace oryginalne: **II.A.:** 1, 2, 4 - 16, 18, 19, 21, **II.D.:** 1 - 4, 7, 9 - 16
  - komunikaty naukowe: **III.B.:** 1 - 25, 27 - 66, 73, 74
- B. Wpływ substancji leczniczych na aktywność prolidazy i metabolizm kolagenu w fibroblastach skóry ludzkiej:
- opublikowane prace oryginalne: **II.A.:** 1, 2, 7 - 9
  - komunikaty naukowe: **III.B.26**
- C. Wpływ substancji leczniczych na przeżywalność i procesy biochemiczne w melanocytach prawidłowych:
- opublikowane prace oryginalne: **II.A.:** 15, 20, **II.D.:** 18, 19
  - komunikaty naukowe: **III.B.:** 67 – 72, 75-77

Ad. A.

Melaniny jako barwniki nie tylko nadają kolor skórze, oczom, czy włosom, ale pełnią szereg innych bardzo istotnych funkcji. Najczęściej opisywaną i najlepiej udokumentowaną rolą omawianych pigmentów, jest ochrona przed działaniem promieniowania ultrafioletowego.

Barwnik zlokalizowany w tęczęwce, pochłaniając promieniowanie widzialne i UV, chroni głębiej położone warstwy oka przed fotodestrukcją, natomiast jego obecność w naczyniówce i nabłonku barwnikowym siatkówki (RPE) zapewnia skuteczną ochronę przed stresem oksydacyjnym, zmniejszając w ten sposób ryzyko rozwoju czerniaka błony naczyniowej oraz związanego z wiekiem zwyrodnienia plamki żółtej. Ponadto pigment zawarty w RPE bierze udział w wychwytywaniu, przetwarzaniu oraz transporcie retinoidów i w konsekwencji odgrywa istotną rolę w procesie widzenia.

Melanocyty obecne w prążku naczyniowym ślimaka ucha wewnętrznego są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania narządu słuchu. Zapewniają one bowiem właściwy skład jonowy endolimfy, przez co pośredniczą w generowaniu potencjału czynnościowego, niezbędnego w procesie słyszenia. Dane literaturowe wskazują, że stopień indukowanej, czasowej utraty słuchu jest odwrotnie proporcjonalny do pigmentacji skóry. Ponadto komórki

barwnikowe zlokalizowane w uchu wewnętrznym odgrywają również ważną rolę w utrzymaniu równowagi.

Biopolimery melaninowe są zdolne do wiązania substancji leczniczych, czego następstwem może być ich kumulacja w upigmentowanych tkankach organizmu, takich jak: skóra, oko, ucho wewnętrzne.

Nadrzędnym celem prowadzonych badań była ocena mechanizmów oddziaływania substancji leczniczych z biopolimerami melaninowymi. Przypuszcza się, że mechanizm działań niepożądanych różnych leków, może być związany z ich kumulacją w tkankach upigmentowanych i wpływem na procesy biochemiczne zachodzące w organizmie. W przeprowadzonych badaniach wykazałam, że następujące substancje lecznicze tworzą kompleksy z melaniną: antybiotyki aminoglikozydowe o działaniu ototoksycznym [II.A.: 2, 8, 10, II D.1, III.B.:1, 2, 4, 6, 7, 12, 16, 29], leki powodujące uszkodzenia narządu wzroku, w tym: leki znieczulające miejscowo stosowane w diagnostyce i terapii schorzeń okulistycznych [II.D.: 2, 3, III.B.: 3, 5] oraz leki psychotropowe [III.B.: 44, 47], a także leki wywołujące uszkodzenia skóry i fotodermatozy: niesteroidowe leki przeciwzapalne [II.D.13, III.B.: 50, 65], leki przeciwnowotworowe [II.A.1, II.D.7] i fluorochinolony [II.A.: 15, 20, II.D.14, III.B.: 49, 58, 61]. W związku z dynamicznym rozwojem przemysłu farmaceutycznego działania niepożądane leków stały się niezwykle ważnym problemem lekarskim, medyczo-prawnym oraz ekonomicznym i dlatego badania zmierzające do wyjaśnienia mechanizmów działań niepożądanych są niezwykle istotne.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdziłam, że ilość leku związanego z biopolimerem melaninowym wzrasta wraz ze wzrostem stężenia początkowego leku i wydłużaniem czasu kompleksowania, osiągając stan równowagi po ok. 24 godz. W tworzeniu większości analizowanych kompleksów lek – melanina uczestniczą co najmniej dwie klasy niezależnych miejsc wiążących o wartościach stałych trwałości  $K_1 \sim 10^6 - 10^3 \text{ M}^{-1}$  i  $K_2 \sim 10^4 - 10^2 \text{ M}^{-1}$ . Wyznaczone sumaryczne liczby miejsc wiążących wskazują, że najwyższe powinowactwo do melaniny wykazują antybiotyki aminoglikozydowe (gentamicyna, streptomycyna, dihydrostreptomycyna), fluorochinolony (ciprofloksacyna, sparfloksacyna, norfloksacyna) oraz leki psychotropowe (imipramina i prochlorperazyna) - od 1,03 do 1,36  $\mu\text{mol}$  leku/mg mel, zaś najniższe niesteroidowe leki przeciwzapalne (paracetamol i ketoprofen) - od 8,9 do 9,9 nmol leku/mg mel.

