



ZAŁĄCZNIK NR 2

Autoreferat

Magdalena Justyna Markowicz-Piasecka

Łódź, 2019

Spis treści

1. Imię i nazwisko.	- 3 -
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....	- 3 -
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.	- 3 -
4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.)	- 4 -
a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego.....	- 4 -
b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy)	- 4 -
c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.....	- 6 -
4. 1. Wprowadzenie.....	- 6 -
4. 2. Cel badań habilitacyjnych.....	- 16 -
4. 3. Wyniki badań i dyskusja	- 22 -
4. 4. Podsumowanie wyników badań stanowiących podstawę osiągnięcia habilitacyjnego	- 42 -
4. 5. Piśmiennictwo	- 44 -
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.....	- 49 -
5.1. Tematyka badań przed uzyskaniem stopnia doktora.....	- 49 -
5.2. Tematyka badań po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych	- 52 -
5.3. Omówienie działalności dydaktycznej.....	- 55 -
5.4. Omówienie działalności organizacyjnej.....	- 56 -
5.5. Podsumowanie	- 56 -

1. Imię i nazwisko.

Magdalena Markowicz-Piasecka

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

2012 - 2015	Specjalizacja z Farmacji aptecznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi Uzyskany tytuł: specjalista w specjalności Farmacja apteczna; Egzamin złożony przed Państwową Komisją Egzaminacyjną z wynikiem bardzo dobrym.
26.11.2013	Nadanie stopnia doktora nauk farmaceutycznych przez Radę Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, przewód doktorski zakończony wyróżnieniem; tytuł pracy: „Use of dendrimers in the preparation technology of iminodiacetic acid derivatives as diagnostic agents for nuclear magnetic resonance tomography.” Promotor: prof. dr hab. Elżbieta Mikiciuk-Olasik Promotor pomocniczy: prof. dr hab. Paweł Szymański Recenzenci: Prof. dr n. farm. Dariusz Matosiuk, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Prof. dr hab. Jerzy Pałka, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku.
2009 - 2013	Stacjonarne Studium Doktoranckie, Uniwersytet Medyczny w Łodzi
2003 - 2009	Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Wydział Farmaceutyczny, kierunek: Farmacja kliniczna (szpitalna); Tytuł pracy magisterskiej: „Ocena wpływu ekstraktu z aronii czarnoowocowej na proces krzepnięcia i fibrynolizy”. Uzyskany tytuł – magister farmacji (Prawo Wykonywania Zawodu: 11026419)

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.

III 2015 - obecnie	adiunkt w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji, Uniwersytet Medyczny w Łodzi
X 2011 – II 2015	asystent w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

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

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

Przedstawionym do oceny osiągnięciem jest jednotematyczny cykl 9 publikacji (7 oryginalnych i 2 przeglądowych) opublikowanych w latach 2017-2019 o łącznym IF wynoszącym 32,349 (275 pkt. MNiSW) zatytułowany:

Poszukiwanie nowego potencjału farmakologicznego metforminy i jej pochodnych.

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

H1 (P): Magdalena Markowicz-Piasecka*, Kristiina M. Huttunen, Łukasz Mateusiak, Elżbieta Mikiciuk-Olasik, Joanna Sikora. Is Metformin a Perfect Drug? Updates in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. Current Pharmaceutical Design, 2017, 23 (17), 2532 – 2550.

IF = 2,757; 30 p MNiSW

H2 (P): Magdalena Markowicz-Piasecka*, Joanna Sikora, Aleksandra Szydłowska, Agata Skupień, Elżbieta Mikiciuk-Olasik, Kristiina M. Huttunen. Metformin – a future therapy for neurodegenerative diseases. Pharmaceutical Research, 2017, 34 (12), 2614-2627.

IF = 3,335; 35 p MNiSW

H3: Magdalena Markowicz-Piasecka*, Johanna Huttunen, Joanna Sikora, Kristiina M. Huttunen. Sulfenamide derivatives can improve transporter-mediated cellular uptake of metformin and induce cytotoxicity in human breast adenocarcinoma cell lines. Bioorganic Chemistry, 2019, 87, 321 – 334.

IF₍₂₀₁₇₎ = 3,929; 25 p MNiSW

H4: Magdalena Markowicz-Piasecka*, Joanna Sikora, Łukasz Mateusiak, Elżbieta Mikiciuk-Olasik, Kristiina M. Huttunen. New prodrugs of metformin do not influence the overall haemostasis potential and integrity of the erythrocyte membrane. European Journal of Pharmacology, 2017, 811, 208-221.

IF = 3,040; 30 p MNiSW

H5: Magdalena Markowicz-Piasecka*, Kristiina M. Huttunen, Elżbieta Mikiciuk-Olasik, Joanna Sikora. Biocompatible sulfenamide and sulfonamide derivatives of metformin can exert beneficial effects on plasma haemostasis. *Chemico-Biological Interactions*, 2018, 280, 15 - 27.

IF₍₂₀₁₇₎ = 3,296; 30 p MNiSW

H6: Magdalena Markowicz-Piasecka*, Kristiina M. Huttunen, Łukasz Mateusiak, Elżbieta Mikiciuk-Olasik, Joanna Sikora. Sulfenamide and sulfonamide derivatives of metformin can exert anticoagulant and profibrinolytic properties. *Chemico-Biological Interactions*, 2018, 284, 126-136.

IF₍₂₀₁₇₎ = 3,296; 30 p MNiSW

H7: Magdalena Markowicz-Piasecka*, Kristiina M. Huttunen, Marlena Broncel, Joanna Sikora. Sulfenamide and sulfonamide derivatives of metformin – a new option to improve endothelial function and plasma haemostasis. *Scientific Reports*, 2019. DOI : 10.1038/s41598-019-43083-z.

IF₍₂₀₁₇₎ = 4,122; 40 p MNiSW

H8: Magdalena Markowicz-Piasecka*, Joanna Sikora, Łukasz Mateusiak, Elżbieta Mikiciuk-Olasik, Kristiina M. Huttunen. Metformin and its sulfenamide prodrugs inhibit human cholinesterases activity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, Art. nr: 7303096.

IF = 4,936; 30 p MNiSW

H9: Magdalena Markowicz-Piasecka*, Kristiina M. Huttunen, Joanna Sikora. Metformin and its sulfonamide derivative simultaneously potentiate anti-cholinesterase activity of donepezil and inhibit beta-amyloid aggregation. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2018, 33 (1), 1309-1322.

IF₍₂₀₁₇₎ = 3,638; 25 p MNiSW

*Autor korespondencyjny

Przedmiotem badań składających się na wyżej wymienione prace były metformina, doustny lek przeciwcukrzycowy, fenformina oraz tioalkilowe i sulfonamidowe pochodne biguanidu. Związki te zostały zaprojektowane i zsyntetyzowane przez Kristiinę Huttunen na University of Eastern Finland (Kuopio, Finlandia). Opracowanie modelu biozgodności oraz badania dotyczące określenia wpływu wyżej wymienionych związków na wybrane parametry hemostazy osoczowej i naczyniowej oraz aktywność ludzkich cholinoesteraz wykonałam w Pracowni Bioanalizy Zakładu Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji (Uniwersytet Medyczny w Łodzi). Badania wychwytu komórkowego metforminy i jej pochodnych wykonałam w trakcie stażu podoktorskiego w School of Pharmacy (University of Eastern Finland).

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

Wprowadzenie teoretyczne do przedstawionego osiągnięcia naukowego zostało przygotowane na podstawie przeglądu piśmiennictwa opublikowanego w następujących artykułach:

Magdalena Markowicz-Piasecka, Kristiina M. Huttunen, Łukasz Mateusiak, Elżbieta Mikiciuk-Olasik, Joanna Sikora. Is Metformin a Perfect Drug? Updates in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Current Pharmaceutical Design*, 2017, 23 (17), 2532 – 2550. [H1 (P)]

Magdalena Markowicz-Piasecka, Joanna Sikora, Aleksandra Szydłowska, Agata Skupień, Elżbieta Mikiciuk-Olasik, Kristiina M. Huttunen. Metformin – a future therapy for neurodegenerative diseases. *Pharmaceutical Research* 2017, 34 (12), 2614-2627. [H2 (P)]

Magdalena Markowicz-Piasecka, Kristiina M. Huttunen, Elżbieta Mikiciuk-Olasik, Łukasz Mateusiak, Joanna Sikora. Metformin - from anti-diabetic drug to anti-cancer drug. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*, 2018, 1 (75), 3 – 18.

4. 1. Wprowadzenie

Cukrzyca, zgodnie z definicją Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) to przewlekła choroba metaboliczna, która występuje, gdy organizm nie wytwarza wystarczającej ilości insuliny lub nie jest w stanie skutecznie wykorzystywać własnej insuliny w procesie metabolizmu cukrów pochodzących ze spożywanej żywności. Niekontrolowana lub nieleczona cukrzyca charakteryzuje się zwiększonym poziomem glukozy we krwi (hiperglikemia), który przyczynia się do poważnego uszkodzenia narządów wewnętrznych, w tym serca, naczyń krwionośnych, oczu, nerek i nerwów [1]. Chorzy na cukrzycę typu 2, którzy stanowią około 90% wszystkich przypadków zachorowań, najczęściej wytwarzają własną insulinę, ale w niewystarczającej ilości lub ich organizm nie jest w stanie jej właściwie wykorzystywać (tzw. insulinooporność).

W 2014 roku, według Raportu WHO [2], na cukrzycę chorowały 422 miliony dorosłych, natomiast w 1980 roku odnotowano 108 milionów chorujących. Na tej podstawie oszacowano, że częstość występowania cukrzycy prawie podwoiła się od 1980 roku (w 1980 roku częstość występowania cukrzycy wynosiła 4,7%, natomiast w 2014 roku wzrosła do 8,5% w populacji osób dorosłych). Zjawisko to można przypisać częstszemu występowaniu czynników ryzyka cukrzycy, w tym nadwagi, otyłości, stosowania niezdrowej diety lub braku aktywności fizycznej. Ostre powikłania cukrzycy, w tym zawał serca lub udar, stanowią istotny czynnik przyczyniający się do zwiększenia umieralności i kosztów opieki medycznej oraz niskiej jakości życia. Według WHO w 2012 roku liczba zgonów z powodu wysokiego stężenia glukozy we krwi została oszacowana na 3,7 miliona, z czego 1,5 miliona to zgony wynikające bezpośrednio z cukrzycy, natomiast 2,2 miliona zgonów spowodowanych było chorobami

układu sercowo-naczyniowego, przewlekłą chorobą nerek i innymi schorzeniami związanymi z wyższym niż prawidłowy poziomem glukozy we krwi.

Międzynarodowa Federacja Diabetologiczna (IDF) poinformowała, że w Polsce częstość występowania cukrzycy w 2017 roku wyniosła 7,6%, natomiast w 2045 r. ma wynieść 9,5% [3]. Dane wskazują, że w Polsce jest ponad 2,2 miliona pacjentów cierpiących na cukrzycę, a całkowite wydatki na opiekę zdrowotną spowodowane cukrzycą wyniosły w 2017 roku 2,5 miliarda USD.

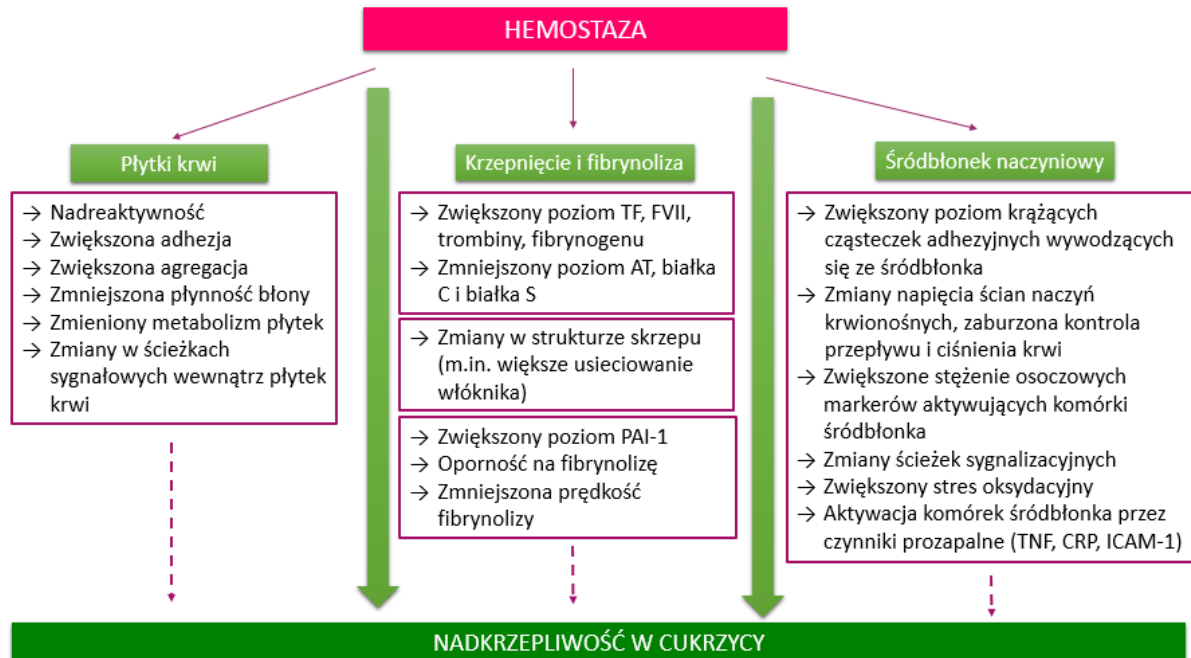
4. 1.1. Zaburzenia układu krzepnięcia i fibrynolizy w cukrzycy

Główną przyczyną przedwczesnej umieralności osób chorujących na cukrzycę typu II są choroby układu sercowo-naczyniowego. Jednym z czynników predysponujących do zwiększonego ryzyka wystąpienia incydentów naczyniowych są zaburzenia równowagi między układami krzepnięcia i fibrynolizy, co określane jest jako trombofilia cukrzycowa [4,5]. Badania wykazują, że cukrzyca wiąże się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia zakrzepicy i aktywacją układu krzepnięcia krwi [6]. Lipiński i Pretorius [6] w obszernej pracy przeglądowej przedstawili liczne powiązania pomiędzy cukrzycą typu II a zaburzeniami hemostazy. Zaburzenia hemostazy występujące u osób z cukrzycą typu II mogą zostać podzielone na następujące fazy: proces krzepnięcia i tworzenia skrzepu, upośledzony układ fibrynolizy, dysfunkcja śródbłonna naczyniowego oraz nadreaktywność płytek krwi [7].

Główne zmiany stwierdzone u pacjentów z cukrzycą typu II dotyczące czynności płytek obejmują ich nadreaktywność, zwiększoną adhezję i agregację oraz zmieniony metabolizm [7,8]. Stan prozakrzepowy u cukrzyków może być również spowodowany zwiększoną aktywnością czynników krzepnięcia, takich jak czynnik von Willebranda (vWF) i czynnik VII (FVII) oraz zwiększonym poziomem fibrynogenu [4]. Naukowcy wspominają również o podwyższonym poziomie czynnika tkankowego (TF) oraz trombinie jako o innych ważnych przyczynach nadkrzepliwości u pacjentów z cukrzycą [9]. Do nieprawidłowości w obrębie układu krzepnięcia zaliczyć można również obniżony poziom antytrombiny III (AT), białka C i białka S. Ponadto, u osób chorujących na cukrzycę zaobserwowano także wzrost poziomu inhibitora aktywatora plazminogenu typu 1 (PAI-1), który przyczynia się do upośledzenia procesu fibrynolizy [10]. Dostępne są także doniesienia wskazujące, że u pacjentów z cukrzycą zmienia się poziom fibrynogenu i proces generacji trombiny, co prowadzi do tworzenia skrzepów o gęstszej strukturze (zwiększone usieciowanie włókna) i utrudnionej fibrynolizie [7,9,11,12]. Badacze wskazują, że dysfunkcja śródbłonna naczyniowego jest czynnikiem inicjującym patogenezę oraz objawy miażdżycy i została klinicznie powiązana z cukrzycą [7,13,14].

Soma i Pretorius [7] podkreślają, że w procesie krzepnięcia u pacjentów z cukrzycą typu II nie można pominąć roli erytrocytów, ponieważ stwierdzono, że erytrocyty osób chorujących na cukrzycę wykazują zwiększoną agregację, zmniejszoną oporność osmotyczną i posiadają

sztywną błonę komórkową o zmniejszonej odkształcalności. Podsumowanie głównych zmian w krzepnięciu krwi w przebiegu cukrzycy typu II została przedstawiona na rycinie 1.



Rycina 1. Podsumowanie zaburzeń hemostazy występujących w przebiegu cukrzycy typu II. Oznaczenia: TF - czynnik tkankowy, FVII - czynnik VII, AT - antytrombina III, t-PA - tkankowy aktywator plazminogenu, PAI-1 - tkankowy inhibitor aktywatora plazminogenu 1, TNF - czynnik martwicy nowotworów, CRP – białko C-reaktywne, ICAM-1 - cząsteczka adhezji międzykomórkowej.

4. 1.2. Cukrzyca a choroba Alzheimera

Choroba Alzheimera (AD) jest jedną z najczęściej występujących postaci otępienia u osób w podeszłym wieku. AD jest chorobą neurodegeneracyjną, którą charakteryzuje zanik pamięci oraz utrata funkcji poznawczych. W AD występuje kilka charakterystycznych cech patologicznych w obrębie mózgu, które obejmują degenerację neuronów, mózgowe blaszki starcze (SP), które powstają w wyniku odkładania się β -amyloidu ($A\beta$), powstawanie wewnątrzkomórkowych splotów neurofibrylarnych zbudowanych ze złogów ufosforylowanego białka tau. Cechą charakterystyczną w przebiegu AD jest obniżony poziom acetylocholiny (ACh) [15-18]. Ponadto, niektórzy autorzy przekonują, że AD można uznać za chorobę metaboliczną, w której mózg nie jest w stanie efektywnie wykorzystać glukozy do produkcji energii. Ponadto, dowody kliniczne wskazują, że w chorobie Alzheimera dochodzi do rozwoju insulinooporności, a to z kolei może przyczyniać się do osłabienia insulinowego szlaku przekazywania sygnałów w niektórych częściach mózgu pacjentów z AD [19].

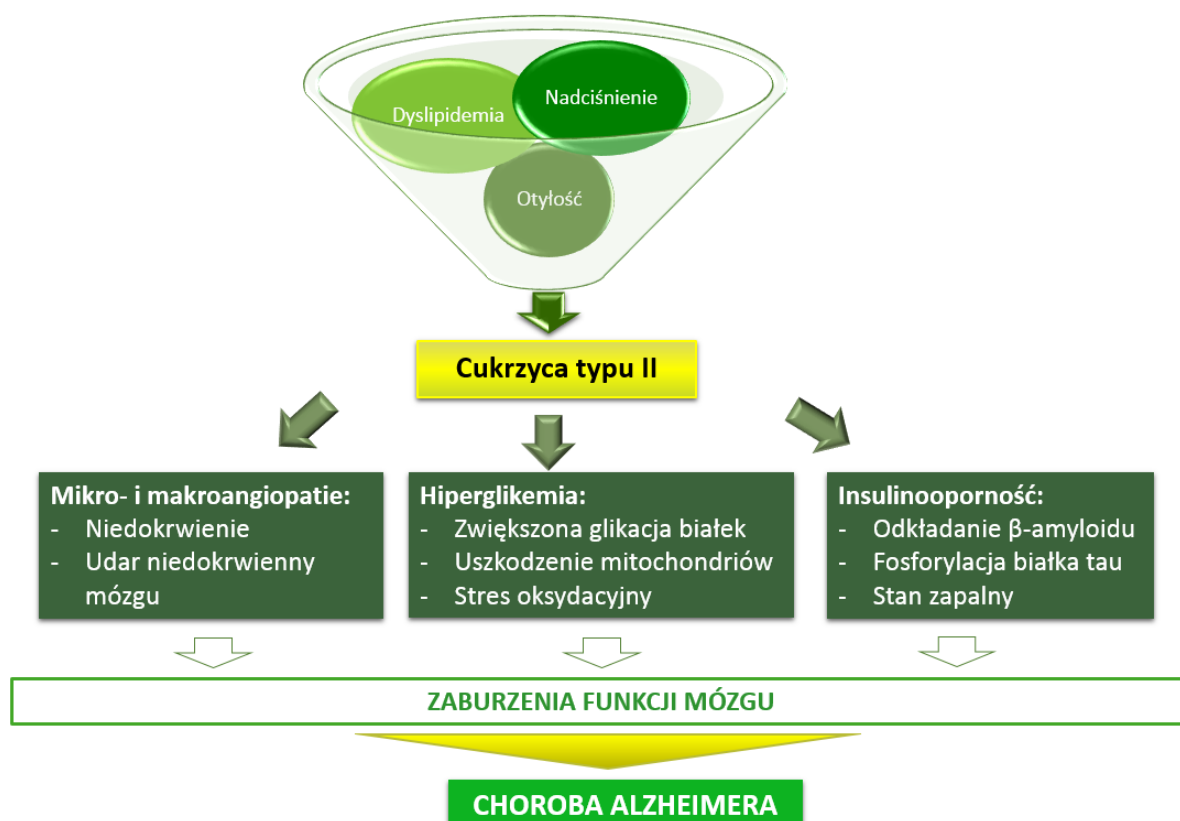
Przegląd najnowszych artykułów i danych epidemiologicznych wskazuje na zwiększone ryzyko rozwoju AD u osób z cukrzycą typu II. Na przykład Biessels i wsp. [20] oraz Kopf i wsp. [21], podobnie do innych badaczy [22,23] wykazali zwiększone ryzyko AD u osób z cukrzycą. Metaanaliza obejmująca 1 776 777 pacjentów wykazała, że osoby z cukrzycą miały istotnie większą częstość występowania AD niż osoby bez tej choroby (RR: 1,53, 95% CI: 1,42-1,63) [24].

Stwierdzono, że ApoE-ε4, jeden z trzech alleli apolipoproteiny E, to silny genetyczny czynnik ryzyka wystąpienia AD [25]. Homozygotyczni nosiciele alleli ApoE-ε4 są narażeni na 8-krotne zwiększenie ryzyka AD [26]. Dodatkowo pacjenci z T2DM, którzy posiadają allel ApoE-ε4, są dwukrotnie bardziej podatni na rozwój AD niż osoby bez cukrzycy [22]. Pomimo wszystkich tych dowodów łączących cukrzycę z AD, istnieją również badania, które wskazują, że cukrzyca nie predysponuje do AD [27,28,29]. Z przedstawionych powyżej danych wynika, że związek między cukrzycą a pogorszeniem funkcji poznawczych w AD nie został jeszcze w pełni udowodniony i potrzebne są dalsze, dobrze zaprojektowane badania kliniczne w celu wyjaśnienia roli cukrzycy w rozwoju funkcji kognitywnych u pacjentów z AD.

Związek pomiędzy T2DM i AD jest złożony i wieloczynnikowy. Jednym z ważniejszych czynników łączących obie choroby jest insulinooporność. Powoduje ona dysfunkcję mitochondriów, która z kolei wyzwała odpowiedź zapalną [30,31]. W tych warunkach oporność na insulinę zwiększa poziom cytokin, takich jak IL-6, IL-1β i IL-18, czynnika martwicy nowotworów-alfa (TNF-α) i białka C-reaktywnego (CRP) [32-34].

Insulina jest odpowiedzialna za kontrolę uwalniania neurotransmiterów mózgowych z synaps oraz aktywację przekąźnictwa związanego z procesami uczenia się i pamięci długotrwałej. U chorych z AD komórki nerwowe nie reagują na insulinę, ponieważ zaburzone jest działanie receptorów insulinowych, co do złudzenia przypomina cukrzycę typu II. Insulina pełni także nadrzędną funkcję we właściwym przebiegu procesów metabolicznych w mózgu. Mechanizm jej działania w odniesieniu do białka tau polega na wpływaniu (wraz z insulinopodobnym czynnikiem wzrostu) na procesy fosforylacji [35,36].

Inne typowe cechy AD i T2DM obejmują nasilenie procesów związanych ze stresem oksydacyjnym i tworzeniem końcowych zaawansowanych produktów glikacji - (AGE). Wspólne cechy AD i T2DM to także tworzenie β-amyloidu (Aβ) z białka prekursorowego amyloidu (APP), aktywacja kinazy syntazy glikogenu (GSK3), która uczestniczy między innymi w fosforylacji białka tau. Ponadto, insulina stymuluje ekspresję acetylotransferazy choline, enzymu odpowiedzialnego za syntezę acetylocholine. Stąd też obniżone poziomy insuliny mogą przyczyniać się do zmniejszenia stężenia acetylocholine, co jest charakterystyczne w przebiegu AD [36]. Na rycinie 2 przedstawiono schemat podsumowujący możliwe mechanizmy łączące cukrzycę i chorobę Alzheimera.



Rycina 2. Mechanizmy łączące cukrzycę typu II i chorobę Alzheimera.

