

mgr farm. Agnieszka Zajda

**Analiza aktywności biologicznej nowych analogów metforminy
o budowie sulfonamidowej**

Analysis of the biological activity of new metformin analogues
with a sulfonamide structure

Rozprawa doktorska w oparciu o cykl publikacji naukowych

Praca wykonana:
w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej,
Analizy Leków i Radiofarmacji
Katedry Chemii Farmaceutycznej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Promotor: dr hab. n. farm. Magdalena Markowicz-Piasecka, prof. uczelni

Łódź 2023

Badania eksperymentalne będące przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej zostały
zrealizowane z wykorzystaniem środków statutowych

Uniwersytetu Medycznego w Łodzi:

503/3-015-01/503-31-001-19-00.

Podziękowania

Prezentowana rozprawa doktorska została przygotowana pod opieką naukową **Pani dr hab. n. farm. Magdaleny Markowicz-Piaseckiej, prof. uczelni**, której składam najserdeczniejsze podziękowania za możliwość realizacji tak interesującej pracy badawczej, patronat naukowy oraz nieocenioną pomoc na każdym etapie prowadzenia badań, a także w trakcie przygotowywania niniejszej dysertacji i publikacji źródłowych. Chciałabym również wyrazić głęboką wdzięczność za wszystkie cenne uwagi i wskazówki merytoryczne na początku mojej drogi naukowej, serdeczność, cierpliwość, niezłomną wiarę w moje możliwości oraz za motywowanie do rozwijania swojej wiedzy naukowej i umiejętności badawczych.

Pragnę podkreślić, iż podstawą niniejszej rozprawy doktorskiej był zbiór jednotematycznych publikacji, dlatego też chciałabym serdecznie podziękować wszystkim pozostałym współautorom artykułów naukowych, w osobach **Pani dr Kristiiny Huttunen; Pani dr hab. n. med. Joanny Sikory, prof. uczelni; Pani mgr farm. Marii Podsiedlik; Pani Miry Hynninen** oraz **Panu Janne Tampio** za zaangażowanie, jak i przyjazną oraz niezwykle owocną współpracę podczas realizacji niniejszych eksperymentów i przygotowywania manuskryptów.

Chciałabym również serdecznie podziękować **wszystkim Pracownikom Katedry Chemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi** za pomoc i przyjazną atmosferę w pracy.

Z całego serca dziękuję **Rodzicom** za możliwość rozwijania swoich zainteresowań, wsparcie, cierpliwość oraz niegasnącą wiarę we mnie. Dziękuję mojemu **Narzeczonemu** za wyrozumiałość, wiarę we mnie oraz za nieskończone pokłady cierpliwości.

Spis treści

Podziękowania	5
Wykaz publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej	9
Wykaz stosowanych skrótów	11
Wprowadzenie	17
Cele naukowe rozprawy doktorskiej.....	51
Część eksperymentalna.....	57
Wyniki przeprowadzonych badań oraz dyskusja.....	63
Podsumowanie osiągniętych wyników	83
Wnioski końcowe oraz perspektywy na przyszłość	89
Streszczenie pracy.....	91
Summary	97
Piśmiennictwo.....	103
Kopie publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej (Publikacje I-III)	113
Oświadczenia osoby ubiegającej się o stopień doktora	211
Oświadczenia współautorów publikacji naukowych	217
Wykształcenie	229
Całkowity dorobek naukowy	229

Wykaz publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej

Praca doktorska pt. „Analiza aktywności biologicznej nowych analogów metforminy o budowie sulfonamidowej” stanowi zbiór trzech opublikowanych i powiązanych tematycznie publikacji naukowych – jeden artykuł przeglądowy (podstawa teoretyczna) oraz dwie prace eksperymentalne. Sumaryczny współczynnik oddziaływania (**IF**) cyklu artykułów naukowych zgodny z rokiem publikacji wynosi **16.808**. Suma punktów według listy czasopism punktowanych **MEiN** jest równa **340**. Poniżej przedstawiono spis publikacji będących postawą niniejszej rozprawy doktorskiej:

➤ **Publikacja I**

Zajda A., Huttunen K., Sikora J., Podsiedlik M., Markowicz-Piasecka M. Is metformin a geroprotector? A peek into the current clinical and experimental data. Mechanisms of Ageing and Development. 2020, 191, 111350.

IF₂₀₂₀ = 5.432; 100 p MEiN₂₀₂₀

➤ **Publikacja II**

Zajda A., Sikora J., Huttunen K., Markowicz-Piasecka M. Structural comparison of sulfonamide-based derivatives that can improve anti-coagulation properties of metformin. International Journal of Molecular Sciences. 2022, 23, 4132.

IF₂₀₂₂ = 6.208; 140 p MEiN₂₀₂₂

➤ **Publikacja III**

Zajda A., Sikora J., Hynninen M., Tampio J., Huttunen K., Markowicz-Piasecka M. Substituent effects of sulfonamide derivatives of metformin that can dually improve cellular glucose utilization and anti-coagulation. Chemico-Biological Interactions. 2023, 373, 110381.

IF₂₀₂₂ = 5.168; 100 p MEiN₂₀₂₂

Wykaz publikacji

Wyniki badań prezentowane w ramach niniejszej dysertacji zostały także przedstawione w formie dwóch komunikatów zjazdowych (1 poster oraz 1 referat ustny) na krajowych konferencjach naukowych:

1. **Zajda A.**, Sikora J., Markowicz-Piasecka M. Właściwości przeciwzakrzepowe nowych sulfonamidowych pochodnych metforminy. XXIV Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, Lublin, 22-24 września 2021 r., poster.
2. **Zajda A.**, Markowicz-Piasecka M. Analiza aktywności biologicznej nowych analogów metforminy o budowie sulfonamidowej. I Ogólnopolskie Forum Młodych, Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, Lublin, 2 marca 2023 r., referat ustny.

Referat został wyróżniony nagrodą dla autora najlepszej prezentacji.

Wykaz stosowanych skrótów

ADA	Amerykańskie Towarzystwo Diabetologiczne (ang. <i>American Diabetes Association</i>)
ADP	adenozyno-5'-difosforan (tzw. adenzynodifosforan) (ang. <i>adenosine diphosphate</i>)
AGEs	produkty końcowe zaawansowanej glikacji (ang. <i>advanced glycation end-products</i>)
AoSMC	ludzkie komórki mięśni gładkich aorty (ang. <i>Aortal Smooth Muscle Cells</i>)
AMP	adenozyno-5'-monofosforan (tzw. adenzynomonofosforan) (ang. <i>adenosine monophosphate</i>)
AMPK	kinaza białkowa aktywowana AMP (ang. <i>5'AMP-activated protein kinase</i>)
APTT	czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (ang. <i>Activated Partial Thromboplastin Time</i>)
ARD	choroby związane ze starzeniem/ z wiekiem (ang. <i>age-related diseases</i>)
AT	antytrombina III (ang. <i>antithrombin III</i>)
ATP	adenozyno-5'-trifosforan (tzw. adenzynotrójfosforan) (ang. <i>adenosine triphosphate</i>)
bFGF	czynnik wzrostu fibroblastów 2 (ang. <i>basic fibroblast growth factor 2</i>)
BMI	wskaźnik masy ciała (ang. <i>body mass index</i>)
Caco-2	komórki gruczolakoraka ludzkiego nabłonka jelita grubego (ang. <i>human epithelial colorectal adenocarcinoma</i>)
CAD	choroba niedokrwienna serca (ang. <i>coronary artery disease</i>)
cAMP	cykliczny adenzyno-3',5'-monofosforan (ang. <i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
CD62P	selektyna P, białko transbłonowe typu 1 (ang. <i>P-selectin, type-1 transmembrane protein</i>)
cGPD	cytoplazmatyczna dehydrogenaza glicerofosforanowa (ang. <i>cytoplasmic glycerophosphate dehydrogenase</i>)
CI	indeks komórkowy (ang. <i>Cell Index</i>)

Wykaz skrótów

CL-test	test krzepnięcia i fibrynolizy (ang. <i>Clot Formation and Fibrinolysis Test</i>)
COVID-19	koronawirus (ang. <i>coronavirus disease 2019</i>)
CRP	białko C-reaktywne (ang. <i>C-reactive protein</i>)
CV	sercowo-naczyniowy (ang. <i>cardiovascular</i>)
DC-SIGN	receptor lektynowy typu C (ang. <i>C-type lectin receptor</i>)
DHAP	fosforan dihydroksyacetonu (ang. <i>dihydroxyacetone phosphate</i>)
DOAC	bezpośrednie doustne antykoagulanty (ang. <i>direct oral anticoagulants</i>)
DPP-4	dipeptydylopeptydaza 4 (ang. <i>dipeptidyl peptidase-4</i>)
EHRs	elektroniczna dokumentacja medyczna (ang. <i>electronic health records</i>)
ELISA	test immunoenzymatyczny (ang. <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
EMA	Europejska Agencja Leków (ang. <i>European Medicines Agency</i>)
ESC	Europejskie Towarzystwo Kardiologiczne (ang. <i>European Society of Cardiology</i>)
ET-1	endotelina-1 (ang. <i>endothelin 1</i>)
FBG	fibrynogen (ang. <i>fibrinogen</i>)
FBP	fruktozo-1,6-bisfosfataza (ang. <i>fructose 1,6-bisphosphatase</i>)
FCCP	4-(trifluorometoksy)fenylohydrazon cyjanku karbonylu (ang. <i>carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone</i>)
FDA	Agencja ds. Żywności i Leków (ang. <i>Food and Drug Administration</i>)
FFA	wolne kwasy tłuszczowe (ang. <i>free fatty acids</i>)
GDM	cukrzyca ciążowa (ang. <i>Gestational Diabetes Mellitus</i>)

Wykaz skrótów

GIP	glukozozależny peptyd insulinotropowy (ang. <i>gastric inhibitory peptide</i>)
GLP-1	glukagonopodobny peptyd-1 (ang. <i>glucagon-like peptide-1</i>)
GLUTs	transportery glukozy (ang. <i>glucose transporters</i>)
GSH	glutation (ang. <i>glutathione</i>)
GST	S-transferaza glutationowa (ang. <i>Glutathione S-transferase</i>)
G3P	3-fosforan aldehydu glicerynowego (ang. <i>glyceraldehyde 3-phosphate</i>)
HDL	lipoproteina o wysokiej gęstości (ang. <i>high-density lipoprotein</i>)
HUVEC	ludzkie komórki śródbłonna żyły pępowinowej (ang. <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>)
ICAM-1	cząsteczka adhezyjna 1 (ang. <i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>)
IDF	Międzynarodowa Federacja Diabetologiczna (ang. <i>International Diabetes Federation</i>)
IF	współczynnik oddziaływania (ang. <i>Impact Factor</i>)
IGT	upośledzona tolerancja glukozy (ang. <i>impaired glucose tolerance</i>)
INR	PT, wyrażony jako Międzynarodowy Współczynnik Znormalizowany (ang. <i>International Normalized Ratio</i>)
IR	insulinooporność (ang. <i>insulin resistance</i>)
JC-1	jodek 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraetylobenzimidazo-karbocyjaniny (ang. <i>tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide</i>)
KE	Komisja Europejska
LDL	lipoproteina o niskiej gęstości (ang. <i>low-density lipoprotein</i>)
LVH	przerost lewej komory (ang. <i>left ventricular hypertrophy</i>)
LVMi	indeks masy lewej komory (ang. <i>left ventricular mass index</i>)
MAPK	szlak kinazy białkowej aktywowanej mitogenem (ang. <i>mitogen-activated protein kinase pathway</i>)

Wykaz skrótów

MATE1	białko ekstruzji wielolekowej i toksyn 1 (ang. <i>multidrug and toxin extrusion 1</i>)
MATE2	białko ekstruzji wielolekowej i toksyn 2 (ang. <i>multidrug and toxin extrusion 2</i>)
mGPD	mitochondrialna dehydrogenaza glicerofosforanowa (ang. <i>mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase</i>)
mtDNA	DNA mitochondrialny (ang. <i>mitochondrial DNA</i>)
NAD⁺	dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (utleniony) (ang. <i>nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized)</i>)
NADH	dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (zredukowany) (ang. <i>nicotinamide adenine dinucleotide (reduced)</i>)
NAFLD	niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby (ang. <i>nonalcoholic fatty liver disease</i>)
NATPOL	Ogólnopolskie Badanie Rozpowszechnienia Czynn timer Ryzyka Chorób Układu Krążenia
NCD	chorobą niezakaźna (ang. <i>non-communicable disease</i>)
NFZ	Narodowy Fundusz Zdrowia
NO	tlenek azotu (ang. <i>nitrogen monoxide</i>)
NOAC	doustne leki przeciwzakrzepowe niebędące antagonistami witaminy K (ang. <i>non-vitamin K antagonist oral anticoagulants</i>)
OAC	doustne leki przeciwzakrzepowe (ang. <i>oral anticoagulants</i>)
OCT	transporter kationów organicznych (ang. <i>organic cation transporter</i>)
OCT-1	transporter kationów organicznych 1 (ang. <i>organic cation transporter 1</i>)
OCT-2	transporter kationów organicznych 2 (ang. <i>organic cation transporter 2</i>)
OCT-3	transporter kationów organicznych 3 (ang. <i>organic cation transporter 3</i>)
ONZ	Organizacja Narodów Zjednoczonych (ang. <i>United Nations</i>)
PAI-1	śródbłonkowy inhibitor aktywatora plazminogenu-1 (ang. <i>plasminogen activator inhibitor-1</i>)
PCOS	zespół policystycznych jajników (ang. <i>polycystic ovary syndrome</i>)

Wykaz skrótów

PI3K/Akt	szlak kinazy 3-fosfoinozytydu /kinazy białkowej B (ang. <i>phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B pathway</i>)
PKA	kinaza białkowa A (ang. <i>protein kinase A</i>)
PKC	kinaza białkowa C (ang. <i>protein kinase C</i>)
PMAT	błonowy transporter monoaminy (ang. <i>plasma membrane monoamine transporter</i>)
pNA	<i>p</i> -nitroanilina (ang. <i>p-nitroaniline</i>)
PPAR-γ	receptory γ aktywowane przez proliferatory peroksysomów (ang. <i>peroxisome proliferator-activated receptors γ</i>)
PSM	pochodne sulfonylomocznika
PT	czas protrombinowy (ang. <i>Prothrombin Time</i>)
PTD	Polskie Towarzystwo Diabetologiczne (ang. <i>Polish Diabetes Society</i>)
RAGE	receptor AGE (ang. <i>Receptor for Advanced Glycation Endproducts</i>)
R&D	badania i rozwój (ang. <i>research and development</i>)
RBC	erytrocyty (ang. <i>red blood cells</i>)
ROS	reaktywne formy tlenu (ang. <i>reactive oxygen species</i>)
RTCA-DP	system do monitorowania proliferacji komórek adherentnych w czasie rzeczywistym (ang. <i>Real-Time Cell Analyzer</i>)
SGLT2	kotransporter glukozowo-sodowy 2 (ang. <i>sodium/glucose cotransporter 2</i>)
SLC	grupa białek transportujących substancje rozpuszczone (ang. <i>solute carriers</i>)
SMCs	komórki mięśni gładkich (ang. <i>smooth muscle cells</i>)
SR-B	receptor zmiatacz klasy B (ang. <i>scavenger receptor-class B</i>)
TAFI	inhibitor fibrynolizy aktywowany trombiną (ang. <i>thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor</i>)

Wykaz skrótów

TC	cholesterol całkowity (ang. <i>total cholesterol</i>)
TFPI	inhibitor szlaku czynnika tkankowego (ang. <i>tissue factor pathway inhibitor</i>)
TG	trójglicerydy (ang. <i>triglycerides</i>)
TGF-β1	transformujący czynnik wzrostu β 1 (ang. <i>transforming growth factor β1</i>)
TG_t	czas generacji endogennej trombiny (ang. <i>thrombin generation time</i>)
TMB	3,3',5,5'-tetrametylobenzydyna (ang. <i>3,3',5,5'-tetramethylbenzidine</i>)
TNF-λ	czynnik martwicy nowotworów (ang. <i>tumor necrosis factor λ</i>)
t-PA	tkankowy aktywator plazminogenu (ang. <i>tissue plasminogen activator</i>)
TSOAC	celowane doustne antykoagulanty (ang. <i>target-specific oral anticoagulants</i>)
TT	czas trombinowy (ang. <i>Thrombin Time</i>)
TXA₂	tromboksan A ₂ (ang. <i>thromboxane A2</i>)
TZD	tiazolidynediony (agonista PPAR- γ)
T1DM	cukrzyca typu 1 (ang. <i>Type 1 Diabetes Mellitus</i>)
T2DM	cukrzyca typu 2 (ang. <i>Type 2 Diabetes Mellitus</i>)
UKPDS	brytyjskie wieloośrodkowe badanie z randomizacją (ang. <i>United Kingdom Prospective Diabetes Study</i>)
VCAM-1	cząsteczka adhezyjna 1 komórek naczyniowych (ang. <i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i>)
VKA	antagonista witaminy K (ang. <i>vitamin K antagonist</i>)
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia (ang. <i>World Health Organization</i>)
$\Delta\Psi$M	potencjał błony mitochondrialnej (ang. <i>mitochondrial membrane potential</i>)
2-NBDG	2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-dezoksyglukoza (ang. <i>2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoxyglucose</i>)

Wprowadzenie

W ciągu ostatnich dziesięcioleci, dynamiczny rozwój gospodarczy, postępujący proces starzenia się społeczeństwa, urbanizacja oraz współczesny styl życia (tj. przewlekły stres, złe nawyki żywieniowe, brak aktywności fizycznej oraz niedobór snu) doprowadziły do znacznego obciążenia światowej populacji chorobami cywilizacyjnymi. Obecnie cukrzyca (DM, ang. *Diabetes Mellitus*), obok chorób układu sercowo-naczyniowego, stanowi jedną z najbardziej rozpowszechnionych chorób cywilizacyjnych XXI wieku [1-3].

Monitorowanie danych epidemiologicznych dotyczących rozpowszechnienia cukrzycy zarówno na całym świecie jak i w skali kraju jest szczególnie istotne w celu planowania oraz implementacji odpowiednich interwencji prewencyjnych. Począwszy od 2000 r. Międzynarodowa Federacja Diabetologiczna (IDF) rozpoczęła regularne publikowanie, co 2-4 lata, szacunkowych danych dotyczących rozpowszechnienia cukrzycy, kiedy to pierwsze szacunki wykazały, iż liczba dorosłych z cukrzycą obejmuje 151 milionów ludzi na całym świecie. W 2021 r. IDF ogłosiła, że liczba ta wzrosła niemal czterokrotnie, szacując, że obecnie aż 537 milionów osób dorosłych choruje na cukrzycę (Ryc. 1), a prawie połowa z nich jest wciąż niezdiagnozowana. Z każdym kolejnym rokiem wartość ta sukcesywnie wzrasta [4]. Na tej podstawie grono ekspertów IDF przewiduje, iż do 2045 roku liczba osób dotkniętych cukrzycą wzrośnie do 783 milionów, co obecnie stanowi jedno z najpoważniejszych zagrożeń dla globalnego zdrowia i największych wyzwań zdrowotnych obecnego wieku [5]. Zgodnie z danymi przedstawionymi przez Narodowy Fundusz Zdrowia (NFZ), a także w oparciu o badania serii NATPOL dowodzące, iż około 20-25% osób chorych żyje z nierozpoznaną cukrzycą, stwierdzono, iż w 2019 r. na cukrzycę chorowały niemal 3 miliony Polaków (tj. 7.8% krajowej populacji) [6,7].

Raport opublikowany w 2022 r. przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) wykazał, że aż 95% wszystkich zdiagnozowanych przypadków cukrzycy to pacjenci cierpiący na cukrzycę typu 2 (T2DM). Natomiast pozostałe 5% obejmuje zarówno grupę pacjentów z cukrzycą typu 1 (T1DM) oraz cukrzycą ciążową (GDM) [7]. T2DM jest pierwszą chorobą niezakaźną (NCD), która została powszechnie uznana za cichą epidemię XXI wieku przez Organizację Narodów Zjednoczonych (ONZ) [3,4].

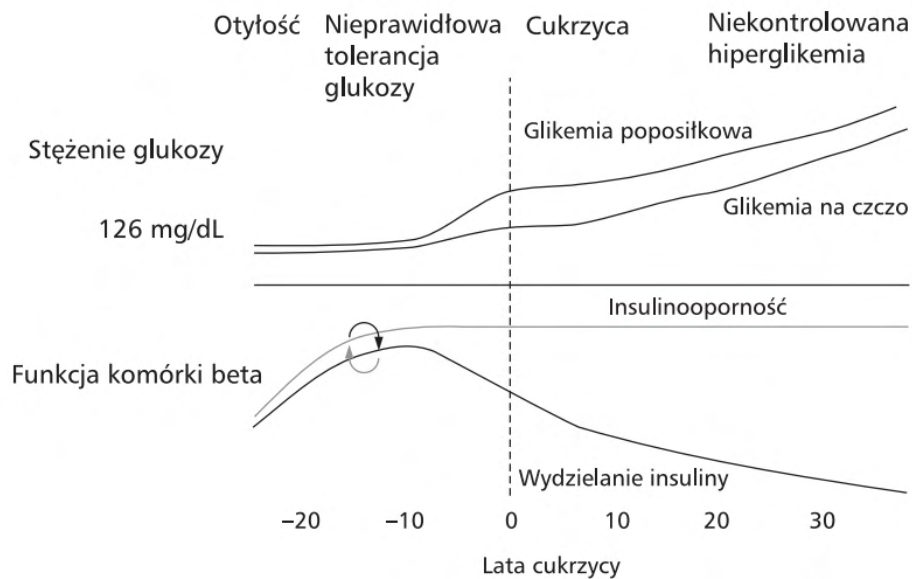
Uzasadnienie podjętej tematyki badawczej



Rycina 1. Rozpowszechnienie cukrzycy na świecie, u dorosłych w wieku 20-79 lat, w 2021 r. [5].

Patogeneza T2DM

U osób zdrowych poziom glukozy we krwi jest regulowany dzięki prawidłowemu wydzielaniu insuliny i glukagonu na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego [8,9]. W oparciu o definicję WHO, cukrzyca jest powszechnie definiowana jako zespół schorzeń metabolicznych objawiających się przewlekłą hiperglikemią, tj. zwiększonym stężeniem glukozy we krwi [8]. Stan hiperglikemii uwarunkowany jest zaburzeniami występującymi na poziomie wydzielania i/lub działania hormonu anabolicznego, insuliny (Ryc. 2). Zatem do bezpośrednich przyczyn hiperglikemii zaliczamy następujące defekty patofizjologiczne: zaburzenie wydzielania insuliny – gdy trzustka nie wytwarza wystarczającej ilości insuliny oraz całkowite zahamowanie procesu wytwarzania insuliny; i/lub upośledzenie działania insuliny spowodowane spadkiem wrażliwości tkanek obwodowych (np. wątroby, mięśni szkieletowych, tkanki tłuszczowej) na działanie powyższego hormonu – gdy organizm nie jest w stanie w sposób skuteczny wykorzystać endogennej insuliny w procesie metabolizmu węglowodanów (tzw. insulinooporność, IR) [5,10].



Rycina 2. Zaburzenia występujące na poziomie działania oraz wydzielania hormonu anabolicznego, insuliny, prowadzące do rozwoju klinicznie jawnej T2DM [11].

Wzrost poziomu glukozy, aminokwasów oraz wolnych kwasów tłuszczowych we krwi po spożytym posiłku (tzw. bodziec hiperglikemiczny) powoduje zmniejszenie wydzielania glukagonu przez komórki λ i tym samym wyzwała dwufazową sekrecję insuliny. Ponadto zwiększone stężenie endogennych hormonów inkretynowych uwalnianych przez błonę śluzową jelita cienkiego po posiłku, tj. glukagonopodobny peptyd-1 (GLP-1) oraz

Uzasadnienie podjętej tematyki badawczej

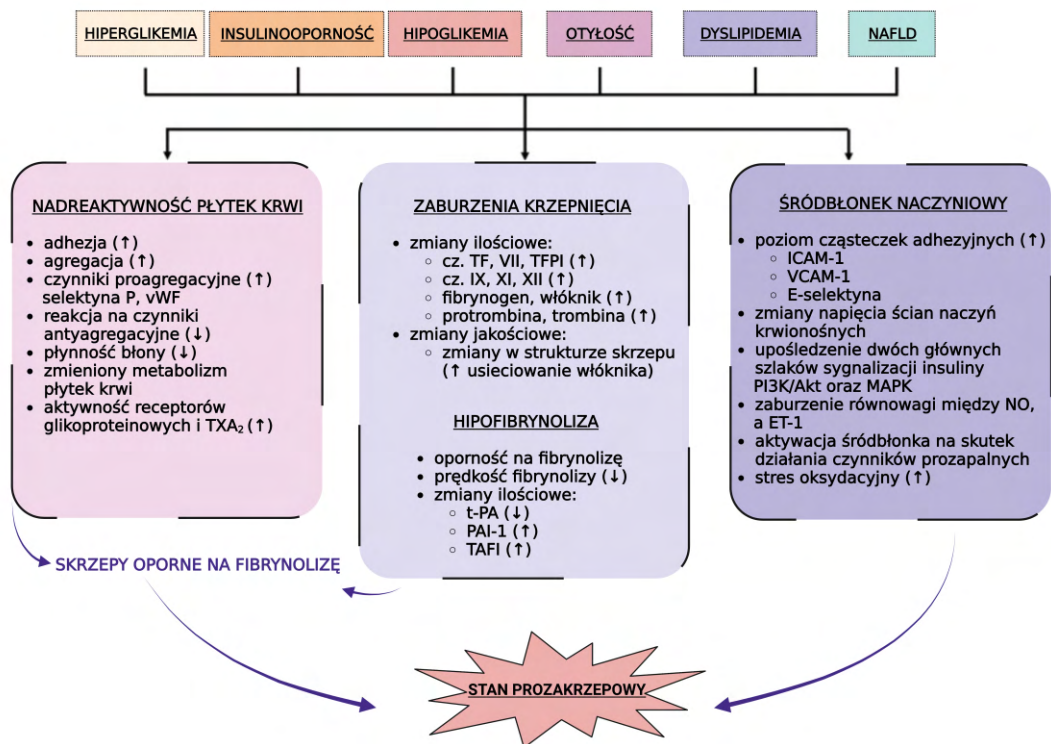
glukozozależny peptyd insulinotropowy (GIP), a także neuroprzekaźników odpowiedzialnych za przywspółczulną aktywację cholinergiczną nerwu błędnego również wzmacnia wydzielanie insuliny. Najpierw obserwowany jest natychmiastowy, skokowy wyrzut insuliny zdeponowanej w ziarnistościach cytoplazmatycznych komórek β wysp trzustkowych (trwający kilka minut), po którym następuje zwiększona synteza i uwalnianie insuliny (trwające aż kilkadziesiąt minut). W przypadku gdy stężenie glukozy utrzymuje się na wysokim poziomie następuje długotrwałe uwalnianie insuliny [12-14].

Pierwsza faza wydzielania insuliny odgrywa istotną rolę w utrzymaniu homeostazy glukozy w osoczu, gdyż odpowiada za przygotowanie tkanek obwodowych na spożycie posiłku, hamowanie endogennej syntezy glukozy w wątrobie oraz hamowanie procesu lipolizy. Upośledzenie powyższego procesu lub całkowity zanik jest bardzo wczesnym oraz częstym zaburzeniem, objawiającym się hiperglikemią poposiłkową, które ujawnia się w toku rozwoju pełnoobjawowej T2DM, a także upośledzonej tolerancji glukozy (IGT). Natomiast w stanie przedcukrzycowym druga faza wydzielania insuliny przebiega prawidłowo lub jest upośledzona w nieznacznym stopniu. Faza ta odpowiada za niewielkie hamowanie produkcji glukozy w wątrobie oraz zwiększone wykorzystanie glukozy w tkankach obwodowych. Choć znaczenie drugiej fazy wydzielania insuliny jest stosunkowo niedoceniane w porównaniu z fazą pierwszą, jest ona również niezbędna dla utrzymania prawidłowej homeostazy glukozy [14,15]. W początkowym stadium u pacjentów z T2DM obserwujemy hiperinsulinemię, która jest odpowiedzią kompensacyjną komórek β trzustki na zjawisko wzrostu oporności tkanek obwodowych na insulinę. Z czasem czynność komórek β zanika wraz z jednoczesnym narastaniem hiperglikemii (Ryc. 2), co w konsekwencji prowadzi także do stopniowego upośledzenia drugiej fazy sekrecji insuliny. Dlatego też u pacjentów z T2DM krzywa dobowej insulinemii wraz z progresją choroby ulega zjawisku tzw. wypłaszczenia [11-13,16-17].

W przeprowadzonych dotychczas badaniach [18-22], u pacjentów ze stanem przedcukrzycowym, z rozwiniętą cukrzycą, a także u krewnych pierwszego stopnia pacjentów z cukrzycą, u których nie wykazano istotnych nieprawidłowości względem tolerancji glukozy odnotowano także upośledzenie pulsacyjnego i oscylacyjnego charakteru wydzielania insuliny [13,17]. Ponadto u pacjentów w początkowym stadium zaobserwowano nasilone wydzielanie niedojrzałych ziarnistości bogatych w proinsulinę (zanim nastąpi ich konwersja do insuliny) z komórek β , tzw. hiperproinsulinemia, jako odpowiedź na zjawisko hiperglikemii oraz stan IR [13,23,24].

Zaburzenia układu krzepnięcia i fibrynolizy u pacjentów z T2DM

Złożone i wieloczynnikowe zaburzenia metaboliczne współistniejące z cukrzycą, m.in. hiperglikemia i IR, prowadzą do zaburzenia równowagi fizjologicznej między procesami krzepnięcia i fibrynolizy, co sprzyja rozwojowi stanu prozakrzepowego. Stan ten przejawia się zwiększoną liczbą płytek krwi, ich nadmierną aktywacją, zaburzeniami czynników krzepnięcia, hipofibrynolizą oraz dysfunkcją śródbłonna. Powyższe zjawisko jest powszechnie określane mianem trombofilii cukrzycowej (tzw. nadkrzepliwość) [25-28]. Niewątpliwie oprócz hiperglikemii i IR, do głównych czynników przyczyniających się do stanu prozakrzepowego u chorych na cukrzycę zaliczane są również inne zaburzenia metaboliczne, takie jak hipoglikemia, dyslipidemia, otyłość czy niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby (NAFLD) (Ryc. 3) [25].



Rycina 3. Zaburzenia hemostazy u pacjentów z T2DM.

Zaburzenia hemostazy

Zaburzenia hemostazy występujące u pacjentów z T2DM obejmują zarówno nieprawidłowości w obrębie mechanizmów hemostazy pierwotnej, płytkowo-naczyniowej oraz zaburzenia procesów hemostazy wtórnej, osoczowej. Zrozumienie mechanizmów zaan-

gażowanych w inicjację i progresję zaburzeń hemostazy ma kluczowe znaczenie w dążeniu do skutecznej prewencji chorób sercowo-naczyniowych u pacjentów z cukrzycą oraz opracowywaniu nowych strategii terapeutycznych.

Zgodnie z obecnymi doniesieniami, płytki krwi odgrywają istotną rolę w patogenezie i progresji powikłań naczyniowych u cukrzyków (Ryc. 3). Niewątpliwie hiperglikemia i IR zwiększają liczbę, adhezję i agregację płytek krwi poprzez zmniejszenie skuteczności przeciwapagregacyjnej prostaglandyny I₂, prostacykliny PGI₂ i tlenku azotu (NO) oraz spadek płynności błony, zmieniony metabolizm płytek krwi (zaburzenie homeostazy Ca i Mg) oraz wzrost aktywności receptorów glikoproteinowych i tromboksanu A₂ (TXA₂) [29-31].

Czynniki krzepnięcia (tzw. koagulanty) to szereg białek, zaangażowanych w proces krzepnięcia, współdziałających z płytkami krwi w procesie tworzenia skrzepu. Liczne badania wykazały, że istnieje dostrzegalny związek między współistniejącym przewlekłym stanem hiperglikemii, IR i zwiększonym poziomem czynników krzepnięcia w osoczu, w tym fibrynogenu, czynnika VII, VIII, XI, XII, czynnika von Willebranda (vWF), czynnika tkankowego (TF) oraz trombiny (IIa) (Ryc. 3). U cukrzyków obserwuje się zarówno ilościowe, jak i jakościowe zmiany czynników krzepnięcia i antykoagulantów, co skutkuje tworzeniem skrzepów opornych na lizę [25,32]. Ponadto przewlekły stan hiperglikemii indukuje proces nieenzymatycznej glikozylacji naturalnych antykoagulantów, takich jak antytrombina III (AT III), białko C i S, co może objawiać się zmniejszeniem ich poziomu oraz zaburzeniami w ich aktywności i sprzyja powstawaniu blaszki miażdżycowej oraz ryzyku wystąpienia incydentów zakrzepowych u pacjentów z T2DM [33].

U chorych na cukrzycę stan przewlekłej hiperglikemii, IR oraz zwiększone wytwarzanie reaktywnych form tlenu (ROS) przyspiesza proces glikooksydacji białek i lipidów, co skutkuje zwiększonym wytwarzaniem produktów końcowych zaawansowanej glikacji (AGEs), które następnie gromadzą się w ścianie naczyń i bezpośrednio zaburzają jego strukturę oraz funkcję. Ponadto stan zapalny o niskim stopniu złośliwości spowodowany, m.in. zwiększonym poziomem białka C-reaktywnego (CRP), również sprzyja nieodwracalnym zmianom w śródbłonku [16,26,34,35].

Do nieprawidłowości w obrębie śródbłonka zaliczyć można również zaburzenie dwóch głównych szlaków sygnalizacji insuliny: szlaku kinazy 3-fosfoinozytydu/kinazy białkowej B (PI3K/Akt) i szlaku kinazy białkowej aktywowanej mitogenem (MAPK).

Przegląd aktualnej literatury dowodzi, iż w warunkach zwiększonej oporności tkanek obwodowych na insulinę i kompensacyjnej hiperinsulinemii, insulina wykazuje działanie: pronadciśnieniowe, aterogenne, trombogenne i prokoagulacyjne oraz dochodzi do upośledzenia sygnalizacji zależnej od PI3K oraz braku wpływu na szlak MAPK lub jego wzmoczona aktywacja, co w konsekwencji prowadzi do zaburzenia równowagi między wytwarzaniem NO, a wydzielaniem endoteliny-1 (ET-1). W następstwie niniejsze zaburzenia także przyczyniają się do dysfunkcji śródbłonna [16,35].

Zaburzenia czynności śródbłonna mają ogromne znaczenie w patogenezie powikłań naczyniowych, ponieważ śródbłonek stanowi nie tylko najbardziej wewnętrzną warstwę naczyń krwionośnych biorących udział w modulowaniu napięcia i struktury ściany naczyń, ale także odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu równowagi hemostatycznej poprzez wydzielanie szeregu mediatorów, które regulują agregację płytek krwi, napięcie naczyń, proces krzepnięcia krwi oraz fibrylizację [12-15,26]. Zatem dysfunkcja śródbłonna jest główną przyczyną wielu powikłań makro- i mikronaczyniowych. Mikroangiopatie są to uszkodzenia małych naczyń krwionośnych prowadzące do retinopatii cukrzycowej, która może doprowadzić do ślepoty; neuropatii cukrzycowej (tj. uszkodzenie nerwów) i nefropatii cukrzycowej doprowadzającej do niewydolności nerek. Natomiast makroangiopatie to uszkodzenia dużych naczyń krwionośnych. Do ich konsekwencji można zaliczyć takie jednostki chorobowe jak: zawał mięśnia sercowego, udar mózgu, chorobę wieńcową oraz miażdżycę [36].

Wszystkie powyżej omówione procesy sprzyjają powstawaniu i wzrostowi blaszki miażdżycowej oraz jej destabilizacji, co stanowi morfologiczne podłoże występowania powikłań miażdżycowych – chorób naczyń obwodowych, ostrych zespołów wieńcowych, czy udaru.

Hipofibrylizacja

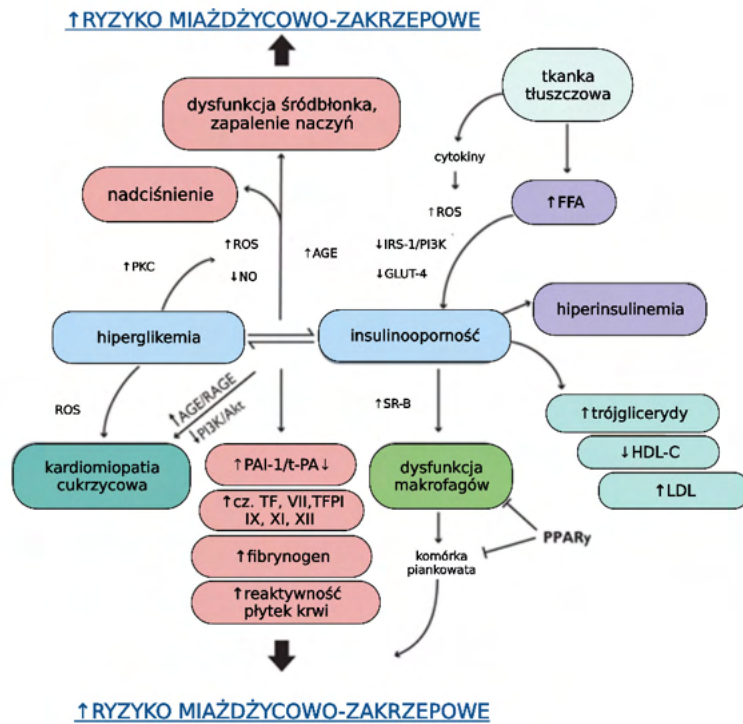
Dostępne są również doniesienia, iż przewlekły stan zwiększonego stężenia glukozy we krwi oraz zjawisko IR u pacjentów z T2DM powodują wzrost poziomu dwóch głównych czynników antyfibrynolitycznych: inhibitora aktywatora plazminogenu-1 (PAI-1) i inhibitora fibrylizacji aktywowanego trombiną (TAFI), co w konsekwencji skutkuje spadkiem poziomu czynników fibrynolitycznych. Ponadto w przebiegu cukrzycy obserwuje się zaburzenie procesu generacji trombiny, które prowadzi do generowania skrzepów o nieprawidłowej, gęstszej strukturze (zwiększone usieciowanie włókniaka), co także utrudnia proces fibrylizacji [25-28,29].

Układ czerwonokrwinkowy

Mahindrakar i wsp. dowiedli, iż u cukrzyków występują także zaburzenia w obrębie integralności, żywotności, odkształcalności i lepkości erytrocytów. Zwiększona agregacja oraz zmniejszona odkształcalność erytrocytów jest najprawdopodobniej spowodowana wzmożoną glikozylacją spektryny, białka występującego na powierzchni błony erytrocytarnej, w tej grupie pacjentów [37].

Postępowanie przeciwzakrzepowe w T2DM

Ze względu na niekorzystny profil naczyniowy u cukrzyków, obejmujący nasilone środowisko zakrzepowe i przyspieszoną miażdżycę (Ryc. 4), ryzyko niedokrwienia naczyń jest w tej populacji niemal dwukrotnie zwiększone, w tym choroby niedokrwiennej serca (CAD), udaru czy nawet zgonu. W związku z powyższym dość często konieczne jest wdrożenie odpowiedniej terapii przeciwzakrzepowej i/lub przeciwplatekowej [38,39].



Rycina 4. Stan hiperglikemii, insulinooporność, a zwiększone ryzyko rozwoju chorób układu krążenia u pacjentów z T2DM.

Obecnie brak jednoznacznie ustalonych wytycznych dotyczących optymalnego postępowania przeciwzakrzepowego w stanie prozakrzepowym u chorych na cukrzycę, a powszechnie stosowane strategie terapeutyczne są w dużej mierze podobne zarówno u pacjentów ze zdiagnozowaną cukrzycą, jak i bez [25,26,29].

Wyrównanie metaboliczne zaburzeń biochemicznych (tj. zoptymalizowana kontrola glukozy i lipidów oraz utrata masy ciała), zgodnie z wytycznymi Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego (ESC) z 2019 r. dotyczącymi cukrzycy, stanu przedcukrzycowego i chorób sercowo-naczyniowych oraz zaleceniami klinicznymi Polskiego Towarzy-

stwa Diabetologicznego (PTD) z 2022 r. dotyczącymi postępowania u chorych na cukrzycę, stanowi podstawę leczenia przeciwzakrzepowego u pacjentów z T2DM. Aktualne wytyczne zalecają także rozważenie zastosowania terapii doustnymi lekami przeciwzakrzepowymi: preparatami niebędącymi antagonistami witaminy K – nowymi doustnymi lekami przeciwzakrzepowymi (NOAC) lub antagonistami witaminy K (VKA) [25,40,41].

Do niedawna terapia VKA, pochodnymi kumaryny, takimi jak warfaryna oraz acenokumarol, była uważana za podstawową strategię w leczeniu doustnymi lekami przeciwzakrzepowymi (OAC). Efekt przeciwkrzepliwy, zależny od dawki, osiągany jest dopiero po 3-5 dniach od zastosowania VKA. Początkowo VKA wykazują działanie prozakrzepowe poprzez blokowanie naturalnych antykoagulantów, białka C, S i Z, co jest powiązane z ryzykiem wystąpienia powikłań zakrzepowych, zwłaszcza w pierwszych dniach terapii. Następnie VKA wykazują opóźnione działanie przeciwzakrzepowe poprzez hamowanie czynników krzepnięcia II, VII, IX i X. Niestety kliniczne zastosowanie VKA jest ograniczone poprzez wąski indeks terapeutyczny, dużą zmienność w odpowiedzi farmakologicznej, konieczność częstego monitorowania INR oraz rozległymi interakcjami lek-pożywienie [25,42-46].

W ostatniej dekadzie rozwój bezpośrednich doustnych antykoagulantów (DOAC), w tym inhibitora trombiny (dabigatran) i inhibitorów czynnika Xa (rywaroksaban, apiksaban i edoksaban), zrewolucjonizował dotychczasowe podejście przeciwzakrzepowe [29,47]. W literaturze fachowej spotykane jest zamienne nazewnictwo niniejszej grupy leków, m.in. DOAC, NOAC czy celowane doustne antykoagulanty (TSOAC).

Trombina, osoczowa proteaza serynowa, jest jednym z głównych celów opracowywania leków przeciwzakrzepowych, ponieważ odgrywa ważną rolę w tworzeniu skrzepów krwi poprzez przekształcanie fibrynogenu w fibrynę, aktywację czynników krzepnięcia V, VIII, XI, XII i stymulowanie płytek krwi, indukując w ten sposób ich agregację. Z drugiej strony, ograniczenie wytwarzania trombiny poprzez hamowanie trypsynopodobnego czynnika proteazy serynowej, czynnika Xa, stanowi równie obiecującą strategię antykoagulacyjną. Mechanizm działania nowych doustnych selektywnych inhibitorów czynnika Xa skierowany jest na punkt zbieżny wspólnego szlaku zewnętrznej i wewnętrznej kaskady krzepnięcia krwi. Zatem trombina nie jest bezpośrednio hamowana, co prowadzi do zmniejszenia ryzyka wystąpienia niepożądanego krwawienia [48].

Uzasadnienie podjętej tematyki badawczej

Według najnowszych doniesień naukowych, terapia z zastosowaniem NOAC wykazuje lepszą skuteczność, korzystniejszy profil bezpieczeństwa, a także mniejsze ryzyko zatorowości systemowej, poważnych krwawień i powikłań cukrzycy oraz interakcji z pokarmem w porównaniu ze standardową terapią VKA [49-52]. Obecnie DOAC stanowią preferowaną grupę leków u osób bez bezwzględnych wskazań do terapii VKA i są przepisywane zarówno w celach terapeutycznych, jak i profilaktycznych powikłań zakrzepowo-zatorowych. Jednakże, pomimo postępu w terapii przeciwcukrzycowej i przeciwzakrzepowej, cukrzyca nadal wiąże się ze zwiększoną chorobowością i śmiertelnością, głównie z przyczyn sercowo-naczyniowych, co skłania badaczy do poszukiwania nowych związków o działaniu przeciwzakrzepowym, w tym również pochodnych o strukturze sulfonamidowej.

Postępowanie w T2DM

W początkowym stadium T2DM leczenie rozpoczyna się od terapii behawioralnej, która jest nieodzownym elementem leczenia pacjentów zarówno z T1DM, jak i T2DM. Cele terapii behawioralnej obejmują modyfikację stylu życia, a więc zmianę nawyków żywieniowych, redukcję masy ciała oraz wprowadzenie umiarkowanego, regularnego wysiłku fizycznego (co najmniej co 2-3 dni), a także unikanie stresu i przestrzeganie odpowiedniej długości czasu snu. Jednakże gdy utrzymanie optymalnej kontroli metabolicznej choroby nie jest możliwe za pomocą wyżej wymienionych środków, do terapii behawioralnej należy dołączyć odpowiednią terapię lekową [41]. Leki przeciwcukrzycowe obecnie najczęściej stosowane w terapii T2DM zestawiono w Tabeli 1.

Na rynku farmaceutycznym dostępnych jest pięć klas środków terapeutycznych o różnym mechanizmie działania hipoglikemizującego:

1. leki zwiększające wrażliwość obwodową na insulinę – metformina oraz agonista receptorów γ aktywowanych przez proliferatory peroksysomów (PPAR- γ) – pioglitazon;
2. leki zwiększające sekrecję insuliny: pochodne sulfonilomocznika i glinidy;
3. leki zwiększające wydzielanie insuliny w sposób zależny od nasilenia hiperglikemii – leki inkretynowe: analogi GLP-1 (tzw. inkretynomimetyki), tj. dulaglutyd, eksenatyd, liksysenatyd, liraglutyd, semaglutyd, tirzepatyd; oraz tzw. gliptyny – inhibitory dipeptydylopeptydazy 4 (inhibitory DPP-4), tj. linagliptyna, saksagliptyna, sitagliptyna, wildagliptyna;
4. leki zmniejszające wchłanianie glukozy – inhibitory α -glukozydazy, tj. akarboza;
5. leki zmniejszające wchłanianie zwrotne glukozy w nerkach – inhibitory kotransportera 2 glukozy zależnego od jonów sodowych (inhibitory SGLT2), tzw. flozyny lub gliflozyny, tj. dapagliflozyna, empagliflozyna, ertugliflozyna, kanagliflozyna [53].

Tabela 1. Porównanie leków obecnie najczęściej stosowanych w terapii T2DM – zgodnie ze stanowiskiem Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego (2023 r.).

	metformina	pochodne sulfonilomocznika	agoniści receptora GLP-1	inhibitory DPP-4	agonista PPAR-γ	inhibitory SGLT-2
Efekt/ mechanizm	Zmniejszenie produkcji glukozy w wątrobie. Zwiększenie wrażliwości obwodowej na insulinę.	Zwiększenie wydzielania insuliny.	Zwiększenie wydzielania insuliny zależne od nasilenia hiperglikemii, hamowanie łaknienia.	Zwiększenie stężenia insuliny wydzielanej w zależności od nasilenia hiperglikemii.	Zwiększenie wrażliwości obwodowej na insulinę.	Indukcja cukromoczu.
Sila działania hipoglikemizującego	duża	duża	duża	średnia	duża	duża
Insulina w osoczu	↓	↑↑	↑↑	↑	↓	↓
Cholesterol frakcji LDL	↓	–	↓	↓ lub –	–	– lub ↑
Cholesterol frakcji HDL	↑	–	↑	↑	↑	↑
Trójglicerydy	↓	–	↓	–	↓	–
Masa ciała	↓ lub –	↑	↓↓	–	↑	↓
Ryzyko hipoglikemii	–	↑	–	–	–	–
Działania niepożądane	Zaburzenia żołądkowo-jelitowe.	Hipoglikemia, przyrost masy ciała.	Zaburzenia żołądkowo-jelitowe (nudności, wymioty).	Istotne nie występują.	Retencja płynów, przyrost masy ciała, wzrost ryzyka złamań kości długich.	Zakażenia zewnętrznych narządów płciowych, odwodnienie (szczególnie u osób starszych).
Przeciwwskazania	Niewydolność narządów (serca, mózgu, wątroby, nerek, oddechowa), alkoholizm.	Niewydolność serca, wątroby, nerek.	Neuropatia żołądkowo-jelitowa.	Niewydolność wątroby.	Niewydolność serca, wątroby, rak pęcherza moczowego.	Znaczny spadek filtracji kłębuszkowej.

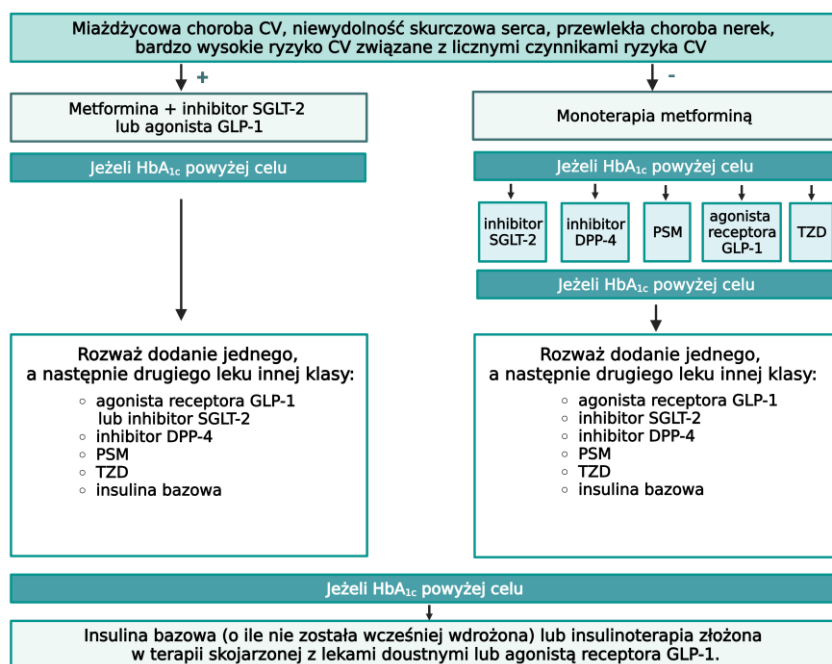
Objaśnienia: „↓” — spadek; „↑” — wzrost; „–” — brak efektu.

Terapia z wykorzystaniem środków hipoglikemizujących podlega stałej indywidualizacji pod kątem wpływu leków zarówno na parametry glikemiczne (tj. ryzyko hipoglikemii), jak i pozaglikemiczne (tj. ryzyko sercowo-naczyniowe, choroby współistniejące, masa ciała, czy gospodarka lipidowa). Obecnie metformina stanowi lek pierwszego wyboru przy rozpoczynaniu farmakoterapii T2DM, jeśli nie istnieją żadne przeciwwskazania do jej zastosowania. W sytuacji, gdy mimo zastosowania metforminy w monoterapii w zalecanych dawkach maksymalnych bądź tolerowanych niemożliwe jest utrzymanie docelowych wartości H_{bA}_{1c} lub gdy w wywiadzie obecna jest choroba współistniejąca z T2DM: miażdżycowa choroba sercowo-naczyniowa, skurczowa niewydolność serca, przewlekła choroba nerek oraz w przypadku wysokiego ryzyka sercowo-naczyniowego, terapię metforminą należy kontynuować w terapii skojarzonej z drugim lekiem hipoglikemizującym, tj. agonista receptora GLP-1/ inhibitor SGLT-2, lub insuliną bazową.

Uzasadnienie podjętej tematyki badawczej

Jeżeli po kilku tygodniach stosowania skuteczność terapeutyczna wdrożonego leczenia nie została osiągnięta, niezbędna jest inicjacja terapii skojarzonej trójlekowej z dalszym zastosowaniem metforminy. Mając na uwadze postępujący charakter T2DM, terapia z wykorzystaniem insuliny bazowej w indywidualnie dobranym schemacie podawania jest dość często wskazana, a jej wprowadzenie w terapii skojarzonej z metforminą jest możliwe z pominięciem etapów pośrednich (terapii podwójnej i potrójnej). Na dalszych etapach leczenia zarówno w skojarzeniu z insulinoterapią prostą, jak i złożoną rekomendowane jest dalsze stosowanie metforminy oraz innych doustnych leków hipoglikemizujących czy agonistów receptora GLP-1 (iniekcje podskórne). Zatem metformina występuje zawsze w każdym schemacie leczenia, na każdym etapie rozwoju T2DM, zarówno w monoterapii, jak i w skojarzeniu z innymi lekami przeciwcukrzycowymi, w przypadku braku przeciwwskazań do jej stosowania oraz dobrej tolerancji przez pacjenta. Poniżej przedstawiono schematy (Ryc. 5 i 6) obrazujące najnowsze zalecenia kliniczne (2023 r.) dotyczące postępowania u chorych na T2DM zgodnie ze stanowiskiem PTD [41].

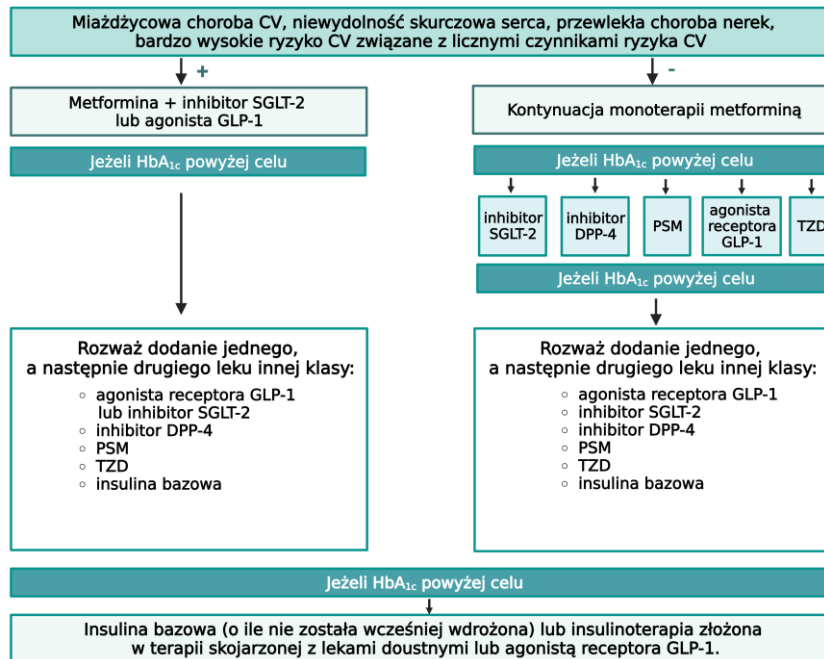
Pacjenci z cukrzycą typu 2 uprzednio nieleczeni farmakologicznie



Rycina 5. Schemat leczenia osób z T2DM uprzednio nieleczonych farmakologicznie zgodnie ze stanowiskiem PTD (2023 r.).

Uzasadnienie podjętej tematyki badawczej

Pacjenci z cukrzycą typu 2 uprzednio leczeni metforminą



Rycina 6. Schemat leczenia osób z T2DM uprzednio leczonych farmakologicznie zgodnie ze stanowiskiem PTD (2023 r.).

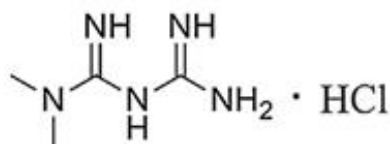
Metformina – przegląd historyczny

Historia metforminy jest ściśle związana z Rutwicą lekarską (łac. *Galega officinalis*), Ryc. 7, a dokładnie z surowcem roślinnym, zielem, pozyskiwanym z Rutwicy lekarskiej (łac. *Herba galegae*), które od średniowiecza stanowiło złoty środek w leczeniu stanów wzmożonego pragnienia oraz częstego oddawania moczu, a więc typowych objawów powszechnie znanej choroby, cukrzycy [54-57]. *Herba galegae* jest bogatym, naturalnym źródłem alkaloidów, w tym guanidyny oraz jej pochodnych o mniejszej toksyczności, galeginy i hydroksygaleginy [58]. W latach dwudziestych XX wieku, galegina była testowana u ludzi pod kątem właściwości hipoglikemizujących, ale niestety po zastosowaniu klinicznym okazała się być substancją wysoce toksyczną [54-57]. Ze względu na toksyczność guanidyny, w 1922 r. dwaj irlandzcy chemicy, Werner i Bell, przeprowadzili pionierską syntezę cząsteczki, pochodnej alkaloidu galeginowego, metforminy (Ryc. 7), która zachowuje działanie hipoglikemizujące związku macierzystego. Jednakże przez długi czas nie była ona stosowana klinicznie, najprawdopodobniej ze względu na pojawienie się insulinoterapii w latach dwudziestych niniejszego wieku, co spowodowało utratę zainteresowania potencjalnymi metodami leczenia cukrzycy [57].

A.



B.

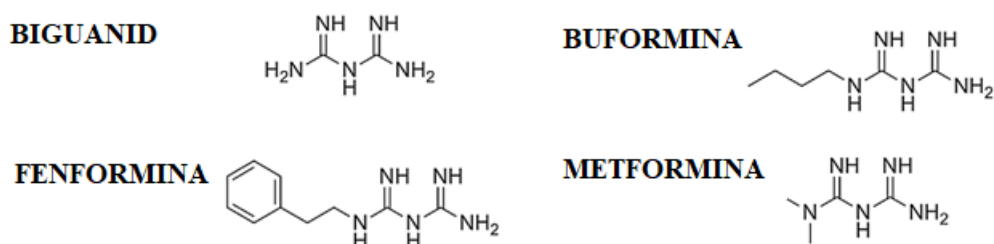


Rycina 7. A. Rutwica lekarska. **B.** Struktura chemiczna chlorowodoru metforminy [59].

Dopiero po dokonaniu rozróżnienia cukrzycy na cukrzycę insulinowrażliwą (ang. *insulin-sensitive diabetes*) oraz cukrzycę insulinoniewrażliwą (ang. *insulin-insensitive diabetes*), w latach pięćdziesiątych XX wieku zsyntetyzowano kolejne pochodne galeginy o właściwościach obniżających stężenie glukozy we krwi, tj. fenforminę i buforminę [60]. Z chemicznego punktu widzenia galegina to izoprenylowa pochodna guanidyny, natomiast metformina, fenformina i buformina to biguanidy, a więc związki zawierające

Uzasadnienie podjętej tematyki badawczej

w swojej budowie dwie sprzężone cząsteczki guanidyny, z terminalnym atomem azotu dodatkowo podstawionym kolejno następującymi ugrupowaniami: dwie grupy metylowe; ugrupowanie fenyletylowe; podstawnik *n*-butylowy (Ryc. 8). Biguanidy wykazują silniejsze działanie hipoglikemizujące w porównaniu ze związkami zawierającymi tylko jedną cząsteczkę guanidyny [54-57].



Rycina 8. Struktury pierwszych pochodnych biguanidu.

Przełom nastąpił w latach siedemdziesiątych, kiedy to fenformina oraz buformina zostały wycofane z rynku farmaceutycznego z powodu odnotowanych licznych przypadków ciężkiej lub śmiertelnej kwasicy mleczanowej, tym samym na znaczeniu zyskała metformina [54,61]. Wprawdzie metformina niesie ze sobą ryzyko wystąpienia kwasicy mleczanowej, jednakże tylko u pacjentów z zaburzeniami czynności nerek, u których jest przeciwwskazana do zastosowania [62]. W oparciu o liczne doniesienia, w tym wyniki badania United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS), w których dowiedziono akceptowalnego profilu ryzyka zastosowania metforminy, lek ten, oprócz uzyskania rejestracji na terenie Europy, został również dopuszczony przez amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA) do sprzedaży w Stanach Zjednoczonych [54,60]. Obecnie metformina jest najczęściej przepisywanym doustnym lekiem przeciwcukrzycowym na świecie, który jest przyjmowany przez ponad 150 milionów pacjentów rocznie [63].

Zastosowanie metforminy

Podstawowym wskazaniem rejestracyjnym metforminy jest leczenie dorosłych pacjentów z T2DM, zwłaszcza ze współistniejącą nadwagą, zarówno w monoterapii, jaki i w skojarzeniu z innymi lekami hipoglikemizującymi bądź insuliną. Obecnie jest to jeden z najczęściej zalecanych leków przeciwcukrzycowych w leczeniu T2DM na całym

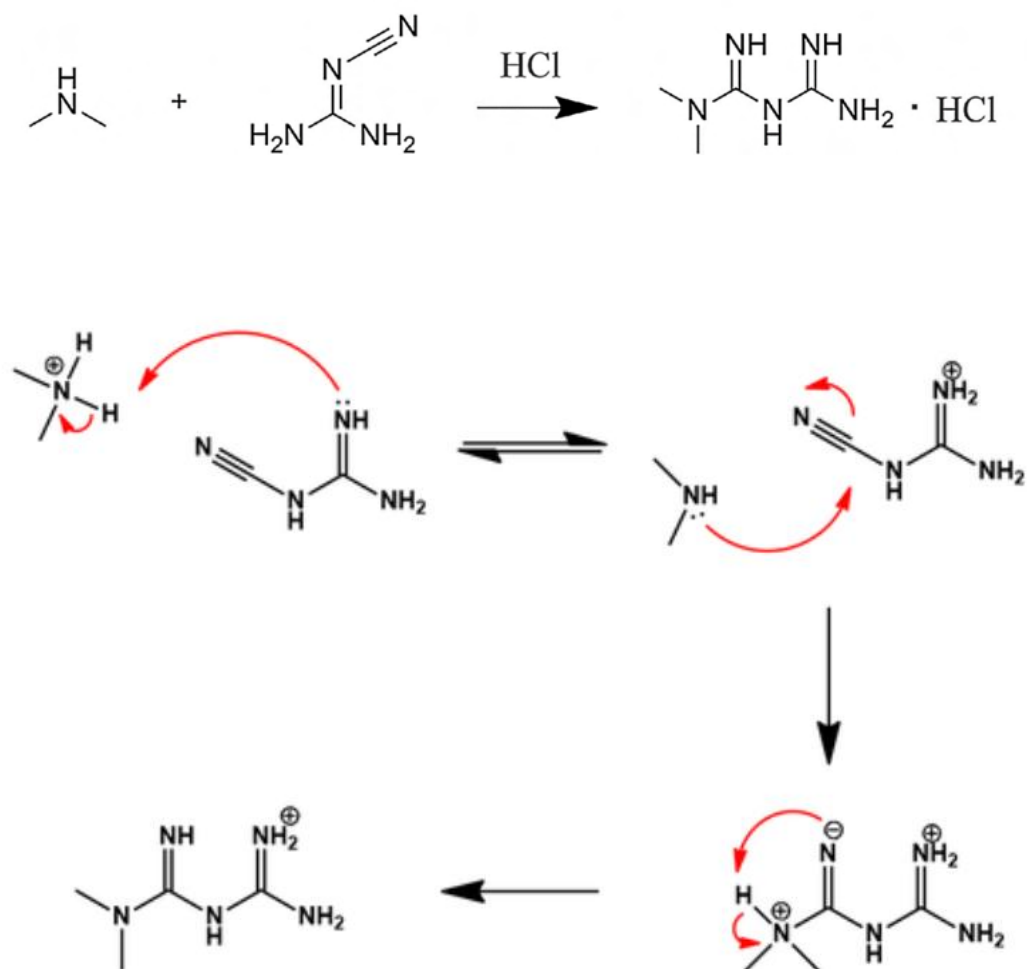
świecie. W Polsce metformina jest również zarejestrowana w leczeniu zespołu policytycznych jajników (PCOS) oraz w zapobieganiu T2DM w stanie przedcukrzycowym [62]. Warto również wspomnieć, iż metformina to jedyny lek o działaniu przeciwcukrzycowym, który jest zalecany przez Amerykańskie Towarzystwo Diabetologiczne (ADA) u pacjentów ze stanem przedcukrzycowym jako profilaktyka T2DM [64].

Ze względu na działanie plejotropowe metforminy jest ona również stosowana w kilku pozarejestrowanych wskazaniach (ang. *off-label*): w leczeniu zespołu metabolicznego, T1DM oraz w GDM. Została ona sklasyfikowana przez FDA jako lek należący do kategorii B stosowania w czasie ciąży [64]. Niemniej jednak, w Polsce nie rekomenduje się jej stosowania w czasie ciąży, a zmiana stylu życia i terapia z wykorzystaniem insuliny wciąż stanowi podstawę leczenia pacjentek z GDM [54].

Struktura oraz właściwości fizykochemiczne i farmakokinetyczne metforminy

Metformina, pochodna alkaloidu galeginowego, zawiera w swojej strukturze dwa silnie zasadowe szkielety guanidyny ($pK_a = 12.5$) połączone wspólnym atomem azotu. W rusztowaniu tym dwa atomy wodoru przy atomie azotu (N1) zostały podstawione dwoma ugrupowaniami metylowymi ($-CH_3$). Zatem z chemicznego punktu widzenia, metformina, jest dimetylową pochodną biguanidu (*N,N*-dimetylobiguanid) o silnych właściwościach zasadowych ($pK_a = 2.8$ i 11.5) [65-67]. W praktyce farmaceutycznej metformina stosowana jest doustnie (łac. *per os*) w postaci soli – chlorowodoru metforminy (chlorowoderek *N,N*-dimetylobiguanidu), który jest syntetyzowany za pomocą reakcji addycji cyjanowej z dicyjanodiamidu i chlorku dimetyloamoniowego (Ryc. 9) w temperaturze $120-140\text{ }^\circ\text{C}$ w ciągu 4 godzin z wydajnością 69% (oczywiście istnieje kilka procedur różniących się warunkami reakcji czy strategią oczyszczania, które są opatentowane przez firmy farmaceutyczne) [56,67].

Uzasadnienie podjętej tematyki badawczej



Rycina 9. Reakcja addycji cyjanowej [68].

W roztworach wodnych, jaki i w warunkach fizjologicznych (~ 6.9-7.4) metformina występuje jako monoprotynowany kation ze względu na wysoką wartość pK_a. Ponadto niska wartość logP (logP oktanol : woda = - 2.6) wskazuje, iż metformina przejawia silne właściwości hydrofilowe. W związku z powyższym, ta mała, wysoce polarna cząsteczka metforminy charakteryzuje się dobrą rozpuszczalnością w wodzie oraz słabą rozpuszczalnością w tłuszczach [56,69-71]. Jak powszechnie wiadomo cząsteczki zdysocjowane (zjonizowane) czy hydrofilowe przenikają przez błony komórkowe o wiele trudniej niż cząsteczki małe, niezdysocjowane (niezjonizowane) i lipofilne [72]. Zatem wymienione powyżej właściwości fizykochemiczne metforminy niestety ograniczają jej dyfuzję bierną przez błony komórkowe oraz tym samym przyczyniają się do jej powolnego i niecałkowitego wchłaniania z górnego odcinka jelita cienkiego. W konsekwencji skutkuje to niecałkowitą absorpcją leku, co stanowi podstawowy element ograniczający osiągnięcie odpowiedniej dostępności biologicznej (tzw. biodostępności).

Zgodnie z danymi zawartymi w karcie charakterystyki postaci leku [62] całkowita biodostępność metforminy po podaniu *per os* postaci krótkodziałającej w dawce 0.5–1.5 g wynosi około 50–60%. Maksymalne stężenie metforminy osiągane jest po upływie ok. 2.5 godziny. Jedynie w nieznacznym stopniu metformina wiąże się z białkami osocza, dlatego też po wchłonięciu ulega ona szybkiej dystrybucji do tkanek oraz erytrocytów (najprawdopodobniej jest to jej drugi kompartment dystrybucji) [63]. Choć mitochondria są głównym celem działania metforminy, może ona również oddziaływać z erytrocytami, które są komórkami krwi pozbawionymi organelli komórkowych, takich jak jądro, mitochondria, czy rybosomy. Najprawdopodobniej metformina oddziałuje na erytrocyty poprzez wpływ na płynność ich błony komórkowej [73]. Metformina nie podlega procesowi biotransformacji, gdyż dotychczas nie zidentyfikowano żadnych jej metabolitów. Stąd też brak metabolizmu w wątrobie istotnie wyróżnia farmakokinetykę metforminy od farmakokinetyki pozostałych biguanidów. Metformina wydalana jest głównie wraz z moczem (przesączanie kłębuszkowe i wydzielanie kanalikowe) w postaci niezmienionej. Pozostała, niewchłonięta frakcja jest eliminowana w około 20–30% wraz z kałem [56,62,74]. Proces eliminacji wynosi ok. 6.5 godziny i jest on przedłużony u pacjentów z zaburzeniami czynności nerek, a także bezpośrednio koreluje z klirensiem kreatyniny [57,62].

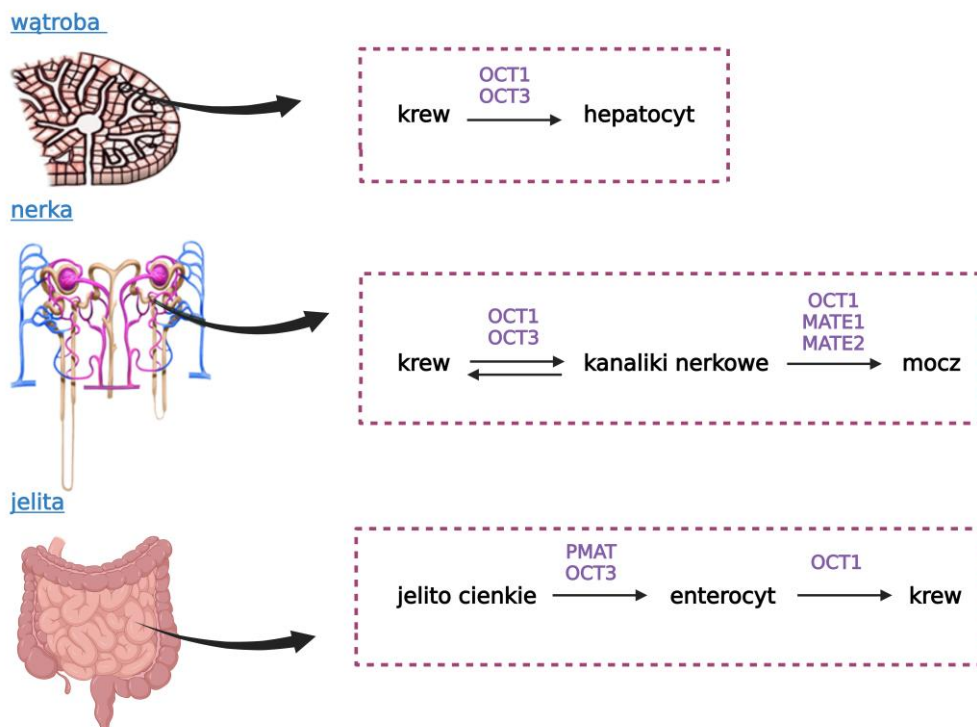
Wieloletnie doświadczenia eksperymentalne dotyczące farmakokinetyki metforminy poparte licznymi badaniami klinicznymi, wskazują na to, iż około 35–40% pacjentów przyjmujących powyższy lek w monoterapii nie jest w stanie osiągnąć odpowiedniego stężenia glukozy we krwi na czczo. Zgodnie z aktualną wiedzą stężenie metforminy w osoczu oscyluje w zakresie od 54 do 4133 ng/ml [75]. Ponadto u zdrowych ochotników zaobserwowano znaczne różnice w wartości klirensu nerkowego metforminy (150–700 ml/min) [76]. Powyższe doniesienia świadczą o znacznej zmienności w zakresie odpowiedzi na metforminę (tzw. zmienność wewnątrzsobnicza oraz międzysobnicza). Zmienność wewnątrzsobnicza może być spowodowana wieloma czynnikami, takimi jak: wiek, płeć, choroby współistniejące, nieodpowiednio dobrana dawka leku, czy nieprzestrzeganie przez pacjentów zaleceń lekarskich oraz interakcje metforminy z innymi lekami lub mikrobiomem [54]. Duża zmienność międzysobnicza w odpowiedzi klinicznej na metforminę u pacjentów z T2DM stwarza również potrzebę identyfikacji elementów genetycznych, które mogą wpływać na skuteczność terapii z wykorzystaniem metforminy. Przegląd obszernego piśmiennictwa sugeruje prawdopodobną rolę czynników

genetycznych; polimorfizm aż 31 genów ze szczególnym uwzględnieniem nadrodziny genów SLC; w odpowiedzi na leczenie metforminą. Zatem należy dokładnie przyjrzeć się roli transporterów oraz białek kodowanych przez rodzinę genów SLC, m.in. błonowym transporterem monoamin (PMAT), transporterom kationów organicznych OCT1, OCT2 oraz OCT3, a także funkcji białek ekstruzji wielolekowej i toksyn MATE1 i MATE2, gdyż są one zaangażowane w procesy wchłaniania, dystrybucji i wydalania metforminy z organizmu, co w konsekwencji może przyczyniać się do zmienności międzyosobniczej parametrów farmakokinetycznych metforminy [77].

Farmakogenetyka

Po podaniu metforminy *per os* następuje jej absorpcja ze światła jelita, która odbywa się głównie za pośrednictwem transporterów: PMAT, kodowanego przez gen *SLC29A4*, oraz najprawdopodobniej OCT3, kodowanego przez gen *SLC22A3*, zlokalizowanych na błonie podstawnej komórek absorpcyjnych kosmków jelitowych (tzw. enterocytów) [63,78]. Dalszy transport metforminy z enterocytów do płynu śródmiąższowego przebiega z udziałem transportera OCT1, kodowanego przez gen *SLC22A1*, umiejscowionego na błonie podstawno-bocznej enterocytów. Poprzez swoje uczestnictwo w wątrobowym wychwycie metforminy, transportery OCT1 oraz prawdopodobnie także transportery OCT3, obecne w błonie podstawno-bocznej hepatocytów, odpowiadają za jej główny cel działania – metabolizm glukozy. Zaś w nerkach, metformina jest wychwytywana z krążenia do komórek nabłonka nerki przez transporter OCT2, kodowany przez gen *SLC22A2*, gdzie ulega ekspresji na błonie podstawno-bocznej, a następnie jest wydalana z moczem przy pomocy białek MATE1 (gen *SLC47A1*) i MATE2 (gen *SLC47A2*), które w ten sposób regulują klirens nerkowy metforminy [63,76,78,79]. Na rycinie 10 zobrazowano transport metforminy z udziałem transporterów oraz białek kodowanych przez rodzinę genów SLC.

Uzasadnienie podjętej tematyki badawczej



Rycina 10. Transport metforminy z udziałem transporterów oraz białek kodowanych przez rodzinę genów SLC.