Wiązanie substancji leczniczych przez melaniny jest bardzo ważnym problemem, gdyż może modyfikować metabolizm, a w konsekwencji właściwości terapeutyczne i działania niepożądane leków, co sugeruje, że ludzie o różnej pigmentacji oczu i skóry mogą



odmiennie reagować na działanie leków. Mechanizm wiązania ksenobiotyków z melaninami jest skomplikowany i jest wypadkową wielu czynników, m.in. budowy strukturalnej polimerów melaninowych i właściwości substancji leczniczych.

W badaniach wpływu siły jonowej i pH roztworu na trwałość kompleksów gentamicyny i kanamycyny z melanim stwierdziłam, że wzrost siły jonowej roztworu kompleksującego oraz obniżenie wartości pH wpływają na zmniejszenie wartości stałych trwałości (K) oraz liczby miejsc wiążących (n) w tych kompleksach, co świadczy o udziale wiązań jonowych w oddziaływaniach analizowanych antybiotyków z melanim [II.D.4, III.B.: 20, 22].

Analiza kompleksów substancji leczniczych z melanim techniką spektroskopii EPR, prowadzona wspólnie z Katedrą Biofizyki SUM, wykazała powstawanie o-semichinonowych wolnych rodników w melanim w obecności antybiotyków aminoglikozydowych i fluorochinolonów, co wskazuje na możliwość udziału wolnych rodników melanimy w mechanizmach toksycznego działania substancji leczniczych. Stwierdzono, że w melanim występuje duża liczba stabilnych wolnych rodników, a analizowane leki nie generują nowego typu rodników w melanim, gdyż we wszystkich próbkach występuje tylko jedna grupa centrów paramagnetycznych. Wydaje się bardzo prawdopodobne, że w sytuacji przekroczenia możliwości detoksyfikacyjnych pigmentu, melanimy mogą indukować powstawanie wolnych rodników, czego konsekwencją może być stres oksydacyjny i degeneracja komórek, zarówno upigmentowanych jak i znajdujących się w ich sąsiedztwie [II.A.: 4, 5, 12, 21, II.D.9, III.B.: 14, 25, 27, 30, 34, 38, 39, 55, 60, 73].

Obecność w budowie strukturalnej melanin ugrupowań o charakterze jonowym (wolne grupy karboksylowe i o-semichinonowe), które w fizjologicznym pH przyjmują ładunek ujemny, decyduje o jonowym charakterze wiązania pomiędzy polianionami melaninowymi a ksenobiotykami o właściwościach kationowych. W wiązaniu mogą również uczestniczyć siły van der Waalsa, kompleksy z udziałem przeniesienia ładunku (tzw. charge-transfer) oraz oddziaływania hydrofobowe. Powstające wiązania są mniej lub bardziej trwałe, zależnie od budowy chemicznej substancji podlegającej wiązaniu. Ponadto zdolności sorpcyjne melanin, w tym ich właściwości jonowymienne, są powodem wysokiej kumulacji jonów metali w tkankach upigmentowanych organizmu. W sytuacji, kiedy wiele stosowanych substancji leczniczych podlega specyficznej interakcji z biopolimerami melaninowymi, ocena konkurencyjności wiązania leków i jonów metali przez melanimy w istotny sposób przyczynia się do wyjaśnienia mechanizmów terapeutycznego działania, jak również występowania działań niepożądanych substancji leczniczych o wysokim powinowactwie do tkanek upigmentowanych.