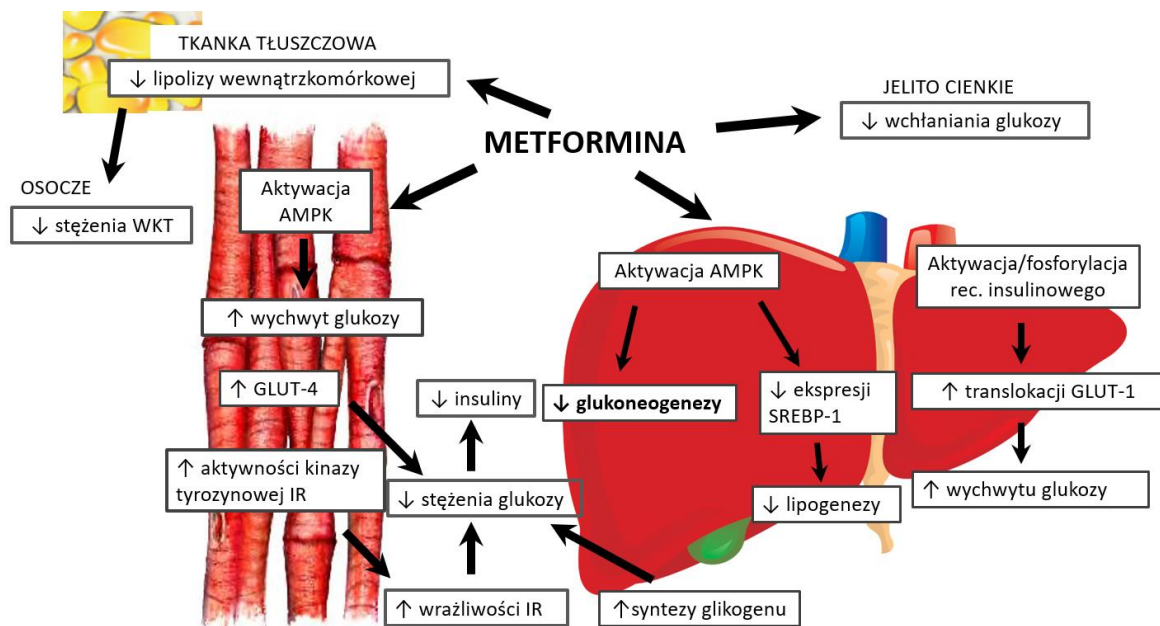
4. 1. 3. Metformina

Klasyczna farmakoterapia cukrzycy typu II rozpoczyna się od modyfikacji stylu życia. Prawidłowe żywienie oraz aktywność fizyczna mają istotne znaczenie w poprawie ogólnego stanu zdrowia pacjentów oraz prewencji i leczeniu przewlekłych powikłań cukrzycy. Jeśli pomimo zmiany stylu życia nie udaje się utrzymać optymalnej kontroli metabolicznej choroby należy zastosować doustny lek przeciwcukrzycowy. Metformina jest lekiem pierwszego wyboru przy rozpoczynaniu leczenia farmakologicznego w cukrzycy typu II, o ile nie jest przeciwwskazana lub źle tolerowana. Gdy insulinooporność postępuje, a opcja monoterapii staje się niewystarczająca do kontrolowania poziomu glukozy we krwi, należy dodać drugi lek doustny (np. pochodną sulfonilomocznika) [37]. Postępujący charakter cukrzycy typu II i spadek wytwarzania insuliny endogennej wymagają podania egzogennej insuliny [37-40]. Do najważniejszych grup leków stosowanych w leczeniu cukrzycy typu II zaliczamy: pochodne sulfonilomocznika, biguanidy (metformina), glinidy (np. repaglinid), inhibitory α -glukozydazy (akarboza), tiazolidynodiony (agoniści rec. PPAR γ), inhibitory dipeptydylopeptydazy 4 (DPP-4; gliptiny), analogi glukagonopodobnego peptydu-1 (GLP-1) i analogi amyliny [41].

Metformina, syntetyczny biguanid, jest obecnie jednym z najczęściej zalecanych leków w leczeniu cukrzycy typu II na całym świecie. Oprócz tego wskazania, metformina jest również stosowana w leczeniu zespołu policystycznych jajników (PCOS), zespołu metabolicznego, a także w profilaktyce cukrzycy [42-44].

Wiele badań wskazuje, że mitochondria stanowią główny cel działania molekularnego metforminy [45]. Lek gromadzi się w macierzy mitochondriów, gdzie hamuje kompleks I łańcucha transportu elektronów, powodując zmniejszenie utleniania NADH i ostatecznie zmniejszenie syntezy ATP [45,46]. Zmiany te powodują aktywację kinazy AMP (AMPK) (mechanizm zależny od kinazy wątrobowej B1 (LKB1)) [47]. W rezultacie metformina hamuje glukoneogenezę wątrobową i zwiększa zużycie glukozy w mięśniach [48]. Foretz i wsp. zwrócili uwagę na obecność niezależnej od LKB1 i AMPK ścieżki hamowania wątrobowej glukoneogenezy [49].

Metformina przyczynia się także do zmniejszenia hiperinsulinemii poprzez zwiększenie wrażliwości na insulinę [41]. Działanie to wynika m.in. z pośredniej indukcji ekspresji receptora insulinowego oraz obniżenia poziomu glukozy we krwi w wyniku hamowania wchłaniania glukozy w przewodzie pokarmowym [41,50]. Metformina zmniejsza oporność na insulinę poprzez zwiększenie aktywności kinazy tyrozynowej receptora insuliny, zwiększenie syntezy glikogenu oraz aktywności transporterów glukozy GLUT4 [51]. Najważniejsze mechanizmy związane z hipoglikemizującym działaniem metforminy przedstawiono na rycinie 3.



Rycina 3. Mechanizm działania hipoglikemizującego metforminy.

Skróty: WKT – wolne kwasy tłuszczowe, AMPK – kinaza AMP, GLUT-1/4 – transportery glukozy, IR – receptor insuliny, SREBP-1 – białko wiążące sekwencję odpowiedzi na sterole.

Obecnie uważa się, że zarówno postępowanie nefarmakologiczne, jak i stosowanie metforminy, mają udowodnioną rolę w zapobieganiu cukrzycy u osób ze stanem przedcukrzycowym. Slama [52] wykazał, że leczenie metforminą znacznie zmniejszyło częstość występowania cukrzycy u osób z IGT (upośledzoną tolerancją glukozy) i z wysokim stężeniem glukozy w osoczu na czczo.

Oprócz właściwości hipoglikemizujących, metformina okazała się wywierać korzystny wpływ na profil lipidowy [53]. Kilka badań klinicznych sugeruje, że metformina przyczynia się do obniżenia poziomu cholesterolu całkowitego i cholesterolu LDL (low-density lipoproteins) [54]. W przeciwieństwie do tych wyników stwierdzono jednak, że metformina nie ma wpływu na cholesterol HDL (high-density lipoproteins) lub triglicerydy (TG) u pacjentów z cukrzycą typu II [54]. Istnieją również inne badania, które nie potwierdzają pozytywnych efektów stosowania metforminy w odniesieniu do zmian w profilu lipidowym [55], dlatego nie można jednoznacznie potwierdzić, że metformina korzystnie wpływa na te parametry.

Niezwykle istotne z klinicznego punktu widzenia okazały się badania UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study). Udowodniły one, że metformina znacząco zmniejsza liczbę zgonów związanych z cukrzycą (o 42%), a także śmiertelność ogólną (o 36%) [56]. Wykazano ponadto, że stosowanie metforminy u pacjentów z cukrzycą typu II istotnie redukuje ryzyko wystąpienia zawału mięśnia sercowego (o 39%) [56]. Podobne wyniki uzyskano w innych badaniach klinicznych i epidemiologicznych [57-58]. Zaproponowano, że te pozytywne rezultaty mogą wynikać nie tylko z lepszej kontroli glikemii, ale również z powodu utraty masy ciała. Leczenie metforminą stanowi istotny element zintegrowanej modyfikacji stylu życia oraz farmakoterapii zapobiegającej zarówno cukrzycy typu II, jak i chorobie sercowo-naczyniowej [59]. Stąd też metformina uważana jest za wyjątkowo cenny lek ze względu na jego właściwości przeciwcukrzycowe oraz korzystny wpływ na śmiertelność w tej populacji [53,60].

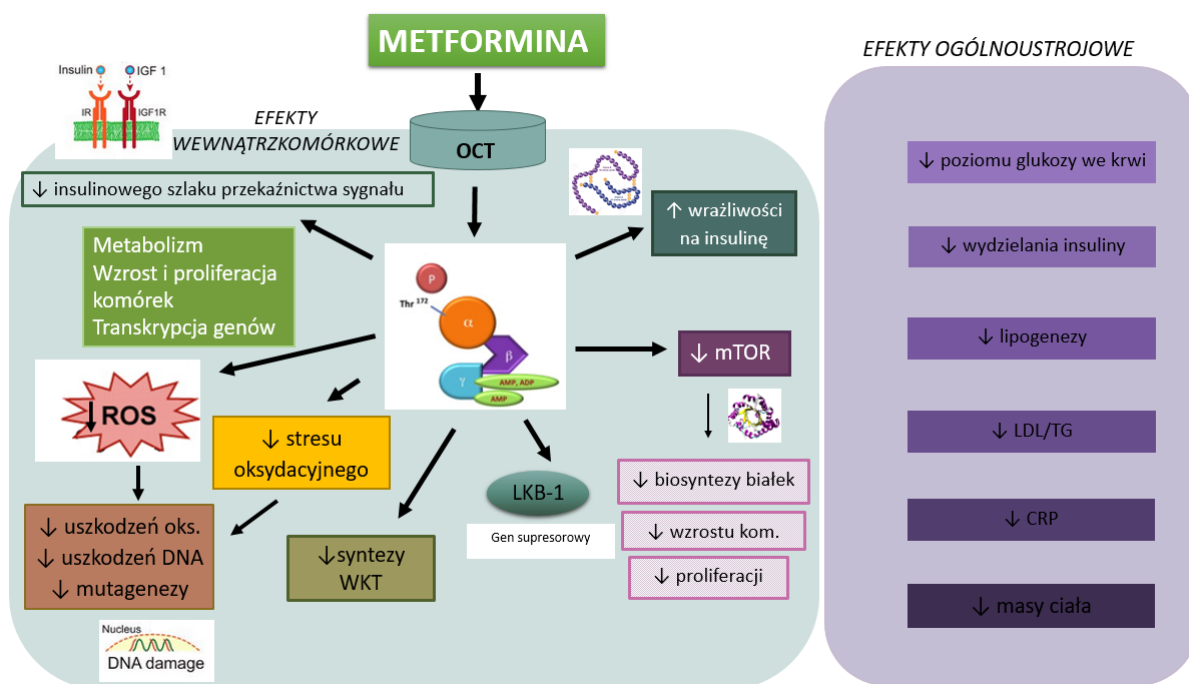
Wyniki publikacji autorstwa Hong [61], Yang [62], Kinsara [63], Chi [64] oraz Nesti [65] wskazują, że metformina osłabia uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne w mięśniu sercowym i zapobiega przebudowie wywołanej czynnikami humoralnymi i hemodynamicznymi. Stwierdzono także, że lek ten zmniejsza apoptozę kardiomiocytów, poprawia adaptację ich metabolizmu podczas niedokrwienia oraz chroni przed rozwojem niewydolności serca [53].

Kilka doniesień wskazuje, że metformina może hamować proces powstawania blaszki miażdżycowej [66,67]. W większości badań korzystny wpływ metforminy na proces powstawania zmian w tętnicach nie był związany z poziomem lipidów w osoczu. Sugeruje to, że lek ten może także oddziaływać bezpośrednio na naczynia krwionośne, głównie poprzez zapobieganie uszkodzeniom śródbłonna naczyniowego oraz korzystny wpływ na funkcjonowanie komórek śródbłonna [59]. Główne mechanizmy przeciwmiażdżycowego działania metforminy obejmują hamowanie przylegania leukocytów do śródbłonna, tworzenia komórek piankowatych, proliferacji komórek mięśni gładkich i agregacji płytek krwi [68].

Niektóre publikacje wskazują również na profibrynolityczne właściwości metforminy. Na przykład 12-tygodniowe podawanie metforminy w dawce 2550 mg dziennie przyczyniło się do zmniejszenia poziomu PAI-1 (inhibitor aktywatora plazminogenu 1) (200,7 ng/mL na początku badania w porównaniu do 173,7 ng/mL po 12 tygodniach) [69]. Stwierdzono również, że metformina zapobiega powikłaniom mikro- i makronaczyniowym w cukrzycy poprzez poprawę funkcji śródbłonna naczyniowego [70] w sposób zależny od AMPK. Szczegółowy opis wpływu metforminy na układ sercowo-naczyniowy i hemostazę został przedstawiony

w artykule „Is Metformin a Perfect Drug? Updates in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics” [H1 (P)].

Wiele badań wykazuje, że metformina wywiera działanie przeciwnowotworowe [41]. Na przykład Evans i wsp. stwierdzili, że pacjenci z cukrzycą typu II leczeni metforminą mieli niższy wskaźnik śmiertelności na nowotwory w porównaniu do pacjentów, którzy nie stosowali metforminy [71]. Stąd też metformina w coraz większym stopniu przyciąga uwagę badaczy dzięki swoim właściwościom przeciwnowotworowym, w szczególności w raku sutka, jajnika, trzonu macicy i trzustki [41]. Oprócz właściwości antyproliferacyjnych, metformina może poprawić skuteczność różnych chemioterapeutyków i pomóc w pokonaniu oporności na chemioterapię. Na przykład, wykazano, że metformina zwiększa wrażliwość komórek nowotworowych endometrium na cisplatynę i paklitaksel [72,73], a także pokonuje oporność na trastuzumab w zwierzęcym modelu raka sutka [74]. Główne mechanizmy przeciwnowotworowej aktywności metforminy zostały opisane w publikacji "Metformin - from anti-diabetic drug to anti-cancer drug" i podsumowane na Rycinie 4.



Rycina 4. Komórkowe i ogólnoustrojowe mechanizmy działania przeciwnowotworowego metforminy.

Skróty: OCT – transportery dla kationów organicznych, mTOR – ssaczy cel rapamycyny, ROS – reaktywne formy tlenu, IGF-1 – insulinopodobny czynnik wzrostu, LDL – lipoproteiny o małej gęstości, TG – triglicerydy, CRP – białko C-reaktywne.

Oprócz wyżej wymienionych korzystnych efektów działania metforminy w odniesieniu do glikemii, profilu lipidowego, układu sercowo-naczyniowego i właściwości przeciwnowotworowych metformina wykazuje również właściwości przeciwzapalne i przeciwstarzeniowe [75-78].

Jak szerzej przedstawiono w rozdziale 4. 1.2, wiele aktualnych danych sugeruje, że metformina może odgrywać znaczącą rolę w leczeniu choroby Alzheimera (AD). Istnieją badania kliniczne potwierdzające jej korzystne działanie w zakresie poprawy funkcji poznawczych i utraty pamięci. Korzystne właściwości metforminy wynikają z jej molekularnego mechanizmu działania. Najnowsze doniesienia naukowe sugerują, że metformina może zmniejszać ryzyko AD poprzez zniesienie oporności na insulinę w mózgu [79,80]. Ponadto aktywacja AMPK wywiera działanie neuroprotektoryjne na ludzkie komórki nerwowe, poprawia funkcje mitochondrialne i osłabia działanie AGE (zaawansowane produkty glikacji) [81]. Stwierdzono także, że metformina znacząco zmniejsza ekspresję β -sekreazy 1 (BACE1) i jej aktywność w modelach komórkowych oraz *in vivo*, tym samym zmniejszając ilość produktów powstałych w wyniku jej aktywności oraz wytwarzanie β -amyloidu [82]. Ponadto Zhou i wsp. [83] wykazali, że traktowanie szczurzych neuronów w mózdku (CGN) metforminą znacząco zwiększało żywotność komórek w warunkach neurotoksyczności indukowanej przez glutaminian [83].

Przeprowadzono kilka badań *in vivo* oceniających wpływ metforminy na aktywność acetylocholinoesterazy (AChE), której poziom jest podwyższony zarówno w chorobie Alzheimera, jak i cukrzycy typu II. Na przykład Bhutada i wsp. [84] zbadali wpływ alkaloidu - berberyny i metforminy na zaburzenia funkcji poznawczych u szczurów z cukrzycą indukowaną streptozotocyną. Indukcja cukrzycy u szczurów przyczyniła się do poważnego upośledzenia w procesie uczenia się i pamięci. Objawy te wynikały ze zwiększonej peroksydacji lipidów i aktywności cholinoesteraz (ChE). Autorzy stwierdzili, że długotrwałe leczenie (30 dni) za pomocą metforminy w dawce 500 mg/kg poprawia zdolności poznawcze, zmniejsza stres oksydacyjny i aktywność AChE. Wyniki prac naukowych wskazują, że potencjalne spektrum korzystnych efektów metforminy obejmuje również właściwości przeciwzapalne i przeciwutleniające [85,86].

Pod względem chemicznym metformina jest pochodną biguanidu (chlorowodorek 1,1-dimetylobiguanidu) charakteryzującą się wysoce hydrofilowymi właściwościami [46,87]. W warunkach fizjologicznych metformina występuje w postaci dodatnio naładowanej (sprotonowanej). Te niekorzystne właściwości fizykochemiczne przyczyniają się do wolnego i niepełnego wchłaniania z jelita cienkiego oraz braku możliwości dyfuzji leku przez błony komórkowe [88]. Dostępność biologiczną metforminy po podaniu doustnym oszacowano na 50 - 60%, ale odnotowano także znaczną zmienność międzyosobniczą, która może powodować brak odpowiedzi na lek [88].

Metformina jest aktywnie transportowana do komórek za pośrednictwem transporterów, głównie poprzez transportery kationów organicznych (OCT) i błonowe transportery monoamin (PMAT) [87,88]. Wchłanianie metforminy w świetle jelita odbywa się za pośrednictwem transporterów PMAT, zlokalizowanych na błonie podstawnej enterocytów i transporterów OCT1, które wykazują ekspresję na błonie podstawno-bocznej enterocytów [89]. W wątrobie metformina jest wychwytywana przez hepatocyty głównie przy udziale OCT1 i prawdopodobnie przez OCT3. W nerkach transport metforminy do komórek nabłonka opiera

się na transporterach OCT2, ulegających ekspresji na błonie podstawno-bocznej, a wydalanie metforminy do moczu odbywa się z udziałem transporterów z grupy MATE 1 i 2 (multidrug and toxin extrusion protein). Stąd też można założyć, że transportery i ich ekspresja, aktywność lub polimorfizm wpływają na właściwości farmakokinetyczne metforminy, w tym jej wchłanianie w przewodzie pokarmowym, dystrybucję i wydalanie, a także efekty biochemiczne u ludzi [87].

Jak dotąd nie znaleziono powiązań pomiędzy polimorfizmem transporterów OCT a chorobami występującymi u ludzi. Wydaje się, że większym ryzykiem związanym z polimorfizmem OCT oraz substratami przenoszonymi za ich pomocą jest możliwość wystąpienia interakcji między lekami. Wykazano, że polimorfizm OCT1 jest związany ze zmienioną farmakokinetyką metforminy i imatynibu (inhibitor kinazy tyrozynowej) [90]. Ponadto stwierdzono, że doustne leki przeciwcukrzycowe, takie jak repaglinid i rozyglitazon hamują transport metforminy za pośrednictwem OCT1 [91].

4. 1.4. Pochodne biguanidu

Ze względu na relatywnie niskie oraz niecałkowite wchłanianie z przewodu pokarmowego, powodujące umiarkowaną dostępność biologiczną oraz znaczne różnice międzypersoniczne i wewnątrzpochodne w odpowiedzi klinicznej na metforminę, podjęto kilka prób syntezy nowych związków (pochodne, proleki) w celu poprawy profilu farmakokinetycznego metforminy [92,93,94]. Zespół Huttunen zsyntetyzował kilka tioalkilowych proleków (zawierających ugrupowanie N-S) o lepszej absorpcji z przewodu pokarmowego w stosunku do metforminy [92-94]. Badania *in vivo* wybranych proleków ujawniły, że związki te gromadzą się w erytrocytach, gdzie ulegają biokonwersji do metforminy za pomocą grup tiolowych i następnie ilościowo uwalniają metforminę, co przyczynia się do wydłużenia biologicznego okresu półtrwania metforminy po podaniu doustnym [93].

W innych pracach Huttunen i wsp. opisali syntezę pochodnych metforminy o budowie sulfonamidowej wykazujących zwiększoną przenikalność w monowarstwie komórek Caco-2 [94]. Stwierdzono, że prolek *o*-nitro-*p*-trifluorometylosulfonamidowy jest przekształcany do metforminy *in vitro* w subkomórkowej frakcji wątroby, najprawdopodobniej przez transferazę S-glutationową (GST) [95]. Z kolei stwierdzono, że zarówno *o*-, jak i *p*-nitrosulfonamidy nie ulegają konwersji przez GST, dlatego powinny być one traktowane jako pochodne, a nie proleki metforminy. Na podstawie otrzymanych wyników wywnioskowano, że wydajna biokonwersja przy użyciu GST wymaga wysoce elektrofilowej struktury chemicznej (np. podstawników elektronoujemnych przyłączonych w pozycji *o*- lub *p*- pierścienia aromatycznego). Ponieważ GST ulega ekspresji w hepatocytach, związki te zostały zaprojektowane tak, aby ulegać biokonwersji do metforminy dopiero, gdy zostaną dostarczone do hepatocytów. Metformina była również stosowana jako substrat do syntezy kolejnych pochodnych o korzystnych właściwościach. Na przykład Koh i wsp. [96] zsyntetyzowali nową pochodną metforminy (HL010183) i szereg soli metforminy, które

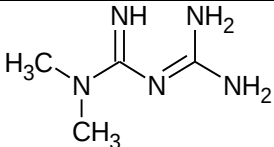
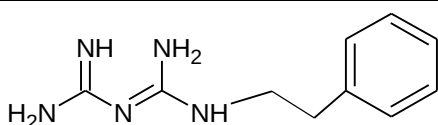
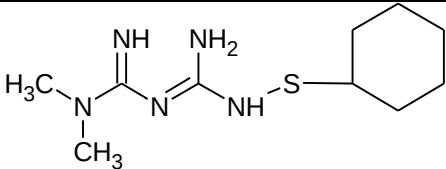
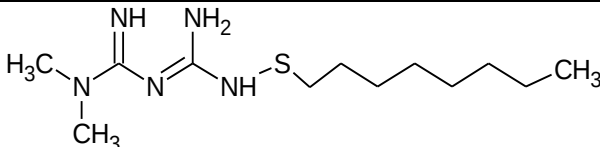
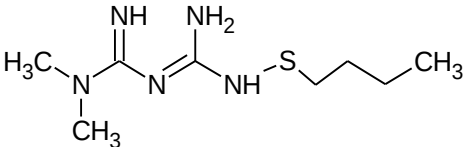
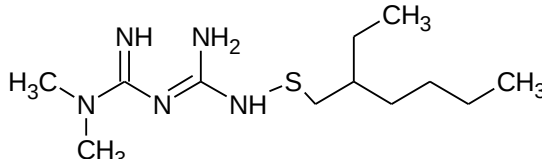
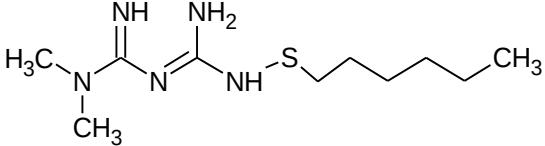
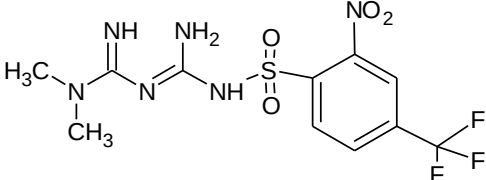
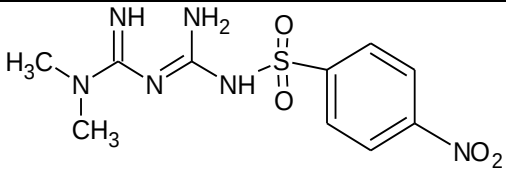
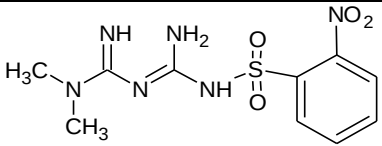
wywierały silniejsze działanie hamujące na proliferację i inwazyjność komórek raka sutka Hs578T niż metformina [96].

4. 2. Cel badań habilitacyjnych

Pomimo wszystkich opisanych we wstępie autoreferatu cennych właściwości, metformina charakteryzuje się niekorzystnym profilem farmakokinetycznym, m.in. wolnym i niekompletnym wchłanianiem, co skutkuje stosunkowo niską biodostępnością oraz znacznymi różnicami w odpowiedzi klinicznej na lek. W związku z tym na University of Eastern Finland zsyntetyzowano kilka analogów i proleków metforminy, aby poprawić właściwości fizykochemiczne i farmakokinetyczne macierzystego leku [92-95].

Biorąc pod uwagę powyższe uzasadnienie, celem przedstawionych artykułów naukowych, stanowiących podstawę niniejszego jednotematycznego osiągnięcia, było opracowanie modelu oceny biozgodności nowych związków oraz określenie wpływu metforminy i jej tioalkilowych oraz sulfonamidowych pochodnych na wybrane parametry hemostazy osoczowej i naczyniowej oraz aktywność ludzkich cholinoesteraz. Określiłam także rolę transporterów kationów organicznych (OCT) w wychwycie komórkowym tioalkilowych i sulfonamidowych pochodnych biguanidu. Struktury chemiczne badanych związków przedstawiłam w Tabeli 1.