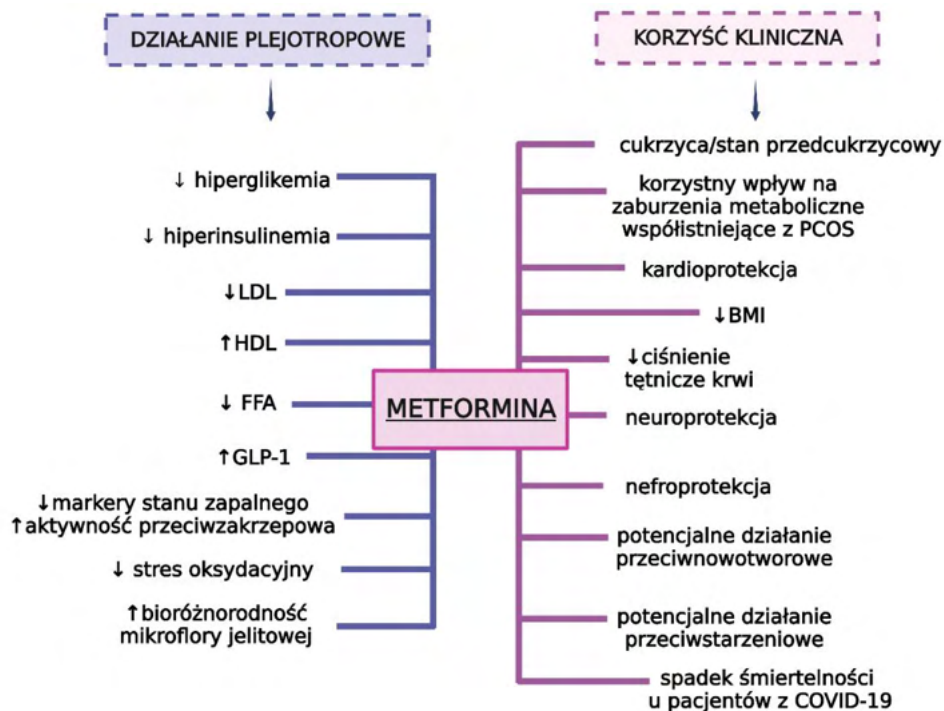
Zatem transportery leków odgrywają kluczową rolę w farmakokinetyce metforminy. Stąd też warianty genetyczne genów transportujących leki są słusznymi kandydatami do przeprowadzania dogłębnych badań. W swoim ostatnim przeglądzie systematycznym, oceniającym zależność między polimorfizmami OCT1 a danymi biochemicznymi i klinicznymi u pacjentów przyjmujących metforminę, Mofó Mato i wsp. wykazali, iż niektóre polimorfizmy genu *SLC22A1* były bezpośrednio powiązane ze zmienną odpowiedzią na lek [80]. Ponadto Xiao i wsp. wykazali interakcję pomiędzy *SLC47A1* (wariant rs2289669), a *SLC22A1* (wariant rs594709), która wpływała na poziom glukozy i insuliny, IR oraz poprawę stężenia lipidów we krwi po zastosowaniu leczenia metforminą u chińskiej populacji pacjentów [81]. Natomiast Choi i wsp. scharakteryzowali dwa niesynonimiczne warianty *SLC47A2*, które są powiązane ze znacznie niższym wychwytem metforminy [82]. Zaś Zacharenko i wsp. dowiedli, iż warianty międzygenowe, tj. rs3119309, rs7757336 i rs2481030, zlokalizowane między *SLC22A2* i *SLC22A3*, są istotnie związane z brakiem odpowiedzi na metforminę wśród pacjentów z kohorty europejskiej [83].

Uzasadnienie podjętej tematyki badawczej

Zgodnie z powyższym, można przypuszczać, iż aktywność, ekspresja oraz polimorfizm różnych wariantów w genach z nadrodziny SLC kodujących transportery PMAT, OCT1, OCT2, OCT3 oraz białka MATE1 i MATE2 może mieć wpływ na różne efekty terapeutyczne uzyskane po zastosowaniu metforminy w monoterapii u pacjentów z T2DM, dlatego też niezbędne jest prowadzenie dalszych badań na dużych kohortach dobrze przebadanych pacjentów.

Farmakodynamika metforminy

Pomimo ponad sześćdziesięcioletniego doświadczenia klinicznego oraz przeprowadzenia licznych badań, złożone mechanizmy molekularne leżące u podstawy działania metforminy nie zostały jeszcze w pełni poznane. W świetle zgromadzonej dotychczas wiedzy, metformina oddziałuje z wieloma celami oraz komórkowymi szlakami sygnałowymi, m.in. w mięśniach, tkance tłuszczowej, śródbłonku naczyń, a nawet mózgu, tym samym wywiera wpływ na liczne procesy fizjologiczne i patologiczne (Ryc. 11) [78].



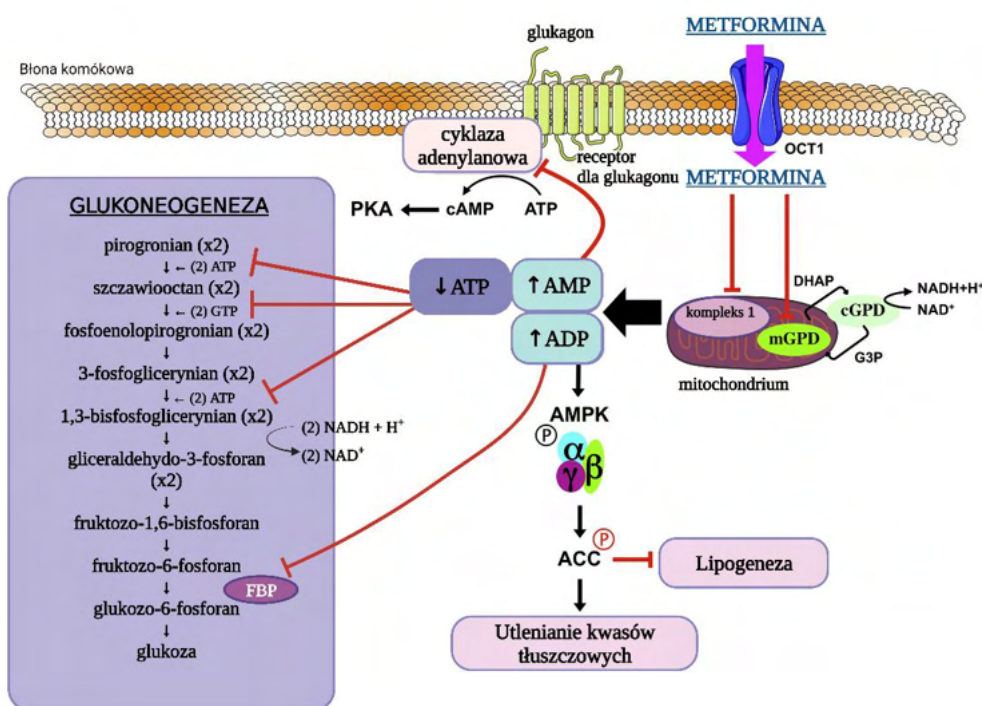
Rycina 11. Korzyści kliniczne wynikające z plejotropowego działania metforminy.
Objaśnienia: „↑” — zwiększanie, „↓” — zmniejszanie.

Zatem metformina, oprócz swojej udowodnionej skuteczności jako środka obniżającego stężenie glukozy we krwi, wykazuje również działanie plejotropowe, gdyż przejawia umiarkowane działanie przeciwzapalne, przeciwutleniające, a także potencjalne włą-

ściwości kardioprotekcyjne, czy nawet przeciwnowotworowe. W ostatnich latach metformina, jako obiecujący lek o potencjalnych właściwościach przeciwstarzeniowych, stała się przedmiotem zainteresowania wielu badaczy i klinicystów.

Działanie hipoglikemizujące

Kliniczne działanie hipoglikemizujące metforminy wynika przede wszystkim z jej zdolności do hamowania procesu glukoneogenezy, co w konsekwencji skutkuje zmniejszeniem wytwarzania glukozy w wątrobie. Na rycinie 12 przedstawiono schemat działania hipoglikemizującego metforminy. W warunkach fizjologicznych, sprotonowana postać metforminy predysponuje do jej gromadzenia w ujemnie naładowanych organellach, tj. mitochondria, w stężeniach nawet 1000-krotnie wyższych niż w środowisku pozakomórkowym [55,84]. Zdolność do akumulacji w mitochondriach jest powszechnie uważana za główny cel działania metforminy [85].



Rycina 12. Mechanizm działania hipoglikemizującego metforminy.

W następstwie zilustrowanych zmian następuje zahamowanie procesu glukoneogenezy, syntezy kwasów tłuszczowych, białek i cholesterolu (procesy anaboliczne), a także dochodzi do nasilenia wychwytu i utleniania kwasów tłuszczowych oraz wychwytu glukozy i nasilenia glikolizy (procesy kataboliczne) [75,84].

Uzasadnienie podjętej tematyki badawczej

Mając na uwadze, iż IR stanowi jeden z podstawowych mechanizmów patogenetycznych rozwoju T2DM, warto wspomnieć, iż metformina w mniejszym stopniu działa również poprzez: zwiększenie wrażliwości tkanek obwodowych na insulinę oraz ułatwienie wychwytu i wykorzystania glukozy w tkankach obwodowych poprzez zwiększenie zdolności transportowych wszystkich rodzajów transporterów glukozy przez błony komórkowe (GLUTs, kodowanych przez *SLC2A4*). [62,63,86]. Ponadto metformina zmniejsza wchłanianie glukozy w środkowej części jelita cienkiego i wykazuje zdolność do zwiększania uwalniania GLP-1 poprzez jelitowy szlak metaboliczny zależny od AMPK oraz wpływa na metabolizm kwasów żółciowych i mikrobiom, co zwiększa wydzielanie insuliny i obniża poziom glukozy w osoczu [54,62,73,84,87].

Kardioprotekcyjne właściwości metforminy

Oprócz właściwości hipoglikemizujących metforminy, w wielu badaniach klinicznych i eksperymentalnych wykazano również jej korzystny wpływ na układ sercowo-naczyniowy, w tym na profilaktykę chorób serca i naczyń [88,89]. Ochronne działanie metforminy na układ sercowo-naczyniowy zostało po raz pierwszy odkryte przez brytyjską grupę badawczą w ponad dziesięcioletnim, wieloośrodkowym, randomizowanym, prospektywnym badaniu UKPDS, w którym wzięło udział aż 1704 pacjentów z nadwagą oraz T2DM. Uzyskane w niniejszym badaniu wyniki dowodzą, iż metformina nie tylko znacząco zmniejsza zgony związane z cukrzycą (o 42%), ale także zmniejsza ryzyko zawału mięśnia sercowego (o 39%) oraz ryzyko udaru mózgu (o 41%). Ponadto zaobserwowano także 36% spadek śmiertelności ogólnej [90]. Te niezwykle korzystne wyniki uzyskane w badaniu UKPDS ugruntowały jej wiodącą pozycję wśród leków hipoglikemizujących stosowanych w T2DM oraz zachęciły naukowców do zbadania kardioprotekcyjnego mechanizmu działania metforminy.

Aktualny stan wiedzy dowodzi, iż mechanizm odpowiedzialny za kardioprotekcyjne działanie metforminy jest złożony i wielokierunkowy. Dane doświadczalne i kliniczne sugerują bezpośredni wpływ na metabolizm, strukturę oraz funkcję serca (Tab. 2) [91].

Tabela 2. Dane doświadczalne i kliniczne oceniające wpływ metforminy na metabolizm, strukturę oraz funkcję serca.

Rodzaj badania	Obserwowany efekt po zastosowaniu metforminy
model komórkowy <i>in vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> • hamowanie adhezji monocytów do komórek śródbłonna przy zmniejszonym wydzielaniu cytokin prozapalnych oraz zapobieganie tworzeniu się komórek piankowatych [92], • osłabienie apoptozy kardiomiocytów wywołanej stresem oksydacyjnym [93], • znaczące hamowanie nadekspresji transformującego czynnika wzrostu $\beta 1$ (TGF-$\beta 1$) i czynnika wzrostu fibroblastów 2 (bFGF) [93], • spadek poziomu cząsteczek adhezyjnych: VCAM-1 i ICAM-1, indukowanych przez czynnik martwicy nowotworów (TNF-λ) [94], • wzrost uwalniania tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA) [88].
model zwierzęcy <i>in vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> • hamowanie apoptozy kardiomiocytów wywołanej stresem oksydacyjnym i zapobieganie progresji niewydolności serca [95], • poprawa przebudowy mięśnia sercowego poprzez zmniejszenie zwłóknienia, przerostu i uszkodzeń miocytów wywołanych na skutek niedokrwienia [96], • poprawa czynności mięśnia sercowego (zachowana frakcja wyrzutowa lewej komory) [97,98], • zmniejszenie rozmiaru zawału serca, przeciwdziałanie przerostowi oraz apoptozie mięśnia sercowego [99].
badania kliniczne	<ul style="list-style-type: none"> • znaczące zmniejszenie przerostu lewej komory (LVH) oraz indeksu masy lewej komory (LVMI) u pacjentów z CAD, insulinoopornością i/lub stanem przedcukrzycowym [100], • korzystny wpływ na profil lipidowy osocza, w tym obniżenie cholesterolu całkowitego (TC), cholesterolu frakcji lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) i trójglicerydów (TG) oraz znaczące zmniejszenie masy ciała u pacjentów z T2DM [101].

Przegląd literatury specjalistycznej dowodzi, iż metformina wykazuje również właściwości przeciwzakrzepowe. Chociaż mechanizm przeciwzakrzepowego działania metforminy pozostaje nadal niewyjaśniony, dostępne dowody z badań *in vitro* wskazują na jej zdolność do zmniejszania aktywacji i adhezji płytek krwi oraz działanie przeciwagregacyjne, polegające na zmniejszaniu agregacji spontanicznej oraz indukowanej ADP [27,102,103]. Xin i wsp. donieśli, że metformina ma zdolność hamowania uwalniania mtDNA (mitochondrialnego DNA), co prowadzi do hamowania aktywacji płytek krwi poprzez szlak zależny od receptora lektynowego typu C (DC-SIGN) i w ten sposób zapobiega zakrzepicy zarówno żyłnej, jak i tętniczej [104].

Przegląd uzyskanych wyników z przeprowadzonych dotychczas badań klinicznych oceniających wpływ metforminy na układ sercowo-naczyniowy został zamieszczony w sekcji 3.2.2. w publikacji pt. „Is metformin a geroprotector? A peek into the current clinical and experimental data.” (**Publikacja I**).

Modyfikacje strukturalne szkieletu metforminy

Silnie hydrofilowy charakter metforminy utrudnia jej zdolność do przenikania przez błony komórkowe na drodze dyfuzji biernej, co prowadzi do jej powolnego wchłaniania, a więc stanowi element ograniczający jej biodostępność po podaniu doustnym. Ponadto istnieje duża zmienność między- i wewnątrzsobnicza w odpowiedzi klinicznej na metforminę. Obecnie dostępnych jest kilka doniesień na temat modyfikacji strukturalnych metforminy (pochodne, proleki) przeprowadzonych w celu poprawy jej parametrów fizykochemicznych oraz farmakokinetycznych. Huttunen i wsp. zsyntetyzowali szereg proleków metforminy zawierających w swojej budowie ugrupowanie tioalkilowe ($RSNR_1R_2$) [105,106]. Ze względu na lepszą przenikalność przez błony komórkowe, tioalkilowe proleki metforminy szybko gromadzą się w erytrocytach, gdzie następnie są biokonwertowane przez endogenne tiole (RSH), tj. zredukowany glutation (GSH), do leku macierzystego, metforminy, a następnie w sposób ilościowy uwalniają metforminę do osocza. Zastosowanie niniejszej strategii prolekowej znacznie zwiększyło wchłanianie i biodostępność leku macierzystego [105-107] oraz wydłużyło biologiczny okres półtrwania metforminy po podaniu doustnym u szczurów [106].

Modyfikacja strukturalna ugrupowania umiejscowionego przy atomie siarki pozwala na poprawę właściwości fizykochemicznych tioalkilowego proleku metforminy, np. poprzez dodanie grup polarnych można zwiększyć jego rozpuszczalność w wodzie, natomiast przez wydłużenie lub rozgałęzienie łańcucha alkilowego można poprawić jego lipofilowość. Zgodnie z powyższym, Huttunen i wsp. zsyntetyzowali tioalkilowy prolek metforminy zawierający w swojej strukturze podstawnik oktylowy. Modyfikacja ta pozwoliła uzyskać cząsteczkę o znacznej lipofilowości, a tym samym zwiększonej przenikalności w monowarstwie komórek gruczołakoraka ludzkiego nabłonka jelita grubego (Caco-2), który stanowi dobry model do oceny wchłaniania potencjalnego leku w warunkach *in vitro* [107].

Dalsze prace eksperymentalne zespołu doktor Kristiiny Huttunen doprowadziły do uzyskania związków zawierających w swojej strukturze ugrupowanie sulfonamidowe ($RSO_2NR_1R_2$), które stały się obiecującymi kandydatami [108]. W warunkach *in vitro* zsyntetyzowany prolek *o*-nitro-*p*-trifluorometylosulfonamidowy ulegał bioaktywacji przez S-transferazę glutationową (GST) w ludzkich oraz szczurzych frakcjach subkomórkowych wątroby. Natomiast dwie pozostałe cząsteczki, tj. *o*-nitrobenzenosulfonamid

oraz *p*-nitrobenzenosulfonamid, były stabilne enzymatycznie, co czyni je pochodnymi, a nie prolekami [89].

Ostatnie doniesienia zespołu pod kierownictwem pani dr hab. Markowicz-Piaseckiej wskazują na bezpośredni związek między strukturalną modyfikacją szkieletu metforminy w sulfonamidy, takie jak nitrobenzenosulfonamidy, fluorowcowane benzenosulfonamidy, alkilosulfonamidy, a możliwością otrzymania potencjalnych związków o silniejszych właściwościach przeciwzakrzepowych niż lek macierzysty, metformina [89,109, 110]. Nowe sulfonamidowe pochodne metforminy korzystnie wpływają na hemostazę osoczną, w tym tworzenie skrzepu, jego stabilizację, fibrylizację, a także aktywność płytek krwi [108].

Ponadto Xin i wsp. dowiedli, iż wprowadzenie grupy sulfonamidowej do pochodnej biguanidu może hamować tworzenie skrzepu poprzez zmniejszenie agregacji płytek krwi, adhezji i retrakcji skrzepu. Ich nowo zsyntetyzowana *N*-trifluorometanosulfonylowa pochodna biguanidu utrudnia aktywację integryny GPIIb/IIIa i ekspresję białka transbłonowego typu 1 (CD62P) [111].

W chemii medycznej ugrupowanie sulfonamidowe stanowi uprzywilejowany, często powtarzający się motyw strukturalny, ze względu na szerokie spektrum działania farmakologicznego sulfonamidów. Od wielu lat znajdują one zastosowanie kliniczne w różnych jednostkach chorobowych, tj. infekcje bakteryjne, wirusowe, czy grzybicze; cukrzyca (np. gliklazyd, glipizyd, glibenklamid, glikwidon czy glimepiryd); hipercholesterolemia (rozuwastatyna); nadciśnienie (np. tiazyny, furosemid, indapamid, chlortalidon); stany zapalne (nimesulid, celekoksyb); psychoza (sulpiryd); jaskra (acetazolamid, dorzolamid i brynzolamid); padaczka (zonisamid, topiramid); a nawet rak (np. SLC-0111, lek o działaniu przeciwnowotworowym, który jest obecnie w II fazie badań klinicznych). Stąd też liczne cząsteczki oparte na strukturze sulfonamidu są obecnie powszechnie stosowane do projektowania i opracowywania nowych potencjalnych związków leczniczych, o lepszej skuteczności i mniejszej toksyczności. Zgodnie z przeglądem literaturowym, sulfonamidy z powodu szerokiego zakresu bioaktywności, również cieszą się szczególnym zainteresowaniem w kierunku zmiany ich przeznaczenia terapeutycznego [108,111-113]. Zatem zastosowanie chemicznej modyfikacji strukturalnej metforminy z wykorzystaniem sulfonamidów zawierających dodatkowe ugrupowania może być niezmiernie ważne w celu pozyskania potencjalnych leków o korzystnych

Uzasadnienie podjętej tematyki badawczej

właściwościach obniżających poziom glukozy i wysoce pożądanej aktywności antykoagulacyjnej.

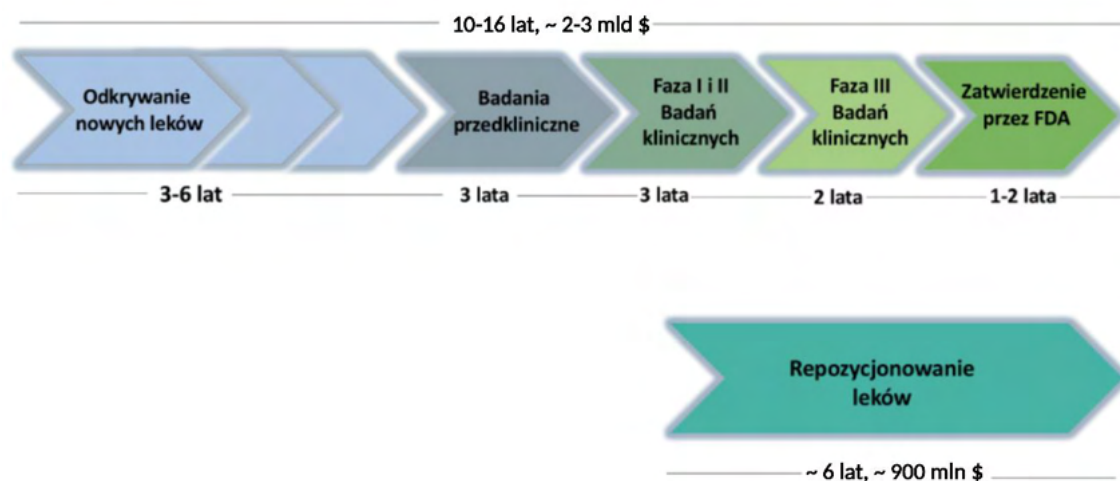
Repozycjonowanie leków

Konwencjonalne odkrywanie i opracowywanie leków jest żmudnym oraz niezwykle czasochłonnym procesem, który obarczony jest dużymi kosztami badań i rozwoju (R&D) oraz bardzo wysokim ryzykiem niepowodzenia. Z powszechnie dostępnych raportów wynika, iż przeciętny koszt całkowity odkrywania i opracowywania leków *de novo* oscyluje w granicach 2-3 miliardów dolarów. Natomiast całkowity proces opracowywania nowej cząsteczki leczniczej zajmuje od 10 do 16 lat [114,115]. Przegląd literatury naukowej dowodzi, iż jedynie jedna cząsteczka spośród tysiąca kandydatów na potencjalny środek leczniczy o potwierdzonej skuteczności w badaniach przedklinicznych przechodzi do I fazy badań klinicznych. Natomiast spośród leków zakwalifikowanych do I fazy badań klinicznych tylko 10% zostaje wdrożonych na rynek farmaceutyczny [114-116]. Firmy farmaceutyczne oraz naukowcy z sektora publicznego, mając na uwadze pilną potrzebę opracowywania nowych leków oraz wszystkie powyższe aspekty; poszukują nowych, alternatywnych metod odkrywania leków.

W rozwijającej się dziedzinie polifarmakologii repozycjonowanie leków stało się alternatywą dla opracowywania leków *de novo*. Podejście polegające na zmianie przeznaczenia leku umożliwia odkrywanie nowych celów biologicznych poza zakresem pierwotnego wskazania terapeutycznego dla cząsteczek eksperymentalnych oraz leków zatwierdzonych, badanych, wycofanych czy wyeliminowanych w trakcie badań klinicznych. W literaturze fachowej dla strategii określanej mianem „repozycjonowania leków” spotykane są również pojęcia stosowane zamiennie, tj. „przekierowywanie leków” lub „znajdowanie nowych zastosowań dla starych leków” (ang. *drug repurposing*, *drug re-profiling*, *drug re-tasking*, *drug repositioning*). Repozyjonowanie leków jest bardzo owocną ścieżką umożliwiającą pozyskiwanie leków o nowych wskazaniach terapeutycznych, która pozwala na skrócenie czasu, jak i ograniczenie kosztów związanych z badaniami wstępnymi, a więc opracowywaniem nowych receptur, optymalizacją chemiczną, przesiewową analizą *in vitro* oraz *in vivo*, badaniami toksykologicznymi czy klinicznymi. Leki o zmienionym przeznaczeniu są zazwyczaj zatwierdzane w ciągu 3-12 lat, zaś ich całkowity koszt jest aż o połowę mniejszy (Ryc. 13) [114-116]. Podejście zmiany przeznaczenia leku jest także związane z wyższym wskaźnikiem powodzenia w procesie zatwierdzania leku przez organy regulacyjne ds. leków w porównaniu z cząsteczkami leczniczymi opracowanymi *de novo*. Wynika to z dostępności już wcześniej zatwierdzonych, przez organ regulacyjny ds. leków, danych dotyczących dawki oraz narażenia

Uzasadnienie podjętej tematyki badawczej

(poprzednie badania przedkliniczne oraz I-IIb faza badań klinicznych), czy profilu bezpieczeństwa (toksykologia przedkliniczna i III faza badań klinicznych zatwierdzonego leku) [117]. Istnieją dwie główne strategie zmiany przeznaczenia leku: *on-target* – cel biologiczny leku jest ten sam, ale choroba jest inna, oraz *off-target* – zarówno cel, jak i wskazania medyczne są nowe [114].



Rycina 13. Porównanie procesu odkrywania i opracowywania leków *de novo* ze strategią repozycjonowania [114].

Zmiana przeznaczenia leków w poszukiwaniu nowych substancji leczniczych zyskała ogromne zainteresowanie w ostatnich latach ze względu na globalne zagrożenie związane z pandemią COVID-19 (ang. *coronavirus disease 2019*), wywołaną przez wirus SARS-CoV-2, które wymagało pilnego opracowania skutecznego leku. W ciągu sześciu miesięcy od wybuchu pandemii, Komisja Europejska (KE), bazując na pozytywnej opinii wydanej przez Europejską Agencję Leków (EMA) przyznała warunkowe pozwolenie na dopuszczenie do obrotu analogu nukleozydu, remdesiviru, do leczenia COVID-19 [117,118]. Zaś pierwotnie remdesivir został opracowany do leczenia gorączki krwotocznej.

Niniejsza strategia koncentruje się na wirtualnym przeszukiwaniu bibliotek leków w celu poszukiwania podobieństw w efekcie oraz sposobie działania cząsteczek, a także w kierunku ujawnienia nowych celów, m.in. badanie powiązań między strukturą chemiczną leku a działaniem niepożądanym, czy zależności między lekami a chorobami. Zatem repozycjonowanie leków nie tylko dostarcza dane charakteryzujące cele i fenotypy chorób, czy profile leków, ale pozwala uzyskać całe mapy szlaków [116,118].

Uzasadnienie podjętej tematyki badawczej

Metody obliczeniowe, tzw. zmiana przeznaczenia leków *in silico* (komputerowe repozycjonowanie) są także powszechnie stosowane do repozycjonowania leków [119]. Ponadto generowanie oraz walidację hipotez dotyczących repozycjonowania leków oferuje również elektroniczna dokumentacja medyczna (EHRs) powiązana z prowadzeniem nadzoru nad bezpieczeństwem farmakoterapii (ang. *pharmacovigilance*) [120].

Obserwacje kliniczne lekarzy są również ważnym elementem podejścia ukierunkowanego na zmianę przeznaczenia. Zdarza się, że lek może także wywierać zaskakujące działanie farmakologiczne, które pierwotnie nie było zamierzone. Modelowym przykładem jest minoksydyl, lek opracowany w latach pięćdziesiątych XX wieku przez firmę Upjohn, który miał znaleźć zastosowanie w leczeniu wrzodów żołądka i dwunastnicy. Jednakże zsyntetyzowana cząsteczka wykazywała efekt silnie rozszerzający naczynia krwionośne. Początkowo minoksydyl został zatwierdzony przez FDA w leczeniu ciężkich postaci nadciśnienia tętniczego, ale ze względu na liczne działania niepożądane powyższe wskazanie rejestracyjne zostało usunięte. Nieoczekiwanym efektem farmakologicznym była kliniczna odpowiedź minoksydyli w przypadku pacjentów borykających się z łysieniem androgenowym. Lek ten początkowo był przepisywany przez lekarzy *off-label*, a następnie w 1986 r. został zatwierdzony przez FDA do stosowania w powyższej jednostce chorobowej [121].

Politerapia a leki o wielu celach

Nieustanny postęp w dziedzinie biochemii, biologii molekularnej oraz genetyki pozwala naukowcom identyfikować nowe cele molekularne odgrywające kluczową rolę w mechanizmach leżących u podstawy danej choroby. Wraz z sekwencjonowaniem ludzkiego genomu oraz licznymi pracami nad genomem liczba celów molekularnych wciąż wzrasta [122]. W przemyśle farmaceutycznym konwencjonalne strategie odkrywania leków bazują na podejściu: „jeden lek ↔ jeden cel ↔ jedna choroba”. Dzięki niniejszym strategiom opracowano wiele leków działających na określone cele biologiczne oraz zidentyfikowano molekularne mechanizmy interakcji lek–cel. Jednakże podejścia te nie doceniają złożoności szlaków chorobowych [123].

Politerapia (tj. terapia skojarzona, ang. *polytherapy*) daje optymalne korzyści kliniczne w leczeniu wieloczynnikowych chorób przewlekłych, tj. dwóch lub więcej przewlekłych schorzeń, ale niestety stwarza także wysokie ryzyko klinicznie istotnych interakcji lek–lek i lek–pożywienie, działań niepożądanych, toksyczności i polipragmazji. W celu zwiększenia efektu terapeutycznego oraz poprawy stosowania się do zaleceń lekarskich przez pacjentów, na rynek farmaceutyczny wprowadzono preparaty złożone, które zawierają odpowiednio dobrane dawki dwóch lub więcej substancji farmakologicznie czynnych. Wśród najczęściej stosowanych preparatów złożonych znajdują się kombinacje leków hipoglikemizujących, hipotensyjnych i hipolipemizujących [26,124].

Zastosowanie strategii ukierunkowanej na wiele celów, w których pojedyncza cząsteczka selektywnie moduluje różne cele molekularne jednego, unikalnego szlaku chorobowego lub wielu szlaków chorobowych, stanowi obiecującą alternatywę dla terapii skojarzonej. Zatem podejście wielocelowe może zapewnić lepszą skuteczność i bezpieczeństwo w porównaniu z lekami jednocelowymi. Leki multimodalne łączą różne podjednostki strukturalne w jednym rusztowaniu, umożliwiając w ten sposób identyfikację molekularną za pomocą więcej niż jednego bioreceptora [124-128]. Mając na uwadze znaczny odsetek pacjentów chorych na cukrzycę o wysokim ryzyku sercowo-naczyniowym, punktem przełomowym byłoby opracowanie leku multimodalnego, który zarówno obniża poziom glukozy we krwi, jak i wykazuje działanie przeciwzakrzepowe, co jest niezwykle pożądane w leczeniu oraz przeciwdziałaniu powikłaniom współistniejącym z niniejszą jednostką chorobową [126-128].

Cele naukowe rozprawy doktorskiej

Na przestrzeni ostatniej dekady, metformina, stała się obiecującym kandydatem w strategii repozycjonowania leków, ze względu na jej dobry profil bezpieczeństwa, długotrwałe stosowanie u ludzi oraz wiele cennych właściwości, szczegółowo opisanych we wstępie niniejszej dysertacji, obejmujących jej wielokierunkowy wpływ na glikemię oraz plejotropowy mechanizm działania, w tym korzystny wpływ na profil lipidowy osocza, zwiększenie aktywności fibrynolitycznej osocza oraz redukcję stresu oksydacyjnego; a także jej ochronny wpływ na układ sercowo-naczyniowy. Wszystkie omówione powyżej wielokierunkowe właściwości farmakologiczne metforminy uzasadniają jej wiodącą pozycję w leczeniu pacjentów z T2DM, a także otwierają nowe możliwości zastosowania tej wyjątkowej cząsteczki w profilaktyce i leczeniu wielu złożonych jednostek chorobowych.

Jednakże mimo wielu zalet, metformina, ze względu na swą budowę chemiczną i silnie hydrofilowy charakter, wykazuje niekorzystne właściwości farmakokinetyczne, m.in. relatywnie wolne i niecałkowite wchłanianie z przewodu pokarmowego, co w konsekwencji przejawia się umiarkowaną biodostępnością oraz znacznymi różnicami międzysobniczymi i wewnątrzsobniczymi w odpowiedzi klinicznej na lek. W celu poprawy profilu farmakokinetycznego i fizykochemicznego macierzystego leku w University of Eastern Finland zsyntetyzowano szereg analogów metforminy. Obiecującymi kandydatami okazały się pochodne sulfonamidowe.

Wobec powyższego, przedmiotem przedstawionego jednotematycznego zbioru publikacji naukowych, stanowiących podstawę niniejszego osiągnięcia, było przeprowadzenie badań przesiewowych 14 nowych, nieopisanych dotychczas w literaturze pochodnych metforminy o budowie sulfonamidowej. Struktury chemiczne analizowanych związków zostały przedstawione w Tabeli 3. Badania realizowane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej można podzielić na cztery etapy:

ETAP 1. Szczegółowa analiza potencjału terapeutycznego metforminy jako środka przeciwstarzeniowego wraz z uwzględnieniem molekularnych mechanizmów działania metforminy w kontekście jej potencjalnego wykorzystania jako leku o wielokierunkowym działaniu (**Publikacja I**).

ETAP 2. Ocena aktywności biologicznej nowych sulfonamidowych analogów metforminy (**Publikacja II i III**).

ETAP 3. Badania biogodności nowych pochodnych metforminy w modelu ludzkich erytrocytów (tzw. erytrotoksyczność) (**Publikacja III**).

ETAP 4. Ustalenie zależności pomiędzy budową a aktywnością biologiczną badanych pochodnych (**Publikacja II i III**). Podsumowanie wyników uzyskanych w przeprowadzonych badaniach naukowych.

Szczegółowe cele badawcze obejmowały:

ETAP 2.

1. Ocena wpływu nowych pochodnych metforminy na żywotność, integralność oraz morfologię ludzkich komórek śródbłonna żyły pępowinowej (HUVEC) oraz ludzkich komórek mięśni gładkich aorty (AoSMC) z wykorzystaniem eksperymentalnych modeli układu naczyniowego *in vitro*. Badania te przeprowadzono za pomocą testu WST-1 oraz przy użyciu systemu XCelligence RTCA-DP, co może dostarczyć informacji na temat potencjalnej cytotoksyczności badanych związków (**Publikacja II i III**).
2. Ocena wpływu nowych pochodnych metforminy na zdolność wykorzystania glukozy w komórkach HUVEC (tzw. test utylizacji glukozy) (**Publikacja II i III**).
3. Ocena wpływu nowych pochodnych metforminy na migrację komórek HUVEC (ang. *Endothelial Cell Migration*) z wykorzystaniem systemu Juli™Stage. Zdolność do modulacji metabolizmu komórek śródbłonna naczyniowego odgrywa bardzo ważną rolę w kontroli inicjacji i progresji miażdżycy (**Publikacja II**).
4. Ocena wpływu nowych pochodnych metforminy na uwalnianie t-PA z komórek HUVEC, odpowiedzialnego za aktywację plazminy (**Publikacja II**).
5. Ocena wpływu nowych pochodnych metforminy na potencjał błony mitochondrialnej ($\Delta\Psi M$), gdyż akumulacja w mitochondriach stanowi główny subkomórkowy cel działania metforminy (**Publikacja III**).
6. Ocena wpływu nowych pochodnych metforminy na zewnątrzpochodny (czas protrombinowy, PT) i wewnątrzpochodny (czas częściowej tromboplastyny po aktywacji, APTT) szlak krzepnięcia z wykorzystaniem rutynowych metod laboratoryjnych (**Publikacja II i III**).
7. Ocena wpływu nowych pochodnych metforminy na proces polimeryzacji fibryny (czas trombinowy, TT) (**Publikacja II i III**).

Realizacja celu naukowego

8. Ocena wpływu nowych pochodnych metforminy na aktywność jednego z naturalnie obecnych w osoczu antykoagulantów – antytrombiny III (AT) (**Publikacja II i III**).
9. Ocena wpływu nowych pochodnych metforminy na aktywność czynnika X (**Publikacja II i III**).
10. Ocena wpływu nowych pochodnych metforminy na ogólny potencjał tworzenia skrzepu, jego stabilizacji i fibrynolizy, z uwzględnieniem parametrów kinetycznych wyżej wymienionych procesów (**Publikacja II i III**).
11. Ocena wpływu nowych pochodnych metforminy na proces krzepnięcia po generacji endogennej trombiny (**Publikacja II i III**).
12. Ocena wpływu nowych pochodnych metforminy na aktywność jednego z dwóch głównych enzymów biorących udział w hemostazie osoczowej – trombiny (**Publikacja III**).

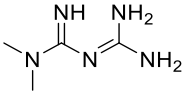
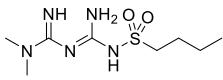
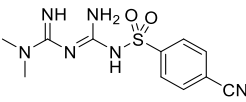
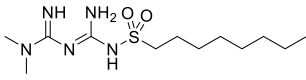
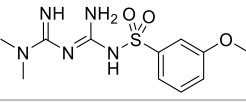
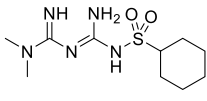
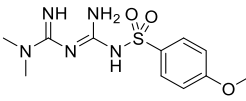
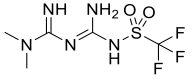
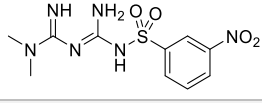
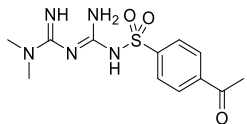
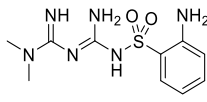
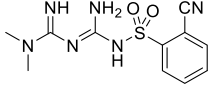
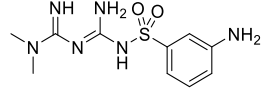
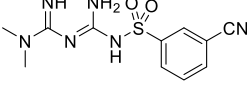
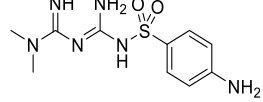
ETAP 3.

1. Ocena wpływu nowych pochodnych metforminy na hemolizę krwinek czerwonych, ponieważ hemozgodność jest podstawowym kryterium ograniczającym przydatność kliniczną nowych potencjalnych substancji leczniczych (**Publikacja III**).
2. Ocena wpływu nowych pochodnych na morfologię erytrocytów (**Publikacja III**).

ETAP 4.

1. Podsumowanie wyników badań naukowych, osiągniętych w ramach realizacji niniejszej dysertacji, poprzez ustalenie zależności pomiędzy budową chemiczną nowych sulfonamidowych analogów metforminy a ich aktywnością biologiczną, ze szczególnym uwzględnieniem właściwości antykoagulacyjnych i cytotoksyczności w modelach hodowli komórek *in vitro*.

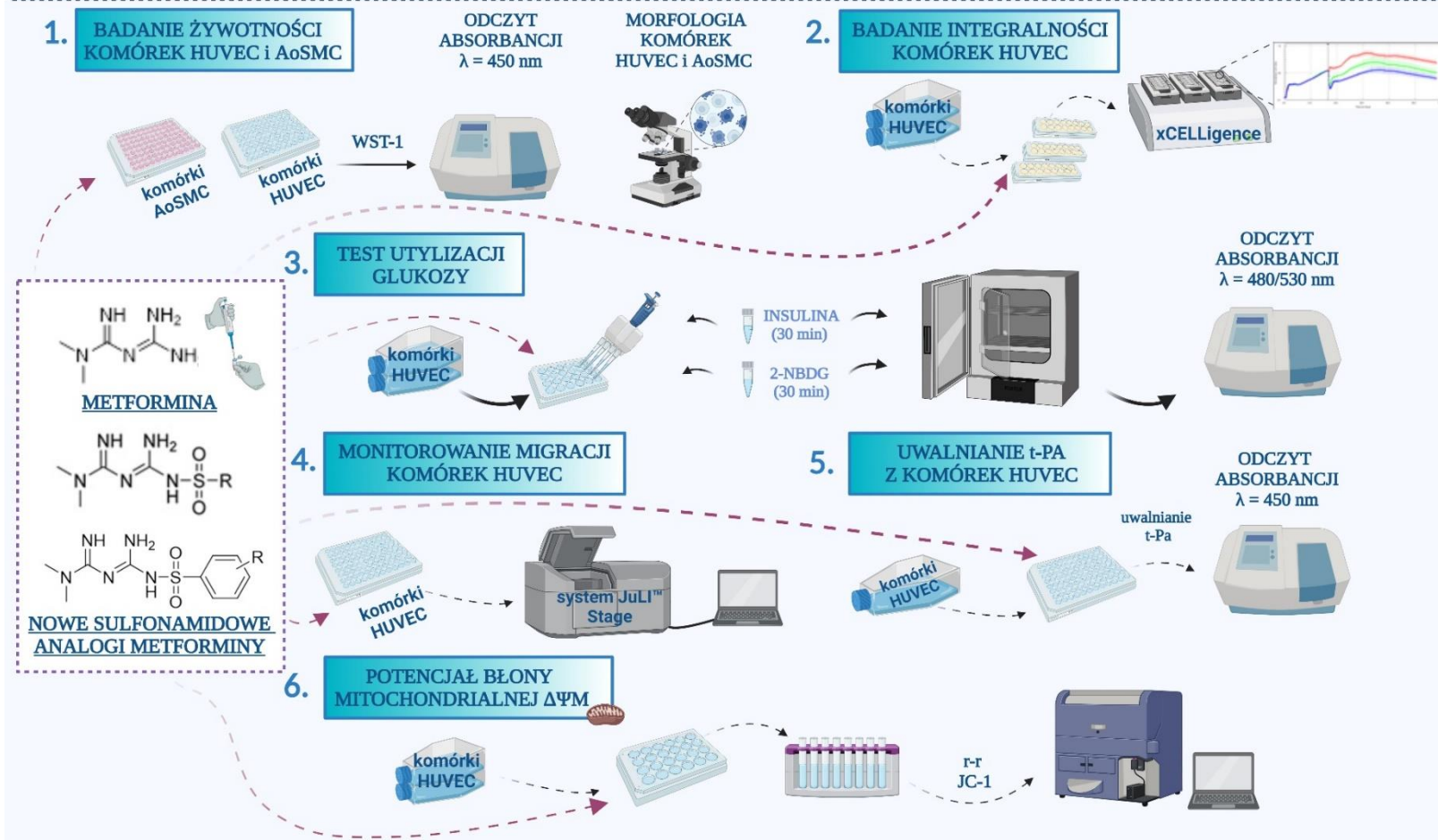
Tabela 3. Struktura chemiczna analizowanych pochodnych biguanidu: metforminy oraz jej sulfonamidowych analogów **1–14**.

Metformina	
	
Związek 1	Związek 8
	
Związek 2	Związek 9
	
Związek 3	Związek 10
	
Związek 4	Związek 11
	
Związek 5	Związek 12
	
Związek 6	Związek 13
	
Związek 7	Związek 14
	

Wszystkie cząsteczki zaprezentowane w powyższej tabeli zostały zaprojektowane oraz zsyntetyzowane przez zespół pod przewodnictwem dr Kristiiny Huttunen w University of Eastern Finland (Kuopio, Finlandia).

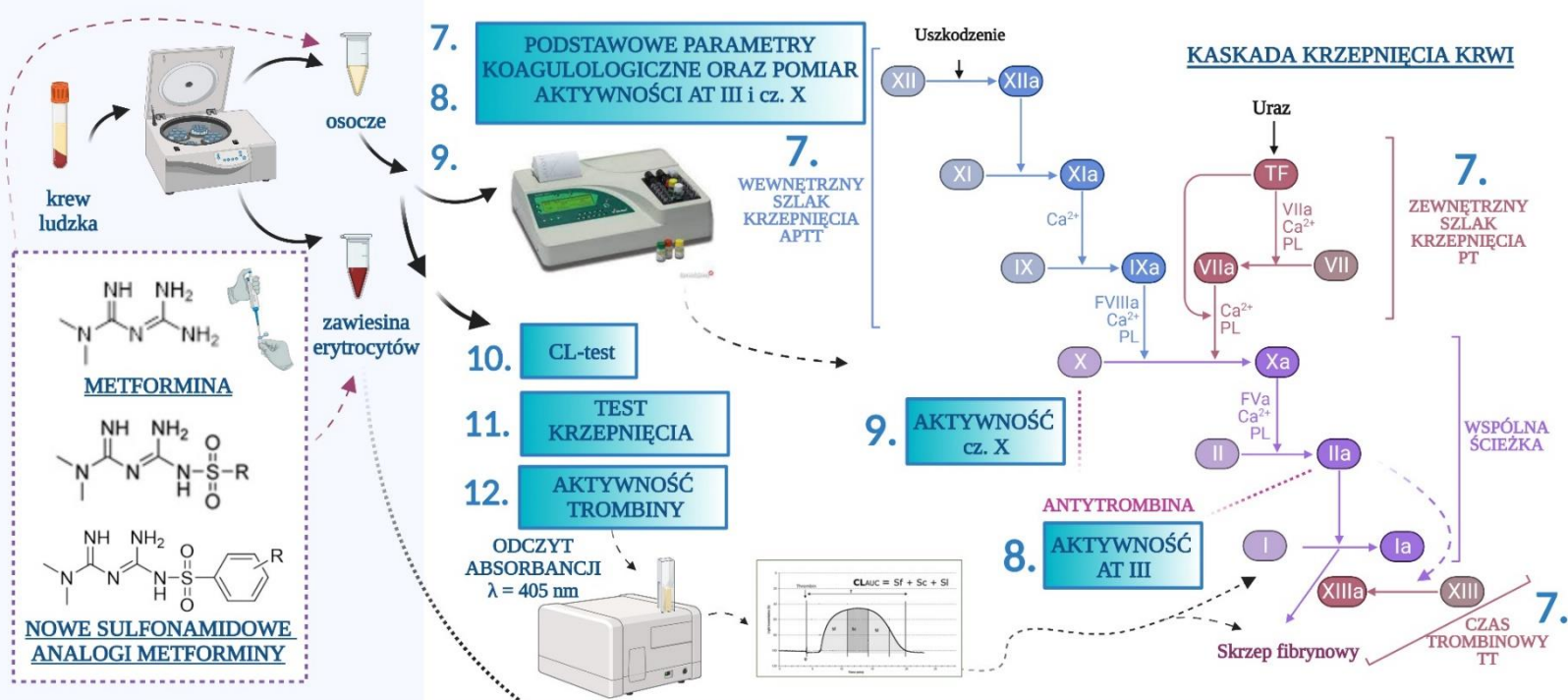
ETAP 1. Szczegółowa analiza potencjału terapeutycznego metforminy jako środka przeciwstarzeniowego wraz z uwzględnieniem molekularnych mechanizmów działania metforminy w kontekście jej potencjalnego wykorzystania jako leku o wielokierunkowym działaniu (Publikacja I).

ETAP 2. Ocena aktywności biologicznej nowych sulfonamidowych analogów metforminy pod kątem hemostazy naczyniowej (Publikacja II i III).



Rycina 14A. Szczegółowy schemat badań zrealizowanych w ramach pracy doktorskiej (etapy I-II).

ETAP 2. Ocena aktywności biologicznej nowych sulfonamidowych analogów metforminy pod kątem hemostazy osoczowej (Publikacja II i III).



ETAP 3. Badania biozgodności nowych pochodnych metforminy w modelu ludzkich erytrocytów (tzw. erytrotoksyczność) (Publikacja III).



ETAP 4. Podsumowanie wyników badań naukowych, osiągniętych w ramach realizacji niniejszej dysertacji, poprzez ustalenie zależności pomiędzy budową chemiczną nowych sulfonamidowych analogów metforminy a ich aktywnością biologiczną, ze szczególnym uwzględnieniem właściwości antykoagulacyjnych i cytotoksyczności w modelach hodowli komórek *in vitro*.

Rycina 14B. Szczegółowy schemat badań zrealizowanych w ramach pracy doktorskiej (etapy II-IV).

Część eksperymentalna

Material badawczy

1. Material biologiczny wykorzystany do podstawowych badań koagulologicznych oraz badań erytrotoksyczności

Wszystkie eksperymenty przeprowadzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej z wykorzystaniem materiału biologicznego (osocze, erytrocyty) zostały zatwierdzone przez Komisję Bioetyczną przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi (nr zgody: RNN/105/20/KE).

Ogólna procedura przygotowania materiału biologicznego do badań przesiewowych układu krzepnięcia i testu lizy krwinek czerwonych została zamieszczona w **Publikacji II** oraz w **Publikacji III** i materiałach uzupełniających do **Publikacji III**.

2. Hodowle komórkowe (HUVEC i AoSMC)

Komórki HUVEC i AoSMC hodowano zgodnie z wytycznymi producenta (odpowiednio Lonza oraz ScienCell Research Laboratories) w temperaturze 37 °C, w inkubatorze HeLa Cell. Podziały hodowli (tzw. pasażowanie komórek) przeprowadzano, gdy w naczyniach hodowlanych osiągnięto 80% konfluencji. W doświadczeniach wykorzystano komórki pochodzące maksymalnie z 4 pasaży.

Metody badawcze wykorzystane w pracy doktorskiej

Dokładna charakterystyka procedur badawczych, przygotowania próbek oraz szczegółowy opis aparatury i wszystkich odczynników użytych w niniejszych badaniach został przedstawiony w artykułach naukowych (**Publikacja II**, **Publikacja III** oraz materiały uzupełniające do **Publikacji III**), które stanowią podstawę rozprawy doktorskiej.

1. Test żywotności oraz badanie morfologiczne komórek pierwotnych

Wpływ analizowanych związków na wzrost komórek linii HUVEC i AoSMC oceniono za pomocą testu kolorymetrycznego WST-1. Badanie to opiera się na redukcji jasnożółtej soli tetrazolowej (WST-1) do ciemnożółtego formazanu w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę mitochondrialną w dzielących się komórkach (komórkach żywych). Pomiar ilości powstałego formazanu przeprowadzono metodą spektrofotometryczną.

Analizę mikroskopową komórek HUVEC i AoSMC wykonano przy użyciu mikroskopu świetlnego z kontrastem fazowym (powiększenie 100×) oraz dedykowanego oprogramowania OptaView 7.

2. Badania integralności komórek HUVEC

W celu przeprowadzenia oceny wpływu sulfonamidowych pochodnych metforminy na integralność oraz funkcje barierowe komórek HUVEC zastosowano ciągły system analizy komórek w czasie rzeczywistym RTCA-DP (XCelligence, Roche). System ten bazuje na procesie elektronicznej detekcji oraz analizie dynamicznych zmian zachodzących we właściwościach barierowych monowarstwy komórek śródbłonna naczyniowego. Zatem metoda ta opiera się na pomiarze impedancji elektronicznej w czasie rzeczywistym, wyrażonej jako bezwymiarowy parametr, tzw. indeks komórkowy (CI).

3. Test utylizacji glukozy

Wpływ testowanych cząsteczek na wewnątrzkomórkowy wychwyt glukozy w hodowli komórek HUVEC zbadano za pomocą analogu deoksyglukozy, 2-NBDG. W metodzie tej marker fluorescencyjny 2-NBDG został wykorzystany jako sonda do wykrywania glukozy pobranej przez hodowane komórki za pośrednictwem transporterów glukozy. Fluorescencja generowana przez 2-NBDG jest proporcjonalna do wychwytu glukozy przez komórki HUVEC.

4. Monitorowanie migracji komórek HUVEC

W celu zbadania wpływu nowych sulfonamidowych analogów metforminy na zdolność migracji komórek HUVEC przeprowadzono test *in vitro* zarastania rasy (ang. *wound-healing assay*) przy użyciu systemu JuLI™ Stage. System ten jest tzw. rejestratorem komórek w czasie rzeczywistym, który umożliwia obrazowanie i analizę żywych komórek. Zasada tej metody polega na mechanicznym wykonaniu zadrapania w warstwie komórek HUVEC w hodowli *in vitro* za pomocą dostarczonego przez producenta drapak w celu utworzenia szczeliny przypominającej nacięcie. Komórki HUVEC monitorowano co 30 minut w ciągu 24-godzinnej inkubacji. Wyniki odczytano w punkcie startowym (T_0) oraz po 6, 12, 18 i 24 godzinach inkubacji. Analizę uzyskanych obrazów migracji komórek oraz pomiary szerokości obszaru zarysowania wykonano za pomocą dedykowanego oprogramowania (NanoEntek).

5. Uwalnianie t-PA z komórek HUVEC

Do ilościowej oceny uwalniania tkankowego aktywatora plazminogenu w supernatantach hodowli komórkowej HUVEC użyto immunoenzymatyczny test ELISA. Niniejsza metoda opiera się na wykorzystaniu detekcyjnego biotynylowanego przeciwciała monoklonalnego swoistego dla t-PA, które wiąże kompleksy t-PA lub t-PA/PAI-1 na dnie studzienki. Podczas prowadzenia eksperymentu dodano także koniugat streptawidyna-peroksydaza, który umożliwia pomiar powstałych kompleksów z t-PA. Aby przeprowadzić wizualizację reakcji enzymatycznej, w metodzie tej zastosowano substrat chromogenny TMB. Pomiar ilościowy barwnego produktu przeprowadzono metodą spektrofotometryczną.

6. Badanie potencjału błony mitochondrialnej JC-1

Wpływ badanych związków na potencjał błony mitochondrialnej ($\Delta\Psi_M$) komórek HUVEC oceniono metodą cytometrii przepływowej przy użyciu barwnika cytofluorymetrycznego (tzw. sonda fluorescencyjna) JC-1, który wnika do mitochondriów i zmienia swoje właściwości fluorescencyjne na skutek agregacji. Poziom agregacji odczynnika JC-1 w mitochondriach odzwierciedla zmiany zachodzące w wartości $\Delta\Psi_M$, co zdefiniowano jako stosunek średniej intensywności fluorescencji czerwonej (J-agregaty) do zielonej (monomery). Wyższy stosunek czerwonej do zielonej fluorescencji wskazuje na większą polaryzację błony mitochondrialnej.

7. Podstawowe parametry koagulologiczne

W ramach poszukiwania aktywności przeciwzakrzepowej nowych analogów metforminy przeprowadzono pomiar czasu APTT, PT oraz TT w ludzkim osoczu za pomocą rutynowych metod laboratoryjnych z wykorzystaniem koagulometru Coag Chrom 3003.

8. Aktywność AT

Aktywność AT w ludzkim osoczu pod wpływem działania sulfonamidowych pochodnych metforminy została oszacowana spektrofotometrycznie przy użyciu diagnostycznej metody laboratoryjnej. We wspomnianej metodzie osocze poddano inkubacji z badanymi związkami, natomiast trombinę inkubowano z nadmiarem heparyny (60 sekund). Po dodaniu chromogennego substratu do badanej próbki nastąpiło uwolnienie *p*-nitroaniliny (*p*NA) w ilości proporcjonalnej do poziomu AT.

9. Aktywność czynnika X

Aktywność czynnika X oceniono za pomocą rutynowej optycznej metody analizy instrumentalnej, kolorymetrii. W niniejszej metodzie ilość uwolnionej *p*NA ze specyficznego substratu czynnika Xa mierzona jest spektrofotometrycznie. Aktywność enzymatyczna czynnika X jest wprost proporcjonalna do zmiany absorbancji *p*NA przy długości fali $\lambda = 405$ nm.

10. Test tworzenia skrzepu i fibrynolizy (CL-test)

Wpływ poszczególnych związków na ogólny potencjał hemostazy przeanalizowano za pomocą metody turbidymetrycznej przy użyciu wieloparametrycznego modelu, CL-test. Proces tworzenia skrzepu, jego stabilizacji oraz lizy został dokładnie przeanalizowany poprzez ciągłe rejestrowanie zmian transmitancji w czasie. Odczyt krzywych tworzenia skrzepu i fibrynolizy przeprowadzono przy długości fali $\lambda = 405$ nm, stosując spektrofotometr Cecil CE 2021 z termostatowanym obiegiem wody (37 °C) i mieszadłem magnetycznym oraz z zastosowaniem dedykowanego oprogramowania [129].

11. Test krzepnięcia po generacji endogennej trombiny

Ocena potencjału krzepnięcia również została przeprowadzona za pomocą metody turbidymetrycznej. Proces tworzenia skrzepu przeanalizowano poprzez ciągły odczyt zmian transmitancji w czasie. Krzywe tworzenia skrzepu uzyskano przy długości fali $\lambda = 405$ nm, stosując spektrofotometr Cecil CE 2021 z termostatowanym obiegiem wody (37 °C) oraz przy użyciu dedykowanego oprogramowania [129].

12. Pomiar aktywności amidolitycznej trombiny

Dostępność centrum katalitycznego proteazy serynowej określono za pomocą metody spektrofotometrycznej dodając bezbarwną substancję chromogenną D-Phe-Pip-Arg-*p*NA, która zmienia swój kolor na żółty na skutek hydrolizy wiązania peptydowego i przekształcenia substratu w *p*NA. Absorbancję badanych próbek mierzono spektrofotometrycznie (spektrofotometr Cecil CE 2021) oraz z wykorzystaniem dedykowanego oprogramowania [129].

13. Test lizy krwinek czerwonych oraz badanie morfologii erytrocytów

Biozgodność nowych sulfonamidowych pochodnych względem krwinek czerwonych oceniona została poprzez hemolizę erytrocytów oraz ocenę mikroskopową ich morfologii. Za pomocą metody spektrofotometrycznej zmierzono ilość hemoglobiny uwolnionej

z erytrocytów pod wpływem działania badanych związków po 1-godzinnej oraz 24-godzinnej inkubacji. Analizę mikroskopową erytrocytów wykonano z wykorzystaniem mikroskopu z kontrastem fazowym (powiększenie 400×) oraz dedykowanego oprogramowania OptaView 7 zarówno po 1 godzinie, jak i 24 godzinach inkubacji z analizowanymi analogami metforminy.

14. Analiza statystyczna uzyskanych danych

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Statistica 12.0 (StatSoft) oraz GraphPad Prism 5. Zgodność z rozkładem normalnym zweryfikowano za pomocą testu Shapiro-Wilka. Zaś jednorodność wariancji została oceniona poprzez zastosowanie testu Levene'a. Test t dla prób zależnych został użyty w przypadku wyników, które były zgodne z rozkładem normalnym (np. badania na materiale biologicznym), natomiast statystycznie istotne różnice między średnimi grup niezależnych zidentyfikowano za pomocą jednokierunkowej (jednoczynnikowej) analizy wariancji ANOVA. Wyniki wszystkich analiz uznano za istotne statystycznie przy wartościach p mniejszych niż 0.05.

Wyniki przeprowadzonych badań oraz dyskusja

ETAP 1. Szczegółowa analiza potencjału terapeutycznego metforminy jako środka przeciwstarzeniowego wraz z uwzględnieniem molekularnych mechanizmów działania metforminy w kontekście jej potencjalnego wykorzystania jako leku o wielokierunkowym działaniu (**Publikacja I**).

Szerokie spektrum badań eksperymentalnych oraz klinicznych donosi, iż metformina wykazuje działanie plejotropowe oraz korzystny wpływ na wiele różnych stanów patologicznych. Oprócz poprawy homeostazy glukozy, przejawia także pozytywny wpływ na częstość występowania chorób związanych ze starzeniem (ARD), takich jak choroby układu krążenia, choroby neurodegeneracyjne czy nowotwory, co zaś sugeruje jej korzystny wpływ na wydłużenie życia. Wiele badań przeprowadzonych na modelu zwierzęcym (tj. nicienie, stawonogi, gryzonie) dowodzi, że metformina może opóźnić proces starzenia poprzez wpływ na procesy metaboliczne i komórkowe, które są związane z rozwojem ARD. Dlatego też oczekuje się, iż metformina może również korzystnie oddziaływać na podstawowe czynniki starzenia u ludzi, które leżą u podstawy wielu schorzeń bezpośrednio powiązanych z wiekiem.

Wynikiem przeprowadzonego studium literaturowego było usystematyzowanie aktualnej wiedzy oraz uzyskanych dotychczas danych, na temat wpływu metforminy na rozwój lub progresję ARD, pochodzących zarówno z badań przedklinicznych: eksperymentów z wykorzystaniem linii komórkowych (*in vitro*) oraz modeli zwierzęcych (*in vivo*), jak również badań klinicznych, w tym obecnie prowadzonych randomizowanych badań klinicznych – Targeting Aging with Metformin (TAME). W artykule naukowym pt. „Is metformin a geroprotector? A peek into the current clinical and experimental data.” (**Publikacja I**) przeanalizowano molekularne mechanizmy oraz szlaki zaangażowane w potencjalne właściwości przeciwstarzeniowe metforminy, ze szczególnym uwzględnieniem jej wpływu na inicjację i progresję chorób układu sercowo-naczyniowego, chorób neurodegeneracyjnych oraz nowotworów. Mocne dowody eksperymentalne i kliniczne, uzyskane w ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat, ujawniające korzystny wpływ metforminy na czynność układu sercowo-naczyniowego, wynikające z poprawy funkcji śródbłonna, ochrony przed stresem oksydacyjnym, ograniczeniem proliferacji komórek mięśni gładkich oraz jej potencjalnych właściwości przeciwzapalnych są szczególnie interesujące. Konsekwencją niniejszych zainteresowań były badania eksperymentalne

Realizacja celów naukowych – wyniki i dyskusja

podejmujące kwestię potencjalnego wielokierunkowego działania, w tym właściwości antykoagulacyjnych, hipoglikemizujących wraz z przeprowadzeniem oceny cytotoksyczności nowych sulfonamidowych analogów biguanidu, o korzystniejszym profilu fizykochemicznym niż metformina, z wykorzystaniem modeli hodowli komórek *in vitro*, co stanowi podstawę niniejszej dysertacji.

ETAP 2. Ocena aktywności biologicznej nowych sulfonamidowych analogów metforminy (**Publikacja II i III**).

Substancje chemiczne mogą wywierać wpływ na żywotność oraz metabolizm komórek. Wobec powyższego profil aktywności cytotoksycznej jest jednym z podstawowych czynników ograniczających w rozwoju nowych potencjalnych cząsteczek leczniczych. Testy żywotności komórek i cytotoksyczności z wykorzystaniem hodowli ludzkich komórek pierwotnych *in vitro* są powszechnie stosowane jako badania przesiewowe potencjalnych kandydatów na leki. Służą one do oceny wpływu (potencjalnego działania toksycznego) związku chemicznego na daną linię komórkową, w tym na żywotność i integralność komórek oraz ich proliferację. Oznaczenie profilu aktywności cytotoksycznej danego związku chemicznego dostarcza niezwykle cennych informacji na temat potencjalnego molekularnego mechanizmu działania substancji w modelach komórkowych, co stanowi podstawę do prowadzenia dalszych badań eksperymentalnych. Zatem niniejsze badania należy uznać za dobry wstęp do badań toksykologicznych, które są niezbędne do zweryfikowania zarówno bezpieczeństwa ksenobiotyku, jak i jego prawidłowego działania po podaniu [130,131].

Mając na względzie powyższe oraz fakt, iż śródbłonek stanowi bezpośredni punkt kontaktu ze związkiem rozpuszczonym w osoczu krwi, jak i to, że komórki śródbłonka oraz komórki mięśni gładkich naczyń są podstawowymi składnikami ścian naczyń krwionośnych, które odgrywają kluczową rolę w progresji chorób układu krążenia, w pierwszym etapie badań przeprowadzono analizę oddziaływania nowych analogów metforminy o budowie sulfonamidowej na żywotność dwóch ludzkich linii komórek HUVEC i AoSMC z wykorzystaniem eksperymentalnych modeli układu naczyniowego *in vitro* za pomocą testu WST-1 (**Publikacja II i III**). Warto wspomnieć, iż zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami, metformina nie wykazuje wpływu na żywotność oraz morfologię komórek HUVEC i AoSMC w stężeniach do 3.0 $\mu\text{mol/mL}$ [89,132]. Spośród wszystkich badanych nowych sulfonamidowych pochodnych metforminy, związki **2**, **11** oraz **12** wykazywały najmniejszy wpływ na wzrost komórek HUVEC, gdyż w stężeniu 1.5 $\mu\text{mol/mL}$ ich żywotność została zachowana na poziomie 61.67%–89.21%. Ponadto sulfonamidowe analogi metforminy **1** i **3** także charakteryzowały się stosunkowo dobrym profilem bezpieczeństwa w linii komórkowej HUVEC, a wyznaczone dla nich wartości IC_{50} , a więc stężenia powodujące 50% spadek żywotności komórek, wynosiły odpowiednio: 3.643 ± 0.26 i 3.506 ± 0.24 $\mu\text{mol/mL}$. Natomiast dla pozostałych związków (**4–10**, **13**,

14) odnotowano silniejszy efekt hamujący wzrost komórek śródbłonna w stężeniach ok. 0.3–1.5 $\mu\text{mol/mL}$ (analogi **6–8**) oraz 1.0–1.5 $\mu\text{mol/mL}$ (pochodne **4, 5, 9, 10, 13, 14**). Oszacowane dla nich wartości IC_{50} oscylowały w zakresie 0.304–1.589 $\mu\text{mol/mL}$. Ze wszystkich badanych związków to cyjanobenzenosulfonamidy (**6–8**) okazały się najbardziej toksyczne, gdyż w przypadku traktowania komórek HUVEC związkami **6–8** już w stężeniu 0.3 $\mu\text{mol/mL}$ zaobserwowano znaczne obniżenie przeżywalności komórek – spadek żywotności na poziomie 45.42–56.92%.

W przeciwieństwie do komórek HUVEC, wszystkie analizowane pochodne (**1–14**) wykazywały znacznie słabszy wpływ na żywotność komórek AoSMC; dlatego też nie określono dla nich wartości IC_{50} w stężeniach do 1.5 $\mu\text{mol/mL}$. Zatem można uznać, iż wszystkie badane związki charakteryzowały się stosunkowo dobrym profilem bezpieczeństwa w linii komórkowej AoSMC. Na przykład dla związków **6–8** w stężeniu 0.3 $\mu\text{mol/mL}$ odnotowano znaczne obniżenie żywotności komórek HUVEC, podczas gdy komórki AoSMC stymulowane za pomocą wspomnianych pochodnych metforminy w stężeniu 0.3 $\mu\text{mol/mL}$ utrzymywały żywotność na poziomie aż 81.44–83.74%.

Przeprowadzono również analizę mikroskopową komórek HUVEC i AoSMC po 24-godzinnej inkubacji z badanymi związkami (**1–14**) za pomocą mikroskopu z kontrastem fazowym. W badaniu tym zastosowano testowane pochodne w tych samych zakresach stężeń, które zostały użyte w badaniach żywotności oraz w stężeniach przyczyniających się do 50% spadku żywotności komórek. Reprezentatywne mikrografie komórek HUVEC oraz AoSMC stymulowanych badanymi związkami przedstawiono w **Publikacji II, III**. Ocena morfologiczna wykazała, iż traktowanie komórek HUVEC związkami **1–10, 13, 14** skutkowało wzrostem liczby zaokrąglonych i skurczonych komórek w obrazie mikroskopowym. Co więcej, dla biguanidów **4–9** i **11** zaobserwowano także tendencję do wydłużania komórek śródbłonna. Niemniej jednak wszystkie te zmiany zostały zaobserwowane w stężeniach odpowiadających ich wartościom IC_{50} lub w najwyższym testowanym stężeniu (1.5 $\mu\text{mol/mL}$ bądź 3.0 $\mu\text{mol/mL}$). Mikroskopia fazowo-kontrastowa ujawniła także znaczny spadek liczby żywych komórek HUVEC po stymulacji pochodnymi z podstawnikiem cyjanowym (**6–8**) w stężeniach zbliżonych do ich wartości IC_{50} oraz wyższych, co doskonale obrazuje wyniki uzyskane z testu WST-1. Ponadto badania mikroskopowe wykazały, iż wszystkie analizowane związki (**1–14**) przejawiały znacznie mniejszy wpływ na morfologię komórek AoSMC, co objawiało się jedynie po-

jawieniem zaokrąglonych oraz obkurczonych komórek. Natomiast zmiany morfologiczne komórek AoSMC, charakteryzujące się zwiększoną tendencją do zlepiania, zaobserwowane po traktowaniu ich związkami **13**, **14** nie były powiązane ze znacznymi zmianami w ich żywotności.

Nowe sulfonamidowe analogi metforminy poddano dalszym testom na poziomie komórkowym – badanie integralności komórek HUVEC w czasie rzeczywistym przy użyciu systemu RTCA-DP wykonującego pomiary impedancji elektrycznej komórek wyrażonej przy użyciu bezwymiarowego parametru CI. Parametr ten dostarcza informacji na temat statusu biologicznego komórek w czasie rzeczywistym, a więc odzwierciedla zmiany zachodzące we właściwościach barierowych pod wpływem działania badanych związków – w liczbie, żywotności, adhezji oraz kształcie komórek adherentnych, a także w przepuszczalności monowarstwy komórek [133]. Zatem system RTCA-DP stanowi niezwykle cenne narzędzie do oceny potencjalnej cytotoksyczności analizowanych molekuł. Wcześniej przeprowadzone badania eksperymentalne nie wykazały, aby metformina wpływała na integralność czy adhezję komórek HUVEC w całym badanym zakresie stężeń: 0.006–1.5 $\mu\text{mol/mL}$ [89].

W każdym punkcie czasowym analizy w ciągu 36-godzinnej inkubacji komórek śródbłonna z pochodnymi **1–8** zaobserwowano bezpośrednią odpowiedź komórek HUVEC manifestującą się statystycznie istotnym zmniejszeniem wartości parametru nCI (**Publikacja II**). Większy spadek wartości nCI odnotowano w stężeniu 1.0 $\mu\text{mol/mL}$ w porównaniu do 0.3 $\mu\text{mol/mL}$ czy komórek niestymulowanych (komórek kontrolnych). Analiza statystyczna dowodzi, iż spośród związków **1–8**, pochodna z podstawnikiem alkilowym (**1**) wywierała najmniejszy wpływ na funkcję komórek HUVEC, gdyż nie odnotowano dla niej statystycznie istotnego spadku wartości nCI w obu badanych stężeniach po 36 godzinach inkubacji, a otrzymane wartości były porównywalne do prób kontrolnych. Ponadto dla związku **3** odnotowano statystycznie istotny spadek integralności komórek śródbłonna, który kształtował się na poziomie 5.56–8.20% w obu badanych stężeniach (0.714 ± 0.035 w stężeniu 0.3 $\mu\text{mol/mL}$ oraz 0.694 ± 0.054 w stężeniu 1.0 $\mu\text{mol/mL}$ w porównaniu z kontrolą 0.756 ± 0.192 ; odpowiednio $p < 0.01$; $p < 0.001$) po 36-godzinnej stymulacji. Zatem odnotowany spadek integralności komórek HUVEC dla analogu metforminy (**3**) był także bardzo zbliżony do wartości uzyskanej dla próby kontrolnej. Najbardziej niekorzystny wpływ na właściwości barierowe komórek HUVEC przejawiały pochodne cyjanowe (**6–8**) w obu badanych stężeniach. Po 36-godzinnej inkubacji

odnotowano znaczny spadek nCI do wartości 0–0.20 dla związków **6–8**, podczas gdy analogi metforminy **1–5** zmniejszały integralność komórek śródbłónka o 40–60% w zależności od punktu czasowego analizy oraz zastosowanego stężenia.

Podobnie do leku referencyjnego, metforminy, żaden z jej sulfonamidowych analogów **9–14** nie wykazywał wpływu na funkcję komórek HUVEC w obu analizowanych stężeniach (0.3 lub 0.6 $\mu\text{mol/mL}$) w ciągu pierwszych 12 godzin stymulacji (**Publikacja III**). Natomiast po 24-godzinnej inkubacji komórek HUVEC ze związkami **9–14** zaobserwowano statystycznie istotne obniżenie wartości nCI o 30–60% w obu badanych stężeniach (w zależności od punktu czasowego prowadzonego doświadczenia). Biguanidy **9–14** powodowały większy spadek wartości nCI w stężeniu 0.6 $\mu\text{mol/mL}$ w porównaniu do 0.3 $\mu\text{mol/mL}$ oraz komórek kontrolnych. Spośród związków **9–14** najmniejszy wpływ na integralność komórek HUVEC wykazywała pochodna **12** z podstawnikiem aminowym umiejscowionym w pozycji *orto*- w pierścieniu aromatycznym. Odnotowany spadek integralności komórek śródbłónka dla związku **12** wynosił 30.53% w stężeniu 0.3 $\mu\text{mol/mL}$ oraz 33.47% w stężeniu 0.6 $\mu\text{mol/mL}$ (1.116 ± 0.172 i 1.068 ± 0.206 w porównaniu z kontrolą 1.606 ± 0.085 ; $p < 0.001$) po 36-godzinnej stymulacji.

Odnotowane zmiany wartości parametru nCI (dla związków **2–5**, **9–14**), bezpośrednio odzwierciedlające zmiany w integralności komórek śródbłónka, nie prowadzą do zwiększonej śmiertelności komórek HUVEC, a więc obserwowane efekty nie są nieodwracalne. Natomiast cyjanobenzenosulfonamidy (**6–8**) powodują znaczny spadek wartości parametru nCI, a więc wykazują niekorzystny wpływ na śródbłonek, a to prowadzi do obumarcia znacznej liczby komórek HUVEC, co zostało potwierdzone w teście WST-1 oraz ocenie mikroskopowej.

Mając na uwadze wielokierunkowy wpływ metforminy na glikemię postanowiono przetestować wszystkie nowo zsyntetyzowane związki pod kątem ich potencjalnej zdolności do zwiększania wychwyty glukozy z komórek śródbłónka. Ze względu na wysoką cytotoksyczność odnotowaną dla związków **6–8** ($\text{IC}_{50} = 0.461 \pm 0.13 \mu\text{mol/mL}$ (zw.**6**); $\text{IC}_{50} = 0.304 \pm 0.12 \mu\text{mol/mL}$ (zw.**7**); $\text{IC}_{50} = 0.791 \pm 0.13 \mu\text{mol/mL}$ (zw.**8**)) zdecydowano o zastosowaniu pochodnych **1–8** w stężeniach do 0.3 $\mu\text{mol/mL}$ (**Publikacja II**). Zaś związki **9–14** stosowano w stężeniach do 0.6 $\mu\text{mol/mL}$ (**Publikacja III**).