Wobec powyższego celowym było przeprowadzenie badań obejmujących ocenę zdolności wiązania wybranych substancji leczniczych z melaniną w obecności jonów metali występujących fizjologicznie w organizmie. Przeprowadzone badania wykazały, iż jony  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  w istotny sposób wpływają na wiązanie leków znieczulających miejscowo (lidokaina, bupiwakaina, prokaina i tetrakaina) [II.D.: 2, 3, III.B.: 8, 10, 11, 13, 15, 40, 45], antyarytmicznych (chinidyna, metoprolol i dizopiramid) [II.D.12, III.B.: 51, 52, 56, 59] i psychotropowych (imipramina i prochlorperazyna) [III.B.57] oraz omówionych wcześniej antybiotyków aminoglikozydowych do melaniny. Przeprowadzone badania techniką spektroskopii EPR wykazały wpływ jonów metali na koncentrację wolnych rodników w melaninie. Wykazano, że diamagnetyczne jony  $Zn^{2+}$  powodują wzrost, natomiast paramagnetyczne jony  $Cu^{2+}$  powodują obniżenie koncentracji wolnych rodników w kompleksach antybiotyków aminoglikozydowy-melanina. Widma EPR wykazały ponadto występowanie zarówno wolnych rodników o spinie  $S=1/2$  podlegających prawu Curie, jak i centrów paramagnetycznych o spinie  $S=1$ , które nie spełniają prawa Curie. Analiza porównawcza próbek melaniny ocenianych w warunkach próżni oraz w powietrzu sugeruje, że właściwości i koncentracja wolnych rodników w melaninie, jak i kompleksach melaniny z antybiotykiem i jonami metali zależy od obecności tlenu, który powoduje spowolnienie procesów relaksacji spin-sieć w badanych próbkach [II.A.: 6, 13, 14, 16, 18, 19, II.D.: 10, III.B.: 17, 21, 23, 24, 31, 32, 35-37, 41, 46, 53, 54, 63, 64].

Przeprowadzone badania wskazują, że istnieje duże prawdopodobieństwo, iż uwzględniając znak ładunku substancji leczniczej i jonu metalu, te same miejsca w melaninie mogą służyć do wiązania zarówno substancji leczniczej, jak i jonów metali, a zatem jony metali mogą modyfikować wiązanie substancji leczniczych do melaniny.

#### Ad B.

W ramach badań prowadzonych we współpracy z Zakładem Chemii Leków Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej/Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku oceniałam wpływ antybiotyków (daunorubicyna, gentamicyna, kanamycyna, netylmicyna i puromycyna), melaniny i kompleksu lek-melanina na proces biosyntezy kolagenu. Synteza kolagenu zachodzi głównie w komórkach tkanki łącznej (w fibroblastach, osteoblastach i chondrocytach), sąsiadujących z melanocytami, w których zachodzi synteza melanin.

W przeprowadzonych badaniach wykazałam, że daunorubicyna, gentamicyna, kanamycyna, netylmicyna i puromycyna hamują proces biosyntezy kolagenu w hodowlach fibroblastów, co sugeruje że powodem niepożądanych działań tych leków może być

m.in. ich toksyczne oddziaływanie na proces biosyntezy kolagenu w narządzie słuchu i w skórze. Melanina, pomimo tego, że nie wpływa na biosyntezę kolagenu, nasila inhibitorowy wpływ gentamicyny [II.A.2], kanamycyny [II.A.8] i daunorubicyny [II.A.1] na biosyntezę kolagenu i DNA w hodowlach fibroblastów. Wykazano ponadto, że melanina przeciwdziała inhibitorowemu działaniu netylmycyny [II.A.9] i puromycyny [II.A.7, III.B.26] na metabolizm kolagenu w fibroblastach.

Uzyskane wyniki potwierdziły hipotezę o udziale melaniny w toksyczności substancji leczniczych, gdyż wykazały że badane antybiotyki hamują proces biosyntezy kolagenu, a melanina w istotny sposób modyfikuje to działanie.

Ad C.

Biorąc pod uwagę fakt, iż melanina, jak i komórki barwnikowe – melanocyty, występują nie tylko w skórze, ale także w uszach, oczach, mózgu, sercu, płucach i tkance tłuszczowej, istnieje przypuszczenie, że biopolimery melaninowe mogą mieć wpływ na występowanie działań niepożądanych substancji leczniczych o wysokim powinowactwie do tkanek upigmentowanych organizmu.