Tabela 1. Budowa chemiczna badanych pochodnych biguanidu: metforminy, fenforminy oraz pochodnych 1 – 8.

	
Metformina	Fenformina
	
Związek nr 1	Związek nr 2
	
Związek nr 3	Związek nr 4
	
Związek nr 5	Związek nr 6
	
Związek nr 7	Związek nr 8

Powyższe cele zostały osiągnięte w czterech etapach:

→ **Etap A.** Przegląd piśmiennictwa dotyczącego najnowszych danych z dziedziny farmakokinetyki metforminy, w szczególności roli transporterów (np. OCT) oraz nowych właściwości metforminy, w tym korzystnego wpływu na profil lipidowy, układ sercowo-naczyniowy oraz krzepnięcie i fibrynolizę [H1 (P)]. Analiza danych dotyczących stosowania metforminy w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych ze szczególnym uwzględnieniem AD [H2 (P)].

→ **Etap B.** Rola transporterów kationów organicznych (OCT) w wychwycie komórkowym metforminy i jej pochodnych [H3].

→ **Etap C.** Ocena wpływu metforminy i jej pochodnych na wybrane parametry hemostazy osoczowej i erytrotoksyczność [H4, H5, H6].

→ **Etap D.** Ustalenie wpływu metforminy i jej pochodnych na wybrane markery dysfunkcji śródbłonna naczyniowego oraz hemostazę w warunkach pół-fizjologicznych w przepływie krwi [H7].

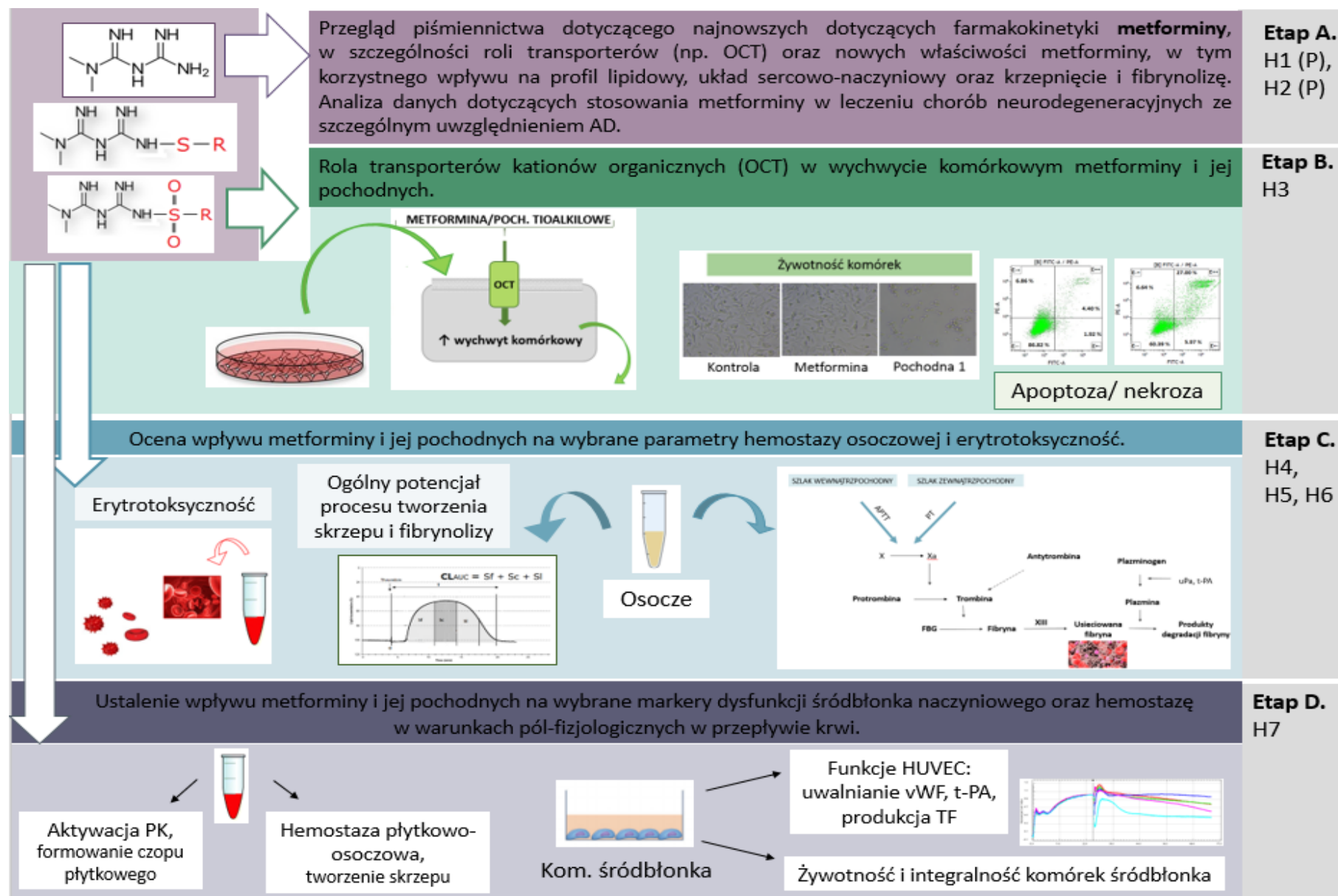
→ **Etap E.** Ocena potencjału hamowania ludzkich ChE i ustalenie potencjalnego synergizmu pomiędzy pochodnymi biguanidu i donepezilem w kierunku hamowania ChE [H8, H9].

Szczegółowe cele prac oryginalnych [H-3] - [H-9] obejmują:

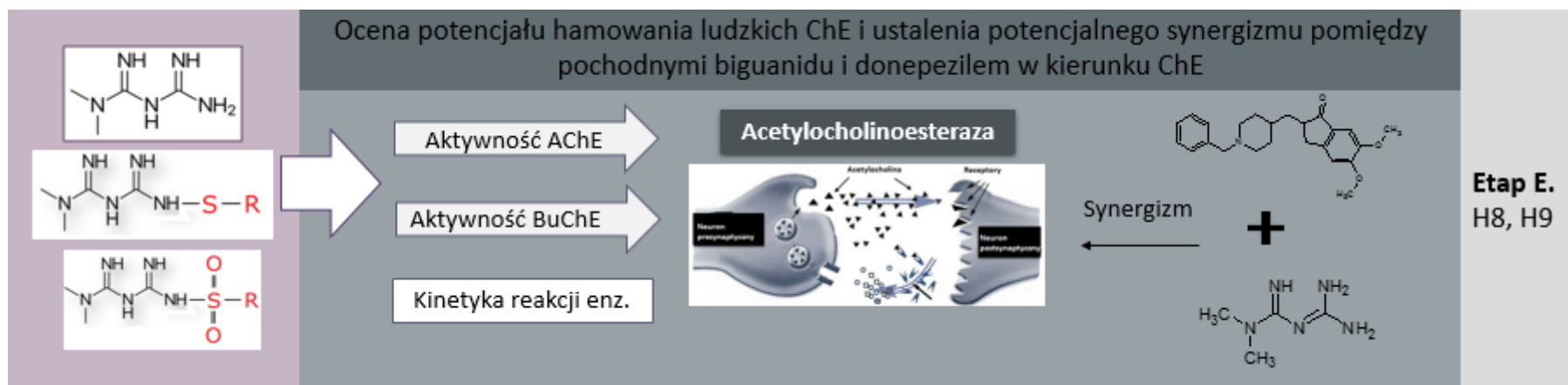
- Określenie powinowactwa metforminy oraz jej pochodnych do transporterów kationów organicznych (OCT) [H3];
- Analizę wychwytu komórkowego pochodnych biguanidów w dwóch liniach komórkowych raka piersi wykazujących zróżnicowaną ekspresję OCT [H3];
- Ustalenie zależności pomiędzy wychwytem komórkowym pochodnych biguanidów a efektami ich działania, w tym żywotność, morfologię oraz apoptozę komórek raka piersi [H3];
- Ocenę wpływu metforminy i jej pochodnych na ogólny potencjał tworzenia skrzepu i fibrynolizy, parametry kinetyczne tych procesów oraz proces krzepnięcia po generacji endogennej trombiny [H4, H5];
- Ocenę wpływu metforminy i jej pochodnych na zewnątrzpochodny i wewnątrzpochodny szlak krzepnięcia określając PT (czas protrombiny) i APTT (czas częściowej tromboplastyny po aktywacji) [H4, H5];
- Analizę toksyczności pochodnych biguanidu względem erytrocytów [H4, H5];
- Ocenę wpływu metforminy i jej pochodnych na czas trombinowy (TT) [H6];
- Ocenę wpływu metforminy i jej pochodnych na aktywność czynnika X [H6] oraz aktywność dwóch głównych enzymów uczestniczących w hemostazie osoczowej: trombiny i plazminy [H6];
- Ocenę wpływu metforminy i jej pochodnych na aktywność naturalnie występujących w osoczu antykoagulantów: antytrombiny III (AT) i białka C [H6];
- Ocenę wpływu metforminy i jej pochodnych na aktywację płytek krwi oraz proces formowania czopu płytkowego w warunkach przepływu krwi [H7];
- Ocenę wpływu metforminy i jej pochodnych na proces krzepnięcia krwi, indukowanego tromboplastyną i kolagenem w warunkach przepływu krwi (hemostaza płytkowo-osoczowa) [H7];
- Ocenę wpływu metforminy i jej pochodnych na żywotność, integralność oraz apoptozę ludzkich komórek śródbłonna żyły pępowinowej (HUVEC) [H7];
- Ocenę wpływu metforminy i jej pochodnych na wewnątrzkomórkowy poziom czynnika tkankowego (TF) oraz uwalnianie czynnika von Willebranda (vWF) i tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA) z komórek HUVEC [H7];
- Ocenę wpływu metforminy i jej pochodnych na ekspresję międzykomórkowej cząsteczki adhezyjnej 1 (ICAM-1) na powierzchni komórek HUVEC [H7];

- Analizę wpływu pochodnych biguanidu na aktywność ludzkich esteraz (AChE i BuChE) oraz ustalenie typu inhibicji [H8, H9];
- Ocenę potencjalnego synergizmu wybranych biguanidów i donepezilu w stosunku do obu cholinesteraz oraz oszacowanie potencjalnego zastosowania pochodnych biguanidu jako skutecznych adiuwantów do klinicznie zatwierdzonych inhibitorów AChE [H9, H9];
- Ocenę potencjału wybranych biguanidów na hamowanie procesu agregacji β -amyloidu [H9].

Kierunki badawcze podjęte w każdym z etapów przedstawiłam schematycznie na Rycinie 5 (A, B).



Rycina 5A. Schemat przedstawiający kierunki badań habilitacyjnych (etapy A – D).



Rycina 5B. Schemat przedstawiający kierunki badań habilitacyjnych (etap E).

4. 3. Wyniki badań i dyskusja

4. 3. 1. Etap A. Przegląd piśmiennictwa dotyczącego najnowszych danych z dziedziny farmakokinetyki metforminy, w szczególności roli transporterów (np. OCT) oraz nowych właściwości metforminy, w tym korzystnego wpływu na profil lipidowy, układ sercowo-naczyniowy oraz krzepnięcie i fibrynolizę. Analiza danych dotyczących stosowania metforminy w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych ze szczególnym uwzględnieniem AD.

Wynikiem studium literaturowego, które przeprowadziłam było usystematyzowanie aktualnej wiedzy na temat roli transporterów z grupy OCT w procesie wchłaniania, dystrybucji oraz eliminacji metforminy. W przeglądzie literatury uwzględniłam także dane dotyczące ryzyka związanego z polimorfizmem OCT oraz możliwością wystąpienia interakcji między lekami, które są substratami transporterów OCT. Konsekwencją powyższych zainteresowań badawczych były badania eksperymentalne, które wykonałam podczas stażu naukowego na University of Eastern Finland. Badania te dotyczyły określenia powinowactwa do transporterów OCT oraz ich roli w wychwycie komórkowym metforminy i jej pochodnych. Część przeprowadzonych badań została przedstawiona na konferencji „Inaugural Conference of the International Transmembrane Transporter Society: The Transporter Transition” („Sulfenamide derivatives can improve OCT-mediated cellular uptake of metformin”). W publikacji pt. „Is Metformin a Perfect Drug? Updates in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics.” [H1 (P)] przeanalizowałam szereg mechanizmów potencjalnego działania metforminy, ze szczególnym uwzględnieniem chorób układu sercowo-naczyniowego oraz hemostazy. Omówiłam także korzystne właściwości metforminy takie jak: właściwości przeciwzapalne, przeciwnowotworowe oraz przeciwstarzeniowe. W oparciu o przegląd literatury ustaliłam zakres stężeń metforminy oraz jej pochodnych, które następnie wykorzystałam w badaniach własnych. Jednym z najczęściej stosowanych stężeń w testach *in vitro* jest 5 mg/L, co stanowi ok. 0,03 $\mu\text{mol/mL}$. Co ciekawe, jedna z najnowszych publikacji autorstwa Kajbaf i wsp. [97] wskazuje na bardzo duże rozbieżności w terapeutycznych stężeniach metforminy w osoczu. Badacze twierdzą, że zmienia się ono w zakresie 0,129 - 90 mg/L, czyli 0,8 nmol/mL - 0,6 $\mu\text{mol/mL}$. Z kolei w badaniach *in vitro* naukowcy testują stężenia wielokrotnie wyższe, dochodzące nawet do 10 mmol/L (10 $\mu\text{mol/mL}$) [98,99]. Dlatego, w oparciu o dane literaturowe, zdecydowaliśmy się na stosowanie metforminy i pochodnych w zakresie stężeń 0,006 - 1,5 lub 3,0 $\mu\text{mol/mL}$.

Wymienione w publikacji pt. „Is Metformin a Perfect Drug? Updates in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics.” właściwości metforminy stały się punktem wyjścia do poszerzenia i usystematyzowania wiadomości dotyczących potencjalnego zastosowania tego biguanidu w farmakoterapii chorób neurodegeneracyjnych. Ze względu na moje wcześniejsze doświadczenie (Załącznik 6, punkt II A, poz. 1, 3, 4, 5) w pracy pt.: „Metformin – a future therapy for neurodegenerative diseases” [H2 (P)] dokonałam przeglądu danych literaturowych dotyczących potencjalnego zastosowania metforminy w chorobie Alzheimera. W publikacji tej przedstawiłam szereg hipotez wyjaśniających potencjalne mechanizmy działania metforminy

w chorobie Alzheimer. Konsekwencją powyższych zainteresowań badawczych były badania eksperymentalne podejmujące kwestię potencjalnego działania anty-cholinergicznego metforminy i jej pochodnych [H8, H9].

4. 3. 2. Etap B. Rola transporterów kationów organicznych w wychwycie komórkowym metforminy i jej pochodnych.

Badania przeprowadzone przez Cai i wsp. [100] wykazały, że poziom ekspresji transporterów OCT jest skorelowany z wychwytem komórkowym metforminy, a co za tym idzie z antyproliferacyjną i przeciwnowotworową skutecznością metforminy w raku sutka. Wychwyt metforminy i aktywność antyproliferacyjną porównano między komórkami ludzkiego raka piersi z niedoborem przenośnika OCT, BT-20 i OCT3-BT-20, która została zmodyfikowana pod kątem nadekspresji transportera kationów organicznych 3 (OCT3) (dominujący transporter w ludzkich nowotworach piersi). Wychwyt metforminy był minimalny w komórkach BT-20, ale zwiększony 13-krotnie w komórkach OCT3-BT20, a siła antyproliferacyjna metforminy była 4-krotnie większa w OCT3-BT20 w porównaniu z komórkami BT-20. Ten wzrost aktywności antyproliferacyjnej był związany z większą fosforylacją AMPK i zmniejszoną fosforylacją pS6K w komórkach OCT3-BT20 [100]. Dane *in vitro* zostały potwierdzone przez obserwacje *in vivo*, w których wykazano znacząco większą skuteczność przeciwnowotworową metforminy u myszy z nowotworami wykazującymi nadekspresję OCT3 w porównaniu z guzami typu dzikiego (niska ekspresja OCT). Podsumowując, ustalono wyraźną zależność pomiędzy ekspresją transportera OCT3, kaskadą sygnalizacyjną AMPK-mTOR-pS6K i antyproliferacyjną aktywnością metforminy w raku sutka [100].

Biorąc pod uwagę powyższe, zdecydowałam się zbadać jaką rolę pełnią transportery kationów organicznych w wychwycie komórkowym metforminy oraz jej tioalkilowych oraz sulfonamidowych pochodnych oraz sprawdzić czy modyfikacja struktury chemicznej biguanidu wpływa na zwiększenie wychwytu komórkowego. Badania te przeprowadziłam w zespole doktor Kristiiny Huttunen na University of Eastern Finland.

Badania prowadziłam na dwóch liniach komórkowych wykazujących zróżnicowaną ekspresję przenośników z grupy OCT. Liniami tymi były linie nowotworowe piersi: MCF-7 oraz MDA-MB-231. W pierwszym etapie pracy zbadałam funkcje transporterów OCT 1, 2 i 3 w dwóch liniach komórek raka piersi (MCF-7 oraz MDA-MB-231). Określiłam m.in. charakterystykę transportu choline (substrat transporterów OCT) znakowanej izotopem ^{14}C ($[^{14}\text{C}]$ -cholina), w tym zależność od czasu oraz stężenia. Zbadałam także wychwyt $[^{14}\text{C}]$ -choline w obecności inhibitorów transporterów OCT: dizopiramid, narynginy oraz cymetydyny. Na podstawie uzyskanych wyników ustaliłam warunki przeprowadzania eksperymentów z użyciem badanych biguanidów.

W pierwszym etapie określiłam powinowactwo metforminy oraz tioalkilowych i sulfonamidowych pochodnych metforminy do transporterów OCTs. Badania te prowadziłam przy użyciu [^{14}C]-choliny, a radioaktywność próbek mierzyłam za pomocą licznika scyntylacyjnego. Wyniki pokazały, że metformina w zakresie stężeń 10 – 2000 $\mu\text{mol/L}$ hamuje wychwyt choliny w komórkach MCF-7 i MDA-MB-231 na zbliżonym do siebie poziomie, w ok. 30 – 35%. Wszystkie zsyntetyzowane tioalkilowe proleki metforminy wykazywały znacząco większy wpływ na wychwyt choliny. Największe powinowactwo do transporterów OCT wykazywał związek tioalkilowy z łańcuchem *n*-oktylowym, który hamował w 50% transport [^{14}C]-choliny do komórek MCF-7 oraz MDA-MB-231 w stężeniach odpowiednio 236.1 ± 1.28 oraz 217.4 ± 1.33 $\mu\text{mol/L}$.

Następnie zbadalam wychwyt metforminy oraz pochodnych biguanidu w obu liniach komórkowych (MCF-7 oraz MDA-MB-231). W pierwszym etapie analizy ustaliłam zależność między stężeniem metforminy i wychwytem w komórkach, a następnie uzyskane krzywe przekształciłam za pomocą równania Eadie-Hofstee i otrzymane krzywe analizowałam w celu obliczenia wartości K_m i V_{max} . Na podstawie porównania wychwyty metforminy w komórkach MCF-7 i MDA-MB-231 można stwierdzić, że wychwyt jest nieznacznie lepszy w komórkach MDA-MB-231. Analiza wychwyty metforminy wykresów Eadie-Hofstee wykazała, że 2 transportery biorą udział w wychwycie komórkowym leku w obu liniach komórkowych. Aby dowiedzieć się, jaki jest udział transporterów OCT w wychwycie metforminy, przeprowadziłam eksperymenty z inhibitorami OCT, w tym preferencyjnego inhibitora OCT1, dizopiramidu. W obu liniach komórkowych odnotowałam znacznie niższy wychwyt metforminy w stężeniu 100 $\mu\text{mol/L}$ w obecności dizopiramidu, więc możemy wywnioskować, że OCT, prawdopodobnie OCT1, uczestniczy w transporcie metforminy w niższych stężeniach. W wyższym stężeniu głównym transporterem jest najprawdopodobniej inny transporter, który nie był hamowany przez dizopiramid. W przypadku badań w obecności cymetydyny nie odnotowano żadnej znaczącej różnicy w wychwycie metforminy z i bez udziału tego inhibitora ($0,053 \pm 0,011$ vs. $0,068 \pm 0,021$ nmol/min/mg białek).

W kolejnym etapie pracy zbadalam także pochodne tioalkilowe i określiłam zależność pomiędzy ich stężeniem a wychwytem komórkowym. Wszystkie analizowane pochodne wykazywały większy wychwyt komórkowy w porównaniu do leku macierzystego, metforminy. Pochodna z podstawnikiem cykloheksylowym wykazywała największy wychwyt komórkowy spośród badanych związków. W komórkach MCF-7 w stężeniu 800 $\mu\text{mol/L}$ wartość ta wynosiła $1,28 \pm 0,19$ nmol/min/mg białka i była ponad 11-krotnie wyższa niż dla metforminy. Podobnie, w przypadku komórek MDA-MB-231 odnotowano najwyższy wychwyt dla pochodnej cykloheksylowej ($0,95 \pm 0,06$ nmol/min/mg białka). Uzyskane wyniki zależności wychwyty pochodnych biguanidu od ich użytego stężenia opracowałam stosując równanie Eadie-Hofstee, które pozwoliło wywnioskować, że badane związki są transportowane w komórkach MCF-7 oraz MDA-MB-231 za pomocą dwóch transporterów. Zgodnie ze stosunkiem V_{max}/K_m oba transportery w komórkach MCF-7 okazały się bardziej wydajne niż w komórkach MDA-MB-231, a pochodna miała wyższe powinowactwo względem transporterów w komórkach

MCF-7, ponieważ odpowiednie wartości K_m były niższe. Z kolei w komórkach MDA-MB-231 pochodna cykloheksylowa miała wyższą wartość V_{max} , ale jednocześnie wyższą wartość K_m , czyniąc te komórki mniej wydajnymi pod względem wychwytu niż MCF-7. Oba transportery w komórkach MDA-MB-231 zachowywały się jak transportery o większej wydajności a mniejszym powinowactwie do związku, podczas gdy w MCF-7 miały wyższe powinowactwo i posiadały mniejszą wydajność. Według różnic K_m wydaje się, że w obu liniach komórkowych pochodna ta ma równe powinowactwo do obu transporterów, więc nie jest selektywna wobec określonego podtypu transportera OCT.

Ciekawe wyniki badań otrzymałam w przypadku pochodnej tioalkilowej z *n*-butylowym łańcuchem. Związek ten był wychwytywany do komórek MCF-7 około 12-krotnie lepiej niż metformina ($1,325 \pm 0,388$ wobec $0,11 \pm 0,01$ nmol/min/mg białek). Natomiast wychwyt pochodnej butylowej w komórkach MDA-MB-231 był znacznie niższy, co można wytłumaczyć mniej więcej 7-krotnie mniejszą wydajnością transportu (V_{max}/K_m) w komórkach MDA-MB-231. W przypadku komórek MCF-7 ze względu na stosunkowo niskie powinowactwo do OCT trudno było stwierdzić, czy transportery OCT zaangażowane były w jego transport, czy nie. Może to sugerować, że pochodna ta wykorzystuje jakiś inny mechanizm transportowy, który występuje tylko w komórkach MCF-7, takich jak PMAT (Plasma Membrane Monoamine Transporter) lub MATE1 (Multidrug and Toxic Compound Extrusion). Na podstawie tych wyników można wywnioskować, że "dodanie" łańcucha butylowego do szkieletu metforminy przyczyniło się do znacznego zmniejszenia powinowactwa do OCT i przekierowania cząsteczki do innych transporterów. Wynik ten potwierdzono w doświadczeniach z inhibitorami OCT, ponieważ w obecności 400 μ mol/L dizopiramidu i cymetydyny zaobserwowano znaczny wzrost wychwytu komórkowego pochodnej *n*-butylowej. Wychwyt pochodnej *n*-butylowej w obecności inhibitorów OCT, dizopiramidu i cymetydyny został zwiększony, ponieważ prawdopodobnie związki te „przeszkadzały” pochodnej *n*-butylowej w wiązaniu się z OCT i zmusiły ją do użycia innych transporterów. Zjawisko to obserwowano również w przypadku transporterów LAT1 (transporter aminokwasów typu L) [101].

Podsumowując, chemiczne przekształcenie metforminy w pochodne tioalkilowe różniące się długością łańcucha alkilowego lub obecnością nasyconego pierścienia heksylowego przyczyniło się do uzyskania lepszyc substratów dla OCT oraz wyższego wychwytu komórkowego w komórkach MCF-7 i MDA-MB-231. Dłuższy łańcuch alkilowy wprowadzony do pochodnych tioalkilowych przyczynił się do wyższej selektywności dla transportera OCT1 w stosunku do innego transportera, jak również do wydajności transportu.