Zgodnie z powyższym do dalszych badań oceniających zdolność utylizacji glukozy w modelu hodowli komórkowej HUVEC wybrano wszystkie analizowane związki (**1–14**). Badanie to przeprowadzono z wykorzystaniem fluorescencyjnego analogu glukozy

2-NBDG, który jest powszechnie stosowany zarówno do monitorowania zużycia glukozy w komórkach żywych oraz jako wskaźnik żywotności komórek. W obu eksperymentach jako kontrolę negatywną zastosowano D-glukozę, która wykazywała zdolność do hamowania wychwytu 2-NBDG w stężeniu 0.1 $\mu\text{mol/mL}$. Natomiast jako kontrolę pozytywną zastosowano lek macierzysty, metforminę. Istotny wzrost wychwytu 2-NBDG zaobserwowano w komórkach stymulowanych metforminą we wszystkich badanych stężeniach. Spośród wszystkich analizowanych związków biguanidy **1–5** oraz **13** znacznie zwiększały wewnątrzkomórkowy wychwyty znakowanej fluorescencyjnie glukozy w obu badanych stężeniach, tym samym wykazywały działanie najbardziej zbliżone do metforminy. Na przykład dla komórek HUVEC inkubowanych w obecności pochodnej **2** odnotowano następujące zwiększenie wychwytu glukozy: $13.9 \pm 0.3 \mu\text{mol/L}$ w stężeniu 0.1 $\mu\text{mol/mL}$ oraz $14.6 \pm 1.0 \mu\text{mol/L}$ w stężeniu 0.3 $\mu\text{mol/mL}$ ($p < 0.001$). Podobny efekt odnotowano dla *m-* i *p*-metoksybenzenosulfonamidów oraz *p*-aminobenzenosulfonamidów (**9**, **10** i **14**). Jednakże zmiany te zostały odnotowane wyłącznie w najwyższym badanym stężeniu (0.6 $\mu\text{mol/mL}$). Uzyskane wyniki wskazują, iż pochodna **11** również przejawia zdolność do zwiększania wychwytu glukozy z komórek śródbłonna w stężeniu 0.6 $\mu\text{mol/mL}$, jednak zarejestrowane zmiany nie były statystycznie istotne ($8.1 \pm 0.7 \mu\text{mol/L}$ w odniesieniu do kontroli $6.4 \pm 1.1 \mu\text{mol/L}$; NS, $p > 0.05$). Związki **7** i **8** posiadające w pierścieniu aromatycznym ugrupowanie cyjanowe umiejscowione odpowiednio w pozycji *meta*- oraz *para*- także przyczyniały się do zwiększonego zużycia glukozy w komórkach śródbłonna ($p < 0.05$); jednakże jedynie w stężeniu 0.3 $\mu\text{mol/mL}$.

Miażdżyca stanowi jedną z głównych przyczyn przedwczesnej śmiertelności u pacjentów z T2DM. W jej rozwoju uczestniczy szereg procesów prozapalnych, proliferacyjnych i prokoagulacyjnych. Kluczową rolę w rozwoju miażdżycy tętnic odgrywa upośledzona funkcja komórek śródbłonna, którą można scharakteryzować jako zmianę w migracji i przepuszczalności komórek [134]. Oprócz utraty bariery śródbłonkowej na rozwój zmian miażdżycowych wpływa również migracja i proliferacja komórek mięśni gładkich [135]. Zatem zaprojektowanie związków o potencjalnym działaniu hamującym migrację komórek patologicznych może okazać się niezwykle cenne w hamowaniu inicjacji oraz progresji zmian miażdżycowych.

W oparciu o wyniki uzyskane z badań prowadzonych z wykorzystaniem linii komórkowej HUVEC wskazujące na wysoką toksyczność *o*-, *m*-, *p*-cyjanobenzenosulfonamidów (**6–8**) postanowiono w dalszych badaniach oceniających migrację komórek HUVEC

przetestować wyłącznie związki **1–5**. Komórki HUVEC inkubowane wraz ze wspomnianymi pochodnymi w stężeniach 0.3 $\mu\text{mol/mL}$ oraz 1.0 $\mu\text{mol/mL}$ poddano zatem badaniu oceniającemu migrację komórek śródbłonna przy użyciu testu *in vitro* zarastania rysy (ang. *wound-healing assay*) – **Publikacja II**. Do przeprowadzenia niniejszego badania zastosowano system JuLi™Stage, który umożliwia monitorowanie komórek żywych w czasie rzeczywistym. Jako związek odniesienia zastosowano metforminę w stężeniach 0.3 oraz 1.0 $\mu\text{mol/mL}$. Uzyskane dane wskazują, iż metformina nieznacznie moduluje migrację komórek w ciągu 24-godzinnej inkubacji, co przejawiało się zwiększeniem szerokości rysy w warstwie komórek HUVEC w porównaniu do kontroli. Szerokość zarysowania zmierzona po 24-godzinnej inkubacji komórek HUVEC z metforminą w wyższym badanym stężeniu (1.0 $\mu\text{mol/mL}$) wynosiła $419.8 \pm 42.3 \mu\text{m}$ w odniesieniu do kontroli $272.4 \pm 42.2 \mu\text{m}$. Jednak żadna ze zmian zarejestrowanych dla metforminy nie okazała się statystycznie istotna. Bardzo zbliżone wartości uzyskano także dla pozostałych badanych związków (**1–5**). Po 24-godzinnej inkubacji, zaobserwowano niewielkie hamowanie szybkości zarastania rysy przez hodowane komórki HUVEC traktowane związkami **1–4**, jednakże odnotowane wartości również nie były statystycznie istotne. Jedynie w przypadku komórek śródbłonna traktowanych pochodną z podstawnikiem acetylowym umiejscowionym w pozycji *para*- w pierścieniu aromatycznym (**5**) przy wyższym badanym stężeniu 1.0 $\mu\text{mol/mL}$ zarejestrowano statystycznie istotne zahamowanie migracji komórek HUVEC (454.5 ± 62.0 ; $p < 0.05$). Niemniej jednak efekt ten może wynikać z właściwości hamujących wzrost komórek HUVEC ($\text{IC}_{50(\text{zw. } 5)} = 1.589 \pm 0.13 \mu\text{mol/mL}$), stąd też niezwykle ważna jest kontynuacja dalszych badań. Przeprowadzono także dokładną analizę zwizualizowanych zmian – obrazów uzyskanych z eksperymentu oceniającego wpływ działania metforminy oraz związków **1–5** na migrację komórek HUVEC w miejscu mechanicznego utworzenia rysy. Mikrofotografie dla metforminy oraz związków **1** i **5** w stężeniu 1.0 $\mu\text{mol/mL}$ zostały załączone w materiałach uzupełniających do **Publikacji II**. Dla komórek HUVEC traktowanych badanymi związkami **1–5** w obrazie mikroskopowym odnotowano wzrost liczby zaokrąglonych komórek. Natomiast metformina nie indukowała znaczących zmian w morfologii i migracji komórek HUVEC. Analiza mikroskopowa potwierdziła uzyskane wartości dla związków **1–5** oraz wykazała, iż analog metforminy **5** w sposób umiarkowany hamuje migrację komórek HUVEC po 24-godzinach inkubacji.

W warunkach hemostazy, układ fibrynolityczny stanowi przeciwwagę dla złożonego procesu krzepnięcia krwi. Zatem ten fizjologiczny proces pełni rolę zapobiegawczą przed rozwojem zakrzepicy [136]. Zważywszy, iż powstawaniu skrzepliny sprzyjają zaburzenia fibrynolizy, w których kluczową rolę pełni proteaza serynowa, t-PA, katalizująca konwersję plazminogenu do plazminy, postanowiono ocenić również wpływ związków **1–5** w stężeniach 0.3 oraz 1.0 $\mu\text{mol/mL}$ na uwalnianie najważniejszego endogennego aktywatora plazminogenu z komórek śródbłonna. Nawiązując do badań prowadzonych przez Panią Promotor, metformina znacznie zwiększa uwalnianie t-PA z komórek HUVEC w zakresie stężeń: 0.006–1.5 $\mu\text{mol/mL}$ [89]. Natomiast wszystkie badane sulfonamidowe analogi metforminy (**1–5**) zmniejszają ilość uwalnianego t-PA z komórek HUVEC (**Publikacja II**). Na przykład dla związku z ugrupowaniem *n*-butylowym (**1**) odnotowano znaczące obniżenie stężenia t-PA w supernatantach komórkowych do 2427.2 ± 246.0 pg/mL przy 0.3 $\mu\text{mol/mL}$ ($p < 0.01$) oraz 1709.5 ± 219.1 pg/mL przy 1.0 $\mu\text{mol/mL}$ ($p < 0.001$) w porównaniu z 2895.4 ± 208.7 pg/mL (wartość uzyskana dla kontroli). Pozostałe związki wykazywały analogiczny mechanizm działania względem uwalniania t-PA w modelu komórkowym HUVEC. Jednakże, aby dokładnie przeanalizować związek między wpływem metforminy i badanych pochodnych (**1–5**) na aktywność fibrynolityczną krwi oraz przeciwzakrzepowy potencjał ściany naczyniowej należy przeprowadzić dalsze pogłębione badania oceniające aktywność plazminy – głównego enzymu przekształcającego fibrynę i fibrynogen w produkty ich degradacji; a także warto oszacować stosunek ilości PAI-1 do t-PA.

W swojej pracy badawczej Patel i wsp. wykazali, iż stan hiperglikemii zwiększa wytwarzanie H_2O_2 i O_2^- , a także prowadzi do hiperpolaryzacji błony mitochondrialnej w komórkach HUVEC; co w konsekwencji przyczynia się do postępującej dysfunkcji śródbłonna [137]. Ponadto Lin i wsp. zwrócili uwagę na bezpośrednią zależność między hiperpolaryzacją mitochondriów, a zmniejszoną wrażliwością na działanie insuliny [138]. Tak jak wspominałam w części teoretycznej niniejszej dysertacji, głównym celem działania metforminy jest mitochondrium. Przegląd dostępnego piśmiennictwa donosi, iż metformina indukuje depolaryzację błony mitochondrialnej, zwiększa stosunek AMP/ATP oraz mleczanu do pirogronianu i zmniejsza produkcję glukozy [139]. Dlatego też w kolejnym etapie badań oszacowano wpływ związków **9–14** na potencjał błonowy mitochondriów ($\Delta\Psi\text{M}$) w komórkach HUVEC na podstawie fluorescencji sondy JC-1

z wykorzystaniem cytometru przepływowego (**Publikacja III**). Analizy oparte na cytometrii oraz mikroskopii z zastosowaniem sondy fluorescencyjnej są obecnie powszechnie stosowane w celu monitorowania potencjału błony mitochondrialnej jako cennego wskaźnika żywotności komórek oraz polaryzacji i funkcji mitochondriów [140,141]. W badaniu tym zmiany stosunku fluorescencji czerwonej do zielonej zależą wyłącznie od potencjału błony mitochondrialnej. Czynniki takie jak rozmiar, kształt czy gęstość mitochondriów nie mają wpływu na zaobserwowane zmiany fluorescencji. Statystycznie istotne zmniejszenie stosunku fluorescencji czerwonej do zielonej ($p < 0.05$) odnotowano dla komórek HUVEC traktowanych FCCP (kontrola pozytywna). Po 24-godzinnej stymulacji z metforminą 0.5 i 1.0 $\mu\text{mol/mL}$ oraz sulfonamidowymi analogami metforminy **9–11** przy 0.3 $\mu\text{mol/mL}$ i 0.6 $\mu\text{mol/mL}$, a także z pochodną **12** w stężeniu 0.3 $\mu\text{mol/mL}$ nie zaobserwowano zmian istotnych statystycznie. Inkubacja komórek HUVEC z biguanidami podstawionymi grupą aminową w pozycji *meta*- i *para*- (**13, 14**) w obu badanych stężeniach: 0.3 i 0.6 $\mu\text{mol/mL}$ oraz w pozycji *orto*- (**12**) w najwyższym badanym stężeniu doprowadziła do znacznego spadku mitochondrialnego potencjału membranowego ($\Delta\Psi\text{M}$), co zostało zdefiniowane jako niższy stosunek fluorescencji czerwonej do zielonej ($p < 0.001$). W związku z powyższym nowe potencjalne środki terapeutyczne oparte na szkielecie metforminy (szczególnie *o*-, *m*-, *p*-aminobenzenosulfonamidy **12–14**) ze względu na swe działanie ukierunkowane na mitochondria mogą okazać się niezwykle cennymi cząsteczkami w zapobieganiu dysfunkcji śródbłonna oraz w leczeniu wtórnych defektów związanych z cukrzycą.

Naukowcy dowiedli, iż u pacjentów z cukrzycą występują nieprawidłowości w funkcjonowaniu układu krzepnięcia [142] oraz fibrynolizy [143], co znacznie zwiększa potencjał prozakrzepowy w tej grupie pacjentów, a tym samym nasila u nich ryzyko wystąpienia zakrzepicy. W związku z powyższym oraz ze względu na potencjalne ryzyko wystąpienia interakcji pomiędzy cząsteczką leku a krwią, które może prowadzić do aktywacji kaskady krzepnięcia krwi postanowiono w dalszej części pracy przeprowadzić również ocenę wpływu nowo zsyntetyzowanych pochodnych metforminy (**1–14**) na aktywację układu krzepnięcia (tzw. ocena hemokompatybilności) z wykorzystaniem rutynowych laboratoryjnych testów diagnostycznych (**Publikacja II** oraz **Publikacja III**). Kaskadę krzepnięcia krwi można podzielić na trzy szlaki: wewnętrzny, zewnętrzny oraz wspólny, prowadzący do powstania fibryny. Mając na uwadze powyższe przeprowadzono testy oceniające wszystkie te trzy szlaki – pomiar czasu PT (dla zewnątrzpochodnego szlaku

krzepnięcia), czasu APTT (dla wewnątrzpochodnego szlaku krzepnięcia) oraz czasu TT (dla procesu polimeryzacji fibryny). Analiza niniejszych parametrów jest niezwykle ważna, gdyż np. skrócenie czasu PT bądź APTT na skutek działania cząsteczek chemicznych może unaocznić stan, w którym to czynniki antykoagulacyjne są niezdolne do równoważenia tendencji prozakrzepowych, co tym samym wiązałoby się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia żylnej choroby zakrzepowo-zatorowej. Natomiast wydłużenie czasu PT i APTT może wskazywać na potencjalne właściwości antykoagulacyjne ksenobiotyku. Odnotowane zmiany w postaci skrócenia bądź wydłużenia czasu PT i APTT mogą być związane ze stężeniem fibrynogenu (FBG) oraz poszczególnych osoczowych czynników krzepnięcia krwi, a także aktywnością enzymów kaskady krzepnięcia krwi. Zaś obserwowane zmiany czasu TT mogą być spowodowane stężeniem FBG, stopniem polimeryzacji i stabilizacji fibryny oraz aktywnością antytrombiny. W eksperymentach tych wykorzystano osocza, w których odnotowane stężenia FBG zawierały się w przedziale wartości referencyjnych (2–4 g/L).

Wcześniejsze badania wskazują, iż metformina nie wpływa zarówno na wewnętrzny, jak i zewnętrzny szlak krzepnięcia (APTT, PT), jak również na proces polimeryzacji fibryny (TT), parametry kinetyczne tworzenia skrzepu i fibrynolizy (CL-test) oraz aktywność czynnika X [89,132]. Natomiast istotne statystycznie zwiększenie aktywności AT odnotowano dla metforminy wyłącznie w najwyższym badanym stężeniu [144]. Natomiast wyniki osiągnięte w ramach niniejszych badań dowodzą, iż w przeciwieństwie do analogów alkilowych wszystkie sulfonamidowe pochodne metforminy posiadające w swojej budowie pierścień aromatyczny (**5**, **9–14**) wywierały istotny statystycznie wpływ na poszczególne parametry hemostazy osoczowej – PT, APTT bądź TT, co manifestowało się ich wydłużeniem i może to wskazywać na ich potencjalne działanie antykoagulacyjne. Niewątpliwie, spośród wszystkich pochodnych aromatycznych biguanidu, te z podstawnikiem umiejscowionym w pozycji *meta*- w pierścieniu benzenowym (**9**, **11**, **13**) w zależności od badanego stężenia indukowały zwiększenie wszystkich trzech badanych parametrów (wydłużenie czasu PT, APTT oraz TT). Jednakże w przypadku powyższych analogów metforminy istotne statystycznie zmiany odnotowane dla czasu APTT oraz TT wybiegały poza zakres wartości referencyjnych (APTT: 26.7–40.0 s; TT: 14.0–18.0 s). Przykładowo dla związku **11** zarejestrowano wzrost APTT na poziomie 44.92 ± 5.09 s (względem kontroli: 34.88 ± 5.69 s; $p < 0.05$) oraz TT na poziomie 20.05 ± 0.58 s

(względem kontroli: 13.50 ± 0.28 s; $p < 0.01$). Związek **4** oraz **5** również wywierały korzystny wpływ na wydłużenie czasu APTT i TT w zakresie stężeń 0.6–1.5 $\mu\text{mol/mL}$, jednakże stężenia te są bliskie wyznaczonym dla nich wartościom IC_{50} względem komórek HUVEC. W przypadku wszystkich analizowanych sulfonamidowych analogów metforminy zawierających ugrupowanie alkilowe (**1–3**) zaobserwowano istotne statystycznie skrócenie czasu TT, jednakże mieszczące się w zakresie wartości referencyjnych, a dla analogu **1** odnotowano również istotne statystycznie wydłużenie czasu APTT w stężeniach 0.06–0.6 $\mu\text{mol/mL}$, także mieszczące się na poziomie wartości odniesienia.

Jak przedstawiłam w części teoretycznej niniejszej dysertacji stan przewlekłej hiper-glikemii indukuje nieenzymatyczną glikozylację naturalnych antykoagulantów, w tym m.in. AT, co może objawiać się spadkiem jej poziomu lub aktywności [33]. Ta osoczowa α -glikoproteina odgrywa kluczową rolę w hemostazie, gdyż jest ona głównym inhibitorem trombiny (cz. IIa) oraz czynnika Xa. Ponadto AT hamuje również takie czynniki krzepnięcia krwi jak: VIIa, IXa, XIa, XIIa, kalikreinę oraz plazminę. Wyniki moich badań ujawniły, iż związki **1**, **3–5**, **9**, **11** i **14** znacząco zwiększały aktywność AT w stężeniach 0.6–1.5 $\mu\text{mol/mL}$ (**Publikacja II**, **Publikacja III**). Niewątpliwie najsilniejszy efekt zaobserwowano dla pochodnych aromatycznych (**9**, **11**, **14**), co może tłumaczyć wpływ tych związków na wydłużenie wszystkich trzech parametrów: PT, APTT oraz TT. W przypadku pochodnych (**1**, **4–5**) zarejestrowane statystycznie istotne zmiany mieściły się w zakresie wartości referencyjnych (80–130%); natomiast dla pozostałych związków (**3**, **9**, **11**, **14**) odnotowane wartości wykaczały poza zakres referencyjny, co może mieć znaczenie dla prowadzenia dalszych badań. Przykładowo dla związku **1** zaobserwowano znaczny wzrost aktywności AT przy stężeniu 0.6 $\mu\text{mol/mL}$ i 1.5 $\mu\text{mol/mL}$, który wynosił odpowiednio $120.00 \pm 2.71\%$ i $123.00 \pm 5.20\%$ ($p < 0.01$). Natomiast w przypadku związku **9** wzrost aktywności w najwyższych badanych stężeniach (0.6–1.5 $\mu\text{mol/mL}$) kształtował się następująco $136.00 \pm 3.74\%$ i $150.50 \pm 14.20\%$ ($p < 0.05$).

Ze względu na te obiecujące wyniki wskazujące na potencjalne właściwości przeciwzakrzepowe badanych pochodnych postanowiono zweryfikować również czy związki te mogą wywierać wpływ na aktywność czynnika X powstającego zarówno na szlaku wewnątrz-, jak i zewnątrzpochodnym kaskady krzepnięcia krwi (**Publikacja II**, **Publikacja III**). Czynnikiem ten jest zatem pierwszym elementem wspólnego szlaku krzepnięcia, a jego aktywna postać wchodzi w skład kompleksu protrombinazowego odpowiedzialnego za aktywację protrombiny do trombiny, która następnie przekształca fibrynogen

w fibrynę. W świetle zgromadzonych wyników związki **1, 5, 9, 11–14** w sposób statystycznie istotny zmniejszały aktywność czynnika X w stężeniu 1.5 $\mu\text{mol/mL}$. Ponadto znaczący spadek aktywności czynnika X zauważono także w stężeniu 0.6 $\mu\text{mol/mL}$ w przypadku związków **9, 12, 13** ($p < 0.05$) oraz **14** (NS, $p > 0.05$). Co ciekawe, dla *m*- podstawionych benzenosulfonamidów (**9, 11, 13**) spadek ten może być także ściśle związany ze znacznym wydłużeniem takich parametrów jak: PT, APTT i TT; co również potwierdzałoby ich potencjalne działanie przeciwkrzepliwe. Ponadto zaobserwowano, iż pochodna **1** hamowała wewnętrzny szlak krzepnięcia ($\uparrow\text{APTT}$), a związki **5, 12, 14** wydłużały zarówno czas APTT, jak i wydłużały proces polimeryzacji fibryny ($\uparrow\text{TT}$) w stężeniach, w których zaobserwowano dla nich znaczny spadek aktywności czynnika Stuarta-Prower'a. Warto wspomnieć, iż spadki aktywności czynnika X zarejestrowane dla związków **9, 11–14** w najwyższym badanym stężeniu wykraczały poza zakres wartości referencyjnych. Zaś wszystkie pozostałe wartości mieściły się w przedziale 77–131%, a więc na poziomie referencyjnym aktywności czynnika Stuarta-Prower'a.

Na podstawie wyników uzyskanych z badań przesiewowych układu krzepnięcia (PT, APTT, TT) oraz badań nad aktywnością AT i czynnika X, związki **1–5, 9, 11, 12, 14** w stężeniach 0.006–1.5 $\mu\text{mol/mL}$ poddano dalszym pogłębionym badaniom oceniającym ich wpływ na ogólny potencjał tworzenia skrzepu i fibrynolizy (CL_{AUC}) przy użyciu wieloparametrycznego modelu (CL-test) z własnym programem komputerowym (**Publikacja II i III**). Badanie to jest oparte na pomiarze parametrów kinetycznych następujących procesów: tworzenie skrzepu, jego stabilizacja oraz fibrynoliza za pomocą ciągłego monitorowania zmian transmitancji w czasie. W doświadczeniach tych dodanie wysokiego stężenia egzogennej trombiny (0.5 IU/mL) do próbki zawierającej trzykrotnie rozcieńczone osocze oraz 10 μl badanych związków i 10 μl t-PA wyzwalalo proces tworzenia skrzepu fibrynowego. Wyniki niniejszych badań wskazują, iż większość analizowanych biguanidów wydaje się zwiększać ogólny potencjał tworzenia skrzepu i fibrynolizy ($\uparrow\text{CL}_{\text{AUC}}$) przy jednoczesnym wydłużeniu całkowitego czasu procesu tworzenia skrzepu i jego lizy ($\uparrow\text{T}$). Spośród wszystkich badanych związków, biguanidy **4, 5, 9** oraz **12** okazały się neutralne pod względem wpływu na ogólny potencjał tworzenia skrzepu i fibrynolizy.

Dotychczasowe osiągnięcia wskazują, iż stabilność skrzepu fibrynowego jest regulowana zarówno przez mechaniczne właściwości włókien fibryny, jak i ich podatność na

fibrylizę katalizowaną przez enzymy (tzw. właściwości fibrynolityczne). Zatem struktura fibryny bezpośrednio przyczynia się do regulacji szybkości fibrylizy, np. wraz ze zmniejszaniem rozmiaru włókien fibryny zmniejsza się również szybkość fibrylizy [145]. Stąd też wszelkie odnotowane zmiany wartości parametrów takich jak: początkowa prędkość wykrzepiania osocza (F_{vo}), maksimum wykrzepiania (F_{max}) oraz czas wykrzepiania osocza (T_f) mogą wskazywać, iż badane związki wpływają na strukturę powstającego skrzepu, co w następstwie może przyczyniać się do zmiany szybkości procesu fibrylizy. W świetle uzyskanych wyników, związek **11**, posiadający w swojej strukturze chemicznej grupę nitrową w pozycji *meta* w pierścieniu benzenowym, wykazywał potencjalne właściwości przeciwzakrzepowe, co przejawiało się istotnym statystycznie zmniejszeniem maksimum wykrzepiania ($\downarrow F_{max}$) oraz początkowej prędkości wykrzepiania osocza ($\downarrow F_{vo}$), a także wydłużeniem czasu wykrzepiania osocza ($\uparrow T_f$) w najwyższych badanych stężeniach (0.3–1.5 $\mu\text{mol/mL}$; $p < 0.05$, $p < 0.01$). Potencjał przeciwkrzepliwy pochodnej **11** może wynikać z jej hamującego wpływu na amidolityczną aktywność trombiny, co postanowiono ocenić w dalszej części pracy badawczej. Podobne właściwości przejawiała również pochodna **4**, jednakże wszystkie istotne statystycznie zmiany wartości następujących parametrów: F_{max} , F_{vo} i T_f zostały odnotowane wyłącznie w stężeniu 1.5 $\mu\text{mol/mL}$, a więc w stężeniu wyższym niż oszacowana dla niej wartość IC_{50} względem komórek HUVEC. Dalsza dokładna analiza procesu tworzenia skrzepu wykazała, iż sulfonamidowa pochodna metforminy podstawiona ugrupowaniem *n*-oktylowym (**2**) w stężeniu 1.5 $\mu\text{mol/mL}$ ($p < 0.05$) oraz *m*-nitrobenzenosulfonamid (**11**) w zakresie stężeń 0.3–1.5 $\mu\text{mol/mL}$ wydłużały czas trombinowy ($\uparrow T_t$), co sugeruje, iż związki te mogą wpływać na proces polimeryzacji fibryny.

Zbadano również wpływ tych związków na proces stabilizacji tworzenia skrzepu. Zgodnie z uzyskanymi wynikami stwierdzono, iż wszystkie związki wybrane do niniejszego badania wydłużają czas stabilizacji skrzepu ($\uparrow T_c$), co znalazło również swoje odzwierciedlenie w zwiększeniu pola pod krzywą stabilizacji skrzepu ($\uparrow S_c$), a wszystkie odnotowane efekty były zależne od badanego stężenia. Wyniki te wskazują, iż analizowane związki mogą wpływać na strukturę powstającego skrzepu.

W odniesieniu do parametrów fibrylizy można stwierdzić, iż analizowane związki **2–5**, **9**, **11**, **12**, **14** nie wpływały na początkową prędkość fibrylizy skrzepu (L_{vo} constans), czas fibrylizy (T_l constans), a także na pole pod krzywą fibrylizy (S_l constans) w całym zakresie badanych stężeń. Statystycznie istotny wpływ na czas fibrylizy

(\uparrow Tl) zaobserwowano jedynie w przypadku pochodnej **1** (0.3–0.6 $\mu\text{mol/mL}$) ($p < 0.05$), co było bezpośrednio związane z podwyższoną wartością parametru F_{max} . Dla pochodnych **9** i **14** odnotowano znaczne zwiększenie maksimum fibrylizy ($\uparrow L_{\text{max}}$); co najprawdopodobniej było spowodowane wzrostem wartości F_{max} . Natomiast związek **11** w stężeniu 1.5 $\mu\text{mol/mL}$ znacząco zmniejszał maksymalną prędkość fibrylizy ($\downarrow L_{\text{max}}$; $p < 0.05$). Zmiana ta jest ściśle związana ze statystycznie znamiennej zmniejszeniem maksimum wykrzepiania ($\downarrow F_{\text{max}}$; $p < 0.05$) odnotowanym w najwyższym badanym stężeniu. Niewątpliwie wszystkie otrzymane wartości parametru L_{max} odzwierciedlają zmiany obserwowane dla parametru F_{max} , a zatem wszystkie utworzone skrzepy uległy całkowitej lizie. Ponadto niniejsze wyniki sugerują, iż wszystkie utworzone skrzepy uległy lizie w czasie zbliżonym do czasu fibrylizy odnotowanego w przypadku prób kontrolnych, a zatem inkubacja z badanymi związkami nie wiąże się z ryzykiem opóźnienia procesu fibrylizy.

Proces generowania trombiny stanowi centralny element procesu hemostazy, na którego przebieg ma wpływ szybkość jej powstawania, jej struktura oraz stabilność mechaniczna i fibrynolityczna [146,147]. W tym dynamicznym procesie generowania trombiny, część utworzonej trombiny oddziałuje zwrotnie na dwa wczesne stadia układu krzepnięcia – aktywacja czynnika V i VIII. Na skutek aktywacji wyżej wymienionych czynników krzepnięcia następuje wzmocnienie funkcji czynnika/ów Xa i IXa, które są zaangażowane w dalszy proces tworzenia trombiny [148]. Przegląd dostępnej literatury dowodzi, iż zmieniony wzorzec generacji trombiny przyczynia się do istotnych implikacji fizjologicznych – zmian w procesie krzepnięcia osocza. Na przykład nadmierne nasilenie procesu generacji trombiny bezpośrednio koreluje ze zwiększonym ryzykiem zakrzepowym. Zatem proces generowania trombiny ma kluczowe znaczenie dla opracowywania nowych środków przeciwzakrzepowych lub hemostatycznych [146-148]. Dlatego też w kolejnej części badań przeprowadzono eksperymenty oceniające wpływ związków **1–5**, **9**, **11**, **12**, **14** na proces krzepnięcia po generacji endogennej trombiny (**Publikacja II** i **Publikacja III**). Poprzez ciągły pomiar zmian transmitancji, badanie to dostarcza cennych informacji o wytwarzaniu endogennej trombiny – szybkości generowanej trombiny w osoczu oraz o zapoczątkowaniu kaskady krzepnięcia. Na skutek dodania niewielkiej ilości trombiny (0.00312 IU/mL) oraz chlorku wapnia (0.005 mmola/mL), do próbek zawierających trzykrotnie rozcieńczone osocze, zaindukowano reakcję zwrotną prowadzącą do wytworzenia endogennej trombiny oraz zapoczątkowania procesu krzepnięcia. Analiza krzywej

generacji trombiny ujawniła, iż związki **2** (1.5 $\mu\text{mol/mL}$), **4** (0.6 $\mu\text{mol/mL}$) i **5** (0.06–0.3 $\mu\text{mol/mL}$) oraz pochodne **9**, **11**, **12**, **14** w całym badanym zakresie stężeń znacznie opóźniały proces generowania endogennej trombiny. Ponadto w przeprowadzonym eksperymencie związki **2** i **5** przy najwyższym badanym stężeniu (1.5 $\mu\text{mol/mL}$; $p < 0.01$) oraz pochodne metforminy **9** i **11** w zakresie stężeń 0.6–1.5 $\mu\text{mol/mL}$ (odpowiednio; $p < 0.01$, $p < 0.05$) przyczyniły się do istotnego statystycznie zmniejszenia pola pod krzywą tworzenia skrzepu ($\downarrow S$); podczas gdy dla pozostałych analogów metforminy całkowity potencjał krzepnięcia pozostawał stały (S constans). Zmniejszenie maksimum wykrzepiania (F_{max}) zaobserwowano dla związków **2** i **5** przy najwyższym testowanym stężeniu (1.5 $\mu\text{mol/mL}$), dane te sugerują, iż struktura chemiczna powyższych sulfonamidów może wpływać na strukturę skrzepu. Żadna z pozostałych badanych pochodnych nie indukowała znaczących zmian maksimum wykrzepiania (F_{max} constans). Ponadto stwierdzono istotne wydłużenie czasu wykrzepiania osocza ($\uparrow T_f$) i zmniejszenie początkowej prędkości wykrzepiania osocza ($\downarrow F_{\text{vo}}$) dla następujących sulfonamidów: **4** (0.3–0.6 $\mu\text{mol/mL}$), **5** (0.3–1.5 $\mu\text{mol/mL}$) oraz **9**, **11**, **12**, i **14** (w całym zakresie badanych stężeń). Stąd też przypuszczamy, iż wspomniane cząsteczki mogą wywierać korzystny efekt na krzepnięcie osocza poprzez wpływ na aktywność trombiny bądź poprzez zmianę aktywności czynników krzepnięcia, co w następstwie prowadzi do opóźnienia powstawania skrzepu po generacji endogennej trombiny.

Biorąc pod uwagę silny wpływ związków **9–14** na proces polimeryzacji fibryny, przejawiający się istotnym statystycznie wydłużeniem czasu TT i ich zdolność do hamowania wewnątrzpochodnego szlaku krzepnięcia krwi ($\uparrow \text{APTT}$) czy opóźniania procesu generacji endogennej trombiny (TGt) oraz rolę przypisywaną trombinie w rozwoju i progresji zakrzepicy, a także fakt, iż inhibicja trombiny (cz. IIa) stanowi jeden z kluczowych celów terapeutycznych leków innowacyjnych obecnie powszechnie stosowanych w farmakoterapii przeciwzakrzepowej, podjęto próbę przetestowania tych związków pod kątem ich oddziaływania na aktywność amidolityczną trombiny (**Publikacja III**) [149]. Badanie to przeprowadzono w oparciu o metodę spektrofotometryczną, a osiągnięte wyniki wyrażono jako prędkość reakcji enzymatycznej (dA/dt) oraz maksymalna aktywność trombiny (A_{max}).

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, iż wszystkie badane pochodne **9–14** wykazywały nieznaczące działanie hamujące prędkość reakcji enzymatycznej (dA/dt) oraz maksymalną aktywność trombiny (A_{max}); zmiany te były jednak statystycznie

nieistotne. Niewątpliwie, *p*-aminobenzenosulfonamid (**14**) najsilniej hamował maksymalną aktywność trombiny (A_{max}) oraz szybkość reakcji enzymatycznej (dA/dt) w całym analizowanym zakresie stężeń (0.3–1.5 $\mu\text{mol/mL}$); co potwierdza wcześniejsze wyniki pozyskane z testu krzepnięcia, tj. istotne statystycznie opóźnienie procesu generacji endogennej trombiny ($\uparrow\text{TGt}$), a także znaczące wydłużenie parametrów APTT i TT. Ponadto dla związku **11** w stężeniu 1.5 $\mu\text{mol/mL}$ zaobserwowano także spadek prędkości reakcji enzymatycznej ($\downarrow dA/dt$; NS, $p > 0.05$), co mogłoby wyjaśniać zmiany odnotowane we wspomnianym stężeniu w: CL-teście – istotne statystycznie zmniejszenie maksimum wykrzepiania ($\downarrow F_{max}$; $p < 0.05$) oraz początkowej prędkości wykrzepiania osocza ($\downarrow F_{vo}$; $p < 0.05$), a także wydłużenie czasu wykrzepiania osocza ($\uparrow T_f$; $p < 0.01$); czy w teście krzepnięcia – istotne statystycznie opóźnienie procesu generacji endogennej trombiny ($\uparrow\text{TGt}$; $p < 0.001$). Istotny statystycznie spadek szybkości reakcji enzymatycznej (dA/dt) zaobserwowano również dla *para*-podstawionych benzenosulfonamidy (**9**, **13**); jednak te korzystne efekty odnotowano przy najwyższym stężeniu, które przyczyniło się do znacznego spadku żywotności komórek HUVEC, dlatego też wyniki te nie uważa się za ważne. Badania te nie wykazały statystycznie znaczących zmian w aktywności trombiny dla pozostałych pochodnych metforminy. Zatem niniejsze wyniki sugerują, iż wydłużenie czasu TT wykazane w przypadku związków **10**, **12** może być spowodowane ich wpływem na proces polimeryzacji fibryny.

ETAP 3. Badania biogodności nowych pochodnych metforminy w modelu ludzkich erytrocytów (tzw. erytrotoksyczność) (**Publikacja III**).

Każdy lek, który po wchłonięciu przemieszcza się do krwi, ma bezpośredni kontakt z erytrocytami – może zostać związany na ich powierzchni bądź dyfundować do ich wnętrza [72]. Zatem kwestia hemozgodności jest kluczowym kryterium ograniczającym przydatność kliniczną nowych potencjalnych substancji leczniczych. Erytrocyty są wrażliwe na utratę integralności oraz hemolizę z powodu naprężeń ścinających czy zmian ciśnienia osmotycznego. Dlatego też w trakcie opracowywania nowych kandydatów na leki istotne jest, aby zaprojektowane cząsteczki nie wchodziły w niekorzystne interakcje z elementami morfotycznymi krwi. Ponadto erytrocyty stanowią prawdopodobnie drugi kompartment dystrybucji metforminy [63]. Stąd też w ramach niniejszej pracy postanowiono ocenić biogodność nowych pochodnych w modelu ludzkich erytrocytów. Mając na względzie badania przeprowadzone przez Robert F. i wsp., które dowodzą, iż okres półtrwania metforminy w tych komórkach krwi jest znacznie dłuższy niż ten odnotowany w osoczu – 23.4 ± 1.9 h wobec 2.7 ± 1.2 h [150], postanowiono przeprowadzić ocenę wpływu nowych pochodnych metforminy na hemolizę krwinek czerwonych oraz badanie morfologiczne tych komórek krwi zarówno po 1 godzinie, jak i 24 godzinach inkubacji ze wszystkimi badanymi związkami (1–14). Eksperymenty oceniające potencjalną erytrotoksyczność związków 1–8 przeprowadziłam w ramach wcześniej realizowanych badań pod kierownictwem pani dr hab. Markowicz-Piaseckiej, a osiągnięte wyniki zostały szczegółowo omówione w publikacji naukowej pt. „Sulfonamide metformin derivatives induce mitochondrial-associated apoptosis and cell cycle arrest in breast cancer cells.”, której jestem również współautorem. Pomimo, iż związki 1–5 w stężeniu $1.5 \mu\text{mol/mL}$ w statystycznie istotny sposób zwiększały odsetek zhemolizowanych erytrocytów po 1 i 24-h inkubacji, należy je uznać za hemokompatybilne, gdyż oszacowany stopień hemolizy czerwonych krwinek nie przekroczył klinicznie istotnego poziomu – 10%. Jednakże benzenosulfonamidowe pochodne metforminy z ugrupowaniem -CN podstawionym w pierścieniu aromatycznym w pozycji *o*-, *m*- i *p*- (6–8) przyczyniały się do znaczącej hemolizy krwinek czerwonych, przekraczającej 15% w stężeniu $1.5 \mu\text{mol/mL}$. Związki te uznano za biokompatybilne w zakresie stężeń 0.006 – $0.6 \mu\text{mol/mL}$, gdyż tu stopień hemolizy nie przekroczył 10%. Po 1-godzinnej inkubacji zarówno pochodne metoksyłowe podstawione w pozycji *meta*- (9), *para*- (10), jak i *m*-nitrobenzenosulfonamid (11) nie wykazywały statystycznie istotnego wpływu na integralność błony erytrocytarnej w całym badanym

zakresie stężeń. Pozostałe związki (**12–14**) znacząco zwiększały odsetek zhemolizowanych erytrocytów; jednakże stopień hemolizy erytrocytów wynosił mniej niż 5%, co uważa się za klinicznie nieistotne. Przykładowo, stopień hemolizy erytrocytów po 1-godzinnej inkubacji zawiesiny erytrocytów w obecności związku **12** ($0.6 \mu\text{mol/mL}$) wynosił 1.72 ± 0.57 (wobec kontroli 0.966 ± 0.116 ; $p < 0.05$). Żaden z badanych związków **9–14** również nie wywoływał istotnej klinicznie hemolizy po 24 godzinach inkubacji. Niewątpliwie związki (**1–5**, **9–14**) można uznać za potencjalnie bezpieczne w zakresie stężeń $0.006\text{--}1.5 \mu\text{mol/mL}$, gdyż % hemolizy w żadnym przypadku nie przekroczył 10%.

Erytrocyty poddano również analizie morfologicznej z wykorzystaniem mikroskopu z kontrastem fazowym. W przypadku erytrocytów traktowanych związkami **1–6**, **9–14** nie zaobserwowano zmian patologicznych, a więc zmian nieodwracalnych, takich jak: anizocyty czy owalocyty, zarówno po 1 godzinie oraz 24 godzinach inkubacji. Niemniej jednak zauważono tendencję do tworzenia echinocytów oraz stomatocytów na skutek traktowania erytrocytów pochodnymi **1–6**, **9–14** (po 1-h i 24-h). Jednakże są to zmiany fizjologiczne i w pełni odwracalne. Po 24 godzinnej ekspozycji erytrocytów na wyżej wymienione związki zaobserwowano nasilenie zmian fizjologicznych w porównaniu do eksperymentu prowadzonego przez 1 godzinę. Spośród wszystkich badanych związków pochodne cyjanowe podstawione w pozycji *meta* i *para* w pierścieniu benzenowym (**7–8**) indukowały rozległą echinocytozę, eryptozę i owalocytozę, co odzwierciedla wyniki uzyskane w teście określającym integralność błony erytrocytarnej. Podsumowując, nowe sulfonamidowe pochodne metforminy **1–5**, **9–14** uznano za hemokompatybilne, gdyż nie wykazują one wpływu na integralność błony erytrocytarnej oraz morfologię krwinek czerwonych w całym badanym zakresie stężeń ($0.006\text{--}1.5 \mu\text{mol/mL}$), w którym to były one testowane w ramach eksperymentów stanowiących podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej.

Podsumowanie osiągniętych wyników

ETAP 4. Ustalenie zależności pomiędzy budową a aktywnością biologiczną badanych pochodnych (**Publikacja II i III**). Podsumowanie wyników uzyskanych w przeprowadzonych badaniach naukowych.

W ramach prezentowanej rozprawy doktorskiej przeprowadzono analizę zależności pomiędzy budową chemiczną nowych sulfonamidowych analogów metforminy a ich aktywnością biologiczną, ze szczególnym uwzględnieniem właściwości antykoagulacyjnych i cytotoksyczności w modelach hodowli komórek *in vitro*. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów uzyskano następujące rezultaty:

- Spośród wszystkich analizowanych związków, alkilowe pochodne metforminy (**1–3**), *m*-nitrobenzenosulfonamid (**11**) oraz *o*-aminobenzenosulfonamid (**12**) wykazywały najkorzystniejszy profil bezpieczeństwa w obu liniach komórkowych HUVEC i AoSMC w stężeniach do 1.5 $\mu\text{mol/mL}$, co zostało również potwierdzone w badaniach integralności komórkowej.
- Analiza statystyczna badania integralności i żywotności komórek HUVEC dowiodła, iż opracowana strategia chemicznej modyfikacji szkieletu metforminy w sulfonamid zawierający w swojej budowie podstawnik alkilowy, tj. *n*-butylowy, prowadzi do uzyskania związku o najmniejszej cytotoksyczności, gdyż po 36 godzinach inkubacji z komórkami HUVEC pochodna ta nie wpływała istotnie na wartość znormalizowanego indeksu komórkowego w obu badanych stężeniach 0.3 i 1.0 $\mu\text{mol/mL}$, a oszacowana dla niej wartość IC_{50} wynosi $3.643 \pm 0.26 \mu\text{mol/mL}$.
- Wszystkie sulfonamidowe analogi metforminy zależnie od badanego stężenia zmniejszały integralność komórek śródbłonna naczyniowego, jednakże w przypadku pochodnych **2–5**, **9–14** zmiany te nie były powiązane ze zwiększoną śmiertelnością komórek HUVEC.
- Podstawienie pierścienia aromatycznego ugrupowaniem cyjanowym w pozycji *orto*, *meta* bądź *para* skutkowało znaczącym wzrostem cytotoksyczności benzenosulfonamidowych pochodnych metforminy, co przejawiało się zmniejszeniem żywotności komórek HUVEC na poziomie: 78.13–98.45%, jak również spadkiem integralności komórek śródbłonna do wartości bliskich zeru.
- Zarówno wszystkie pochodne alkilowe (**1–4**), jak również *meta* i *para* podstawione benzenosulfonamidy (**5**, **9**, **10**, **13**, **14**), podobnie jak lek referencyjny, metformina,

zwiększają wychwyty glukozy w komórkach HUVEC, co może wskazywać na ich potencjalne działanie hipoglikemizujące. Niewątpliwie w celu uzyskania pełnej oceny wpływu nowo zsyntetyzowanych analogów metforminy na wychwyty glukozy niezbędne jest przeprowadzenie dalszych eksperymentów z wykorzystaniem innych modeli komórkowych, takich jak hepatocyty, komórki trzustki czy mięśni szkieletowych.

- Na skutek chemicznego przekształcenia cząsteczki metforminy w sulfonamidy zawierające układ aromatyczny uzyskano związki (**5**; **9–14**) hamujące zarówno wewnątrzpochodny szlak krzepnięcia (\uparrow APTT), jak i proces polimeryzacji fibryny (\uparrow TT). Natomiast wprowadzenie grupy metoksylowej, nitrowej bądź aminowej do pierścienia aromatycznego benzenosulfonamidowych analogów metforminy w pozycji *meta* determinuje ich wpływ także na zewnątrzpochodny szlak krzepnięcia (\uparrow PT). Dane te zostały dodatkowo potwierdzone eksperymentalnie w teście oceniającym aktywność jednego z głównych celów innowacyjnych leków przeciwzakrzepowych – badanie aktywności czynnika X, który wykazał, iż wszystkie badane aromatyczne pochodne metforminy indukowały spadek jego aktywności, potwierdzając w ten sposób ich potencjalne właściwości antykoagulacyjne. Ponadto w obecności wspomnianych benzenosulfonamidowych analogów metforminy **9**, **11** i **14** odnotowano także wzrost aktywności AT.
- Spośród pochodnych alkilowych, związek z podstawnikiem *n*-butylowym (**1**) w statystycznie istotny sposób wydłużał czas APTT, zmniejszał aktywność czynnika X oraz indukował wzrost aktywności AT. Zaś pochodna trifluorometylowa (**4**) wydłużała proces polimeryzacji fibryny, co może być bezpośrednio powiązane z jej zdolnością do zwiększania aktywności AT. Jednakże te korzystne właściwości pochodnej **4** były obserwowane w stężeniach, które przyczyniają się do znaczącego spadku żywotności komórek HUVEC.
- Dalsza pogłębiona analiza przy użyciu wieloparametrycznego modelu (CL-test) dostarcza dodatkowych dowodów na to, iż przyłączenie grupy nitrowej do pierścienia benzenu w pozycji *meta* prowadzi do uzyskania związku (**11**) o potencjalnej aktywności antykoagulacyjnej, wynikającej z jego hamującego wpływu na proces polimeryzacji fibryny (\downarrow Fvo, \downarrow Fmax, \uparrow Tf), a także zdolności do wydłużania czasu potrzebnego do rozpoczęcia procesu tworzenia skrzepu (\uparrow Tt).
- Alkilowe analogi metforminy **2**, **4** oraz jej aromatyczne pochodne **5**, **9**, **11**, **12**, **14** przyczyniły się do wydłużenia czasu generacji endogennej trombiny (TGt) i czasu

krzepnięcia osocza (\uparrow Tf) oraz zmniejszenia początkowej prędkości wykrzepiania osocza (\downarrow Fvo), co może być bezpośrednio powiązane z hamowaniem aktywności amidolitycznej trombiny, zwłaszcza w przypadku związków **9**, **11**, **14**.

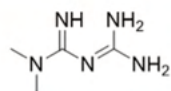
- W dalszych badaniach eksperymentalnych oceniających aktywność amidolityczną trombiny, dowiodłam, iż przeprowadzenie modyfikacji chemicznej struktury metforminy w pochodną benzenosulfonamidową z przyłączonym podstawnikiem aminowym w pozycji *para*- (**14**) pozwala uzyskać związek o potencjalnych właściwościach antykoagulacyjnych, gdyż spośród wszystkich analizowanych pochodnych wykazywał on najsilniejszy efekt hamujący maksymalną aktywność trombiny (A_{max}) oraz szybkość reakcji enzymatycznej (dA/dt) w całym badanym zakresie stężeń.
- Wszystkie przebadane sulfonamidowe analogi metforminy (**1–5**) zmniejszały uwalnianie t-PA. W celu przeanalizowania zależności pomiędzy wpływem sulfonamidowych pochodnych metforminy na poziom t-PA a zdolnością do przekształcania nieaktywnego plazminogenu w aktywną plazminę niezbędne jest przeprowadzenie dalszych pogłębionych badań oceniających aktywność plazminy, jak również warto oszacować stosunek PAI-1 do t-PA
- W przeprowadzonym teście zarastania rysy, *p*-acetylobenzenosulfonamid (**5**) w sposób umiarkowany hamował migrację komórek śródbłonna, co może okazać się niezwykle cenne przy opracowywaniu cząsteczek hamujących inicjację oraz progresję zmian miażdżycowych.
- W świetle uzyskanych wyników nowe benzenosulfonamidowe pochodne oparte na szkielecie metforminy podstawione grupą aminową w pozycji *o*-, *m*-, *p*- w pierścieniu aromatycznym (**12–14**) indukowały znaczny spadek mitochondrialnego potencjału membranowego ($\Delta\Psi M$), co może być istotne w zapobieganiu dysfunkcji śródbłonna oraz w leczeniu wtórnych defektów związanych z cukrzycą.
- Żadna z testowanych pochodnych (**1–5**, **9–14**), poza cyjanobenzenosulfonamidami (**6–8**), nie wykazuje niekorzystnego wpływu na integralność błony erytrocytarnej, gdyż stopień hemolizy krwinek czerwonych po inkubacji ze wspomnianymi analogami metforminy nie przekroczył 10%, a mikroskopia fazowo-kontrastowa wykazała jedynie tendencję do tworzenia zmian fizjologicznych: transformacje dyskocyt – echinocyt oraz dyskocyt – stomatocyt. W związku z powyższym wysunięto wniosek, iż wszystkie te nowo zsyntetyzowane analogi metforminy (**1–5**, **9–14**) nie oddziałują silnie z ich dwuwarstwą lipidowo-białkową, a więc są hemokompatybilne w całym badanym zakresie stężeń: 0.006–1.5 $\mu\text{mol/mL}$.

Realizacja celów naukowych – podsumowanie osiągniętych wyników

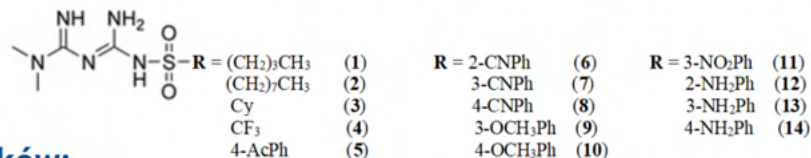
- Benzenosulfonamidy podstawione ugrupowaniem -CN w pozycji *o*-, *m*- i *p*- (**6–8**) przyczyniały się do znaczącej hemolizy krwinek czerwonych, przekraczającej 15% w stężeniu 1.5 $\mu\text{mol/mL}$, co znalazło swoje odzwierciedlenie w analizie mikroskopowej – zaobserwowano rozległą echinocytozę, eryptozę i owalocytozę. Związki te uznano za biokompatybilne w zakresie stężeń 0.006–0.6 $\mu\text{mol/mL}$ (stopień hemolizy < 10%).

Analiza aktywności biologicznej nowych analogów metforminy o budowie sulfonamidowej

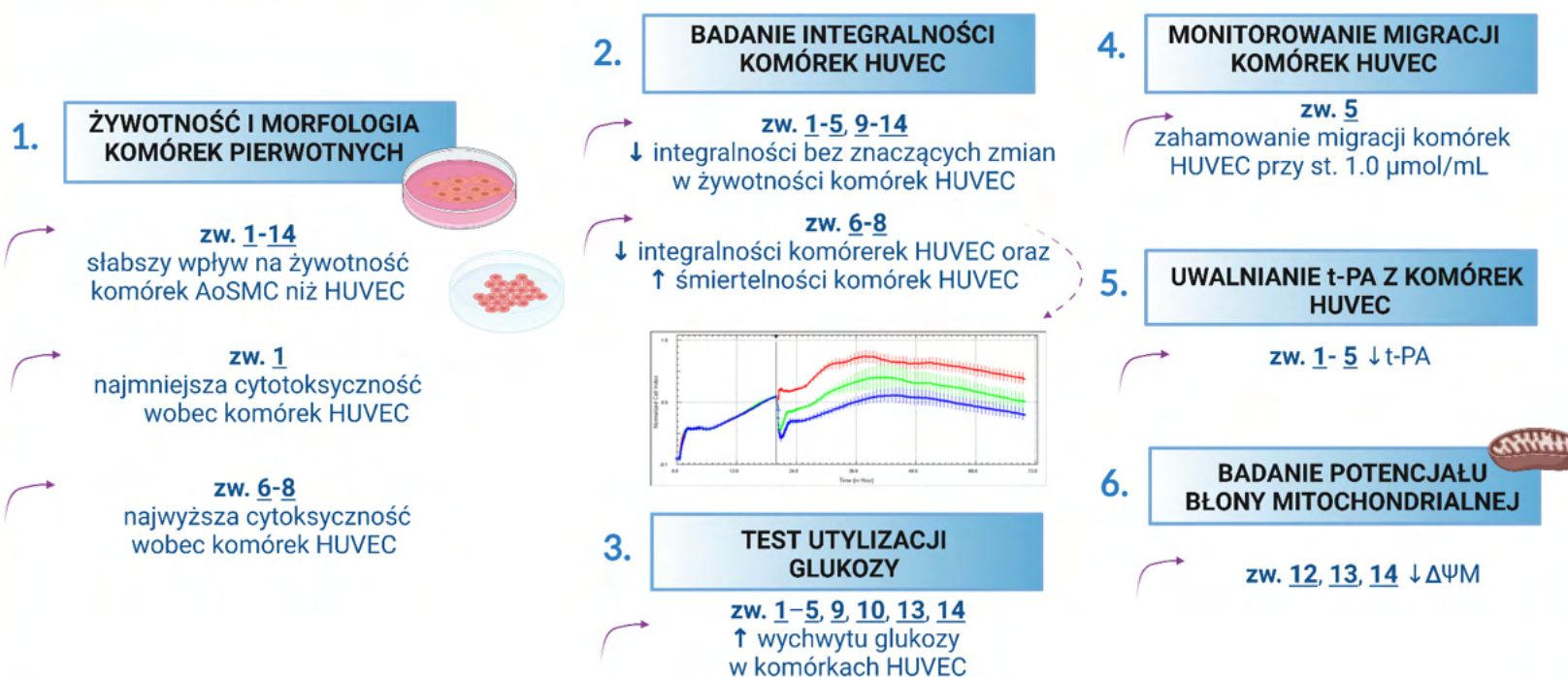
METFORMINA



14 NOWYCH SULFONAMIDOWYCH POCHODNYCH METFORMINY

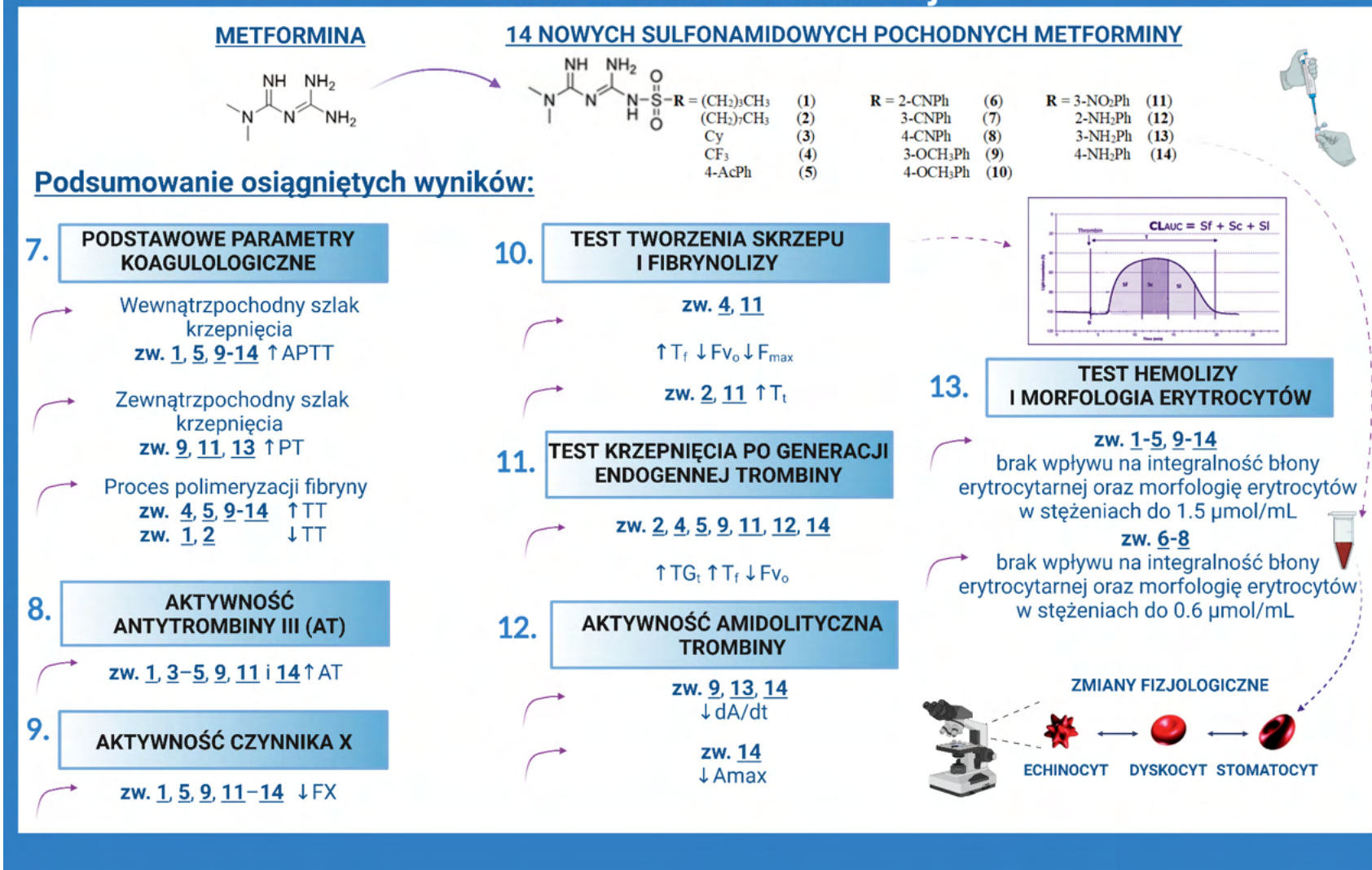


Podsumowanie osiągniętych wyników:



Rycina 15A. Podsumowanie osiągniętych wyników badań zrealizowanych w ramach pracy doktorskiej.

Analiza aktywności biologicznej nowych analogów metforminy o budowie sulfonamidowej



Rycina 15B. Podsumowanie osiągniętych wyników badań zrealizowanych w ramach pracy doktorskiej.

Wnioski końcowe oraz perspektywy na przyszłość

Metformina to nie tylko jeden z najstarszych doustnych leków przeciwcukrzycowych, zalecany przez prawie wszystkie aktualne wytyczne jako lek pierwszego rzutu w terapii T2DM, ale również cząsteczka chemiczna z bogatą perspektywą na przyszłość ze względu na jej dobry profil bezpieczeństwa, długotrwałe stosowanie u ludzi oraz wiele cennych właściwości, obejmujących jej wielokierunkowy wpływ na glikemię oraz plejotropowy mechanizm działania, w tym m.in. korzystny wpływ na profil lipidowy osocza, zwiększenie aktywności fibrynolitycznej osocza oraz redukcję stresu oksydacyjnego; a także jej ochronny wpływ na układ sercowo-naczyniowy.

Pomimo tych wszystkich korzystnych właściwości, ze względu na właściwości fizykochemiczne metforminy, jej stosowanie jest bezpośrednio powiązane z kilkoma problemami, m.in. relatywnie wolnym i niecałkowitym wchłanianiem z przewodu pokarmowego, co w konsekwencji przejawia się umiarkowaną biodostępnością oraz znacznymi różnicami międzypersonalnymi i wewnątrzpersonalnymi w odpowiedzi klinicznej na lek. W związku z powyższym w University of Eastern Finland zsyntetyzowanych zostało **14** nowych sulfonamidowych analogów metforminy, o korzystniejszym profilu fizykochemicznym, które następnie zostały w ramach niniejszej pracy doktorskiej przebadane pod kątem ich działania na wybrane parametry hemostazy osoczowej i naczyniowej, jak również oceniono ich biogodność w modelu ludzkich erytrocytów. Ponadto oszacowano ich zdolność do wychwytu glukozy z komórek HUVEC, a także oznaczono ich aktywność cytotoksyczną w modelach hodowli ludzkich komórek pierwotnych *in vitro*.

Zgodnie z osiągnięciami uzyskanymi w ramach wcześniej prowadzonych badań, metformina nie wpływa zarówno na wewnątrzpochozny, jak i zewnątrzpochozny szlak krzepnięcia (APTT, PT), jak również na proces polimeryzacji fibryny (TT), parametry kinetyczne tworzenia skrzepu i fibrynolizy (CL-test) oraz aktywność czynnika X [89,132]. Niemniej jednak, metformina zwiększa uwalnianie t-PA w całym badanym zakresie stężeń 0.006–1.5 $\mu\text{mol/mL}$ [89]. Ponadto metformina w statystycznie istotny sposób zwiększa aktywność AT, jednakże wyłącznie w stężeniu 1.5 $\mu\text{mol/mL}$ [144]. Natomiast na podstawie eksperymentów przeprowadzonych w ramach prezentowanej rozprawy doktorskiej można wywnioskować, iż nowo zsyntetyzowane, nieopisane wcześniej w literaturze analogi metforminy o budowie sulfonamidowej, zawierające podstawnik alkilowy (**1–4**) bądź pierścień aromatyczny w swojej strukturze chemicznej (**5, 9–14**), wywierają korzystniejsze działanie na poszczególne parametry hemostazy osoczowej

niż lek referencyjny, metformina. Rezultaty przeprowadzonych analiz sugerują, iż *m*-nitrobenzenosulfonamid (**11**) wykazuje wysoce pożądaną aktywność przeciwkrzepliwą; podczas gdy *m*-metoksybenzenosulfonamid (**9**), *m*-aminobenzenosulfonamid (**13**) oraz *p*-aminobenzenosulfonamid (**14**) wykazują zarówno właściwości przeciwhiperglikemiczne, jak i silniejsze działanie przeciwzakrzepowe niż metformina. Tak więc uzyskane wyniki wskazują, iż chemiczna modyfikacja szkieletu metforminy w sulfonamidowe analogi zawierające w swojej budowie układ aromatyczny podstawiony zwłaszcza w pozycji *meta* (**9**, **11**, **13**) prowadzi do otrzymania cząsteczek o silniejszych właściwościach przeciwzakrzepowych niż sam lek macierzysty, metformina. Ponadto przeprowadzone analizy cytotoksyczności badanych związków **1–5**, **9–14** z wykorzystaniem komórek HUVEC oraz AoSMC, a także erytrocytów sugerują bezpieczeństwo ich potencjalnego zastosowania. Niemniej jednak, wyłącznie na podstawie badań *in vitro* nie można przewidzieć właściwości nowych analogów metforminy w warunkach *in vivo*. Niezbędne jest zatem kontynuowanie badań *in vivo* w celu uzyskania pełnego modelu skuteczności i bezpieczeństwa nowo zsyntetyzowanych sulfonamidowych analogów metforminy.

Podsumowując, wyżej wymienione pochodne o obiecującym działaniu hipoglikemizującym i/lub potencjalnie silniejszym działaniem przeciwzakrzepowym niż metformina, mogą być stosowane jako cząsteczki wiodące do dalszego projektowania i opracowywania nowych, potencjalnych środków terapeutycznych o wielokierunkowym mechanizmie działania. Zatem modyfikacja szkieletu metforminy w sulfonamidy zawierające pierścień aromatyczny stanowi pierwszy obiecujący krok w rozwoju nowych pochodnych biguanidu wykazujących właściwości hipoglikemizujące o korzystnym wpływie na stan nadkrzepliwości, a uzyskane wyniki w przyszłości mogą przyczynić się do uzyskania leku wykazującego wielokierunkowy mechanizm działania, co byłoby istotne w leczeniu oraz przeciwdziałaniu powikłaniom współistniejącym z T2DM.

Streszczenie pracy

Cukrzyca jest obecnie uznawana za jedną z najbardziej rozpowszechnionych, przewlekłych chorób metabolicznych na świecie. W ostatnich dwóch dekadach liczba pacjentów z rozpoznaną cukrzycą gwałtownie wzrasta, co stanowi jedno z najpoważniejszych zagrożeń dla globalnego zdrowia, jak również największe wyzwanie zdrowotne obecnego wieku. Zgodnie z obowiązującą definicją Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organization*) cukrzyca jest wyniszczającym, wieloczynnikowym, przewlekłym zespołem zaburzeń metabolicznych objawiającym się wysokim stężeniem glukozy we krwi (stan przewlekłej hiperglikemii) wynikającym z upośledzonego wydzielania insuliny i/lub defektów działania insuliny. Spośród wszystkich typów cukrzycy, cukrzyca typu 2 (T2DM, ang. *Type 2 Diabetes Mellitus*) stanowi prawie 95% wszystkich zdiagnozowanych przypadków. W początkowej fazie cukrzycy leczenie rozpoczyna się od kompleksowej modyfikacji stylu życia, tj. zmiany nawyków żywieniowych, wprowadzenia umiarkowanego wysiłku fizycznego, abstynencji od alkoholu oraz zaprzestania palenia tytoniu. Jeżeli utrzymanie optymalnej kontroli metabolicznej choroby nie jest możliwe mimo zastosowania wyżej wymienionych środków, niezbędne jest włączenie do terapii behawioralnej odpowiedniej terapii lekowej. Zgodnie z najnowszymi zaleceniami Amerykańskiego Towarzystwa Diabetologicznego, Europejskiego Stowarzyszenia Badań nad Cukrzycą oraz Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego chlorowodorek *N,N*-dimetylobiguanidu, powszechnie znany jako metformina, jest lekiem pierwszego rzutu, stosowanym zarówno w monoterapii we wczesnych stadiach T2DM, jak i na dalszych etapach leczenia w terapii skojarzonej z insuliną lub innymi lekami hipoglikemizującymi, jeśli nie istnieją żadne przeciwwskazania do jej stosowania.

T2DM jest często bezpośrednio powiązana z szeregiem chorób współistniejących, takich jak choroby układu sercowo-naczyniowego, nadciśnienie, otyłość, hiperlipidemia, przewlekła choroba nerek czy niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby. Choroby te zaliczane są do głównych czynników warunkujących stan prozakrzepowy u diabetyków. Ze względu na wysokie ryzyko incydentów miażdżycowo-zakrzepowych, klinicznie objawiających się chorobą wieńcową, a także chorobą naczyń obwodowych lub mózgowych; choroby układu sercowo-naczyniowego są najczęstszą przyczyną śmiertelności w tej grupie pacjentów. Warto wspomnieć, iż od ponad 60 lat metformina stanowi najczęściej przepisywany lek w terapii T2DM, a jej zastosowanie kliniczne jest po-

parte obszerną bazą danych pochodzącą zarówno z badań przedklinicznych, jak i klinicznych, która obejmuje także istotne dowody na redukcję częstości zdarzeń sercowo-naczyniowych u pacjentów z cukrzycą. Przełomowe z klinicznego punktu widzenia okazały się wyniki badania United Kingdom Prospective Diabetes, które udowodniły, iż cząsteczka ta znacząco zmniejsza zgony związane z cukrzycą (o 42%), a także śmiertelność ogólną (o 36%) oraz ryzyko zawału mięśnia sercowego (o 39%) u pacjentów ze zdiagnozowaną T2DM. Te korzystne właściwości metforminy wynikają z jej wielokierunkowego wpływu na glikemię oraz plejotropowego mechanizmu działania, w tym korzystnego wpływu na profil lipidowy osocza, nasilenia aktywności fibrynolitycznej osocza oraz redukcji stresu oksydacyjnego, a także jej ochronnego wpływu na układ sercowo-naczyniowy, w tym zmniejszenie przebudowy mięśnia sercowego oraz właściwości przeciwmiażdżycowych. Dobry profil bezpieczeństwa metforminy, długotrwałe stosowanie u ludzi oraz wszystkie wymienione powyżej wielokierunkowe właściwości farmakologiczne metforminy uzasadniają jej wiodącą pozycję w leczeniu pacjentów z cukrzycą, a także otwierają nowe możliwości zastosowania tej wyjątkowej cząsteczki w profilaktyce i leczeniu wielu złożonych jednostek chorobowych. Stąd też metformina stała się obiecującym kandydatem w strategii repozycjonowania leków.

Choć metformina wykazuje wiele korzystnych właściwości farmakologicznych, niestety ze względu na swoją budowę chemiczną i silnie hydrofilowy charakter wykazuje niekorzystne właściwości farmakokinetyczne. Skutkuje to niską przenikalnością przez błony biologiczne, co prowadzi do słabej absorpcji leku i ostatecznie ogranicza jego biodostępność. W związku z powyższym cząsteczka metforminy wzbudziła w ostatnich latach szczególne zainteresowanie wśród badaczy oraz zachęciła ich do modyfikacji struktury biguanidu. Aby poprawić profil farmakokinetyczny i fizykochemiczny macierzystego leku w University of Eastern Finland zsyntetyzowano szereg analogów metforminy. Spośród wszystkich zsyntetyzowanych pochodnych obiecującymi kandydatami okazały się pochodne sulfonamidowe. W celu uzyskania analogu metforminy o potencjalnym podwójnym działaniu, w tym o właściwościach hipoglikemizujących i przeciwwakrzepowych, jeden z bocznych atomów azotu w szkielecie metforminy podstawiono ugrupowaniem sulfonamidowym posiadającym w swojej strukturze grupę alkilową lub pierścień aromatyczny.

Uwzględniając powyższe przesłanki, celem przedstawionego spójnego tematycznie zbioru publikacji naukowych, stanowiących podstawę niniejszej dysertacji, było przeprowadzenie analizy aktywności biologicznej **14** nowych obiecujących analogów metforminy o budowie sulfonamidowej. Oceniono wpływ niniejszych związków na wybrane aspekty hemostazy, w tym parametry osocze i naczyniowe oraz układ krzepnięcia i fibrylizację. W zaprezentowanej pracy przeprowadzono także szczegółową analizę potencjału terapeutycznego metforminy jako obiecującej cząsteczki o właściwościach przeciwstarzeniowych wraz z uwzględnieniem molekularnych mechanizmów jej działania w kontekście potencjalnego zastosowania jako leku o wielokierunkowym działaniu.

Pierwszy etap niniejszych badań obejmował biologiczną ocenę **14** sulfonamidowych pochodnych metforminy pod kątem ich wpływu na wybrane parametry hemostazy naczyniowej. Cytotoksyczność badanych analogów metforminy oceniono z wykorzystaniem eksperymentalnych modeli *in vitro* układu naczyniowego: ludzkich komórek śródbłoka żyły pępowinowej (HUVEC, ang. *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) oraz ludzkich komórek mięśni gładkich aorty (AoSMC, ang. *Aortal Smooth Muscle Cells*). Wcześniejsze badania wykazały, iż metformina nie wpływa na żywotność zarówno komórek HUVEC, jak i komórek AoSMC w całym zakresie badanych stężeń 0.006–3.0 $\mu\text{mol/mL}$. Z przedstawionych badań wynika, iż spośród wszystkich analizowanych związków, alkilowe pochodne metforminy (**1–3**), *m*-nitrobenzenosulfonamid (**11**) i *o*-aminobenzenosulfonamid (**12**) wykazują najkorzystniejszy profil bezpieczeństwa zarówno w liniach komórkowych HUVEC, jak i AoSMC przy stężeniach do 1.5 $\mu\text{mol/mL}$. Zastosowanie chemicznej modyfikacji cząsteczki metforminy do benzenosulfonamidów podstawionych grupą –CN w pozycji *orto*, *meta* lub *para* skutkowało istotnym wzrostem cytotoksyczności, co przejawiało się zarówno znacznym zmniejszeniem żywotności komórek HUVEC, jak i spadkiem ich integralności do wartości bliskich zeru. Pozostałe związki zależnie od stężenia zmniejszały integralność komórek HUVEC, jednakże nie przyczyniały się one do zwiększenia ich śmiertelności.

W dalszej części badań wszystkie analogi metforminy oparte na strukturze sulfonamidu zostały poddane badaniom przesiewowym w celu przeprowadzenia oceny ich zdolności do utylizacji glukozy w komórkach HUVEC oraz ich potencjalnych właściwości przeciwwkrzepowych wykorzystując model biologiczny ludzkiego osocza. Przeprowadzono pomiar czasu protrombinowego (PT, ang. *Prothrombin Time*), czasu częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT, ang. *Activated Partial Thromboplastin Time*) oraz

czasu trombinowego (TT, ang. *Thrombin Time*). Następnie oceniano ich wpływ na aktywność czynnika X, trombiny i antytrombiny III (AT, ang. *antithrombin III*). Ponadto analizowane związki poddano dalszym pogłębionym badaniom pod kątem ich wpływu na proces tworzenia skrzepu i jego lizy (CL-test, ang. *Clot Formation and Fibrinolysis Test*). Wcześniejsze badania wykazały, iż metformina nie wpływa zarówno na wewnątrzpochodny, jak i zewnątrzpochodny szlak krzepnięcia (APTT, PT), proces polimeryzacji fibryny (TT), parametry kinetyczne tworzenia skrzepu czy fibrynolizy (CL-test) oraz aktywność czynnika X w całym zakresie badanych stężeń 0.006–3.0 $\mu\text{mol/mL}$. Natomiast udowodniono, iż metformina statystycznie istotnie zwiększa aktywność AT, jednakże tylko przy stężeniu 1.5 $\mu\text{mol/mL}$. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, iż zarówno alkilowe analogi metforminy **1–4**, jak i jej aromatyczne pochodne **5, 9, 10, 13, 14**, podobnie jak lek macierzysty, metformina, zwiększały wychwyt glukozy w komórkach HUVEC. W przeciwieństwie do leku referencyjnego, wszystkie aromatyczne analogi metforminy (**5, 9–14**) istotnie wydłużały zarówno czas APTT, jak i TT. Dzięki strukturalnej modyfikacji szkieletu metforminy w *m*-podstawione sulfonamidy (**9, 11, 13**) uzyskano związki, które wykazywały wpływ również na zewnątrzpochodny szlak krzepnięcia (\uparrow PT). Dane te zostały dodatkowo potwierdzone eksperymentalnie w teście oceniającym aktywność czynnika X, który wykazał, iż wszystkie sulfonamidy indukowały spadek jego aktywności, tym samym potwierdzając ich aktywność przeciwkrzepliwą. Z kolei w obecności pochodnych **9, 11** i **14** odnotowano również wzrost aktywności AT. Stwierdzono, iż przyłączenie grupy nitrowej w pozycji *meta* pierścienia benzenowego (pochodna **11**) determinuje jej wpływ na proces tworzenia skrzepu (\downarrow początkowej prędkości wykrzepiania osocza (\downarrow Fvo), \downarrow maksimum wykrzepiania (\downarrow Fmax), \uparrow czasu wykrzepiania osocza (\uparrow Tf)) oraz czas potrzebny do rozpoczęcia procesu tworzenia skrzepu (\uparrow Tt). Ponadto test krzepnięcia wykazał, iż zarówno alkilowe analogi metforminy **1–4**, jak i jej aromatyczne pochodne **5, 9, 11, 12, 14** przyczyniają się do wydłużenia czasu generowania endogennej trombiny (TGt, ang. *thrombin generation time*), czasu krzepnięcia osocza (\uparrow Tf) oraz zmniejszenia początkowej prędkości wykrzepiania osocza (\downarrow Fvo), co może być bezpośrednio powiązane z hamowaniem przez te związki amidolitycznej aktywności trombiny. Ze strukturalnego punktu widzenia chemiczna modyfikacja szkieletu metforminy w benzenosulfonamid podstawiony ugrupowaniem aminowym w pozycji *para* w pierścieniu aromatycznym skutkowałą uzyskaniem związku **14** o najsilniej-

szym efekcie hamującym maksymalną aktywność trombiny (Amax) i początkową szybkość reakcji enzymatycznej (dA/dt) w całym badanym zakresie stężeń, co zatem wskazuje na jego właściwości przeciwzakrzepowe.