W celu zweryfikowania wcześniejszych wyników badań oddziaływania leków z biopolimerami melaninowymi w układach modelowych, obecnie prowadzę badania wpływu substancji leczniczych na przeżywalność komórek oraz na przebieg procesów biochemicznych w melanocytach o wysokiej i niskiej pigmentacji pochodzących od noworodka (HEMn-DP i HEMn-LP) i osoby dorosłej (HEMa-LP), w tym: na proces melanizacji (aktywność tyrozynazy, ilość wytwarzanej melaniny) oraz na aktywność systemu antyoksydacyjnego (poprzez ocenę aktywności enzymów antyoksydacyjnych – dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy i peroksydazy glutationowej). W ramach tego obszaru działalności naukowej przedmiotem badań są leki o udokumentowanym powinowactwie do melaniny, w tym fluorochinolony [II.A.: 15, 20, II.D.19, III.B.: 68, 69, 75], niesteroidowe leki przeciwzapalne [II.D.18, III.B.71], tetracykliny [III.B.76], neuroleptyki - pochodne fenotiazyny [III.B.77] oraz opisane wcześniej antybiotyki aminoglikozydowe [III.B.: 67, 70, 72].

Badane substancje lecznicze obniżają przeżywalność melanocytów, a stopień toksyczności leku jest zależny od jego stężenia. Wykazany wpływ fluorochinolonów, tetracyklin, pochodnych fenotiazyny i niesteroidowych leków przeciwzapalnych na zawartość melaniny oraz aktywność tyrozynazy w melanocytach *in vitro* wskazuje, że leki te mogą powodować inhibicję procesu melanogenezy w komórkach upigmentowanych *in vivo* [II.A.:

15, 20, II.D.18, III.B.: 71, 76, 77]. Analizowane fluorochinolony wpływają także na aktywność enzymów antyoksydacyjnych w melanocytach, co powoduje zaburzenie równowagi oksydacyjno-redukcyjnej w komórkach barwnikowych. Generowanie stresu oksydacyjnego w melanocytach pod wpływem analizowanych leków może być odpowiedzialne za ich działania niepożądane w obrębie tkanek upigmentowanych [D.19, III.B.: 68, 69, 75].

Uzyskane wyniki badań wskazują na istotny udział melanin i melanocytów w mechanizmach działań niepożądanych substancji leczniczych o wysokim powinowactwie do tkanek upigmentowanych organizmu.

## **5.2 WSPÓŁPRACA NAUKOWA**

W trakcie mojej dotychczasowej pracy naukowej niektóre z projektów były realizowane w ramach współpracy z:

- Zakładem Chemii Leków Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
- Katedrą i Zakładem Biofizyki Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach.

## **5.3 NAGRODY OTRZYMANE ZA DZIAŁALNOŚĆ NAUKOWĄ**

Nagrody Rektora Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach za osiągnięcia w działalności naukowo-badawczej:

- Zespołowa Nagroda I Stopnia za wykazanie udziału melaniny w inhibitorowym działaniu daunorubicyny na procesy metaboliczne w tkance łącznej (2002).
- Zespołowa Nagroda za wykazanie inhibicyjnego wpływu antybiotyków na procesy peroksydacji lipidów w płynie mózgowo-rdzeniowym u dzieci z wodogłowiem (2003).
- Zespołowa Nagroda za cykl prac dotyczących wiązania substancji leczniczych do biopolimerów melaninowych w aspekcie niepożądanych działań toksycznych leków (2004).
- Zespołowa Nagroda II Stopnia za prace dotyczące wpływu leków na przemiany związków endogennych w wybranych jednostkach chorobowych (2006).

- Zespołowa Nagroda II Stopnia za publikacje pt.: „Analiza wpływu wybranych czynników fizykochemicznych na właściwości wolnorodnikowe melanin metodą elektronowego rezonansu paramagnetycznego” (2006).
- Zespołowa Nagroda III Stopnia za publikację pt.: „Effect of melanin on netilmicin-induced of collagen biosynthesis on human skin fibroblasts” (2007).
- Zespołowa Nagroda II Stopnia za badania dotyczące oceny właściwości wolnorodnikowych kompleksów z melanią techniką elektronowego rezonansu paramagnetycznego (2011).
- Zespołowa Nagroda II Stopnia za badania wpływu ciprofloksacyny na przeżywalność i stopień melanizacji melanocytów prawidłowych (2012).

Wrześniew Doro to,