Na podstawie dokonanego przeglądu literatury możemy stwierdzić, że jest to pierwsze badanie porównujące wychwyt komórkowy metforminy oraz jej pochodnych w dwóch niezmodyfikowanych liniach ludzkich komórek raka sutka, MCF-7 i MDA-MB-231. Wiele z opublikowanych badań wykazało wychwyt metforminy w różnych liniach komórkowych transfekowanych rOCT1, hOCT2 lub hOCT3 [102,103]. Biorąc pod uwagę wyniki Cai i wsp. [100] założyliśmy, że wzrost wychwytu związków pochodnych metforminy może przełożyć się na

większą siłę aktywności biologicznej testowanych związków, takich jak efekt antyproliferacyjny.

Po powrocie do Polski kontynuowałam badania i sprawdziłam czy zwiększony wychwyt komórkowy pochodnych biguanidu może wywoływać efekty cytotoksyczne. Nasze badania wykazały, że metformina nie wpływa znacząco na żywotność komórek do stężenia 3 mmol/L. Analiza wyników wykazała, że metformina indukowała taki sam schemat odpowiedzi w obu liniach komórkowych w porównywalnych stężeniach, jednak dla najwyższego badanego stężenia metformina powodowała statystycznie istotne zmniejszenie żywotności komórek MDA-MB-231. Postanowiliśmy pracować z szerokim zakresem stężeń, aby sprawdzić, czy wpływ metforminy można osiągnąć przy użyciu klinicznie istotnych stężeń lub tylko przy wyższych lub eksperymentalnych stężeniach. Uzyskane wyniki są w większości zgodne z innymi publikacjami wykazującymi brak lub słabe właściwości antyproliferacyjne metforminy w niższych stężeniach. Badania mikroskopowe nie wykazały wpływu metforminy w całym zakresie stężeń na morfologię komórek obu linii. W teście apoptozy wykazaliśmy, że stymulacja komórek MDA-MB-231 metforminą przyczyniła się do znacznego zmniejszenia liczby komórek zebranych w bramce B ($58,21 \pm 1,57\%$ w porównaniu z $69,48 \pm 4,06\%$ w przypadku próbek kontrolnych), jednak nie zmieniło to istotnie procentu żywotnych komórek (AV-PI-), jak również wczesnych, późnych apoptotycznych i nekrotycznych komórek.

W przeciwieństwie do metforminy, dla innych badanych związków określiłam stężenie powodujące 50% spadek żywotności komórek (IC_{50}). Komórki stymulowano badanymi związkami w stężeniach w tym samym zakresie, co w badaniach wychwyty komórkowego ($10 \mu\text{mol/L}$ do 2000 lub $3000 \mu\text{mol/L}$). Pochodna z pierścieniem cykloheksylowym okazała się najbardziej cytotoksyczna wobec komórek MCF-7 ($IC_{50} = 0,72 \pm 1,31 \mu\text{mol/L}$). Zakładamy, że stosunkowo niskie wartości IC_{50} i właściwości antyproliferacyjne pochodnej cykloheksylowej wynikają z wysokiego wychwyty w obu liniach komórkowych, które były 12-krotnie i 8-krotnie wyższe niż metformina w komórkach MCF-7 i MDA-MB-231.

Związek, który zmniejsza żywotność komórek nowotworowych, może również przyczyniać się do śmierci komórek pierwotnych. Dlatego przeprowadziliśmy kilka eksperymentów z wykorzystaniem ludzkich komórek śródbłonna (ludzkich HUVEC), które wykazały, że na przykład związek tioalkilowy z pierścieniem heksylowym zmniejszał żywotność komórek HUVEC w stężeniu $6 \mu\text{mol/L}$, a z kolei pochodna łańcuchem *n*-butylowym nie doprowadziła do zmiany żywotności i integralności komórek do $1,5 \text{ mmol/L}$.

Biorąc pod uwagę fakt, że wychwyt metforminy i jej skuteczność antyproliferacyjna i przeciwnowotworowa opierają się na wielu transporterach, w naszych badaniach przedstawiliśmy nowy sposób poprawy cytotoksyczności metforminy. Wyniki wskazują, że chemiczna modyfikacja struktury metforminy w pochodne tioalkilowe prowadzi do uzyskania związków o znacznie lepszych właściwościach antyproliferacyjnych. Należy jednak podkreślić, że ocenie właściwości przeciwnowotworowych pochodnych biguanidu musi towarzyszyć

określenie powinowactwa związków do transporterów OCT, co pozwoli na odpowiednią interpretację danych.

4. 3. 3. Etap C. Ocena wpływu metforminy i jej pochodnych na wybrane parametry hemostazy osoczowej i erytrotoksyczność.

Jak przedstawiono w części "Wprowadzenie", wyniki badań eksperymentalnych i klinicznych wskazują na wielokierunkowe działanie metforminy względem hemostazy, w tym na hemostazę płytkową i osoczną, uwzględniając zarówno układ krzepnięcia, jak i fibrynolizy. Jednak dokładny mechanizm działania metforminy na proces krzepnięcia krwi i fibrynolizę wciąż nie jest w pełni poznany i wyjaśniony. Stąd też zdecydowałam się ocenić *in vitro* wpływ metforminy, fenforminy i ośmiu pochodnych metforminy (Tabela 1) na ogólny potencjał tworzenia skrzepu i fibrynolizy przy użyciu wcześniej opisanego wieloparametrycznego modelu (CL-test) z własnym programem komputerowym [104]. Test ten oparty jest na pomiarze ogólnego potencjału tworzenia skrzepu, jego stabilizacji i fibrynolizy (CL_{AUC}) za pomocą ciągłego monitorowania zmian transmitancji. W badaniach z wykorzystaniem CL-testu stwierdziliśmy, że zarówno metformina, jak i fenformina nie wpływają znacząco na ogólny potencjał tworzenia skrzepu i fibrynolizy (CL_{AUC} constans, [H4]). Z kolei wśród badanych związków, pochodna tioalkilowa 5 i sulfonamidy 7 i 8 przyczyniły się do statystycznie istotnego zmniejszenia ogólnego potencjału tworzenia skrzepu i fibrynolizy ($\downarrow CL_{AUC}$) ([H5]). Sugeruje to, że wymienione związki mogą wywierać korzystny efekt w odniesieniu do hemostazy osoczowej, która jest często zaburzona u pacjentów z cukrzycą typu II. CL-test umożliwia również ocenę kilku parametrów kinetycznych procesu tworzenia skrzepu, jego stabilizacji i lizy. Badania wykazały, że metformina oraz fenformina nie wpływają na parametry kinetyczne wszystkich trzech faz badanego procesu, podczas gdy niektóre pochodne metforminy przyczyniły się do istotnych zmian w wybranych parametrach [H4, H5]. Na przykład, związek 8 wykazywał korzystne właściwości przeciwzakrzepowe, które przejawiały się zmniejszonym maksimum krzepnięcia ($\downarrow F_{max}$), a także zmniejszoną początkową prędkością tworzenia skrzepu ($\downarrow F_{vo}$). W odniesieniu do procesu fibrynolizy stwierdzono, że związek 8 przyczynił się do statystycznego zmniejszenia maksimum fibrynolizy ($\downarrow L_{max}$), co dowiodło całkowitej fibrynolizie wcześniej utworzonego skrzepu. Podczas naszych badań stwierdziliśmy, że związek 4 w najwyższym stężeniu (1,5 $\mu\text{mol/mL}$) istotnie zwiększał prędkość początkową fibrynolizy ($\uparrow L_{vo}$), podczas gdy nie obserwowano takiego efektu dla innych związków lub związku macierzystego, metforminy. Wyniki te wydają się mieć kluczowe znaczenie, biorąc pod uwagę zaburzenia procesu fibrynolizy u pacjentów z cukrzycą. Bardzo ważne są również wyniki dotyczące czasu stabilizacji skrzepu. Otóż w przypadku związków 4, 5, 7 i 8 zaobserwowano statystycznie znamienne skrócenie czasu stabilizacji skrzepu ($\downarrow T_c$), co oznacza, że związki te nie zmieniają struktury skrzepu, nie opóźniają procesu fibrynolizy i skracają czas od momentu inicjacji krzepnięcia i do całkowitej lizy skrzepu. Ma to kluczowe znaczenie, ponieważ udowodniono, że cukrzyca wiąże się z opornością na fibrynolizę,

potwierdzające ich korzystne właściwości w porównaniu z metforminą, która nie wykazała wpływu na czas Tc [H4, H5].

Następnym etapem badań była ocena wpływu biguanidów na proces krzepnięcia po generacji endogennej trombiny. W tych doświadczeniach, stosowałam niewielkie ilości trombiny (0,0375 IU/mL) oraz chlorek wapnia (0,015 mmol/mL). Dodanie tych odczynników nie inicjuje krzepnięcia, ale wywołuje reakcję sprzężenia zwrotnego prowadzącą do generacji endogennej trombiny, a przez to do zapoczątkowania procesu krzepnięcia. Wykazano, że związki 4 i 8 indukują statystycznie istotne wydłużenie czasu generacji endogennej trombiny ($\uparrow$ TGt), podczas gdy inne biguanidy nie wpływają na ten proces.

W celu dalszego scharakteryzowania wpływu pochodnych metforminy na hemostazę osoczną zdecydowałam się na wykonanie rutynowych laboratoryjnych testów diagnostycznych, takich jak pomiary czasu częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT) i czasu protrombinowego (PT). Żadne z tych badań nie wykazało statystycznie istotnych zmian dla pochodnych metforminy, z wyjątkiem sulfonamidu 8. Związek ten w zakresie stężeń 0,3 – 1,5 μ mol/mL istotnie wydłużył zarówno czas APTT, jak i PT, jednak zaobserwowane zmiany i wartości obu czasów mieściły się w zakresach referencyjnych obu parametrów. Otrzymane wyniki pozwalają stwierdzić, że badane związki nie wywierają niekorzystnego wpływu na zewnątrzpochozny i wewnątrzpochozny szlak krzepnięcia. Dodatkowo, pomiary stężenia fibrynogenu (FBG) wykazały, że żaden z badanych związków nie przyczynił się do zwiększenia jego poziomu (np. poprzez inicjowanie jego agregacji). Jest to ważne w świetle wyników badań, które wskazują, że u osób chorujących na cukrzycę typu II poziom FBG jest podwyższony.

Podsumowując tę część badań, CL-test jest bardzo cennym narzędziem do przesiewowego badania potencjalnych leków, ponieważ pole pod krzywą tworzenia skrzepu i fibrynolizy jest równoważne ogólnemu potencjałowi hemostazy (OHP) i koreluje z ryzykiem incydentów sercowo-naczyniowych [105]. Na podstawie przeprowadzonych badań można wywnioskować, że związki 7 i 8, posiadające podstawnik -NO₂ w pierścieniu aromatycznym, wykazują korzystny wpływ na hemostazę osoczną, ponieważ przyczyniają się do znacznego zmniejszenia ogólnego potencjału tworzenia skrzepu i fibrynolizy ($\downarrow$ CL_{AUC}). Korzystnie również zmieniają parametry kinetyczne, takie jak maksimum krzepnięcia ($\downarrow$ F_{max}), początkowa prędkość tworzenia skrzepu ($\downarrow$ F_{vo}) i czas stabilizacji skrzepu ($\downarrow$ Tc). Ponadto wykazałam, że sulfonamid 8 znacząco wydłuża czas generacji endogennej trombiny ($\uparrow$ TGt), co prawdopodobnie może być spowodowane zmniejszeniem aktywności trombiny. Podczas oceny aktywności zarówno wewnątrzpochoznego, jak i zewnątrzpochoznego szlaku krzepnięcia, wykazano, że pochodna 8 z podstawnikiem *o*-nitrobenzenowym ma właściwości przeciwzakrzepowe wyrażone jako przedłużone PT i APTT. Wydłużanie czasu protrombinowego (PT) odnotowane w przypadku *o*-nitrobenzenosulfonamidu (8) jest ważną obserwacją, szczególnie w świetle wyników Kim i wsp. [106], którzy wykazali, że PT jest znacznie skrócony u osób chorujących na cukrzycę w porównaniu do zdrowych osób.

Powyższe obiecujące wyniki zachęciły mnie do kontynuowania badań oraz wyjaśnienia mechanizmów działania metforminy oraz jej tioalkilowych i sulfonamidowych pochodnych, ze

szczególnym naciskiem na hemostazę osoczną. Ponieważ zarówno zewnątrzpochozny, jak i wewnątrzpochozny szlak krzepnięcia łączą się we wspólną ścieżkę, z czynnikiem X będącym pierwszym elementem tej drogi przekształcającym protrombinę w trombinę, zdecydowałam się przeprowadzić badania, których celem było określenie aktywności czynnika X [H6]. Badania wykazały, że metformina nie wpływa na aktywność czynnika X, co koreluje z naszymi wstępnymi badaniami parametrów PT i APTT. Z kolei sulfonamid 8 istotnie obniżył aktywność czynnika X ($107,25 \pm 11,18\%$ w porównaniu z kontrolą $117,50 \pm 11,21\%$), co uzasadnia wydłużenie parametrów PT i APTT. Z kolei związek 2 z łańcuchem oktylowym znacząco zwiększył aktywność czynnika X ($132,75 \pm 16,78\%$ w porównaniu z kontrolą $109,00 \pm 8,04\%$, [H6]), czemu towarzyszyło skrócenie APTT (38,87 s dla kontroli w porównaniu z 34,67 s i 33,37 s dla stężenia odpowiednio 1,5 i 3,0 $\mu\text{mol/mL}$, [H4]).

Jako kontynuację badań oceniających podstawowe parametry krzepnięcia, w tym APTT i PT, określałam wpływ biguanidów na czas trombinowy (TT). TT odzwierciedla czas, jaki upłynął od dodania egzogennej trombiny do osocza ubogopłytkowego (PPP), a następnie konwersji fibrynogenu (FBG) w fibrynę przy jednoczesnym odszczepieniu fibrynopeptydu A (FpA) i fibrynopeptydu B (FpB). Wartość TT obrazuje ostatnią fazę kaskady krzepnięcia, ale nie odzwierciedla całkowitej sprawności układu krzepnięcia. Wartość TT zależy przede wszystkim od stężenia fibrynogenu. W naszych badaniach stosowano osocza, w których stężenie FBG utrzymywało się w zakresie referencyjnym (2-4 g/L). Przeprowadzone próby wykazały, że badane związki nie przyczyniły się do zmian w stężeniu FBG [H4, H5]. Pomiar TT wykazały, że tylko związki 5 i 7 powodują znaczące skrócenie czasu TT, jednak wyniki te zawierały się w przedziale wartości referencyjnych, tj. pomiędzy 12,2 i 16,2 s dla trombiny o aktywności 3,0 UNIH/mL stosowanej w naszych testach.

W kolejnym etapie badań, postanowiłam sprawdzić, czy to przyspieszenie konwersji FBG do fibryny nie jest spowodowane wpływem związków na aktywność trombiny. Aktywność trombiny oceniłam spektrofotometrycznie za pomocą substratu chromogenego, a wyniki wyrażałam jako prędkość reakcji enzymatycznej (dA/dt). Stwierdziłam, że metformina i fenformina nie wpływają na aktywność enzymatyczną trombiny w całym zakresie badanych stężeń, podczas gdy związek 4 w najwyższym stężeniu (1,5 $\mu\text{mol/mL}$) znacznie zwiększył prędkość reakcji. Ta wyższa aktywność trombiny może wyjaśnić wcześniej odnotowany wzrost początkowej prędkości tworzenia skrzepu ($\uparrow \text{Fvo}$) dla związku 4 ($214,50 \pm 20,40\%$ T/min w porównaniu z kontrolą $192,00 \pm 20,41\%$ T/min [H5]). W przeciwieństwie do tych wyników, związek 8 w stężeniu 1,5 mol/mL przyczynił się do znaczącego zmniejszenia prędkości reakcji enzymatycznej ($\downarrow \text{dA/dt}$), co wyjaśnia zmniejszoną początkową prędkość tworzenia skrzepu ($\downarrow \text{Fvo}$) ($62,76 \pm 31,69\%$ T/min vs. kontrola $163,40 \pm 29,48\%$ T/min) obserwowaną w CL-teście [H5]. Właściwości sulfonamidu 8 w kierunku zmniejszenia aktywności trombiny, a w konsekwencji zmniejszenia początkowej prędkości tworzenia skrzepu wydają się mieć istotne znaczenie, zwłaszcza ze względu na to, że w badaniach równoległych stwierdzono, że metformina nie wywiera istotnego wpływu na oba parametry, ani na aktywność trombiny, ani na początkową prędkość tworzenia skrzepu. Badania aktywności trombiny nie wykazały

żadnych znaczących zmian w jej aktywności dla pozostałych pochodnych biguanidu. Wyniki te sugerują, że skrócony czas trombinowy (TT) wykazany w przypadku związków 5 i 7 może być spowodowany ich wpływem na proces polimeryzacji fibryny.

Kolejna część badań obejmowała eksperymenty oceniające wpływ biguanidów na aktywność białka C, które uważa się za główny system kontroli układu krzepnięcia. Istnieje kilka doniesień naukowych łączących cukrzycę typu II i aktywność białka C. Na przykład, Ceriello i wsp. [107] stwierdzili, że niedobór białka C może być związany ze zwiększonym procesem generacji trombiny u pacjentów z cukrzycą, ale mechanizm tego związku jest wciąż nieznany. Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały, że metformina, fenformina, pochodne tioalkilowe 1, 2, 3 i 4 oraz sulfonamid 8 nie wywierają wpływu na aktywność białka C, co jest ważną obserwacją, ponieważ cukrzyca może predysponować do zmniejszonej aktywności białka C. Niestety, w przypadku innych badanych związków w najwyższym stężeniu odnotowano istotny spadek aktywności białka C. Pomimo otrzymania tych niekorzystnych wyników, przypuszczamy, że zaobserwowana redukcja aktywności białka C może nie mieć znaczenia klinicznego, ponieważ uzyskane wartości mieszczą się w zakresie referencyjnym dla tej metody (80-110%). Jednakże jesteśmy świadomi, że na podstawie badań *in vitro* nie możemy przewidzieć klinicznego zachowania pochodnych w warunkach *in vivo*.

Aby dodatkowo scharakteryzować sposób działania biguanidów, wykonałam badania aktywności AT, niezależnej od witaminy K proteazy, która hamuje krzepnięcie poprzez neutralizację enzymatycznej aktywności trombiny. Wykorzystując substrat chromogeny określiłam wpływ biguanidów na aktywność AT. Stwierdziłam, że metformina, fenformina i związki 2 i 3 istotnie podwyższały aktywność AT, podczas gdy pozostałe związki nie wywierały istotnego działania na aktywność AT. Na podstawie przeglądu aktualnej literatury nie można wyciągnąć jednoznacznych wniosków dotyczących poziomu i aktywności AT u pacjentów z cukrzycą typu II [108]. Jednak ze względu na właściwości antykoagulacyjne AT, nowe związki, które mogą zwiększyć jej aktywność są pożądane, szczególnie w przypadku stanów związanych z nadkrzepliwością.

Poza nadkrzepliwością, cukrzyca typu II charakteryzuje się również większym prawdopodobieństwem wystąpienia hipofibrynolizy, która objawia się nieprawidłową strukturą skrzepu, opornością na fibrynolizę oraz zmniejszoną prędkością lizy. Dlatego zdecydowałam się podjąć badania oceniające aktywność plazminy, głównego enzymu przekształcającego włóknik w produkty degradacji fibryny. Badania wykazały, że ani metformina, ani fenformina nie wpływają na proteolityczną aktywność plazminy, co koreluje z wartościami początkowej prędkości fibrynolizy (Lvo) uzyskanymi w CL-teście [H4, H5]. Wyniki te sugerują, że związki można uznać za neutralne, biorąc pod uwagę ten aspekt procesu fibrynolizy. Natomiast wzrost aktywności plazminy odnotowano dla związku 2 w stężeniu 0,6 - 1,5 $\mu\text{mol/mL}$ i związku 4 o stężeniu 1,5 $\mu\text{mol/mL}$. Obserwacje te wyjaśniają istotnie zwiększoną prędkość początkową fibrynolizy ($\uparrow$ Lvo) związku 4 ($30,00 \pm 2,26\%$ T/min w porównaniu z kontrolą $25,82 \pm 1,56\%$ T/min, [H5]) i nieistotnie zwiększone Lvo związku 2 [H4]. Otrzymane wyniki wydają się bardzo cenne ze względu na związek między hipofibrynolizą

a cukrzycą typu II. Podwyższona aktywność plazminy i jednocześnie wzrost początkowej prędkości fibrynolizy uzyskany podczas inkubacji ludzkiego osocza z pochodnymi metforminy może być ich atutem w porównaniu z metforminą, która nie wywierała wpływu na te parametry. Niestety, podczas badań nad aktywnością plazminy stwierdziliśmy, że jeden z badanych związków, pochodna tioalkilowa z czterowęglowym łańcuchem (3), znacząco obniżyła jej aktywność (maksymalny procent inhibicji plazminy wynosił $35,15 \pm 16,28\%$ przy najwyższym badanym stężeniu). Wynik ten może wyjaśniać zmniejszoną prędkość początkową fibrynolizy ($\downarrow$ Lvo) odnotowaną w CL-teście.

Ostatnia część badań tego etapu to ocena wpływu biguanidów na czerwone krwinki (RBCs). Przeprowadziłam badania erytrotoksyczności, ponieważ oprócz interakcji pomiędzy białkami osocza a ksenobiotykami może dojść także do zainicjowania interakcji z komórkami krwi. Biozgodność nowych substancji względem krwi oceniana jest poprzez ich wpływ na hemolizę krwinek czerwonych. Jest to prosta i wiarygodna metoda służąca do oceny hemokompatybilności. Innym ważnym powodem podejmowania tych eksperymentów jest fakt, że metformina gromadzi się w erytrocytach, co przyczynia się do dłuższego okresu półtrwania w tych elementach morfotycznych krwi niż w osoczu ($23,4 \pm 1,9$ h wobec $2,7 \pm 1,2$ h). Przeprowadzony przez nas test lizy erytrocytów wykazał, że metformina nie wpływa na błonę erytrocytów i nie przyczynia się do ich hemolizy. Z kolei stwierdzono, że fenformina powoduje istotny wzrost hemolizy erytrocytów, jednak nie przekraczał on 10%. Hemoliza erytrocytów, w testach *in vitro*, nie przekraczająca 10% została uznana za wartość, która nie ma znaczenia klinicznego [109]. Spośród testowanych pochodnych tioalkilowych związków 2 z łańcuchem *n*-oktylowym przyczynił się do znaczącej hemolizy przy najwyższym badanym stężeniu. Przypuszczamy, że ten niekorzystny efekt jest związany z lipofilową strukturą związku. W przypadku sulfonamidów problem erytrotoksyczności wydaje się bardziej złożony. Sulfonamid 6 nie doprowadził do nadmiernej hemolizy krwinek czerwonych, podczas gdy w przypadku najwyższych stężeń sulfonamidów 7 i 8 zaobserwowano wzrost hemolizy erytrocytów. Sulfonamidy 7 i 8 nie wywierały wpływu na morfologię erytrocytów, co zostało dodatkowo potwierdzone histogramami uzyskanymi w badaniach cytometrycznych. Dlatego przypuszczamy, że grupa $-\text{NO}_2$ w pierścieniu aromatycznym może być odpowiedzialna za zwiększoną hemolizę, jednak bez zmiany morfologii erytrocytów. Ponieważ pochodna trifluorometylowa nie zwiększyła stopnia hemolizy, podejrzewamy, że włączenie atomu halogenu do pierścienia benzenowego może zmniejszyć odsetek zhemolizowanych erytrocytów. Przeprowadzone badania morfologiczne wykazały owalocytozę w przypadku sulfonamidu 6, ponieważ w obrazie mikroskopowym można było potwierdzić obecność dużych owalocytów. Obserwacje te zostały dodatkowo potwierdzone przez badania cytometryczne, ponieważ na histogramie wykryto tylko jedną populację erytrocytów dla stężenia $1,5 \mu\text{mol/mL}$.

Pomimo faktu, że metformina nie zmienia integralności błony komórkowej erytrocytów, badania morfologiczne wykazały, że przyczynia się ona do tworzenia echinocytów w stężeniu $3,0 \mu\text{mol/mL}$. Należy podkreślić, że proces transformacji dyskocyty-echinocyty występuje

naturalnie w naczyniach krwionośnych. Jest to proces odwracalny i może być spowodowany szeregiem czynników chemicznych i fizycznych, w tym zwiększoną siłą jonową, zasadowym pH i obniżonym poziomem ATP. Wyniki badań mikroskopowych sugerują, że większość analizowanych przez nas związków nie wpływa na erytrocyty w sposób patologiczny [110]. Sugeruje się, że zmiany kształtu erytrocytów wynikają ze zróżnicowanej penetracji związku z obrębie błony białkowo-lipidowej erytrocytów, a echinocyty powstają podczas wnikania ksenobiotyków do zewnętrznej warstwy błony erytrocytarnej [110].