W ostatnim etapie badań oceniono wpływ nowych pochodnych metforminy na hemolizę krwinek czerwonych (RBC, ang. *red blood cells*) i morfologię tych komórek krwi. Biozgodność niniejszych substancji w modelu ludzkich erytrocytów oceniano za pomocą badania mikroskopowego i hemolizy RBC. Żaden z analizowanych sulfonamidowych analogów metforminy poza cyjanobenzenosulfonamidami (**6–8**) nie wykazywał niekorzystnego wpływu na integralność błony erytrocytarnej oraz ich morfologię (stopień hemolizy erytrocytów < 10%); zatem wszystkie te nowo zsyntetyzowane analogi metforminy (**1–5, 9–14**) nie oddziałują silnie z ich dwuwarstwą lipidowo-białkową. W obrazie mikroskopowym obserwowano jedynie zmiany fizjologiczne, tj. stomatocyty i echinocyty. Na podstawie niniejszych wyników stwierdzono, iż związki **1–5, 9–14** są hemozgodne w całym badanym zakresie stężeń: 0.006–1.5 $\mu\text{mol/mL}$. Analiza cytotoksyczności badanych związków **1–5, 9–14** przy użyciu komórek HUVEC i AoSMC oraz erytrocytów sugeruje bezpieczeństwo ich potencjalnego zastosowania. Niemniej jednak, aby uzyskać kompleksowy model skuteczności i bezpieczeństwa niniejszych analogów metforminy opartych na strukturze sulfonamidu, niezbędne jest przeprowadzenie także badań *in vivo*.

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej dysertacji dowodzą, iż nowo zsyntetyzowane analogi metforminy o strukturze sulfonamidowej, zawierające w swojej budowie chemicznej zarówno podstawnik alkilowy (**1–4**), jak i pierścień aromatyczny (**5, 9–14**) korzystniej wpływają na wybrane parametry hemostazy osoczowej niż metformina. Ponadto uzyskane dane sugerują, iż *m*-nitrobenzenosulfonamid (**11**) wykazuje wysoce pożądaną aktywność przeciwkrzepliwą; podczas gdy *m*-metoksybenzenosulfonamid (**9**), *m*-aminobenzenosulfonamid (**13**) i *p*-aminobenzenosulfonamid (**14**) wykazują zarówno właściwości przeciwhiperlipidemiczne, jak i silniejsze działanie przeciwzakrzepowe w porównaniu z lekiem odniesienia, metforminą. Na tej podstawie wysunięto wniosek, iż przeprowadzenie chemicznej modyfikacji szkieletu metforminy w benzenosulfonamidy podstawione zwłaszcza w pozycji *meta* (**9, 11, 13**) prowadzi do otrzymania cząsteczek o silniejszych właściwościach antykoagulacyjnych niż lek macierzysty, metformina. Wyżej wymienione pochodne można uznać za wartościowych kandydatów na prototypy

do dalszego projektowania i opracowywania nowych potencjalnych przedstawicieli terapeutycznych o wysoce pożądanym właściwościach przeciwkrzepliwych lub o multimodalnym działaniu – leków przeciwcukrzycowych o korzystnym wpływie na stan nadkrzepliwości.

Summary

Diabetes mellitus is currently ranked as one of the most widespread chronic metabolic diseases worldwide. In the last two decades, the number of patients diagnosed with diabetes has been increasing at an alarming rate which currently constitutes one of the most serious threats to global health as well as the greatest health challenges of the current century. According to the present definition provided by the World Health Organization (WHO), diabetes mellitus constitutes a devastating, multi-factorial chronic cluster of metabolic disorders manifested by high blood glucose concentrations (state of chronic hyperglycaemia) arising from impaired insulin secretion and/or defects in insulin action. Out of all types of diabetes, type 2 diabetes mellitus (T2DM) accounts for almost 95% of all diagnosed diabetes cases. In the initial stage of T2DM, treatment begins with comprehensive lifestyle modification, i.e. changing dietary habits, introducing moderate physical effort, abstaining from alcohol, as well as smoking cessation. If the aforementioned measures fail to achieve optimal metabolic control of this disease, it is necessary to incorporate appropriate pharmacotherapy into the behavioral therapy. In pursuance of the latest recommendations of the American Diabetes Association, the European Association for the Study of Diabetes, and the Polish Diabetes Society, *N,N*-dimethylbiguanide hydrochloride, well-known as metformin, constitutes the first-line drug of choice, used both as a monotherapy in the early stages of T2DM and as combined drug therapy with insulin or other hypoglycaemic drugs in further steps of treatment, if there are no contraindications to its administration.

T2DM is quite often directly bound up with a number of co-morbidities, such as cardiovascular diseases, hypertension, obesity, hyperlipidaemia, chronic kidney disease or non-alcoholic fatty liver disease. These diseases are rated among the main contributing factors to the pro-thrombotic state in diabetics. In view of the high risk of atherothrombotic events, clinically manifested as coronary artery disease and also peripheral or cerebrovascular disease; cardiovascular diseases constitute the most prevalent cause of mortality in this group of patients. It is worth mentioning that metformin has been the top-prescribed medicine for the management of T2DM for over 60 years, and its clinical application is supported by a vast database of both pre-clinical and clinical studies, which also includes significant evidence for reducing cardiovascular events in diabetes patients. The United Kingdom Prospective Diabetes study revealed landmark results indicating that this molecule significantly reduces diabetes-related deaths by 42%,

all-cause mortality by 36%, and the risk of myocardial infarction by 39% in patients diagnosed with T2DM. These beneficial properties of metformin arise from its multidirectional effect on glycaemia and the pleiotropic mechanism of action, including a beneficial effect on the plasma lipid profile, amplification of plasma fibrinolytic activity and reduction of oxidative stress as well as its protective effect on the cardiovascular system, covering the reduction of myocardial remodelling, and anti-atherosclerotic properties. The good safety profile of metformin, long-term use in humans, and all the above multidirectional pharmacological properties of metformin justify its leading position in the treatment of patients with T2DM, as well as open new possibilities for the using this unique molecule in the prevention and treatment of many complex disease entities. As a result, metformin has emerged as a promising candidate in drug repositioning strategy.

Although metformin exerts numerous advantageous pharmacological properties, it unfortunately possesses unfavourable pharmacokinetic properties due to its chemical structure and strongly hydrophilic character. This results in low permeability through biological membranes, leading to poor drug absorption and ultimately limiting its bioavailability. Considering the above, this molecule has aroused particular interest among researchers in recent years and encouraged them to modify the structure of biguanide. The scientists at the University of Eastern Finland synthesized several metformin analogues aimed at improving the pharmacokinetic and physicochemical characteristics of the original drug. Among these derivatives, sulfonamide derivatives of metformin have become promising candidates. To obtain metformin analogue with a potential dual action, including the hypoglycaemic and anti-coagulation properties, one of the terminal nitrogen atoms in the metformin backbone was substituted with sulfonamide moiety possessing an alkyl group or an aromatic ring in its structure.

Taking the aforementioned premises into consideration, the purpose of a thematically coherent collection of scientific publications, which serves as the foundation of the present dissertation, was to carry out an analysis of the biological activity of **14** novel promising metformin analogues with a sulfonamide structure. Hence, their effect on selected aspects of hemostasis, including plasma and vascular parameters as well as coagulation and fibrinolysis process, was assessed. In the paper presented herein, a detailed analysis

of the therapeutic potential of metformin as a promising molecule with anti-ageing properties; including the molecular mechanisms of its action in the context of its potential use as a multi-target drug, was conducted.

The first step of this studies included the biological evaluation of **14** sulfonamide derivatives of metformin for their effect on vascular hemostasis. The cytotoxic activity of studied metformin analogues was determined using experimental *in vitro* models of the vasculature: human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and human aortal smooth muscle cells (AoSMC). Previous studies prove that metformin does not affect the viability of both HUVEC and AoSMC over the entire concentration range of 0.006–3.0 $\mu\text{mol/mL}$. The research presented here suggests that among all the analyzed compounds, alkyl derivatives of metformin (**1–3**), *m*-nitrobenzenesulfonamide (**11**) as well as *o*-aminobenzenesulfonamide (**12**) reveal the greatest safety profile in both HUVEC and AoSMC cell lines at concentrations up to 1.5 $\mu\text{mol/mL}$. Chemical modification of the metformin molecule into benzenesulfonamides substituted with –CN group in the *orto*, *meta* or *para* position resulted in a significant increase in the cytotoxicity of benzenesulfonamide biguanides, which was manifested by both a significant reduction in HUVEC cell viability and a decrease in their integrity to values close to zero. The remaining compounds, depending on the concentration, decreased the integrity of HUVEC cells; however, they did not contribute to increased cell death.

In the further part of the studies, all sulfonamide-based analogues of metformin were underwent screening to assess their glucose utilization properties in HUVECs as well as their potential anti-coagulation properties in the biological model of human plasma. Prothrombin Time (PT), Partially Activated Thromboplastin Time (APTT), and Thrombin Time (TT) were measured. Afterwards, their influence on the activity of coagulation X factor, thrombin, and antithrombin III (AT) was also assessed. Furthermore, the analyzed compounds were subjected to further in-depth studies in terms of their influence on the process of clot formation and its lysis (CL-test). Prior research demonstrates that metformin does not affect both the intrinsic, and extrinsic coagulation pathway (APTT, PT), as well as the process of fibrin polymerization (TT), the kinetic parameters of clot formation or fibrinolysis (CL-test) and the activity of factor X over the entire concentration range 0.006–3.0 $\mu\text{mol/mL}$. However, metformin statistically significantly increases AT activity, but only at a concentration of 1.5 $\mu\text{mol/mL}$. Based on the obtained results, it was found that both alkyl analogues of metformin **1–4** and its aromatics derivatives **5**,

9, 10, 13, 14, similarly to the parent drug, metformin, elevated glucose uptake in HUVECs. Unlike the original drug, all its aromatic analogues (**5, 9–14**) significantly prolonged both APTT, and TT. Owing to the structural modification of a metformin backbone into *m*-substituted sulfonamides (**9, 11, 13**) resulted in compounds that also affect the extrinsic coagulation pathway (\uparrow PT). These data were further proven experimentally in the factor X activity test, which found that all sulfonamides induced a decrease in its activity, thus confirming their anti-coagulant activity. In turn, an increase in the activity of AT was also reported in the presence of derivatives **9, 11**, and **14**. The attachment of the nitro group to the *meta* position of the benzene ring (derivative **11**) determines its effect on the process of clot formation (\downarrow initial clot formation velocity (\downarrow Fvo), \downarrow maximum clotting velocity (\downarrow Fmax), \uparrow plasma clotting time (\uparrow Tf)), and the time it takes to start the clot formation process (\uparrow Tt). Moreover, the coagulation assay proved that both alkyl metformin analogues **2, 4** and its aromatic derivatives **5, 9, 11, 12, 14** contributed to a prolonged thrombin generation time (TGt), plasma clotting time (\uparrow Tf), and a decreased initial velocity of coagulation (\downarrow Fvo), which might be related to the inhibition of the amidolytic activity of thrombin. From the structural point of view, the chemical modification of a metformin skeleton into benzenesulfonamide substituted with an amino moiety in the *para* position in the aromatic ring resulted in a compound **14** with the most potent inhibitory effect on the maximum activity of thrombin (A_{max}) and initial velocity of the reaction (dA/dt) over the entire concentration range, implying its anti-coagulant properties.

The last purpose of this research was to assess the effect of new metformin derivatives on red blood cell (RBC) hemolysis and the morphology of these blood cells. The biocompatibility of these substances in a model of human red blood cells was assessed through microscopic examination and RBC lysis test. Indubitably, none of the analyzed sulfonamide-based analogues of metformin besides cyanobenzenesulfonamides (**6–8**) revealed an adverse effect on erythrocyte integrity as well as their morphology (the degree of RBC hemolysis $< 10\%$); thus all the newly synthesized metformin analogues do not interact strongly with the lipid-protein bilayer. Only physiological changes, i.e. stomatocytes and echinocytes, were observed in the microscopic images. On the basis of these results, it was concluded that compounds **1–5, 9–14** are hemocompatible in the entire tested concentration range: 0.006–1.5 $\mu\text{mol/mL}$. The cytotoxicity analysis of the tested compounds **1–5, 9–14** using HUVEC and AoSMC cells, as well as erythrocytes, suggest the safety of

their potential use. Nevertheless, to obtain a comprehensive model of the effectiveness and safety of the present sulfonamide-based metformin analogues, it is crucial to conduct additional *in vivo* research.

The results of this dissertation indicate that newly synthesized metformin analogues with a sulfonamide structure, containing both an alkyl substituent (**1–4**) or an aromatic ring in their chemical structure (**9–14**), have a more favourable effect on individual parameters of plasma hemostasis than metformin. Furthermore, the obtained outcomes suggest that *m*-nitrobenzenesulfonamide (**11**) reveals highly desirable anti-coagulant activity; while *m*-methoxybenzenesulfonamide (**9**), *m*-aminobenzenesulfonamide (**13**) and *p*-aminobenzenesulfonamide (**14**) exert both anti-hyperglycaemic properties and more potent anti-coagulant activity than the parent drug, metformin. On this basis, it was inferred a conclusion that the chemical modification of the metformin scaffold into benzenesulfonamides substituted especially in the *meta* position (**9, 11, 13**) leads to molecules with stronger anticoagulant properties than the reference drug, metformin. The above-mentioned derivatives can be regarded as valuable candidates as prototypes for further design and development of new potential therapeutic representatives with highly desirable anti-coagulant properties or with multimodal action – antidiabetic agents with a favourable effect on hypercoagulability.

Piśmiennictwo

1. Ejma, M., **2010**. Neurologiczne Powikłania cukrzycy. *Pol. Przegl. Neurol.* 6 (4), 179-189.
2. Dziemidok, P., Makara-Studzińska, M., Jarosz, M., **2011**. Diabetes and depression: a combination of civilization and life-style diseases is more than simple problem adding - literature review. *Ann Agric Environ Med.* 18 (2), 318-322.
3. Dziemidok, P., Gorczyca-Siudak, D., Danielak, M., **2021**. Is It Possible to Prevent Sars-Cov-2 Infection in a Non-Infectious Diseases Ward during the Pandemic on the Example of a Diabetes Clinic Institute of Rural Health, Lublin, Poland? *Int J Environ Res Public Health.* 18 (14), 7593.
4. Jaacks, L., Siegel, K., Gujral, U., Narayan, K., **2016**. Type 2 diabetes: A 21st century epidemic. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 30 (3), 331–343.
5. IDF Diabetes Atlas 2022. <https://diabetesatlas.org/> (stan z dnia 01.12.2022).
6. Raport: Rozwój terapii w diabetologii. <https://diabetyk.org.pl/raport-rozwoj-terapii-w-diabetologii/> (stan z dnia 02.12.2022).
7. Cukrzyca. Epidemiologia rejestrowana. <https://shiny.nfz.gov.pl/cukrzyca/> (stan z dnia 02.12.2022).
8. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>, (stan z dnia 02.12.2022).
9. Csajbók, É., Tamás, G., **2016**. Cerebral cortex: a target and source of insulin? *Diabetologia.* 59 (8), 1609-1615.
10. Solomon, E., Berg, L., Martin D., **2004**. *Biology.* 7th edition. Brooks Cole. 1-1248.
11. Małecki, M., Klupa, T., **2007**. Rola komórki beta trzustki w patogenezie cukrzycy typu 2. *Diabet. Prakt.* 8, B1-B10.
12. Aronoff, S., Berkowitz, K., Shreiner, B., Want, L., **2004**. Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon. *Diabetes Spectr.* 17 (3), 183-190.
13. Gerich, J., **2002**. Is Reduced First-Phase Insulin Release the Earliest Detectable Abnormality in Individuals Destined to Develop Type 2 Diabetes?. *Diabetes.* 51 (1), 117-121.
14. Yuan, T., Song, S., Zhao, T., Duo, Y., Wang, S., Gao, J., Liu, S., Dong, Y., Li, R., Fu, Y., Zhao, W., **2021**. Patterns of Insulin Secretion During First-Phase Insulin Secretion in Normal Chinese Adults. *Front Endocrinol (Lausanne).* 12, 738427.
15. Park, S., Gautier, J., Chon, S., **2021**. Assessment of Insulin Secretion and Insulin Resistance in Human. *Diabetes Metab J.* 45 (5), 641-654.
16. Dęmba, K., Krasnodębski, P., Mrozikiewicz-Rakowska, B., Jasik, M., Czupryniak, L., **2016**. Leczenie cukrzycy typu 2. *Kardiolog. Prakt.* 10 (1), 3-9.
17. Satin, L., Butler, P., Ha J., Sherman A., **2015**. Pulsatile insulin secretion, impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Mol Aspects Med.* 42, 61-77.
18. Lang, D., Matthews, D., Burnett, M., Turner, R., **1981**. Brief, irregular oscillations of basal plasma insulin and glucose concentrations in diabetic man. *Diabetes.* 30, 435–439.
19. O’Rahilly, S., Turner, R., Matthews, D., **1988**. Impaired pulsatile secretion of insulin in relatives of patients with non-insulin-dependent diabetes. *N Engl J Med.* 318, 1225–1230.
20. Meier, J., Pennartz, C., Schenker, N., Menge, B., Schmidt, W., Heise, T., Kapitza, C., Veldhuis, J., **2013**. Hyperglycaemia is associated with impaired pulsatile insulin secretion: effect of basal insulin therapy. *Diabetes Obes Metab.* 15, 258–263.
21. Lin, J., Fabregat, M., Gomis, R., Bergsten, P., **2002**. Pulsatile insulin release from islets isolated from three subjects with type 2 diabetes. *Diabetes.* 51 (4), 988–993.

22. Gumbiner, B., Van Cauter, E., Beltz, W., Ditzler, T., Griver, K., Polonsky, K., Henry, R., **1996**. Abnormalities of insulin pulsatility and glucose oscillations during meals in obese noninsulin-dependent diabetic patients: effects of weight reduction. *J Clin Endocrinol Metab.* 81 (6), 2061-2068.
23. Zethelius, B., Byberg, L., Hales, C., Lithell, H., Berne, C., **2003**. Proinsulin and acute insulin response independently predict Type 2 diabetes mellitus in men-report from 27 years of follow-up study. *Diabetologia.* 46 (1), 20-26.
24. Batista, T., Haider, N., Kahn, C., **2021**. Defining the underlying defect in insulin action in type 2 diabetes. *Diabetologia.* 64 (5), 994-1006.
25. Li, X., Weber, N., Cohn, D., Hollmann, M., DeVries, J., Hermanides, J., Preckel, B., **2021**. Effects of Hyperglycemia and Diabetes Mellitus on Coagulation and Hemostasis. *J Clin Med.* 10 (11), 2419.
26. Vazzana, N., Ranalli, P., Cucurullo, C., Davì, G., **2012**. Diabetes mellitus and thrombosis. *Thromb Res.* 129 (3), 371-377.
27. Schneider, D., **2009**. Factors Contributing to Increased Platelet Reactivity in People with Diabetes. *Diabetes Care.* 32 (4), 525–527.
28. Carr, M., **2001**. Diabetes mellitus: a hypercoagulable state. *J Diabetes Complications.* 15(1), 44-54.
29. Ajjan, R., Kietsiroje, N., Badimon, L., Vilahur, G., Gorog, D., Angiolillo, D., Russell, D., Rocca, B., Storey, R., **2021**. Antithrombotic therapy in diabetes: which, when, and for how long? *Eur Heart J.* 42 (23), 2235–2259.
30. Soma, P., Pretorius, E., **2015**. Interplay between ultrastructural findings and atherothrombotic complications in type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol* 14, 96.
31. Colwell, J., Nesto, R. **2003**. The platelet in diabetes: focus on prevention of ischemic events. *Diabetes Care.* 26 (7), 2181-2188.
32. American Diabetes Association, **2009**. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 32 (1), S62-S67.
33. Addai-Mensah, O., Annani-Akollor, M., Nsafoah, F., Fondjo, L., Owiredo, E., Danquah, K., Duneeh, R., Amponsah, F., **2019**. Effect of poor glycaemic control on plasma levels and activity of protein C, protein S, and antithrombin III in type 2 diabetes mellitus. *PLoS One.* 14 (9), e0223171.
34. Mugabo, Y., Li, L., Renier, G., **2010**. The connection between C-reactive protein (CRP) and diabetic vasculopathy. Focus on preclinical findings. *Curr Diabetes Rev.* 6 (1), 27-34.
35. Muniyappa, R., Sowers, J., **2013**. Role of insulin resistance in endothelial dysfunction. *Rev Endocr Metab Disord.* 14 (1) 5-12.
36. Fowler M., **2011**. Mikro- i makronaczyniowe powikłania cukrzycy, *Diabetologia po Dyplomie.* 8 (4), 40-44.
37. Mahindrakar, Y., Suryakar, A., Ankush, R., Katkam, R., Kumbhar, K., **2007**. Comparison between erythrocyte hemoglobin and spectrin glycosylation and role of oxidative stress in type-2 diabetes mellitus. *Indian J Clin Biochem.* 22 (1), 91-94.
38. Camm, A., Sabbour, H., Schnell, O., Summaria, F., Verma, A., **2022**. Managing thrombotic risk in patients with diabetes. *Cardiovasc Diabetol.* 21 (1), 160.
39. Pechlivani, N., Ajjan, R., **2018**. Thrombosis and Vascular Inflammation in Diabetes: Mechanisms and Potential Therapeutic Targets. *Front Cardiovasc Med.* 5, 1.
40. Cosentino, F., Grant, P., Aboyans, V., Bailey, C., Ceriello, A., Delgado, V., Federici, M., Filippatos, G., Grobbee, D., Hansen, T., Huikuri, H., Johansson, I., Jüni, P., Lettino, M., Marx, N., Mellbin, L., Östgren, C., Rocca, B., Roffi, M., Sattar, N., Seferović, P., Sousa-Uva, M., Valensi, P., Wheeler, D., ESC Scientific

- Document Group, **2019**. ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD. *Eur Heart J.* 41 (2), 255-323.
41. The Writing Team, **2023**. Guidelines on the management of patients with diabetes. A position of Diabetes Poland. *Curr Top Diabetes*, 3 (1), 1–133.
 42. Harter, K., Levine, M., Henderson, S., **2015**. Anticoagulation drug therapy: a review. *West J Emerg Med.* 16 (1), 11-17.
 43. Di Minno, A., Frigerio, B., Spadarella, G., Ravani, A., Sansaro, D., Amato, M., Kitzmiller, J., Pepi, M., Tremoli, E., Baldassarre, D., **2017**. Old and new oral anti-coagulants: Food, herbal medicines and drug interactions. *Blood Rev.* 31 (4), 193-203.
 44. Lip, G., Keshishian, A., Kang, A., Li, X., Dhamane, A., Luo, X., Balachander, N., Rosenblatt, L., Mardekian, J., Nadkarni, A., Pan, X., Di Fusco, M., Garcia Reeves, A., Yuce, H., Deitelzweig, S., **2020**. Effectiveness and Safety of Oral Anticoagulants in Patients With Nonvalvular Atrial Fibrillation and Diabetes Mellitus. *Mayo Clin Proc.* 2020, 95, 929-943.
 45. Rejestr Produktów Leczniczych, Karta Charakterystyki Postaci Leku – Warfin 3 mg, <https://rejestrmedyczne.ezdrowie.gov.pl/rpl/search/public> (stan z dnia 12.01.2023).
 46. Rejestr Produktów Leczniczych, Karta Charakterystyki Postaci Leku – Acenocumarol WZF 1 mg, <https://rejestrmedyczne.ezdrowie.gov.pl/rpl/search/public> (stan z dnia 12.01.2023).
 47. Mavromanoli, A., Stefano, M., Barco, Konstantinides, S., **2021**. Antithrombotics and new interventions for venous thromboembolism: Exploring possibilities beyond factor IIa and factor Xa inhibition. *Res Pract Thromb Haemost.* 5 (4), 10.1002.
 48. Alwafi, H., Alotaibi, B., Naserm, A., Salawati, E., Qadus, S., Sweiss, K., Dairi, M., Hassouneh, L., Aldalameh, Y., Samannodi, M., **2021**. The safety and efficacy of the use of oral anticoagulant medications in patients with diabetes mellitus: A systematic review. *Saudi Pharm J.* 29 (12), 1374-1382.
 49. Baker, W., Beyer-Westendorf, J., Bunz, T., Eriksson, D., Meinecke, A., Sood, N., Coleman, C., **2019**. Effectiveness and safety of rivaroxaban and warfarin for prevention of major adverse cardiovascular or limb events in patients with non-valvular atrial fibrillation and type 2 diabetes. *Diabetes Obes. Metab.* 21 (9), 2107–2114.
 50. Rocha, B., da Cunha, G., Aguiar, C., **2021**. A narrative review of low-dose rivaroxaban in patients with atherothrombotic cardiovascular disease: Vascular protection beyond anticoagulation. *Cardiovasc. Diagn. Ther.* 11 (1), 130–141.
 51. Hylek, E., Held, C., Alexander, J., Lopes, R., De Caterina, R., Wojdyla, D., Huber, K., Jansky, P., Steg, P., Hanna, M., Thomas, L., Wallentin, L., Granger, C., **2014**. Major bleeding in patients with atrial fibrillation receiving apixaban or warfarin: The ARISTOTLE Trial (Apixaban for Reduction in Stroke and Other Thromboembolic Events in Atrial Fibrillation): Predictors, Characteristics, and Clinical Outcomes. *J. Am. Coll. Cardiol.* 63 (20), 2141–2147.
 52. Brambatti, M., Darius, H., Oldgren, J., Clemens, A., Noack, H., Brueckmann, M., Yusuf, S., Wallentin, L., Ezekowitz, M., Connolly, S., Healey, J., **2015**. Comparison of dabigatran versus warfarin in diabetic patients with atrial fibrillation: Results from the RE-LY trial. *Int. J. Cardiol.* 196, 127–131.
 53. Leki przeciwcukrzycowe. <https://www.mp.pl/cukrzyca/leczenie/65898,leki-przeciwcukrzycowe> (stan z dnia 04.01.2023).

54. Drzewoski, J., Hanefeld, M., **2021**. The Current and Potential Therapeutic Use of Metformin-The Good Old Drug. *Pharmaceuticals*. 14 (2), 122.
55. Rena, G., Hardie, D., Pearson, E., **2017**. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*. 60 (9), 1577-1585.
56. Zhou, T., Xu, X., Du, M., Zhao, T., Wang, J., **2018**. A preclinical overview of metformin for the treatment of type 2 diabetes. *Biomed Pharmacother*. 106, 1227-1235.
57. Bailey, C., **2017**. Metformin: historical overview. *Diabetologia* 60 (9), 1566–1576.
58. Bednarska, K., Kuś, P., Fecka, I., **2020**. Investigation of the Phytochemical Composition, Antioxidant Activity, and Methylglyoxal Trapping Effect of *Galega officinalis* L. Herb In Vitro. *Molecules*. 25 (24), 5810.
59. Rutwica lekarska. <https://podlaskiogrod.pl/Gatunki-roslin/Bobowate,10/Rutwica-lekarska,700> (stan z dnia 12.01.2023).
60. Hardie, D., **2022**. 4.12 - A New Understanding of Metformin. *Comprehensive Pharmacology*. 280-300.
61. Sterne, J., **1959**. Treatment of diabetes mellitus with N,N-dimethylguanylguanidine (LA. 6023, glucophage). *Therapie*. 14, 625–630.
62. Rejestr Produktów Leczniczych, Karta Charakterystyki Postaci Leku - Glucophage 850, <https://rejestrmedyczne.ezdrowie.gov.pl/rpl/search/public> (stan z dnia 12.01.2023).
63. He, L., Wondisford, F., **2015**. Metformin action: concentrations matter. *Cell Metab*. 21(2):159-162.
64. Corcoran, C., Jacobs, T. Metformin. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK518983/> (stan z dnia 12.01.2023).
65. National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 3520, Guanidine. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Guanidine>. (stan z dnia 12.01.2023).
66. Chhetri, H., Thapa, P., Van Schepdael, A., **2014**. Simple HPLC-UV method for the quantification of metformin in human plasma with one step protein precipitation. *Saudi Pharm J*. 22 (5), 483-487.
67. Shalmashi, A., **2008**. New Route to Metformin Hydrochloride (N,N-dimethylimidodicarbonimidic diamide hydrochloride) Synthesis. *Molbank* 1, M564.
68. Total synthesis of metformin. <https://www.sciencesnail.com/science/total-synthesis-of-metformin>. (stan z dnia 14.01.2023).
69. Viollet, B., Guigas, B., Sanz, Garcia, N., Leclerc, J., Foretz, M., Andreelli, F., **2012**. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci (Lond)*. 122 (6), 253-270.
70. Mondal, S., Samajdar, R., Mukherjee, S., Bhattacharyya, A., Bagchi, B., **2018**. Unique Features of Metformin: A Combined Experimental, Theoretical and Simulation Study of its Structure, Dynamics and Interaction Energetics with DNA Grooves. *J. Phys. Chem. B*. 1-47.
71. Graham, G., Punt, J., Arora, M., Day, R., Doogue, M., Duong, J., Furlong, T., Greenfield, J., Greenup, L., Kirkpatrick, C., Ray, J., Timmins, P., Williams, K., **2011**. Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet*. 50 (2), 81-98.
72. Derendorf, H., Gramattè, T., Schäfer, H., Staab, A., **2013**. Farmakokinetyka Podstawy i Znaczenie praktyczne. wyd. 3, przeł. Wyska, E. *MedPharm Polska*. 1-383.
73. Pernicova, I., Korbonits, M., **2014**. Metformin-mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nat Rev Endocrinol*. 10 (3), 143-156.
74. Dunn, C., Peters, D., **1995**. Metformin. A review of its pharmacological properties and therapeutic use in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Drugs*. 49 (5), 721–749.

75. Gong, L., Goswami, S., Giacomini, K., Altman, R., Klein, T., **2012**. Metformin pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet Genomics*. 22 (11), 820-827.
76. Stocker, S., Morrissey, K., Yee, S., Castro, R., Xu, L., Dahlin, A., Ramirez, A., Roden, D., Wilke, R., McCarty, C., Davis, R., Brett, C., Giacomini, K., **2013**. The effect of novel promoter variants in MATE1 and MATE2 on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of metformin. *Clin Pharmacol Ther*. 93 (2), 186-194.
77. Nasykhova, Y., Tonyan, Z., Mikhailova, A., Danilova, M., Glotov, A., **2020**. Pharmacogenetics of Type 2 Diabetes—Progress and Prospects. *Int. J. Mol. Sci*. 21 (18), 6842.
78. Foretz, M., Guigas, B., Bertrand, L., Pollak, M., Viollet, B., **2014**. Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metab*. 20 (6), 953-966.
79. Markowicz-Piasecka, M., Huttunen, K., Mateusiak, L., Mikiciuk-Olasik, E., Sikora, J., **2017**. Is Metformin a Perfect Drug? Updates in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Curr Pharm Des*. 23 (17), 2532-2550.
80. Mofo Mato, E., Guewo-Fokeng, M., Essop, M., Owira, P., **2018**. Genetic polymorphisms of organic cation transporter 1 (OCT1) and responses to metformin therapy in individuals with type 2 diabetes: A systematic review. *Medicine (Baltimore)*. 97 (27), e11349.
81. Xiao, D., Guo, Y., Li, X., Yin, J., Zheng, W., Qiu, X., Xiao, L., Liu, R., Wang, S., Gong, W., Zhou, H., Liu, Z., **2016**. The Impacts of SLC22A1 rs594709 and SLC47A1 rs2289669 Polymorphisms on Metformin Therapeutic Efficacy in Chinese Type 2 Diabetes Patients. *Int J Endocrinol*. 2016, 4350712.
82. Choi, J., Yee, S., Ramirez, A., Morrissey, K., Jang, G., Joski, P., Mefford, J., Hesselson, S., Schlessinger, A., Jenkins, G., Castro, R., Johns, S., Stryke, D., Sali, A., Ferrin, T., Witte, J., Kwok, P., Roden, D., Wilke, R., McCarty, C., Davis, R., Giacomini, K., **2011**. A common 5'-UTR variant in MATE2-K is associated with poor response to metformin. *Clin Pharmacol Ther*. 90 (5), 674-84.
83. Zaharenko, L., Kalnina, I., Geldnere, K., Konrade, I., Grinberga, S., Židzik, J., Javorský, M., Lejnieks, A., Nikitina-Zake, L., Fridmanis, D., Peculis, R., Radovica-Spalvina, I., Hartmane, D., Pugovics, O., Tkáč, I., Klimčáková, L., Pīrāgs, V., Klovinš, J., **2016**. Single nucleotide polymorphisms in the intergenic region between metformin transporter OCT2 and OCT3 coding genes are associated with short-term response to metformin monotherapy in type 2 diabetes mellitus patients. *Eur J Endocrinol*. 175 (6), 531-540.
84. Abdulla Mahmood, S., **2021**. Mechanisms of Action of Metformin. *Metformin - Pharmacology and Drug Interactions*. IntechOpen. (stan z dnia 12.01.2023).
85. Prattichizzo, F., Giulianim A., Mensam E., Sabbatinelli, J., De Nigris, V., Rippo, M., La Sala, L., Procopio, A., Olivieri, F., Ceriello, A., **2018**. Pleiotropic effects of metformin: Shaping the microbiome to manage type 2 diabetes and postpone ageing. *Ageing Res Rev*. 48, 87-98.
86. Wesołowski, P., Wańkowicz, Z., **2011**. Zakład Farmakodynamiki, Insulinooporność a dializoterapia otrzewnowa. *Forum Nefrologiczne*. 4 (4), 313–319.
87. Poznyak, A., Litvinova, L., Poggio, P., Moschetta, D., Sukhorukov, V., Orekhov, A., **2022**. From Diabetes to Atherosclerosis: Potential of Metformin for Management of Cardiovascular Disease. *Int. J. Mol. Sci*. 23, 9738.
88. Han, Y., Xie, H., Liu, Y., Gao, P., Yang, X., Shen, Z., **2019**. Effect of metformin on all-cause and cardiovascular mortality in patients with coronary artery diseases: a systematic review and an updated meta-analysis. *Cardiovasc Diabetol*. 18 (1), 96.

89. Markowicz-Piasecka, M., Huttunen, K., Broncel, M., Sikora, J., **2019**. Sulfenamide and Sulfonamide Derivatives of Metformin – A New Option to Improve Endothelial Function and Plasma Haemostasis. *Sci Rep.* 9, 6573.
90. 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.
91. 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 (8), 657-669.
92. Mamputu, J., Wiernsperger, N., Renier, G., **2003**. Metformin inhibits monocyte adhesion to endothelial cells and foam cell formation. *The British Journal of Diabetes & Vascular Disease.* 3 (4), 302-310.
93. Wang, X., Zhang, J., Li, L., Zhao, X., **2011**. Beneficial effects of metformin on primary cardiomyocytes via activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase. *Chin Med J (Engl).* 124 (12), 1876-1884.
94. Yang, Q., Yuan, H., Chen, M., Qu, J., Wang, H., Yu, B., Chen, J., Sun, S., Tang, X., Ren, W., **2018**. Metformin ameliorates the progression of atherosclerosis via suppressing macrophage infiltration and inflammatory responses in rabbits. *Life Sci.* 198, 56-64.
95. Sasaki, H., Asanuma, H., Fujita, M., Takahama, H., Wakeno, M., Ito, S., Ogai, A., Asakura, M., Kim, J., Minamino, T., Takashima, S., Sanada, S., Sugimachi, M., Komamura, K., Mochizuki, N., Kitakaze, M., **2009**. Metformin prevents progression of heart failure in dogs: role of AMP-activated protein kinase. *Circulation.* 119 (19), 2568-2577.
96. Xiao, H., Ma, X., Feng, W., Fu, Y., Lu, Z., Xu, M., Shen, Q., Zhu, Y., Zhang, Y., **2010**. Metformin attenuates cardiac fibrosis by inhibiting the TGFbeta1-Smad3 signalling pathway. *Cardiovasc Res.* 87 (3), 504-513.
97. Yin, M., van der Horst, I., van Melle, J., Qian, C., van Gilst, W., Silljé, H. de Boer, R., **2011**. Metformin improves cardiac function in a nondiabetic rat model of post-MI heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 301, (2), H459-H468.
98. Cittadini, A., Napoli, R., Monti, M., Rea, D., Longobardi, S., Netti, P., Walser, M., Samà, M., Aimaretti, G., Isgaard, J., Saccà, L., **2012**. Metformin prevents the development of chronic heart failure in the SHHF rat model. *Diabetes.* 61 (4), 944-953.
99. Elmadhun, N., Sabe, A., Lassaletta, A., Chu, L., Sellke, F., **2014**. Metformin mitigates apoptosis in ischemic myocardium. *J Surg Res.* 192 (1), 50-58.
100. Mohan, M., Al-Talabany, S., McKinnie, A., Mordi, I., Singh, J., Gandy, S., Baig, F., Hussain, M., Bhalraam, U., Khan, F., Choy, A., Matthew, S., Houston, J., Struthers, A., George, J., Lang, C., **2019**. A randomized controlled trial of metformin on left ventricular hypertrophy in patients with coronary artery disease without diabetes: the MET-REMODEL trial. *Eur Heart J.* 40 (41), 3409-3417.
101. Gillani, S., Ghayedi, N., Roosta, P., Seddigh, P., Nasiri, O., **2021**. Effect of Metformin on Lipid Profiles of Type 2 Diabetes Mellitus: A Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *J Pharm Bioallied Sci.* 13 (1), 76-82.
102. Markowicz-Piasecka, M., Sikora, J., Mateusiak, Ł., Mikiciuk-Olasik, E., Huttunen, K., **2017**. New prodrugs of metformin do not influence the overall haemostasis potential and integrity of the erythrocyte membrane. *Eur. J. Pharmacol.* 811, 208–221.
103. Pryor, R., Cabreiro, F., **2015**. Repurposing metformin: An old drug with new tricks in its binding pockets. *Biochem. J.* 471 (3), 307–322.

104. Xin, G., Wei, Z., Ji, C., Zheng, H., Gu, J., Ma, L., Huang, W., Morris-Natschke, S., Yeh, J., Zhang, R., Qin, C., Wen, L., Xing, Z., Cao, Y., Xia, Q., Lu, Y., Li, K., Niu, H., Lee, K., Huang, W., **2016**. Metformin Uniquely Prevents Thrombosis by Inhibiting Platelet Activation and mtDNA Release. *Sci Rep.* 6, 36222.
105. Huttunen, K., Mannila, A., Laine, K., Kemppainen, 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 (14), 4142-4148.
106. Peura, L., Huttunen, K., **2014**. Sustained release of metformin via red blood cell accumulated sulfenamide prodrug. *J Pharm Sci.* 103 (7), 2207-2210.
107. Huttunen, K., Leppänen, J., Laine, K., Vepsäläinen, J., Rautio, J., **2013**. Convenient microwave-assisted synthesis of lipophilic sulfenamide prodrugs of metformin. *Eur J Pharm Sci.* 49 (4), 624-8.
108. Rautio, J., Vernerová, M., Aufderhaar, I., Huttunen, K., **2014**. Glutathione-S-transferase selective release of metformin from its sulfonamide prodrug. *Bioorg Med Chem Lett.* 24 (21), 5034-6.
109. Markowicz-Piasecka, M., Sikora, J., Zajda, A., Huttunen, K., **2020**. Novel halogenated sulfonamide biguanides with anti-coagulation properties. *Bioorg Chem.* 94, 103444.
110. Markowicz-Piasecka, M., Sadkowska, A., Sikora, J., Broncel, M., Huttunen, K., **2020**. Novel Sulfonamide-Based Analogs of Metformin Exert Promising Anti-Coagulant Effects without Compromising Glucose-Lowering Activity. *Pharmaceuticals (Basel).* 13 (10), 323.
111. Xin, G., Ming, Y., Ji, C., Wei, Z., Li, S., Morris-Natschke, S., Zhang, X., Yu, K., Li, Y., Zhang, B., Zhang, J., Xing, Z., He, Y., Chen, Z., Yang, X., Niu, H., Lee, K., Huang, W., **2020**. Novel potent antiplatelet thrombotic agent derived from biguanide for ischemic stroke. *Eur J Med Chem.* 200, 112462.
112. Apaydin, S.; Török, M., **2019**. Sulfonamide derivatives as multi-target agents for complex diseases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 29 (16), 2042–2050.
113. Carta, F., Scozzafava, A., Supuran, C., **2012**. Sulfonamides: a patent review (2008 - 2012). *Expert Opin. Ther. Patents.* 22 (7) 7, 747-758.
114. Fajkis, N., Kołaczowski, M., Marcinkowska, M., **2018**. Repositioning strategy, a new uses for old drugs. *Wiadomości Chemiczne.* 72, 11-12.
115. Park, K., **2019**. A review of computational drug repurposing., *Transl Clin Pharmacol.* 27 (2), 59-63.
116. Krishnamurthy, N., Grimshaw, A., Axson, S., Choe, S., Miller, J., **2022**. Drug repurposing: a systematic review on root causes, barriers and facilitators. *BMC Health Serv Res.* 22 (1), 970.
117. Tan, G., Sloan, E., Lambert, P., Kirkpatrick, C., Ilomäki, J., **2023**. Drug repurposing using real-world data. *Drug Discov Today.* 28 (1), 103422.
118. Sahoo, B., Ravi Kumar, B., Sruti, J., Mahapatra, M., Banik, B., Borah, P., **2021**. Drug Repurposing Strategy (DRS): Emerging Approach to Identify Potential Therapeutics for Treatment of Novel Coronavirus Infection. *Front Mol Biosci.* 26 (8), 628144.
119. Wen, Q., Liu, R., Zhang, P., **2021**. Clinical connectivity map for drug repurposing: using laboratory results to bridge drugs and diseases. *BMC Med Inform Decis Mak.* 21, 263.
120. Liu, F., Jagannatham A., Yum H., **2019**. Towards Drug Safety Surveillance and Pharmacovigilance: Current Progress in Detecting Medication and Adverse Drug Events from Electronic Health Records. *Drug Saf.* 42 (1), 95-97.

121. Suchonwanit, P., Thammarucha, S., Leerunyakul, K., **2019**. Minoxidil and its use in hair disorders: a review. *Drug Des Devel Ther.* 13, 2777-2786.
122. Croston, G., **2017**. The utility of target-based discovery. *Expert Opin Drug Discov.* 12 (5), 427-429.
123. Shaikh, S., Lee, E., Ahmad, K., Ahmad, S., Lim, J., Choi, I., **2021**. A Comprehensive Review and Perspective on Natural Sources as Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitors for Management of Diabetes. *Pharmaceuticals (Basel).* 14 (6), 591.
124. Wojtczak, D; Kasznicki, J; Drzewoski, J., **2017**. Pros and cons of polypharmacy in elderly patients with diabetes. *Clin Diabetol.* 6, 34–38.
125. Masnoon, N., Shakib, S., Kalisch-Ellett, L., Caughey, G., **2017**. What is polypharmacy? A systematic review of definitions, *BMC Geriatr.* 17, 230.
126. Makhoba, X., Viegas, C., Mosa, R., Viegas, F., **2020**. Pooe OJ. Potential Impact of the Multi-Target Drug Approach in the Treatment of Some Complex Diseases. *Drug Des Devel Ther.* 14, 3235-3249.
127. Lillich, F., Imig, J., Proschak, E., **2021**. Multi-Target Approaches in Metabolic Syndrome. *Front Pharmacol.* 11, 554961.
128. Artasensi, A., Pedretti, A., Vistoli, G., Fumagalli, L., **2020**. Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Multi-Target Drugs. *Molecules.* 25 (8), 1987.
129. Kostka, B., Para, J., Sikora, J., **2007**. A multiparameter test of clot formation and fibrinolysis for in-vitro drug screening, *Blood Coagul. Fibrinolysis* 18 (7), 611–618.
130. Aslantürk, Ö., **2018**. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World Intech Open.* Chapter 1, 1-12.
131. Tekade, R., **2022**. In *Advances in Pharmaceutical Product Development and Research, Pharmacokinetics and Toxicokinetic Considerations*, Academic Press. 2, 1–792.
132. Markowicz-Piasecka, M., Huttunen, K., Sadkowska, A., Sikora, J., **2019**. Pleiotropic Activity of Metformin and Its Sulfonamide Derivatives on Vascular and Platelet Haemostasis. *Molecules.* 25 (1), 125.
133. RTCA DP Instrument Operator’s Manual, Version January 2013. http://www.cytometrie-imagerie-saint-antoine.org/media/4046/RTCA_DP_System_Operator_Manual_v3.pdf (stan z dnia 25.02.2023).
134. Ku, Y., Cho, B., Kim, M., Lim, S., Park, Y., Jang, H., Choi, S., **2017**. Rosiglitazone increases endothelial cell migration and vascular permeability through Akt phosphorylation. *BMC Pharmacol Toxicol.* 18 (1), 62.
135. Rorbach-Dolata, A., Kubis, A., Piwovar, A., **2017**. Epigenetic modifications: An important mechanism in diabetic disturbances. *Postępy Hig. I Med. Doświadczalnej*, 71, 960–974.
136. Kołodziejczyk, J., Wachowicz B., **2010**. Rola układu fibrynolitycznego w progresji nowotworów. *Postępy Nauk Medycznych* 6, 509-514.
137. Patel, H., Chen, J., Das, K., Kavdia, M., **2013**. Hyperglycemia induces differential change in oxidative stress at gene expression and functional levels in HUVEC and HMVEC. *Cardiovasc Diabetol.* 12, 142.
138. Lin, Y., Berg, A., Iyengar, P., Lam, T., Giacca, A., Combs, T., Rajala, M., Du, X., Rollman, B., Li, W., Hawkins, M., Barzilai, N., Rhodes, C., Fantus, I., Brownlee, M., Scherer, P., **2005**. The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: the role of reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 280 (6), 4617-4626.

139. Kim, J., You, Y., **2017**. Regulation of organelle function by metformin. *IUBMB Life*. 69 (7) 459-469.
140. Perelman, A., Wachtel, C., Cohen, M., Haupt, S., Shapiro, H., Tzur, A., **2012**. JC-1: alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. *Cell Death Dis*. 3 (11), e430.
141. JC-1 Dye for Mitochondrial Membrane Potential
<https://www.thermofisher.com/pl/en/home/life-science/cell-analysis/cell-viability-and-regulation/apoptosis/mitochondria-function/jc-1-dye-mitochondrial-membrane-potential.html> (stan z dnia 14.03.2023).
142. Fuller, J., Keen, H., Jarrett, R., Omer, T., Meade, T., Chakrabarti, R., North, W., Stirling, Y., **1979**. Haemostatic variables associated with diabetes and its complications. *Br Med J*. 2 (6196), 964-966.
143. Fearnley, G., Chakrabarti, R., Avis, P., **1963**. Blood fibrinolytic activity in diabetes mellitus and its bearing on ischaemic heart disease and obesity. *Br Med J*. 1 (5335) 921-923.
144. Markowicz-Piasecka, M., Huttunen, K., Mateusiak, Ł., Mikiciuk-Olasik, E., Sikora, J., **2018**. Sulfenamide and sulfonamide derivatives of metformin can exert anticoagulant and profibrinolytic properties. *Chem Biol Interact*. 284, 126-136.
145. Lord, S., **2011**, Molecular mechanisms affecting fibrin structure and stability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 31 (3), 494-499.
146. Wolberg, A., Campbell, R., **2008**. Thrombin generation, fibrin clot formation and hemostasis. *Transfus Apher Sci*. 38 (1), 15-23.
147. Tripodi A., **2020**. Thrombin generation: a global coagulation procedure to investigate hypo- and hyper-coagulability. *Haematologica*. 105 (9), 2196-2199.
148. Crawley, J., Zanardelli, S., Chion, C., Lane, D., **2007**. The central role of thrombin in hemostasis. *J Thromb Haemost*. 5 (1), 95-101.
149. Bijak, M., Ziewiecki, R., Saluk, J., Ponczek, M., Pawlaczyk, I., Krotkiewski, H., Wachowicz, B., Nowak, P., **2014**. Thrombin inhibitory activity of some polyphenolic compounds. *Med Chem Res*. 23 (5), 2324-2337.
150. Robert, F., Fendri, S., Hary, L., Lacroix, C., Andréjak, M., Lalau, J., **2003**. Kinetics of plasma and erythrocyte metformin after acute administration in healthy subjects. *Diabetes Metab*. 29 (3), 279-83.

Publikacja I

Zajda A., Huttunen K., Sikora J., Podsiedlik M., Markowicz-Piasecka M. Is metformin a geroprotector? A peek into the current clinical and experimental data. Mechanisms of Ageing and Development. 2020, 191, 111350. **IF₂₀₂₀ = 5.432; 100 p MEiN₂₀₂₀**



Contents lists available at ScienceDirect

Mechanisms of Ageing and Development

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mechagedev

Is metformin a geroprotector? A peek into the current clinical and experimental data

Agnieszka Zajda^a, Kristiina M. Huttunen^b, Joanna Sikora^c, Maria Podsiedlik^c, Magdalena Markowicz-Piasecka^{c,*}^a Students Research Group, Laboratory of Bioanalysis, Department of Pharmaceutical Chemistry, Drug Analysis and Radiopharmacy, Medical University of Lodz, ul. Muszyńskiego 1, 90-151 Lodz, Poland^b School of Pharmacy, Faculty of Health Sciences, University of Eastern Finland, Yliopistoranta 1C, POB 1627, 70211 Kuopio, Finland^c Laboratory of Bioanalysis, Department of Pharmaceutical Chemistry, Drug Analysis and Radiopharmacy, Medical University of Lodz, ul. Muszyńskiego 1, 90-151 Lodz, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:
Metformin
Biguanides
Senescence
Geroprotector
Ageing

ABSTRACT

Nowadays we observe a growing scientific interest and need to develop novel research approach that target ageing. Metformin, apart from its proven effectiveness as a glucose-lowering agent, was found to exert multidirectional effects because of its cardioprotective, anti-inflammatory and anti-cancer activity. Recently, metformin has become a subject of interest of many researchers as a promising drug with anti-ageing properties; however, its impact on clinical ageing features is still hypothetical. Nevertheless, results of cellular experiments and animal studies confirm that metformin has advantageous effects on ageing. Additionally, a number of clinical trials prove positive effects of metformin on the prevalence of age-related diseases (ARD), including cardiovascular disease or carcinoma. We have observed a significant advancement in human research since a few randomised clinical trials evaluating the impact of metformin on ageing were launched.

Here, we present an investigation on anti-ageing properties of metformin, and provide the explanation of mechanisms and pathways implicated in this function. We also analyse available clinical evidence on healthspan extension, all-cause mortality and ARD. Finally, we discuss currently conducted randomized clinical trials which aim to explore metformin potential as an anti-ageing drug in humans.

1. Introduction

Over the previous few decades, life expectancy has risen dramatically and resulted in a higher population of elderly people across all developed countries (Skirbekk et al., 2019). In 2015, globally, there were 617.1 million (9%) people who were 65 or older. Within next 10 year the older population will reach about 1 billion which constitute 12 % of the projected total world population (Roberts et al., 2018). The main factors contributing to the increased human longevity are as follows: implementation of vaccination, disinfectants, and antibiotics significantly reducing the incidence of infectious diseases, improvement in healthcare, nutrition and technology, and raising awareness of preventive actions, including exercise and reduction of smoking (Vaiserman et al., 2016). Development of novel technologies and standards in medicine, and education are associated with increased lifespan.

However, these positive outcomes do not contribute to improved healthspan, which is regarded as the number of years during which people are generally healthy and free from serious or chronic illness (Mercken et al., 2012). Thus, the growing number of elderly, and higher prevalence of ARD such as cancer, diabetes (type two diabetes mellitus, T2DM), cardiovascular disease are frequently found in most of developed countries. They all pose an extensive socio-economic challenge (Beard and Bloom, 2015; Vaiserman et al., 2016).

Ageing stems from a permanent interplay between single genetic makeup and environment contributing to accumulation of cellular damage over time. It finally leads to disease promotion and death (Guráú et al., 2018). Oxidative stress plays an important role in ageing because oxidative damage leads to cellular hallmarks of ageing which then lead to various ARD (Luo et al., 2020; Lopez-Otin and Kroemer, 2019). Taking into consideration oxidative-related hypothesis of ageing,

* Corresponding author.

E-mail addresses: agnieszka.zajda@stud.umed.lodz.pl (A. Zajda), kristiina.huttunen@uef.fi (K.M. Huttunen), joanna.sikora@umed.lodz.pl (J. Sikora), magdalena.markowicz@umed.lodz.pl (M. Markowicz-Piasecka).<https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111350>

Received 2 July 2020; Received in revised form 25 August 2020; Accepted 1 September 2020

Available online 6 September 2020

0047-6374/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

and positive effects of observational studies, numerous clinical trials examining antioxidants have been carried out to investigate the potential of antioxidants for the prevention and treatment of age-related morbidity and mortality. However, the results of randomized clinical trials showed that antioxidant supplementation does not affect ARD (Luo et al., 2020).

Therefore, investigation of novel interventional strategies, aiming at improving health span, is a current first concern in biomedical research. Traditionally, pharmacological approaches have gained special attention in the field of new discipline known as biogerontology (Campbell et al., 2017; Vaiserman et al., 2016; Vaiserman and Lushchak, 2017). There are several molecules targeting primary ageing pathways, including calorie restriction mimetics, and autophagy inducers. Also senolytic drugs (agents selectively inducing apoptosis of senescent cells), and telomerase activators are now under investigation (Vaiserman et al., 2016; Vaiserman and Lushchak, 2017). Current doubts regarding efficiency of antioxidants supplementation have contributed to an increased interest in other healthspan-promoting options, including calorie-restriction (CR)-based strategy (Vaiserman et al., 2016). Although the beneficial effect of CR on healthspan is incontestable, the applicability of this strategy is difficult in humans. To overcome obstacles, the scientists are attempting to develop novel molecules to mimic the CR state without restricting a diet (Lee and Min, 2013).

One drug which has been a subject of extensive research as a geroprotector is an anti-diabetic drug - metformin, *N,N*-dimethylbiguanide hydrochloride (Bailey, 2017). Metformin is one of the most frequently administered drugs in T2DM. The anti-hyperglycemic activity of the drug stems from its inhibition of gluconeogenesis and glycogenolysis, and increase in tissue sensitivity to insulin and tissue glucose utilization (Mahmood et al., 2013). Importantly, metformin was found to be effective in polycystic ovarian syndrome (PCOS) and metabolic syndrome (Knowler et al., 2002).

Given the history of metformin administration in pharmacotherapy presented in Fig. 1, the greatest breakthrough was a result of the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS). This study confirmed that the therapy with metformin contributes to 42 % reduction of diabetes-related death and a 36 % decline in all-cause mortality (UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group, 1998). In addition, metformin decreases CVD incidence in subjects with T2DM (Soukas et al., 2019). The positive properties of the drug regarding the cardiovascular system result from its beneficial influence on endothelium, protection from oxidative stress, and reduction of proliferation of smooth muscle cells (SMCs) (Nesti and Natali, 2017).

Apart from its glucose-lowering properties, metformin has retained

interest due to its pleiotropic effects and activity in various tissues, including muscles, adipose tissue, vascular endothelium, and brain (Foretz et al., 2014; Novelle et al., 2016). Metformin reduces food intake, and body weight through direct action on the hypothalamic center which control satiety and feeding (Novelle et al., 2016). Metabolic effects of metformin have been briefly reviewed by Piskovatska et al., 2019a, 2019b. Additionally, metformin affects metabolic and cellular processes associated with the development of ADR, including inflammation, oxidative damage, protein glycation, cellular senescence, apoptosis, and growth of certain types of cancer (Novelle et al., 2016; Piskovatska et al., 2019a, 2019b).

Another aspect of metformin which makes it specifically encouraging for further studies on its geroprotective potential is the fact that the drug has already been widely used in humans for several decades. Therefore, metformin safety profile, and its potential contraindications are well characterised (Campbell et al., 2017). These characteristics make the drug substantially more straightforward to be implemented as a therapy for ageing than clinically unapproved drugs.

This review presents investigation on the application of metformin as a potential geroprotector. We outline state of the art data regarding anti-ageing activity of metformin, and provide molecular mechanisms and pathways engaged in this function. We also analyse available clinical evidence on healthspan extension, and currently conducted clinical trials which aim to explore metformin capacity as an anti-ageing drug in humans. Next, we provide the experimental and pre-clinical evidence on anti-ageing properties of metformin. Finally, the review shows new favourable circumstances relating to the translational potential of metformin.

2. The mechanism of Metformin Action

2.1. The gut – stimulation of hormone secretion

Despite long clinical experience with metformin and increased scientific attention into its pleiotropic activity, the exact way of metformin activity remains unclear. Metformin is active in humans only when administered orally. A typical dose of classical formulation is usually two g per day. Approximately, half of the dose (ca. 6 mmol) is absorbed, and then excreted via kidneys. The other half of the drug is not absorbed, and excreted in the faeces (Graham et al., 2011). It has been estimated that the colon is exposed to the drug at concentrations reaching 40 mM (Glosmann and Lutz, 2019).

Previously, it was hypothesised that metformin exerts its action mainly in liver. Recently, it also has been claimed that the drug is also

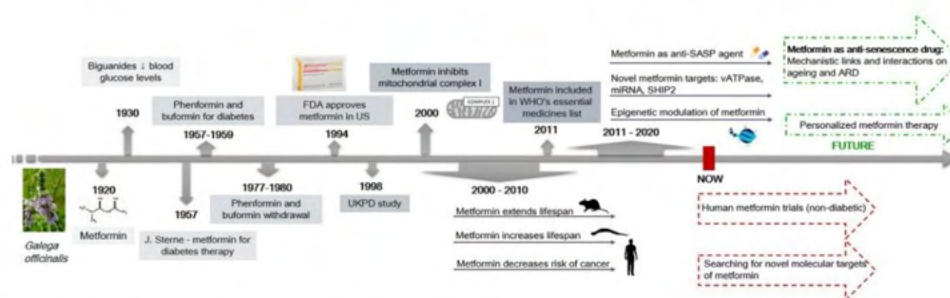


Fig. 1. Schematic review of the history of metformin application and future trends.

In medieval times *Galega officinalis* herb was used to treat diabetes like symptoms. Metformin was synthesized in 1922, and its glucose-lowering properties were studied in animal model in the mid-1920s, and in humans in 1930s. Owing to studies conducted by Dr Jean Sterne, metformin was approved for the treatment of diabetes in Europe in the 1950s. Knowledge about metformin has increased significantly over the past 20 years. New metformin properties have been discovered, including antioxidant and anti-cancer effects. Research into the anti-ageing properties of metformin is also underway.

Abbreviations: FDA Food and Drug Administration; UKPDS United Kingdom Prospective Diabetes Study; WHO World Health Organization; SASP - senescence-associated secretory phenotype; SHP2 - Inositol Polyphosphate Phosphatase-Like Protein 1; ARD ageing related diseases; vATPase vacuolar ATPase.

active in intestine (Glossmann and Lutz, 2019) and these effects in gastrointestinal tract are responsible for the pharmacological properties of the drug (Wu et al., 2017a). This statement has been confirmed by Buse et al. (2016), who found separation of the glycemic effect from plasma exposure to the drug with gut-restricted delayed-release formulation. It has also been reported that metformin concentration in the jejunum can be 300-fold higher than that measured in blood (Thomas and Gregg, 2017). Actually, typical side effects of metformin associated with the alimentary tract may be regarded as an indicator of therapeutic efficacy (Thomas and Gregg, 2017). During the last decade, many scientific teams have commenced to explore the drug's effect on the intestine in more detail, since this is a major site of drug concentration. For instance, metformin has a specific influence on the composition of the intestinal microbiome independently on its glucose-lowering properties (Forslund et al., 2015). The authors examined the microbiome of 784 patients, and reported that the metformin-specific effect was associated with an increase in *Escherichia* species proportionally to the blood metformin level. Furthermore, the analysis of gut microbiome of metformin-treated T2DM subjects showed great similarity to the controls, and not to the T2DM subjects. This finding may indicate a rescue from dysbiosis associated with T2DM. The authors concluded that metformin participates in partial gut microbial mediation of both therapeutic and adverse effects. However, further validation is required to identify causality and to clarify how such mediation might occur. In addition, this study highlights the need to disentangle specific disease dysbioses from effects of treatment on human microbiomes (Forslund et al., 2015). These important conclusions were further proved by a study of Bryrup et al. (2019) who reported that metformin intake alters the gut microbiota composition in non-diabetic men, and claimed that this effect does not depend on the dysbiosis triggered by diabetes. Another randomised clinical trial embracing forty non-treated subjects suffering from T2DM who were using placebo or metformin for four months found an elevation in abundance of *Escherichia* spp. and *Bifidobacterium wadsworthia* along with a reduction in *Intestinibacter* spp. and *Clostridium* spp. (Wu et al., 2017b). Furthermore, it was found that metformin-altered microbiota mediated some anti-diabetic effects of the drug (Wu et al., 2017b). As reviewed by Soukas et al. (2019), metformin might also increase the number of bacteria producing short-chain fatty acids that lead to weight loss and anti-inflammatory effect in T2DM subjects. A comprehensive analysis of the effects of metformin on human microbiome can be found in a review of Prattichizzo et al. (2018). So far, the effect of metformin on microbiota and the related anti-ageing activity have been underestimated. As summarized by Prattichizzo et al. (2018), metformin reshapes intestinal microbiota, and fosters the growth of bacterial species producing short-chain fatty acids (SCFAs) which increase the barrier function of the intestinal epithelium. As a consequence, lower levels of immune system stimulating agents, including LPS and flagellin, get into circulation, which may improve the balance between factors counteracting and promoting inflammation (Prattichizzo et al., 2018).

Metformin might also act through the incretin axis. It has been known for several years that metformin therapy elevates both fasting and postprandial levels of the satiety-promoting incretin hormone, glucagon-like peptide 1 (GLP-1) (DeFronzo et al., 2016; Prattichizzo et al., 2018). Metformin affects postprandial GLP-1 secretion in direct and AMPK mediated effects (Bahne et al., 2018). Furthermore, metformin administration might also lead to the significant increase in peptide YY (PYY) (DeFronzo et al., 2016) and growth differentiation factor 15 (GDF-15) (Glossmann and Lutz, 2019). GDF-15 is produced in the intestine, cardiomyocytes and endothelial cells via the "integrated stress response", and is a member of the transforming growth factor beta (TGF- β) superfamily (Glossmann and Lutz, 2019; Adela and Banerjee, 2015). It was found that GDF-15 is a biomarker for T2DM and CVD (Adela et al., 2015) since GDF-15 levels are higher in individuals with heart failure (HF), and coronary artery disease where its plasma levels might be regarded as prognosis of the disease (Natali et al., 2019). These

possible associations between metformin administration and its cardiovascular effects were analyzed by Natali et al. (2019) and Gerstein et al. (2017). According to their results, administration of metformin in diabetics contributed to 40 % elevation of GDF-15 plasma level (Natali et al., 2019). Therefore, according to authors GDF-15 levels might be a biomarker for the use of metformin (Gerstein et al., 2017). It has been suggested that possible explanation for the association of GDF-15 with metformin therapy, and also with HbA1c, could be the fact that GDF-15 reflects the function of mitochondria (Natali et al., 2019).

2.2. Mitochondrial complex I inhibition

A metformin molecule is positively charged at pH 7.4 (99.9 % of the molecule exists in ionized form in blood) (Graham et al., 2011) which predisposes the biguanide to concentrate in negatively charged organelles, such as mitochondria (Prattichizzo et al., 2018). Mitochondrial accumulation is frequently considered as the primary target of metformin (Prattichizzo et al., 2018; Hardie et al., 2012). In 2000, metformin was discovered to suppress mitochondrial complex I, but not complexes II, III, and IV (El-Mir et al., 2000; Owen et al., 2000). Metformin was found to induce depolarization of the mitochondrial membrane potential, elevate the AMP/ATP and lactate/pyruvate ratios, and decrease glucose production (Kim and You, 2017). Interestingly, the degree of gluconeogenesis inhibition is related with the extent of suppression of the respiratory chain. These observations confirm that cellular energy depletion induced by metformin results in incomplete flux of ATP which is important to commence gluconeogenesis in the liver (El-Mir et al., 2000).

The molecular mechanism of metformin interaction with complex I has not been fully discovered. It was proved that the drug suppresses NADH oxidation by complex I isolated from several species, including bovine heart mitochondria, yeast *Pichia pastoris*, and bacterium *Escherichia coli*, implying that metformin interacts to the conserved subunits of complex I (Kim and You, 2017). Bridges et al. (2014) found that metformin suppresses a rate-limiting step coupled to ubiquinone reduction, but does not competitively attach to the ubiquinone-binding site in complex I. It is worth pointing out that it has not yet been confirmed whether or not complex I is the only mitochondrial target of metformin. Importantly, it is still not determined whether the biguanide suppresses respiration directly or indirectly (Fontaine, 2014).

Apart from hypoglycaemic effect, related to inhibition of complex I, metformin was also found to inhibit cancer cell growth through its action on this target (Andrzejewski et al., 2014; Birsoy et al., 2014). Activation of the energy sensor AMPK is another effect associated with complex I. However, it will be discussed later in the next chapter of this manuscript.

Hunter et al. (2018) revealed that inhibition of fructose-1-6-bisphosphatase (FBP1) participating in the process of glucose production is another effect of elevated AMP levels. It was found that metformin decreases glucose concentration by allosteric inhibition of FBP1 in mice. These results provide evidence that metformin at therapeutic concentrations in vivo exerts significant effects via adjustment of cellular energy charge (Soukas et al., 2019).

The key function of mitochondria is ATP production through oxidative phosphorylation which result in generation of energy through oxidation of nutrients that create an electron chemical gradient across the mitochondrial inner membrane. Another important activity related to mitochondria is production of reactive oxygen species (ROS), contributing to DNA and cell damage. Impairment of mitochondria is one of principal causes of ageing because ageing mitochondria lose their ability to provide cellular energy and release high levels of ROS. Impaired mitochondrial function has been linked to insulin resistance in multiple tissues including skeletal muscles, liver, fat, heart and pancreas (Podhorecka et al., 2017).

Beneficial impact of metformin on ROS production are mediated not only by inhibition of the mitochondrial respiratory chain, but also by

suppressing nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NAD(P)H) oxidase (Saisho, 2015). The inhibition of the electron transport chain together with the initiation of antioxidant gene expression by the SKN-1/Nrf2 transcription pathway explains how metformin acts as an anti-oxidative agent, thus reducing the production of ROS (Novelle et al., 2016).

The reduction of ROS production might also stem from other mechanisms. For example, Khallaghi et al. (2016) reported that metformin restores the activity of phosphoinositide 3-Kinase/S6 Protein Kinase (PI3K/S6K). Besides, metformin may enhance cell survival by improving anti-oxidant systems, particularly glutathione peroxidase (GSH) and catalase (CAT) (Khallaghi et al., 2016). In turn, Batchuluun et al. (2014) revealed anti-oxidative properties of metformin through suppression of protein kinase C (PKC) - NAD(P)H oxidase pathway. The available data suggests that inhibition of nuclear factor κ B (NF- κ B) by activation of AMPK is crucial for the anti-inflammatory properties of the drug (Saisho, 2015). For instance, Li et al. (2009) showed inhibitory properties of metformin towards nuclear factor κ B (NF- κ B) activation in the vessel wall. In another paper, Hattori et al. (2006) found that metformin inhibits cytokine-induced NF- κ B activation via AMPK activation in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC).

Interestingly, metformin through the effects on AMPK might have an effect on pain in animal models of neuropathy and acute nociception (Melemedjian et al. (2011); Tillu et al., 2012). Russe et al. (2013) reported that metformin-mediated activation of AMPK leads to analgesic effects, similarly to those induced by ibuprofen. As presented by Lihn et al. (2008), AMPK activation might also be associated with decreasing levels of pro-inflammatory cytokines, including IL-6 and IL-8 in adipose tissue and skeletal muscle.

2.3. Increase of the activity of adenosine monophosphate-activated protein kinase

AMPK is a fundamental indicator of cellular energy condition that controls metabolic energy equilibrium (Hardie et al., 2012). Generally, stimulation of AMPK is due to increased AMP/ATP and ADP/ATP ratios (Novelle et al., 2016), and this route is known as nucleotide-dependent regulation. However, the activity of AMPK is regulated also by other upstream signals, thus making AMPK a central sensor coordinating the cellular metabolism (Garcia and Shaw, 2017). Importantly, AMPK activation is engaged in the acute release of gut hormones, such as GLP-1 and peptide YY from human mucosal preparations, since the kinase inhibitor prevents the metformin effect (Glosmann and Lutz, 2019). In addition, AMPK allosterically activates IR (insulin receptor) and IRS1 (insulin receptor substrate 1) thus increasing insulin sensitivity (Bahrambeigi et al., 2005).

Metformin activates AMPK in two independent manners. The first one is the 'canonical' pathway which is nucleotide-dependent (increase in the [ADP/ATP] ratio and phosphorylation by upstream liver kinase B1 [LKB1]). The second possible way of AMPK activation ('noncanonical', AMP-independent) is a lysosomal pathway caused by a decrease in the fructose 1,6-bisphosphate level (Glosmann and Lutz, 2019). The importance of AMPK in glucose-lowering properties of metformin was confirmed in a study of Shaw et al. (2005), who reported that the ablation of LKB1 in the liver disturbed antihyperglycemic effects of metformin in a high-fat diet. The activation of AMPK by metformin results in the following effects, (i) phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase (ACC)1 and ACC2, resulting in an elevated fatty acid uptake and β -oxidation, thus improving insulin sensitivity and (ii) activation of 3,5-cyclic phosphodiesterase 4B (PDE4B), thus reducing cAMP and indirectly inhibiting the activity of cAMP-dependent protein kinase A (PKA). It finally leads to glucose consumption and decreased glucose output (Prattichizzo et al., 2018). The effects on ACC are also related with lipid-lowering properties of metformin (Novelle et al., 2016). However, the drug decreases also the levels of sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1), a major lipogenic transcription

factor, through direct phosphorylation by AMPK (Novelle et al., 2016).

The biological effects of metformin do not only stem from AMPK activation (Bahrambeigi et al., 2005). For instance, a study of Foretz et al. (2010) conducted on liver and primary hepatocytes from knockout models for both AMPK α 1/ α 2 catalytic subunits and the upstream activating kinase LKB1 showed that neither AMPK nor LKB1 are important for metformin suppression of glucose production in the liver. However, one of more recent studies revealed that low doses of metformin effectively inhibit glucose production via AMPK activation regardless of the increased level of the AMP/ATP ratio (Cao et al., 2014). As mentioned above, metformin is able to stimulate AMPK indirectly, secondary to the inhibition of the mitochondrial respiratory chain complex 1, contributing to ATP reduction and an escalation of AMP levels (Foretz et al., 2014). It has been suggested that changes in the intracellular ATP levels, but not direct AMPK activation, are responsible for the influence of metformin on hepatic glucose output (Foretz et al., 2014). Recently another possible mechanism of metformin action has been found by Madiraju et al. (2014). The authors found that the inhibition of gluconeogenesis by metformin might stem from a direct effect on the activity of mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase (mGPD). Suppression of mGPD pauses the glycerophosphate shuttle, contributing to the arrest of gluconeogenesis from glycerol (Foretz et al., 2014).

AMPK was also found to adjust mTORC1 signalling (mechanistic target of rapamycin complex 1) which is responsible for the process of ageing, carcinoma and neurodegenerative diseases (Melnik and Schmitz, 2014). In addition, over-stimulation of mTORC1 signaling by overabundance of food and high amino acid intake leads to T2DM evolution since mTORC1 signaling is engaged in pancreatic β -cell growth, β -cell mass regulation, insulin synthesis and secretion. Metformin was found to suppress mTORC1 through different signalling pathways. One of them is LKB1/AMPK-mediated activation of TSC2 (tuberin) which suppresses mTORC1. Additionally, metformin improves AMPK/TSC2-mediated mTORC1 inhibition by stimulating REDD1 (regulated in DNA damage and development 1) and ATM (ataxia telangiectasia mutated). Furthermore, it was found that metformin blocks amino acid-mediated activation of RAG (RAS-related GTP-binding protein) GTPases at the lysosomal surface (Melnik and Schmitz, 2014). Decreased mTORC1 activity downregulates S6K1 which contributes to improvement in glucose level control, through AKT-mediated glucose uptake and inhibition of FoxO1-mediated gluconeogenesis. The positive effects of mTORC1 suppression are not limited to metabolic benefits, but are also related to other mTORC1-driven diseases, including PCOS, atherosclerosis and CVD, cancer, and neurodegenerative diseases (Melnik and Schmitz, 2014).

Both AMPK and mTOR signalling pathways have been proposed as mediators of caloric restriction (CR) (Lee and Min, 2013). During lack of energy state, LKB phosphorylates and activates AMPK, which subsequently stimulates the processes to generate ATP. It has been proved that worms overexpressing AMPK (aak-2) lived longer than controls, and glucose restriction increased aak-2 activity (Schulz et al., 2007). The function of AMPK activation in lifespan extension was also proved in the *Drosophila* model (Funakoshi et al., 2011). Due to the advantageous influence of metformin on AMPK, mTOR and insulin/IGF-1 signalling pathways, the drug has been identified as downstream-type caloric restriction mimetic (CRM) (Shintani et al., 2018). Metformin was found to possess a CR-related longevity advantage mediated by the activation of AMPK in several animal models (Lee and Min, 2013). Results of these studies will be discussed in the following parts of this paper.

Recently, it has also been found that prolonged metformin therapy is associated with increased levels of the microRNA-processing protein DICER1 in mice as well as humans, and subsequently increases the expression of a subset of microRNAs (miR-20a, miR-34a, miR-130a, miR-106b, miR-125, and let-7c) which are related with senescence (Hooten et al., 2016).

Finally, one more molecular target of metformin, and signalling pathway of AMPK activation has been identified (Zhang et al., 2016). It

has been found that metformin can interact with v-ATPase (lysosomal vacuolar ATPase) to promote the translocation of AXIN/LKB1 (AXIN – a scaffold protein) onto the surface of lysosomes to form a complex with v-ATPase-Ragulator. It ultimately leads to AMPK activation. Binding of metformin to v-ATPase forces the Ragulator/v-ATPase complex to undergo a conformation change from the 'nutrient-rich' to the 'starvation conformation', which finally is associated with the recruitment of LKB1 and prevents mTORC1 activation even during nutrient-rich state (Kim and You, 2017).

2.4. Novel targets of action

In the previous chapter, we have described the potential interaction between metformin and vATPase which could imply that late endosome/lysosome could be another target of metformin. Additionally, it has recently been found that it is possible for metformin to modulate endosomal trafficking to lysosomes by affecting eNHE (Na⁺/H⁺ exchangers). This suggests that the drug might be engaged in control of the cellular endocytic cycle (Kim and You, 2017).

Another target for metformin is lipid phosphatase Src homology 2 domain-containing inositol-5-phosphatase 2 (SHIP2), which is upregulated in diabetic rodent models and inhibits insulin signalling by decreasing Akt activation. This in turn leads to insulin resistance and reduced glucose uptake (Lehtonen, 2019). It has been found that metformin directly binds to purified recombinant SHIP2 and blocks its activity, while an in vivo subsequent effect of SHIP2 inhibition includes increased insulin sensitivity (Polianskyte-Prause et al., 2019). The authors list potentially beneficial effects of SHIP2 suppression which are as

follow, improved glucose metabolism, attenuation of insulin resistance and hyperglycemia (Polianskyte-Prause et al., 2019).

Although metformin is not a newly developed drug, new mechanisms of action continue to be discovered. Indeed, recent studies have supplied us with a long record of possible molecular targets which are as follow: NF-κB inhibition, inflammasome inhibition, increased expression of nuclear pore complex (NPC) and acyl-CoA dehydrogenase family member-10 (ACAD10), increased expression of the peroxiredoxin PRDX-2, Nrf2 activation, and folate metabolism (Prattichizzo et al., 2018).

Recently, it has also been found that metformin can enhance autophagy which is a cellular mechanism responsible for degradation of cytoplasmic constituents, preserving cellular homeostasis through elimination of impaired proteins and organelles (De Santi et al., 2019). Metformin enhances autophagy through AMPK activation and subsequent phosphorylation of unc-51-like kinase (ULK-1) and Beclin 1 (Hur and Lee, 2015). However, Song et al. (2015) reported improvement of hepatic steatosis by metformin through autophagy activation via sirtuin 1 pathway, not AMPK. Autophagy is also engaged in nutrient supply during energy insufficiency, and is also important for the proper function of mitochondria and the ER. Due to the fact that AMPK is an inducer of intracellular energy equilibrium, the activation of AMPK by metformin implies that autophagy induction might be another mechanism responsible for metabolic improvement related with metformin therapy (Hur and Lee, 2015). Importantly, metformin was also found to prevent cell tumorigenesis through autophagic cell death (De Santi et al., 2019).

Mechanisms of metformin anti-ageing activity have been summarized in Fig. 2. Certainly, the above-mentioned mechanisms of metformin action will widen in the future, leading to greater insight of the

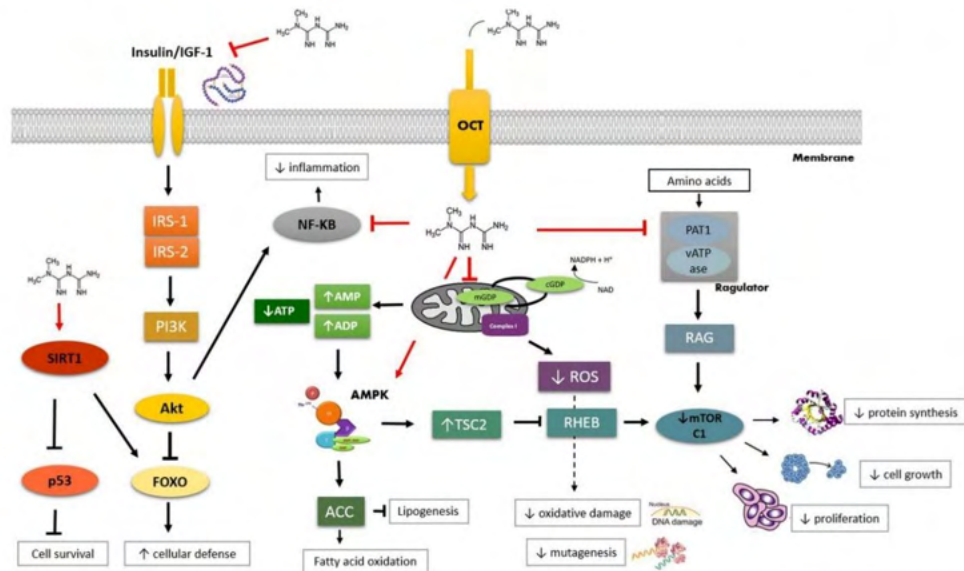


Fig. 2. Mechanisms of metformin action related to ageing.

The figure shows schematically the most important intracellular targets of metformin. Outside the cells metformin has been found to affect the receptors for insulin and IGF-1 that are activated with ageing. Metformin is transported into the cells via organic cation transporters (OCTs) in which metformin inhibits mitochondrial complex I, and activates AMPK. Therefore, metformin suppresses mTOR, which appears to be a major target to modulate ageing. Metformin through inhibition of complex I decreases ROS level, and through inhibition of NF-κB decreases inflammation. Modulation of SIRT1 activity leads to removal of senescent cells. All the processes affect cell proliferation, cellular survival, stress defense, autophagy, protein synthesis, and inflammation which are strongly associated with longevity. The effects of metformin on its primary targets are marked with red arrows or lines. The figure does not include all the cross-talk between individual factors.

Abbreviations: IGF-1 – insulin growth factor 1; IRS-1/2 – insulin receptor substrate 1/2; PI3K – phosphoinositide 3-kinases; Akt – protein kinase B; FOXO – transcription factors (Forkhead box); SIRT1 – sirtuin 1; NF-κB – nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; ACC – Acetyl-CoA carboxylase; TSC2 – tuberous sclerosis complex 2; ROS – reactive oxygen species; RHEB – Ras homolog enriched in brain; mTOR – mammalian target of rapamycin; RAG – RAS-related GTP-binding protein; PAT1 – proton-coupled aminoacid transporter 1; vATPase – vacuolar ATPase.

molecular mechanisms responsible for pleiotropic activity of the drug. Moreover, discovery of new targets for metformin will aid in the search for novel anti-diabetic molecules with improved safety profiles.

3. Clinical data on Metformin ANTI-AGEING Properties

Clinical studies have confirmed that metformin reduces the prevalence of diabetes in high risk subjects (Knowler et al., 2002). Later research of Knowler and Diabetes Prevention Group, 2015 also confirmed the advantageous properties of metformin in prevention of HbA_{1c}-defined diabetes. There are also plenty of observational studies that provide evidence on geroprotective properties of metformin in humans which have been previously reviewed (Piskovatska et al., 2020). Within this chapter, we briefly review the current literature particularly emphasising all-cause mortality, age-related diseases, including cancer as well as cardiovascular disease.

3.1. All-cause mortality

Based on the survey of currently available clinical outcomes we can distinguish two types of studies focusing on influence of metformin on all-cause mortality. The first group of studies compares diabetic individuals using metformin to the general population or non-diabetic subjects (Bannister et al., 2014; Berard et al., 2014; Bo et al., 2012; Claesen et al., 2016), while the second group of studies compares metformin-treated diabetic subjects to other T2DM patients taking other medications used in management of diabetes, such as insulin (Ekström et al., 2012; Ghotbi et al., 2013), sulphonylurea (Evans et al., 2006; Kahler et al., 2007; Sullivan et al., 2011; Wang et al., 2014) or observing a diet (Bo et al., 2012; Sullivan et al., 2011).

Results of the studies comparing metformin-treated diabetic patients with non-diabetics showed that the mortality rate is significantly lower in metformin users than in those who did not use the drug. For instance, Bannister et al. (2014) confirmed that T2DM patients, being administered metformin monotherapy, demonstrated a longer survival than matched, non-diabetic controls. The authors found also that sulphonylurea therapy was associated with a reduced survival compared with controls and metformin monotherapy (Bannister et al., 2014). In turn, Bérard et al. (2014) evaluated a fourteen-year risk of all-cause mortality according to hypoglycemic exposure at baseline in the general population, and found that the hazard ratio for all-cause mortality was lower in the metformin-treated group (HR 2.28) than that in the untreated diabetic subjects (HR 3.22).

Ekström et al. (2012) evaluated the influence and safety of metformin therapy in T2DM subjects, and found that the biguanide treatment compared with insulin treatment contributed to a decreased risk of CVD, serious infection and all-cause mortality. Importantly, metformin use was associated with lower all-cause mortality in comparison with other hypoglycaemic agents (Ekström et al. (2012)). In another study, Evans et al. (2006) assessed the risk of cardiovascular events in T2DM subjects newly using with metformin or sulphonylureas. The most prominent observation of this study was the fact that individuals newly treated with sulphonylureas alone, or with sulphonylureas combined with metformin, were at higher risk of adverse cardiovascular effects than those treated only with metformin. Importantly, metformin treatment was related to a lower cumulative mortality rate in comparison with sulphonylurea therapy (Evans et al., 2006). A decrease in all-cause and cardiovascular mortality linked with metformin treatment compared with sulphonylurea monotherapy was also reported by Johnson et al. (2002). In turn, Kahler et al. (2007) found no significant drug effect on all-cause mortality for all oral treatment cohorts, including metformin relative to sulphonylurea oral monotherapy. Another study of Wang et al. (2014) showed that among older veterans suffering from T2DM without concomitant frailty-related disorders, metformin treatment, compared to sulphonylurea, contributed to a 30 % decrease in the mortality risk. On the other hand, metformin appeared to have no effect on the mortality rate in the

patients with frailty-related markers (Wang et al., 2014).

To summarize, one of recent meta-analyses of Campbell et al. (2017) revealed that diabetic subjects using metformin demonstrate importantly lower all-cause mortality than healthy people not using this biguanide (HR = 0.93, 95 %CI 0.88–0.99). Metformin therapy also appears to be more beneficial regarding all-cause mortality in comparison to other therapies, including insulin or sulphonylurea therapies.

3.2. Age-related diseases

In this chapter, we will concentrate mainly on the relationship between metformin and the occurrence of cancer, cardiovascular disease and neurodegenerative diseases.

3.2.1. Cancer

Anti-cancer properties of metformin were confirmed for the first time in 2005 when Evans et al. (2005) published outcomes of a clinical trial, carried out on 11,867 patients. The authors reported that T2DM individuals using metformin had a lower cancer-related mortality rate than those who did not use metformin. Since then, numerous systematic investigations and meta-analyses have been published. They aim to determine the association between metformin use and cancer incidence or survival outcomes (Campbell et al., 2017; Yu et al., 2019).

Several clinical trials have reported that chronic use of metformin may contribute to decrease in progression of breast cancer and mortality due to this ailment (Pizzuti et al., 2015; Col et al., 2012; Hadad et al., 2011; Goodwin et al., 2011). For example, Bodmer et al. (2010) reported in a nested case-control study that chronic treatment with metformin is significantly related with a reduced risk of breast cancer in T2DM patients. Metformin also appeared to be beneficial in newly diagnosed, untreated, non-diabetic breast cancer patients (Niraula et al., 2012). However, not all studies report advantageous effects of metformin on cancer incidence or outcomes. For instance, Bonanni et al. (2012) did not confirm statistically significant effects of metformin on breast cancer proliferation in non-diabetic women. Metformin was also found to positively affect the incidence of metastases in breast cancer since after 5-years follow-up, 9.2 % of patients treated with metformin, and 12.3 % subjects not using the drug developed metastases (Jacob et al., 2016).

Ambiguous results were observed for metformin and its effects on endometrial cancer. Becker et al. (2013) and Luo et al. (2014) did not find any effects of metformin on the risk of endometrial cancer. Also Al Hilli et al. (2016) reported that the effect of diabetes and metformin on clinical outcomes is insignificant in risk-adjusted endometrial cancer groups. On the other hand, Tseng (2015) observed that metformin treatment in diabetic females is associated with an overall essentially lower risk of endometrial cancer with dose-response relationship. Also the results of three studies investigating the potential of metformin on the growth of pancreatic carcinoma in T2DM subjects did not provide the unequivocal answer, since Bodmer et al. (2012) reported that metformin was associated with a reduced risk of pancreatic cancer in women only. On the other hand, Lu et al. (2015) and Walker et al. (2014) did not find any important relationship between metformin and pancreatic cancer.

The advantageous effects of metformin on cancer incidence, mortality and prognosis was also confirmed in various types of gastrointestinal cancers. For instance, Van de Voorde et al. (2015) published that metformin therapy contributed to a significantly better distant metastasis-free survival rate and overall survival rate. According to Lee et al. (2011), metformin utilization is related with a significantly decreased risk of incidence of total cancer, colorectal, liver and pancreatic cancer. Metformin was also found to decrease the risk of progression of hepatocellular carcinoma and reduce liver-related death in diabetic patients with HCV cirrhosis (Nkontchou et al., 2011). Positive effects of metformin regarding cancer incidence were also found in a metaanalysis conducted by Campbell et al. (2017). Its authors estimated that metformin therapy is associated with a decreased risk of colorectal

and breast cancer. There are also other studies reporting beneficial effects of metformin on the prevalence of various types of cancers, including head and neck cancer (Rêgo et al., 2015), prostate cancer (Preston et al., 2014) or lung cancer (Smiechowski et al., 2013). However, negative results should also be taken into consideration, such as obtained for bladder (Goossens et al., 2015) or thyroid cancer (Tseng, 2012). The summary of the results of the above studies is enclosed in Table 1. A valuable summary of the anti-cancer properties of metformin are also presented by Pitskovatska et al. (2019).

3.2.2. Cardiovascular diseases

The past several years have brought strong evidence proving the favourable influence of metformin on the function of the cardiovascular system (Nesti and Natali, 2017). These beneficial effects may result from the improvements of endothelium function, reduction of proliferation of smooth muscle cells, and anti-inflammatory properties of the drug (Nesti and Natali, 2017). Within this chapter, we focus on clinical outcomes of the influence of metformin on the cardiovascular system.

Apart from UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group, 1998, also other studies confirmed advantageous effects of metformin with respect to the cardiovascular system. For instance, Kooy et al. (2009) found that metformin treatment contributed to a reduction of macrovascular end point after a follow-up period of 4.3 years. In another study (SPREAD-DIMCAD trial), metformin administration in patients with the T2DM and cardiovascular disease contributed to a 46 % reduction of recurrent cardiovascular events when compared to glipizide (Hong et al., 2013). In turn, Ekström et al. (2012) evaluated the risk of CVD in 51,675 individuals with T2DM on continuous anti-hyperglycemic therapy or insulin, and found that metformin-treated patients showed a lower risk of CVD in comparison to patients using insulin. Also Ghotbi et al. (2013) found that metformin therapy of T2DM individuals was related to a lower risk of primary outcome event (POE), and lower mortality, which implies that the drug decreases the risk of CVD. These beneficial effects were not confirmed by results of the BARI2D trial performed in T2DM subjects who were eligible for coronary artery revascularization (BARI 2D Study Group et al., 2009). Nevertheless, this study did not confirm a direct effect of metformin, because two therapeutic strategies including insulin sensitizing (metformin and thiazolidinediones) versus insulin providing (sulfonylureas and insulin) drugs were applied in this study.

There are also studies evaluating effects of metformin on the prevalence of stroke. Floyd et al. (2016) examined the prevalence of stroke in metformin users in comparison to other T2DM subjects non treated with metformin. The investigators found that the use of metformin is connected with a lower risk of stroke compared with other T2DM therapies. On the other hand, metformin was not found to decrease the risk of myocardial infarction (Floyd et al., 2016). In turn, Jansson et al. (2014) found that the incidence of cumulative cardiovascular disease and myocardial infarction were significantly lowered after implementation of metformin treatment. A meta-analysis of these studies reported an important decrease in the stroke incidence among patients using metformin (Campbell et al., 2017). However, there is also a study that does not confirm the efficacy of metformin in preservation of left ventricular ejection fraction in patients without diabetes presenting with ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI) (Lexis and van der Horst, 2014). Also another study failed to demonstrate the benefits of metformin on the carotid intimal medial thickness in non-diabetic subjects (Preiss et al., 2014).

Several studies identified influence of metformin on the incidence of HF. For instance, Hartung et al. (2005) compared various anti-diabetic therapies and found that metformin as opposed to thiazolidinedione was not associated with an elevated risk of hospitalization due to HF. On the other hand, Koro et al. (2005) reported an increase, yet non-significant, in the prevalence of congestive HF during the treatment with metformin compared to subjects treated with sulphonylurea. In the next study study, carried out by Nichols et al. (2005), a non-significant

reduction in congestive HF in diabetics undergoing a metformin therapy was observed. Therefore, the authors concluded that metformin may offer some protection from the incidence of HF in comparison to sulphonylurea or insulin. Similar conclusions were presented by McAlister et al. (2008), who compared the prevalence of HF in T2DM subjects using metformin to those treated with sulphonylurea, and reported an insignificant decrease in HF in the metformin-treated group. The summary of metformin clinical effects resulting in lifespan extension is presented in Fig. 3.

3.2.3. Neurodegenerative disease

The outcomes of several clinical trials give evidence that chronic treatment with metformin could reduce the liability of cognitive decline (Ng et al., 2016). The investigators examined 365 older T2DM subjects (>55 years old) in the population-based Singapore Longitudinal Aging Study. According to the results, metformin use reduced the risk of cognitive impairment (modified Mini-Mental Status Exam score ≤ 23) by 51 %, which remained strong to adjustment for vascular and non-vascular risk factors. Furthermore, Ng et al. (2016) did not report any essential interactive effects of metformin therapy with apolipoprotein (APOE- ϵ 4) and depression. In turn, Cheng et al. (2014) presented results of a large observational study which showed that the risk of dementia is weaker in T2DM individuals treated with metformin or sulphonylurea than those using thiazolidinediones for a longer period. The authors presume that potential mechanisms of positive effects of the drug include: improved insulin sensitivity, a decreased risk of metabolic syndrome, and reduced inflammation (Cheng et al., 2014).

Another study proved that a 24-week administration of metformin improves cognitive function in depressed diabetic patients. In addition, metformin was found to significantly reduce depressive symptoms and change the glucose metabolism in depressed diabetics (Guo et al., 2014). Herath et al. (2016) examined the effect of diabetes treatment on certain cognitive parameters over four years, and reported that only metformin users demonstrated a better cognitive function including verbal learning, working memory, and executive functions in comparison to patients using other anti-diabetic drugs. Nevertheless, there is also one study reporting that metformin therapy was linked with impaired cognitive performance (Moore et al., 2013). Conflicting evidence regarding metformin effects on cognitive function was also presented by Piskovatska et al., 2019a, 2019b.

3.3. Clinical studies targeting longevity

Owing to the fact that metformin action can target the anti-ageing mechanism, and has a capability to reduce all-cause mortality and prevalence of certain types of cancers, researchers and clinicians have conducted clinical trials on nondiabetic individuals to determine the potential of metformin in extending human life.

One example might be the Metformin in Longevity Study (MILES), which is a double-blind, placebo-controlled clinical study including fourteen patients. The study aims to find associations between 6-week metformin intake and youthful gene expression in elderly people with impaired glucose tolerance (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT02432287>, available on 29.04.2020). Results of the study showed that in older adults, metformin contributes to metabolic and non-metabolic changes, including pyruvate metabolism and DNA repair in the muscle tissue as well as peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) and sterol regulatory element-binding proteins (SREBP) signaling, and mitochondrial fatty acid oxidation in the adipose tissue (Kulkarni et al., 2018).

Quite recently, a large double-blind, placebo-control TAME (Targeting Aging with Metformin) study has been launched. The principal aim of the study is to establish anti-ageing properties of metformin in nondiabetic subjects, and to find out whether metformin can target the ageing process by slowing the sequelae of existing age-related morbidity. It is planned to include 3000 participants, aged 65–79

Table 1
Other clinical studies evaluating the effects of metformin on lung, prostate, bladder, kidney, liver and pancreas cancer.

Cancer	Study type	Study population	Total participants	Measured outcome	Effect on organs	Results and conclusions	Ref.
Lung	Cohort study	Newly diagnosed lung cancer patients with T2DM	1443	Lung cancer specific mortality with metformin treatment	Further clinical studies are required to verify these findings.	Little evidence of a protective association between metformin therapy and cancer mortality in lung cancer subjects.	Mc Menamina et al., 2016
Lung	Nested case-control analysis	New users of oral hypoglycemic drugs from the UK GPRD	115,923	Risk of lung cancer with metformin therapy	No significant change was observed in lung cancer cells.	No beneficial effect of metformin on risk of lung cancer; RR = 0.94.	Śmiechowski et al. 2013
Lung	Retrospective study	Patients with a recorded diagnosis of lung cancer from the UK GPRD	91,301	Risk of lung cancer with metformin treatment	Long-term metformin treatment had preventive effect on subsequent development of lung cancer cells in women only.	Chronic use of metformin was not associated with decreased risk of lung cancer.	Bodner et al., 2012
Prostate	Meta-analysis	30 cohort studies	1,660,795	Overall survival (OS), PCa specific survival, recurrence free survival (RFS)	Further clinical studies are required to verify these findings.	Metformin treatment improves overall survival, and RFS in prostate cancer. Metformin did not decrease PCa-specific survival.	He et al., 2019
Bladder	Retrospective cohort study	Patients with at least one prescription of oral anti-diabetic agents and/or insulin	165,398	Urinary bladder cancer (UBC) risk	No significant change was observed in bladder cancer cells.	No association between metformin use and UBC risk (HR = 1.12) compared with SU only users.	Goossens et al., 2015
Bladder	Meta-analysis	9 retrospective cohort studies	1,270,179	Risk of bladder cancer with metformin treatment	Metformin intake reduced progression of muscle invasive bladder cancer for non Asians.	Metformin treatment improves survival connected with bladder cancer. Metformin ameliorates RFS, progression-free survival (PFS), and cancer specific survival (CSS). Metformin had no ability to decreased the incidence of bladder cancer.	Hu et al., 2018
Bladder	Retrospective cohort study	Newly diagnosed Taiwanese patients with T2DM	940,708	Risk of bladder cancer with metformin treatment	Metformin revealed potential preventive effect on bladder cancer cells i.e. inhibition the growth and proliferation of cancer cells.	Use of metformin was associated with reduced bladder cancer risk.	Tseng, 2014
Bladder	Retrospective cohort study	Patients with T2DM treated with metformin or sulfonylureas	87,600	Risk of bladder cancer with metformin or SUs treatment.	No significant change was observed in bladder cancer cells.	No significant effect of metformin treatment on prevalence of bladder cancer.	Mamtani et al., 2014
Kidney	Meta-analysis	8 cohort studies and 1 population based study	7426	Survival rate with kidney cancer after metformin treatment	Metformin treatment decreased progression of kidney cancer in 5 studies.	Metformin use had a protective ability on PFS, CSS and OS. Little evidence of a protective impact of metformin treatment on renal cancer survival outcomes. None reached statistical significance.	Nayan et al., 2019
Kidney	Meta-analysis	8 cohorts studies	254,329	Survival rate with kidney cancer after metformin treatment	Reduced risk of cancer cells development in kidney in patients treated with metformin in comparison with non-treated patients.	Metformin treatment improved OS, CSS in patients with renal cell carcinoma (RCC). No beneficial effect of metformin use on DFS and PFS of kidney cancer.	Li et al., 2017
Kidney	Retrospective cohort study	Patients with T2DM and M0 renal cell carcinoma who undergoing nephrectomy.	158	Overall survival, connection between metformin treatment and disease-free.	No significant change was observed in kidney cancer cells.	No positive effect of metformin use on kidney cancer risk.	Nayan et al., 2017
Kidney	Cohort study	Taiwanese patients with type 2 diabetes	247,252	Risk of bladder cancer with metformin treatment	Further clinical studies are required to verify these findings.	Metformin treatment reduced the prevalence of kidney cancer in T2DM subjects in a dose-dependent manner.	Tseng, 2016
Liver	Meta-analysis	Randomized controlled trials, 6 retrospective cohort	13,985	Overall survival (OS) after metformin treatment and other anti-diabetic drugs in	Metformin use led to inhibition of hepatocellular carcinoma cells proliferation.	Beneficial effect of metformin on OS of patients with HCC and	Zhou et al., 2020

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Cancer	Study type	Study population	Total participants	Measured outcome	Effect on organs	Results and conclusions	Ref.
Liver	Cohort study	studies, and case-control studies Men at the age of 40-89 without renal, chronic liver, or cardiovascular diseases and cancer.	84 433	hepatocellular carcinoma (HCC) patients with type 2 diabetes Risk of hepatocellular carcinoma with metformin treatment	Metformin intake revealed potential preventive effect on hepatocellular carcinoma cells in Hispanics and non-Hispanic African American only. Thereby, metformin response is probably heritable or dependent on ethnicity disparity.	T2DM after healing therapy. Metformin use reduced the incidence of HCC by ca. 51 % and altered the race/ethnicity disparity.	Wang et al., 2019.
Liver	Meta-analysis	23 studies (observational studies and randomized controlled trials)	17,028,953	Risk of liver cancer with metformin treatment	Further clinical studies are required to verify these findings.	Protective association between metformin treatment and risk of liver cancer. In metformin treated group, the risk of liver cancer was reduced by 48 %.	Ma et al., 2017
Liver	Random-effects meta-analysis model	5 studies (2 hospital-based case-control studies, 2 prospective cohort study and 1 retrospective cohort study)	105,495	Risk of liver cancer with metformin treatment	Metformin played a role in chemoprevention of growth of liver cancer cells.	Little evidence of a protective association between metformin use and incidence of liver cancer – reduction by ca. 62 %. In four studies, metformin treatment reduced the risk of HCC by ca. 70 %.	Zhang et al., 2012
Pancreas	Cohort study	Patients with pancreatic cancer-related diabetes (PCRD) and postpancreatitis diabetes mellitus (PPDM)	1862	Risk of mortality with anti-diabetic drugs treatment in patients with PCRD and PPDM	Further clinical studies are required to verify these findings.	No association between metformin therapy and survival in PCRD patients. Beneficial effect on survival in PPDM patients.	Cho et al., 2019
Pancreas	Meta analysis	8 studies (randomized controlled trials, cohort studies, or case-control studies)	4293	Overall survival (OS) of patients with pancreatic cancer with metformin treatment	In Asian patients, metformin treatment was associated with reduced risk of cancer cells development only to small extent.	Little evidence of a beneficial association between metformin therapy and OS. Metformin use caused increase of OS ca. 19 %.	Xin et al., 2018
Pancreas	Meta analysis	17 studies (cohort, observational and case-control)	36,791	Overall survival after metformin adjuvant treatment in patients with pancreatic cancer.	Metformin adjuvant treatment had preventive effect on growth of pancreatic cancer cells, especially in Asian patients at an early tumor stage (I-II). No significant change was observed in pancreatic cancer cells.	Association between metformin use and prolonged survival in pancreatic cancer individuals.	Wan et al., 2018
Pancreas	Retrospective cohort study	Patients with T2DM and advanced pancreatic adenocarcinoma (PAC)	516	Survival rate with pancreatic cancer after metformin treatment	No significant change was observed in pancreatic cancer cells.	No clinically important association between metformin treatment and survival in patients with advanced PAC. However, metformin provided survival in PAC in non-metastatic disease.	Hwang et al., 2013

years. The authors plan to measure the time to the occurrence of new cardiovascular events, cancer, dementia, and mortality. TAME's aim is also to determine significant functional and geriatric end points. Thanks to this study, scientists will know whether treatment with metformin can inhibit age-related diseases, including cancer, CVD and AD and thus decrease or postpone mortality (Barzilai et al., 2016).

4. Preclinical in vivo evidence of geroprotective effects

As presented above metformin is a medication approved by the Food and Drug Administration for the therapy of T2DM but it has also been found to target some ageing-related mechanisms (Nir Barzilai et al., 2016). This aforementioned activity of metformin calls for its use in treatment of ARD and extension of longevity. Within this chapter we provide the results of pre-clinical studies aiming to confirm the

anti-ageing properties of the drug and explain its mechanism of action.

4.1. Invertebrate models

The multidirectional mechanism of metformin action has been demonstrated to beneficially affect ARDs. These effects were confirmed in *in vitro* studies targeting mainly molecular mechanisms of ageing, and also *in vivo* studies, including various types of organisms ranging from a simple worm to a mice and rhesus monkeys (Barzilai et al., 2016). Nematode *Caenorhabditis elegans* is an experimental model. It is widely used as it allows to elucidate molecular mechanisms involved in longevity (Lapierre and Hansen, 2012). Research on the anti-ageing effects of metformin has been extensively conducted over the past decade, but according to some sources (Potempa et al., 2016), the first reports of these properties of metformin appeared 40 years ago. Several

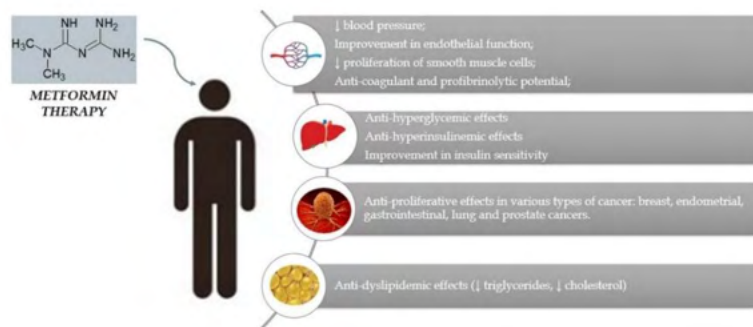


Fig. 3. Potential clinical effects of metformin contributing to its anti-ageing effects. In the ageing patients, metformin may provide multiple benefits. Metformin basic effects are related with the influence on the liver (e.g. reduction in glucose output), and the peripheral tissues to increase glucose uptake. With regard to cardiovascular system metformin ameliorates hyperglycemia, improves endothelial function, reduces blood pressure and possesses anti-coagulant properties. In addition, metformin reduces insulin resistance and fat redistribution. Accumulating data give evidence on the anti-proliferative role of metformin in several types of cancer. All these beneficial effects may improve physical function (e.g. mobility, endurance), clinical outcomes (e.g. blood pressure, weight and cardiovascular health) leading to improved quality of life and extended lifespan.

studies have found that metformin prolongs lifespan in *C. elegans* (Cabreiro et al., 2013; De Haes et al., 2014; Onken and Driscoll, 2010; Wu et al., 2016). As reported by Onken and Driscoll (2010), the drug administered at a dose of 50 mM increases the mean lifespan of *C. elegans* by about 40 %; however, it is not associated with the maximum life span extension. The authors also found that anti-ageing properties of metformin stem from the activation of LKB1-AMPK-SKN1 signalling pathway. Further research has shown that longevity effect of metformin in *C. elegans* is related to both v-ATPase-mediated mTORC1 suppression and v-ATPase-AXIN/LKB1-mediated AMPK activation (Chen et al., 2017).

Interestingly, metformin was also showed to increase lifespan in *C. elegans* co-cultured with *Escherichia coli* which has multidirectional effects on the model organism. The mechanism of action included alteration of microbial folate and methionine metabolism. Additionally, metformin differentially influences nematode lifespan, depending on *E. coli* strain, metformin sensitivity and glucose concentration. Bearing in mind that the intestinal microbiome affects human metabolism and health, metformin effects on gut microbiome can contribute to its therapeutic efficacy (Cabreiro et al., 2013). Reduced glucose supplementation prolongs *C. elegans* lifespan through mitohormesis, a biological response in which a lower level of mitochondrial stress improves health and viability (Bárceña et al., 2018). De Haes et al. (2014) showed that metformin prolongs lifespan by means of mitohormesis and found that the mitohormetic signal was transmitted by the hydrogen peroxide scavenger peroxiredoxin (PRDX-2), whose expression was greater after metformin supplementation. The investigators also stress that due to its evolutionary conservation, the peroxiredoxin pathway might stand for a general principle of longevity signalling. In addition, *C. elegans* treated with the drug also demonstrated beneficial morphology for a longer time, which consequently led to their improved health span (De Haes et al., 2014).

Despite the promising results in nematodes, metformin longevity effects were not confirmed in *Drosophila*, whose lifespan is affected by AMPK activation (Tohyama and Yamaguchi, 2010). Also in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*, independently on the gender, metformin did not extend the lifespan. Importantly, metformin at high doses (100 mM) was toxic to the flies, probably due to disturbances in intestinal fluid homeostasis (Slack et al., 2012). These outcomes imply that the drug has evolutionarily conserved influence on metabolism but not on lifespan. Nevertheless, the drug was found to suppress age- and oxidative stress-induced DNA damage and delay stem cell ageing in *Drosophila* (Na et al., 2013). The effects of metformin on lifespan were also examined on a silkworm model (Song et al., 2019). Metformin was found to prolong the lifespan of the male silkworm through AMPK-P53-FoxO pathway, increasing stress resistance and anti-oxidative capacity. Interestingly,

the survival change was not observed in female silkworms. Thus we can expect that anti-ageing effects of metformin might be gender-related.

In summary, despite the intriguing benefits of metformin in lifespan extension in some nematodes, the underlying mode of action, not yet well explained has become a subject of extensive debate since metformin targets various cellular signalling pathways associated with inflammation, cellular senescence, and stress defense. The researchers claim that metformin prolongs lifespan through mimicking the effects of diet restriction by activating AMPK.

4.2. Vertebrate models

Frequent application of metformin for the treatment of T2DM contributed to the collection of a large amount of data regarding effects of its potential application, pharmacological profile, safety, and mortality. A vast majority of studies on geroprotective effects of metformin utilised a rodent model, mainly various mice strains (Novelle et al., 2016).

A study of Anisimov et al. (2005) was one of the first studies reporting effects of metformin on life span and progression of mammary tumors in mice. The investigators found that long-term treatment of female transgenic HER-2/neu mice with metformin at a dose of 100 mg/kg in drinking water, slightly reduced food intake, slowed down the age-related elevation of blood glucose and triglycerides level. Importantly, it was confirmed that the drug prolonged the mean life span by 8%, and the maximum life span by 1 month in comparison with the control group. In addition, the prevalence and size of mammary adenocarcinomas in mice treated with metformin got decreased and was similar to the one observed in the non-treated group (Anisimov et al., 2005). In another mice strain (outbred SHR mice), the chronic treatment of females with metformin (100 mg/kg in drinking water) reduced the body weight, improved the mean life span by 37.8 %, and the maximum life span by 2.8 months in comparison with the control group. However, in this model, the authors did not find any effect of metformin supplementation on blood estradiol concentration and spontaneous tumor incidence (Anisimov et al., 2008). Metformin extends the mean life span, and in combination with melatonin, significantly inhibited the size of transplanted tumors in HER-2/neu mice, thus giving evidence that it may be useful in prevention and treatment of breast cancer (Anisimov et al., 2010a). Interestingly, Anisimov et al. (2011) showed that the longevity effects of metformin in female SHR mice depend on the age of the animals at the onset of treatment. A prolongation of the mean life span and the maximum life span was observed when metformin administration was started at the age of 3 months, while no effects were reported when metformin was supplemented to the animals at the age of 15 months (Anisimov et al., 2011).

The geroprotective effects of metformin were also confirmed by [Martin-Montalvo et al. \(2013\)](#), who reported that the chronic supplementation with metformin (0.1 % w/w in diet), introduced at middle age, extends the healthspan and lifespan in C57BL/6 mice. The authors reported that metformin acts as CR mimetic, and its beneficial effects include increased insulin sensitivity, and lowered LDL and cholesterol levels without a decrease in caloric intake. Furthermore, metformin improves antioxidant protection, resulting in reductions of both oxidative damage accumulation and incessant inflammation ([Martin-Montalvo et al., 2013](#)). The beneficial effects of metformin were also observed in a second strain of male mice (hybrid B6C3F1), with a 4.15 % increase in the mean lifespan ([Martin-Montalvo et al., 2013](#)). Research conducted by [Smith et al. \(2010\)](#) is one of a few studies examining anti-ageing effects of metformin in the Fisher-344 rat model. However, the authors did not find any evidence of lifespan extension in the metformin treated group. These discouraging effects were attributed to resistance of this strain of rat to calorie restriction ([Smith et al., 2010](#)).

Metformin was also reported to exert advantageous effects on neurological disorders. For instance, [Ma et al. \(2007\)](#) found that metformin supplementation (2 mg/mL in drinking water) significantly increased the survival time of male mice suffering from Huntington's disease (HD). A higher dose of metformin (5 mg/mL) did not affect survival. Interestingly, the positive affect of metformin was reported only in male mice, not female. Also [Sanchis et al. \(2019\)](#) reported that metformin relieves motor and neuropsychiatric phenotypes in zQ175 mice with HD indicating delay of HD progression. However, a study of [Kaneb et al. \(2011\)](#) has shown that metformin does not influence the onset, progression and survival of male mice with amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Results of other studies are summarized in [Table 2](#).

Beneficial properties of metformin were also confirmed with respect to pathological hallmarks of AD. For example, [Chen et al. \(2016\)](#) determined the effect of metformin in β -amyloid ($A\beta$) transport across the blood-brain barrier (BBB), and found the drug essentially reduced the influx across the BBB via the receptor for advanced end glycation product (RAGE) expression and intra-arterial infusion of ^{125}I - $A\beta(1-40)$ in diabetic male db/db mice. In another study, [Li et al., 2012a, 2012b](#) reported that metformin improves AD-like neuropathology in obese, leptin-resistant mice. However, there are also studies showing adverse effects of metformin regarding the liability of developing AD. [Chen et al. \(2009\)](#) demonstrated that metformin administration in a triple transgenic mouse model of AD results in an increase in the expression of BACE1, being one of the two enzymes that cleave amyloid precursor protein (APP) to generate $A\beta$, which was associated with an increase in $A\beta$ production and small plaque formation. In addition, the investigators found that the drug can be harmful toward viability of neurons through its AMPK-mediated mechanism ([Chen et al., 2009](#)).

Anti-inflammatory properties of metformin were also confirmed in an animal model. [Oliveira et al. \(2016\)](#) observed that diabetic mice treated with metformin demonstrate reduced levels of the expression of inflammation markers (IL-1 and vascular endothelial growth factor (VEGF)), accompanied by enhanced levels of p-AMPK and nitric oxide synthase 3 (eNOS). Anti-oxidative potential of metformin was also examined in a mouse model with carbon tetrachloride (CCl_4)-induced oxidative liver injury ([Dai et al., 2014](#)). Supplementation with metformin markedly reduced the level of serum aminotransferases and attenuated hepatic histological abnormalities. [Ma et al. \(2015\)](#), by using a rat model of painful diabetic neuropathy, demonstrated that metformin exerts beneficial effects on malondialdehyde (MDA) and glycation end product levels in blood, as well as increases superoxide dismutase activity, suggesting that the drug suppresses diabetes-induced oxidative stress. In addition, metformin was found to act neuroprotectively through enhancing autophagy and inhibiting the inflammation after a spinal cord injury (SCI) ([Wang et al., 2016](#)).

Metformin was also found to be effective in other ARDs including cancer. Numerous pre-clinical reports have confirmed anti-cancer properties of the drug, and discovered plausible mechanisms

Table 2
The prolongevity effects of metformin in animal studies.

Animal model	Metformin dose	Major findings	Reference
129/Sv mice	100 mg/kg in drinking water	Long treatment with metformin increased female mice lives by ca. 5%. This effect has not been noticed among males. Metformin decreased the prevalence of malignant tumors in females.	Anisimov et al., 2010b
Wistar rats fed with high-fat diet	8 week treatment	Metformin acts neuroprotectively against the detrimental effects of $A\beta$ and HFDs on hippocampal synaptic plasticity.	Asadbegi et al., 2016
129/Sv mice	100 mg/kg in s.c. injection at the 3rd, 5th and 7th days of life	Neonatal treatment with metformin increased male mice mean life span by ca. 20 % and also extended maximum life span by ca. 3.5%. Nonetheless, such an effect has not been observed in females. Metformin reduced mean life span by ca. 9.1% and maximum life span by ca. 3.8%. Practically half (45 %) of male of the control group and 71.8% of the researched group survived up to 800 days of age.	Anisimov et al., 2015
Kras G12D mice	5 mg/mL in the drinking water for 3 or 9 months	Three months treatment with metformin reduced risk of hepatic steatosis development and ability to weight gain in mouse population subjected to HFD. After 9 months treatment, metformin significantly decreased the incidence of pancreatic ductal adenocarcinoma.	Chang et al., 2018
Balb/c female mice	250 mg/kg in the drinking water	Metformin induced apoptosis in A549 and PANC-1 cell xenografts and decreased growth of K-ras mutant tumors after 21 days of treatment.	Ma et al., 2013
C57BL/6J male mice	50 mg/kg in the drinking water	Metformin weakened enhanced activation of insulin receptor and significantly induced phosphorylation of AMP kinase leading to considerable reduction of tumor size and growth in HFD mice.	Algire et al., 2008
Female Wistar rats	2 mg/mL in the drinking water	Metformin prevented postmenopausal breast cancer progression. After 8 weeks treatment, mean tumor burden was decreased by ca 86% in the metformin-treated rats.	Giles et al., 2018

explaining the molecular mechanism of its action in cancer. This observation has been a subject of many review papers ([Rizos and Elisaf, 2013](#); [Yu et al., 2019](#); [Pizzutti et al., 2015](#); [Febbraro et al., 2014](#)), so we will focus only on just a few examples. For instance, [Gotlieb et al. \(2008\)](#) demonstrated cytotoxic properties of metformin towards ovarian cancer cells, which has later been supported by a few papers ([Wu et al., 2012](#); [Lengyel et al., 2014](#)). Initial experiments identified the molecular mechanism of metformin action, with AMPK, and its downstream targets responsible for anti-cancer activity ([Wu et al., 2012](#)). In xenograft mouse models of ovarian cancer, metformin reduced tumor burden,

decreased tumor weight, and improved the cisplatin cytotoxicity (Wu et al., 2012; Lengyel et al., 2014; Rattan et al., 2011). Metformin was also found to significantly reduce the risk of pancreatic ductal adenocarcinoma incidence and tumor weights in transgenic mice (Mohammed et al., 2013). Moreover, the authors observed essential inhibition of carcinoma spread in the pancreas. Molecular studies have shown that the pancreatic tissue of mice, fed with metformin, exhibited a significant suppression of mTOR, extracellular signal-regulated kinases (ERK), phosphorylated extracellular signal-regulated kinases (pErf), and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) (Mohammed et al., 2013). On the other hand, Cheng and Lanza-Jacoby (2015) suggested that metformin decreases pancreatic cancer cell survival by reducing ROS production through down-regulation of NADPH oxidase 4 (NOX4) protein expression.

In summary, on the base of the analysis of the above data collected in different animal models, metformin seems to be an encouraging geroprotector (Cabo, 2013). The summary of the current knowledge on the metformin effects in various organisms is presented in Fig. 4. In addition, growing evidence in preclinical studies suggests advantageous effects of metformin in the treatment of ARD, including cancer and neurodegenerative diseases. Significant is the fact that the drug presents a good safety profile and is well tolerated. However, there are still some discrepancies between results of some studies regarding the effectiveness of metformin. Thus, further studies are required to clarify both the mechanisms and biological properties of metformin.

5. Experimental in vitro evidence of Geroprotective effects of Metformin

Within this chapter, we provide a brief overview of beneficial properties of metformin obtained in *in vitro* studies which might be valuable in the treatment of selected ADR.

5.1. Anti-proliferative effects

Before discussing the role of metformin as suppressor of cancer cell viability, one should look at the effective concentration of the drug. The efficacy of metformin as an anti-neoplastic drug stems from the sensitivity of certain tissues to the drug, and cellular transport. Based on the number of transporters engaged in cellular uptake of metformin into different tissues, including plasma membrane monoamine transporters (PMAT), organic cation transporters (OCTs), multidrug and toxin extrusion (MATE), we presume that the presence and function of transporters, and interactions between them may influence the uptake of metformin into tumor cells. This may result in different anticancer potential of the drug (Markowicz-Piasecka et al., 2019). Most of the available studies report anti-proliferative properties of metformin at concentrations reaching 5–50 mM which are much higher than those corresponding to therapeutic concentrations applied in T2DM treatment (plasma concentrations between 10–40 μM). However, it should be noted that the concentration of metformin is highly different in various organs (Foretz et al., 2014). For instance, metformin concentration in the colon was found to reach 40 mM (Glosmann and Lutz, 2019).

An overview of current literature shows that anti-cancer properties of metformin are based on several mechanisms, including activation of LKB1/AMPK pathway, and suppression of mTOR, induction of cell cycle arrest or apoptosis, inhibition of protein synthesis, and improvement of the immunity (Franciosi et al., 2013). Favourable inhibitory effects of metformin on cell growth have been described for various cancer cell lines. These outcomes may be divided into two categories – studies presenting the improvement of chemotherapy during metformin treatment and studies confirming metformin cytotoxicity (Rizos and Elisaf, 2013).

For instance, two independent studies (Dong et al., 2012; Hanna et al., 2012) reported that metformin improves the response of

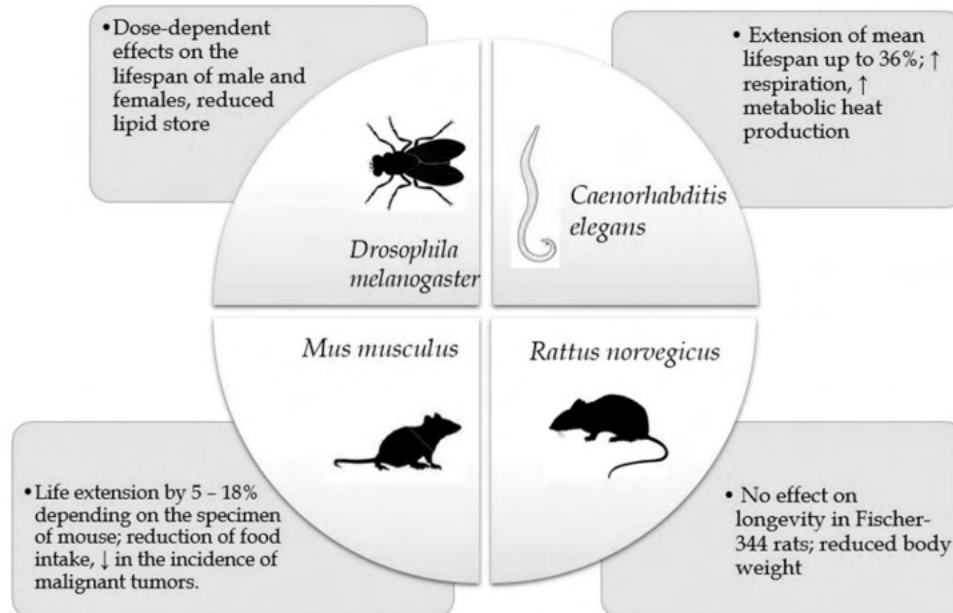


Fig. 4. The summary of lifespan-extending properties of metformin in different animal models (*Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*). The results are based on the previous findings (Cabreiro et al., 2013; De Haes et al., 2014; Smith et al., 2010; Slack et al., 2012; Martin-Montalvo et al., 2013; Anisimov et al., 2010b). A detailed description of the research results is presented in the text.

endometrial cancer cells to cisplatin and paclitaxel. The synergistic effect between metformin and cisplatin with respect to cytotoxic effect was also found for breast cancer cells (Liu et al., 2012), ovarian cancer cells and metastatic nodules in the lung (Rattan et al., 2011). In turn, Song et al. (2012) reported that metformin elevated the radiosensitivity of human breast cancer cells and mouse fibrosarcoma cells.

The effectiveness of metformin as a cytotoxic agent has been reviewed comprehensively (Rizos and Elisaf, 2013). Metformin was reported to diminish the viability of several types of cancer cells, including lung, gastric or endometrial cancer cells (Rizos and Elisaf, 2013). Other studies proved that metformin blocks cellular transformation and selectively kills cancer stem cells in four types of breast cancer (Hirsch et al., 2013) as well as hepatocellular carcinoma cells (Bhalla et al., 2012). Other highly valuable cytotoxic properties of metformin have been presented in Table 3.

Researchers usually examine both effects and associated mechanisms of metformin action. For example, Buzzai et al. (2007) established the effects of metformin on paired isogenic colon cancer cell lines HCT116 p53^{+/+} and HCT116 p53^{-/-}. The authors found that metformin treatment selectively inhibited growth of HCT116 p53^{-/-} by induction of apoptosis, and concluded that the drug exerts selective toxicity towards p53-deficient cells. Thus, metformin might be valuable in the treatment of patients with harboring p53-deficient tumors which are frequently resistant to traditional radiotherapy or chemotherapy (Buzzai et al., 2007). In turn, Zakikhani and co-workers (2006) reported that metformin suppresses breast and glial cancer cell growth in AMPK-dependent manner. They proved the results using small interfering RNA against AMP kinase, which prevented metformin-induced antiproliferative effect towards breast cancer cells (Zakikhani et al., 2006). Interesting findings were also collected by Ben Sahra et al. (2008), who revealed AMPK-mediated anti-proliferative effects of metformin on the human prostate cancer cells model. However, the scientists did not observe inhibition of anti-proliferative metformin action after using siRNA against the two catalytic subunits of AMPK, which means that the drug has another anti-neoplastic mechanism of action. The authors found that metformin inhibits ribosomal protein S6 kinase beta-1 (p70S6 kinase, S6K1) phosphorylation which is connected with downregulation of the mTOR pathway. The authors reported that metformin antiproliferative activity was due to reduced expression of cyclin D1 protein leading to cell cycle arrest at the G0/G1 phase (Sahra et al., 2008). Another interesting results were presented by Queiroz et al. (2013), who evaluated the anti-proliferative potential and mechanism of action of metformin in MCF-7 cancer cells. Metformin decreased the viability of MCF-7 cells, induced cell cycle arrest at the G0-G1 phase and increased cell apoptosis and necrosis. The authors identified also a molecular mechanism of the anti-proliferative properties of metformin which was linked with AMPK, and its downstream effectors including p38, Akt and ERK 1/2 (pro-inflammatory phosphokinases). The final effect of metformin treatment was stimulation of FOXO3a, being a transcription factor attenuating cancer by promoting cell cycle arrest (Queiroz et al., 2014).

5.2. Antioxidant properties

The process of ageing is closely connected with an onset of several diseases including cancer, T2DM, CVD and neurodegenerative diseases. It has been postulated that one of the causes leading to these diseases is oxidative stress. The main mechanism of anti-oxidative properties of metformin stems from inhibition of the mitochondrial respiratory chain. However, metformin has also been shown to reduce the production of ROS in mouse embryonic fibroblasts independently of AMPK activation (Algire et al., 2010). In turn, Bonnefont-Rousselot et al. (2003) found that metformin at pharmacologically relevant concentrations has the potential to scavenge hydroxyl free radicals. The authors found a decrease, yet nonsignificant, in ROS-induced luminescence in polymorphonuclear cells (PMN) stimulated by phorbol myristate acetate

Table 3

The selected studies evaluating cytotoxic potential of metformin in various cell lines.

Type of cells	IC ₅₀ value	Major outcome	Reference
The human endometrial carcinoma cell line Hec1A, Ishikawa; the mouse endometrial carcinoma cell line MecPK	IC ₅₀ = 5.03 mM for Hec1A IC ₅₀ = 141.12 mM for Ishikawa IC ₅₀ = 1.39 mM for MecPK	In all cell lines, metformin increased AMPK phosphorylation. Reduction of S6 ribosomal protein (S6rp) phosphorylation, ERK1/2 phosphorylation and increase of apoptosis in K-Ras mutated cells was only observed in Hec1A and MecPK cells. Reduction of AKT phosphorylation influenced PI3K pathway in both cell lines. Metformin demonstrated considerable cytotoxicity effectiveness against tumor with mutation in the K-Ras.	Iglesias et al., 2013
PC-3 (androgen independent phenotype) prostate cancer cells	IC ₅₀ = 5 mM	Metformin caused up regulation of 10 miRNAs and down-regulation of 12 miRNAs.	Avei et al., 2013
The human breast cancer cell line MCF-7	IC ₅₀ = 10 mM	After metformin administration, mTOR phosphorylation was suppressed and led to enhance of AMPK phosphorylation. Metformin also showed the ability to decrease NF- κ B level and weakened cyclin D1, I κ B α and phospho-I κ B α . Significant reduction of ER alpha action was already noticed at a concentration of 2 mM.	Scherbakov et al., 2016
Feline injection-site sarcoma (ISS) line (JB)	IC ₅₀ = 8 mM	Metformin induced cell death but this effect was not associated with inhibition of mTOR.	Pierro et al., 2017
The Human Glioblastoma Stem Cell GBM1, GBM2, GBM3, GBM4, GBM5, GBM6, GBM7	IC ₅₀ = 12.96 mM for GBM1 IC ₅₀ = 12.30 mM for GBM2, IC ₅₀ = 6.22 mM for GBM3, IC ₅₀ = 12.65 mM for GBM4, IC ₅₀ = 2.10 mM for GBM5, IC ₅₀ = 9.12 mM for GBM6,	Metformin had antiproliferative potency in glioblastoma stem cells (GSCs) by selective inhibition of Chloride Intracellular Channel 1 (CLIC1)-mediated ion.	Barbieri et al., 2018

(continued on next page)

Table 3 (continued)

Type of cells	IC ₅₀ value	Major outcome	Reference
The human rectal cancer cell lines SW837 and SW1463, the human colon carcinoma cell lines HCT116 and LS513	IC ₅₀ = 6.65 mM for GBM7	Metformin showed the ability to regulate chemoresistance in rectal cancer cells by influencing molecules acting as oncogenes: the drug stops signal transducer and activator of transcription (STAT3) phosphorylation and transforming growth factor, beta receptor II (TGFBR2)-mediated signalling. Metformin action has oriented itself to TGF-β signaling, leading to inhibition the TGF-β1-induced epithelial mesenchymal transition (EMT). After metformin administration, AMPK was activated in all cell lines and led to decrease of STAT3 phosphorylation. The ability of metformin to STAT3 and NF-κB inhibition caused decrease of IL-6-induced epithelial mesenchymal transition (EMT) expression. Metformin curbed PFKFB3 expression and has a synergistic effect with PFK15.	Park et al., 2019
	IC ₅₀ = 1.02 mM for SW837		
	IC ₅₀ = 8.75 nM for SW1463,		
	IC ₅₀ = 34.4 nM for HCT116,		
	IC ₅₀ = 40 mM for LS513		
The human primary breast cancer cells MBCDF-D5, MBCD3, MBCD23, MBCDF B3, MBCD25, MBCD17, MBCDF, MBCD4	IC ₅₀ = 44.70 mM for MBCDF D5	Metformin curbed PFKFB3 expression and has a synergistic effect with PFK15.	Esparza-López et al., 2019
	IC ₅₀ = 23.97 nM for MBCD3,		
	IC ₅₀ = 36.55 mM for MBCD23		
	IC ₅₀ = 52.61 mM for MBCDF B3,		
	IC ₅₀ = 10.11 mM for BCD25,		
	IC ₅₀ = 5.31 mM for MBCD17,		
	IC ₅₀ = 11.45 mM for MBCDF,		
The human multiple myeloma (MM) cell lines RPM8226, ARP-1 and OPM2	IC ₅₀ = 8.17 mM for MBCD4	Metformin curbed PFKFB3 expression and has a synergistic effect with PFK15.	Liu et al., 2019
	IC ₅₀ = 10 mM		
Acute Myeloid Leukemia (AML) cell lines HL 60 (AML M3 type) and THP-1 (AML M5 type)	For HL 60: IC ₅₀ 24h = 33.06 mM, IC ₅₀ 48h = 15.15 mM, IC ₅₀ 72h = 10.38 mM.	Metformin has a synergistic effect with cytarabine (Ara C) through the suppression of mTORC1/P70S6K pathway. This combination of drugs caused cell cycle arrest (block of S phase).	Yuan et al., 2020
	For THP-1 IC ₅₀ 24h = 78.77 mM, IC ₅₀ 48h = 12 mM, IC ₅₀ 72h = 6.386 mM.		

(PMA), or formyl methionine leucyl phenylalanine (fMLP). Thus, considering these results, the authors concluded that metformin could directly remove ROS or act indirectly by modulating the intracellular synthesis of superoxide anion (Bonnefont-Rousselot et al., 2003).

Vascular diabetic complications are associated with the production of advanced end glycation products (AGEs). Ruggiero-Lopez et al. (1999) was one of the first authors who reported that metformin affects

the formation of AGEs through interaction with α -dicarbonyl compounds, including methylglyoxal and glyoxal. Thus, it may be stated that metformin reduces carbonyl stress which can result in the prevention of vascular diabetic complication *in vivo* (Ruggiero-Lopez et al., 1999). Anti-oxidative properties of metformin were also confirmed by An et al. (2016), who assessed the influence of metformin on fluctuating glucose-induced endothelial dysfunction. This *in vitro* study showed that metformin has protective properties towards endothelial cells against oxidative stress. The beneficial effects of metformin included recoupling eNOS (endothelial nitric oxide synthase) through upregulation of GTPCH1 (guanosine 5'-triphosphate cyclohydrolase 1) and BH4 (tetrahydrobiopterin) levels, and attenuation of upregulation of p47-pox subunit in NADPH oxidase in FG-treated HUVECs. It was found that the protective effect of metformin resulted from inhibition of NADPH oxidase via an AMPK-dependent pathway. Additionally, metformin acted through typical activation of AMPK signalling pathway which inhibited generation of ROS and accelerated production of NO (An et al., 2016). Another study, conducted on colorectal cancer cells (Nguyen et al., 2019), proved that the drug decreases ROS production through inhibition of NADPH oxidase activity. Additionally, metformin suppressed NF-κB signalling and blocked interleukin-8 (IL-8) up-regulation induced by lithocholic acid (LCA). These outcomes led to a conclusion that metformin might prevent endothelial cell proliferation and tubelike formation (Nguyen et al., 2019).

5.3. Anti-inflammatory effects

Inflammation constitutes an important part of the pathogenesis of ageing-related diseases, including T2DM, as well as Alzheimer's disease (AD) (Verdile et al., 2015). For instance, multiple data have proved that the development of T2DM is related with elevated levels of inflammatory markers and mediators, including C-reactive protein (CRP) and interleukin 6 (IL-6) (Pradhan et al., 2001). In the course of AD, the degree of inflammation is associated with a cognitive decline (Parachikova et al., 2007) and brain atrophy (Cagnin et al., 2002). Inflammation, including NF-κB signalling, is recognized as an important contributing factor to ARDs, and a few previous experiments have reported that metformin inhibits NF-κB, also in vascular tissue (Isoda et al., 2006) and in hepatocytes (Woo et al., 2014). The effects of NF-κB inhibition in human endothelial cells (ECs) and smooth muscle cells (SMCs) included a reduced release of cytokines, such as interleukin-6 (IL-6) and interleukin-8 (IL-8), and attenuated activation potential of pro-inflammatory phosphokinases (p38, JNK, and Erk and Akt), induced by IL-1 (Isoda et al., 2006). Also Cameron et al. (2016) found that the biguanide in primary hepatocytes inhibits tumor necrosis factor- α -dependent I κ B degradation and expression of pro-inflammatory mediators, including IL-6, IL-1 β , and CXCL1/2 (C-X-C motif ligand 1/2). In addition, in macrophages, metformin specifically decreases a release of pro-inflammatory cytokines, without blocking M1-macrophages and M2-macrophages differentiation or activation (Cameron et al., 2016).

Anti-inflammatory properties of metformin were confirmed in colon cancer cells (COLO205) as well. The drug was found to disrupt the activation of NF-κB and phosphorylation of inhibitor of kappa B. The activity of this mechanism resulted in decreased production of inflammatory interleukines (IL-8 and IL-1 α). The authors evaluated also *in vivo* effects of metformin, and found that the drug ameliorates inflammation in epithelial cells of mice, inhibits colitis-associated colon tumorigenesis in a murine model, and weakens the severity of intestinal inflammation in IL-10 knockout mice (Koh et al., 2014). The advantageous effects of metformin on intestinal smooth muscle cells were also reported by Al-Dwairi et al. (2018). Cell stimulation with metformin caused a significant inhibition of secretion and expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-1 α , macrophage colony stimulating factor (M-CSF) and T cell activation gene-3 (TCA-3). The authors confirmed that the biguanide reduced levels of lipopolysaccharide-induced NF-κB

phosphorylation (Al-Dwairi et al., 2018). The anti-inflammatory properties of metformin were also presented *in vitro* using human retinal microvascular endothelial cells (hRVECs). The anti-inflammatory properties of the drug stem from activation of AMPK and related lowered levels of inflammatory molecules such as NF- κ B, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and IL-8 in TNF- α -stimulated hRVECs (Han et al., 2018).

In summary, numerous experimental studies have evaluated the potential of metformin in attenuation of inflammation and oxidative stress, and presented promising results in various types of cells. However, further studies conducted on animal models or clinical trials are required to support the results of *in vitro* studies.

5.4. Neuroprotective effects

It has been proved that metformin is able to counteract basic mechanisms of ARD such as cancer, CVD, and neurodegenerative diseases, including AD. According to Rotermund et al. (2018), the drug might affect neuronal longevity mechanisms because its cellular effects, yet not fully elucidated, are well-studied. Additionally, due to the well-known safety profile and multi-directional activity, metformin is an interesting drug for further studies. The main mechanisms supporting a neuroprotective effect of metformin include glucose metabolism improvement, energy sensing, counteracting protein phosphorylation, oxidative stress and neuroinflammation (Rotermund et al., 2018). The potential of metformin as a drug for treatment of neurodegenerative diseases has been studied thoroughly, and is a subject of many reviews (Palleria et al., 2016; Rotermund et al., 2018; Markowicz-Piasecka et al., 2017). Therefore, this article is a presentation of only a few *in vitro* studies on neuroprotective properties of metformin.

Metformin was found to exert neuroprotective properties preventing apoptosis of primary neurons (El-Mir et al., 2008). Studies demonstrated that metformin reduced neuronal damage and ameliorated a lack of oxygen or glucose in neurons. Owing to this activity, the drug prevented etoposide induced-apoptosis, leading to improvement of neuronal cell survival (El-Mir et al., 2008). Moreover, metformin effectively improves impaired glucose uptake in insulin-resistant neuronal cells, and prevents occurrence of molecular and pathological characteristics of AD (Gupta et al., 2011).

Importantly, metformin has the potential to significantly reduce beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 (BACE1) protein expression and activity in cellular model, thereby reducing BACE1 cleavage products and generation of A β (Hettich et al., 2014). The decreased BACE1 expression was caused by interfering with MID1 (E3 ubiquitin ligase) complex which subsequently activates PPA2 (protein phosphatase 2A) and suppresses mTOR signalling. Therefore, in the future, the targeting mTOR/PP2A therapy may be a reasonable method of suppression of AD (Hettich et al., 2014). Another cell research also reported that metformin stimulates PP2A activity and reduces tau phosphorylation at PP2A-dependent epitopes. Interestingly, the authors reported that metformin effects on PP2A and subsequent tau phosphorylation do not appear to depend on AMPK activation (Kickstein et al., 2010). These findings prove a beneficial effect of chronic metformin therapy and arouse the expectation that metformin would have a neuroprotective and protective effect in individuals with susceptibility for AD (Kickstein et al., 2010). According to Zhou and co-workers (Zhou et al., 2016) pretreating rat cerebellar granule neurons (CGN) with metformin significantly enhances cell viability against neurotoxic effects of glutamate.

AMPK signalling appears to be crucial to protect neurons under pathologic conditions. Paintlia et al. (2013) showed that metformin through AMPK activation reduces inflammation and oxidative stress, which results in protection of oligodendrocytes (OLs) in mixed *in vitro* glial cultures, stimulated with lipopolysaccharide. Similar effects were also found in OLs exposed to cytokines. Based on these results, it can be claimed that metformin as a AMPK activator can decrease deficits in

multiple sclerosis and associated neurodegenerative disorders (Paintlia et al., 2013). Another interesting results were presented by Wang et al. (2012), who reported that the biguanide supports neurogenesis and enhances spatial memory in a PKC-CBP-dependent (atypical kinase C) manner. As stated by the authors, PKC-CBP pathway is important for the normal genesis of neurons from neural precursors, and due to its activation, metformin promotes rodent and human neurogenesis in culture (Wang et al., 2012).

In summary, the data presented herein imply that metformin may play a crucial role in the treatment of AD due to targeting several pathological hallmarks of AD, including neurodegeneration, tau phosphorylation, and neuroinflammation. Moreover, anti-cholinesterase activity of the drug should also be pointed out. Nevertheless, negative results, especially those linking long-term use of metformin with accumulation of β -amyloid aggregates, should be kept in mind when evaluating the potential of metformin as an anti-AD agent.

5.5. Anti-senescence properties

Organismal ageing is accompanied by metabolic changes at the cellular level. A rising quantity of senescent cells (SCs) induces secretion of pro-inflammatory factors which impair the regeneration capability of stem cells. The chronic state of low grade inflammation is commonly reported in elderly people and is linked with many ARDs (Bielak-Zmijewska et al., 2014). In the body ageing process, accumulation of damage in cells, decreased efficiency of cell repair systems and impaired removal of damaged cells result in accumulation of malfunctioning cells. These impaired cells worsen the functioning of neighboring tissues, increase inflammation, which promotes the ageing of the whole body (Bielak-Zmijewska et al., 2014).

Metformin is one of synthetic and natural compounds, investigated for their anti-senescence properties, in *in vitro* and animal models. As reviewed by Barzilai et al. (2012) and Gurau et al. (2018), metformin presents beneficial effects on a number of ageing-related processes such as inflammation, autophagy, cell viability, and protein synthesis. In addition, the drug modulates the expression of receptors for cytokines, insulin, and IGF-1, and promotes mTOR inhibition (Gurau et al., 2018).

Metformin was found to significantly attenuate vascular senescence and HFD (high fat diet) induced atherosclerosis in mouse model. Furthermore, metformin increased the expression level of superoxide dismutase-1 (SOD1) in aortas of mice, leading to a decreased level of ROS (Forouzandeh et al., 2014). In turn, Moiseeva et al. (2013) reported that metformin suppresses the expression of genes coding for multiple inflammatory cytokines during cellular ageing. The investigators observed that metformin was able to prevent the translocation of NF- κ B to the nucleus and stopped the phosphorylation of I κ B and IKK α / β , processes needed for activation of the NF- κ B pathway. These observations can explain the anti-ageing and anti-neoplastic effects of metformin. Metformin was also proposed to be a SASP (senescence-associated secretory phenotype) inhibiting molecule in senescent fibroblasts (Moiseeva et al., 2013; Sultuybek et al., 2019). Interestingly, metformin did not reduce the expression of anti-cancer cytokines (e.g. interferon) in senescent cells, implying that the drug modulates SASP by reducing its inflammatory potential but retaining its anti-cancer properties (Moiseeva et al., 2013). Noren Hooten et al. (2016) discovered that long-term treatment with metformin upregulated DICER1 and increased microRNA both in mice and humans with T2DM. In addition, the authors found that the drug reduced p16 and p21 protein levels and also other inflammatory oncogenes being the hallmarks of SASP. On the base of these results, the authors hypothesised that upregulation of DICER1 levels may become a new approach for ageing-related diseases (Noren Hooten et al., 2016). Metformin up-regulated the expression of microRNAs in human pancreatic, prostate, lung cancer cells (Li et al., 2012a; Avci et al., 2013; Dong et al., 2020) and also in endometrial epithelial cells of patients with PCOS (Zhai et al., 2019) in a dose-dependent manner.

Anti-ageing effects of metformin cannot be discussed without describing its effects on SIRT1. SIRT are a group of proteins which have nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺)-dependent deacetylase activity or ADP-ribosyltransferase activity. The sirtuin family is responsible for supporting mammalian health, regulating various cell functions, perhaps modulating the ageing process including extension of viability and forming responses to stressors. In mammals, there are seven sirtuin homologues of which SIRT1 is the most comprehensively examined for its significance in the vascular ageing process (Kida and Goligorsky, 2016). The mechanism of SIRT1 action is linked with deacetylation of transcription factors (such as FOXO1, 3 and 4, p53, NF- κ B, PGC-1 and HSF-1), histones and DNA repair proteins (Giblin et al., 2014). Metformin was found to act agonistically on SIRT1 by improving its catalytic efficacy (Cuyàs et al., 2018). Importantly, improvement in SIRT1 activity protects cells against apoptotic death by induction of p65 deacetylation, which provokes the inhibition of NF- κ B factor (Lee et al., 2009).

6. Does metformin meet all CRITERIA for a Geroprotector?

The scientific area of discovery of geroprotectors is a very dynamic discipline. Currently, there is approximately 200 substances which possess anti-ageing properties, including slowing ageing or increasing lifespan in a variety of organisms (e.g. yeasts, nematodes or rodents) (Geroprotectors.org database) (Moskalev et al., 2015). In the previous chapters, we presented the multidirectional action of metformin in preserving youth. However, one should approach this topic critically and consider whether metformin meets all the most important criteria that are the basis to become a geroprotector.

Nowadays, there is no single definition of geroprotectors in the scientific literature (Moskalev et al., 2016). Another important issue are the differences in the study protocols, including methodology, research methods or model organisms and genetic background within species which impede to compare the results and make conclusions. For this reason Moskalev et al. (2016) introduced the concept of geroprotector and developed the criteria for classifying a substance as a geroprotector. In general, a certain substance is regarded as geroprotector when it increases lifespan (Moskalev et al., 2016). The criteria for being a geroprotector have been divided into primary and secondary groups. Increased lifespan, amelioration of ageing biomarkers, acceptable toxicity, and improving health-related quality of life are listed in the first group. Secondary selection criteria are as follows, evolutionary conservatism of target or mechanism of action, reproducibility of geroprotective effects on different model organisms, increase in stress resistance, and simultaneous influence on several ageing-associated causes of death in mammals (Moskalev et al., 2016). In the case of metformin, these criteria are not always met. Although some studies report increase in longevity in several model organisms: *C. elegans* (Cabreiro et al., 2013), *D. melanogaster* (Slack et al., 2012), and *M. musculus* (Martin-Montalvo et al., 2013), there are also reports showing no effect of metformin in rats with normal genetics (Smith et al., 2010). Importantly, metformin is regarded as a safe drug with acceptable acute toxicity – mouse LD₅₀ oral 1450 mg/kg (Tomasulo, 2002), and is well tolerated (Giugliano et al., 1993). The effects of metformin on mice lifespan depend on its dose since it was found that smaller doses of the drug (0.1 % w/w in diet) slightly prolonged the lifespan by 5.83 %, but higher doses (1% w/w) led to the shortening of mice lifespan due to renal dysfunction (-14.4 %) (Martin-Montalvo et al., 2013). Toxic effects of metformin given at 1% (w/w) were also confirmed in 2-year-old mice (Alfaras et al., 2017). The authors examined the effects of 1% metformin given according to the different regimens, every-other week (EOW) or two consecutive weeks per month (2WM) on the survival of mice. During the first few weeks a decrease in body weight was observed; however, the lifespan of mice in both groups (EOW and 2WM) was comparable with non-treated animals. The differences in the action of metformin on metabolic markers between the

EOW and 2WM groups, with EOW metformin conferring greater benefits were found. It was concluded that the absence of adverse outcomes associated with chronic, intermittent use of 1% metformin in old mice has clinical translatability into the biology of ageing in humans (Alfaras et al., 2017). Rarely occurring but serious adverse effects include lactic acidosis, respiratory disease (due to inadequate oxygenation of tissues), and impaired renal function (Moskalev et al., 2016). According to Espada et al. (2019) the pro-longevity effects of metformin depend also on the time of metformin supplementation since the investigators found that late life metformin treatment limits cell survival and shortens lifespan of *C. elegans* by triggering an aging-associated failure of energy metabolism. In addition to above-mentioned data, metformin was found to not slow down the epigenetic clock (Quach et al., 2017). It was also found that metformin negatively affects the hypertrophic response to resistance training in healthy older subjects (Walton et al., 2019). Metformin was also reported to inhibit mitochondrial adaptation to aerobic exercise in the elderly (Konopka et al., 2019). Thus, it implies that prior to prescribing metformin as an anti-ageing agent, additional studies are required to understand the mechanisms that elicit positive and negative responses to metformin with and without exercise (Konopka et al., 2019). Among unfavourable effects associated with long-term metformin administration are those related with decreased level of vitamin B₆, B₁₂ and folate in the body, which can cause anemia, homocysteinemia (increased risk of atherosclerosis), neuropathy, impaired memory or even cognitive dysfunctions (Aroda et al., 2016; Glossmann and Lutz, 2019; Roy et al., 2016).

To summarize, the beneficial effects of metformin on lifespan in humans were reported mainly on people with specific diseases, including T2DM or hypertension. However, those favourable effects were not confirmed in healthy subjects since the causes of reduced mortality in sick people do not necessarily slow down the ageing of healthy individuals. Similar comparison can be done with relation to age because most of the available studies were conducted in elderly patients but we still lack the knowledge how metformin acts in young people.

7. Concluding remarks

In summary, metformin is a safe and effective drug for treatment of T2DM. It targets multiple mechanisms involved in senescence at the molecular level. Numerous cellular studies have revealed that metformin exerts anti-oxidative effects, reduces inflammatory markers, suppresses NF- κ B, and mTOR signalling pathways, and thus reduces DNA damage. Importantly, mounting evidence in preclinical invertebrate and vertebrate models suggests advantageous contribution of the drug to lifespan extension and reduction of the risk of ageing-related diseases, including cancer and neurodegeneration. These valuable properties of metformin attracted scientists' and clinicians' attention who perceive metformin as a promising geroprotector in humans.