Podczas badań mikroskopowych zauważyłam, że metformina, fenformina wraz ze związkiem 3 mogą również przyczyniać się do indukcji eryptozy. Eryptoza to skoordynowany proces zaprogramowanej śmierci komórki wykazujący znaczne podobieństwo do apoptozy. Charakteryzuje się obkurczeniem komórek, pofałdowaniem błony erytrocytarnej, co może być spowodowane przez wiele czynników fizjologicznych i patologicznych, jak warunki hiperosmotyczne, obniżenie energii lub markery stanu zapalnego (np. białko C, czynniki krzepnięcia itp.). Stwierdzono również, że eryptozę można wywoływać za pomocą ksenobiotyków, w tym między innymi lekami przeciwnowotworowymi (topotekan, cisplatyna), przeciwciałami monoklonalnymi (sunitynib, sorafenib, lipatinib) i lekami przeciwwirusowymi (rybawiryna) [111]. Jak stwierdził Lang i wsp. [111] fizjologicznie eryptoza zapewnia usunięcie wadliwych erytrocytów. W przeciwnym razie ulegną one hemolizie, która jest uważana za śmierć erytrocytu przypominającą nekrozę. Istotne jest również, że erytrocyty wykazujące cechy eryptozy mogą być zaangażowane w stymulację procesu krzepnięcia krwi, co może spowodować zahamowanie mikrokrążenia [111].

Podsumowując, opisany powyżej etap badań będący elementem osiągnięcia habilitacyjnego, dotyczy oceny wpływu metforminy i jej pochodnych na wybrane parametry hemostazy osoczowej oraz na toksyczność wobec czerwonych krwinek. W świetle opisanych powyżej zaburzeń hemostazy występujących u pacjentów z cukrzycą typu II wszystkie badane pochodne metforminy można uznać za bezpieczne względem hemostazy osoczowej. Co ważne, niektóre z nich, na przykład związek 8, mogą nawet korzystnie wpływać na proces krzepnięcia krwi, poprzez między innymi zmniejszenie ogólnego potencjału tworzenia skrzepu i fibrynolizy, wydłużenie czasu generacji endogennej trombiny i podstawowych wskaźników koagulologicznych (APTT, PT). Te korzystne efekty można wytłumaczyć zmniejszoną aktywnością czynnika X i trombiny pod wpływem związku 8.

Pochodna 8 należy do benzenosulfonamidów, które stanowią dobrą alternatywę polepszenia właściwości fizykochemicznych i farmakokinetycznych problematycznego leku macierzystego, metforminy [95]. Ważne jest, że te pochodne nie są metabolizowane przez enzymy obecne w jelicie cienkim (enterocyty), są stabilne w ludzkim osoczu [H5], ulegają biokonwersji przez transferazę S-glutationu (GST) w hepatocytach [95]. Dlatego oczekujemy, że o-nitrobenzenosulfonamid (8) może wywierać korzystne działanie przeciwzakrzepowe *in vivo* i stanowi obiecujący punkt wyjścia do dalszego rozwoju nowych pochodnych metforminy.

4. 3. 4. Etap D. Ustalenie wpływu metforminy i jej pochodnych na wybrane markery dysfunkcji śródbłonna naczyniowego oraz hemostazę w warunkach pół-fizjologicznych w przepływie krwi.

Biorąc pod uwagę wielokierunkowe działanie metforminy, w tym także korzystny wpływ na płytki krwi i hemostazę naczyniową, postanowiliśmy ocenić wpływ pochodnych metforminy na żywotność i integralność ludzkich komórek śródbłonna żyły pępowinowej (HUVEC), które mogą również dostarczyć informacji na temat potencjalnej toksyczności badanych związków. Do przeprowadzenia tych badań zastosowałam system RTCA-DP (Real-Time Cell Analyzer), który umożliwia ocenę dynamicznych zmian zachodzących we właściwościach barierowych monowarstwy komórek śródbłonna naczyniowego pod wpływem biguanidów. System RTCA-DP bazuje na procesie elektronicznej detekcji i analizie procesów biologicznych (pomiar impedancji elektronicznej), co umożliwia ocenę stanu wzrostu komórki w czasie rzeczywistym. Obecność komórek bądź zmiany ich właściwości wpływają na przepływ elektronów i jonów na powierzchni sensora. W przypadku zmian statusu biologicznego komórek aparat RTCA-DP automatycznie odbiera odpowiednie zmiany w elektronicznych właściwościach czujników w pobliżu komórek. Te sygnały elektryczne są następnie przeliczane na sygnały cyfrowe do dalszego analizowania. Zastosowany system pozwala obserwować natychmiastową i późną odpowiedź na działanie stymulatora, czyli badanego związku. Główne parametry stanu komórek, w tym żywotność, adhezja oraz morfologia, wyrażane są za pomocą indeksu komórkowego (CI), który służy do pomiaru względnych zmian impedancji elektrycznej [112]. Wyniki eksperymentów przedstawiono za pomocą "znormalizowanego indeksu komórkowego" (nCI), który oblicza się przez podzielenie wartości CI w pewnym punkcie czasowym przez wartość CI w referencyjnym punkcie czasowym.

Po stymulacji komórek śródbłonna naczyniowego (HUVEC) metforminą w badanym zakresie stężeń, znormalizowany indeks komórkowy (nCI) wzrósł nieznacznie o około 7% w porównaniu z komórkami nie stymulowanymi lekiem (kontrola). Badania mikroskopowe potwierdziły również, że metformina nie wpływa na morfologię komórek śródbłonna naczyniowego. Przegląd aktualnej literatury pozwala zauważyć, iż do tej pory nie przeprowadzono badań określających wpływ metforminy na żywotność i integralność komórek śródbłonna za pomocą systemu monitorowania stanu komórek w czasie rzeczywistym. Większość badań przedstawia wyniki testów punktu końcowego (end-point tests). Na przykład Esfahanian i wsp. [113] wykazali, że metformina nie wpływa na integralność komórek HUVEC, a jej działanie antyproliferacyjne nie jest związane z cytotoksycznością. Z kolei w innym badaniu Majithiya i Balaraman [114] udowodnili, że podawanie metforminy szczurom z indukowaną cukrzycą obniża ciśnienie krwi i przywraca funkcję śródbłonna. W innym badaniu Verma i wsp. [115] donoszą, że metformina bezpośrednio zmniejsza skurcz naczyń krwionośnych szczurów w odpowiedzi na działanie amin katecholowych.

Wyniki badań wykazały, że związek 3 z łańcuchem *n*-butylowym, podobnie jak metformina, nie wpływał na integralność i żywotność komórek śródbłónka w żadnym z analizowanych punktów czasowych w całym zakresie stężeń. W przypadku fenforminy stwierdzono, że najwyższe stężenie (1,5 $\mu\text{mol/mL}$) przyczyniło się do znacznego spadku wartości nCI po 3 godzinach od dodania leku. Wyniki te zostały potwierdzone w badaniach mikroskopowych, w których fenformina w stężeniu 1,5 $\mu\text{mol/mL}$ przyczyniła się do zmniejszenia liczby żywych komórek. Pozostałe pochodne z podstawnikami tioalkilowymi (związki 2, 4 i 5) znacząco zmniejszały integralność komórek śródbłónka tylko w najwyższym badanym stężeniu (1,5 $\mu\text{mol/mL}$). W związku z tym można wnioskować, że dłuższy łańcuch alkilowy w pochodnych tioalkilowych oraz bardziej lipofilowe właściwości badanych związków przyczyniły się do niekorzystnego wpływu na żywotność i integralność komórek. Spośród badanych pochodnych tioalkilowych związek 1 z podstawnikiem cykloheksylowym okazał się najbardziej toksyczny ze wszystkich badanych związków, ponieważ nawet dla najniższego badanego stężenia (0,006 $\mu\text{mol/mL}$) nastąpił znaczący spadek wartości nCI. Badania mikroskopowe komórek HUVEC wykazały zmiany morfologiczne pod wpływem związku 1, objawiające się przerwaniem błony komórkowej, obkurczeniem komórek i lizą błony komórkowej.

W przypadku badanych sulfonamidów w ciągu pierwszych 3 godzin po stymulacji można było zaobserwować bezpośrednią odpowiedź komórek śródbłónka przejawiającą się zmniejszeniem wartości nCI. Jednak po 6 godzinach od momentu dodania związków wartości nCI wzrosły i były porównywalne do prób kontrolnych. Tylko dla najwyższego stężenia sulfonamidów stwierdziliśmy znaczące obniżenie wartości nCI we wszystkich punktach czasowych analizy. Badania morfologiczne wykazały, że związek 6 w stężeniu 1,5 $\mu\text{mol/mL}$ wykazywał niekorzystny wpływ na żywotność i integralność komórek, co skutkowało obkurczeniem i zlepianiem komórek, podczas gdy komórki traktowane sulfonamidami 7 i 8 nie wykazywały zmian morfologicznych poza najwyższymi stężeniami, dla którego zaobserwowano więcej wydłużonych komórek w porównaniu z próbami kontrolnymi.

W celu dalszego scharakteryzowania sposobu działania biguanidów wykonano badania mające na celu sprawdzenie czy związki przyczyniają się do apoptozy komórek śródbłónka naczyniowego. Apoptoza, zwana również programowaną śmiercią komórki jest procesem niezwykle ważnym dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. Proces apoptozy jest kluczowy w utrzymywaniu homeostazy organizmu - pomiędzy ilością komórek wytwarzanych, a tymi, które muszą ulec zniszczeniu (komórki uszkodzone lub zmutowane). Komórki ulegające apoptozie przechodzą szereg przemian, zarówno na poziomie morfologicznym (m.in. utrata objętości komórek) jak i biochemicznym. Alternatywnym sposobem śmierci komórek jest nekroza, która jest patologicznym procesem, zwykle występującym w odpowiedzi na czynniki toksyczne, takie jak stan zapalny, niedokrwienie czy substancje chemiczne.

Wpływ pochodnych biguanidu na indukcję apoptozy prowadzono po 24-godzinnej inkubacji komórek śródbłónka z badanymi związkami. Badania przeprowadzono przy użyciu cytometrii przepływowej, po wybarwieniu komórek aneksyną V (AV) i jodkiem propidyny (PI). Stymulacja

HUVEC za pomocą metforminy w stężeniu 0,3 $\mu\text{mol/mL}$ przyczyniła się do statystycznie wyższego odsetka żywotnych komórek (AV-PI-), jak również do zmniejszenia liczby komórek we wczesnej i późnej apoptozie. Wyniki te są zgodne z wynikami uzyskanymi przy użyciu systemu RTCA-DP, w którym odnotowano niewielki wzrost wartości nCI dla komórek stymulowanych za pomocą metforminy. Hamowanie apoptozy przez metforminę w linii komórkowej HUVEC opisali również inni autorzy [116]. Ponadto, metformina w stężeniu 100 $\mu\text{mol/L}$ zapobiegała apoptozie wywołanej hiperglikemią w komórkach śródbłonna naczyniowego [117]. To korzystne działanie metforminy na komórki śródbłonna może stanowić wyjaśnienie jej ochronnego wpływu przed powikłaniami naczyniowymi występującymi w cukrzycy. W przypadku proleku 3 nie zaobserwowano wpływu na żywotność komórek, ponieważ odsetek AV-PI- nie różnił się od wartości w próbach kontrolnych. Ponadto związek ten nie wpływał na apoptozę i nekrozę komórek HUVEC, ponieważ odsetki zarówno AV + PI -, jak i AV + PI +, odpowiadające apoptozie oraz AV - PI +, świadczące o nekrozie były porównywalne z niestymulowanymi komórkami HUVEC. Przeciwnie, związek 2 z łańcuchem *n*-oktylowym w stężeniu 1,0 $\mu\text{mol/mL}$ przyczynił się do zmniejszenia odsetka komórek oznaczonych w obrębie bramek A i B, dając dowód na niekorzystny wpływ na żywotność komórek. Ponadto odsetek komórek nekrotycznych (AV - PI +) wzrósł około 10-krotnie ($12,6 \pm 3,8\%$ w porównaniu do kontroli $1,4 \pm 0,3\%$). Większość pozostałych badanych związków, oprócz sulfonamidu 8, nie wykazała istotnego wpływu na procent żywych, apoptotycznych i nekrotycznych komórek, co sugeruje ich biogodność w stosunku do komórek śródbłonna.

W kolejnej części badań oceniłam wpływ biguanidów na poziom wewnątrzkomórkowego czynnika tkankowego (TF) w komórkach HUVEC. Oznaczenie ilości TF w komórkach śródbłonna naczyniowego po 6-godzinnej stymulacji pochodnymi biguanidu przeprowadziłam metodą ELISA. Stężenia badanych związków dobrałam na podstawie wcześniej przeprowadzonych badań, tak aby nie wpływały one negatywnie na żywotność i morfologię komórek śródbłonna naczyniowego. TF jest kluczowym czynnikiem inicjującym krzepnięcie krwi, a zewnątrzkomórkowa domena TF służy jako receptor dla osoczowych czynników krzepnięcia VII i VIIa [118]. Kaskada krzepnięcia krwi w szlaku zewnątrzpo pochodnym rozpoczyna się z chwilą zetknięcia komórkowego TF z krążącym osoczowym czynnikiem VII, który przekształcony do postaci aktywnej VIIa tworzy z TF kompleks TF/VIIa aktywujący czynniki krzepnięcia IX i X. Komórki śródbłonna w warunkach fizjologicznych nie wykazują lub wykazują śladową ekspresję TF. Nie dochodzi zatem do kontaktu komórkowego TF z krążącą krwią i do aktywacji procesu krzepnięcia. Wytwarzanie TF w komórkach śródbłonna naczyń jest indukowane przez liczne cytokiny ($\text{TNF}\alpha$, ligand CD-40), biogenne aminy (serotoninę, histaminę), inne mediatory (np. trombinę, utlenione LDL lub VEGF) lub ksenobiotyki [119]. W przeprowadzonych badaniach zaobserwowałam, że metformina i związki 3 i 4, które wywierały korzystny wpływ na żywotność i integralność komórek HUVEC, przyczyniły się do zwiększenia produkcji TF w komórkach. Fenformina, związek 5 oraz sulfonamidy 7 i 8 nie wpływały na poziom wewnątrzkomórkowego TF. Związek 1, z powodu swojego niekorzystnego wpływu na HUVEC badany był tylko w stężeniu 0,006 $\mu\text{mol/mL}$, w którym nie wpłynął istotnie na stężenie TF. Podobnie stwierdzono, że związek 6 w zakresie stężeń 0,006 - 0,06 $\mu\text{mol/mL}$ nie zmieniał

wewnątrzkomórkowego poziomu TF. Na podstawie uzyskanych wyników nie możemy jednoznacznie stwierdzić czy zwiększone wewnątrzkomórkowe wytwarzanie TF jest również związane z jego zwiększonym uwalnianiem przez komórki. Stąd też, aby wyjaśnić wpływ biguanidów na poziom TF, należy przeprowadzić dalsze badania oceniające ilość uwolnionego TF. Podjęłam próbę przeprowadzenia takiego oznaczenia w supernatantach komórek śródbłonna jednak poziom TF okazał się być na granicy wykrywalności użytego testu ELISA. Ze względu na fakt, iż w przebiegu cukrzycy często występuje nadkrzepliwość i zwiększona aktywność TF w osoczu, zdecydowaliśmy się przeprowadzić dodatkowe badania z użyciem ludzkiego osocza. Żaden z badanych związków oprócz sulfonamidów 7 i 8 w najwyższym badanym stężeniu, nie wpłynął na poziom TF w osoczu krwi, dlatego przypuszczamy, że badane biguanidy nie oddziałują bezpośrednio z tą glikoproteiną.

Aby szerzej scharakteryzować, w jaki sposób pochodne biguanidu wpływają na funkcje komórek śródbłonna naczyniowego i uczestniczą w hemostazie naczyniowej, przeprowadziłam eksperymenty dotyczące uwalniania czynnika von Willebranda (vWF). Badania uwalniania vWF z komórek HUVEC wykonałam przy użyciu testu ELISA. Stwierdziłam, że metformina i fenformina w całym zakresie stężeń zmniejszyły uwalnianie vWF z nieuszkodzonych komórek HUVEC (stężenia badanych związków zostały dobrane tak, aby podobnie jak w przypadku badania TF, nie wpływały negatywnie na żywotność komórek), jednak różnice nie miały znaczenia statystycznego. Wyniki te są zgodne z badaniem przeprowadzonym przez Jager i wsp. [120], którzy odkryli, że podawanie metforminy u pacjentów cierpiących na zespół metaboliczny wiąże się ze zmniejszeniem poziomu vWF. Autorzy zakładają, że poprawa markerów funkcji śródbłonna (na przykład vWF) przyczyniła się do zmniejszenia ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego u pacjentów z cukrzycą typu II. Co ciekawe, w naszych badaniach związek 8 znacząco zmniejszył ilość uwalnianego vWF o około 20% w porównaniu do kontroli ($61,87 \pm 3,58$ pg/mL przy stężeniu $1,0 \mu\text{mol/mL}$ w porównaniu z $83,57 \pm 9,12$ pg/mL dla kontroli). Spośród badanych pochodnych związki 4, 6 i 7 nie wpływały na stężenie uwolnionego vWF, podczas gdy związki 3 i 5 przyczyniły się do jego znacznego wzrostu przy najwyższym badanym stężeniu.

Oprócz ilościowej oceny uwalniania vWF z komórek śródbłonna naczyniowego określiliśmy również uwalnianie tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA), który przekształca nieaktywny plazminogen w aktywną proteazę plazminę. Metformina w całym zakresie stężeń przyczyniła się do zwiększenia uwalniania t-PA z komórek śródbłonna, podczas gdy fenformina nie wpływa znacząco na stężenie uwolnionego t-PA w supernatantach komórkowych. Zgodnie z wynikami wcześniejszych badań, metformina nie wpływa *in vitro* na aktywność plazminy, w związku z tym ostatni etap enzymatycznego cięcia fibryny nie ulega zaburzeniu. Przypuszczamy, że zwiększone uwalnianie t-PA można uznać za korzystne, ponieważ jego główną rolą jest aktywacja plazminy, a wyższe stężenia t-PA (w zakresie $170\text{--}1400$ ng/mL) zwiększają początkową prędkość fibrynolizy ($\uparrow$ Lvo), a zatem przyspieszają całkowitą lizę skrzepu. Jednak według Goya i wsp. [121] podwyższony poziom antygenu lub obniżona aktywność t-PA stanowi marker dysfunkcji śródbłonna naczyniowego i wiąże się z trzykrotnie

zwiększonym ryzykiem rozwoju cukrzycy. Prawdopodobnie zwiększony poziom t-PA u pacjentów chorych na cukrzycę wynika z oporności na fibrynolizę i kompensacji poprzez dodatkową syntezę t-PA, stąd też nie można jednoznacznie uznać, że zwiększenie uwalniania t-PA przez komórki HUVEC w wyniku stymulacji metforminą jest niekorzystne. Przegląd aktualnej literatury nie daje jednoznacznej odpowiedzi dotyczącej wpływu metforminy na poziom t-PA zarówno u pacjentów z cukrzycą, jak i osób zdrowych, ponieważ wyniki badań wskazują na zróżnicowane efekty [120, 122]. Pozostałe pochodne biguanidu w niższych stężeniach nie zmieniały ilości uwalnianego t-PA, podczas gdy w wyższych stężeniach znacznie zmniejszały stężenie t-PA w supernatantach komórek śródbłónka.

W kolejnym etapie badań określiłam wpływ pochodnych biguanidu na ekspresję cząsteczek ICAM-1 na powierzchni komórek śródbłónka naczyniowego (HUVEC). Badania przeprowadziłam techniką cytometrii przepływowej przy użyciu przeciwciała anty-CD54. Metformina w obu badanych stężeniach nie wpłynęła istotnie na ekspresję ICAM-1 na powierzchni HUVEC w porównaniu do niestymulowanych komórek. Ponieważ ICAM-1 ułatwia infiltrację granulocytów obojętnochłonnych i odgrywa kluczową rolę w odpowiedzi zapalnej i immunologicznej [123], ważne byłoby, aby związki nie zwiększały jego ekspresji. Jednakże, zgodnie z uzyskanymi wynikami, wszystkie badane związki oprócz sulfonamidu 7 (0,3 i 1,0 $\mu\text{mol/mL}$) i 8 (0,3 $\mu\text{mol/mL}$) istotnie zwiększyły ekspresję ICAM-1 na powierzchni komórek śródbłónka.

Następna część badań obejmowała pionierskie pomiary wpływu metforminy i jej pochodnych na hemostazę płytkową i osocзовą w warunkach przepływu krwi za pomocą urządzenia T-TAS, nowatorskiego systemu wykorzystującego mikroczipy w układzie komór przepływowych. Celem pierwszego etapu była ocena aktywności płytek krwi oraz procesu formowania czopu płytkowego w warunkach przepływu krwi przy użyciu PL-chipów (pokrytych kolagenem). Metformina w obu badanych stężeniach nie wpływała na początkowy etap tworzenia czopu płytkowego (parametr T_{10} bez zmian), ale przy stężeniu 0,3 $\mu\text{mol/mL}$ powodowała istotne wydłużenie czasu okluzji (OT) (1,21-krotnie) i czasu krzepnięcia (CT) (1,37-krotnie) w porównaniu do prób kontrolnych. Metformina przyczyniła się do zmniejszenia pola pod krzywą (AUC_{10}), jednak zmiany nie były istotne statystycznie. Zakładamy, że właściwości te mogą wynikać z działania leku na aktywację i agregację płytek krwi, ponieważ wcześniej opisywano już antyagregacyjne właściwości metforminy [124]. Ponadto, w literaturze znajdują się także doniesienia, że metformina zmniejsza maksymalną agregację płytek indukowaną przez difosforan adenozyiny (ADP) w warunkach *in vitro* [125]. W przeciwieństwie do metforminy, fenformina nie miała wpływu na proces powstawania czopu płytkowego. Przeprowadzone przez nas badania wskazują, że większość biguanidów posiada właściwości przeciwwzkrzepowe, które zostały wykazane przez statystycznie istotny wpływ na parametry T_{10} , OT i CT, a także zmniejszone AUC_{10} .

Druga część badań obejmowała wykorzystanie czipów AR (opłaszczonych kolagenem i tromboplastyną), które pozwalają zbadać proces krzepnięcia krwi z udziałem zarówno płytek krwi jak i osocзовych czynników krzepnięcia. Badania te wykazały, że metformina nie wpływa

znacząco na proces powstawania skrzepu, ponieważ oceniane parametry T_{10} , OT_{80} , T_{10-80} oraz AUC_{30} nie uległy zmianie. Wyniki te są zgodne z tymi opisanymi w publikacjach [H4] i [H6], w których wykazaliśmy, że metformina nie zmienia ogólnego potencjału tworzenia skrzepu i fibrynolizy (CL_{AUC} stałe) oraz parametrów kinetycznych tych procesów, a także nie wpływa na zewnętrzny, jak i wewnętrzny szlak krzepnięcia (PT, APTT). Właściwości antykoagulacyjne zaobserwowano w przypadku innych testowanych biguanidów. Na przykład stwierdzono, że sulfonamid 8 z podstawnikiem *o*-nitrobenzenowym statystycznie wydłuża czas T_{10} , OT_{80} , T_{10-80} i zmniejsza AUC_{30} . Wyniki te można wytłumaczyć zmniejszeniem całkowitego potencjału tworzenia skrzepu i fibrynolizy ($\downarrow CL_{AUC}$), zmniejszeniem maksimum krzepnięcia ($\downarrow F_{max}$) i początkowej prędkości tworzenia skrzepu ($\downarrow F_{vo}$) w CL-teście, a także wydłużonymi parametrami PT i APTT [H5]. Ponadto inne mechanizmy, w tym obniżona aktywność czynnika krzepnięcia X, wraz ze zmniejszoną amidolityczną aktywnością trombiny [H6], mogą odpowiadać za przeciwzakrzepowe właściwości wykazane w badaniach przy użyciu systemu T-TAS.

Podsumowując, celem tej części badań było określenie wpływu pochodnych metforminy na wybrane markery funkcji śródbłonka naczyniowego oraz hemostazę w warunkach pół-fizjologicznych. Stwierdziłam, że metformina w niewielkim stopniu przyczyniła się do wzrostu żywotności i integralności komórek śródbłonka, co zostało dodatkowo potwierdzone w teście apoptozy. Te korzystne właściwości mogące zmniejszać skutki wpływu wysokiego stężenia glukozy w stosunku do komórek śródbłonka naczyniowego mogą przyczynić się do bardziej skutecznej terapii cukrzycy typu II. Wykazano także, że metformina przedłuża proces tworzenia czopu płytkowego, jednak lek nie wywierał wpływu na proces tworzenia skrzepu po aktywacji płytek krwi i osoczowych czynników krzepnięcia przy użyciu systemu T-TAS, co potwierdza nasze poprzednie wyniki (niezmienione APTT, PT i aktywność czynnika X).

Wykazałam również, że długość łańcucha alkilowego w pochodnych tioalkilowych określa ich właściwości względem komórek śródbłonka naczyniowego. Pochodna 3 z *n*-butylowym łańcuchem alkilowym, podobnie jak metformina, nie przyczyniła się do zmian żywotności i integralności komórek śródbłonka. Dodatkowo, związek 3 charakteryzuje się właściwościami przeciwzakrzepowymi, które przejawiały się przedłużonym tworzeniem czopu płytkowego oraz formowaniem skrzepu płytkowego bogatego w fibrynę. Uzyskane wyniki wskazują, że również sulfonamidy 7 i 8 wykazują właściwości przeciwzakrzepowe objawiające się zmniejszoną ilością uwalnianego vWF z komórek śródbłonka i przedłużonymi parametrami powstawania skrzepu w warunkach przepływu krwi. Wyniki te wydają się bardzo obiecujące z uwagi na to, że metformina w równoległych badaniach nie wykazywała istotnego wpływu na te parametry. Jednakże bezpośrednia ekstrapolacja naszych wyników do warunków *in vivo* powinna być prowadzona rozważnie.