A lot of human studies indicate that individuals using metformin demonstrate a decreased risk of developing any cancer compared with the general population. In addition, metformin-users have a lower probability of developing colorectal, breast or lung cancer compared with T2DM subjects who have been administered non-metformin therapies. However, not all clinical studies report beneficial effects of metformin regarding the incidence of cancer. Therefore, the currently available data is not sufficient to support the direct anti-cancer properties of metformin. Hopefully, ongoing trials, determining the long-term treatment with metformin as a therapy in prostate, colorectal or pancreatic cancer, will help to elucidate the potential of metformin as an anti-cancer drug. As far as we are concerned, the valuable influence of metformin on the prevalence of cancer might be evident over a longer period of time or in more specific treatment groups, including insulin users. Certainly, continuous progress in discovering molecular targets of metformin action will help to understand and continue research on antitumor activity of the drug.

Currently ongoing clinical trials aim to determine effects of

monotherapy of metformin or in combination with lifestyle changes on clinical and molecular hallmarks of ageing. For instance, NCT03451006 trial aims to check whether metformin can improve longevity of the cell, reduce ageing-related biochemical parameters and thereby strengthen physical performance, measured by the short physical performance battery test. In turn, the aim of NCT03713801 is to see whether metformin can boost the immune response to the pneumococcal conjugate vaccine (PCV-13) in older adults, and if this effect is mediated by microbiome. While writing this paper, at the beginning of May 2020, the register of clinical trials (www.clinicaltrials.gov) includes six recruiting clinical studies which aim at determining effects of metformin on ageing.

Bearing in mind both the promising results of clinical studies, and neutral or ambiguous data regarding metformin anti-cancer effects, we strongly believe that current clinical studies, including TAME, could provide more accurate information on metformin potential as an anti-ageing agent. Definite data is needed to confirm the role of metformin as a geroprotector.

Acknowledgements

The current review was financially supported by Medical University of Lodz (grant number 503/3-015-01/503-31-001-19-00), and National Science Centre in Poland (grant number 2016/21/D/NZ7/01548).

References

- Adela, R., Banerjee, S.K., 2015. GDF15 as a target and biomarker for diabetes and cardiovascular diseases: a translational prospective. *J. Diabetes Res.* 2015, 490842 <https://doi.org/10.1155/2015/490842>.
- Al Hilli, M.M., Bakkum-Gomez, J.N., Mariani, A., Cliby, W.A., Mc Gree, M.E., Weaver, A.L., Dowdy, S.C., Podratz, K.C., 2016. The effect of diabetes and metformin on clinical outcomes is negligible in risk adjusted endometrial cancer cohorts. *Gynecol. Oncol.* 140, 270–276. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2015.11.019>.
- Al-Dwairi, A., Alqudah, M., Al-Shoub, O., Alfaqih, M., Alomari, D., 2018. Metformin exerts anti-inflammatory effects on mouse colon smooth muscle cells in vitro. *Exp. Ther. Med.* 16, 985–992. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6222>.
- Alfaras, I., Mitchell, S.J., Mora, H., Lugo, D.R., Warren, A., Navas Enamorado, I., Hoffmann, V., Hine, C., Mitchell, J.R., Le Couteur, D.G., Cogger, V.C., Bernier, M., de Cabo, R., 2017. Health benefits of late-onset metformin treatment every other week in mice. *Ageing and Mechanisms of Disease*, 3, 16. <https://doi.org/10.1038/s41514-017-0018-7>.
- Algire, C., Zakikhani, M., Blouin, M.J., Shuai, J.H., Pollak, M., 2008. Metformin attenuates the stimulatory effect of a high-energy diet on in vivo LLC1 carcinoma growth. *Endocr. Relat. Cancer* 15, 833–839. <https://doi.org/10.1677/ERC-08-0038>.
- Algire, C., Amrein, L., Zakikhani, M., Panasci, L., Pollak, M., 2010. Metformin blocks the stimulatory effect of a high-energy diet on colon carcinoma growth in vivo and is associated with reduced expression of fatty acid synthase. *Endocr. Relat. Cancer* 17, 351–360. <https://doi.org/10.1677/ERC-09-0252>.
- An, H., Wei, R., Ke, J., Yang, J., Liu, Y., Wang, X., Wang, G., Hong, T., 2016. Metformin attenuates fluctuating glucose-induced endothelial dysfunction through enhancing GTPCH1 mediated eNOS recycling and inhibiting NADPH oxidase. *J. Diabetes Complicat.* 30, 1017–1024. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2016.04.018>.
- Andrzejewski, S., Gravel, S.P., Pollak, M., St Pierre, J., 2014. Metformin directly acts on mitochondria to alter cellular bioenergetics. *Cancer Metab.* 2, 12. <https://doi.org/10.1186/2049-3002-2-12>.
- Anisimov, V.N., Berstein, L.M., Egormin, P.A., Piskunova, T.S., Popovich, I.G., Zabezhinski, M.A., Kovalenko, I.G., Poroshina, T.E., Semchenko, A.V., Provinciani, M., Re, F., Franceschi, C., 2005. Effect of metformin on life span and on the development of spontaneous mammary tumors in HER2/neu transgenic mice. *Exp. Gerontol.* 40, 685–693. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.07.007>.
- Anisimov, V.N., Berstein, L.M., Egormin, P.A., Piskunova, T.S., Popovich, I.G., Zabezhinski, M.A., Tyndyk, M.L., Yurova, M.V., Kovalenko, I.G., Poroshina, T.E., Semchenko, A.V., 2008. Metformin slows down aging and extends life span of female SHR mice. *Cell Cycle* 7, 2769–2773. <https://doi.org/10.4161/cc.7.17.6625>.
- Anisimov, V.N., Egormin, P.A., Piskunova, T.S., Popovich, I.G., Tyndyk, M.L., Yurova, M.N., Zabezhinski, M.A., Anikin, I.V., Karkach, A.S., Romanyukha, A.A., 2010a. Metformin extends life span of HER2/neu transgenic mice and in combination with melatonin inhibits growth of transplantable tumors in vivo. *Cell Cycle* 9, 188–197. <https://doi.org/10.4161/cc.9.1.10407>.
- Anisimov, V.N., Piskunova, T.S., Popovich, I.G., Zabezhinski, M.A., Tyndyk, M.L., Egormin, P.A., Yurova, M.V., Rosenfeld, S.V., Semchenko, A.V., Kovalenko, I.G., Poroshina, T.E., Berstein, L.M., 2010b. Gender differences in metformin effect on aging, life span and spontaneous tumorigenesis in 129/Sv mice. *Ageing (Albany NY)* 2, 945–958. <https://doi.org/10.18632/aging.100245>.
- Anisimov, V.N., Berstein, L.M., Popovich, I.G., Zabezhinski, M.A., Egormin, P.A., Piskunova, T.S., Semchenko, A.V., Tyndyk, M.L., Yurova, M.N., Kovalenko, I.G., Poroshina, T.E., 2011. If started early in life, metformin treatment increases life span and postpones tumors in female SHR mice. *Ageing* 3, 148–157. <https://doi.org/10.18632/aging.100273>.
- Anisimov, V.N., Popovich, I.G., Zabezhinski, M.A., Egormin, P.A., Yurova, M.N., Semchenko, A.V., Tyndyk, M.L., Panchenko, A.V., Trashkov, A.P., Vasiliev, A.G., Khatisev, N.V., 2015. Sex differences in aging, life span and spontaneous tumorigenesis in 129/Sv mice neonatally exposed to metformin. *Cell Cycle* 14, 46–55. <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.973308>.
- Aroda, V.R., Edelstein, S.L., Goldberg, R.B., Knowler, W.C., Marcovina, S.M., Orchard, T.J., Bray, G.A., Schade, D.S., Tempresa, M.G., White, N.H., Crandall, J.P., the Diabetes Prevention Program Research Group, 2016. Long term metformin use and vitamin B12 deficiency in the diabetes prevention program outcomes study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101, 1754–1761. <https://doi.org/10.1210/je.2015-3754>.
- Asadbegi, M., Yaghmaei, P., Salehi, I., Ebrahim-Habibi, A., Komaki, A., 2016. Neuroprotective effects of metformin against A β -mediated inhibition of long term potentiation in rats fed a high fat diet. *Brain Res. Bull.* 121, 178–185. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.02.005>.
- Avci, C.B., Harman, E., Dodurga, Y., Sussner, S.Y., Gunduz, C., 2013. Therapeutic potential of an anti-diabetic drug, metformin: alteration of miRNA expression in prostate cancer cells. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 14, 765–768. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2013.14.2.765>.
- Bahne, E., Sun, E.W.L., Young, R.L., Hansen, M., Sonne, D.P., Hansen, J.S., Rohde, U., Liou, A.P., Jackson, M.L., de Fontgalland, D., Rabbitt, P., Hollington, P., Sposato, L., Due, S., Wattchow, D.A., Reifeld, J.F., Holst, J.J., Keating, D.J., Vilsbøll, T., Knop, F.K., 2018. Metformin-induced glucagon-like peptide-1 secretion contributes to the actions of metformin in type 2 diabetes. *JCI Insight* 3, e93936. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.93936>.
- Bahrnabeghi, S., Yousefi, B., Rahimi, M., Shafiei-Irannejad, V., 2005. Metformin: an old antidiabetic drug with new potentials in bone disorders. *Biomed. Pharmacother.* 109, 1593–1601. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.032>.
- Bailey, C.J., 2017. Metformin: historical overview. *Diabetologia*, 60, 1566–1576. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4318-z>.
- Bannister, C.A., Holden, S.E., Jenkins-Jones, S., Morgan, C.L., Halcox, J.P., Scherthaner, G., Mukherjee, J., Currie, C.J., 2014. Can people with type 2 diabetes live longer than those without? A comparison of mortality in people initiated with metformin or sulphonylurea monotherapy and matched, non-diabetic controls. *Diabetes Obes. Metab.* 16, 1165–1173. <https://doi.org/10.1111/dom.12354>.
- Barbieri, F., Würth, R., Pattarozzi, A., Verduci, I., Mazzaola, C., Cattaneo, M.G., Tonelli, M., Solari, A., Bajetto, A., Daga, A., Vicentini, L.M., Mazzanti, M., Florio, T., 2018. Inhibition of chloride intracellular channel 1 (CLIC1) as biguanide class-effect to impair human glioblastoma stem cell viability. *Front. Pharmacol.* 9, 899. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00899>.
- Bárceña, C., Mayoral, P., Quirós, P.M., 2018. Chapter two – mitohormesis, an antiaging paradigm. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 340, 35–77. <https://doi.org/10.1016/bs.icrmb.2018.05.002>.
- BARI 2D Study Group, Frye, R.L., August, P., Brooks, M.M., Hardison, R.M., Kelsey, S.F., MacGregor, J.M., Orchard, T.J., Chaitman, B.R., Genuth, S.M., Goldberg, S.H., Hlatky, M.A., Jones, T.L.Z., Molitch, M.E., Nesto, R.W., Sako, E.Y., Sobel, B.E., 2009. A randomized trial of therapies for type 2 diabetes and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 360, 2503–2515. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0805796>.
- Barzilai, N., Huffman, D.M., Muzumdar, R.H., Barke, A., 2012. The critical role of metabolic pathways in aging. *Diabetes* 61, 1315–1322. <https://doi.org/10.2337/db111300>.
- Barzilai, N., Crandall, J.P., Kritchevsky, S.B., Espeland, M.A., 2016. Metformin as a tool to target aging. *Cell Metab.* 23, 1060–1065. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.05.011>.
- Batcuhnum, B., Inoguchi, T., Sonoda, N., Sasaki, S., Inoue, T., Fujimura, Y., Minra, D., Takayanagi, R., 2014. Metformin and liraglutide ameliorate high glucose induced oxidative stress via inhibition of PKC/NAD(P)H oxidase pathway in human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis* 232, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.10.025>.
- Beard, J.R., Bloom, D.E., 2015. Towards a comprehensive public health response to population ageing. *Lancet* 385, 658–661. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61461-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61461-6).
- Becker, C., Jick, S.S., Meier, C.R., Bodmer, M., 2013. Metformin and the risk of endometrial cancer: a case-control analysis. *Gynecol. Oncol.* 129, 565–569. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2013.03.009>.
- Bérard, E., Bongard, V., Dallongeville, J., Arveiler, D., Cottel, D., Wagner, A., Ruidavets, J.B., Ferrières, J., 2014. 14-year risk of all-cause mortality according to hypoglycemic drug exposure in a general population. *PLoS One* 9, e95671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095671>.
- Bhalla, K., Hwang, B.J., Dewi, R.E., Twaddell, W., Goloubeva, O.G., Wong, K.K., Saxena, N.K., Biswal, S., Girmun, G.D., 2012. Metformin prevents liver tumorigenesis by inhibiting pathways driving hepatic lipogenesis. *Cancer Prev. Res. Phila. (Phila)* 5, 544–552. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CCR11-0228>.
- Bielak-Zuniewska, A., Grabowska, W., Przybylska, D., 2014. Rola starzenia komórkowego w starzeniu organizmu i chorobach związanych z wiekiem. *Postępy Biochemii* 60.
- Birsosy, K., Possemato, R., Lorbeer, F.K., Bayraktar, E.C., Thiru, P., Yucel, B., Wang, T., Chen, W.W., Clish, C.B., Sabatini, D.M., 2014. Metabolic determinants of cancer cell sensitivity to glucose limitation and biguanides. *Nature* 508, 108–112. <https://doi.org/10.1038/nature13110>.
- Bo, S., Ciccone, G., Rosato, R., Villosio, P., Appendino, G., Ghigo, E., Grassi, G., 2012. Cancer mortality reduction and metformin: a retrospective cohort study in type 2 diabetic patients. *Diabetes Obes. Metab.* 14, 23–29. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2011.01480.x>.

- Bodmer, M., Meier, C., Krähenbühl, S., Jick, S.S., Meier, C.R., 2010. Long term metformin use is associated with decreased risk of breast cancer. *Diabetes Care* 33, 1304–1308. <https://doi.org/10.2337/dc09-1791>.
- Bodmer, M., Becker, C., Meier, C., Jick, S.S., Meier, C.R., 2012. Use of antidiabetic agents and the risk of pancreatic cancer: a case control analysis. *Am. J. Gastroenterol.* 107, 620–626. <https://doi.org/10.1038/sjg.2011.483>.
- Bonanni, B., Puntoni, M., Cazzaniga, M., Pruneri, G., Serrano, D., Guerrieri-Gonzaga, A., Gemari, A., Trabacca, M.S., Galimberti, V., Veronesi, P., Johansson, H., Aristarco, V., Bassi, F., Luini, A., Lazzeroni, M., Varricchio, C., Viale, G., Bruzzi, P., Decensi, A., 2012. Dual effect of metformin on breast cancer proliferation in a randomized presurgical trial. *J. Clin. Oncol.* 30, 2593–2600. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.39.3769>.
- Bonnefont-Rousselot, D., Rajji, B., Walrand, S., Gardes-Albert, M., Jore, D., Legrand, A., Peynet, J., Vasson, M.P., 2003. An intracellular modulation of free radical production could contribute to the beneficial effects of metformin towards oxidative stress. *Metabolism* 5, 586–589. <https://doi.org/10.1053/meta.2003.50093>.
- Bridges, H.R., Jones, A.J.Y., Pollak, M.N., Hirst, J., 2014. Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria. *Biochem. J.* 462, 475–487. <https://doi.org/10.1042/BJ20140620>.
- Bryrup, T., Thomsen, C.V., Kern, T., Allin, K.H., Brandslund, L., Jørgensen, N.R., Vestergaard, H., Hansen, T., Hansen, T.H., Pedersen, O., Nielsen, T., 2019. Metformin-induced changes of the gut microbiota in healthy young men: results of a non-blinded, one-armed intervention study. *Diabetologia* 62, 1024–1035. <https://doi.org/10.1007/s00125-019-4888-7>.
- Buse, J.B., DeFronzo, R.A., Rosestock, J., Kim, T., Burns, C., Skare, S., Baron, A., Fineman, M., 2016. The primary glucose-lowering effect of metformin resides in the gut, not the circulation: results from short-term pharmacokinetic and 12-Week dose-ranging studies. *Diabetes Care* 39, 198–205. <https://doi.org/10.2337/DC15-0488>.
- Buzzai, M., Jones, R.G., Amaravadi, R.K., Lum, J.J., DeBerardinis, R.J., Zhao, F., Viollet, B., Thompson, C.B., 2007. Systemic treatment with the antidiabetic drug metformin selectively impairs p53-deficient tumor cell growth. *Cancer Res.* 67, 6745–6752. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4447>.
- Cabo, R., 2013. Metformin improves healthspan and lifespan in mice. *Nat. Commun.* 4, 2192. <https://doi.org/10.1038/ncomms3192>.
- Cabreiro, F., Au, C., Leung, K.Y., Vergara-Irigaray, N., Cochemé, H.M., Noori, T., Weinkove, D., Schuster, E., Greene, N.D.E., Gens, D., 2013. Metformin retards aging in *C. Elegans* by altering microbial folate and methionine metabolism. *Cell.* 153, 228–239. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.035>.
- Cagnin, A., Gerhard, A., Banati, R.B., 2002. In vivo imaging of neuroinflammation. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 12, 581–586. [https://doi.org/10.1016/S0924-977X\(02\)00107-4](https://doi.org/10.1016/S0924-977X(02)00107-4).
- Cameron, A.R., Morrison, V.L., Levin, D., Mohan, M., Fortea, C., Beall, C., McNeilly, A. D., Balfour, D.J.K., Savinko, T., Wong, A.K.F., Viollet, B., Sakamoto, K., Fagerholm, S.C., Foretz, M., Lang, C.C., Rena, G., 2016. Anti-inflammatory effects of metformin irrespective of diabetes status. *Circ. Res.* 119, 652–665. <https://doi.org/10.1161/ATCRRESAHA.116.308445>.
- Campbell, J.M., Bellman, S.M., Stephenson, M.D., Lisy, K., 2017. Metformin reduces all-cause mortality and diseases of ageing independent of its effect on diabetes control: a systematic review and meta-analysis. *Ageing Res. Rev.* 40, 31–44. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.08.003>.
- Cao, J., Meng, S., Chang, E., Beckwith Fickas, K., Xiong, L., Cole, R.N., Radovick, S., Wondolford, F.E., He, L., 2014. Low concentrations of metformin suppress glucose production in hepatocytes through AMP-activated protein kinase (AMPK). *J. Biol. Chem.* 289, 20435–20446. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.567271>. <https://www.census.gov/content/dam/Census/library/publications/2018/acs/ACS-38.pdf>.
- Chang, H.H., Moro, A., Chou, C.E.N., Dawson, D.W., French, S., Schmidt, A.I., Sinnott-Smith, J., Hao, F., Hines, O., Eibl, G., Rozenfurt, E., 2018. Metformin decreases the incidence of pancreatic ductal adenocarcinoma promoted by diet induced obesity in the conditional KrasG12D mouse model. *Sci. Rep.* 8, 5899. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24337-8>.
- Chen, Y., Zhou, K., Wang, R., Liu, Y., Kwak, Y.D., Ma, T., Thompson, R.C., Zhao, Y., Smith, L., Gasparini, L., Luo, Z., Xu, H., Liao, F.F., 2009. Antidiabetic drug metformin (Glucophage®) increases biogenesis of Alzheimer's amyloid peptides via up-regulating BACE1 transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 3907–3912. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807991106>.
- Chen, F., Dong, R.R., Zhong, K.L., Ghosh, A., Tang, S.S., Long, Y., Hu, M., Miao, M.X., Liao, J.M., Sun, H.B., Kong, L.Y., Hong, H., 2016. Antidiabetic drugs restore abnormal transport of amyloid- β across the blood-brain barrier and memory impairment in db/db mice. *Neuropharmacology.* 101, 123–136. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.07.023>.
- Chen, J., Ou, Y., Li, Y., Hu, S., Shao, L.W., Liu, Y., 2017. Metformin extends *C. Elegans* lifespan through lysosomal pathway. *eLife* 6, e31268. <https://doi.org/10.7554/eLife.31268.001>.
- Cheng, G., Lanza-Jacoby, S., 2015. Metformin decreases growth of pancreatic cancer cells by decreasing reactive oxygen species: role of NOX4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 465, 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.07.118>.
- Cheng, C., Lin, C.H., Tsai, Y.W., Tsai, C.J., Chou, P.H., Lan, T.H., 2014. Type 2 diabetes and antidiabetic medications in relation to dementia diagnosis. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 69, 1299–1305.
- Cho, J., Scragg, R., Pandol, S.J., Goodarzi, M.O., Petrov, M.S., 2019. Antidiabetic medications and mortality risk in individuals with pancreatic cancer related diabetes and postpancreatitis diabetes: a nationwide cohort study. *Diabetes Care* 42, 1675–1683. <https://doi.org/10.2337/dc19-0145>.
- Claesen, M., Gillard, P., De Smet, F., Callens, M., De Moor, B., Mathieu, C., 2016. Mortality in individuals treated with glucose-lowering agents: a large, controlled cohort study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101, 461–469. <https://doi.org/10.1210/je.2015-3184>.
- Col, N.F., Ochs, L., Springmann, V., Aragaki, A.K., Chlebowski, R.T., 2012. Metformin and breast cancer risk: a meta-analysis and critical literature review. *Breast Cancer Res. Treat.* 135, 639–646. <https://doi.org/10.1007/s10549-012-2170-x>.
- Cuyàs, E., Verdura, S., Llorach Parés, L., Fernández-Arroyo, S., Joven, J., Martín-Castillo, B., Bosch-Barrera, J., Brunet, J., Nonell-Canals, A., Sánchez-Martínez, M., Menéndez, J., 2018. Metformin is a direct SIRT1-activating compound: computational modeling and experimental validation. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 9, 657. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00657>.
- Dai, J., Liu, M., Ai, Q., Lin, L., Wu, K., Deng, X., Jing, Y., Jia, M., Wan, J., Zhang, L., 2014. Involvement of catalase in the protective benefits of metformin in mice with oxidative liver injury. *Chemico-Biol. Interact.* 216, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.03.013>.
- De Haes, W., Froninckx, L., Van Assche, R., Smolders, A., Depuydt, G., Billen, J., Braeckman, B.P., Schoofs, L., Temmerman, L., 2014. Metformin promotes lifespan through mitohormesis via the peroxiredoxin PRDX 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, E2501–E2509. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321776111>.
- De Santi, M., Baldelli, G., Diotallevi, A., Galluzzi, L., Schiavano, G.F., Brandi, G., 2019. Metformin prevents cell tumorigenesis through autophagy-related cell death. *Sci. Rep.* 9, 66. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37247-6>.
- DeFronzo, R.A., Buse, J.B., Kim, T., Burns, C., Skare, S., Baron, A., Fineman, M., 2016. Once-daily delayed-release metformin lowers plasma glucose and enhances fasting and postprandial GLP-1 and PYY: results from two randomised trials. *Diabetologia* 59, 1645–1654. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-3992-6>.
- Dong, L., Zhou, Q., Zhang, Z., Zhu, Y., Duan, T., Peng, Y., 2012. Metformin sensitizes endometrial cancer cells to chemotherapy by repressing glyoxalase I expression. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 38, 1077–1085. <https://doi.org/10.1111/j.1447-0756.2011.01839.x>.
- Dong, J., Peng, H., Yang, X., Wu, W., Zhao, Y., Chen, D., Chen, L., Liu, J., 2020. Metformin mediated microRNA-7 upregulation inhibits growth, migration, and invasion of non-small cell lung cancer A549 cells. *Anticancer Drugs* 31, 345–352. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000875>.
- Ekström, N., Schiöler, L., Svensson, A.M., Eeg-Olofsson, K., Jonasson, J.M., Zethelius, B., Cederholm, J., Eliasson, B., Gudbjörnsdóttir, S., 2012. Effectiveness and safety of metformin in 51 675 patients with type 2 diabetes and different levels of renal function: a cohort study from the Swedish National Diabetes Register. *BMJ Open* 2, e001076. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2012-001076>.
- El-Mir, M.Y., Nogueira, V., Fontaine, E., Averet, 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.1.223>.
- El-Mir, M.Y., Detaille, D., R-Villanueva, G., Delgado-Esteban, M., Guigas, B., Attia, S., Fontaine, E., Almeida, A., Leverve, X., 2008. Neuroprotective role of anti-diabetic drug metformin against apoptotic cell death in primary cortical neurons. *J. Mol. Neurosci.* 34, 77–87. <https://doi.org/10.1007/s12031-007-9002-1>.
- Espada, L., Dakhovnik, A., Chaudhari, P., Martirosyan, A., Miek, L., Poliezhaeva, T., Schaub, Y., Nair, A., Döring, N., Rahms, N., Werz, O., Koerber, A., Kirkpatrick, J., Ori, A., Ermolaeva, M.A., 2019. Late life metformin treatment limits cell survival and shortens lifespan by triggering an aging-associated failure of energy metabolism. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/863357>.
- España López, J., Alvarado Muñoz, J.F., Escobar-Arriaga, E., Ulla Aguirre, A., de Jesús Ibarra Sánchez, M., 2019. Metformin reverses mesenchymal phenotype of primary breast cancer cells through STAT3/NF- κ B pathways. *BMC Cancer* 19, 728. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5945-1>.
- Evans, J.M.M., Donnelly, L.A., Emshie Smith, A.M., Alessi, D.R., Morris, A.D., 2005. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ* 330, 1304–1305. <https://doi.org/10.1136/bmj.38415.708634.F7>.
- Evans, J.M.M., Ogston, S.A., Emshie-Smith, A., Morris, A.D., 2006. Risk of mortality and adverse cardiovascular outcomes in type 2 diabetes: a comparison of patients treated with sulfonylureas and metformin. *Diabetologia* 49, 930–936. <https://doi.org/10.1007/s00125-006-0176-9>.
- Febbraio, T., Lengyel, E., Romero, I.L., 2014. Old drug, new trick: repurposing metformin for gynecologic cancers? *Gynecol. Oncol.* 135, 614–621. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2014.10.011>.
- Floyd, J.S., Wiggins, K.L., Christiansen, M., Dublin, S., Longstreth, W.T., Smith, N.L., McKnight, B., Heckbert, S.R., Weiss, N.S., Psaty, B.M., 2016. Case-control study of oral glucose-lowering drugs in combination with long-acting insulin and their risks of incident myocardial infarction and incident stroke. *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.* 25, 151–160. <https://doi.org/10.1002/pds.3914>.
- Fontaine, E., 2014. Metformin and respiratory chain complex I: the last piece of the puzzle? *Biochem. J.* 463, e3–e5. <https://doi.org/10.1042/BJ20141020>.
- Foretz, M., Ibrard, S., Leclerc, J., Zarrinpashneh, E., Soty, M., Mithieux, G., Sakamoto, K., Andreelli, F., Viollet, B., 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. <https://doi.org/10.1172/JCI40671>.
- Foretz, M., Guigas, B., Bertrand, L., Pollak, M., Viollet, B., 2014. Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metab.* 20, 953–966. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.09.018>.
- Forouzanmehr, F., Salazar, G., Patrushev, N., Xiong, S., Hilenski, L., Fei, B., Alexander, R. W., 2014. Metformin beyond diabetes: pleiotropic benefits of metformin in attenuation of atherosclerosis. *J. Am. Heart Assoc.* 3, e001202. <https://doi.org/10.1161/JAHA.114.001202>.
- Forslund, K., Hildebrand, F., Nielsen, T., Falony, G., Le Chatelier, E., Sunagawa, S., Prifti, E., Vieira Silva, S., Gudmundsdóttir, V., Pedersen, H.K., Arumugam, M.,

- Kristiansen, K., Voigt, A.Y., Vestergaard, H., Herczeg, R., Costea, P.I., Kultima, J.R., Li, J., Jørgensen, T., Levenez, F., Dore, J., MetaHTT consortium, Nielsen, H.B., Brunak, S., Raes, J., Hansen, T., Wang, J., Ehrlich, S.D., Bork, P., Pedersen, O., 2015. Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature* 528, 262–266. <https://doi.org/10.1038/nature15766>.
- Franciosi, M., Lucisano, G., Lapice, E., Strippoli, G.F.M., Pellegrini, F., Nicolucci, 2013. A. Metformin therapy and risk of cancer in patients with type 2 diabetes: systematic review. *PLoS One* 8, e71583. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071583>.
- Funakoshi, M., Tsuda, M., Muramatsu, K., Hatsuda, H., Morishita, S., Aigaki, T., 2011. A gain of function screen identifies wdb and lkb1 as lifespan extending genes in *Drosophila*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 405, 667–672. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.01.090>.
- Garcia, D., Shaw, R.J., 2017. AMPK: mechanisms of cellular energy sensing and restoration of metabolic balance. *Mol. Cell* 66, 789–800. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.032>.
- Gerstein, H.C., Pare, G., Hess, S., Ford, R.J., Sjaarda, J., Raman, K., McQueen, M., Lee, S. F., Haanel, H., Steinberg, G.R., 2017. Growth differentiation factor 15 as a novel biomarker for metformin. *Diabetes Care* 40, 280–283. <https://doi.org/10.2337/dc16-1682>.
- Ghotbi, A.A., Køber, L., Finer, N., James, W.P.T., Sharma, A.M., Caterson, L., Coutinho, W., Van Gaal, L.F., Torp-Pedersen, C., Andersson, C., 2013. Association of hypoglycaemic treatment regimens with cardiovascular outcomes in overweight and obese subjects with type 2 diabetes: a substudy of the SCOUT trial. *Diabetes Care* 36, 3746–3753. <https://doi.org/10.2337/dc13-0027>.
- Giblin, W., Skinner, M.E., Lombard, D.B., 2014. Sirtuins: guardians of mammalian healthspan. *Trends Genet.* 30, 271–286. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.04.007>.
- Giles, E.D., Jindal, S., Wellberg, E.A., Schedin, T., Anderson, S.M., Thor, A.D., Edwards, D.P., MacLean, P.S., Schedin, P., 2018. Metformin inhibits stromal aromatase expression and tumor progression in a rodent model of postmenopausal breast cancer. *Breast Cancer Res.* 20, 50. <https://doi.org/10.1186/s13058-018-0974-2>.
- Giugliano, D., Quatraro, A., Consoli, G., Minei, A., Ceriello, A., De Rosa, N., D'Onofrio, F., 1993. Metformin for obese, insulin-treated diabetic patients: improvement in glycaemic control and reduction of metabolic risk factors. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 44, 107–112. <https://doi.org/10.1007/BF00315466>.
- Glossmann, H.H., Lutz, O.M.D., 2019. Metformin and aging: a review. *Gerontology* 65, 581–590. <https://doi.org/10.1159/000502257>.
- Goodwin, P.J., Stanbolic, V., Lemieux, J., Chen, B.E., Parulekar, W.R., Gelmon, K.A., Hershman, D.L., Hobday, T.J., Ligibel, J.A., Mayer, I.A., Pritchard, K.L., Whelan, T.J., Rastogi, P., Shepherd, L.E., 2011. Evaluation of metformin in early breast cancer: a modification of the traditional paradigm for clinical testing of anti-cancer agents. *Breast Cancer Res. Treat.* 126, 215–220. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-1224-1>.
- Goossens, M.E., Buntinx, F., Zeegers, M.P., Driessen, J.H.M., De Bruin, M.L., De Vries, F., 2015. Influence of metformin intake on the risk of bladder cancer in type 2 diabetes patients. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 80, 1464–1472. <https://doi.org/10.1111/bcp.12740>.
- Gotlieb, W.H., Saumet, J., Beauchamp, M.C., Gu, J., Lau, S., Pollak, M.N., Bruchim, I., 2008. In vitro metformin anti-neoplastic activity in epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 110, 246–250. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2008.04.008>.
- Graham, G.G., Punt, J., Arora, M., Day, R.O., Doogue, M.P., Duong, J.K., Furlong, T.J., Greenfield, J.R., Greenup, L.C., Kirkpatrick, C.M., Ray, J.E., Timmins, P., Williams, K.M., 2011. Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin. Pharmacokinet.* 50, 81–98. <https://doi.org/10.2165/11534750-000000000-00000>.
- Guo, M., Mi, Y., Jiang, Q.M., Xu, J.M., Tang, Y.Y., Tian, G., Wang, B., 2014. Metformin may produce antidepressant effects through improvement of cognitive function among depressed patients with Diabetes Mellitus. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. Suppl.* 41, 650–656. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12265>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.01.033>.
- Guriñ, F., Baldoni, S., Praticchizzo, F., Espinosa, E., Amenta, F., Procopio, A.D., Albertini, M.C., Bonafè, M., Olivieri, F., 2018. Anti-senescence compounds: a potential nutraceutical approach to healthy aging. *Ageing Res. Rev.* 46, 14–31. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.05.001>.
- Hadad, S., Iwamoto, T., Jordan, L., Purdie, C., Bray, S., Baker, L., Jellema, G., Deharo, S., Hardie, D.G., Puzstai, L., Moulder-Thompson, S., Dewar, J.A., Thompson, A.M., 2011. Evidence for biological effects of metformin in operable breast cancer: a pre-operative, window-of-opportunity, randomized trial. *Breast Cancer Res. Treat.* 128, 783–794. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1612-1>.
- Han, J., Li, Y., Liu, X., Zhou, T., Sun, H., Edwards, P., Gao, H., Yu, F.S., Qiao, X., 2018. Metformin suppresses retinal angiogenesis and inflammation in vitro and in vivo. *PLoS One* 13, e0193031. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193031>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2012.01.009>.
- Hardie, D.G., Ross, F.A., Hawley, S.A., 2012. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 251–262. <https://doi.org/10.1038/nrm3311>.
- Hartung, D.M., Touchette, D.R., Bultemeier, N.C., Haxby, D.G., 2005. Risk of hospitalization for heart failure associated with thiazolidinedione therapy: a medicare claims-based case-control study. *Pharmacotherapy* 25, 1329–1336. <https://doi.org/10.1592/phco.2005.25.10.1329>.
- Hattori, Y., Suzuki, K., Hattori, S., Kasai, K., 2006. Metformin inhibit cytokine-induced nuclear factor kappaB activation via AMP-activated protein kinase activation in vascular endothelial cells. *Hypertension* 47, 1183–1188. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000221429.94591.72>.
- He, K., Hu, H., Ye, S., Wang, H., Cui, R., Yi, L., 2019. The effect of metformin therapy on incidence and prognosis in prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* 9, 2218. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38285-w>.
- Herath, P.M., Cherbun, N., Eramudugolla, R., Anstey, K.J., 2016. The effect of diabetes medication on cognitive function: evidence from the PATH through life study. *Biomed Res. Int.* 2016, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2016/7208429>.
- Hettich, M.M., Mattes, F., Ryan, D.P., Griesche, N., Schröder, S., Dorn, S., Krauß, S., Ehninger, D., 2014. The anti-diabetic drug metformin reduces BACE1 protein level by interfering with the MID1 Complex. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102420>.
- Hirsch, H.A., Iliopoulos, D., Struhl, K., 2013. Metformin inhibits the inflammatory response associated with cellular transformation and cancerstem cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 972–977. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221055110>.
- Hong, J., Zhang, Y., Lai, S., Lv, A., Su, Q., Dong, Y., Zhou, Z., Tang, W., Zhao, J., Cui, L., Zhou, D., Wang, D., Li, H., Liu, C., Wu, G., Shen, J., Zhu, D., Wang, W., Shen, W., Ning, G., 2013. Effects of metformin versus glipizide on cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease. *Diabetes Care* 36, 1304–1311. <https://doi.org/10.2337/dc12-0719>.
- Hooten, N.N., Martin-Montalvo, A., Dhruv, D.F., Zhang, Y., Bernier, M., Zonderman, A. B., Becker, K.G., Gorospe, M., De Cabo, R., Evans, M.K., 2016. Metformin-mediated increase in DICER1 regulates microRNA expression and cellular senescence. *Aging Cell* 15, 572–581. <https://doi.org/10.1111/acel.12469>.
- Hu, J., Chen, J.B., Cui, Y., Zhu, Y.W., Ren, W.B., Zhou, X., Liu, L.F., Chen, H.Q., Zu, X.B., 2018. Association of metformin intake with bladder cancer risk and oncologic outcomes in type 2 diabetes mellitus patients. A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 97, e11596. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000011596>.
- Hunter, R.W., Hughey, C.C., Lantier, L., Sundelin, E.L., Peggie, M., Zeqiraj, E., Sichei, F., Jessen, N., Wasserman, D.H., Sakamoto, K., 2018. Metformin reduces liver glucose production by inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase. *Nat. Med.* 24, 1395–1406. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0159-7>.
- Hur, K.Y., Lee, M.S., 2015. New mechanisms of metformin action: focusing on mitochondria and the gut. *J. Diabetes Investig.* 6, 600–609. <https://doi.org/10.1111/jdi.12328>.
- Hwang, A.L., Haynes, K., Hwang, W.T., Yang, Y.X., 2013. Metformin and survival in pancreatic cancer: a retrospective cohort study. *Pancreas* 42, 1054–1059. <https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e3182965a3c>.
- Iglesias, D.A., Yates, M.S., van der Hoeven, D., Rodkey, T.L., Zhang, Q., Co, N.N., Burzawa, J., Chigurupati, S., Celestino, J., Bowser, J., Broadus, R., Hancock, J.F., Schmandt, R., Lu, K.H., 2013. Another surprise from metformin: novel mechanism of action via K Ras influences endometrial cancer response to therapy. *Mol. Cancer Ther.* 12, 2847–2856. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0439>.
- Isoda, K., Young, J.L., Zirik, A., MacFarlane, L.A., Tsuboi, N., Gerdes, N., Schönbeck, U., Libby, P., 2006. Metformin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-kappaB in human vascular wall cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 611–617. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000201938.78044.75>.
- Jacob, L., Kostev, K., Rathmann, W., Kaldler, M., 2016. Impact of metformin on metastases in patients with breast cancer and type 2 diabetes. *J. Diabetes Complications* 30, 1056–1059. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2016.04.003>.
- Jansson, S.P.O., Svärdsudd, K., Andersson, D.K.G., 2014. Effects of fasting blood glucose levels and blood pressure and treatment of diabetes and hypertension on the incidence of cardiovascular disease: a study of 740 patients with incident type 2 diabetes with up to 30 years' follow up. *Diabet. Med.* 31, 1055–1063. <https://doi.org/10.1111/dme.12514>.
- 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. <https://doi.org/10.2337/diacare.25.12.2244>.
- Kahler, K.H., Rajan, M., Rhoads, G.G., Safford, M.M., Demissie, K., Lu, S.E., Pogach, L.M., 2007. Impact of oral antihyperglycemic therapy on all-cause mortality among patients with diabetes in the Veterans Health Administration. *Diabetes Care* 30, 1689–1693. <https://doi.org/10.2337/dc06-2272>.
- Kaneb, H.M., Sharp, P.S., Rahmani-Kondori, N., Wells, D.J., 2011. Metformin treatment has no beneficial effect in a dose response survival study in the SOD1G93A mouse model of ALS and is harmful in female mice. *PLoS One* 6, e24189. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024189>.
- Khallaghi, B., Safarian, F., Nasoohi, S., Ahmadiani, A., Dargahi, L., 2016. Metformin-induced protection against oxidative stress is associated with AKT/mTOR restoration in PC12 cells. *Life Sci.* 148, 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.02.024>.
- Kickstein, E., Krauss, S., Thornhill, P., Rutschow, D., Zeller, R., Sharkey, J., Willianson, R., Fuchs, M., Köhler, A., Glossmann, H., Schneider, R., Sutherland, C., Schweiger, S., 2010. Biguanide metformin acts on tau phosphorylation via mTOR/protein phosphatase 2A (PP2A) signalling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 21830–21835. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912793107>.
- Kida, Y., Golligorsky, M.S., 2016. Sirtuins, cell senescence, and vascular aging. *Can. J. Cardiol.* 32, 634–641. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2015.11.022>.
- Kim, J., You, Y.J., 2017. Regulation of organelle function by metformin. *RUBMB Life* 69, 459–469. <https://doi.org/10.1002/iub.1633>.
- Knowler, W.C., Diabetes Prevention Group, 2015. HbA1c as a predictor of diabetes and as an outcome in the diabetes prevention program: a randomized clinical trial. *Diabetes Care* 38, 51–58. <https://doi.org/10.2337/dc14-0886>.

- Knowler, W.C., Barrett-Connor, E., Fowler, S.E., Hamman, R.F., Lachin, J.M., Walker, E.A., Nathan, D.M., 2002. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N. Engl. J. Med.* 346, 393–403. <https://doi.org/10.1056/NEJMed012512>.
- Koh, S.J., Kim, J.M., Kim, L.K., Ko, S.H., Kim, J.S., 2014. Anti-inflammatory mechanism of metformin and its effects in intestinal inflammation and colitis-associated colon cancer. Anti-inflammatory mechanism of metformin and its effects in intestinal inflammation and colitis-associated colon cancer. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 29, 502–510. <https://doi.org/10.1111/jgh.12435>.
- Konopka, A.R., Laurin, J.L., Schoenberg, H.M., Reid, J.J., Castor, W.M., Wolff, C.A., Musci, R.V., Safairad, O.D., Linden, M.A., Biela, L.M., Bailey, S.M., Hamilton, K.L., Miller, B.F., 2019. Metformin inhibits mitochondrial adaptations to aerobic exercise training in older adults. *Aging Cell* 18, e12880. <https://doi.org/10.1111/acel.12880>.
- Kooy, A., de Jager, J., Leher, P., Bets, D., Wulflele, M.G., Donker, A.J.M., Stehouwer, C.D.A., 2009. Long term effects of metformin on metabolism and microvascular and macrovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Arch. Intern. Med.* 169, 616–625. <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2009.20>.
- Koro, C.E., Bowlin, J., Weiss, S.R., 2005. Antidiabetic therapy and the risk of heart failure in type 2 diabetic patients: an independent effect or confounding by indication. *Diabetologia* 48, 697–703. <https://doi.org/10.1007/s00125-005-0109-7>.
- Kulkarni, A.S., Brutsaert, E.F., Anghel, V., Zhang, K., Bloomgarden, N., Pollak, M., Mar, J.C., Hawkins, M., Crandall, J.P., Barzilay, N., 2018. Metformin regulates metabolic and nonmetabolic pathways in skeletal muscle and subcutaneous adipose tissues of older adults. *Aging Cell* 17, e12723. <https://doi.org/10.1111/acel.12723>.
- Lapierre, L.R., Hansen, M., 2012. Lessons from *C. elegans*: signaling pathways for longevity. *Trends Endocrinol. Metab.* 23, 637–644. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.07.007>.
- Lee, S.H., Min, K.J., 2013. Caloric restriction and its mimetics. *BMB Rep.* 46, 181–187. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2013.46.4.033>.
- Lee, J.H., Song, M.Y., Song, E.K., Kim, E.K., Moon, W.S., Han, M.K., Park, J.W., Kwon, K.B., Park, B.H., 2009. Overexpression of SIRT1 protects pancreatic β -cells against cytokine toxicity by suppressing the nuclear factor- κ B signaling pathway. *Diabetes* 58, 344–351. <https://doi.org/10.2337/db07-1795>.
- Lee, M.S., Hsu, C.C., Wahlqvist, M.L., Tsai, H.N., Chang, Y.H., Huang, Y.C., 2011. Type 2 diabetes increases and metformin reduces total, colorectal, liver and pancreatic cancer incidences in Taiwanese: a representative population prospective cohort study of 800,000 individuals. *BMC Cancer* 11, 20. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-20>.
- Lehtonen, S., 2019. SHIPping out diabetes Metformin, an old friend among new SHIP2 inhibitors. *Acta Physiol.* 24, e13349. <https://doi.org/10.1111/apha.13349>.
- Lengyel, E., Litchfield, L.M., Mitra, A.K., Nieman, K.M., Mukherjee, A., Zhang, Y., Johnson, A., Bradaric, M., Lee, W., Romero, L.L., 2014. Metformin inhibits ovarian cancer growth and increases sensitivity to paclitaxel in mouse models. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 212, 479. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2014.10.026> e1 479.e10.
- Lewis, C.P.H., van der Horst, I.C.C., 2014. Metformin for cardiovascular disease: promise still unproven. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2, 94–95. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(13\)70171-2](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(13)70171-2).
- Li, S.N., Wang, X., Zeng, Q.T., Feng, Y.B., Cheng, X., Mao, X.B., Wang, T.H., Deng, H.P., 2009. Metformin inhibits nuclear factor kappaB activation and decreases serum high sensitivity C reactive protein level in experimental atherosclerosis of rabbits. *Heart Vessels* 24, 446–453. <https://doi.org/10.1007/s00380-008-1137-7>.
- Li, W., Yuan, Y., Huang, L., Qiao, M., Zhang, Y., 2012a. Metformin alters the expression profiles of microRNAs in human pancreatic cancer cells. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 96, 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2011.12.028>.
- Li, J., Deng, J., Sheng, W., Zuo, Z., 2012b. Metformin attenuates Alzheimer's disease like neuropathology in obese, leptin resistant mice. *Pharmacol. Biochem. Beh.* 101, 564–574. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2012.03.002>.
- Li, Y., Hu, L., Xia, Q., Yuan, Y., Mi, Y., 2017. The impact of metformin use on survival in kidney cancer patients with diabetes: a meta-analysis. *Int. Urol. Nephrol.* 49, 975–981. <https://doi.org/10.1007/s11255-017-1548-4>.
- Lihn, A.S., Pedersen, S.B., Lund, S., Richelsen, B., 2008. The anti diabetic AMPK activator AICAR reduces IL 6 and IL 8 in human adipose tissue and skeletal muscle cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 292, 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.06.004>.
- Liu, H., Scholz, C., Zang, C., Scheife, J.H., Habel, P., Regierer, A.C., Schulz, C.O., Possinger, K., Encker, J., 2012. Metformin and the mTOR inhibitor everolimus (RAD001) sensitize breast cancer cells to the cytotoxic effect of chemotherapeutic drugs in vitro. *Anticancer Res.* 32 (1627–), 1637.
- Liu, X., Zhao, Y., Zhang, E., Yan, H., Lv, N., Cai, Z., 2019. The synergistic effect of PFK15 with metformin exerts anti-melanoma activity via PFKFB3. *BiochemBiophys Res Commun.* 515, 332–338. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.05.136>.
- Lopez-Otin, C., Kroemer, G., 2019. Decelerating ageing and biological clocks by autophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 385–386. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0149-8>.
- Lu, Y., García Rodríguez, L.A., Malgerud, L., González-Pérez, A., Martín-Pérez, M., Lagergren, J., Bevilacqua, T.S., 2015. New-onset type 2 diabetes, elevated HbA1c, anti-diabetic medications, and risk of pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* 113, 1607–1614. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.353>.
- Luo, J., Beresford, S., Chen, C., Chlebowski, R., Garcia, L., Kuller, L., Regier, M., Wactawski-Wende, J., Margolis, K.L., 2014. Association between diabetes, diabetes treatment and risk of developing endometrial cancer. *Br. J. Cancer* 111, 1432–1439. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.407>.
- Luo, J., Mills, K., le Cessie, S., Noordam, R., van Heemst, D., 2020. Ageing, age-related diseases and oxidative stress: what to do next? *Ageing Res. Rev.* 57, 100982. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2019.100982>.
- Ma, T.C., Buescher, J.L., Oatis, B., Funk, J.A., Nash, A.J., Carrier, R.L., Hoyt, K.R., 2007. Metformin therapy in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neurosci. Lett.* 411, 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.10.039>.
- Ma, Y., Guo, F.C., Wang, W., Shi, H.S., Li, D., Wang, Y.S., 2013. K-ras gene mutation as a predictor of cancer cell responsiveness to metformin. *Mol. Med. Rep.* 8, 763–768. <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1596>.
- Ma, J., Yu, H., Liu, J., Chen, Y., Wang, Q., Xiang, L., 2015. Metformin attenuates hyperalgesia and allodynia in rats with painful diabetic neuropathy induced by streptozotocin. *Eur. J. Pharm.* 764, 599–606. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.06.010>.
- Ma, S., Zheng, Y., Xiao, Y., Zhou, P., Tan, H., 2017. Meta-analysis of studies using metformin as a reducer for liver cancer risk in diabetic patients. *Bull. Sch. Med. Md* 96, e6888. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000006888>.
- Madiraju, A.K., Erion, D.M., Rahimi, Y., Zhan, X.M., Braddock, D.T., Albrigh, R.A., Prigaro, B.J., Wood, J.L., Bhanot, S., MacDonald, M.J., Jurczak, M.J., Camporez, J.P., Lee, H.Y., Cline, G.W., Samuel, V.T., Kibbey, R.G., Shulman, G.I., 2014. Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature* 510, 542–546. <https://doi.org/10.1038/nature13270>.
- Mahmood, K., Nacem, M., Rahimajad, N.A., 2013. Metformin: the hidden chronicles of a magic drug. *Eur. J. Int. Med.* 24, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2012.10.011>.
- Mamtani, R., Pfanzeller, N., Haynes, K., Finkelstein, B.S., Wang, X., Keefe, S.M., Haas, N.B., Vaughn, D.J., Lewis, J.D., 2014. Incidence of bladder cancer in patients with type 2 diabetes treated with metformin or sulfonylureas. *Diabetes Care* 37, 1910–1917. <https://doi.org/10.2337/dc13-1489>.
- Markowicz-Piasecka, M., Sikora, J., Szydłowska, A., Skupień, A., Mikiciuk-Olasik, E., Huttunen, K.M., 2017. Metformin - a future therapy for neurodegenerative diseases: theme: drug discovery, development and delivery in Alzheimer's disease guest editor: davide Brambilla. *Pharm. Res.* 34, 2614–2627. <https://doi.org/10.1007/s11095-017-2199-y>.
- Markowicz-Piasecka, M., Huttunen, J., Sikora, J., Huttunen, K.M., 2019. Sulfenamide derivatives can improve transporter-mediated cellular uptake of metformin and induce cytotoxicity in human breast adenocarcinoma cell lines. *Bioorg. Chem.* 87, 321–334. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.03.036>.
- Martin-Montalvo, A., Mercken, E.M., Mitchell, S.J., Palacios, H.H., Mote, P.L., Scheibye-Knudsen, M., Gomes, A.P., Ward, T.M., Minor, R.K., Blouin, M.J., Schwaib, M., Pollak, M., Zhang, Y., Yu, Y., Becker, K.G., Bohr, V.A., Ingram, D.K., Sinclair, D.A., Wolf, N.S., Spindler, S.R., Bernier, M., de Cabo, R., 2013. Metformin improves healthspan and lifespan in mice. *Nat. Commun.* 4, 2192. <https://doi.org/10.1038/ncomms3192>.
- McMenamin, U.C., Cardwell, C.R., Hughes, C.M., Murray, L.M., 2016. *Lung Cancer* 94, 35.
- McAlister, F.A., Eurich, D.T., Majumdar, S.R., Johnson, J.A., 2008. The risk of heart failure in patients with type 2 diabetes treated with oral agent monotherapy. *Eur. J. Heart Fail.* 10, 703–708. <https://doi.org/10.1016/j.ejheart.2008.05.013>.
- Melemedjian, O.K., Asiedu, M.N., Tilly, D.V., Sanoja, R., Yan, J., Lark, A., Khoutorsky, A., Johnson, J., Peebles, K.A., Lepow, T., Sonenberg, N., Dussor, G., Price, T.J., 2011. Targeting adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) in preclinical models reveals a potential mechanism for the treatment of neuropathic pain. *Mol. Pain* 7, 70. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-7-70>.
- Melnik, B.C., Schmitz, G., 2014. Metformin: an inhibitor of mTORC1 signaling. *J. Endocrinol. Diabetes* 2, 1029.
- Mercken, E.M., Carbonneau, B.A., Krzywick-Walker, S.M., de Cabo, R., 2012. Of mice and men: the benefits of caloric restriction, exercise, and mimetics. *Ageing Res. Rev.* 11, 390–398. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2011.11.005>.
- Mohammed, A., Janakiram, N.B., Brewer, M., Ritchie, R.L., Marya, A., Lightfoot, S., Steele, V.E., Rao, C.V., 2013. Antidiabetic drug metformin prevents progression of pancreatic cancer by targeting in part cancer stem cells and mTOR signaling. *Transl. Oncol.* 6, 649–659. <https://doi.org/10.1593/10.13556>.
- Moiseva, O., Deschênes Simard, X., St Germain, E., Igelmann, S., Huot, G., Cadar, A.E., Bourdeau, V., Pollak, M.N., Ferbyre, G., 2013. Metformin inhibits the senescence-associated secretory phenotype by interfering with IKK/NF- κ B activation. *Aging Cell* 12, 489–498. <https://doi.org/10.1111/acel.12075>.
- Moore, E.M., Mander, A.G., Ames, D., Kotowicz, M.A., Carne, R.P., Brodaty, H., Woodward, M., Boundy, K., Ellis, K.A., Bush, A.L., Faux, N.G., Martins, R., Zoelcke, C., Rowe, C., Watters, D.A., 2013. AIBL Investigators. Increased risk of cognitive impairment in patients with diabetes is associated with metformin. *Diabetes Care* 36, 2981–2987. <https://doi.org/10.2337/dc13-er11b>.
- Moskalev, A., Chernyagina, E., de Magalhães, J.P., Barardo, D., Thoppil, H., Shaposhnikov, M., Budovsky, A., Fraifeld, V.E., Garazha, A., Tsvetkov, V., Bronovitsky, E., Bogomolov, V., Scerbacov, A., Kuryan, O., Gurinovich, R., Jellen, L.C., Kennedy, B., Mamoshina, P., Dobrovolskaya, E., Aliper, A., Kaminsky, D., Zhavoronkov, A., 2015. Geroprotectors: org: a new, structured and curated database of current therapeutic interventions in aging and age-related disease. *Aging (Albany NY)* 7, 616–628. <https://doi.org/10.18632/aging.100799>.
- Moskalev, A., Chernyagina, E., Tsvetkov, V., Fedintsev, A., Shaposhnikov, M., Krut'ko, V., Zhavoronkov, A., Kennedy, B.K., 2016. Developing criteria for evaluation of geroprotectors as a key stage toward translation to the clinic. *Aging Cell* 15, 407–415. <https://doi.org/10.1111/acel.12463>.
- Na, H.J., Park, J.S., Pyo, J.H., Lee, S.H., Jeon, H.J., Kim, Y.S., Yoo, M.A., 2013. Mechanism of metformin: inhibition of DNA damage and proliferative activity in *Drosophila* midgut stem cell. *Mech. Ageing Dev.* 134, 381–390. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2013.07.003>.
- Natali, A., Nesti, L., Venturi, E., Shore, A.C., Khan, F., Gooding, K., Gates, P.E., Looker, H.C., Dove, F., Goncalves, I., Persson, M., Nilsson, J., 2019. Metformin is the key factor

- in elevated plasma growth differentiation factor-15 levels in type 2 diabetes: a nested, case-control study. *Diabetes Obes. Metab.* 21, 412–416. <https://doi.org/10.1111/dom.13519>.
- Nayan, M., Finelli, A., Jewett, M.A.S., Juurlink, D.N., Austin, P.C., Kulkarni, G.S., Hamilton, R.J., 2017. Metformin use and kidney cancer outcomes in patients with diabetes: a propensity score analysis. *Clin. Genitourin. Cancer* 15, 300–305. <https://doi.org/10.1016/j.clgc.2016.06.008>.
- Nayan, M., Punjani, N., Juurlink, D.N., Finelli, A., Austin, P.C., Kulkarni, G.S., Uleryk, E., Hamilton, R.J., 2019. Metformin use and kidney cancer survival outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Clin. Oncol.* 42, 275–284. <https://doi.org/10.1097/COC.0000000000000512>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2017.04.009>.
- Ng, T.P., Feng, L., Yap, K.B., Lee, T.S., Tan, C.H., Winblad, B., 2016. Long term metformin usage and cognitive function among older adults with diabetes. *J. Alzheimer's Disease* 41, 61–68. <https://doi.org/10.3233/JAD131901>.
- Nguyen, T.T., Ung, T.T., Li, S., Lian, S., Xia, Y., Park, S.Y., Jun, Y.S., 2019. Metformin inhibits lithocholic acid-induced interleukin 8 upregulation in colorectal cancer cells by suppressing ROS production and NF- κ B activation. *Sci. Rep.* 9, 2003. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38778-2>.
- Nichols, G.A., Koro, C.E., Gullion, C.M., Ephross, S.A., Brown, J.B., 2005. The incidence of congestive heart failure associated with antidiabetic therapies. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 21, 51–57. <https://doi.org/10.1002/dmrr.480>.
- Niraula, S., Dowling, R.J.O., Ennis, M., Chung, M.C., Done, S.J., Hood, N., Escallon, J., Leong, W.L., McCreedy, D.R., Reedijk, M., Stanbolic, V., Goodwin, P.J., 2012. Metformin in early breast cancer: a prospective window of opportunity neoadjuvant study. *Breast Cancer Res. Treat.* 135, 821–830. <https://doi.org/10.1007/s10549-012-2223-1>.
- Nkontchou, G., Cosson, E., Aout, M., Mahmoudi, A., Bourcier, V., Charif, I., Gamme-Carrie, N., Grando-Lemaire, V., Vicaut, E., Trinchet, J.C., Beaugrand, M., 2011. Impact of metformin on the prognosis of cirrhosis induced by viral hepatitis C in diabetic patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, 2601–2608. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-2415>.
- Novelle, M.G., Ali, A., Diéguez, C., Bernier, M., de Cabo, R., 2016. Metformin: a hopeful promise in aging research. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6, a025932. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025932>.
- Oliveira, W.H., Nunes, A.K., França, M.E.R., Santos, L.A., Lós, D.B., Rocha, S.W., Barbosa, K.P., Rodrigues, G.B., Peixoto, C.A., 2016. Effects of metformin on inflammation and short term memory in streptozotocin induced diabetic mice. *Brain Res.* 1644, 149–160. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.05.013>.
- Onken, B., Driscoll, M., 2010. Metformin induces a dietary restriction-like state and the oxidative stress response to extend *C. elegans* healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1. *PLoS One* 5, e8758. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008758>.
- Owen, M.R., Doran, E., Halestrap, A.P., 2000. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex I of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem. J.* 348, 607–614. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3480607>.
- Paintlia, A.S., Paintlia, M.K., Mohan, S., Singh, A.K., Singh, I., 2013. AMP-activated protein kinase signaling protects oligodendrocytes that restore central nervous system functions in an experimental autoimmune encephalomyelitis model. *Am. J. Pathol.* 183, 526–541. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.04.030>.
- Palleria, C., Leporini, C., Maida, F., Succurro, E., De Sarro, G., Arturib, F., Russo, E., 2016. Potential effects of current drug therapies on cognitive impairment in patients with type 2 diabetes. *Front. Neuroendocrinol.* 42, 76–92. <https://doi.org/10.1016/j.yfrnc.2016.07.002>.
- Parachikova, A., Agadjanyan, M.G., Cribbs, D.H., Blurton Jones, M., Perron, V., Rogers, J., Beach, T.G., Cotman, C.W., 2007. Inflammatory changes parallel the early stages of Alzheimer disease. *Neurobiol. Aging* 28, 1821–1833. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.08.014>.
- Park, J.H., Kim, Y.H., Park, E.H., Lee, S.J., Kim, H., Kim, A., Lee, S.B., Shim, S., Jang, H., Myung, J.K., Park, S., Lee, S.J., Kim, M.J., 2019. Effects of metformin and phenformin on apoptosis and epithelial mesenchymal transition in chemo-resistant rectal cancer. *Cancer Sci.* 110, 2834–2845. <https://doi.org/10.1111/cas.14124>.
- Pierro, J., Saba, C., McLean, K., Williams, R., Kurpuzoglu, E., Prater, R., Hoover, K., Gogal, R., 2017. Anti-proliferative effect of metformin on a feline injection site sarcoma cell line independent of mTOR inhibition. *Res. Vet. Sci.* 114, 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.03.003>.
- Piskovatska, V., Stefanyshyn, N., Storey, K.B., Vaiserman, A.M., Lushchak, O., 2019a. Metformin as a geroprotector: experimental and clinical evidence. *Biogerontology* 20, 33–48. <https://doi.org/10.1007/s10522-018-9773-5>.
- Piskovatska, V., Strilytska, O., Koliada, K., Vaiserman, A., Lushchak, O., 2019b. Health benefits of anti-aging drugs. In: Harris, J., Korolchuk, V. (Eds.), *Biochemistry and Cell Biology of Ageing: Part II Clinical Science*, 91. Subcellular Biochemistry, pp. 339–392. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3681-2_13.
- Piskovatska, V., Storey, K.B., Vaiserman, A.M., Lushchak, O., 2020. The use of metformin to increase the human healthspan. *Rev. New Drug Targets Age-Related Disorders* 1260, 319–332. https://doi.org/10.1007/978-3-030-42667-5_13.
- Pizzutti, L., Vici, P., Lauro, L.D., Sergi, D., Giulia, M.D., Marchetti, P., Mangeri-Saccà, M., Giordano, A., Barba, M., 2015. Metformin and breast cancer: basic knowledge in clinical context. *Cancer Treat. Rev.* 41, 441–447. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2015.03.002>.
- Podhorecka, M., Ibanez, B., Dmoszyńska, A., 2017. Metformin – its anti-cancer and anti-aging effects. *Post. Med. Hig. Dosw.* 71, 170–175. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.3801>.
- Poliakovsky-Prause, Z., Tolvanen, T.A., Lindfors, S., Dumont, V., Van, M., Wang, H., Dash, S.N., Berg, M., Naams, J.B., Hautala, L.C., Nisen, H., Mirtti, T., Groop, P.H., Wähälä, K., Tienari, J., Lehtonen, S., 2019. Metformin increases glucose uptake and acts renoprotectively by reducing SHP2 activity. *FASEB J.* 33, 2858–2869. <https://doi.org/10.1096/fj.201800529RR>.
- Potempa, M., Jonczyk, P., Szczerba, K., Kandefer, B., Kajdaniuk, D., 2016. Metformin – today's panacea? *Clin. Diabetol.* 5, 117–122. <https://doi.org/10.5603/DK.2016.0020>.
- Pradhan, A.D., Manson, J.E., Rifai, N., Buring, J.E., Ridker, P.M., 2001. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 286, 327–334. <https://doi.org/10.1001/jama.286.3.327>.
- Prattichizzo, F., Giuliani, A., Mensà, E., Sabbatinelli, J., De Nigris, V., Ripponi, M.R., Sala, L.L., Procopio, A.D., Olivieri, F., Ceriello, A., 2018. Pleiotropic effects of metformin: shaping the microbiome to manage type 2 diabetes and postpone ageing. *Ageing Res. Rev.* 48, 87–98. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.10.003>.
- Preiss, D., Lloyd, S.M., Ford, I., McMurray, J.J., Holman, R.R., Welsh, P., Fisher, M., Packard, C.J., Sattar, N., 2014. Metformin for non-diabetic patients with coronary heart disease (The CAMERA Study): a randomised controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2, 116–124. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(13\)70152-9](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(13)70152-9).
- Preston, M.A., Riis, A.H., Ehrenstein, V., Bream, R.H., Batista, J.L., Olumi, A.F., Mucci, L.A., Adami, H.O., Sørensen, H.T., 2014. Metformin use and prostate cancer risk. *Eur. Urol.* 66, 1012–1020. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2014.04.027>.
- Queiroz, E.A.L.F., Punkila, S., Eichler, R., Sampaio, S.C., Forsyth, H.L., Lees, S.J., Barbosa, A.M., Dekker, R.F.H., Fortes, Z.B., Khaier, N., 2014. Metformin induces apoptosis and cell cycle arrest mediated by oxidative stress, AMPK and FOXO3a in MCF7 breast cancer cells. *PLoS One* 9, e98207. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098207>.
- Rattan, R., Graham, R.P., Maguire, J.L., Giri, S., Shridhar, V., 2011. Metformin suppresses ovarian cancer growth and metastasis with enhancement of cisplatin cytotoxicity in vivo. *Neoplasia* 13, 483–491. <https://doi.org/10.1593/neo.11148>.
- Rêgo, D.F., Pavan, L.M.C., Elias, S.T., De Luca Canto, G., Guerra, E.N.S., 2015. Effects of metformin on head and neck cancer: a systematic review. *Oral Oncol.* 51, 416–422. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2015.01.007>.
- Rizos, C.V., Elisaf, M.S., 2013. Metformin and cancer. *Eur. J. Pharmacol.* 705, 96–108. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.02.038>.
- Roberts, A.W., Ogunwole, S.U., Blakeslee, L., Rabe, M.A., 2018. The Population 65 Years and Older in the United States: 2016. ACS, p. 38.
- Rotermund, C., Machetanz, G., Fitzgerald, J.C., 2018. The therapeutic potential of metformin in neurodegenerative diseases. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 9, 400. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00400>.
- Roy, R.P., Ghosh, K., Ghosh, M., Acharyya, A., Bhattacharya, A., Pal, M., Chakraborty, S., Sengupta, N., 2016. Study of vitamin B₁₂ deficiency and peripheral neuropathy in metformin-treated early type 2 diabetes mellitus. *Indian J. Endocrinol. Metab.* 20, 631–637. <https://doi.org/10.4103/2230-8210.190542>.
- Ruggiero-Lopez, D., Leconte, M., Moinet, G., Paterneau, G., Lagarde, M., Wiemsperger, N., 1999. Reaction of metformin with dicarbonyl compounds. Possible implication in the inhibition of advanced glycation end product formation. *Biochem. Pharmacol.* 58, 1765–1773. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(99\)00263-4](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(99)00263-4).
- Russe, O.Q., Möser, C.V., Kynast, K.L., King, T.S., Stephan, H., Geisslinger, G., Niederberger, E., 2013. Activation of the AMP-activated protein kinase reduces inflammatory nociception. *J. Pain* 14, 1330–1340. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2013.05.012>.
- Sahra, I.B., Laurent, K., Loubat, A., Giorgetti Peraldi, S., Colosetti, P., Auburger, P., Tanti, J.F., Marchand Brustel, Y.L., Bost, F., 2008. The antidiabetic drug metformin exerts an antitumoral effect in vitro and in vivo through a decrease of cyclin D1 level. *Oncogene* 27, 3576–3586. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1211024>.
- Saisho, Y., 2015. Metformin and inflammation: its potential beyond glucose-lowering effect. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* 15, 196–205. <https://doi.org/10.2174/1871530315666150316124019>.
- Sanchez, A., García Gimeno, M.A., Cañada Martínez, A.J., Sequedo, M.D., Millán, J.M., Sanz, P., Vázquez-Maunrique, R.P., 2019. Metformin treatment reduces motor and neuropsychiatric phenotypes in the zQ175 mouse model of Huntington disease. *Exp. Mol. Med.* 51, 1–16. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0264-9>.
- Scherbakov, A.M., Sorokin Jr, D.V., V.V.T. Prokhorov, N.S., Semina, S.E., Berstein, L.M., Krasil'nikov, M.A., 2016. The phenomenon of acquired resistance to metformin in breast cancer cells: the interaction of growth pathways and estrogen receptor signaling. *IUBMB Life* 68, 281–292. <https://doi.org/10.1002/iub.1481>.
- Schulz, T.J., Zarse, K., Voigt, A., Urban, N., Birringer, M., Ristow, M., 2007. Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell Metab.* 6, 280–293. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.08.011>.
- Shaw, R.J., Lamia, K.A., Vasquez, D., Koo, S.H., Bardeesy, N., Depinho, R.A., Montminy, M., Cantley, L.C., 2005. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* 310, 1642–1646. <https://doi.org/10.1126/science.1120781>.
- Shintani, H., Shintani, T., Ashida, H., Sato, M., 2018. Calorie restriction mimetics: upstream-type compounds for modulating glucose metabolism. *Nutrients* 10, 1821. <https://doi.org/10.3390/nut10121821>.
- Skirbekk, V.F., Studinger, U.M., Cohen, J.E., 2019. How to measure population aging? The answer is less than obvious: a review. *Gerontology* 65, 136–144. <https://doi.org/10.1159/000494025>.
- Slack, C., Foley, A., Partridge, L., 2012. Activation of AMPK by the putative dietary restriction mimetic metformin is insufficient to extend lifespan in *Drosophila*. *PLoS One* 7, e47699. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047699>.
- Snieschowski, B.B., Azoulay, L., Yin, H., Pollak, M.N., Suissa, S., 2013. The use of metformin and the incidence of lung cancer in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 36, 124–129. <https://doi.org/10.2337/dc12-0740>.

- Smith, D.L., Elam, C.F., Mattison, J.A., Lane, M.A., Roth, G.S., Ingram, D.K., Allison, D.B., 2010. Metformin supplementation and life span in Fischer-344 rats. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 65, 468–474. <https://doi.org/10.1093/gerona/gdq033>.
- Song, C.W., Lee, H., Dings, R.P.M., Williams, B., Powers, J., Santos, T.D., Choi, B.H., Park, H.J., 2012. Metformin kills and radiosensitizes cancer cells and preferentially kills cancer stem cells. *Sci. Rep.* 2, 362. <https://doi.org/10.1038/srep00362>.
- Song, Y.M., Lee, Y.H., Kim, J.W., Ham, D.S., Kang, E.S., Cha, B.S., Lee, H.C., Lee, B.W., 2015. Metformin alleviates hepatosteatosis by restoring SIRT1-mediated autophagy induction via an AMP activated protein kinase independent pathway. *Autophagy* 11, 46–59. doi: 10.4161/15548627.2014.984271. <https://doi.org/10.4161/15548627.2014.984271>.
- Song, J., Jiang, G., Zhang, J., Guo, J., Li, Z., Hao, K., Liu, L., Cheng, Z., Tong, X., Dai, F., 2019. Metformin prolongs lifespan through remodeling the energy distribution strategy in silkworm, *Bombyx mori*. *Aging (Albany NY)* 11, 240–248. <https://doi.org/10.18632/aging.101746>.
- Soukas, A.A., Hao, H., Wu, L., 2019. Metformin as anti aging therapy: is it for everyone? *Trends Endocrinol. Metab.* 30, 745–755. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2019.07.015>.
- Sullivan, D., Forder, P., Simes, J., Whiting, M., Kritharides, L., Merrifield, A., Donoghoe, M., Colman, P.G., Graham, N., Haapanäki, H., Keech, A., 2011. Associations between the use of metformin, sulphonylureas, or diet alone and cardiovascular outcomes in 6005 people with type 2 diabetes in the FIELD study. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 94, 284–290. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2011.07.028>.
- Sultuybek, G.K., Soydas, T., Yennis, G., 2019. NF- κ B as the mediator of metformin's effect on ageing and ageing-related diseases. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 46, 413–422. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13073>.
- Thomas, L., Gregg, B., 2017. Metformin: a review of its history and future: from lilac to longevity. *Pediatr. Diabetes* 18, 10–16. <https://doi.org/10.1111/pedi.12473>.
- Tilhi, D.V., Melmedjian, O.K., Asicud, M.N., Qu, N., De Felice, M., Dussor, G., Price, T.J., 2012. Resveratrol engages AMPK to attenuate ERK and nTOR signaling in sensory neurons and inhibits incision-induced acute and chronic pain. *Mol. Pain* 8, 5. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-8-5>.
- Tohyama, D., Yamaguchi, A., 2010. A critical role of SNF1A/ dAMPK α (Drosophila AMP-activated protein kinase alpha) in muscle on longevity and stress resistance in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 394, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.126>.
- Tomasulo, P., 2002. ChemDPlus – super source for chemical and drug information. *Med. Ref. Serv. Q.* 21, 53–59. https://doi.org/10.1300/J115v21n01_04.
- Tseng, C.H., 2012. Thyroid cancer risk is not increased in diabetic patients. *PLoS One* 7, e53096. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053096>.
- Tseng, C.H., 2014. Metformin may reduce bladder cancer risk in Taiwanese patients with type 2 diabetes. *Acta Diabetol.* 51, 295–303. <https://doi.org/10.1007/s00592-014-0562-6>.
- Tseng, C.H., 2015. Metformin and endometrial cancer risk in Chinese women with type 2 diabetes mellitus in Taiwan. *Gynecol. Oncol.* 138, 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2015.03.059>.
- Tseng, C.H., 2016. Use of metformin and risk of kidney cancer in patients with type 2 diabetes. *Eur. J. Cancer* 52, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.09.027>.
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)07037-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)07037-8).
- Vaiserman, A., Lushchak, O., 2017. Implementation of longevity-promoting supplements and medications in public health practice: achievements, challenges and future perspectives. *J. Transl. Med.* 15, 160. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1259-8>.
- Vaiserman, A.M., Lushchak, O.V., Koliada, A.K., 2016. Anti aging pharmacology: promises and pitfalls. *Ageing Res. Rev.* 31, 9–35. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.08.004>.
- Van De Voorde, L., Janssen, L., Larue, R., Houben, R., Buijsen, J., Sosef, M., Vanneste, B., Schraepnel, M.C., Berb, M., Lambin, P., 2015. Can metformin improve the tomorrow of patients treated for oesophageal cancer? *Eur. J. Surg. Oncol.* 41, 1333–1339. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2015.05.012>.
- Verdile, G., Fuller, S.J., Martins, R.N., 2015. The role of type 2 diabetes in neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* 84, 22–38. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.04.008>.
- Walker, E.J., Ko, A.H., Holly, E.A., Bracci, P.M., 2014. Metformin use among type 2 diabetes and risk of pancreatic cancer in a clinic-based case-control study. *Int. J. Cancer* 136, E646–E653. <https://doi.org/10.1002/ijc.29120>.
- Walton, R.G., Dungan, C.M., Long, D.E., Tuggle, S.C., Kosmac, K., Peck, B.D., Bush, H.M., Tezanos, A.G.V., McGwin, G., Windham, S.T., Ovalle, F., Banman, M.M., Kern, P.A., Peterson, C.A., 2019. Metformin blunts muscle hypertrophy in response to progressive resistance exercise training in older adults: A randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial: The MASTERS trial. *Aging Cell* 18, e13039. <https://doi.org/10.1111/acel.13039>.
- Wan, G., Sun, X., Li, F., Wang, X., Li, C., Li, H., Yu, X., Cao, F., 2018. Survival benefit of metformin adjuvant treatment for pancreatic cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Cell. Physiol. Biochem.* 49, 837–847. <https://doi.org/10.1159/000493214>.
- Wang, J., Gallagher, D., DeVito, L.M., Cancino, G.I., Tsui, D., He, L., Keller, G.M., Frankland, P.W., Kaplan, D.R., Miller, F.D., 2012. Metformin activates an atypical PKC-CBP pathway to promote neurogenesis and enhance spatial memory formation. *Cell Stem Cell* 11, 23–35. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.03.016>.
- Wang, C.P., Lorenzo, C., Espinoza, S.E., 2014. Frailty attenuates the impact of metformin on reducing mortality in older adults with type 2 diabetes. *J. Endocrinol. Diabetes Obes.* 2, 1031.
- Wang, C., Liu, C., Gao, K., Zhao, H., Zhou, Z., Shen, Z., Guo, Y., Li, Z., Yao, T., Mei, X., 2016. Metformin preconditioning provide neuroprotection through enhancement of autophagy and suppression of inflammation and apoptosis after spinal cord injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 477, 534–540. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.05.148>.
- Wang, C.P., Kuhn, J., Shah, D.P., Schmidt, S., Lam, Y.W.F., MacCarthy, D., Tenner, L., Ramirez, A.G., 2019. Metformin modifies disparity in hepatocellular carcinoma incidence in men with type 2 diabetes but without chronic liver diseases. *Cancer Med.* 8, 3206–3215. <https://doi.org/10.1002/cam4.2142>.
- Woo, S.L., Xu, H., Li, H., Zhao, Y., Hu, X., Zhao, J., Guo, X., Guo, T., Botchlett, R., Qi, T., Pei, Y., Zheng, J., Xu, Y., An, X., Chen, L., Chen, L., Li, Q., Xiao, X., Huo, Y., Wu, C., 2014. Metformin ameliorates hepatic steatosis and inflammation without altering adipose phenotype in diet-induced. *PLoS One* 9, e91111. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091111>.
- Wu, B., Li, S., Sheng, L., Zhu, J., Gu, L., Shen, H., La, D., Hambly, B.D., Bao, S., Di, W., 2012. Metformin inhibits the development and metastasis of ovarian cancer. *Oncol. Rep.* 28, 903–908. <https://doi.org/10.3892/or.2012.1890>.
- Wu, L., Zhou, B., Oshiro-Rapley, N., Li, M., Paulo, J.A., Webster, C.M., Mou, F., Kacergis, M.C., Talkowski, M.E., Carr, C.E., Gygi, S.P., Zheng, B., Soukas, A.A., 2016. An ancient, unified mechanism for metformin growth inhibition in *C. elegans* and cancer. *Cell* 167, 1705–1718. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.055>.
- Wu, T., Horowitz, M., Rayner, C.K., 2017a. New insights into the anti-diabetic actions of metformin: from the liver to the gut. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 157–166. <https://doi.org/10.1080/17474124.2017.1273769>.
- Wu, H., Esteve, E., Tremaroli, V., Khan, M.T., Caesar, R., Mannerås-Holm, L., Ståhlman, M., Olsson, L.M., Serino, M., Planas-Félix, M., Xifra, G., Mercader, J.M., Torrents, D., Burcelin, R., Ricart, W., Perkins, R., Fernández-Real, J.M., Bäckhed, F., 2017b. Metformin alters the gut microbiome of individuals with treatment-naïve type 2 diabetes, contributing to the therapeutic effects of the drug. *Nat. Med.* 23, 850–858. <https://doi.org/10.1038/nm.4345>.
- Xin, W., Fang, L., Fang, Q., Zheng, X., Huang, P., 2018. Effects of metformin on survival outcomes of pancreatic cancer patients with diabetes: a meta-analysis. *Mol. Clin. Oncol.* 8, 483–488. <https://doi.org/10.3892/mco.2017.1541>.
- Yu, H., Zhong, X., Gao, P., Shi, J., Wu, Z., Guo, Z., Wang, Z., Song, Y., 2019. The Potential effect of metformin on cancer: an umbrella review. *Front. Endocrinol.* 10, 617. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00617>.
- Yuan, F., Cheng, C., Xiao, F., Liu, H., Cao, S., Zhou, G., 2020. Inhibition of mTORC1/P70S6K pathway by metformin synergistically sensitizes Acute Myeloid Leukemia to Ara C. *Life Sci.* 243, 117276. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117276>.
- Zakikhani, M., Dowling, R., Fantus, I.G., Sonenberg, N., Pollak, M., 2006. Metformin is an AMP kinase dependent growth inhibitor for breast cancer cells. *Cancer Res.* 66, 10269–10273. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN.06-1500>.
- Zhai, J., Yao, G.D., Wang, J.Y., Yang, Q.L., Wu, L., Chang, Z.Y., Sun, Y.P., 2019. Metformin regulates key microRNAs to improve endometrial receptivity through increasing implantation marker gene expression in patients with PCOS undergoing IVF/ICSI. *Reprod. Sci.* 26, 1439–1448. <https://doi.org/10.1177/1933719118820466>.
- Zhang, Z.J., Zheng, Z.J., Shi, R., Su, Q., Jiang, Q., Kip, K.E., 2012. Metformin for liver cancer prevention in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, 2347–2353. <https://doi.org/10.1210/jc.2012.1267>.
- Zhang, C.S., Li, M., Ma, T., Zong, Y., Cui, J., Feng, J.W., Wu, Y.Q., Lin, S.Y., Lin, S.C., 2016. Metformin activates AMPK through the Lysosomal Pathway. *Cell Metab.* 24, 521–522. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.09.003>.
- Zhou, C., Sun, R., Zhuang, S., Sun, C., Jiang, Y., Cui, Y., Li, S., Xiao, Y., Du, Y., Gu, H., Liu, Q., 2016. Metformin prevents cerebellar granule neurons against glutamate-induced neurotoxicity. *Brain Res. Bull.* 121, 241–245. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.02.009>.
- Zhou, J., Ke, Y., Lei, X., Wu, T., Li, Y., Bao, T., Tang, H., Zhang, C., Wu, X., Wang, G., Li, J., Zhang, H., Ni, F., Ye, Z., Wang, L., 2020. Meta-analysis: the efficacy of metformin and other anti-hyperglycemic agents in prolonging the survival of hepatocellular carcinoma patients with type 2 diabetes. *Ann. Hepatol.* 9, 320–328. <https://doi.org/10.1016/j.aohp.2019.11.008>.

Publikacja II

Zajda A., Sikora J., Huttunen K., Markowicz-Piasecka M. Structural comparison of sulfonamide-based derivatives that can improve anti-coagulation properties of metformin. International Journal of Molecular Sciences. 2022, 23, 4132. **IF₂₀₂₂ = 6.208; 140 p**
MEiN₂₀₂₂



Article

Structural Comparison of Sulfonamide-Based Derivatives That Can Improve Anti-Coagulation Properties of Metformin

Agnieszka Zajda ¹, Joanna Sikora ², Kristiina M. Huttunen ³ and Magdalena Markowicz-Piasecka ^{1,*}¹ Laboratory of Bioanalysis, Department of Pharmaceutical Chemistry, Drug Analysis and Radiopharmacy, Medical University of Lodz, ul. Muszyńskiego 1, 90-151 Lodz, Poland; agnieszkazajda95@gmail.com² Department of Bioinorganic Chemistry, Medical University of Lodz, ul. Muszyńskiego 1, 90-151 Lodz, Poland; joanna.sikora@umed.lodz.pl³ School of Pharmacy, Faculty of Health Sciences, University of Eastern Finland, Yliopistonranta 1C, P.O. Box 1627, 70211 Kuopio, Finland; kristiina.huttunen@uef.fi

* Correspondence: magdalena.markowicz@umed.lodz.pl; Tel.: +48-42-677-92-50

Abstract: Due to its high efficiency, good safety profile, and potential cardio-protective properties, metformin, a dimethyl biguanide, is the first-line medication in antihyperglycemic treatment for type 2 diabetic patients. The aim of our present study was to assess the effects of eight new sulfonamide-based derivatives of metformin on selected plasma parameters and vascular hemostasis, as well as on endothelial and smooth muscle cell function. The compounds with an alkyl chain (1–3), trifluoromethyl substituent (4), or acetyl group (5) significantly elevated glucose utilization in human umbilical endothelial cells (HUVECs), similarly to metformin. Our novel findings showed that metformin analogues 1–3 presented the most beneficial properties because of their greatest safety profile in the WST-1 cell viability assay, which was also proved in the further HUVEC integrity studies using RTCA DP. Compounds 1–3 did not affect either HUVEC or aortal smooth muscle cell (AoSMC) viability up to 3.0 mM. Importantly, these compounds beneficially affected some of the coagulation parameters, including factor X and antithrombin III activity. In contrast to the above-mentioned metformin analogues, derivatives 4 and 5 exerted more profound anticoagulation effects; however, they were also more cytotoxic towards HUVECs, as IC₅₀ values were 1.0–1.5 mM. In conclusion, the chemical modification of a metformin scaffold into sulfonamides possessing alkyl substituents results in the formation of novel derivatives with potential bi-directional activity including anti-hyperglycemic properties and highly desirable anti-coagulant activity.

Keywords: biguanides; coagulation; haemostasis; metformin

Citation: Zajda, A.; Sikora, J.; Huttunen, K.M.; Markowicz-Piasecka, M. Structural Comparison of Sulfonamide-Based Derivatives That Can Improve Anti-Coagulation Properties of Metformin. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 4132. <https://doi.org/10.3390/ijms23084132>

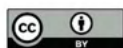
Academic Editor: Silvia S. Barbieri

Received: 20 February 2022

Accepted: 6 April 2022

Published: 8 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

De novo drug development is a laborious and resource- and time-consuming task. Generally, it takes at least 13 years to discover a new drug, and the entire cost ranges from one to three billion dollars. Moreover, the drug design process is often complicated by safety issues, such as high toxicity and efficacy. Accordingly, only ca. 10% of novel compounds which enter first phase clinical trials are accepted to further clinical studies [1,2]. One alternative is drug repurposing, also named drug repositioning or drug reprofiling, for new indications. Although this is not a novel process, it has become an attractive alternative for traditional drug development in recent years. The aim of drug repurposing is to identify a new indication for drugs which are already approved. One advantage of this process is that as the repurposing candidates have established preclinical and clinical profiles (pharmacokinetic, pharmacodynamic and toxicity), they can immediately accede to late-stage clinical trials. The new targets of drug repositioning might be identified in several ways. The drug's molecular purpose can demonstrate a beneficial effect in a different medical condition than originally indicated, or the drug may act via unrecognized

targets associated with various diseases. The particular compound may also demonstrate additional and unintended benefits during clinical observation [3–6].

The sulfonamides represent a large group of well-studied drugs which possess a wide range of antibacterial, antiviral, and antifungal activities, as well as various antimalarial, anti-inflammatory, hypoglycemic, anti-cancer properties, among others. As such, they can be used in a wide range of disease entities. The versatile structure of sulfonamides and the wide range of their activities have contributed to increased interest in repurposing old drugs. The design and synthesis of novel sulfonamide derivatives with beneficial effects are of particular concern [7].

Recent scientific interest has also been focused on the advantageous effects of sulfonamide derivatives on the cardiovascular system and hemostasis as a result of their regulation of vascular tone and influence on the renin-angiotensin system, endothelin receptor, and lipid metabolism. The ability of newly-designed pyrrolidine-sulfonamides to suppress transient receptor potential vanilloid-4 (TRPV4) allows them not only regulate $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ inflow into vascular endothelial cells in lungs, but also to control vascular tone and presumably reduce the risk of heart failure (HF) [7–11]. The development of atherosclerosis and hypertension is accelerated by increased secretion of fatty acid-binding protein (FABP4) and retinol-binding protein (RBP-4). One potential therapeutic strategy in the treatment of atherosclerosis or other cardiovascular diseases is the use of naphthalene-1-sulfonamide derivatives, which are selective FABP4 inhibitors [12,13]. Structural modifications of naphthalene-1-sulfonamide derivatives have been found to inhibit lipolysis, promote lipogenesis, and then reduce glucose and serum lipid levels in obese diabetic mice [14,15]. Another study showed that sulfonamide-pyrrolidinones are also potent and selective inhibitors of factor Xa, which can lead to prevention of thrombin production [16].

Another sulfonamide derivative, rosuvastatin, also has advantageous effects on lipid metabolism. This is commonly used in the treatment of hypercholesterolemia, and has already shown a significant reduction of serum RBP-4 level at a low dose of 2.5 mg/day [17]. The renin-angiotensin-aldosterone (RAA) and endothelin system play important roles in the pathogenesis of hypertension. Activation of endothelin-1 (ET_1) secretion and angiotensin I (AT I) to angiotensin II conversion (ATII) induces blood vessel constriction and promotes the development of vessel change, which restricts blood flow and increases blood pressure. For instance, bosentan, a dual endothelin (ET_A/ET_B) receptor antagonist with a sulfonamide structure, is currently used in the treatment of pulmonary artery hypertension (PAH); however, its potential effectiveness has not been confirmed in all trials, and, importantly, this effect may depend on the duration of treatment in patients with heart failure. There are currently insufficient data on the long-term effect of ET_A/ET_B receptor antagonism induced by bosentan in hypertension [18,19].

In addition, *n*-butyl, methyl, ethoxymethyl, or methoxymethyl substitution of sulfonamide derivatives of benzimidazole have also been found to offer potential as angiotensin II subtype 1 (AT_1) and endothelin subtype A (ET_A) antagonists [20,21]. There is also some evidence that biphenyl sulfonamide with an unsubstituted 1,2,4-triazole moiety may be a strong and selective angiotensin II subtype 2 (AT_2) receptor agonist. This compound has been found to exert antihypertension activity on systolic arterial pressure in mice [22].

Metformin is the first-line oral drug used for initial monotherapy in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM). In the later stages of treatment, metformin is used in co-administration with insulin and other hypoglycemic agents. Its favorable action includes reduction of hepatic glucose production and lowering of insulin resistance, as well as having an advantageous influence on lipid metabolism and cardioprotection activity [23,24]. Metformin also demonstrates a favorable influence on vascular cells by significantly reducing the expression of intercellular adhesion molecules, such as the soluble vascular cell adhesion molecule (sVCAM), soluble intercellular adhesion molecule (sICAM), and von Willebrand factor (vWF), and by inhibiting the adhesion of monocytes to human endothelial cells and preventing the formation of foam cells [25–28]. In addition, recent studies indicate that metformin possesses the ability to increase the release of tissue plasminogen activator

(t-PA) from human umbilical endothelial cells (HUVECs) and to decrease procoagulant activity of tissue factor (TF) [28,29]. Metformin has also been found to exert beneficial effects on platelet function. For instance, Xin et al. reported that metformin has the ability to suppress mtDNA release, leading to the inhibition of platelet activation through a C-type lectin receptor (DC-SIGN)-dependent pathway, thus preventing both venous and arterial thrombosis [30].

These multidirectional effects of metformin therapy have encouraged researchers to modify the structure of biguanide to enhance its potentially favorable activity. In the field of cardiovascular diseases and hemostasis, it was found that sulfonamide-based derivatives of metformin positively affect plasma hemostasis, including clot formation, stabilization, fibrinolysis, and also platelet activity [31]. In addition, Xin et al. found that introduction of a sulfonamide group to a biguanide derivative can inhibit the formation of platelet thrombus by decreasing platelet aggregation, adhesion, and clot retraction. Furthermore, a newly-synthesized N-trifluoromethanesulfonyl biguanide derivative was also found to hinder the activation of integrin GPIIb/IIIa activation and type-1 transmembrane protein (CD62P) expression [32]. These findings have spurred interest in sulfa-drugs, including the biguanide modification into sulfonamides, and these compounds have become promising candidates for the repurposing of old drugs.

The aim of the present study was to compare the effects of metformin derivatives, consisting of a biguanide scaffold with various types of substituted sulfonamide moiety, on plasma hemostasis and endothelial function, thus gaining a better understanding of its activity in this regard. The effects of eight novel sulfonamide-based metformin derivatives (Figure 1) were assessed with regard to their glucose utilization and basic coagulation plasma hemostasis parameters. The studies included also more advanced coagulation parameters, such as the activity of coagulation Xa factor and antithrombin III (AT). In further studies, the examined compounds were screened for the overall potential of clot formation and fibrinolysis (CL-test). The second part of the study examined their effects on the viability, integrity, and morphology of HUVEC and human aortal smooth muscle cells (AoSMC). Following this, the study examined the impact of these novel metformin derivatives on the release of (t-PA) from human endothelial cells. Our findings showed that the chemical modification of the metformin scaffold into sulfonamides containing trifluoromethyl and an acetyl group leads to the formation of potential dual-action drug candidates with glucose-lowering properties and highly desirable anti-coagulant activity.

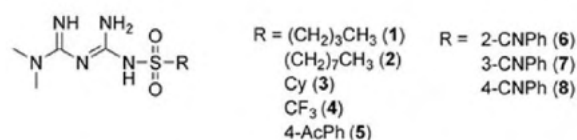


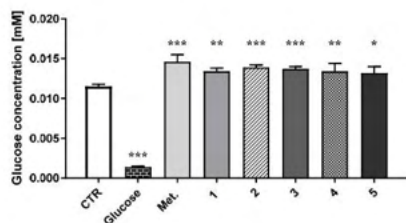
Figure 1. Structure of examined biguanides. Explanatory notes: Ac—acetyl, CN—cyano, Cy—cyclohexyl, Ph—phenyl.

2. Results

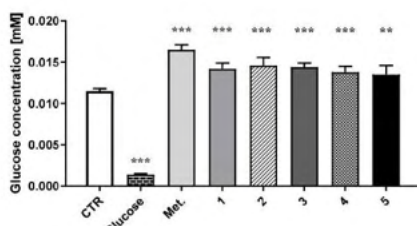
2.1. Intracellular Glucose Uptake

The effects of the examined sulfonamides (1–8) on glucose uptake in HUVEC cells were assessed using a fluorescent glucose analogue (2-NBDG). In these experiments, the cells were treated with compounds 1–8 at 0.1 and 0.3 mM for 24 h, followed by two-hour glucose starvation, and subsequent incubation with insulin and 2-NBDG (Figures 2 and S1, Table S1, Supplementary Materials). D-glucose was used as a negative control, which significantly inhibited the uptake of 2-NBDG (0.0014 ± 0.0001 mM versus 0.0115 ± 0.0003 mM for control, $p < 0.001$). A significant increase in 2-NBDG uptake was observed in the case of the reference drug, metformin, at both tested concentrations (0.0146 ± 0.0009 mM at 0.1 mM, and 0.0165 ± 0.0006 mM at 0.3 mM, $p < 0.001$). Importantly, compounds 1–5 were found to exert comparable effects to the parent drug, and profoundly elevated intracellular uptake of

fluorescently labelled glucose (Figure 2). Comparable effects were reported for compounds 6, 7, and 8 at 0.1 mM. These compounds possessing cyano substituents in the aromatic ring slightly increased glucose uptake; however, the changes were statistically insignificant (Figure S1, Table S1, Supplementary Materials). Compounds 7 and 8, with a CN group in the meta and para positions, at 0.3 mM contributed to the increased uptake of glucose in HUVEC cells ($p < 0.05$).



(A)



(B)

Figure 2. Effects of metformin and biguanide analogues 1–5 at the concentration of 0.1 (A) and 0.3 mM (B), and D-glucose at the concentration of 0.1 mM on the 2-NBDG uptake in HUVEC cells. The results are presented as mean \pm SD, $n = 4$ –6, and an asterisk denotes the significant differences between control and cells treated with glucose, metformin, or studied compounds. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

2.2. Viability of HUVEC and AoSMC Cells

The effects of compounds 1–8 on the viability of HUVEC and AoSMC cells were determined using WST-1 assay. The cells were incubated with the test compounds at various concentrations ranging from 0.006 mM to 5.0 mM. The results are presented in Table 1.

Among the tested compounds, derivative 2 with an *n*-octyl tail appeared to have the lowest effect on the viability of HUVECs, since, within the concentration range 0.006–5 mM, HUVEC viability decreased to 32.1%. Compounds 1 and 3 were also characterized by a relatively good safety profile, as their IC_{50} values were 3.643 ± 0.26 and 3.506 ± 0.24 mM, respectively. The obtained results indicate that compounds 1–5 inhibited HUVECs growth at the level of 24.15%–30.39% at the concentrations of 0.3 mM (Table S2, Supplementary Materials). For instance, compound 1 and 3 at the concentration of 0.3 mM contributed to the decrease of HUVECs viability by approximately 28.96% and 24.15%, respectively. The viability of HUVECs after 24-h stimulation with compound 2 at 0.3 mM was $71.48 \pm 3.12\%$ vs. $101.87 \pm 2.71\%$ for control. Based on the obtained results from the viability assay, we can conclude that compounds 4 and 5 exerted more toxic influence on HUVEC cell growth

up, and their IC_{50} values were 1.038 ± 0.15 and 1.589 ± 0.13 mM, respectively. Compounds 6–8, with a cyano substituent in the aromatic ring, were much more toxic towards HUVECs, with IC_{50} values ranging from 0.30 to 0.79 mM. In this subgroup of biguanides, compound 8 presented the highest IC_{50} value, which suggests that the para position of the CN group in the aromatic ring could be associated with greater safety, expressed as higher cell viability.

Test compounds 1–8 seemed to have a much lower effect on the viability of AoSMC, as IC_{50} values in the concentration range of 0.006–5 mM could not be determined for a few compounds (Table 1). However, for the remaining compounds, the IC_{50} values were significantly higher than their respective values for HUVEC cells. For instance, the compounds with the cyano group in the aromatic ring demonstrated IC_{50} values of 1.57–1.89 mM for AoSMC cells.

The effects of compounds 1–8 on HUVEC and AoSMC cells were also determined using light and phase-contrast microscopy. Representative images of cells treated with compounds at their IC_{50} value or at 3.0 mM are depicted in Figure 3. In HUVECs, treatment with the examined biguanides resulted in the formation of rounded and shrunken cells; in addition, in the case of compounds 4–8, elongation of cell bodies could be observed. The tested compounds appeared to have less influence on the morphology of AoSMC cells, manifested mainly by an increase in the number of round cells.

Table 1. The effects of sulfonamides 1–8 on HUVEC and AoSMC cells growth. The results (IC_{50} values, mM) are presented as mean \pm SD ($n = 6–8$).

Compound	Viability- IC_{50} [mM]	
	HUVEC cells	AoSMC cells
1	3.643 ± 0.26	>59% at 3 mM
2	n.d.	3.710 ± 0.54
3	3.506 ± 0.24	>76% at 3 mM
4	1.038 ± 0.15	>56% at 3 mM
5	1.589 ± 0.13	>62% at 3 mM
6	0.461 ± 0.13	1.685 ± 0.21
7	0.304 ± 0.12	1.891 ± 0.16
8	0.791 ± 0.13	1.573 ± 0.14

n.d.—not determined; at 3.0 mM the viability was 41.5%, and at 5 mM viability was 32.1%.

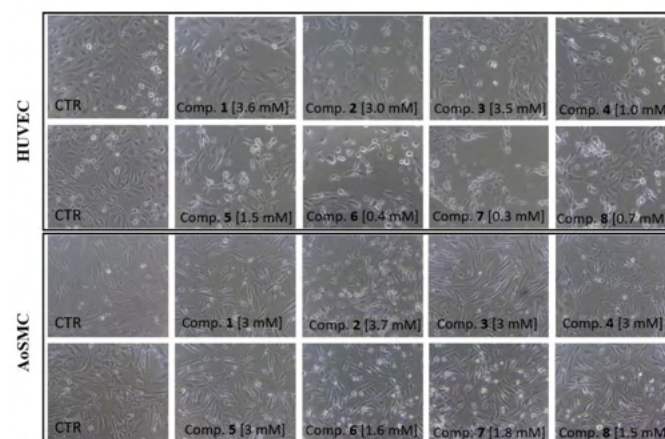


Figure 3. Effect of compounds 1–8 on HUVEC and AoSMC viability and morphology after 24-h incubation. Cells were cultured without (control, CTR) and in the presence of compounds 1–8 at a concentration of 0.006–5.0 mM. Representative cell images are shown for concentrations corresponding to IC_{50} values or 3 mM (100-fold magnification). Metformin was found to not affect the viability and morphology of HUVEC and AoSMC cells in our previous study [28].

2.3. HUVEC Cell Integrity

In HUVECs, the results of 36-h stimulation with the test compounds at concentrations of 0.3 and 1.0 mM are presented in Figure 4 (compounds 1–5), Figure S2 (compounds 6–8), and Table S3 (compounds 1–8) (Supplementary Materials). Cell integrity and shape, expressed by normalized cellular index (nCI), were affected by the structure and concentration of the examined biguanides. All studied compounds caused a profoundly greater reduction in nCI at a concentration of 1.0 mM than 0.3 mM over the entire time of observation.

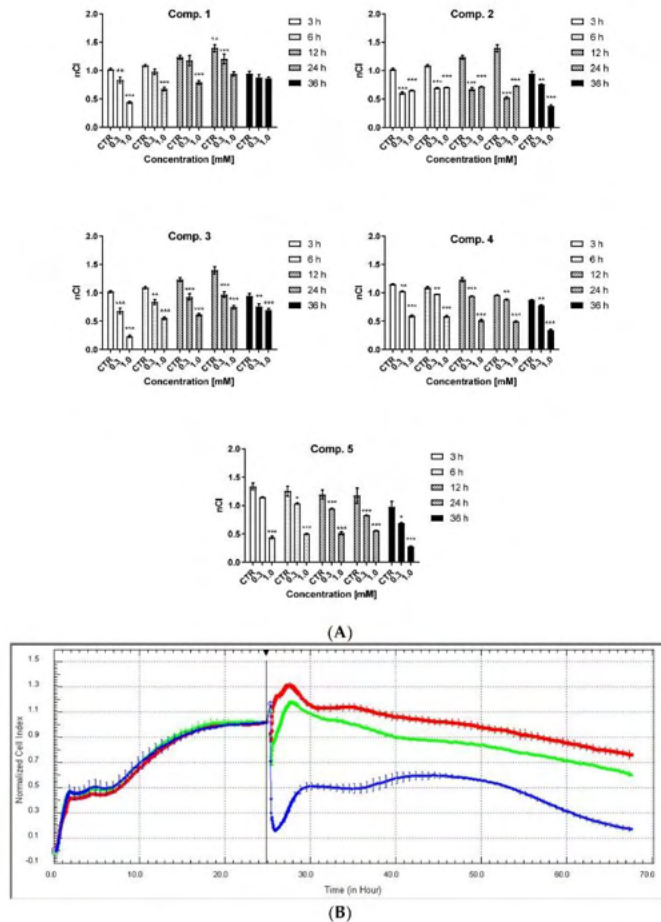


Figure 4. The effects of compounds 1–5 on the integrity of HUVEC analyzed in the RTCA-DP system. (A) The effect of the exposure of compounds 1–5 on normalized Cell Index (nCI) at selected time points (3, 6, 12, 24, and 36 h). The results are presented as mean \pm SD, $n = 4$ –5. An asterisk denotes a significant difference between sample treated with biguanide and control sample; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. (B) The effects of compound 5 on the barrier properties of HUVECs. The picture presents representative plots of one experiment conducted in duplicates (the results are presented as a mean (solid line) \pm standard deviation). For the statistical analysis, three independent experiments were conducted. Red line—control (unstimulated cells); green line—compounds at the concentration of 0.3 mM; navy blue line—1.0 mM.

Statistical analysis indicated that compound **1**, with an *n*-butyl chain attached to a sulfonamide moiety, exerted the least effect on the function of HUVEC cells: no statistically significant reduction of nCI was noticed after 36 h of stimulation (Table S3). The compounds with CN substituents in the aromatic ring (**6–8**) demonstrated the most unfavorable effect on HUVEC barrier properties; when administered at 1.0 mM, compounds **6–8** decreased nCI drastically, which was close to zero, while the other compounds reduced the integrity of endothelial cells by 40–60% depending on the time point of the analysis.

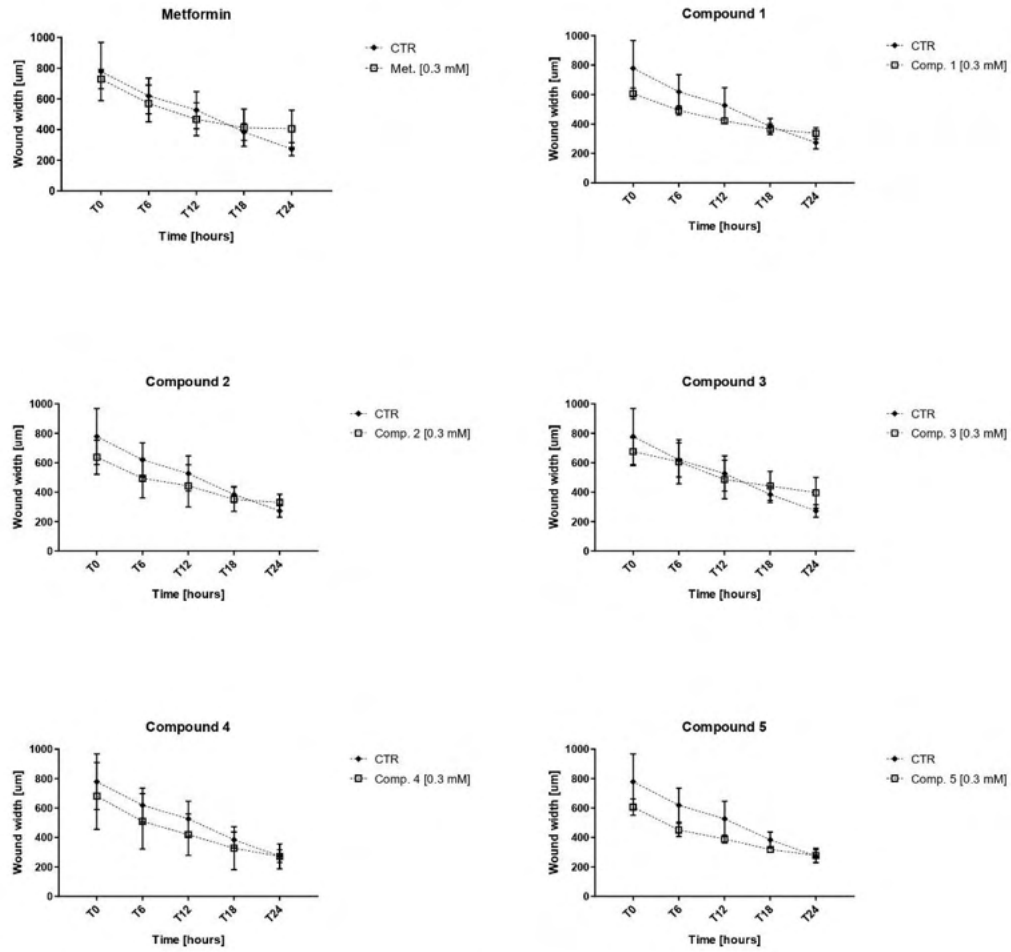
Metformin was not found to affect the integrity and adherence of HUVEC cells over the entire concentration range (0.006–1.5 mM) in our previous study [28]. For instance, after 24 h of co-stimulation with metformin at 1.5 mM, nCI was 0.95 ± 0.08 versus control 1.01 ± 0.07 [28].

2.4. Endothelial Cell Migration

Based on the results obtained in cellular studies, we decided to further examine compounds **1–5**. The effect of biguanides **1–5** on endothelial cell migration was investigated using an in vitro wound-healing assay. The test was performed using the JuLiStage device equipped with a camera which allows cell growth and migration to be visualized in real time. Metformin at 0.3 and 1.0 mM was used as a reference compound. HUVECs were monitored every 30 min over 24-h incubation. For the purposes of this publication, we analyzed the results at the starting point (T_0), and after 6, 12, 18, and 24 h. The potential for metformin derivatives **1–5** to affect HUVEC migration is presented in Table S4 (Supplementary Materials). The results are expressed as the width of the scratched wound calculated using JuLiStage software.

Metformin was found to slightly modulate cell migration, which was manifested by an increase in the width of the wound in comparison with control (Figure 5, Table S4). For instance, the wound width was 419.8 ± 42.3 μm after 24 h of treatment with metformin (1.0 mM) and 272.4 ± 42.2 μm for controls. However, none of the changes reported for metformin were found to be statistically significant. Comparable results were also obtained for other tested compounds (**1–5**). The results of the conducted studies indicate that the tested compounds have the greatest influence on the migration of HUVEC after 24 h of incubation. However, statistically significant inhibition of cell migration was reported only in the case of compound **5** at 1.0 mM ($p < 0.05$). Although other compounds also demonstrated inhibition of HUVEC migration, these effects were not statistically significant.

These results were also visualized by a series of images of cells at various time points. Figure S3 (Supplementary Materials) presents representative images of wound closure in control cells and cells treated with metformin, compound **1**, and compound **5** at 1.0 mM. As depicted in Figure S3, metformin did not induce significant changes in the morphology and migration of HUVECs. Treatment of HUVEC with compound **1** and **5** resulted in greater numbers of round cells. Careful analysis of the images suggests that compound **5** moderately inhibited HUVEC migration after 24-h treatment.



(A)

Figure 5. Cont.

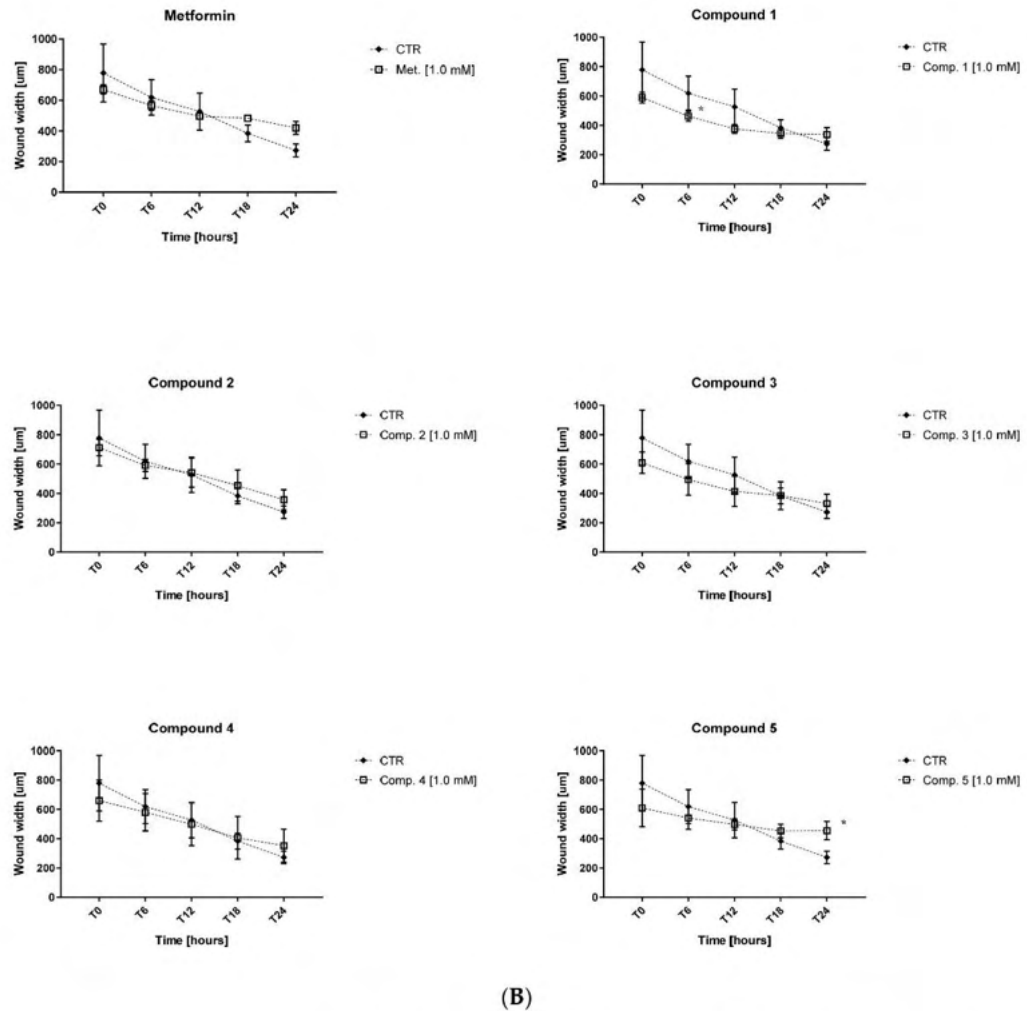


Figure 5. Impact of selected sulfonamides 1–5 and metformin on the migration of HUVECs was analyzed using wound-healing assay in the JulieStage system. The represented graphs reflect changes of the wound width (µm) during 24 h in the absence (control) and in the presence of selected compounds at the concentration of 0.3 (A) and 1.0 mM (B). The results are presented as mean \pm SD, $n = 4-8$; (* $p < 0.05$).

2.5. Tissue Plasminogen Activator (t-PA) Release from Human Umbilical Endothelial Cells

The effects of compounds 1–5 on t-PA release from HUVEC were also tested at concentrations of 0.3 and 1.0 mM (Table 2). Metformin has previously been reported to significantly elevate t-PA release [28]; however, all tested compounds reduced the amount of t-PA released from the cells in a concentration-dependent manner. For instance, compound 1 significantly decreased t-PA concentration in cell supernatants to 2427.2 ± 246.0 pg/mL at 0.3 mM ($p < 0.01$) and 1709.5 ± 219.1 pg/mL at 1.0 mM ($p < 0.001$), compared with 2895.4 ± 205.7 pg/mL for control. The other compounds exhibited analogous properties towards t-PA release in HUVEC cell model.

Table 2. Effects of sulfonamides 1–5 on the release of t-PA from HUVEC cells. The results (t-PA concentration in supernatants, pg/mL) are presented as mean \pm SD ($n = 6$). Values in bold are statistically significant in comparison with control samples. An asterisk denotes a significant difference between tested compounds and control samples (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Compound	Concentration (mM)	Released t-PA (pg/mL)
CTR	-	2895.4 \pm 208.7
1	0.3	2427.2 \pm 246.0 **
	1.0	1709.5 \pm 219.1 ***
2	0.3	1633.9 \pm 263.2 ***
	1.0	990.0 \pm 158.5 ***
3	0.3	1550.9 \pm 135.2 ***
	1.0	1267.1 \pm 350.6 ***
4	0.3	1958.3 \pm 175.3 ***
	1.0	1481.8 \pm 134.0 ***
5	0.3	1947.0 \pm 207.3 ***
	1.0	1326.2 \pm 149.4 ***

2.6. Basic Coagulation Studies

The effects of the synthesized sulfonamides 1–5 on basic coagulation parameters are shown in Table 3. Compounds 6–8 were also tested for their impact on the intrinsic and extrinsic coagulation pathways; however, the cyano derivatives showed anti-coagulant activity only at the concentrations which are higher than their IC_{50} values toward HUVECs. The effects of biguanides on the activation of extrinsic coagulation pathway were evaluated using the Prothrombin Time (PT) test. Importantly, compound 1 prolonged Partially Activated Thromboplastin Time (APTT) (Table 3) at concentrations from 0.06 to 1.5 mM; however, the changes were not statistically significant at the highest concentration tested. In addition, derivative 5 significantly extended APTT at the concentration 1.5 mM, outside the reference values. However, it should be noted that these results were recorded at a concentration that inhibits the viability of HUVEC by 50%.

Table 3. The effects of compounds 1–5 on basic coagulation parameters.

Compound	Concentr. (mM)	PT (s)	INR	APTT (s)	TT (s)
1	0 (CTR)	12.46 \pm 1.49	1.00 \pm 0.12	29.36 \pm 2.23	15.50 \pm 0.92
	0.006	13.04 \pm 2.41	1.04 \pm 0.19	35.12 \pm 4.75	14.03 \pm 0.94 **
	0.06	12.78 \pm 1.86	1.11 \pm 0.23	33.36 \pm 1.78 **	12.98 \pm 1.08 **
	0.3	13.46 \pm 2.71	1.08 \pm 0.22	33.76 \pm 2.53 *	13.90 \pm 1.24 *
	0.6	13.08 \pm 2.36	1.05 \pm 0.19	34.68 \pm 3.31 *	12.64 \pm 1.31 **
	1.5	13.48 \pm 2.93	1.08 \pm 0.23	34.68 \pm 5.21	13.03 \pm 0.86 **
2	0 (CTR)	12.38 \pm 1.68	0.99 \pm 0.13	30.77 \pm 4.03	15.76 \pm 0.36
	0.006	13.30 \pm 1.81	1.07 \pm 0.15	30.79 \pm 5.87	14.14 \pm 0.59 ***
	0.06	12.82 \pm 1.33	1.03 \pm 0.10	31.33 \pm 5.53	13.86 \pm 0.80 **
	0.3	13.10 \pm 1.37	1.05 \pm 0.11	33.49 \pm 4.85	13.48 \pm 2.10 **
	0.6	12.96 \pm 1.42	1.04 \pm 0.11	33.46 \pm 5.59	14.40 \pm 2.35
	1.5	13.20 \pm 1.23	1.06 \pm 0.10	34.83 \pm 6.22	16.32 \pm 2.21
3	0 (CTR)	12.60 \pm 2.54	1.01 \pm 0.20	30.90 \pm 2.92	15.58 \pm 1.07
	0.006	12.52 \pm 1.42	1.00 \pm 0.11	32.97 \pm 5.06	13.18 \pm 1.97 *
	0.06	13.02 \pm 1.90	1.04 \pm 0.15	34.50 \pm 4.52	13.14 \pm 2.01 *
	0.3	13.60 \pm 1.39	1.09 \pm 0.11	33.00 \pm 5.70	13.46 \pm 1.97 **
	0.6	13.66 \pm 2.27	1.09 \pm 0.18	33.17 \pm 5.34	13.50 \pm 1.74 **
	1.5	13.30 \pm 2.30	1.06 \pm 0.18	32.49 \pm 7.50	14.06 \pm 1.60 **

Table 3. Cont.

Compound	Concentr. (mM)	PT (s)	INR	APTT (s)	TT (s)
4	0 (CTR)	13.26 ± 2.06	1.06 ± 0.14	37.30 ± 6.38	16.00 ± 0.78
	0.006	12.18 ± 2.09	1.00 ± 0.15	33.04 ± 4.10	16.55 ± 1.11
	0.06	11.80 ± 1.24	0.93 ± 0.10	35.22 ± 2.68	14.83 ± 1.11
	0.3	11.38 ± 1.26	0.90 ± 0.10	34.14 ± 3.41	17.88 ± 3.58
	0.6	11.80 ± 0.39	0.95 ± 0.03	34.40 ± 4.46	17.78 ± 2.40
	1.5	12.02 ± 0.79	0.96 ± 0.07	43.85 ± 6.20	22.03 ± 2.29 **
5	0 (CTR)	12.90 ± 1.80	1.06 ± 0.13	34.80 ± 3.08	16.30 ± 1.72
	0.006	13.70 ± 3.41	1.09 ± 0.27	35.06 ± 5.82	16.55 ± 1.57
	0.06	11.52 ± 0.86	0.92 ± 0.07	32.66 ± 3.72	16.70 ± 2.48
	0.3	11.88 ± 1.08	0.95 ± 0.09	32.38 ± 2.48	18.48 ± 1.34
	0.6	11.98 ± 0.97	0.96 ± 0.08	36.10 ± 4.40	23.30 ± 2.25 *
	1.5	13.44 ± 1.18	1.05 ± 0.09	77.52 ± 9.85 ***	28.08 ± 1.49 ***

The results are presented as mean ± standard deviation, $n = 4-7$. Values in bold are statistically significant in comparison with control samples. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. The reference values: PT: 9.7–14.6 s; INR: 0.85–1.15; APTT: 26.7–40.0 s; TT: 14.0–18.0 s for 3.0 UNH/mL of thrombin.

The tested compounds had varied effects on fibrin polymerization. For instance, compound 1 with alkyl chain significantly shortened Thrombin Time (TT) over the entire concentration range, while compound 2 with *n*-octyl chain affected TT at concentrations of 0.006–0.3 mM. In addition, compound 4, with a trifluoromethyl substituent, and 5, possessing an acetyl group, significantly extended TT outside the reference value range (14.0–18.0 s). For instance, compound 5 at the concentration 1.5 mM prolonged TT to 28.08 ± 1.49 vs. 16.30 ± 1.72 s for control. Similarly to the measurements of APTT, these results are reported for high concentrations being responsible for substantial inhibition of HUVEC growth.

2.7. Factor X Activity

Factor X is a vitamin K-dependent serine protease, which is synthesized in the liver and participates in both intrinsic and extrinsic coagulation pathways. Factor X deficiency can be inherited or brought on by severe liver disease, vitamin K deficiency, or the administration of anti-coagulant drugs such as warfarin; it can also occur in association with a variety of medical conditions, such as atypical chronic lymphoid leukemia. Factor X deficiency may contribute to the elongation of PT and APTT [33].

The impact of tested biguanides on the activity of factor X (%) are presented in Figure 6 and Table S5 (Supplementary Materials). Significantly lower factor X activity was observed for compounds 1, and 5, and this effect was concentration dependent. Compound 1 and 5 at the highest concentration significantly decreased the activity of factor X ($p < 0.01$, $p < 0.05$), which may be responsible for prolonged APTT (Table 3). However, in the case of compound 5, it should be noted that these results were recorded for a concentration that inhibits the viability of HUVEC by 50%. The other compounds (2, 3) did not exert any relevant influence on factor X activity.

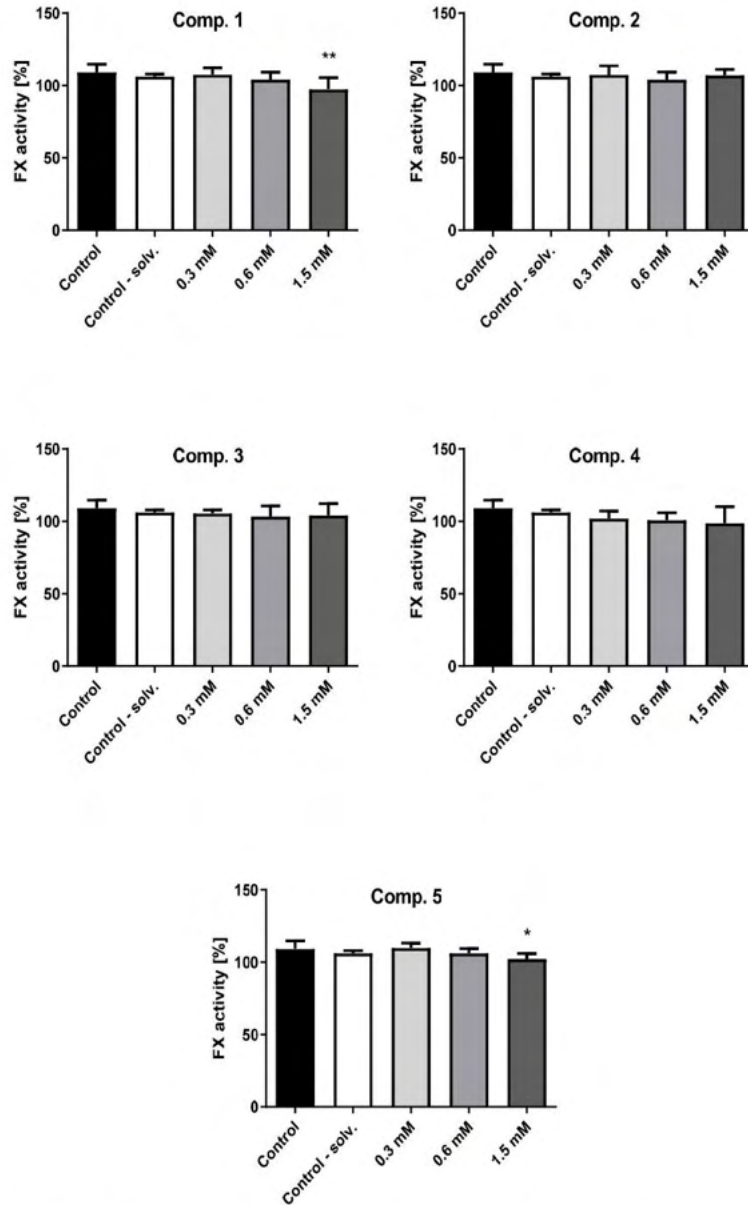


Figure 6. Effects of biguanides 1–5 on the activity of factor X (data are presented as mean \pm SD; $n = 4$ –5) after 1-min incubation with plasma-deficient factor X. The asterisk denotes a statistically significant difference between the samples treated with compounds and control; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

2.8. Antithrombin III (AT) Activity

AT is a plasmatic α -glycoprotein, and is one of the most important plasmatic inhibitors of the activation of coagulation factors, such as thrombin, and free Xa, IXa, and VIIa

plasmatic factors [34]. The activity of AT is measured by synthetic chromogenic substrate activity in the presence of excess heparin levels [35].

Figure 7 depicts the effects of compounds (1–5) on the activity of AT (Table S6, Supplementary Materials). All studied compounds apart from compound 2 with *n*-octyl chain significantly increased the activity of AT. In the case of compound 1, a significant elevation of AT activity was observed at 0.6 and 1.5 mM, and was $120.00 \pm 2.71\%$ and $123.00 \pm 5.20\%$, respectively ($p < 0.01$). For instance, compound 3 also significantly increased the activity of AT to 131.75 ± 6.65 at 0.6 mM ($p < 0.05$) and 136.75 ± 11.32 at 1.5 mM ($p < 0.05$). However, the results reported for compounds 4 and 5 should not be regarded as important since they were recorded at the concentrations contributing to significant HUVEC death.

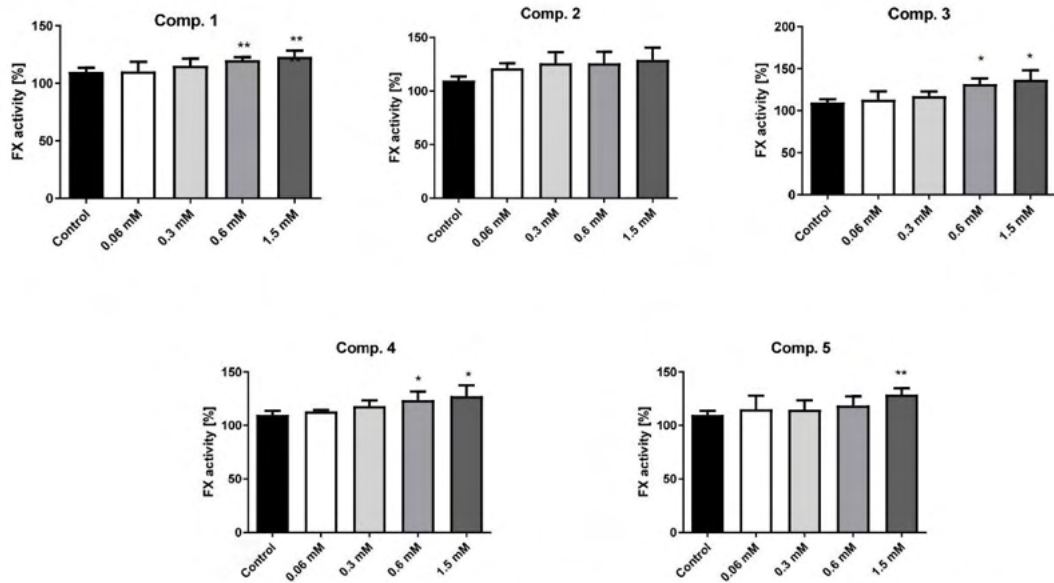


Figure 7. Effects of selected biguanides (1–5) on the activity of anti-thrombin III (AT) (data are presented as mean \pm SD; $n = 4$). The asterisk denotes a statistically significant difference between the samples treated with compounds and control; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

2.9. Clot Formation and Lysis Test (CL-Test)

Based on the results of the basic coagulation studies, compounds 1–5 were further tested for their impact on the overall potential of clot formation and fibrinolysis (CL_{AUC}) using the CL-test [36]. This comprehensive analysis evaluates the effects of the examined sulfonamides on the kinetic parameters of the clot formation process, clot stabilization, and fibrinolysis by continuous monitoring of changes in transmittance (Figure 8, Table S7, Supplementary Materials).

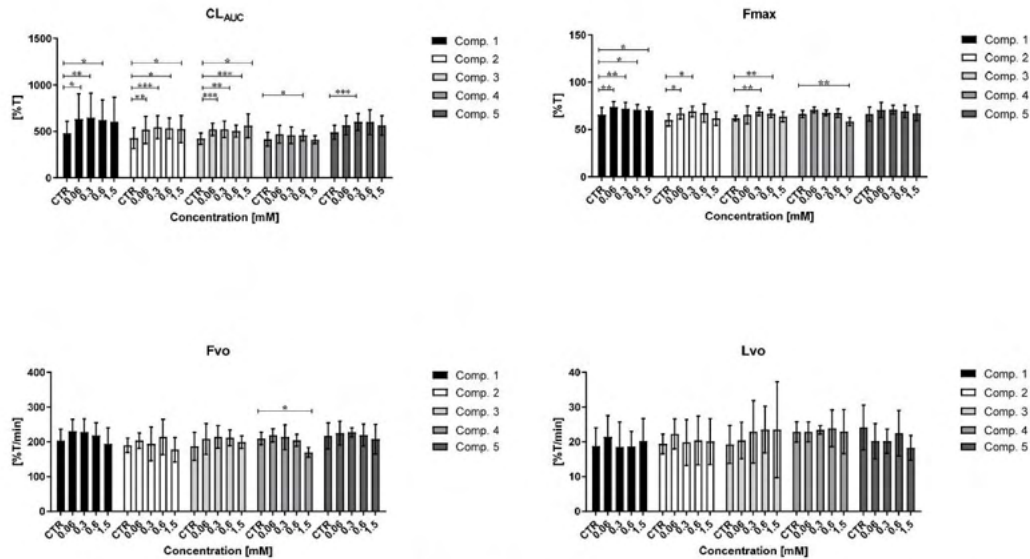


Figure 8. Influence of chosen biguanides 1–5 on overall potential of clot formation and fibrinolysis (CL_{AUC}), and selected parameters of clot formation and fibrinolysis process: maximum clotting (F_{max}); initial plasma clotting velocity (F_{vo}); initial clot fibrinolysis velocity (L_{vo}) (data are presented as means, $n = 5-7$). The asterisk denotes a statistically significant difference between the samples treated with compounds and respective controls; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. In our previous study, metformin did not affect the overall potential of clot formation and fibrinolysis (CL_{AUC}) over the entire concentration range and dimethyl biguanide did not influence the kinetic parameters of the clot formation process and fibrinolysis (F_{max} , F_{vo} , L_{vo} constants) [37].

2.9.1. Overall Potential of Clot Formation and Fibrinolysis (CL_{AUC})

Overall, the compounds tested increased the overall potential of clot formation and fibrinolysis ($\uparrow CL_{AUC}$), manifested by a statistically significant elevation of the area under the curve (AUC) of clot formation and fibrinolysis. Compound 4 stood out among the tested sulfonamides because it did not affect the overall potential of clot formation and fibrinolysis (CL_{AUC} constant) at the highest concentration (1.5 mM). These experiments also examined the overall duration of the clot formation and fibrinolysis process (T). Most of the tested compounds, apart from compound 5, were found to significantly prolong the entire process at the highest concentrations (0.6–1.5 mM). However, similar to the study results discussed previously, these data were obtained at the highest concentrations that adversely affected the viability of HUVEC.

2.9.2. Kinetic Parameters of Clot Formation Phase

One of the kinetic parameters of the clot formation phase is thrombin time (Tt), which expresses the time elapsed from the addition of exogenous thrombin (0.5 U/mL) to the beginning of clot formation. The obtained results showed that compounds 3 and 4 did not influence thrombin time (Tt constant), while compound 2 statistically significantly increased Tt at 1.5 mM ($\uparrow Tt$, $p < 0.05$). A detailed analysis of the data indicated that the tested compounds tended to shorten Tt when applied in the lower concentration range. Importantly, none of the compounds significantly affected the initial velocity of plasma clotting (F_{vo} constant), apart from compound 4 at 1.5 mM, which significantly decreased F_{vo} ($\downarrow F_{vo}$; $p < 0.05$). This change was reflected by a significant increase in plasma clotting time ($\uparrow Tf$) ($p < 0.01$). Incubation of human plasma with sulfonamide 4 at

the highest concentration was also associated with a significant reduction of maximum clotting ($\downarrow F_{\max}$), which can be connected to its influence on the structure of the formed clot or adverse effect on the whole process of clot formation similarly to HUVEC viability. In contrast, compounds **1**, **2**, and **3** profoundly increased the maximum clotting ($\uparrow F_{\max}$), depending on the concentration.

2.9.3. Kinetic Parameters of Clot Stabilization Phase

The second phase of the investigated process evaluated the clot stabilization time (T_c) and the area under the stabilization curve (S_c), as presented in Table S7 (Supplementary Materials). All compounds (**1**–**5**) significantly prolonged clot stabilization time ($\uparrow T_c$) and this effect was concentration dependent. These results indicated a delay in fibrinolysis. In addition, this alteration contributed to an increase in S_c , which suggests that these compounds may influence the clot structure.

2.9.4. The Kinetic Parameters of the Fibrinolysis Phase

A statistically significant increase in maximum fibrinolysis ($\uparrow L_{\max}$) was observed for compound **2** (0.06–0.3 mM) ($p < 0.01$, 0.05, respectively), and this was related to the increase of maximum clotting value ($\uparrow F_{\max}$). These results indicate complete lysis of previously-formed clots. Importantly, none of the tested sulfonamides significantly affected the initial velocity of fibrinolysis (L_{vo} constant) over the entire concentration range, which suggests that the previously formed clots do not persist longer than in the case of control samples. The significant effect on the fibrinolysis time ($\uparrow T_l$) was only observed for compound **1** (0.3–0.6 mM) ($p < 0.05$), and it was related with the elevated F_{\max} . It should be highlighted that most of the studied compounds, particularly at a higher concentration range, did not contribute to any significant increase in the area under the fibrinolysis curve (S_l constant).

2.10. Coagulation Assay

Coagulation assay is an effective method assessing the impact of new compounds on the process of coagulation after generation of endogenous thrombin. Our studies revealed that compounds **2** (1.5 mM), **4** (0.6 mM), and **5** (0.06–0.3 mM) induced statistically significant changes in the length of thrombin generation time ($\uparrow TG_t$), whereas compounds **1** and **3** did not affect TG_t (Table S8, Supplementary Materials). A reduction in maximum clotting (F_{\max}) was observed for compounds **2** and **5** at the highest concentration (1.5 mM), and these data suggest that the chemical structure of these sulfonamides affected the clot structure. No such significant effect was observed for the other compounds (**1**, **3**, **4**), suggesting that they did not affect the clot structure after generation of endogenous thrombin. Importantly, compounds **4** at 0.3–0.6 mM and **5** at 0.3–1.5 mM significantly increased plasma clotting time ($\uparrow T_f$) and decreased initial plasma clotting velocity ($\downarrow F_{vo}$). In contrast, compounds **2** and **3** did not induce any significant influence on F_{vo} or T_f . Compounds **2** and **5** also decreased overall coagulation potential ($\downarrow S$) at the highest concentration ($p < 0.05$), while coagulation potential remained constant for the others (S constant).

3. Discussion

Thanks to improvements in healthcare and nutrition, human life expectancy has greatly increased over the past few decades. However, an aging population is at greater risk of developing age-related diseases, including T2DM, cardiovascular diseases (CVD), neurodegenerative diseases (ND), and cancer. Despite our growing knowledge of their molecular basis, these conditions still lack effective novel treatments [38].

Of these conditions, the present paper places a strong emphasis on diabetes, which is a chronic, metabolic disease characterized by elevated blood glucose levels (hyperglycemia) and an impaired physiological balance between the coagulation and fibrinolysis processes described as diabetic thrombophilia; this is manifested by enhanced platelet aggregation capacity, increased coagulation factor activity, and hypofibrinolysis [39,40]. Microvascular complications in diabetes lead to an elevated risk of the occurrence of cardiovascular

events, which are recognized as the main cause of the mortality associated with T2DM. Metabolic abnormalities related to diabetes such as hyperglycemia, hyperlipidaemia, and insulin resistance, as well as interrelated conditions including oxidative stress, endothelial dysfunction, and inflammation elevate the risk of platelet hyperreactivity and the development of hypercoagulability. Undoubtedly, hyperglycemia also has a negative influence on the vascular endothelium, which constitutes the primary defence against thrombosis. Endothelial impairment leads to enhanced permeability, vasodilation of blood vessels, and activation of clotting factors [41–43].

Nowadays, because of its glucose-lowering effects and good tolerance, weight-lowering properties, and low risk of hypoglycemia, metformin is regarded as a gold standard for the treatment of T2DM [39,44,45]. Although metformin exerts beneficial pharmacodynamic properties, it also possesses unfavorable pharmacokinetics properties, such as relatively slow incomplete absorption, moderate bioavailability, and significant intra-subject and inter-subject variability, which may result in the lack or poor response to the drug. Metformin itself is a strong base, which is administered orally in the form of a salt-N, N-dimethylbiguanide hydrochloride. Due to its strongly polar guanidine structure, metformin also exists as a highly hydrophilic cationic molecule ($\log P$ octanol: water = -2.6) under physiological conditions, which limits its passive diffusion through the cell membranes; this results in the drug only having 50%–60% bioavailability [23,31,46,47]. A crucial role in metformin transport across cell membranes and its accumulation in various organs is played by organic cation transporters (OCTs). These specific carriers are responsible for the oral absorption, distribution, elimination, and biochemical effects of metformin in the human organism [10,41,46,47].

A rapidly growing body of literature indicates that sulphonamides have a versatile structure and a broad range of bioactivity, which make them excellent candidates for drug repositioning [7]. Following on from our previous studies, and considering the favorable pleiotropic properties of metformin and the potential for sulfonamide application in medicines with multiple modes of action, the aim of our present study was to evaluate a selection of eight new sulfonamide-based metformin analogues with glucose-lowering, anti-coagulant properties and effective intracellular uptake profiles as well as greater affinity towards Organic Cation Transporters (OCTs) [48], and to compare them with the parent drug.

Metformin is a glucose-lowering, insulin-sensitizing agent with a multidirectional mechanism of action. A key effect of metformin treatment is its potential for gluconeogenesis suppression based on inhibition of mitochondrial glycerolphosphate dehydrogenase (mtGPD) in hepatocytes [49,50]. Our findings suggested that all tested sulfonamides have the capability to elevate glucose utilization in HUVECs; however, statistically significant changes were observed for compounds 1–5. Of the tested compounds, the alkyl derivatives (1–3) deserve special attention because they demonstrated the most comparable effects to the parent drug, metformin. A fuller appraisal of the effect of the newly-synthesized compounds on glucose uptake requires further experiments using other cellular models, such as hepatocytes and pancreatic and skeletal muscle cells.

There are two essential components to blood vessels: endothelial cells (ECs) and vascular smooth muscle cells (VSMCs), which are responsible for correct vascular development and the maintenance of cardiovascular homeostasis. The endothelium not only acts as a physical barrier between the vessel wall and lumen, but also secretes a number of mediators that regulate platelet aggregation, coagulation, fibrinolysis, and vascular tone [23,46,51,52]. In contrast, VSMCs are responsible for maintaining vessel stability, including their normal shape and their proper motor function, i.e., vasoconstriction and vasodilatation, through active contraction and relaxation. VSMC dysfunction has a key influence on the genesis and development of atherosclerosis and hypertension [53–55]. There is also some evidence that inflammatory activation of the endothelium promotes hypertension development [23,46].

The next step in our studies was to evaluate the effects of sulfonamide derivatives 1–8 on the growth of HUVEC and AoSMC using cellular in vitro models. All tested analogues

demonstrated a comparatively lower influence on the viability of AoSMC than HUVECs, as indicated by WST-1 assay. Of all tested compounds, metformin analogues with alkyl tails (1–3) demonstrated greater safety, indicated by both cell lines demonstrating the highest viability. While, compounds 4 and 5 revealed moderate effects on HUVECs viability at the concentration up to ca. 1.0–1.5 mM. In contrast, compounds 6–8, with a cyano moiety in the benzene aromatic ring, showed more potent inhibitory effects on HUVEC and AoSMC growth, resulting in considerably lower viability. Therefore, cyanobenzenesulfonamides appeared to be the most toxic of all tested compounds, and were not considered for further anti-coagulation studies.

The viability of AoSMCs incubated with derivatives 1–5 (3.0 mM) decreased to 56%–76% depending on the tested compound. Taking into account the resulting cellular viability values, 3.0 mM may be regarded as a safe concentration for further studies of these compounds. Furthermore, phase contrast microscopy suggested that the tested compounds exerted a less profound influence on AoSMC morphology (increase in the number of round cells) than on HUVEC morphology (presence of round and shrunken cells). Only the samples treated with compounds 4–8 demonstrated elongated cell bodies.

Vascular endothelial cell integrity was evaluated using the Real-Time Cell Electric Impedance Sensing (RTCA-DP) system, which is based on changes in the biological status of the cells (nCI parameter) following treatment with compounds 1–8. For this purpose, the RTCA-DP system was used to determine cell number, proliferation rate, size, and shape, and to estimate the quality of cells adhering to the wells [56]. In the current study, a more significant decrease in HUVEC integrity was observed for sulfonamides 1 to 8 at concentrations, i.e., 1.0 mM, higher than 0.3 mM. For compound 1, no significant influence on nCI value was identified after 36-h incubation for either concentration; this suggests that this sulfonamide derivative, with an *n*-butyl chain, exerted considerably smaller effects on HUVEC integrity, and did not appear to affect the immediate cellular response or cell adhesion, as reflected in the WST-1 assay results. The cyanobenzenesulfonamides (6–8) demonstrated the most unfavorable influences on cellular viability during the 36-h incubation period; an immediate decrease in CI value was observed, which continued throughout the entire co-treatment. The RTCA-DP and WST-1 data, as well as the morphology analysis, after 36-h incubation suggest that the observed reduction of nCI value is associated with profound changes in cellular viability. Therefore, compounds 6–8, i.e., with a cyano group in the aromatic ring, were not examined in further studies due to their greater toxicity. It should be emphasized that the decreased cell adhesion and integrity observed following treatment with all other sulfonamide analogues do not appear to be associated with considerable alterations in cell viability.

External factors such as hyperglycemia, hyperlipidemia, hypertension, obesity, and inflammatory agents can induce endothelium activation, resulting in its dysfunction, excessive proliferation, and the formation of atherosclerotic plaques. As such, the modulation of EC metabolism may be a critical step in controlling the initiation and progression of atherosclerosis [57–59]. In addition to the loss of the endothelial barrier, atherosclerotic lesion development is also influenced by the migration and proliferation of smooth muscle cells (SMC) [60,61]. Therefore, compounds with potential inhibitory effects on the migration of pathological cells may be of value in suppressing atherosclerosis development.

The compounds were therefore subjected to endothelial cell migration study using the wound-healing assay. This was performed using the JuLiStage system, which allows real-time monitoring of live cells. The results indicated that metformin and their novel analogues (1–5) inconsiderably modulated cell migration during 24-h incubation. Only compound 5, the acetylbenzenesulfonamide derivative, demonstrated some significant effects, i.e., a moderate suppression effect on endothelial cell migration. However, it should be noted that these effects might stem from inhibitory properties on HUVEC cell growth. The greatest inhibitory influence on HUVEC migration was achieved after 24-h stimulation.

Tissue plasminogen activator is a serine protease, which is synthesized in ECs occurring in blood plasma and is recognized as a marker of endogenous thrombolysis potential.

The primary function of t-Pa includes catalyzing the conversion of plasminogen to plasmin, which is the primary enzyme involved in dissolving blood clots [62–64]. Metformin has previously been reported to significantly elevate t-PA release [28]; while, all tested compounds reduced the amount of t-PA released from the cells in a concentration-dependent manner. However, a review of the current academic literature does not provide an unequivocal answer in regard to the effect of metformin on the level of t-PA in both diabetic patients and healthy individuals, since the results of the studies indicated diversified effects. To deeply analyze the connection between the influence of the tested derivatives and metformin on the level of t-Pa and the ability to convert inactive plasminogen into active plasmin, it is of vital importance to conduct further in-depth studies to assess the activity of plasmin, the main enzyme converting fibrin into fibrin degradation products.

The hemocompatibility of newly-synthesized compounds is usually determined based on blood coagulation tests. In the present study, the quality of the extrinsic and intrinsic coagulation pathways was determined based on basic coagulation parameters including PT and APTT. Importantly, xenobiotics with shorter APTT may result in pro-coagulant imbalances, which would be associated with an enhanced risk of venous thromboembolism; in contrast, prolonged APTTs may indicate potential anti-coagulant properties [65–67].

The thrombin time is a clot-based test which measures the time required for fibrin clot formation following the addition of a standard amount of thrombin to plasma bypassing other coagulation factors. The results imply that compounds **4**, with trifluoromethyl substituent and **5**, with an acetyl group significantly prolonged TT. Not only did biguanide **5** affect the process of fibrin polymerization, reflected in longer TT, but it also inhibited the intrinsic coagulation pathway, indicated by APTT being prolonged to outside reference values. These beneficial effects were revealed by compounds **4**, **5** at concentrations of 0.6–1.5 mM, which are close to their IC₅₀ values towards HUVEC viability (Table 1). However, the development of compounds that are able to improve basic hemostasis parameters at the beginning of preclinical studies is highly desirable, and may allow the development of new derivatives with more favorable anti-coagulant properties compared with the parent drug.

The extrinsic and intrinsic clotting pathways converge into a common path, of which the first element is factor X (FX), which converts prothrombin into thrombin. As such, our present studies examined the influence of compounds **1–5** on the activity of clotting factor X; the results provided an insight into their potential anti-coagulant properties. In particular, biguanide **1** significantly decreased the activity of the Stuart-Prower factor, which demonstrates that this derivative significantly influences APTT. Therefore, it appears that the new biguanide **1** analogue has more noticeable anti-coagulant activity than metformin.

It should be mentioned that in all types of diabetes, the main pro-coagulation agents are hyperglycemia and oxidative stress. Oxidative stress results in the inactivation of antithrombin III, overproduction of kallikrein, activation of the kininogenesis cascade, and excessive release of the antifibrinolytic factor PAI-1 from damaged endothelial cells in hyperglycemic states [62,68–70]. Therefore, the present study also estimated the action of biguanides **1–5** on the activity of AT. The results indicated that compounds **1** and **3–5** significantly increased AT activity, which can also explain their effects on measured APTT. These sulfonamides, and their capacity to significantly increase AT activity, confirmed highly beneficial anti-coagulant properties. It should be taken into account that significant elevation of AT for derivatives **4–5** was noted at concentrations that unfavorably affect the viability of HUVEC, resulting in its decrease of 50% (Table 1).

Compounds **1–5** were selected for further in-depth coagulation studies using the CL-test. This multiparametric method provides an insight into the effects of these compounds on the kinetic parameters of clot formation and fibrinolysis. Regarding the clot formation phase, the biguanide analogue with the *n*-octyl tail (**2**) significantly increased thrombin time (↑Tt), as did the trifluoromethyl derivative (**4**), which slightly prolonged Tt at the highest concentration; this was in accordance with the outcomes of the TT experiment. These data suggest that compounds **2** and **4** influence the process of fibrin polymerization.

Similarly, compound **4** also significantly reduced initial clot formation velocity F_{vo} ($\downarrow F_{vo}$; $p < 0.05$) and maximum clotting ($\downarrow F_{max}$) ($p < 0.01$) while increasing plasma clotting time ($\uparrow T_f$) ($p < 0.01$). These findings suggest that compound **4** might have the capability to delay the process of clot formation by altering thrombin activity. It is worth noting that the concentrations at which compound **4** showed potential anti-coagulant properties were close or higher than its IC_{50} value towards HUVEC viability. Therefore, it can also be conjectured that this beneficial action of compound **4** can be also connected to its unfavorable effect on the whole process of clot formation, similarly to HUVEC viability, and it would require further in-depth studies. It should be also stressed that the remaining compounds did not significantly affect the initial velocity of plasma clotting (F_{vo} constant).

However, as both the initial velocity of fibrinolysis (L_{vo}) and fibrinolysis time (T_l) remained constant for compounds **2–5** over the entire concentration range, it appears that previously-formed clots did not persist longer than in the case of control samples; as such, they are not associated with any risk of slowing fibrinolysis. The obtained values for maximum lysis (L_{max}) reflect those observed for F_{max} , which suggests that previously-formed clots were completely lysed. However, most of the tested biguanides appeared to increase the overall potential of clot formation and fibrinolysis ($\uparrow CL_{AUC}$) with a concomitant increase of the overall duration of the entire process ($\uparrow T$). The most neutral compounds towards the overall potential of clot formation and fibrinolysis, and kinetic parameters of this process, appeared to possess compounds **4** and **5**; however, the reported changes occurred only at the high concentrations contributing to the substantial decrease in the HUVEC viability (Table 1).

The overall potential of plasma coagulation is determined by a comprehensive appraisal of the coagulation process. In this method, the small amounts of thrombin and calcium chloride are used to induce a feedback reaction, which causes the generation of endogenous thrombin and subsequent coagulation [71]. During the experiments, we noticed that tested compounds **2** (1.5 mM), **4** (0.6 mM), and **5** (0.06–0.3 mM) significantly delayed the process of thrombin generation, and that this process was concentration dependent. Furthermore, sulfonamides **4** and **5** prolonged plasma clotting time ($\uparrow T_f$) while decreasing the initial plasma clotting velocity ($\downarrow F_{vo}$); this indicates that their chemical structure may influence the activity of thrombin. It is highly important to highlight that the reported changes occur at concentrations which are lower than compounds' effects on HUVEC viability (Table 1). These results imply that the above-mentioned compounds can exert favorable effects on plasma coagulation. The only exception was compound **3**, which did not affect any of the coagulation parameters.

4. Materials and Methods

4.1. Materials

Basic coagulation studies were performed using Bio-Ksel reagents (Grudziądz, Poland): APTT reagent, calcium chloride, Bio-Ksel PT plus reagent (tromboplastin and solvent), and thrombin (3.0 UNIH/mL) for TT experiments. Calibrator (Bio-Ksel, Grudziądz, Poland), normal plasma (Bio-Ksel, Grudziądz, Poland), and water for injection (Polpharma, Gdańsk, Poland) were used for calibration and establishment of the coefficient of variation (for PT, APTT, TT studies).

Factor X activity was assessed with using factor X-depleted plasma (Bio-Ksel, Grudziądz, Poland), thromboplastin (Bio-Ksel, Grudziądz, Poland), and 0.9% saline. Tris buffer (50 mM) with heparin (2 U/mL) (Bio-Ksel, Grudziądz, Poland), chromogenic substrate (Bio-Ksel, Grudziądz, Poland) were used for antithrombin III measurements.

The CL-test used thrombin (Biomed Lublin, Lublin, Poland), recombinant tissue plasminogen activator (t-PA; Boehringer-Ingelheim (Ingelheim am Rhein, Germany), Tris-buffered saline (TBS; Polish Chemical Reagents, Gliwice, Poland), sodium chloride, and calcium chloride (Polish Chemical Reagents, Gliwice, Poland).

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were purchased from Lonza (Clonetics, Basel, Switzerland), and cultured according to the manufacturer's guidelines. The

following reagents were used for HUVEC maintenance: EGM-2—medium + bullet kit (Lonza, Clonetics, Basel, Switzerland), accutase (Sigma, St. Louis, MO, USA), and HEPES buffered saline solution (Lonza, Clonetics, Basel, Switzerland).