4. 3. 5. Etap E. Ocena potencjału hamowania ludzkich ChE i ustalenie potencjalnego synergizmu pomiędzy pochodnymi biguanidu i donepezilem w kierunku hamowania ChE

Dostępne wyniki badań sugerują, że metformina może odegrać ważną rolę w leczeniu choroby Alzheimera, jednak ilość danych dotyczących wpływu metforminy na ośrodkowy układ nerwowy i jej potencjalna rola w leczeniu tej choroby jest ograniczona i składa się głównie z badań *in vitro* oraz kilku badań *in vivo*. Dlatego celem kolejnej części moich badań było przeprowadzenie pogłębionych i usystematyzowanych badań i ocena *in vitro* wpływu metforminy, fenforminy i ośmiu pochodnych tioalkilowych i sulfonamidowych na aktywność ludzkiej acetylo- i butyrylocholinoesterazy (AChE i BuChE) oraz ustalenie typu inhibicji. Badania przeprowadzono w celu ustalenia zależności między budową a aktywnością antycholinergiczną, co umożliwi racjonalne projektowanie potencjalnych inhibitorów cholinoesterazy (ChE) o strukturze biguanidu.

Badania przeprowadziłam z użyciem ludzkich enzymów: erytrocytarnej AChE oraz osoczowej BuChE. Aktywność AChE i BuChE oceniłam spektrofotometrycznie stosując metodę Ellmana [126] z pewnymi modyfikacjami [127]. Uzyskane wyniki wskazują, że metformina hamuje 50% aktywności AChE w stężeniu $2,35 \pm 0,122 \mu\text{mol/mL}$ i wydaje się być selektywna wobec AChE, ponieważ wykazuje bardzo słabą aktywność anty-BuChE. Z kolei fenformina okazała się być najmniej aktywna względem AChE spośród badanych związków ($IC_{50} = 4,94 \pm 0,575 \mu\text{mol/mL}$). Spośród badanych pochodnych tioalkilowych związków 1 wykazywał najwyższą aktywność wobec ludzkiej AChE ($IC_{50} = 0,89 \pm 0,157 \mu\text{mol/mL}$), jak i BuChE ($IC_{50} = 28 \text{ nmol/mL}$), wykazując tym samym właściwości, które sprzyjają hamowaniu BuChE. Należy jednak podkreślić, że aktywność ta jest znacznie niższa niż aktywność takryny, wzorcowego inhibitora ($2,77 \cdot 10^{-4} \pm 1,11 \cdot 10^{-4} \mu\text{mol/mL}$). Spośród analizowanych związków z łańcuchem alkilowym, pochodna nr 3 z łańcuchem *n*-butylowym była bardziej aktywna w stosunku do AChE ($IC_{50} = 1.190 \pm 0.157 \mu\text{mol/mL}$), związki z podstawnikami *n*-heksylowym i 2-etyloheksylowym hamowały AChE w stężeniu ok. $3,00 \mu\text{mol/mL}$, podczas gdy związek z łańcuchem *n*-oktylowym wykazywał bardzo niską aktywność przeciw AChE (do 20% przy stężeniu $3,0 \mu\text{mol/mL}$). W przypadku pochodnych sulfonamidowych dla związku 6 stwierdzono najwyższą aktywność ($IC_{50} = 0,212 \pm 0,048 \mu\text{mol/mL}$); jednak aktywność ta była znacznie niższa niż aktywność donepezilu ($0,025 \pm 0,004 \mu\text{mol/L}$). Należy w tym miejscu zaznaczyć, że porównując wartości IC_{50} badanych biguanidów z klinicznie stosowanym donepezilem, oczywiste jest, że badane związki wykazują znacznie niższą aktywność wobec obu cholinoesteraz. Warto jednak podkreślić, że uzyskany efekt hamowania aktywności ChE uzyskano dla wartości stężeń biguanidów mieszczących się w potencjalnym zakresie terapeutycznym. W przypadku aktywności BuChE, wśród pochodnych tioalkilowych związków z łańcuchem *n*-oktylowym (związek 2) wykazywał najsilniejszą aktywność anty-BuChE ($IC_{50} = 184,0 \pm 14,0 \text{ nmol/mL}$), ale jednocześnie charakteryzował się bardzo słabą aktywnością przeciw AChE ($IC_{50} > 1000,0 \mu\text{mol/mL}$). Dlatego związek ten można uznać za selektywny względem BuChE i wnioskować, że długi bądź rozgałęziony łańcuch alkilowy zwiększa aktywność anty-BuChE i prowadzi do otrzymania związków selektywnych względem tego enzymu. Wśród badanych

sulfonamidów najbardziej aktywną pochodną w stosunku do BuChE był związek z grupą nitrową w pozycji *para* w pierścieniu aromatycznym. Jednak właściwości inhibicyjne wszystkich trzech sulfonamidów mieściły się w porównywalnym zakresie.

Kolejna część badań obejmowała określenie typu inhibicji badanych związków w stosunku do obu cholinesteraz. Eksperymenty przeprowadziłam przy użyciu różnych stężeń substratów (jodek acetylotiocholiny lub jodek butyrylotiocholiny). Obliczenia prędkości maksymalnej (V_{max}) i stałej Michaelisa-Menten (K_m) przeprowadziłam za pomocą regresji liniowej (według równania Hanesa-Woolfa).

W przypadku hamowania aktywności AChE zarówno metformina, jak i fenformina wykazywały mieszany typ inhibicji, na co wskazuje zmniejszenie szybkości maksymalnej reakcji ($V_{max(i)}$) oraz wzrost stałej $K_{m(i)}$ po inkubacji enzymu z badanymi związkami. Fenformina była również jedynym związkiem, który kompetycyjnie hamował aktywność BuChE, co oznacza, że konkuruje z substratem podczas łączenia z centrum katalitycznym enzymu (CAS). Biorąc pod uwagę fakt, że pochodne 1, 3 i 5 hamowały aktywność AChE w sposób niekompetycyjny, możemy wnioskować, że cząsteczki te są zdolne do wiązania z peryferyjnym miejscem anionowym (PAS) enzymu. Dlatego jest prawdopodobne, że pochodne tioalkilowe mogą wiązać się z PAS, który zmienia trójwymiarową strukturę enzymu, tak że CAS może nadal wiązać się z substratami ze zwykłym powinowactwem; jednakże nie jest to już optymalna forma do stabilizacji stanu przejściowego i katalizowania reakcji. Zdolność do wiązania z PAS wynika najprawdopodobniej z tych samych właściwości strukturalnych (długi łańcuch boczny), które powodują selektywność tych związków w kierunku BuChE (metformina hamuje AChE w sposób mieszany i nie wykazuje aktywności względem BuChE). Rozgałęziony łańcuch alkilowy w cząsteczce związku 4 i wszystkie sulfonamidy 6-8 hamowały aktywność AChE w sposób mieszany, co wskazuje, że podstawnik aromatyczny lub większa struktura umożliwiają po pochodnym biguanidu również wiązać się z CAS.

Kolejnym etapem badań było ustalenie potencjalnego synergizmu wybranych biguanidów z donepezilem, najczęściej stosowanym inhibitorem AChE w terapii AD, względem obu cholinesteraz. Największy wpływ na aktywność AChE stwierdziłam w przypadku połączenia donepezilu w stężeniach 0,01-100 nmol/L ze związkiem 6, stosowanym w stałym stężeniu 150,0 μ mol/L. Wartość IC_{50} mieszaniny donepezil/związek 6 była około 170-krotnie mniejsza niż IC_{50} dla samego donepezilu. Wyniki te zostały następnie przeanalizowane przy użyciu metody Chou-Talalay, która wykazała, że siła działania tego połączenia na aktywność AChE wzrosła w porównaniu z każdym pojedynczym związkiem osobno. Przy użyciu programu komputerowego wyznaczyłam tzw. indeks kombinacji (CI) oraz wartości indeksu redukującego dawkę (DRI). Przeprowadzona analiza wykazała, że dawka donepezilu - selektywnego inhibitora AChE, może zostać 2,69-krotnie zmniejszona, gdy jest stosowana w połączeniu ze związkiem 6. Podsumowując, połączenie donepezilu i metforminy lub związku 6 potęguje efekt anty-AChE, który był większy niż ten, który generuje każdy ze związków osobno. Obserwowany efekt synergistyczny, mogący skutkować wyższym poziomem ACh w mózgu, może stanowić dodatkowe uzasadnienie klinicznej korzyści dla pacjenta chorującego

jednocześnie na cukrzycę i chorobę Alzheimera. Należy jednak podkreślić, że pomimo pożądaných interakcji między donepezilem a metforminą, potrzebne są dalsze badania w celu lepszego poznania korzyści klinicznych płynących z tego połączenia w objawowym leczeniu AD.

Ze względu na zachęcające wyniki badań biguanidów dotyczące ich wpływu na aktywność esteraż oraz potencjalne znaczenie w terapii AD, w dalszej części pracy oszacowałam potencjał najaktywniejszych związków w kierunku hamowania agregacji β -amyloidu. Badania te wykonałam metodą fluorometryczną z wykorzystaniem barwnika tioflawinowego (ThT). Stwierdziłam, że związek 6 w stężeniu 100 i 200 $\mu\text{mol/L}$ wykazuje umiarkowane, ale znaczące właściwości hamujące agregację A β (około 20% zahamowania reakcji fibrylacji). Z kolei wykazałam, że metformina nie wpływa statystycznie na proces agregacji A β w warunkach *in vitro*. Aktualne dane literaturowe przedstawiają niejednoznaczne wyniki dotyczące wpływu metforminy na agregację A β . Na przykład Hettich i wsp. [82] stwierdzili, że metformina znacząco zmniejsza ekspresję i aktywność BACE1 (beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1) w modelach hodowli komórkowych, tym samym zmniejszając produkcję A β , podczas gdy Chen i wsp. [128] wskazuje, że długotrwałe leczenie metforminą może wiązać się z większym ryzykiem rozwoju AD. Biorąc pod uwagę te wyniki, wywnioskowałam, że umiarkowane właściwości anty-agregacyjne związku 6 są korzystne, zwłaszcza biorąc pod uwagę fakt, że w tym samym zakresie stężenia związek przyczynił się do 50% hamowania AChE.

Podsumowując, powyższy etap badań był poświęcony określeniu wplywu metforminy i jej pochodnych tioalkilowych i sulfonamidowych na aktywność ludzkich cholinesteraz oraz ustaleniu potencjalnego synergizmu między wybranymi biguanidami a donepezilem. Badania wykazały, że metformina umiarkowanie hamuje aktywność AChE (mieszany typ inhibicji), natomiast BuChE hamuje w niewielkim stopniu. Metformina wykazuje synergizm z donepezilem, co w przyszłości może okazać się istotne w zapobieganiu zaburzeniom ośrodkowego układu nerwowego związanych z cukrzycą oraz może stanowić dodatkowe uzasadnienie dla korzyści klinicznej u pacjentów z AD ze współistniejącą cukrzycą.

Na podstawie przeprowadzonych badań można wywnioskować, że wśród pochodnych tioalkilowych długie łańcuchy alkilowe najprawdopodobniej wchodzi w interakcję z PAS w cząsteczce AChE i ukierunkowują związki względem selektywnego hamowania BuChE, podczas gdy związki z krótszymi łańcuchami z większym prawdopodobieństwem niekompetycyjnie hamują aktywność obu enzymów. W przypadku sulfonamidów stwierdzono, że pochodna 6 z podstawnikami $-\text{CF}_3$ i $-\text{NO}_2$ w pierścieniu aromatycznym wykazuje najbardziej obiecującą aktywność wobec AChE; jednak należy podkreślić, że aktywność ta była znacznie niższa niż w przypadku donepezilu. Co ważne, mieszanina związku 6 i donepezilu zwiększała aktywność anty-AChE, która była wielokrotnie większa niż dla obu związków osobno. Ponadto przeprowadzone badania wykazały, że związek 6 w stężeniu 200 $\mu\text{mol/L}$ statystycznie istotnie hamuje agregację A β o około 20% w porównaniu do kontroli.

Reasumując, pochodne biguanidu, chociaż wykazują względnie umiarkowaną aktywność, mogą być uważane za dobry punkt wyjścia do dalszego projektowania zarówno selektywnych, jak i nieselektywnych inhibitorów ChE oraz zachęcają do podjęcia dalszych badań w celu zbadania potencjalnego synergizmu z innymi lekami stosowanymi w terapii AD.

4. 4. Podsumowanie wyników badań stanowiących podstawę osiągnięcia habilitacyjnego

Metformina jest skutecznym doustnym lekiem przeciwcukrzycowym stosowanym w leczeniu cukrzycy typu II. Mechanizm działania hipoglikemizującego metforminy polega m. in. na zmniejszaniu wytwarzania glukozy w wątrobie w wyniku hamowania glukoneogenezy i glikogenolizy, zwiększaniu wrażliwości tkanek na insulinę (zwiększa obwodowy wychwyt i tkankowe zużycie glukozy) oraz hamowaniu wchłaniania glukozy i innych heksoz w przewodzie pokarmowym. Ponadto, metformina stymuluje wewnątrzkomórkową syntezę glikogenu w wyniku działania na syntazę glikogenu. Zwiększa zdolność do transportu przez błonę wszystkich typów transporterów glukozy (GLUTs).

Ostatnie wyniki badań wskazują, że potencjalne spektrum korzystnych efektów metforminy rozszerzyło się na leczenie zespołu polycystycznych jajników oraz zespołu metabolicznego. Wiele dowodów naukowych wskazuje również, że oprócz udowodnionych właściwości przeciwcukrzycowych, metformina wywiera korzystny wpływ na masę ciała, profil lipidowy i ryzyko sercowo-naczyniowe związane z cukrzycą typu II.

Pomimo wszystkich wyżej wymienionych korzystnych właściwości, ze względu na właściwości fizykochemiczne, stosowanie metforminy wiąże się z kilkoma problemami, m.in. wolnym i niecałkowitym wchłanianiem, co skutkuje stosunkowo niską biodostępnością oraz znacznymi różnicami w odpowiedzi klinicznej na lek. W związku z powyższym zsyntetyzowanych zostało kilka analogów i proleków metforminy, o korzystniejszych właściwościach, które następnie w ramach niniejszej pracy zbadałam, razem z lekiem macierzystym, metforminą.

Głównym celem badań było określenie powinowactwa pochodnych biguanidów do transporterów kationów organicznych, a także określenie ich roli w wychwycie komórkowym, a następnie ustalenie efektów biologicznych w komórkach nowotworowych raka piersi. Ponadto, oceniłam wpływ metforminy i jej pochodnych tioalkilowych i sulfonamidowych na wybrane parametry hemostazy osoczowej, płytkowej i naczyniowej oraz aktywność ludzkich cholinioesteraz, w modelu *in vitro*.

Na podstawie przeprowadzonych badań można wywnioskować, że w odniesieniu do części ocenianych parametrów hemostazy, niektóre z badanych pochodnych wywierają korzystniejsze działanie niż metformina.

Podsumowując,

- 1) Chemiczna modyfikacja metforminy prowadząca do pochodnych tioalkilowych różniących się długością łańcucha alkilowego lub obecnością nasyconego pierścienia heksylowego zwiększa powinowactwo do transporterów OCT oraz zwiększa wychwyt komórkowy w liniach raka piersi MCF-7 i MDA-MB-231. Dodatkowo, wprowadzenie dłuższego łańcucha alkilowego do szkieletu biguanidu powoduje wyższą selektywność związku względem OCT1 w porównaniu z innymi transporterami oraz większą efektywność transportu.
- 2) Większy wychwyt komórkowy pochodnych biguanidu koreluje z aktywnością biologiczną testowanych związków, w tym efektem antyproliferacyjnym.
- 3) Opracowana strategia modyfikacji struktury metforminy w pochodne tioalkilowe przyczyniła się do zwiększonego wychwytu komórkowego i właściwości antyproliferacyjnych macierzystego leku.
- 4) Stwierdziłam, że metformina nie wpływa w statystycznie istotny sposób na większość mierzonych parametrów hemostazy osoczowej, jednak po raz pierwszy wykazaliśmy, że metformina może zwiększać aktywność antytrombiny III.
- 5) Wszystkie pochodne metforminy mogą być uważane za biozgodne względem hemostazy osoczowej, ponieważ nie przyczyniają się do zwiększenia ogólnego potencjału tworzenia skrzepu i fibrynolizy. Ponadto, sulfonamidowe pochodne *p*- i *o*-nitrobenzenowe (7, 8) pochodne oraz pochodna tioalkilowa z podstawnikiem *n*-heksylowym (5) znacząco zmniejszały ogólny potencjał tworzenia skrzepu i fibrynolizy, co sugeruje, że mogą one korzystnie wpływać na hemostazę osoczną.
- 6) Wśród badanych związków najbardziej korzystne właściwości względem parametrów hemostazy osoczowej wykazywała pochodna *o*-nitrobenzenosulfonamidowa (8), która wydłużała czas generacji endogennej trombiny (TGT) oraz podstawowe parametry krzepnięcia (APTT i PT). Pogłębione badania wykazały również, że związek 8 zmniejsza aktywność czynnika krzepnięcia X oraz aktywność trombiny.
- 7) Większość badanych pochodnych nie wywierała istotnego wpływu na integralność błony erytrocytarnej, jednak zaobserwowałam, że *p*-nitrobenzenosulfonamid w stężeniu 1,5 $\mu\text{mol/mL}$ przyczynił się do hemolizy około 35 % erytrocytów.
- 8) Wykorzystując model komórkowy *in vitro*, stwierdziłam, że metformina zwiększa, jednak nieistotnie statystycznie, żywotność i integralność ludzkich komórek śródbłonna naczyniowego.
- 9) W warunkach przepływu krwi metformina przedłuża proces tworzenia czopu płytkowego, jednak lek nie wpływa na proces tworzenia skrzepu po aktywacji płytek krwi i osoczowych czynników krzepnięcia.
- 10) Długość łańcucha alkilowego w pochodnych tioalkilowych determinuje ich właściwości w stosunku do komórek śródbłonna naczyniowego, ponieważ zaobserwowałam, że przyłączenie dłuższego podstawnika alkilowego prowadzi do znaczącego spadku żywotności i integralności ludzkich komórek śródbłonna przy stężeniu związków 1,5 $\mu\text{mol/mL}$.

11) Pochodna tioalkilowa z łańcuchem *n*-butylowym (3), podobnie jak metformina, nie przyczyniła się do zmian w żywotności i integralności komórek śródbłonna, ponadto charakteryzowała się właściwościami przeciwzakrzepowymi (t.j. przedłużonym czasem tworzenia czopu płytkowego oraz formowania skrzepu płytkowego bogatego w fibrynę).

12) Właściwości antykoagulacyjne sulfonamidów 7 i 8 zostały również potwierdzone przez zmniejszenie ilości uwalniania vWF i wydłużonymi parametrami powstawania skrzepu w warunkach przepływu krwi.

13) Wykazałam, że metformina umiarkowanie hamuje aktywność AChE (mieszany typ inhibicji) i ma bardzo słabą aktywność przeciwko BuChE. Metformina wykazuje działanie synergistyczne z donepezilem, co może stanowić dodatkowe uzasadnienie korzyści klinicznej dla pacjenta równocześnie chorującego na chorobę Alzheimera i cukrzycę typu II.

14) Badania aktywności ChE wśród pochodnych tioalkilowych wykazały, że długie łańcuchy alkilowe najprawdopodobniej wchodzi w interakcję z PAS w AChE i ukierunkowują związki względem selektywnego hamowania BuChE, podczas gdy związki z krótszymi łańcuchami z większym prawdopodobieństwem niekompetycyjnie hamują aktywność obu enzymów, a zatem posiadają właściwości podwójnego wiązania.

15) W grupie sulfonamidów okazało się, że pochodna 6 z podstawnikami $-CF_3$ i $-NO_2$ w pierścieniu aromatycznym wykazuje najbardziej obiecującą aktywność wobec hamowania AChE i wywiera działanie synergistyczne z donepezilem. Ponadto związek ten znacząco hamował agregację A β (o około 20%) w stężeniu odpowiadającym jego wartości IC₅₀.

4. 5. Piśmiennictwo

- [1] <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>, stan z dnia 2018.11.15
- [2] WHO Report, Global Report on Diabetes. 2016. ISBN 978 92 4 156525 7.
- [3] <https://reports.instantatlas.com/report/view/704ee0e6475b4af885051bcec15f0e2c/POL>, stan z dnia 2018.11.15
- [4] Kinalska, I., Telejko, B., 2003. Profilaktyka i leczenie trombofilii cukrzycowej w świetle najnowszych badań. Diabet. Prakt. 4, 153–159.
- [5] Fonseca, V.A., 2003. Management of diabetes mellitus and insulin resistance in patients with cardiovascular disease. Am. Col. Cardiol. 92, 50–60.
- [6] Lipinski, B., Pretorius, E., 2012. Novel pathway of iron-induced blood coagulation: implications for diabetes mellitus and its complications. Pol. Arch. Med. Wewn. 122 (3), 115–122.
- [7] Soma, P., Pretorius, E., 2015. Interplay between ultrastructural findings and atherothrombotic complications in type 2 diabetes mellitus. Cardiovasc. Diabetol. 14, 96.
- [8] Soma, P., Swanepoel, A.C., du Plooy, J., Mqoco, T., Pretorius, E., 2016. Flow cytometric analysis of platelets type 2 diabetes mellitus reveals 'angry' platelets. Cardiovasc. Diabetol. 15, 52.
- [9] Pretorius, E., Bester, J., Vermeulen, N., Alummoottil, S., Soma, P., Buys, A.V., Kell, D.B., 2015. Poorly controlled type 2 diabetes is accompanied by significant morphological and ultrastructural changes in both erythrocytes and in thrombin-generated fibrin: implications for diagnostics. Cardiovasc. Diabetol. 14, 30.
- [10] Karim, F., Shamima Akter, Q., Jahan, S., Khanom, A., Haque, S., Yeasmin, T., Siddika, T., Sinha, S., 2015. Coagulation Impairment in Type 2 Diabetes Mellitus. J. Bangladesh. Soc. Physiol. 10 (1), 26-29.
- [11] Pretorius, E., Lipinski, B., Bester, J., Vermeulen, N., Soma, P., 2013. Albumin stabilizes fibrin fiber ultrastructure in low serum albumin Type 2 diabetes. Ultrastruct. Pathol. 37 (4), 254–257.

- [12] Pretorius, E., Bester, J., 2016. Viscoelasticity as a measurement of clot structure in poorly controlled type 2 diabetes patients: towards a precision and personalized medicine approach. *Oncotarget*. 7 (32), 50895–50917.
- [13] Chen, H., Li, J., Yang, O., Kong, J., Lin, G., 2015. Effect of metformin on insulin-resistant endothelial cell function. *Oncol. Lett.* 9, 1149–1153.
- [14] Tabit, C.E., Chung, W.B., a Vita, J., 2010. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus : Molecular mechanisms and clinical implications. *Rev Endocr. Metab. Disord.* 11, 61–74.
- [15] Sahoo, A.K., Dandapat, J., Dash, U.C., Kanhar, S., 2018. Features and outcomes of drugs for combination therapy as multi-targets strategy to combat Alzheimer's disease. *J. Ethnopharmacol.* 215, 42–73.
- [16] Amatsubo, T., Yanagisawa, D., Morikawa, S., Taguchi, H., Tooyama, I., 2010. Amyloid imaging using high-field magnetic resonance. *Magn. Reson. Med. Sci.* 9, 95–99.
- [17] Hersi, M., Irvine, B., Gupta, P., Gomes, J., Birkett, N., Krewski, D., 2017. Risk factors associated with the onset and progression of Alzheimer's disease: A systematic review of the evidence. *Neurotoxicology*. 61, 143–187.
- [18] Zhang, Y., qu Huang, N., Yan, F., Jin, H., yu Zhou, S., shan Shi, J., Jin, F., 2018. Diabetes mellitus and Alzheimer's disease: GSK-3 β as a potential link. *Behav. Brain Res.* 339, 57–65.
- [19] dela Monte, S., 2014. Type 3 diabetes is sporadic Alzheimer's disease: Mini-review. *Eur. Neuropsychopharm.* 24, 1954–1960.
- [20] Biessels, G.J., Staekenborg, S., Brunner, E., Brayne, C., Scheltens, P., 2006. Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *Lancet Neurol.* 5, 64–74.
- [21] Kopf, D., Frolich, L., 2009. Risk of incident Alzheimer's disease in Diabetic patients: a systematic review of prospective trials. *J Alzheimers dis.* 16, 677–685.
- [22] Peila, R., Rodriguez, B.L., Launer, L.J., 2002. Type 2 diabetes, APOE gene, and the risk for dementia and related pathologies: the Honolulu-Asia aging study. *Diabetes*. 51 (4), 1256–1262.
- [23] Arvanitakis, Z., Wilson, R.S., Bienias, J.L., Evans, D.A., Bennett, D.A., 2004. Diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease and decline in cognitive function. *Arch Neurol.* 61 (5), 661–666.
- [24] Zhang, J., Chen, C., Hua, S., Liao, H., Wang, M., Xiong, Y., et al, 2017. An updated meta-analysis of cohort studies: diabetes and risk of Alzheimer's disease. *Diabetes res Clin Pract.* 124, 41–47.
- [25] Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., et al, 1993. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. 261, 921–923.
- [26] Roses, A.D., 1996. Apolipoprotein E alleles as risk factors in Alzheimer's disease. *Annu rev med.* 47, 387–400.
- [27] Abnera, E.L., Nelson, P.T., Kryscio, R.J., Schmitt, F.A., Fardo, D.W., Woltjer, R.L., et al, 2016. Diabetes is associated with cerebrovascular but not Alzheimer's disease neuropathology. *Alzheimers Dement.* 12, 882–889.
- [28] Beeri, M.S., Silverman, J.M., Davis, K.L., Marin, D., Grossman, H.Z., Schmeidler, J., 2005. Type 2 diabetes is negatively associated with Alzheimer's disease neuropathology. *J Gerontol a Biol Sci med. Sci.* 60, 471–475.
- [29] Sonnen, J.A., Larson, E.B., Brickell, K., Crane, P.K., Woltjer, R., Montine, T.J., 2009. Different patterns of cerebral injury in dementia with or without diabetes. *Arch Neurol.* 66, 315–322.
- [30] Dar, T.A., Sheikh, I.A., Ganie, S.A., Ali, R., Singh, L.R., Gan, S.H., Kamal, M.A., Zargar, M.A., 2014. Molecular linkages between diabetes and Alzheimer's disease: current scenario and future prospects. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 13, 290–298.
- [31] Watson, G.S., Craft, S., 2003. The role of insulin resistance in the pathogenesis of Alzheimer's disease: implications for treatment. *CNS Drugs.* 17, 27–45.
- [32] Hak, A.E., Pols, H.A., Stehouwer, C.D., Meijer, J., Kiliaan, A.J., Hofman, A., Breteler, M.M., Witteman, J.C., 2001. Markers of inflammation and cellular adhesion molecules in relations to insulin resistance in nondiabetic elderly: the Rotterdam study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 4398–4405.
- [33] Zietek, T., Rath, E., 2016. Inflammation meets metabolic disease: gut feeling mediated by GLP-1. *Front. Immunol.* 7, 154.
- [34] Hotamisligil, G.S., 2003. Inflammatory pathways and insulin action. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 27 (3), 53–55.
- [35] Trypka, E., Leszek, J., 2013. Czy choroba Alzhemiera jest cukrzycą III typu?. *Psychoterapia Polska.* 11 (1), 11-16.
- [36] Kandimalla, R., Thirumala, V., Reddy, P.H., 2017. Is Alzheimer's disease a type 3 diabetes? A critical appraisal. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1863, 1078–1089.
- [37] Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę 2018. Stanowisko Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego. *Diabetologia Praktyczna*, 4, 1.

- [38] Bashmakov, Y.K., Petyaev, I.M., 2011. Old drug acquires new target: Metformin and Sirt1. *J Diabetes Metab.* 2, 107.
- [39] Mazzaglia, G., Yurgin, N., Boye, K.S., Trifiro, G., Cottrell, S., Allene, E., Filippi, A., Medea, G., Cricelli, C., 2008. Prevalence and antihyperglycemic prescribing trends for patients with type 2 diabetes in Italy: A 4-year retrospective study from national primary care data. *Pharm Res.* 57, 358–363.
- [40] Baviera, M., Monesi, L., Marzona, I., Avanzini, F., Monesi, G., et al., 2011. Trends in drug prescriptions to diabetic patients from 2000 to 2008 in Italy's Lombardy Region: A large population-based study. *Diabetes Res Clin PR.* 93, 123–130.
- [41] Rizos, C.V., Elisaf, M.S., 2013. Metformin and cancer. *Eur J Pharm.* 705, 96–108.
- [42] Rego, D.F., Pavan, L.M., Elias, S.T., de Luca Canto, G., Guerra, E.N., 2015. Effects of metformin on head and neck cancer: A systematic review. *Oral Onc.* 51, 416–422.
- [43] Giovannucci, E., Harlan, D.M., Archer, M.C., Bergenstal, R.M., Gapstur, S.M., Habel, L.A., 2010. Diabetes and cancer: a consensus report. *Diabetes Care.* 7, 1674–1685.
- [44] Knowler, W.C., Barrett-Connor, E., Fowler, S.E., Hamman, R.F., Lachin, J.M., Walker, E.A., 2002. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med.* 346, 393–403.
- [45] El-Mir, M.Y., Nogueira, V., Fontaine, E., Avéret, N., Rigoulet, M., Leverve, X., 2000. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J Biol Chem.* 275, 223–228.
- [46] Riedmaier, A.E., Fisel, P., Nies, A.T., Schaeffeler, E., Schwab, M., 2013. Metformin and cancer: from the old medicine cabinet to pharmacological pitfalls and prospects. *Trends Pharm Sci.* 34, 126–135.
- [47] Cusi, K., Consoli, A., DeFronzo, R.A., 1996. Metabolic effects of metformin on glucose and lactate metabolism in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81, 4059–4067.
- [48] Oliveras-Ferraro, C., Vazquez-Martin, A., Menendez, J.A., 2009. Genome-wide inhibitory impact of the AMPK activator metformin on [kinesins, tubulins, histones, auroras and polo-like kinases] M-phase cell cycle genes in human breast cancer cells. *Cell Cycle.* 8, 1633–1636.
- [49] Foretz, M., Hebrard, S., Leclerc, J., Zarrinpashneh, E., Soty, M., et al., 2010. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J Clin Invest.* 120, 2355–2369.
- [50] Ikeda, T., Iwata, K., Murakami, H., 2000. Inhibitory effect of metformin on intestinal glucose absorption in the perfused rat intestine. *Biochem Pharmacol.* 59, 887–890.
- [51] Giannarelli, R., Aragona, M., Cappelli, A., 2003. Reducing insulin resistance with metformin: the evidence today. *Diabetes Metab.* 29, 6528–6535.
- [52] Slama, G., 2003. The potential of metformin for diabetes Prevention. *Diabetes Metab.* 29, 104–111.
- [53] Viollet, B., Guigas, B., Garcia, N.S., Leclerc, J., et al., 2012. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci.* 122, 253–270.
- [54] El-Batran, S.A., Abdel-Salam, O.M.E., Nofal, S.M., Baiuomy, A.R., 2006. Effect of rosiglitazone and nateglinide on serum glucose and lipid profile alone or in combination with the biguanide metformin in diabetic rats. *Pharm Res.* 53, 69–74.
- [55] UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group, 1998. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet.* 352, 854–865.
- [56] Johnson, J.A., Simpson, S.H., Toth, E.L., Majumdar, S.R., 2005. Reduced cardiovascular morbidity and mortality associated with metformin use in subjects with Type 2 diabetes. *Diabet Med.* 22, 497–502.
- [57] Johnson, J.A., Majumdar, S.R., Simpson, S.H., Toth, E.L., 2002. Decreased mortality associated with the use of metformin compared with sulfonylurea monotherapy in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 25, 2244–2248.
- [58] Gejl, M., Starup-Linde, J., Scheel-Thomsen, J., Gregersen, S., Vestergaard, P., 2015. Risk of cardiovascular disease: the effects of diabetes and anti-diabetic drugs — a nested case-control study. *Int J Cardiol.* 178, 292–296.
- [59] Després, J.P., 2003. Potential contribution of metformin to the management of cardiovascular disease risk in patients with abdominal obesity, the metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Metab.* 29, 53–61.
- [60] Lamanna, C., Monami, M., Marchionni, N., Mannucci, E., 2011. Effect of metformin on cardiovascular events and mortality: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Diabetes, Obes Metab.* 13, 221–228.
- [61] Hong, J., Zhang, Y., Lai, S., Lv, A., Su, Q., Dong, Y., 2012. Effects of metformin versus glipizide on cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease. *Diabetes Care.* 36, 1304–1311.
- [62] Yang, X., Xu, Z., Zhang, C., Cai, Z., Zhang, J., 2017. Metformin, beyond an insulin sensitizer, targeting heart and pancreatic β cells, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1863, 1984–1990.
- [63] Kinsara, A.J., Ismail, Y.M., 2018. Metformin in heart failure patients. *Indian Heart J.* 70, 175–176.

- [64] Chi, C., Snaith, J., Gunton, J.E., 2017. Diabetes Medications and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *Hear. Lung Circ.* 26, 1133–1141.
- [65] Nesti, L., Natali, A., 2017. Metformin effects on the heart and the cardiovascular system: A review of experimental and clinical data. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 27, 657–669.
- [66] Sirtori, C.R., Catapano, A., Ghiselli, G.C., Innocenti, A.L., Rodriguez, J., 1977. Metformin: an antiatherosclerotic agent modifying very low density lipoproteins in rabbits. *Atherosclerosis.* 26, 79-89.
- [67] Giacchi, M., Vatti, R., 1981. Inhibitory effect of metformin on the development of cholesterol atherosclerosis in the rabbit. Observations on the coronary vessels. *Boll Soc Ital Biol Sper.* 57, 552-555.
- [68] Mamputu, J.C., Wiernsperger, N.F., Renier, G., 2003. Antiatherogenic properties of metformin: the experimental evidence. *Diabetes Metab.* 29, 6S71-6S76.
- [69] Cefalu, W.T., Schneider, D.J., Carlson, H.E., Migdal, P., Gan Lim, L., Izon, M.P., Kapoor, A., Bell-Farrow, A., Terry, J.G., Sobel, B.E., 2002. Effect of combination glipizide GITS/metformin on fibrinolytic and metabolic parameters in poorly controlled type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care.* 25, 2123–2128.
- [70] Isoda, K., Young, J.L., Zirlik, A., MacFarlane, L.A., Tsuboi, N., Gerdes, N., 2006. Metformin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-kappaB in human vascular wall cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26, 611–617.
- [71] Evans, J.M.M., Donnelly, L.A., Emslie-Smith, A.M., Alessi, D.R., Morris, A.D., 2005. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *Br Med J.* 330, 1304–1305.
- [72] Dong, L., Zhou, Q., Zhang, Z., Zhu, Y., Duan, T., Feng, Y., 2012. Metformin sensitizes endometrial cancer cells to chemotherapy by repressing glyoxalase I expression. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 38, 1077–1085.
- [73] Hanna, R.K., Zhou, C., Malloy, K.M., Sun, L., Zhong, Y., Gehrig, P.A., Bae-Jump, V.L., 2012. Metformin potentiates the effects of paclitaxel in endometrial cancer cells through inhibition of cell proliferation and modulation of the mTOR pathway. *Gynecol. Oncol.* 125, 458–469.
- [74] Cufi, S., Corominas-Faja, B., Vazquez-Martin, A., Oliveras-Ferraro, C., Dorca, J., Bosch-Barrera, J., Martin-Castillo, B., Menendez, J.A., 2012. Metformin-induced preferential killing of breast cancer initiating CD44+CD24-/low cells is sufficient to overcome primary resistance to trastuzumab in HER2+ human breast cancer xenografts. *Oncotarget.* 3, 395–398.
- [75] Yuan, H., Li, L., Zheng, W., Wan, J., Ge, P., et al., 2012. Antidiabetic drug metformin alleviates endotoxin-induced fulminant liver injury in mice. *Int Immunopharmacol.* 12, 682-688.
- [76] Bal, F., Bekpinar, S., Unlucerci, Y., Kusku-Kiraz, Z., Onder, S., Uysal, M., Gurdol, F., 2014. Antidiabetic drug metformin is effective on the metabolism of asymmetric dimethylarginine in experimental liver injury. *Diabetes Res Clin Pr.* 106, 295–302.
- [77] Arai, M., Uchiba, M., Komura, H., Mizuochi, Y., Harada, N., Okajima, K., 2010. Metformin, an antidiabetic agent, suppresses the production of tumor necrosis factor and tissue factor by inhibiting early growth response factor-1 expression in human monocytes in vitro. *JPET.* 334, 206-213.
- [78] Kalariya, N.M., Shoeb, M., Ansari, N.H., Srivastava, S.K., Ramana, K.V., 2012. Antidiabetic drug metformin suppresses endotoxin-induced uveitis in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 53, 3431-3440.
- [79] Asadbegia, M., Yaghmaei, P., Salehib, I., Ebrahim-Habibic, A., Komaki, A., 2016. Neuroprotective effects of metformin against Aβ-mediated inhibition of long-term potentiation in rats fed a highfat diet. *Brain res Bull.* 121, 178–185.
- [80] Gupta, A., Bisht, B., Dey, C.S., 2011. Peripheral insulin-sensitizer drug metformin ameliorates neuronal insulin resistance and Alzheimer's-like changes. *Neuropharmacology.* 60, 910–920.
- [81] Chung, M.M., Chen, Y.L., Pei, D., Cheng, Y.C., Sun, B., Nicol, C.J., et al., 2015. The neuroprotective role of metformin in advanced glycation end product treated human neural stem cells is AMPK-dependent. *Bioch Bioph Acta.* 1852, 720–731.
- [82] Hettich, M.M., Mattes, F., Ryan, D.P., Griesche, N., Schroder, S., Dorn, S., et al., 2014. The anti-diabetic drug metformin reduces BACE1 protein level by interfering with the MID1 complex. *Plos one.* 9, e-102420.
- [83] Zhou, C., Sun, R., Zhuang, S., Sun, C., Jiang, Y., Cui, Y., et al., 2016. Metformin prevents cerebellar granule neurons against glutamate-induced neurotoxicity. *Brain res Bull.* 121, 241–245.
- [84] Bhutada, P., Mundhada, Y., Bansod, K., Tawaria, S., Patil, S., Dixit, P., et al., 2011. Protection of cholinergic and antioxidant system contributed to the effect of berberine ameliorating memory dysfunction in rat model of streptozotocin-induced diabetes. *Beh Brain res.* 220, 30–41
- [85] Bruunsgaard, H., Andersen-Ranberg, K., Jeune, B., Pedersen, A.N., Skinhoj, P., Pedersen, B.K., 1999. A high plasma concentration of TNF-alpha is associated with dementia in centenarians. *J Gerontol a Biol Sci med Sci.* 54:357–64.

- [86] Zhao, R.R., Xu, X.C., Xu, F., Zhang, W.L., Zhang, W.L., Liu, L.M., et al., 2014. Metformin protects against seizures, learning and memory impairments and oxidative damage induced by pentylenetetrazole-induced kindling in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 4 (18), 414–417.
- [87] Graham, G.G., Punt, J., Arora, M., Day, R.O., Doogue, M.P., 2011. Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet.* 50, 81–98.
- [88] Foretz, M., Guigas, B., Bertrand, L., Pollak, M., Viollet, B., 2014. Metformin: From Mechanisms of Action to Therapies. *Cell Metabolism.* 20 (6), 953–966.
- [89] Nies, A.T., Koepsell, H., Damme, K., Schwab, M., 2011. Organic Cation Transporters (OCTs, MATEs), in vitro and in vivo evidence for the importance in drug therapy. *Drug Transporters.* 105–167.
- [90] Roth, M., Obaidat, A., Hagenbuch, B., 2012. OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *British J of Pharmacology.* 165, 1260–1287.
- [91] Bachmakov, I., Glaeser, H., Fromm, M.F., König, J., 2008. Interaction of oral antidiabetic drugs with hepatic uptake transporters: focus on OATPs and OCT1. *Diabetes.* 57, 1463–1469.
- [92] Huttunen, K.M., Mannila, A., Laine, K., Kempainen, E., Leppänen, J., Vepsäläinen, J., Järvinen, T., Rautio, J., 2009. The first bioreversible prodrug of metformin with improved lipophilicity and enhanced intestinal absorption. *J. Med. Chem.* 52, 4142–4148.
- [93] Peura, L., Huttunen, K.M., 2014. Sustained release of metformin via red blood cell accumulated sulfenamide prodrug. *J. Pharm. Sci.* 106, 2207–2210.
- [94] Huttunen, K.M., Leppänen, J., Laine, K., Vepsäläinen, J., Rautio, J., 2013. Convenient microwave-assisted synthesis of lipophilic sulfonamide prodrugs of metformin. *Eur. J. Pharm. Sci.* 49, 624–628.
- [95] Rautio, J., Vernerová, M., Aufderhaar, I., Huttunen, K.M., 2014. Glutathione-S-transferase selective release of metformin from its sulfonamide prodrug. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24, 5034–5036.
- [96] Koh, M., Lee, J.C., Min, C., Moon, A., 2013. A novel metformin derivative, HL010183, inhibits proliferation and invasion of triple-negative breast cancer cells. *Bioorg Med Chem.* 21, 2305–2313.
- [97] Kajbaf, F., De Broe, M.E., Lalau, J.D., 2016. Therapeutic concentrations of metformin: a systematic review. *Clin. Pharmacokinet.* 55, 439–459.
- [98] Dallaglio, K., Bruno, A., Cantelmo, A.R., Esposito, A.I., Ruggiero, L., Orecchioni, S., Calleri, A., Bertolini, F., Pfeffer, U., Noonan, D.M., Albini, A., 2014. Paradoxical effects of metformin on endothelial cells and angiogenesis. *Carcinogenesis.* 35 (5), 1055–1066.
- [99] He, L., Sabet, A., Djedjos, S., Miller, R., Sun, X., Hussain, M.A., Radovick, S., Wondisford, F.E., 2009. Metformin and insulin suppress hepatic gluconeogenesis through phosphorylation of CREB binding protein. *Cell.* 137, 635–646.
- [100] Cai, H., Zhang, Y., Han, T., Everett, R. S., Thakker, D. R., 2016. Cation-selective transporters are critical to the AMPK-mediated antiproliferative effects of metformin in human breast cancer cells. *Int. J. Cancer.* 138, 2281–2292.
- [101] Huttunen, K. M., Huttunen, J., Aufderhaar, I., Gynther, M., Denny, W. A., Spicer, J. A., 2016. L-Type amino acid transporter 1 (lat1)-mediated targeted delivery of perforin inhibitors. *Int. J. Pharm.* 498, 205–216.
- [102] Wang, D. S., Kusuhara, H., Kato, Y., Jonker, J. W., Schinkel, A. H., Sugiyama, Y., 2003. Involvement of organic cation transporter 1 in the lactic acidosis caused by metformin. *Mol. Pharmacol.* 63, 844–848.
- [103] Wang, D. S., Jonker, J. W., Kato, Y., Kusuhara, H., Schinkel, A. H., Sugiyama, Y., 2002. Involvement of organic cation transporter 1 in hepatic and intestinal distribution of metformin. *J. Pharm. Exp. Therap.* 302, 510–515.
- [104] Kostka, B., Para, J., Sikora, J., 2007. A multiparameter test of clot formation and fibrinolysis for in-vitro drug screening. *Blood. Coagul. Fibrin.* 18, 611–618.
- [105] Antovic, A., 2010. The overall hemostasis potential: a laboratory tool for the investigation of global hemostasis. *Sem. Thromb. Hem.* 36, 772–779.
- [106] Kim, H.K., Kim, J.E., Park, S.H., Kim, Y.I., Nam-Goong, I.S., Kim, E.S., 2014. High coagulation factor levels and low protein C levels contribute to enhanced thrombin generation in patients with diabetes who do not have macrovascular complications. *J. Diabet. Complicat.* 28, 365–369.
- [107] Ceriello, A., Quatraro, A., Dello Russo, P., Marchi, E., Barbanti, M., Milani, M.R., Giugliano, D., 1990. Protein C deficiency in insulin-dependent diabetes: a hyperglycemia-related phenomenon. *Thromb. Haemostasis.* 64, 104–107.
- [108] Carr, M.E., 2001. Diabetes mellitus - a hypercoagulable state. *J. Diabet. Complicat.* 15, 44–54.
- [109] Fischer, D., Li, Y., Ahlemeyer, B., Krieglstein, J., Kissel, T., 2003. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials.* 24, 1121–1131.
- [110] Stasiuk, M., Kijanka, G., Kozubek, A., 2009. Zmiany kształtu erytrocytów i czynniki je wywołujące. *Post. Biochem.* 55, 425–433.

- [111] Lang, E., Qadri, S.M., Lang, F., 2012. Killing me softly – suicidal erythrocyte death. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 1236–1243.
- [112] Chałubinski, M., Zemanek, K., Skowron, W., Wojdan, K., Gorzelak, P., Broncel, M., 2013. The effect of 7-ketocholesterol and 25-hydroxycholesterol on the integrity of the human aortic endothelial and intestinal epithelial barriers. *Inflamm. Res.* 62, 1015–1023.
- [113] Esfahanian, N., Shakiba, Y., Nikbin, B., Soraya, H., Maleki-Dizaji, N., Ghazi-Khansari, M., Garjani, A., 2012. Effect of metformin on the proliferation, migration, and MMP-2 and -9 expression of human umbilical vein endothelial cells. *Mol. Med. Rep.* 5, 1068–1074.
- [114] Majithiya, J.B., Balaraman, R., 2006. Metformin reduces blood pressure and restores endothelial function in aorta of streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci.* 78, 2615–2624.
- [115] Verma, S., Bhanot, S., McNeill, J., 1996. Decreased vascular reactivity in metformin treated fructose-hypertensive rats. *Metabolism.* 45, 1053–1055.
- [116] Bakhashab, S., Ahmed, F., Schulten, H.J., Ahmed, F.W., Glanville, M., Al-Qahtani, M.H., Weaver, J.U., 2018. Proangiogenic effect of metformin in endothelial cells is via upregulation of VEGFR1/2 and their signaling under hyperglycemia-hypoxia. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 1–18.
- [117] Demaille, D., Guigas, B., Chauvin, C., Fontaine, E., Wiernsperger, N., Leverve, X., 2005. Metformin prevents high-glucose-induced endothelial cell death through a mitochondrial permeability transition-dependent process. *Diabetes.* 54, 2179–2187.
- [118] Wang, J., Ciaraldi, T.P., Samad, F., 2015. Tissue factor expression in obese type 2 diabetic subjects and its regulation by antidiabetic agents. *J. Obes.* 2015, 291209.
- [119] Lewis, J.C., Jones, N.L., Hermanns, M.I., Röhrig, O., Klein, C.L., Kirkpatrick, C.J., 1995. Tissue factor Expression during coculture of endothelial cells and monocytes. *Exp Mol Pathol.* 62 (3), 207–218.
- [120] de Jager, J., Kooy, A., Schalkwijk, C., van der Kolk, J., Lehter, P., Bets, D., Wulffelé, M.G., Donker, A.J., Stehouwer, C.D., 2014. Long-term effects of metformin on endothelial function in type 2 diabetes: A randomized controlled trial. *J. Intern. Med.* 275, 59–70.
- [121] Goya, S., Peter, H., 2008. Tissue plasminogen activator, von Willebrand factor, and risk of type 2 diabetes in older men. *Diabetes Care.* 31, 995–1000.
- [122] Cho, Y.W., Yang, D.H., Oh, D.Y., Baick, S.H., Kim, S.K., Kim, S.J., Hong, S.Y., 1992. Plasma t-PA and PAI-1 antigen concentrations in non-insulin dependent diabetic patients: effects of treatment modality on fibrinolysis. *Korean J Intern Med.* 7, 81–86.
- [123] Hadad, N., Tuval, L., Elgazar-Carmom, V., Levy, R., Levy, R., 2011. Endothelial ICAM-1 protein induction is regulated by cytosolic phospholipase A2 α via both NF- κ B and CREB transcription factors. *J. Immunol.* 186, 1816–1827.
- [124] Colwell, J., 2001. Treatment for the procoagulant state in type 2 diabetes. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 30, 1011–1030.
- [125] Gin, H., Freyburger, G., Boisseau, M., Aubertin, J., 1989. Study of the effect of metformin on platelet aggregation in insulin-dependent diabetics. *Diabetes Res Clin Pr.* 6, 61–67.
- [126] Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. Jr, Feather-Stone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology.* 7, 88–90.
- [127] Worek, F., Mast, U., Kiderlen, D., Diepold, C., Eyer, P., 1999. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clinica Chimica Acta.* 288, 73–90.
- [128] Chen, Y., Zhou, K., Wang, R., et al., 2009. Antidiabetic drug metformin (GlucophageR) increases biogenesis of Alzheimer's amyloid peptides via up-regulating BACE1 transcription. *Proc Natl Acad Sci.* 106, 3907–3912.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

5.1. Tematyka badań przed uzyskaniem stopnia doktora

Jestem absolwentką kierunku farmacja na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. W 2009 roku ukończyłam studia z wynikiem bardzo dobrym uzyskując tytuł magistra farmacji. Moja praca magisterska pt.: „Ocena wpływu ekstraktu z aronii

czarnoowocowej na proces krzepnięcia i fibrynolizy”, została wykonana pod opieką Pani Doktor Joanny Sikory, natomiast promotorem pracy była Pani Profesor Elżbieta Mikiciuk-Olasik. Część wyników badań prowadzonych w ramach pracy magisterskiej zostało opublikowanych w czasopiśmie *European Journal of Nutrition* (Załącznik 6, punkt II A, poz. 6).

Od 2007 roku byłam członkiem Studenckiego Koła Naukowego działającego w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej i Analizy Leków. Zarówno w trakcie pracy w kole naukowym, jak i przygotowania pracy magisterskiej, badania prowadziłam pod opieką dr Joanny Sikory, która nauczyła rzetelnej pracy laboratoryjnej oraz zachęciła do kontynuowania pracy naukowo-badawczej. Moje badania koncentrowały się na ocenie wpływu nowej pochodnej pirymidochinazoliny na układ krzepnięcia i fibrynolizy. Wyniki pracy zostały opublikowane (Załącznik 6, punkt II D, poz. 1) oraz zaprezentowane w formie referatu ustnego na XLVI Ogólnopolskiej, IV Międzynarodowej Konferencji Studenckich Towarzystw Naukowych i Młodych Lekarzy *Juvenes pro Medicina* w 2008 roku. Podsumowując, wyniki mojej pracy naukowej do momentu ukończenia studiów magisterskich zostały opublikowane w 1 pracy oryginalnej (Załącznik 6, punkt II D, poz. 1), 2 pracach przeglądowych (Załącznik 6, punkt II D, poz. 5 i 6) oraz zaprezentowane w postaci 2 referatów ustnych (14 p. MNiSW).

W 2009 roku rozpoczęłam Studia Doktoranckie w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji UM w Łodzi pod kierunkiem Pani Profesor Elżbiety Mikiciuk-Olasik. W trakcie przygotowywania rozprawy doktorskiej prowadziłam badania mające na celu wykorzystanie dendrymerów poliamidoaminowych (PAMAM) jako nośników pochodnych kwasu iminodioctowego do diagnostyki magnetycznego rezonansu jądrowego w chorobach wątroby. Pierwszą część badań stanowiło określenie wpływu dendrymerów PAMAM generacji od 1 do 4 (G1 – G4 PAMAM) na rozpuszczalność czterech pochodnych kwasu iminodioctowego i ustalenie rodzaju interakcji pomiędzy tymi związkami a dendrymerami PAMAM. Badania przy użyciu spektrofotometrycznej metody rozpuszczalności równowagowej wykazały, że obdarzone ładunkiem dodatnim dendrymery PAMAM znacząco przyczyniły się do wzrostu rozpuszczalności wszystkich ocenianych związków. Rozpuszczalność pochodnych kwasu iminodioctowego rosła w przybliżeniu liniowo w funkcji całego zakresu stosowanych stężeń dendrymerów PAMAM. Wykazałam, że rozpuszczalność związków zależy nie tylko od stężenia zastosowanego dendrymeru ale także od jego generacji. Potencjał dendrymerów PAMAM G1 - G4 jako nośniki pochodnych kwasu iminodioctowego oceniłam za pomocą spektroskopii ^1H NMR i 2D-NOESY. Analiza widm ^1H NMR i 2D-NOESY potwierdziła, że interakcje pomiędzy badanymi związkami a dendrymerami PAMAM to głównie oddziaływania elektrostatyczne między powierzchniowymi grupami aminowymi dendrymerów i grupami karboksylowymi pochodnych kwasu iminodioctowego. Dodatkowo, spektroskopia 2D-NOESY umożliwiła ustalenie, że pochodne kwasu iminodioctowego są zlokalizowane na zewnętrznej warstwie dendrymerów PAMAM (Załącznik 6, punkt II A, poz. 2).

Kolejnym etapem mojej pracy była synteza nowych związków zbudowanych z dendrymerów PAMAM G3 - G4 i kompleksów gadolinowych pochodnych kwasu iminodioctowego. Analiza spektrofotometryczna wykazała, że dendrymery PAMAM zależne od generacji mogą być

nośnikiem różnej liczby gadolinowych kompleksów pochodnych kwasu iminodioctowego. W dalszym etapie pracy postanowiłam zbadać toksyczność i biogodność ze szczególnym uwzględnieniem toksyczności względem komórek śródbłonka naczyniowego oraz wpływu na hemostazę osoczną. Wykorzystując metodę optyczną wraz z programem komputerowym "CL-test" wykazałam, że dendrymery wpływają na proces tworzenia skrzepu i fibrynolizy w sposób zależny od ich stężenia oraz generacji. Obserwowany wielokierunkowy wpływ dendrymerów na wszystkich trzech etapach badanego procesu tj. tworzenia się skrzepu, okresu jego stabilizacji i fibrynolizy może zostać uznane za istotne w przypadku podejmowania prób zastosowania klinicznego tych polimerów. Zbadałam także zsyntetyzowane związki, a wyniki badań *in vitro* sugerują, iż związki te mogą zostać uznane za bezpieczne względem hemostazy osoczowej, ponieważ dla potencjalnego średniego stężenia tych związków w osoczu krwi nie zaobserwowałam statystycznie istotnych zmian parametrów kinetycznych procesu tworzenia skrzepu i fibrynolizy. Badania oceniające wpływ dendrymerów PAMAM G3 i G4 na funkcję ludzkich komórek śródbłonka aorty (HAEC) wykazały, że polimery te, zależnie od stężenia i generacji, mają niekorzystny wpływ na komórki śródbłonka naczyniowego. Obserwowana toksyczność związana jest z wielokrotnym dodatnim ładunkiem dendrymerów, który prawdopodobnie oddziałuje z ujemnie naładowaną powierzchnią komórek śródbłonka.

Podsumowując, na podstawie wyników przeprowadzonych badań wykazałam, że dendrymery PAMAM mogą zostać uznane jako potencjalne nośniki pochodnych kwasu iminodioctowego. Wyniki przeprowadzonych badań przyczyniły się do uzyskania nowych informacji dotyczących chemii supramolekularnej i toksyczności dendrymerów PAMAM i gadolinowych kompleksów pochodnych kwasu iminodioctowego, które mogą być wykorzystane w projektowaniu i optymalizacji systemów dostarczania środków kontrastujących zbudowanych na bazie tych polimerów (Zał. 6, punkt II A, poz. 9).

W trakcie studiów doktoranckich uczestniczyłam także w innych badaniach prowadzonych w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji. Jednym z zadań było oczyszczanie oraz badania wpływu na aktywność acetylo- i butyrylocholinoestezy pochodnych tetrahydroakrydyny oraz cyklopentachinoliny (badania pod kierunkiem Doktora Pawła Szymańskiego). Wynikiem tej pracy było współautorstwo 5 publikacji oryginalnych (Zał. 6, punkt II A, poz. 1, 3, 4, 5 oraz punkt II D, poz. 2). Ponadto, kontynuowałam współpracę z Doktor Joanną Sikorą i pracowałam nad określeniem wpływu ekstraktu z Aronii czarnoowocowej na proces krzepnięcia i fibrynolizy u osób z zespołem metabolicznym, zarówno w warunkach *ex vivo*, jak i *in vitro* (Zał. 6, punkt II A, poz. 7).

Przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych wyniki mojej pracy naukowej były opublikowane w 10 publikacjach oryginalnych i 7 publikacjach przeglądowych. Prace przedstawiono na 7 konferencjach naukowych (IF = 16,339; 264 MNiSW).

5.2. Tematyka badań po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych

Po otrzymaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych kontynuowałam badania dotyczące oceny aktywności biologicznej dendrymerów PAMAM, ze szczególnym uwzględnieniem hemostazy osoczowej. Zbadałam m. in. wpływ dendrymerów PAMAM na aktywność amidolityczną trombiny, enzymu przekształcającego rozpuszczalny w osoczu fibrynogen w nierozpuszczalną fibrynę. Wyniki badań wskazały, że dendrymery zależnie od generacji i stężenia statystycznie istotnie zwiększają aktywność trombiny. W dalszym etapie pracy określiłam wpływ dendrymerów na podstawowe parametry koagulologiczne, tj. czas APTT, PT oraz TT. Ponadto, zbadałam wpływ dendrymerów na aktywność czynnika X oraz dwóch naturalnie występujących w osoczu antykoagulantów, tj. białka C oraz antytrombiny III. Badania wykazały statystycznie istotne zmniejszenie aktywności tych dwóch antykoagulantów, co sugeruje pro-zakrzepowe właściwości dendrymerów PAMAM G3 i G4. Z kolei badania aktywności plazminy nie wykazały znaczących różnic pod wpływem badanych dendrymerów. Część wyników tych badań zostało opublikowanych razem z wynikami badań powstałych w ramach pracy doktorskiej (Zał. 6, punkt II A, poz. 8). W kolejnych latach kontynuowałam temat biozgodności dendrymerów PAMAM. Określiłam między innymi wpływ dendrymerów na syntezę wewnątrzkomórkową czynnika tkankowego (TF) w komórkach śródbłonna naczyniowego (HUVEC) (Zał. 6, punkt II A, poz. 16).

Przeprowadziłam także pogłębione badania nad pochodnymi kwasu iminodioctowego oraz ich rolą w aktywacji układu krzepnięcia i fibrynolizy. W pierwszym etapie badań skoncentrowałam się na metylowych pochodnych kwasu iminodioctowego oraz mebrofeninie. Poza badaniami objętymi pracą doktorską (wpływ pochodnych kwasu iminodioctowego na proces tworzenia skrzepu i fibrynolizy oraz generację endogennej trombiny) wykonałam także badania aktywności trombiny oraz wpływ na integralność błony oraz morfologię erytrocytów. Pomimo zaobserwowania istotnego wpływu badanych związków na wybrane parametry, ogólnoustrojowe skutki pochodnych kwasu iminodioctowego względem hemostazy osoczowej należy uznać za nieistotne, ponieważ statystycznie istotne zmiany parametrów kinetycznych badanego procesu nie zostały zaobserwowane dla potencjalnego średniego stężenia w osoczu tych związków, a jedynie dla stężenia 10 - krotnie wyższego (Zał. 6, punkt II A, poz. 10).

We współpracy z Panem Profesorem Michałem Studniarkiem z Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (Zakład Radiologii) wykonaliśmy badania *in vivo* mające na celu określenie właściwości obrazujących zsyntetyzowanych w ramach mojej pracy doktorskiej połączeń gadolinowych kompleksów pochodnych kwasu iminodioctowego z dendrymerami PAMAM G3 i G4. Badania biodystrybucji wskazały, że badane związki mają powinowactwo do wątroby (procent wzmocnienia obrazu wynosił 59 – 116 %, w zależności od badanego kompleksu) oraz nerek (procent wzmocnienia 68 – 136 %). Wyniki badań wraz z badaniami *in vitro* zsyntetyzowanych kompleksów zostały opublikowane (Zał. 6, punkt II A, poz. 9).

Poza badaniami pochodnych kwasu iminodioctowego z podstawnikami metylowymi w pierścieniu aromatycznym, postanowiłam także zsyntezować i przebadać pochodne z podstawnikami metoksyłowymi w pierścieniu aromatycznym. Drogą klasycznej syntezy uzyskałam 5 nowych, nieopisanych pochodnych kwasu iminodioctowego, których strukturę potwierdziłam metodami spektroskopowymi. W kolejnym etapie przeprowadziłam analizę właściwości biologicznych, w której oceniłam aktywację układu krzepnięcia i fibrylizy, generację endogennej trombiny, aktywność trombiny, wewnątrz- i zewnątrzpochozny szlak krzepnięcia oraz potencjalną erytrotoksyczność. Spośród wszystkich zsyntezowanych pochodnych kwasu iminodioctowego najbardziej obiecująca pod względem właściwości biologicznych wydaje się pochodna z dwoma grupami metoksyłowymi w pozycji 3 i 5 w pierścieniu aromatycznym. Wyniki badań zostały opublikowane (Załącznik 6, punkt II A, poz. 12).

Rozpoczęłam też prace nad biogodnością gadolinowych kompleksów z pochodnymi kwasu iminodioctowego (Załącznik 6, punkt II A, poz. 14). Badania objęły podstawowe parametry koagulologiczne (APTT, PT, TT), wpływ na erytrocyty oraz toksyczność względem komórek śródbłoka naczyniowego. Wszystkie badane kompleksy gadolinowe statystycznie wydłużały czas APTT, co prawdopodobnie spowodowane jest większym powinowactwem pochodnych kwasu iminodioctowego do jonów wapnia niż gadolinu, co sugeruje, że otrzymane kompleksy nie są wystarczająco trwałe i istnieje ryzyko podczas zastosowania ich *in vivo*, że uwolnione zostaną jony gadolinu. Potrzebne są dalsze badania, z uwzględnieniem trwałości kompleksów w obecności jonów metali dwuwartościowych, w tym wapnia, magnezu i cynku.

Po otrzymaniu stopnia doktora rozpoczęłam współpracę z innymi pracownikami w obrębie Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. W roku 2016, we współpracy z Doktor Marią Kasprzak oraz Profesorem Justynem Ochockim z Zakładu Chemii Bionieorganicznej UM w Łodzi, prowadziłam badania dotyczące biogodności nowych kompleksów rutenu o potencjalnych właściwościach przeciwnowotworowych. Wyniki tych badań zostały opublikowane (Załącznik 6, punkt II A, poz. 11). Rozpoczęłam także współpracę z Doktor Martą Szumilak oraz Profesorem Andrzejem Stańczakiem z Zakładu Farmacji Szpitalnej. W ramach badań przeprowadziłam ocenę wpływu 6 poliaminowych pochodnych zawierających podstawniki bicykliczne na układ krzepnięcia i fibrylizy oraz integralność błony erythrocytarnej. Wykazaliśmy, że badane związki w zakresie potencjalnych stężeń terapeutycznych (wartości IC_{50} cytotoksyczności względem wybranych linii komórkowych) są biogodne pod kątem hemostazy osoczowej i nie wywierają negatywnego wpływu na erytrocyty (Załącznik 6, punkt II A, poz. 13). We współpracy z Profesor Anną Kilanowicz-Sapotą (Zakład Toksykologii, UM Łódź) zbadaliśmy wpływ heksachloronaftalenu (HxCN) – uważanego za jeden z najbardziej toksycznych kongenerów PCNs, na wybrane parametry hemostazy u samic szczura Wistar. Zarówno po 14- i 28-dniowym narażeniu na HxCN zaobserwowano istotne zmniejszenie ogólnego potencjału tworzenia skrzepu i fibrylizy w porównaniu z grupą kontrolną. Statystycznie istotne różnice odnotowano również w przypadku podstawowych parametrów kinetycznych tego procesu (maksimum krzepnięcia (F_{max}), prędkość tworzenia skrzepu (F_{vo}), prędkość fibrylizy (L_{vo})). Zaobserwowano także istotne obniżenie stężenia fibrynogenu. Wyniki zostały przedstawione

w postaci posteru na konferencji (Załącznik 6, punkt III B, poz. 10). Wyniki badań zostały opisane w publikacji pt.: „Hexachloronaphthalene as a hemostasis disturbing factor in female Wistar rats – a pilot study”, która jest aktualnie w trakcie recenzji w czasopiśmie *Chemosphere*. Brałam także udział w badaniach aktywności biologicznej suchych ekstraktów z kwiatów *Prunus spinosa* L. z zespołem Pani Profesor Moniki Olszewskiej (Zakład Farmakognozji UM Łódź); (Załącznik 6, punkt III B, poz. 12).

Razem z Profesor Joanną Sikorą rozpoczęliśmy współpracę z doktorem Janem Glińskim z firmy Planta Analytica LCC (New Milford, Stany Zjednoczone). W ramach badań określiliśmy wpływ wybranych katechin oraz procyanidyn pozyskanych ze skórki nasion orzecha arachidonowego (*Arachis hypogaea*, *Fabaceae*) na aktywność enzymów AChE oraz BuChE. W drugiej części badań przeprowadziliśmy analizę wpływu procyanidyn na wybrane elementy hemostazy osoczowej w oparciu o pomiar ogólnego potencjału krzepnięcia i fibrynolizy, ocenę wpływu na zewnątrzpochozny (oznaczenie czasu protrombinowego – PT) i wewnątrzpochozny układ krzepnięcia (oznaczenie czasu częściowej tromboplastyny po aktywacji – APTT), ocenę wpływu na hemolizę erytrocytów oraz mikroskopową ocenę wpływu na morfologię erytrocytów. Wyniki badań były przedmiotem dwóch prac magisterskich oraz zostały przedstawione w formie dwóch posterów na Konferencji Naukowej Studentów Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Kosmetologii i Oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w 2017 roku (Załącznik 6, punkt III, Lista pozostałych komunikatów, poz. 3, 5).

W 2017 roku, wspólnie z Profesor Joanną Sikorą, Profesorem Tadeuszem Pietrasem (Zakład Farmakologii Klinicznej, UM w Łodzi) oraz działem badawczym firmy Celon Pharma oceniliśmy potencjał nowych opatentowanych inhibitorów fosfodiesterazy X względem hamowania aktywności ludzkich esteraz (AChE, BuChE). Określiliśmy także synergizm z donepezilem w kierunku hamowania ChE. Wyniki badań zostały opracowane, jesteśmy w trakcie przygotowywania publikacji.

W 2018 roku podjęłam także współpracę z Magister Angeliką Adamus-Grabicką (zespół Pani Profesor Elżbiety Budzisz, Zakład Chemii Surowców Kosmetycznych, UM Łódź). Badania objęły określenie potencjalnej erytrotoksyczności pochodnych aryliidenochromanonów i flawanonów, związków o aktywności przeciwnowotworowej. Wykazałyśmy, że w zakresie stężeń antyproliferacyjnych badane pochodne nie przyczyniają się do hemolizy erytrocytów oraz nie indukują niekorzystnych zmian morfologicznych (Załącznik 6, punkt I A, poz. 15).

Aktualnie kontynuuję współpracę z Doktor Kristiiną Huttunen z University of Eastern Finland w zakresie biozgodności oraz wpływie pochodnych biguanidu na wybrane elementy hemostazy płytkowej. Oceniałam między innymi agregację i adhezję płytek krwi. W kolejnym etapie badań, planujemy wykonać analizę zależności pomiędzy budową biguanidów a ich aktywnością biologiczną, a następnie na tej podstawie zaprojektujemy i zsyntetyzujemy kolejne pochodne metforminy o potencjalnie korzystniejszych właściwościach biologicznych. Rozpoczęłam też badania nad nowymi prolekami ketoprofenu, które są substratami dla transportera LAT1 (L-type amino acid transporter 1) i wykazują lepsze właściwości do pokonywania bariery krew-mózg niż lek macierzysty, ketoprofen. Wykonuję także badania nad

nowo zsyntetyzowanymi inhibitorami transporterów LAT1 (synteza K. Huttunen, UEF) o potencjalnych właściwościach przeciwnowotworowych.

Ponadto, we współpracy z Profesorem Joanną Sikorą prowadzimy badania nad biogodnością czterech typów zawiesin tlenku grafenu (GO). Tlenki grafenu zostały zsyntetyzowane w Instytucie Technologii Materiałów Elektronicznych (Warszawa). Oceniliśmy m.in. erytrotoksyczność oraz wpływ na morfologię erytrocytów, komórek śródbłonna naczyniowego oraz ich integralność i żywotność. Przeprowadzone badania wykazały, że zgodnie z normą ISO, zawiesiny GO można uznać za biogodne względem ludzkich erytrocytów w zakresie stężeń 0,1-10 µg/mL. Nie wykazałyśmy niekorzystnego wpływu zawiesin GO w stężeniach poniżej 0,1 µg/mL na morfologię, integralność i żywotność komórek śródbłonna (Załącznik 6, punkt III, Lista pozostałych komunikatów, poz. 8).

Z Profesorem Joanną Sikorą oraz naszą doktorantką magister Marią Podsiedlik (jestem promotorem pomocniczym w otwartym przewodzie doktorskim) rozpoczęliśmy także badania mające na celu określenie wpływu kwetiapiny oraz innych neuroleptyków na aktywność ludzkiej acetylocholinoesterazy oraz poszukiwanie synergizmu działania tych leków z donepezilem – wybiórczym i odwracalnym inhibitorem acetylocholinoesterazy. Przeprowadzone dotychczas badania wskazują, że kwetiapina jest selektywnym, mieszanym inhibitorem ludzkiej butyrylocholinoesterazy. Średnie stężenie terapeutyczne kwetiapiny obniża aktywność BuChE o około 23% co może mieć znaczenie kliniczne w przypadku pacjentów z otępieniem, u których zastosowano skojarzone leczenie donepezilem i kwetiapiną.

5.3. Omówienie działalności dydaktycznej.

Od chwili rozpoczęcia studiów doktoranckich w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji na Wydziale Farmaceutycznym UM w Łodzi czynnie uczestniczę w zajęciach dydaktycznych. W ramach szkolenia przeddyplomowego prowadzę zajęcia dla studentów III roku na kierunku farmacja z przedmiotu chemia leków. Prowadzę zarówno zajęcia praktyczne (laboratoryjne), teoretyczne (Analiza leków układu roślinnego), jak i seminaria. Prowadzę także 15-godzinne zajęcia fakultatywne dla studentów II roku na kierunku farmacja pt. „Rola farmaceuty w promocji zdrowia”.

Jestem także autorem czterech wykładów metodą e-learning wyłonionych na drodze konkursu w ramach Projektu „Opracowanie i wdrożenie programów kształcenia z zakresu medycyny i farmacji metodą e-learning na Uniwersytecie Medycznym w Łodzi”.

W latach 2014-2018 byłem opiekunem 7 prac magisterskich wykonywanych przez studentów Uniwersytetu Medycznego. Jestem także opiekunem Koła Naukowego w Pracowni Bioanalizy Zakładu Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji UM w Łodzi. Efektem pracy w ramach koła naukowego powstało 12 komunikatów zjazdowych zaprezentowanych na konferencjach studenckich, w tym 2 w formie ustnej (Załącznik 6, punkt III I, Lista pozostałych

komunikatów). Do najważniejszych nagród członków koła naukowego można zaliczyć I miejsce Łukasza Mateusiaka na konferencji Naukowo-Szkoleniowej dla Studentów i Młodych Lekarzy Juvenes Pro Medicina; III miejsce Łukasza Mateusiaka na IX Kongresie Młodej Farmacji oraz II miejsce (nagroda zespołowa) studenta Łukasza Mateusiaka w konkursie Medical Innovation on Rare Cancer. Byłam także opiekunem naukowym grantu, studenta Łukasza Mateusiaka przyznanego na drodze konkursu (Granty UMEDu). Studenci, pracujący w kole pod moją opieką, są także współautorami prac naukowych, które powstały w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji (Zał. 6, punkt II A, poz. 2, 12, 14, 19).

W latach 2014 – 2018 byłam opiekunem studentów odbywających 6-tygodniowe praktyki w ramach programu IAESTE (4 studentów ze Słowenii, Szwajcarii, Bośni i Hercegowiny oraz Indii). Ponadto, 2 studentów z Serbii oraz Turcji odbyło 2-tygodniowe praktyki pod moją opieką w ramach programu Students Exchange Programme (lata 2016, 2017).

5.4. Omówienie działalności organizacyjnej.

Podejmuję działania organizacyjne zarówno w obrębie Zakładu, w którym pracuję, jak i Wydziału Farmaceutycznego UM w Łodzi. Brałam udział w utworzeniu Pracowni Bioanalizy oraz Pracowni Hodowli komórkowej w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji. Byłam członkiem komitetu organizacyjnego I i II Ogólnopolskiej Konferencji Radiofarmaceutycznej w Łodzi (2011, 2013), Konferencji Naukowej Studentów Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Kosmetologii i Oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (kwiecień 2017) oraz III Konferencji Naukowo-Szkoleniowej Studentów Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, kwiecień 2019.

Byłam sekretarzem kursu pt. „Komunikacja interpersonalna” w ramach specjalizacji z Farmacji Aptecznej (2016 – 2018). Jestem także opiekunem czterech magistrów farmacji będących w trakcie specjalizacji z Farmacji aptecznej.

Ponadto, jestem członkiem Okręgowej Izby Aptekarskiej w Łodzi. Biorę udział w popularyzowaniu nauk farmaceutycznych publikując materiały przeglądowe w czasopismach popularnonaukowych dla aptekarzy (Bez Recepty, obecnie Recepta.pl, Farmakoekonomika Szpitalna).

5.5. Podsumowanie

W trakcie całej pracy zawodowej staram się systematycznie podnosić swoje umiejętności praktyczne oraz dydaktyczne. Po uzyskaniu stopnia doktora uzyskałam tytuł specjalisty w zakresie Farmacji aptecznej, za którą otrzymałam wyróżnienie Ministra Zdrowia. Odbyłam trzy krótkoterminowe staże naukowe w ramach programu Erasmus+ (University of Wolverhampton, Faculty of Science and Engineering, Cancer Research, Wielka Brytania, 2015;

University of Eastern Finland, School of Pharmacy, Finlandia, 2015 i 2016) oraz jeden trzymiesięczny na University of Eastern Finland (wrzesień-listopad 2017). Wykonywane przeze mnie prace badawcze były współfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki, Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (granty dla Młodych Naukowców) oraz dotacji Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (działalność statutowa) (Zał. 6, punkt II I.).

Brałam też udział w licznych kursach i szkoleniach, zarówno krajowych jak i zagranicznych m.in. Executive in Innovation and Business Creation, odbytego na Trinity Dublin College (Dublin, Irlandia) oraz IESE Business School, University of Navarra (Barcelona, Hiszpania) (Zał. 6, punkt III Q).

Podsumowując, na mój całkowity dorobek naukowy składa się 41 publikacji (30 znajduje się w bazie Journal Citation Reports) oraz jednego rozdziału w książce. Łączny impact factor wszystkich publikacji wynosi 76,645, a liczba punktów MNiSW 825. Moje prace były cytowane 292 razy (wg. bazy Web of Science), a indeks Hirscha wynosi 9.

Magdalena Markowicz-
Piasecka