Human aortal smooth muscle cells (AoSMC) were purchased from ScienCell Research Laboratories (Carlsbad, CA, USA) and cultured according to the manufacturer's guidelines. The AoSMC cell culture medium included 500 mL basal medium (SMC, ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA, USA), 10 mL fetal bovine serum (FBS, ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA, USA), 5 mL smooth muscle cell growth supplement (SM-CGS, ScienCell Research Laboratories, USA), and 5 mL penicillin/streptomycin solution (ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA, USA). The AoSMCs were passaged in trypsin/EDTA (ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA, USA), Trypsin Neutralizing Solution (ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA, USA). Poly-L-Lysine (ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA, USA) was used to coat the culture flasks.

Glucose uptake studies were conducted using 2-NBDG (2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Cell viability was estimated using WST-1 assay (Takara, Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, France). E-Plate 16 View (Roche & ACEA Biosciences, Santa Clara, CA, USA) and phosphate-buffered saline (PBS, Biomed Lublin, Lublin, Poland) were used for estimation of integrity of HUVECs in the real-time cell electric impedance sensing system. Human tissue plasminogen activator ELISA kit (Abcam, Cambridge, UK) was used for evaluation of t-PA concentration in the HUVEC supernatants.

4.2. Studied Compounds

The synthesis protocol, chemical characterization, and basic properties of the studied compounds 1–8 (Figure 1) were described previously [48]. All compounds were found to be stable in Tris buffer and human plasma [48].

4.3. Plasma Preparation for Basic Coagulology Tests

The experiments on the biological material were accepted by the Bioethics Committee of the Medical University of Lodz (Medical University of Lodz, Poland, approval no. RNN/105/20/KE). The studies on human biological material were conducted in accordance with Polish national directives. The tested human blood constituted a residual material of routine diagnostic studies destined for removal as medical waste.

The blood was collected into vacuum tubes stuffed with 3.2% buffered sodium citrate. Platelet poor plasma (PPP) was obtained by centrifugation at $3000 \times g$ for 10 min at room temperature using a Micro 22R centrifuge (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany). The obtained PPP was stored in small aliquots for up to one month at -30°C . Before each experiment, PPP was restored at 37°C for 15 min. Once thawed, the PPP was not frozen again nor used for retesting.

4.4. Glucose Utilization Assay

HUVEC were seeded at a density of 20,000 cells per well in 48-well plates, and were cultured in standard conditions for 24 h (medium EGM-2; volume 0.2 mL). Following this, compounds 1–8 were added at concentrations of 0.1 and 0.3 mM, and the HUVECs were incubated for another 24 h. Cells treated with D-glucose (final concentration in a sample 0.1 mM) were used as positive controls. On the following day, the cells were rinsed with PBS (Biomed Lublin, Lublin, Poland) and cultured for two hours in glucose-free DMEM medium supplemented with 1% BSA (bovine serum albumin, Sigma, St. Louis, MO, USA). Then, the cells were co-treated with insulin (final concentration 0.0001 mM) for 30 min. Afterwards, the medium was discarded and the cells were treated with 2-NBDG (final concentration 0.05 mM) for 30 min, followed by removal of the solutions of each well. The cells were washed twice with 100 μL PBS, and lysed using 1% Triton X-100 solution in PBS. The fluorescence was recorded using a microplate reader (Biotek, Instruments, Winooski, VT, USA) at 480/530 nm.

The concentration of intracellular 2-NBDG was calculated using a calibration curve obtained using 2-NBDG at concentrations ranging from 0.0001 to 0.025 mM in lysis buffer. The results are presented as mean \pm SD, $n = 4$ –6. The coefficient of variation for the assay was calculated (CV = 2.2%, $n = 8$).

4.5. Cell Viability Assay

HUVEC and AoSMC viability were tested using the WST-1 cell viability assay (Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, France). The study protocol is given in detail elsewhere [72]. Briefly, HUVEC and AoSMC were seeded at densities of 7500 and 5000 cells per well on 96-well plates. The cells were cultivated for up to 24 h to achieve 70% confluency, and subsequently treated with tested compounds diluted in medium (1 + 9; $v = 100$ μ L) or pure medium (control). The plates were incubated at 37 °C (5% CO₂) for the next 24 h. Then, the cells were rinsed with 100 μ L culture medium, and WST-1 reagent diluted in medium (100 μ L) was added; the plates were then incubated again (37 °C, 5% CO₂) for another 90 min. The absorbance was measured at 450 nm (iMARK, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The experiments were performed in triplicate ($n = 8$) and the results were presented as mean \pm SD. The cell viability was expressed as a percentage of the control samples, which constituted 100% viability. Where possible, IC₅₀ values (the concentration of tested compound inhibiting cell growth by 50%) were calculated using concentration-response curves (GraphPad Prism 5, San Diego, CA, USA). The variability coefficient of the method was estimated (CV_(HUVEC) = 8.94%, $n = 8$; CV_(AoSMC) = 5.84%, $n = 10$).

The impact of the tested derivatives on HUVEC and AoSMC morphology was examined using an inverted microscope with phase contrast (magnification 100 \times) (Opta-Tech, Warszawa, Poland, software OptaView 7).

4.6. HUVEC Integrity Studies

The effects of sulfonamides 1–8 on the integrity and barrier properties of HUVEC were examined in real-time using a cell electric impedance monitoring system (Real-Time Cell Analyzer; Roche & ACEA Biosciences, Santa Clara, CA, USA), which is based on tracking electrical impedance signals. Any changes in cell status, adhesion, and morphology are expressed by parameter Cell Index (CI) [73]. The experimental protocol has been described previously [28]. Briefly, the cells were seeded at a density of 15,000 cells per well on E-16 plates (Roche & ACEA Biosciences, Santa Clara, CA, USA), and cultured until the cells achieved plateau phase. Then, the medium was discarded from each well, and the solutions of the test compounds dissolved in cell culturing medium (100 μ L) or pure medium (100 μ L, control) were added. The measurements were then carried out for 48 h. The results are presented as mean \pm SD of 'normalized cell index' (nCI), which is calculated by the division of a CI value at a certain time point by the CI value at a reference time point. The experiments were conducted in triplicate ($n = 4$ –6). The method was validated and the coefficient of variability (CV) was calculated as 9.17%–15.2%, depending on the measured time point ($n = 6$).

4.7. HUVEC Migration in Real Time

The effects of compounds 1–5 on HUVEC migration were determined using the JuLI™ Stage system (NanoEntek, Seoul, Korea): a real-time cell history recorder allowing for live cell imaging and analysis [74]. The procedure for the migration experiments has been published elsewhere in more detail [74]. Concisely, HUVECs were seeded at a density of 10,000 cells per well on 96-well plates and incubated at standard conditions for 24 h. Following this, a wound was made with a scratcher (NanoEntek, Seoul, Korea). The cells were then rinsed with 100 μ L of fresh EGM2 medium, and treated with biguanides 1–5 at the concentrations of 0.3 and 1.0 mM. The cells were incubated and monitored continuously every 10 min for 36 h at 37 °C, 5% CO₂. Analysis of obtained images of cell migration, and measurements of the width of the scratch area were performed using dedicated software

(NanoEntek, Seoul, Korea). The results were presented as mean \pm SD, $n = 4-8$. The CV for the method was estimated as 14.2–24.4%, depending on the time point ($n = 8$).

4.8. Tissue Plasminogen Activators Release from Endothelial Cells

The influence on tissue plasminogen activator release from HUVECs was assessed using an ELISA kit (Abcam, Cambridge, UK). HUVECs seeded at a density of 10,000 per well on 96-well plates were co-incubated with compounds 1–5 at the concentrations of 0.3 and 1.0 mM for an additional 24 h (37 °C, 5% CO₂). The cell supernatants were discarded into Eppendorf tubes and preserved at –20 °C until analysis. Before the tests, the samples were thawed at room temperature for 15 min, and diluted 2.5-fold with diluent in Elisa kit. The measurements of t-PA concentrations in cell supernatants were conducted according to the manufacturer's protocol using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) as a chromogenic substrate. The concentration of t-PA in HUVEC supernatants was determined using a calibration curve ($R^2 = 0.9936$). The results are presented as mean \pm SD, $n = 6$. The CV for the applied method was 7.21%.

4.9. Basic Coagulation Tests: PT, INR, APTT, TT

The effects of biguanidines (1–5) on the basic coagulation parameters (PT, INR, APTT, and TT) were carried out using a CoagChrom-3003 coagulometer (Bio-Ksel, Grudziadz, Poland), according to the routine laboratory diagnostic procedure [37]. The studies were performed in triplicate ($n = 4-7$). The control samples containing distilled water and methanol (1:1) were also included.

The results are presented as mean \pm standard deviation (SD). The methods were validated, and coefficients of variability for all experiments were calculated (PT: CV = 10.25%, APTT: CV = 8.55%, TT: CV = 4.87%). The reference values for each test are as follows: PT: 9.7–14.6 s; APTT: 26.7–40.0 s; TT: 14.0–18.0 s for 3.0 UNIH/mL of thrombin.

4.10. Factor X Activity

The activity of FX was measured optically using deficient plasma factor X [75]. The content of each sample was as follows: 50 μ L of four-fold diluted PPP, 50 μ L of deficient plasma factor X, 10 μ L of the examined compound, and 100 μ L PT reagent. The control samples contained 10 μ L of distilled water and methanol (1:1). The measurement of PT time was recorded using a CoagChrom-3003 coagulometer (Bio-Ksel, Grudziadz, Poland). The activity of factor X was counted using a calibration curve ($R^2 = 0.999$) performed on a calibrator diluted in the range 1:5–1:80 [76]. The variation in plasma coagulation time is proportional to the concentration and activity of factor X in the patient plasma treated with the tested compounds. The coefficient of variability for the method was calculated as CV = 1.80%. The reference values for factor X activity ranged from 77–131%.

4.11. Activity of Antithrombin III (AT)

The activity of AT in human plasma was estimated spectrophotometrically using a diagnostic laboratory method [75]. The test samples consisting of pre-warmed PPP diluted 30-fold (50 μ L), thrombin (10 U/mL) dissolved in Tris buffer (50 mM) in the presence of excess heparin (2 U/mL) (50 μ L), and 10 μ L of examined compounds were incubated for one minute (37 °C). In the control samples, 10 μ L of distilled water and methanol (1:1) was used. The reaction was initiated by the addition of a chromogenic substrate dissolved in water for injection; as a result, *p*-nitroaniline was released proportionally to the level of AT. The evaluation of AT level was performed on the basis of a calibration curve performed on calibrator diluted in the range 1:30–1:120 ($\lambda = 405$ nm) by the coagulometer program (CoagChrom-3003 Bio Ksel, Grudziadz, Poland). The coefficient of variability for the method (CV) was 2.69%, and the reference range was 80%–130%.

4.12. Clot Formation and Fibrinolysis Test (CL-Test)

The effects of the selected sulfonamide derivatives on overall hemostasis potential by means of clot formation and fibrinolysis test (CL-test) were further tested based on the continuous measurement of the changes in optical transmittance over time, as described by Kostka et al. [36] and Sikora et al. [71]. These experiments were conducted using 470 μL of three-fold diluted human citrate plasma, 10 μL of the tested compounds, and 10 μL t-PA (final concentration in a sample 220 ng/mL). The clot formation was triggered by thrombin (10 μL , final concentration 0.5 IU/mL). The clot formation and lysis curves were determined at a wavelength of 405 nm with a spectrophotometer (Cecil CE 2021; London, UK) with circulating thermostated water (37 °C) and a Model 300 Electronic Stirrer (Rank Brothers Ltd., Cambridge, UK). The experiments were conducted in triplicate ($n = 5-7$), and the results are presented as mean \pm SD.

The received graphs were analyzed using dedicated software [36] to determine the kinetic parameters of clot formation, stabilization, and fibrinolysis. The following parameters of clot formation were determined: Tt—thrombin time (s), Fmax—maximum clotting (%T), Tf—plasma clotting time (s), Fvo—initial plasma clotting velocity (%T/min), Sr—area under the clot formation curve (%Txmin). The parameters of the clot stabilization phase comprised Tc—clot stabilization time (s), Sc—area under the curve of stable clot formation (%Txmin). The parameters of fibrinolysis comprised Lmax—maximum lysis (%T), Tl—fibrinolysis time (s), Lvo—initial clot fibrinolysis velocity (%T/min), Sf—area under the fibrinolysis curve (%Txmin). Additionally, the overall potential of clot formation and fibrinolysis (CL_{AUC}, (%Txmin)) and total time of the process of clot formation and fibrinolysis (T, (s)) were also estimated.

The method of clot formation and fibrinolysis was validated, and the coefficient of variation (CV) for pooled human plasma ($n = 7$) was within the range of 3.74–14.53% depending on the calculated parameter [74].

4.13. Coagulation Assay

The coagulation assay is a modification of the CL-test, in which a high concentration of thrombin (0.5 IU/mL) is replaced by small amounts of thrombin (0.00312 IU/mL) and calcium chloride (5 mM). These reagents induce a feedback reaction leading to the generation of endogenous thrombin, and coagulation [37,71]. The other experimental conditions were the same as for the CL-test (Section 4.12).

The obtained curves were analyzed using dedicated software [36] that estimates the following parameters: TGt—thrombin generation time (s), Fmax—maximum clotting (%T), Tf—plasma clotting time (s), Fvo—initial plasma clotting velocity (%T/min), Sf—area under the clot formation curve (%Txmin), Tc—clot stabilization time (s), S—area under the curve of coagulation (%Txmin).

4.14. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using Statistica 12.0 (StatSoft, Kraków, Poland) and GraphPad Prism 5 software (San Diego, CA, USA). The Shapiro-Wilk test was used to check the normality of the distribution of continuous variables, while the homogeneity of variances was verified using Levene's test. The paired *t*-test was performed to test the dependent variables (e.g., studies on biological material), while statistically significant differences between the means of independent groups were identified using one-way ANOVA. The results of all the tests were considered significant at *p*-values lower than 0.05.

5. Conclusions

This paper described a biological evaluation of the effects of eight novel sulfonamide-based derivatives of metformin on vascular hemostasis, plasma properties, and cell function using experimental *in vitro* models. Our novel findings demonstrate that sulfonamides with alkyl chains (1–3), trifluoromethyl substituent (4), or an acetyl group (5) significantly

increased glucose uptake in HUVECs, and that the obtained data are comparable to those received for the parent drug, metformin.

It should be emphasized that metformin analogues with alkyl tails (1–3) did not affect either HUVEC or AoSMC viability at concentrations up to 3.0 mM. In contrast with the above-mentioned compounds, derivatives 4 and 5 revealed a more toxic influence to HUVEC cells at the concentration of ca. 1.0–1.5 mM. These results are in agreement with those received in HUVEC integrity studies using RTCA DP. Studied compounds exerted comparable effects on HUVEC migration in wound healing assay to the parent drug, metformin.

Previous studies indicate that metformin affects neither the intrinsic or extrinsic coagulation pathway (PT, APTT), nor the kinetic parameters of clot formation or fibrinolysis (CL-test), nor the activity of factor X, nor HUVEC or AoSMC viability within the concentration range 0.006–3.0 mM [37,75,77]. Taken together, our research indicated that among all tested compounds, butylsulfonamide (1), octylsulfonamide (2), and cyclohexylsulfonamide (3) deserve special attention because they not only demonstrated the greatest safety profile on both cell lines but also significantly increased glucose uptake compared with the parent drug, metformin. Importantly, these compounds beneficially affect some parameters of plasma hemostasis, and therefore exert more profound anti-coagulation activity than metformin. In addition, our present findings suggest that trifluoromethanesulfonamide (4) and *p*-acetylbenzenesulfonamide (5) exhibit both anti-hyperglycemic properties and highly desirable anti-coagulant activity; however, these properties were reported at high concentrations, frequently similar to their IC₅₀ values towards HUVECs, which give rise the safety issue of these two compounds. Although some of the obtained outcomes appear promising, further *in vivo* studies should be conducted to obtain a model of the complete effectiveness and safety of these new metformin analogues. To conclude, the chemical modification of the metformin backbone into sulfonamides with various substituents appears a promising point of departure for the development of novel metformin derivatives with stronger anti-coagulant properties.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms23084132/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, M.M.-P.; methodology, A.Z. and M.M.-P.; validation, A.Z. and M.M.-P.; formal analysis, M.M.-P.; investigation, A.Z. and M.M.-P.; data curation, A.Z., M.M.-P.; writing—original draft preparation, A.Z.; writing—review and editing, M.M.-P., J.S. and K.M.H.; visualization, A.Z. and M.M.-P.; supervision, K.M.H.; project administration, M.M.-P.; funding acquisition, M.M.-P. and K.M.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The work is funded by Medical University of Lodz (No. 503/3-015-01/503-31-001-19-00 and 503/3-016-02/503-31-001-19-00), and the Academy of Finland (grant numbers 294227 and 307057).

Institutional Review Board Statement: The experiments on the biological material were accepted by the Bioethics Committee of the Medical University of Lodz (Medical University of Lodz, Poland, approval no. RNN/105/20/KE). The studies on human biological material were conducted in accordance with Polish national directives.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The datasets generated during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgments: The authors would like to thank Krystian Skrobisz for valuable assistance in the basic coagulology studies.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

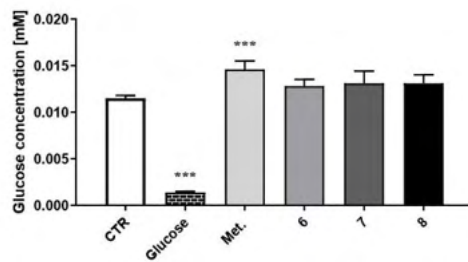
References

1. Park, K. A review of computational drug repurposing. *Transl. Clin. Pharmacol.* **2019**, *27*, 59–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Strittmatter, S.M. Overcoming Drug Development Bottlenecks with Repurposing: Old drugs learn new tricks. *Nat. Med.* **2014**, *20*, 590–591. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Papapetropoulos, A.; Szabo, C. Inventing new therapies without reinventing the wheel: The power of drug repurposing. *Br. J. Pharmacol.* **2018**, *175*, 165–167. [[CrossRef](#)]
4. Juárez-López, D.; Schcolnik-Cabrera, A. Drug Repurposing: Considerations to Surpass While Re-directing Old Compounds for New Treatments. *Arch. Med. Res.* **2021**, *52*, 243–251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Fetro, C.; Scherman, D. Drug repurposing in rare diseases: Myths and reality. *Therapies* **2020**, *75*, 157–160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Lakizadeh, A.; Hassan Mir-Ashrafi, S.M. Drug repurposing improvement using a novel data integration framework based on the drug side effect. *Inform. Med. Unlocked* **2021**, *23*, 100523. [[CrossRef](#)]
7. Apaydin, S.; Török, M. Sulfonamide derivatives as multi-target agents for complex diseases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2019**, *29*, 2042–2050. [[CrossRef](#)]
8. Mondal, S.; Malakar, S. Synthesis of sulfonamide and their synthetic and therapeutic applications: Recent advances. *Tetrahedron* **2020**, *76*, 131662. [[CrossRef](#)]
9. Brnardic, E.J.; Ye, G.; Brooks, C.; Donatelli, C.; Barton, L.; McAtee, J.; Sanchez, R.M.; Shu, A.; Erhard, K.; Terrell, L.; et al. Discovery of Pyrrolidine Sulfonamides as Selective and Orally Bioavailable Antagonists of Transient Receptor Potential Vanilloid-4 (TRPV4). *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 9738–9755. [[CrossRef](#)]
10. Pero, J.E.; Matthews, J.M.; Behm, D.J.; Brnardic, E.J.; Brooks, C.; Budzik, B.W.; Costell, M.H.; Donatelli, C.A.; Eisennagel, S.H.; Erhard, K.; et al. Design and Optimization of Sulfone Pyrrolidine Sulfonamide Antagonists of Transient Receptor Potential Vanilloid-4 with in Vivo Activity in a Pulmonary Edema Model. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 11209–11220. [[CrossRef](#)]
11. Filosa, J.A.; Yao, X.; Rath, G. TRPV4 and the Regulation of Vascular Tone. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2013**, *61*, 113–119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Karakas, S.E.; Banaszewska, B.; Spaczynski, R.Z.; Pawelczyk, L.; Duleba, A. Free fatty acid binding protein-4 and retinol binding protein-4 in polycystic ovary syndrome: Response to simvastatin and metformin therapies. *Gynecol. Endocrinol.* **2013**, *29*, 483–487. [[CrossRef](#)]
13. Majerczyk, M.; Olszanecka-Glinianowicz, M.; Puzianowska-Kuźnicka, M.; Chudek, J. Białko wiążące retinol typu 4 (RBP4) jako czynnik i marker uszkodzenia naczyń związany z insulino opornością. *Postępy Hig. Med. Dosw.* **2016**, *70*, 1267–1275. [[CrossRef](#)]
14. Gao, D.-D.; Dou, H.-X.; Su, H.-X.; Zhang, M.-M.; Wang, T.; Liu, Q.-F.; Cai, H.-Y.; Ding, H.-P.; Yang, Z.; Zhu, W.-L.; et al. From hit to lead: Structure-based discovery of naphthalene-1-sulfonamide derivatives as potent and selective inhibitors of fatty acid binding protein 4. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *154*, 44–59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Zeng, J.; Sauter, E.R.; Li, B. FABP4: A New Player in Obesity-Associated Breast Cancer. *Trends Mol. Med.* **2020**, *26*, 437–440. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Becker, M.R.; Ewing, W.R.; Davis, R.S.; Pauls, H.W.; Ly, C.; Li, A.; Mason, H.J.; Choi-Sledeski, Y.M.; Spada, A.P.; Chu, V.; et al. Synthesis, SAR and in vivo activity of novel thienopyridine sulfonamide pyrrolidinones as factor Xa inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2753–2758. [[CrossRef](#)]
17. Takebayashi, K.; Suetsugu, M.; Matsumoto, S.; Aso, Y.; Inukai, T. Effects of Rosuvastatin and Colestimide on Metabolic Parameters and Urinary Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Type 2 Diabetic Patients with Hyperlipidemia. *South. Med. J.* **2009**, *102*, 361–368. [[CrossRef](#)]
18. Packer, M.; McMurray, J.; Massie, B.M.; Caspi, A.; Charlton, V.; Cohen-Solal, A.; Kiowski, W.; Kostuk, W.; Krum, H.; Levine, B.; et al. Clinical effects of endothelin receptor antagonism with bosentan in patients with severe chronic heart failure: Results of a pilot study. *J. Card. Fail.* **2005**, *11*, 12–20. [[CrossRef](#)]
19. Packer, M.; McMurray, J.; Krum, H.; Kiowski, W.; Massie, B.M.; Caspi, A.; Pratt, C.M.; Petrie, M.C.; DeMets, D.; Kober, I.; et al. Long-Term Effect of Endothelin Receptor Antagonism with Bosentan on the Morbidity and Mortality of Patients with Severe Chronic Heart Failure: Primary Results of the ENABLE Trials. *JACC Heart Fail.* **2017**, *5*, 317–326. [[CrossRef](#)]
20. Tellew, J.E.; Baska, R.A.F.; Beyer, S.M.; Carlson, K.E.; Cornelius, L.A.; Fadnis, L.; Gu, Z.; Kunst, B.L.; Kowala, M.C.; Monshizadegan, H.; et al. Discovery of 4'-(Imidazol-1-yl)methylbiphenyl-2-sulfonamides as dual endothelin/Angiotensin II receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1093–1096. [[CrossRef](#)]
21. Bai, R.; Wei, Z.; Liu, J.; Xie, W.; Yao, H.; Wu, X.; Jiang, J.; Wang, Q.; Xu, J. Synthesis and biological evaluation of 4'-(benzimidazole-1-yl)methylbiphenyl-2-sulfonamide derivatives as dual angiotensin II/endothelin A receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 4661–4667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Liu, J.; Liu, Q.; Yang, X.; Xu, S.; Zhang, H.; Bai, R.; Yao, H.; Jiang, J.; Shen, M.; Wu, X.; et al. Design, synthesis, and biological evaluation of 1,2,4-triazole bearing 5-substituted biphenyl-2-sulfonamide derivatives as potential antihypertensive candidates. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 7742–7751. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Zhou, T.; Xu, X.; Du, M.; Zhao, T.; Wang, J. A preclinical overview of metformin for the treatment of type 2 diabetes. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *106*, 1227–1235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Rena, G.; Hardie, D.G.; Pearson, E.R. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia* **2017**, *60*, 1577–1585. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

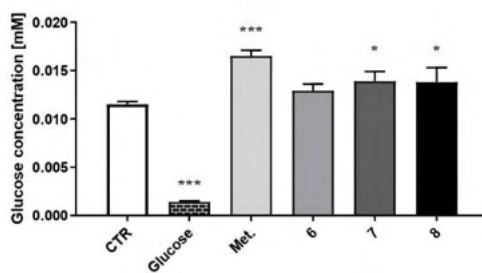
25. Sardu, C.; Paolisso, P.; Sacra, C.; Mauro, C.; Minicucci, F.; Portoghesi, M.; Rizzo, M.R.; Barbieri, M.; Sasso, F.C.; D'Onofrio, N.; et al. Effects of Metformin Therapy on Coronary Endothelial Dysfunction in Patients with Prediabetes with Stable Angina and Nonobstructive Coronary Artery Stenosis: The CODYCE Multicenter Prospective Study. *Diabetes Care* **2019**, *42*, 1946–1955. [CrossRef] [PubMed]
26. De Jager, J.; Kooy, A.; Schalkwijk, C.; Van Der Kolk, J.; Leher, P.; Bets, D.; Wulffelé, M.G.; Donker, A.J.; Stehouwer, C.D.A. Long-term effects of metformin on endothelial function in type 2 diabetes: A randomized controlled trial. *J. Intern. Med.* **2014**, *275*, 59–70. [CrossRef] [PubMed]
27. Caballero, A.E.; Delgado, A.; Aguilar-Salinas, C.A.; Herrera, A.N.; Castillo, J.L.; Cabrera, T.; Gomez-Perez, F.J.; Rull, J.A. The Differential Effects of Metformin on Markers of Endothelial Activation and Inflammation in Subjects with Impaired Glucose Tolerance: A Placebo-Controlled, Randomized Clinical Trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2004**, *89*, 3943–3948. [CrossRef]
28. Markowicz-Piasecka, M.; Huttunen, K.M.; Broncel, M.; Sikora, J. Sulfenamide and Sulfonamide Derivatives of Metformin—A New Option to Improve Endothelial Function and Plasma Haemostasis. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 6573. [CrossRef]
29. Witkowski, M.; Friebe, J.; Tabaraie, T.; Grabitz, S.; Dörner, A.; Taghipour, L.; Jakobs, K.; Stratmann, B.; Tschöpe, D.; Landmesser, U.; et al. Metformin Is Associated with Reduced Tissue Factor Procoagulant Activity in Patients with Poorly Controlled Diabetes. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **2020**, *35*, 809–813. [CrossRef]
30. Xin, G.; Wei, Z.; Ji, C.; Zheng, H.; Gu, J.; Ma, L.; Huang, W.; Morris-Natschke, S.L.; Yeh, J.-L.; Zhang, R.; et al. Metformin Uniquely Prevents Thrombosis by Inhibiting Platelet Activation and mtDNA Release. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 36222. [CrossRef]
31. Markowicz-Piasecka, M.; Sikora, J.; Zajda, A.; Huttunen, K.M. Novel halogenated sulfonamide biguanides with anti-coagulation properties. *Bioorg. Chem.* **2020**, *94*, 103444. [CrossRef] [PubMed]
32. Xin, G.; Ming, Y.; Ji, C.; Wei, Z.; Li, S.; Morris-Natschke, S.L.; Zhang, X.; Yu, K.; Li, Y.; Zhang, B.; et al. Novel potent antiplatelet thrombotic agent derived from biguanide for ischemic stroke. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *200*, 112462. [CrossRef] [PubMed]
33. Coagulation Factor X Activity Assay, Plasma. Available online: <https://www.mayocliniclabs.com/test-catalog/Clinical+and+Interpretive/9066> (accessed on 5 October 2021).
34. Găman, A.M.; Găman, G. Deficiency of Antithrombin III (AT III)—Case Report and Review of the Literature. *Curr. Health Sci. J.* **2014**, *40*, 141–143. [PubMed]
35. Sniecinski, R.M.; Welsby, I.J.; Levi, M.M.; Levy, J.H. Antithrombin: Anti-inflammatory properties and clinical applications. *Thromb. Haemost.* **2016**, *115*, 712–728. [CrossRef]
36. Kostka, B.; Para, J.; Sikora, J. A multiparameter test of clot formation and fibrinolysis for in-vitro drug screening. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **2007**, *18*, 611–618. [CrossRef]
37. Markowicz-Piasecka, M.; Sikora, J.; Mateusiak, L.; Mikiciuk-Olasik, E.; Huttunen, K.M. New prodrugs of metformin do not influence the overall haemostasis potential and integrity of the erythrocyte membrane. *Eur. J. Pharmacol.* **2017**, *811*, 208–221. [CrossRef]
38. Pryor, R.; Cabreiro, F. Repurposing metformin: An old drug with new tricks in its binding pockets. *Biochem. J.* **2015**, *471*, 307–322. [CrossRef]
39. Schneider, D.J. Factors Contributing to Increased Platelet Reactivity in People with Diabetes. *Diabetes Care* **2009**, *32*, 525–527. [CrossRef]
40. Li, X.; Weber, N.; Cohn, D.; Hollmann, M.; DeVries, J.; Hermanides, J.; Preckel, B. Effects of Hyperglycemia and Diabetes Mellitus on Coagulation and Hemostasis. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 2419. [CrossRef]
41. Pretorius, E.; Lipinski, B.; Bester, J.; Vermeulen, N.; Soma, P. Albumin Stabilizes Fibrin Fiber Ultrastructure in Low Serum Albumin Type 2 Diabetes. *Ultrastruct. Pathol.* **2013**, *37*, 254–257. [CrossRef]
42. Carr, M.E. Diabetes mellitus: A hypercoagulable state. *J. Diabetes Complicat.* **2001**, *15*, 44–54. [CrossRef]
43. Erem, C.; Hacıhasanoğlu, A.; Çelik, Ş.; Ovalı, E.; Ersöz, H.Ö.; Ukiñ, K.; Deger, O.; Telatar, M. Coagulation and Fibrinolysis Parameters in Type 2 Diabetic Patients with and without Diabetic Vascular Complications. *Med. Princ. Pract.* **2004**, *14*, 22–30. [CrossRef] [PubMed]
44. Schubert, M.; Hansen, S.; Leefmann, J.; Guan, K. Repurposing Antidiabetic Drugs for Cardiovascular Disease. *Front. Physiol.* **2020**, *11*, 568632. [CrossRef] [PubMed]
45. Nesti, L.; Natali, A. Metformin effects on the heart and the cardiovascular system: A review of experimental and clinical data. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2017**, *27*, 657–669. [CrossRef]
46. Markowicz-Piasecka, M.; Huttunen, K.M.; Mateusiak, L.; Mikiciuk-Olasik, E.; Sikora, J. Is Metformin a Perfect Drug? Updates in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Curr. Pharm. Des.* **2017**, *23*, 2532–2550. [CrossRef]
47. Foretz, M.; Guigas, B.; Bertrand, L.; Pollak, M.; Viollet, B. Metformin: From Mechanisms of Action to Therapies. *Cell Metab.* **2014**, *20*, 953–966. [CrossRef]
48. Markowicz-Piasecka, M.; Huttunen, J.; Zajda, A.; Sikora, J.; Huttunen, K.M. Sulfonamide metformin derivatives induce mitochondrial-associated apoptosis and cell cycle arrest in breast cancer cells. *Chem.-Biol. Interact.* **2021**, *352*, 109795. [CrossRef] [PubMed]
49. Pernicova, I.; Korbonits, M. Metformin—Mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2014**, *10*, 143–156. [CrossRef] [PubMed]

50. Polianskyte-Prause, Z.; Tolvanen, T.A.; Lindfors, S.; Dumont, V.; Van, M.; Wang, H.; Dash, S.N.; Berg, M.; Naams, J.-B.; Hautala, L.C.; et al. Metformin increases glucose uptake and acts renoprotectively by reducing SHIP2 activity. *FASEB J.* **2018**, *33*, 2858–2869. [CrossRef]
51. Avogaro, A.; Albiero, M.; Menegazzo, L.; de Kreutzenberg, S.; Fadini, G.P. Endothelial Dysfunction in Diabetes: The role of reparatory mechanisms. *Diabetes Care* **2011**, *34*, S285–S290. [CrossRef] [PubMed]
52. Brandes, R.P. Endothelial Dysfunction and Hypertension. *Hypertension* **2014**, *64*, 924–928. [CrossRef] [PubMed]
53. Oosterhoff, L.A.; Kruiwagen, H.S.; Van Wolferen, M.E.; Van Balkom, B.W.; Mokry, M.; Lansu, N.; Dungen, N.A.V.D.; Penning, L.C.; Spanjersberg, T.C.; De Graaf, J.W.; et al. Characterization of Endothelial and Smooth Muscle Cells from Different Canine Vessels. *Front. Physiol.* **2019**, *10*, 101. [CrossRef] [PubMed]
54. Zhuge, Y.; Zhang, J.; Qian, F.; Wen, Z.; Niu, C.; Xu, K.; Ji, H.; Rong, X.; Chu, M.; Jia, C. Role of smooth muscle cells in Cardiovascular Disease. *Int. J. Biol. Sci.* **2020**, *16*, 2741–2751. [CrossRef] [PubMed]
55. Zhu, Y.; Qu, J.; He, L.; Zhang, F.; Zhou, Z.; Yang, S.; Zhou, Y. Calcium in Vascular Smooth Muscle Cell Elasticity and Adhesion: Novel Insights Into the Mechanism of Action. *Front. Physiol.* **2019**, *10*, 852. [CrossRef]
56. ICELLigence. Available online: <https://www.aceabio.com> (accessed on 10 September 2021).
57. Obońska, K.; Grabczewska, Z.; Fisz, J.; Kubica, J. Cukrzyca i dysfunkcja śródbłonna—Krótkie spojrzenie na złożony problem. *Folia Cardiol.* **2011**, *6*, 109–116.
58. Sedding, D.G.; Boyle, E.C.; Demandt, J.A.F.; Sluimer, J.C.; Dutzmann, J.; Haverich, A.; Bauersachs, J. Vasa Vasorum Angiogenesis: Key Player in the Initiation and Progression of Atherosclerosis and Potential Target for the Treatment of Cardiovascular Disease. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 706. [CrossRef]
59. Xu, Z.; Han, Y.; Liu, J.; Jiang, F.; Hu, H.; Wang, Y.; Liu, Q.; Gong, Y.; Li, X. MiR-135b-5p and MiR-499a-3p Promote Cell Proliferation and Migration in Atherosclerosis by Directly Targeting MEF2C. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 12276. [CrossRef]
60. Napieralski, R.; Wagner, E.; Gebhard, H.; Schmitt, M.; Zimmermann, A.; Eckstein, H.-H.; Greißel, A.; Culmes, M.; Zerneck, A.; Pelisek, J. Alternation of histone and DNA methylation in human atherosclerotic carotid plaques. *Thromb. Haemost.* **2015**, *114*, 390–402. [CrossRef]
61. Rorbach-Dolata, A.; Kubis, A.; Piwowar, A. Epigenetic modifications: An important mechanism in diabetic disturbances. *Postępy Hig. i Med. Doświadczalnej* **2017**, *71*, 960–974. [CrossRef]
62. Markowicz-Piasecka, M.; Sadkowska, A.; Huttunen, K.M.; Poddiedlik, M.; Mikiciuk-Olasik, E.; Sikora, J. An investigation into the pleiotropic activity of metformin. A glimpse of haemostasis. *Eur. J. Pharmacol.* **2020**, *872*, 172984. [CrossRef]
63. Roszkowski, K.; Ziółkowska, E. Fibrinolysis in neoplastic process. *Contemp. Oncol.* **2005**, *9*, 196–198.
64. Wannamethee, S.G.; Sattar, N.; Rumley, A.; Whincup, P.H.; Lennon, L.; Lowe, G.D. Tissue Plasminogen Activator, von Willebrand Factor, and Risk of Type 2 Diabetes in Older Men. *Diabetes Care* **2008**, *31*, 995–1000. [CrossRef]
65. Chojnowski, K.; Podolak-Dawidziak, M.; Windyga, J. Diagnosis of the prolonged activated partial thromboplastin time (aPTT). *Hematologia* **2010**, *1*, 81–86.
66. Lippi, G.; Franchini, M.; Targher, G.; Montagnana, M.; Salvagno, G.L.; Guidi, G.C.; Favaloro, E.J. Epidemiological association between fasting plasma glucose and shortened APTT. *Clin. Biochem.* **2008**, *42*, 118–120. [CrossRef]
67. Tripodi, A.; Chantarangkul, V.; Martinelli, I.; Bucciarelli, P.; Mannucci, P.M. A shortened activated partial thromboplastin time is associated with the risk of venous thromboembolism. *Blood* **2004**, *104*, 3631–3634. [CrossRef]
68. Pretorius, E.; Bester, J.; Vermeulen, N.; Alummoottil, S.; Soma, P.; Buys, A.V.; Kell, D.B. 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.* **2015**, *14*, 30. [CrossRef]
69. Skrypnik, D.; Bogdański, P.; Pupek-Musialik, D.; Rypiński, B. Leczenie przeciwzakrzepowe u pacjentów z cukrzycą. *Forum Zaburzeń Metab.* **2013**, *4*, 19–28.
70. Sobczak, A.I.S.; Stewart, A.J. Coagulatory Defects in Type-1 and Type-2 Diabetes. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 6345. [CrossRef]
71. Sikora, J.; Markowicz-Piasecka, M.; Broncel, M.; Mikiciuk-Olasik, E. Extract of *Aronia melanocarpa*-modified hemostasis: In vitro studies. *Eur. J. Nutr.* **2014**, *53*, 1493–1502. [CrossRef]
72. Markowicz-Piasecka, M.; Huttunen, J.; Sikora, J.; Huttunen, K.M. Sulfenamide derivatives can improve transporter-mediated cellular uptake of metformin and induce cytotoxicity in human breast adenocarcinoma cell lines. *Bioorg. Chem.* **2019**, *87*, 321–334. [CrossRef]
73. Chalubinski, M.; Zemanek, K.; Skowron, W.; Wojdan, K.; Gorzelak-Pabiś, P.; Broncel, M. The effect of 7-ketocholesterol and 25-hydroxycholesterol on the integrity of the human aortic endothelial and intestinal epithelial barriers. *Inflamm. Res.* **2013**, *62*, 1015–1023. [CrossRef]
74. Markowicz-Piasecka, M.; Sadkowska, A.; Sikora, J.; Broncel, M.; Huttunen, K.M. Novel Sulfenamide-Based Analogs of Metformin Exert Promising Anti-Coagulant Effects without Compromising Glucose-Lowering Activity. *Pharmaceuticals* **2020**, *13*, 323. [CrossRef]
75. Markowicz-Piasecka, M.; Huttunen, K.M.; Mateusiak, L.; Mikiciuk-Olasik, E.; Sikora, J. Sulfenamide and sulfenamide derivatives of metformin can exert anticoagulant and profibrinolytic properties. *Chem. Biol. Interact.* **2018**, *284*, 126–136. [CrossRef]
76. Brown, D.L.; Kouides, P.A. Diagnosis and treatment of inherited factor X deficiency. *Haemophilia* **2008**, *14*, 1176–1182. [CrossRef]
77. Markowicz-Piasecka, M.; Huttunen, K.M.; Sadkowska, A.; Sikora, J. Pleiotropic Activity of Metformin and Its Sulfenamide Derivatives on Vascular and Platelet Haemostasis. *Molecules* **2019**, *25*, 125. [CrossRef]

Figure S1. Effects of metformin and biguanide analogues 6 – 8 at the concentration of 0.1 (A) and 0.3 mM (B), and D-glucose at the concentration of 0.1 mM on the 2-NBDG uptake in HUVEC cells. The results are presented as mean \pm SD, n = 4 – 6, an asterisk denotes the significant differences between control and cells treated with glucose, metformin or studied compounds. * p < 0.05; *** p < 0.001.



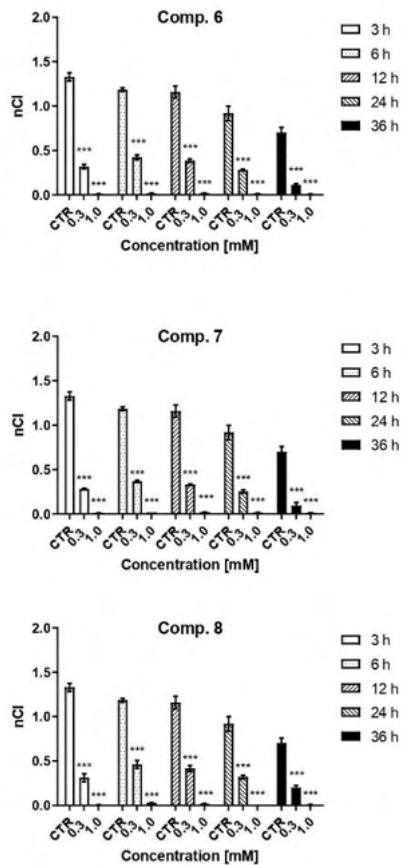
(A)



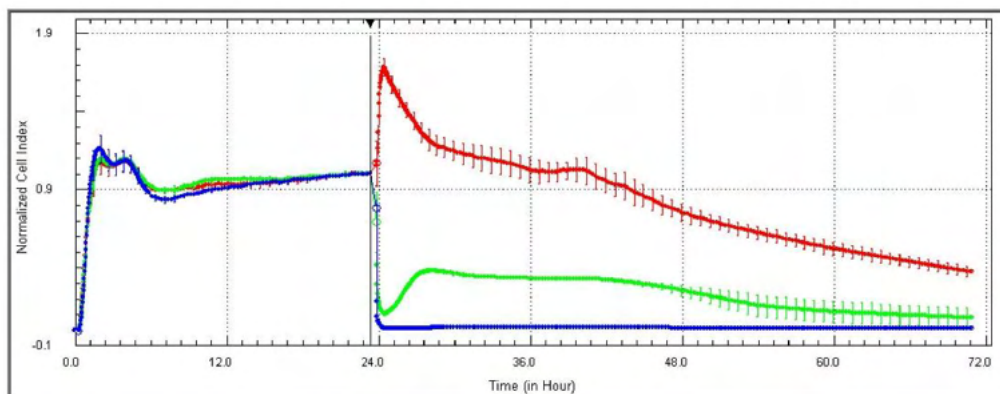
(B)

Figure S2. The effects of biguanides 6–8 on the integrity of HUVECs analyzed in the RTCA-DP system. A) The effect of the exposure of compounds 6–8 on normalized Cell Index (nCI) at selected time points (3, 6, 12, 24 and 36 hours). The results are presented as mean \pm SD, $n = 4 - 5$. An asterisk denotes a significant difference between sample treated with biguanide and control sample; *** $p < 0.001$. B) The effects of compound 7 on the barrier properties of HUVECs. The picture presents representative plots of one experiment conducted in duplicates (the results are presented as a mean (solid line) \pm standard deviation). For the statistical analysis there were conducted three independent experiments. Red line – control (unstimulated cells); green line – compounds at the concentration of 0.3 mM; navy blue line - 1.0 mM.

A)



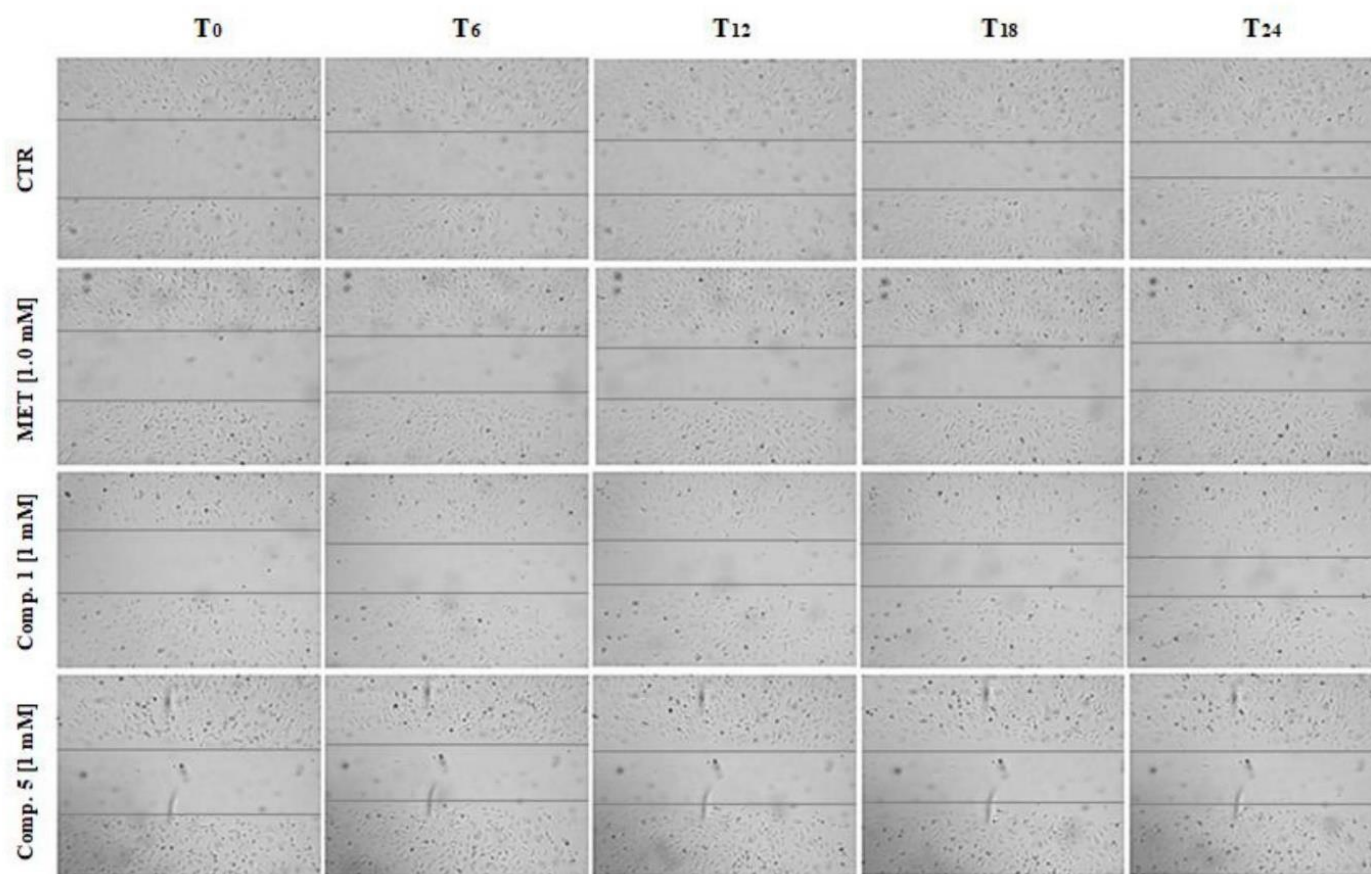
B)



Metformin was not found to affect the integrity and adherence of HUVEC cells over the entire concentration range (0.006 – 1.5 mM) in our previous study [30]. For instance, after 24 hours of co-stimulation with metformin at 1.5 mM nCI was 0.95 ± 0.08 versus control 1.01 ± 0.07 [30].

Materialy uzupełniające do Publikacji II

Figure S3. HUVEC migration in the presence of metformin and selected biguanides (compound 1 and 5). Cell migration was evaluated using wound healing assay in JuLiStage system. Representative cell images are shown for control samples (CTR), metformin, compound 1 and 5 at the concentration of 1.0 mM. Cells were photographed at the indicated time points (t = 0, 6, 12, 18, 24 h); 40× magnification.



Materiały uzupełniające do Publikacji II

Table S1. Effects of biguanides 1 – 8 on the intracellular glucose uptake. The results are presented as mean \pm SD, n = 4.

Compound	Concentration [mM]	Glucose uptake [mM]
Control	-	0.0115 \pm 0.0003
Glucose	0.1	0.0014 \pm 0.0001***
Metformin	0.1	0.0146 \pm 0.0009***
	0.3	0.0165 \pm 0.0006***
Comp. 1	0.1	0.0134 \pm 0.0004**
	0.3	0.0142 \pm 0.0007***
Comp. 2	0.1	0.0139 \pm 0.0003***
	0.3	0.0146 \pm 0.001***
Comp. 3	0.1	0.0137 \pm 0.0003***
	0.3	0.0144 \pm 0.0005***
Comp. 4	0.1	0.0134 \pm 0.001**
	0.3	0.0138 \pm 0.0007***
Comp. 5	0.1	0.0132 \pm 0.0008*
	0.3	0.0135 \pm 0.0011**
Comp. 6	0.1	0.0128 \pm 0.0007
	0.3	0.0129 \pm 0.0007
Comp. 7	0.1	0.0131 \pm 0.0013
	0.3	0.0139 \pm 0.001*
Comp. 8	0.1	0.0131 \pm 0.0009
	0.3	0.0138 \pm 0.0015*

An asterisk denotes the significant differences between control and cells treated with glucose, metformin or studied compounds. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Table S2 The effects of sulfonamides 1–5 on HUVEC cells growth. The results express the percentage of cell viability at the compound concentration of 0.06 and 0.3 mM in comparison to control samples. The results are presented as mean \pm SD (n = 8).

Compound	HUVEC cells growth		
	CTR	0.06 mM	0.3 mM
1	100.00 \pm 6.32	76.35 \pm 9.19***	71.04 \pm 8.45***
2	101.87 \pm 2.71	75.91 \pm 5.85***	71.48 \pm 3.12***
3	100.00 \pm 5.85	77.89 \pm 4.10***	75.85 \pm 11.77***
4	100.00 \pm 5.85	81.54 \pm 9.49***	73.93 \pm 5.30***
5	103.77 \pm 8.09	84.79 \pm 5.67***	77.85 \pm 6.65***

Materiały uzupełniające do Publikacji II

Table S3. The effects of compounds **1 – 8** on the integrity of HUVECs analyzed in the RTCA-DP system.

Compound	Concentration	3 hours	6 hours	12 hours	24 hours	36 hours
CTR	-	1.181 ± 0.124	1.124 ± 0.051	1.168 ± 0.094	1.111 ± 0.166	0.756 ± 0.192
1	0.3 mM	0.832 ± 0.091**	0.981 ± 0.085	1.177 ± 0.149	1.207 ± 0.149**	0.875 ± 0.090
	1.0 mM	0.440 ± 0.032***	0.676 ± 0.062***	0.791 ± 0.067***	0.940 ± 0.077***	0.858 ± 0.054
2	0.3 mM	0.608 ± 0.038***	0.693 ± 0.022***	0.676 ± 0.047***	0.522 ± 0.030***	0.761 ± 0.008***
	1.0 mM	0.652 ± 0.006***	0.706 ± 0.007***	0.719 ± 0.005***	0.731 ± 0.002***	0.379 ± 0.032*
3	0.3 mM	0.680 ± 0.083***	0.837 ± 0.213**	0.927 ± 0.212***	0.969 ± 0.156***	0.714 ± 0.035**
	1.0 mM	0.233 ± 0.039***	0.554 ± 0.047***	0.616 ± 0.042***	0.748 ± 0.061***	0.694 ± 0.054***
4	0.3 mM	1.026 ± 0.008**	0.977 ± 0.004**	0.940 ± 0.010**	0.881 ± 0.013**	0.777 ± 0.021***
	1.0 mM	0.592 ± 0.031***	0.583 ± 0.029***	0.515 ± 0.038***	0.494 ± 0.024***	0.339 ± 0.030***
5	0.3 mM	1.146 ± 0.108	1.036 ± 0.017*	0.746 ± 0.010***	0.830 ± 0.001***	0.690 ± 0.017*
	1.0 mM	0.438 ± 0.042***	0.501 ± 0.027***	0.513 ± 0.050***	0.557 ± 0.008***	0.275 ± 0.021***
6	0.3 mM	0.317 ± 0.050***	0.424 ± 0.053***	0.388 ± 0.07***	0.280 ± 0.018***	0.111 ± 0.026***
	1.0 mM	0.010 ± 0.003***	0.016 ± 0.005***	0.019 ± 0.005***	0.013 ± 0.003***	0.009 ± 0.003***
7	0.3 mM	0.283 ± 0.050***	0.367 ± 0.027***	0.333 ± 0.030***	0.255 ± 0.26***	0.094 ± 0.014***
	1.0 mM	0.013 ± 0.004***	0.018 ± 0.001***	0.020 ± 0.001***	0.016 ± 0.002***	0.013 ± 0.003***
8	0.3 mM	0.312 ± 0.087***	0.461 ± 0.015***	0.416 ± 0.062***	0.321 ± 0.038***	0.198 ± 0.055***
	1.0 mM	0.006 ± 0.004***	0.029 ± 0.006***	0.021 ± 0.004***	0.001 ± 0.001***	0.001 ± 0.001***

The results are presented as mean ± SD, n = 4 – 6. The table includes the calculated normalized Cell Index values (nCI) for control and compounds **1 – 8** after selected time points (3 – 36 h) of incubation. An asterisk denotes the statistically significant difference between sample treated with compounds and controls ample (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Materiały uzupełniające do Publikacji II

Table S4. The effects of metformin and compounds 1 - 5 on the migration of HUVECs analyzed in the JulieStage system. The results are presented as a wound width [μm].

Compound	Concentration	Start [μm]	6 hours [μm]	12 hours [μm]	18 hours [μm]	24 hours [μm]
CTR	-	778.2 \pm 189.9	619.2 \pm 116.0	526.3 \pm 120.4	383.2 \pm 54.4	272.4 \pm 42.2
1	0.3 mM	605.8 \pm 38.63	491.9 \pm 31.7	421.2 \pm 5.9	365.2 \pm 35.8	336.7 \pm 39.0
	1.0 mM	589.1 \pm 36.3	461.9 \pm 33.4*	375.1 \pm 29.9	344.4 \pm 32.8	337.5 \pm 47.3
2	0.3 mM	637.4 \pm 116.3	493.8 \pm 133.1	442.4 \pm 142.9	351.4 \pm 82.6	328.6 \pm 56.9
	1.0 mM	712.4 \pm 56.5	590.8 \pm 40.2	541.5 \pm 99.2	453.1 \pm 106.1	357.2 \pm 68.1
3	0.3 mM	675.1 \pm 94.6	606.7 \pm 149.4	486.0 \pm 131.2	441.9 \pm 99.5	395.9 \pm 104.7
	1.0 mM	609.3 \pm 73.0	494.6 \pm 106.9	414.1 \pm 103.5	385.2 \pm 94.5	331.3 \pm 62.5
4	0.3 mM	681.2 \pm 226.7	509.0 \pm 188.7	418.6 \pm 140.4	326.8 \pm 146.6	271.1 \pm 84.6
	1.0 mM	659.9 \pm 139.7	579.6 \pm 127.6	498.9 \pm 146.5	406.6 \pm 145.3	352.5 \pm 112.2
5	0.3 mM	606.2 \pm 55.1	450.7 \pm 44.6	388.3 \pm 26.8	318.3 \pm 16.7	277.1 \pm 50.3
	1.0 mM	609.0 \pm 127.2	541.5 \pm 78.2	497.4 \pm 36.8	452.5 \pm 46.3	454.5 \pm 62.0*
MET	0.3 mM	728.6 \pm 62.5	570.1 \pm 119.9	467.8 \pm 106.5	412.1 \pm 121.8	405.0 \pm 120.7
	1.0 mM	670.4 \pm 29.2	565.4 \pm 31.5	495.7 \pm 20.0	482.7 \pm 10.0	419.8 \pm 42.3

The results are presented as mean \pm SD, n = 4 – 8; (* $p < 0.05$).

Materiały uzupełniające do Publikacji II

Table S5. Effects of biguanides **1** – **5** on the activity of factor X (data are presented as mean \pm SD; n = 4–5). The asterisk denotes a statistically significant difference between the samples treated with compounds and control; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Compound	Factor X activity [%]				
	Control	Control with solvent	Concentration		
			0.3 mM	0.6 mM	1.5 mM
1	109.20 \pm 5.45	106.20 \pm 1.79	107.60 \pm 4.62	104.20 \pm 4.97	97.40 \pm 8.05**
2	109.20 \pm 5.45	106.20 \pm 1.79	107.40 \pm 6.19	104.00 \pm 5.34	107.00 \pm 4.00
3	109.20 \pm 5.45	106.20 \pm 1.79	105.60 \pm 2.30	103.40 \pm 7.23	104.20 \pm 8.14
4	109.20 \pm 5.45	106.20 \pm 1.79	102.00 \pm 5.15	100.80 \pm 5.17	98.80 \pm 11.39
5	109.20 \pm 5.45	106.20 \pm 1.79	109.80 \pm 3.35	106.20 \pm 3.27	102.20 \pm 3.77*

Table S6. Effects of selected biguanides **1** – **5** on the activity of AT III (data are presented as mean \pm SD; n = 4). The asterisk denotes a statistically significant difference between the samples treated with compounds and control; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Compound	Control	Concentration			
		0.06 mM	0.3 mM	0.6 mM	1.5 mM
1	109.75 \pm 3.86	110.25 \pm 8.34	115.25 \pm 6.18	120.00 \pm 2.71**	123.00 \pm 5.2**
2		121.00 \pm 4.90	127.75 \pm 10.44	125.75 \pm 10.87	129.00 \pm 11.46
3		113.00 \pm 10.13	117.25 \pm 5.50	131.75 \pm 6.65*	136.75 \pm 11.32*
4		113.00 \pm 1.41	118.00 \pm 5.29	123.50 \pm 8.06*	127.25 \pm 10.37*
5		115.00 \pm 12.81	114.50 \pm 8.89	118.50 \pm 8.50	128.75 \pm 5.85**

Materiały uzupełniające do Publikacji II

Table S7. The effects of synthesized sulfonamide derivatives of metformin 1 – 5 on the kinetic parameters of clot formation and fibrinolysis (CL-test).

Compound	Concentr. [mM]	Parameters												
		Tt [s]	Fmax [%T]	Tf [s]	Fvo [%T/min]	Tc [s]	Lmax [%T]	Tl [s]	Lvo [%T/min]	Sf [%T x min]	Sc [%T x min]	Sl [%T x min]	S [%T x min]	T [s]
1	0 (CTR)	21.76 ± 4.24	65.79 ± 7.55	56.67 ± 7.10	203.00 ± 33.04	274.43 ± 69.69	65.23 ± 7.32	228.29 ± 65.51	18.74 ± 5.35	43.87 ± 6.67	293.56 ± 81.99	140.49 ± 42.97	477.92 ± 128.92	581.14 ± 137.78
	0.06	18.97 ± 3.08*	73.71 ± 5.89**	58.61 ± 9.61	230.57 ± 34.38	324.86 ± 130.79	70.23 ± 10.26	253.57 ± 104.13	21.40 ± 6.16	50.97 ± 7.65**	389.25 ± 160.80	193.67 ± 107.75*	633.89 ± 269.28*	656.01 ± 236.60
	0.3	16.81 ± 3.05**	71.97 ± 6.78**	61.36 ± 11.85	227.86 ± 37.81	347.71 ± 124.84*	69.09 ± 10.62	260.57 ± 95.60*	18.53 ± 7.15	52.45 ± 10.08**	407.13 ± 154.90*	186.37 ± 104.97**	645.95 ± 264.51**	686.46 ± 226.50*
	0.6	16.75 ± 4.87**	70.77 ± 5.62*	63.63 ± 6.31*	217.71 ± 37.42	338.00 ± 114.76**	69.47 ± 6.67	267.71 ± 99.31*	18.64 ± 4.38	53.53 ± 5.26***	388.20 ± 131.19*	178.97 ± 84.17	620.70 ± 216.54*	686.09 ± 216.29*
	1.5	21.60 ± 6.05	70.21 ± 3.38*	64.21 ± 9.03*	193.57 ± 47.31	344.29 ± 149.70	66.90 ± 8.86	236.57 ± 80.20	20.23 ± 6.46	52.36 ± 6.58*	389.89 ± 172.66	159.20 ± 87.92	602.52 ± 263.77	666.67 ± 234.05
2	0 (CTR)	19.64 ± 4.14	60.09 ± 6.33	51.63 ± 6.91	190.14 ± 20.85	272.29 ± 56.91	60.49 ± 6.12	223.14 ± 47.05	19.41 ± 2.85	36.43 ± 7.98	267.76 ± 72.76	122.83 ± 33.42	427.01 ± 111.41	566.70 ± 105.96
	0.06	16.86 ± 4.24*	66.77 ± 5.68*	56.56 ± 8.57*	203.43 ± 22.00	296.57 ± 72.31*	67.40 ± 5.38**	240.14 ± 65.11	22.29 ± 4.30	44.40 ± 9.07***	323.20 ± 94.05**	148.45 ± 47.41*	516.05 ± 146.55**	610.13 ± 145.50
	0.3	17.54 ± 5.79	68.99 ± 5.55*	59.24 ± 16.26	194.00 ± 48.64	309.14 ± 68.74**	69.49 ± 5.34*	252.00 ± 73.00	19.83 ± 6.57	46.00 ± 9.83***	344.01 ± 74.34***	153.63 ± 43.80**	543.64 ± 122.37***	637.93 ± 155.22*
	0.6	17.57 ± 3.74	67.40 ± 9.57	55.80 ± 11.60	214.14 ± 50.85	319.00 ± 63.63**	68.19 ± 9.82	247.43 ± 74.21	20.37 ± 7.03	44.34 ± 10.50*	344.82 ± 65.62*	143.77 ± 40.07	532.93 ± 111.10*	639.80 ± 148.09*
	1.5	24.37 ± 7.41*	61.57 ± 7.24	61.21 ± 14.65	177.43 ± 34.91	351.43 ± 96.53**	62.14 ± 6.63	249.14 ± 80.94	20.07 ± 6.59	44.31 ± 12.08*	346.35 ± 92.32**	133.78 ± 47.19	524.43 ± 146.77*	686.16 ± 190.86*
3	0 (CTR)	18.82 ± 3.69	61.83 ± 2.64	47.35 ± 9.66	187.33 ± 40.60	246.17 ± 36.41	66.15 ± 9.79	241.50 ± 92.10	19.25 ± 5.44	33.50 ± 9.79	249.97 ± 34.38	137.96 ± 53.57	421.43 ± 60.96	553.83 ± 88.64
	0.06	16.68 ± 3.26	65.40 ± 9.39	57.45 ± 8.71*	208.17 ± 44.80	279.50 ± 46.51	71.38 ± 8.36	235.33 ± 48.33	20.38 ± 5.24	48.52 ± 10.81*	314.15 ± 49.14*	156.16 ± 30.07	521.91 ± 66.81***	588.97 ± 87.54
	0.3	16.23 ± 4.22	68.78 ± 4.04**	55.13 ± 7.55	214.17 ± 32.05	299.50 ± 38.60**	70.15 ± 3.87	229.17 ± 48.85	22.88 ± 8.98	44.41 ± 6.00*	335.21 ± 50.51**	142.20 ± 37.46	521.82 ± 88.83**	600.03 ± 91.80
	0.6	17.17 ± 3.17	66.60 ± 4.00**	54.73 ± 5.88	211.50 ± 22.76	299.50 ± 40.90*	67.55 ± 4.50	234.83 ± 42.86	23.53 ± 6.67	42.40 ± 3.94	323.11 ± 42.53**	137.48 ± 23.47	502.99 ± 64.69***	606.23 ± 87.70
	1.5	18.15 ± 4.30	63.60 ± 5.36	62.35 ± 6.00*	199.50 ± 18.07	355.50 ± 66.77**	63.92 ± 5.38	253.17 ± 62.51	23.50 ± 13.77	47.68 ± 7.07*	368.60 ± 84.14*	143.17 ± 38.79	559.45 ± 127.25*	689.17 ± 134.48**
4	0 (CTR)	21.02 ± 2.10	66.46 ± 3.97	50.98 ± 3.76	209.80 ± 18.21	243.00 ± 44.06	66.64 ± 3.91	185.80 ± 33.86	22.86 ± 2.93	39.76 ± 4.23	262.61 ± 52.40	111.94 ± 19.65	414.31 ± 74.15	500.80 ± 81.25
	0.06	17.90 ± 1.55	70.78 ± 2.99	56.08 ± 4.04	218.80 ± 18.83	254.40 ± 42.82	70.60 ± 2.68	192.40 ± 34.02	22.84 ± 2.84	46.76 ± 4.65**	293.55 ± 59.85	128.24 ± 33.57	468.55 ± 95.54	520.78 ± 76.54
	0.3	18.10 ± 1.60	67.68 ± 2.97	53.62 ± 5.86	213.40 ± 35.45	267.20 ± 50.90	68.22 ± 3.35	199.60 ± 31.48	23.44 ± 1.16	42.11 ± 3.94	295.28 ± 65.79	121.04 ± 21.89	458.43 ± 88.55	538.52 ± 81.13
	0.6	19.26 ± 3.17	67.36 ± 4.41	57.16 ± 4.14*	204.60 ± 17.01	271.80 ± 34.83*	67.86 ± 4.50	192.60 ± 30.81	23.86 ± 5.29	45.49 ± 5.26	296.64 ± 39.28*	114.75 ± 16.61	456.88 ± 57.50*	540.82 ± 63.83*
	1.5	21.50 ± 1.37	58.40 ± 4.18**	63.84 ± 5.82**	169.80 ± 13.83*	281.40 ± 41.02*	59.92 ± 6.34	195.00 ± 35.57	22.96 ± 6.37	44.23 ± 5.10	267.39 ± 29.91	101.06 ± 16.22*	410.69 ± 41.73	561.74 ± 73.93*
5	0 (CTR)	20.02 ± 1.26	66.28 ± 7.48	52.16 ± 3.51	217.20 ± 37.39	280.80 ± 29.23	66.46 ± 5.58	231.40 ± 20.77	24.12 ± 6.46	40.79 ± 6.01	301.89 ± 45.53	146.24 ± 30.82	488.91 ± 75.48	584.38 ± 46.77
	0.06	15.90 ± 1.94**	70.66 ± 8.17	56.96 ± 4.97	225.00 ± 34.12	309.60 ± 33.97**	72.16 ± 7.80	254.40 ± 11.06	20.20 ± 5.10	47.54 ± 4.13*	357.76 ± 75.93*	159.03 ± 25.98	564.32 ± 102.00	636.86 ± 37.88*
	0.3	17.00 ± 2.17*	70.94 ± 4.68	57.26 ± 5.37	227.60 ± 13.30	331.40 ± 24.11**	66.96 ± 11.55	244.00 ± 21.58	20.18 ± 3.47	48.43 ± 6.81**	383.11 ± 50.30***	169.87 ± 46.38*	601.41 ± 90.65***	649.66 ± 38.22**
	0.6	16.22 ± 1.62**	69.22 ± 6.62	56.60 ± 7.39	219.60 ± 31.60	348.60 ± 50.47	70.12 ± 6.38	257.00 ± 49.10	22.48 ± 6.56	46.55 ± 8.60	393.45 ± 83.29*	158.15 ± 42.23	598.15 ± 132.27	678.42 ± 105.62
	1.5	17.44 ± 2.25	67.02 ± 7.66	61.12 ± 6.91*	207.80 ± 42.70	336.00 ± 40.02	69.08 ± 8.20	252.80 ± 32.96	18.28 ± 3.58	48.35 ± 4.83*	366.87 ± 74.64*	146.13 ± 30.60	561.34 ± 104.05	667.36 ± 65.44

The results are presented as mean ± standard deviation, n = 5 – 7. The asterisk denotes a statistically significant difference between the samples treated with compounds and control; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Tt—thrombin time, Fmax—maximum clotting, Tf— plasma clotting time, Fvo—initial plasma clotting velocity, Tc—clot stabilization time, Lmax — maximum lysis, Tl — fibrinolysis time, Lvo—initial clot fibrinolysis velocity, Sf—area under the clot formation curve, Sc—area under the curve of a stable clot formation, Sr — area under the fibrinolysis curve, S — overall potential of clot formation and fibrinolysis, T—total time of the process of clot formation and fibrinolysis.

Materiały uzupełniające do Publikacji II

Table S8. The effects of synthesized sulfonamide derivatives of metformin 1 – 5 on the process of coagulation after generation of endogenous thrombin (Coagulation Assay).

Compound	Parameters							
	Concentr. [mM]	TGt [s]	Fmax [%T]	Tf [s]	Fvo [%T/min]	Sf [%T x min]	Sc [%T x min]	S [%T x min]
1	0 (CTR)	148.17 ± 34.31	77.82 ± 11.86	115.73 ± 40.18	128.05 ± 31.13	103.38 ± 24.78	533.26 ± 112.97	1493.77 ± 236.20
	0.06	161.33 ± 35.27	76.30 ± 7.79	155.67 ± 45.29*	97.22 ± 36.13	140.16 ± 31.01*	458.27 ± 113.77	1449.09 ± 154.09
	0.3	162.33 ± 37.96	82.67 ± 4.79	109.63 ± 40.06	117.65 ± 36.38	104.53 ± 38.44	544.47 ± 81.13	1586.01 ± 103.04
	0.6	176.83 ± 57.02	75.62 ± 9.88	138.77 ± 59.29	96.52 ± 20.91*	119.01 ± 48.07	444.40 ± 91.71	1442.42 ± 198.39
	1.5	172.00 ± 43.56	74.15 ± 7.83	135.33 ± 75.79	107.77 ± 35.80	114.89 ± 64.82	452.95 ± 102.22	1435.77 ± 143.80
2	0 (CTR)	130.60 ± 22.66	84.52 ± 5.26	93.72 ± 17.54	133.05 ± 34.97	87.96 ± 15.40	629.50 ± 62.21	1627.12 ± 106.89
	0.06	151.33 ± 26.37	85.20 ± 6.52	98.28 ± 33.46	124.35 ± 37.66	91.44 ± 30.65	562.66 ± 156.02	1638.19 ± 135.59
	0.3	135.67 ± 25.90	85.12 ± 5.67	85.08 ± 25.10	142.17 ± 46.90	79.63 ± 20.32	602.85 ± 84.63	1641.98 ± 118.29
	0.6	153.33 ± 21.05	83.60 ± 6.72	91.58 ± 19.43	140.83 ± 37.45	88.00 ± 18.58	583.07 ± 90.13	1611.84 ± 135.58
	1.5	170.50 ± 31.73*	76.35 ± 9.75*	101.45 ± 38.76	120.32 ± 48.40	87.66 ± 44.66	511.33 ± 178.11	1467.86 ± 181.79**
3	0 (CTR)	157.2 ± 18.14	82.76 ± 8.29	109.20 ± 43.90	125.50 ± 34.76	98.32 ± 34.87	550.86 ± 105.32	1551.16 ± 128.03
	0.06	155.00 ± 20.58	84.78 ± 5.57	108.30 ± 35.15	108.56 ± 28.63	102.35 ± 29.66	586.27 ± 95.97	1628.36 ± 118.58
	0.3	139.60 ± 7.44	82.66 ± 7.51	108.58 ± 33.64	113.42 ± 23.98	100.51 ± 28.00	766.41 ± 394.94	1580.91 ± 150.03
	0.6	158.40 ± 13.03	82.44 ± 5.61	112.94 ± 35.34	127.78 ± 40.82	107.67 ± 29.19	560.45 ± 102.47	1580.02 ± 119.57
	1.5	165.40 ± 28.25	77.50 ± 8.20	93.42 ± 26.49	135.98 ± 31.06	83.28 ± 17.34	537.91 ± 99.63	1494.31 ± 163.29
4	0 (CTR)	154.14 ± 23.86	74.67 ± 9.74	112.94 ± 32.85	102.23 ± 31.19	94.02 ± 21.11	510.67 ± 100.18	1429.48 ± 196.15
	0.06	161.71 ± 39.45	79.24 ± 7.60	129.97 ± 38.90	96.99 ± 11.47	119.40 ± 39.08	515.40 ± 98.15	1519.15 ± 151.73
	0.3	181.86 ± 60.74	80.94 ± 9.46	170.66 ± 58.09**	83.81 ± 30.97**	153.41 ± 43.56***	458.09 ± 90.33	1521.04 ± 185.84
	0.6	219.43 ± 38.58*	82.30 ± 8.88	146.74 ± 41.02*	65.83 ± 16.80*	122.37 ± 37.64*	421.14 ± 95.69*	1556.25 ± 169.91
	1.5	202.71 ± 57.08	73.63 ± 11.18	142.07 ± 47.27	74.69 ± 22.75	114.15 ± 40.37	412.12 ± 85.19*	1385.35 ± 201.92
5	0 (CTR)	148.71 ± 28.25	83.49 ± 4.87	83.41 ± 17.23	149.00 ± 40.89	78.61 ± 11.72	610.13 ± 83.82	1612.34 ± 102.21
	0.06	160.57 ± 14.68*	83.37 ± 7.62	123.04 ± 59.00	103.67 ± 43.45*	110.80 ± 46.90	534.01 ± 122.74	1577.51 ± 142.35
	0.3	193.29 ± 39.67*	84.50 ± 4.38	119.30 ± 57.99	110.86 ± 46.57*	110.58 ± 52.91	505.31 ± 135.62*	1613.22 ± 106.60
	0.6	196.71 ± 54.37	78.74 ± 8.04*	127.66 ± 35.79*	93.69 ± 26.75**	115.19 ± 39.76	462.63 ± 86.60*	1427.86 ± 277.45
	1.5	168.67 ± 35.31	73.12 ± 6.99**	121.73 ± 32.28*	110.63 ± 31.15*	105.87 ± 31.97	490.51 ± 52.81**	1399.07 ± 139.67**

The results are presented as mean ± standard deviation, n = 5 – 7. The asterisk denotes a statistically significant difference between the samples treated with compounds and control; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. TGt—thrombin generation time, Fmax—maximum clotting, Tf— plasma clotting time, Fvo—initial plasma clotting velocity, Sf—area under the clot formation curve, Sc—area under the curve of a stable clot formation, S — overall potential of clot formation.

Publikacja III

Zajda A., Sikora J., Hynninen M., Tampio J., Huttunen K., Markowicz-Piasecka M. Substituent effects of sulfonamide derivatives of metformin that can dually improve cellular glucose utilization and anti-coagulation. *Chemico-Biological Interactions*. 2023, 373, 110381. **IF₂₀₂₂= 5.168; 100 p MEiN₂₀₂₂**



Contents lists available at ScienceDirect

Chemico-Biological Interactions

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chembioint

Research paper

Substituent effects of sulfonamide derivatives of metformin that can dually improve cellular glucose utilization and anti-coagulation

Agnieszka Zajda^a, Joanna Sikora^b, Mira Hynninen^c, Janne Tampio^c, Kristiina M. Huttunen^c, Magdalena Markowicz-Piasecka^{a,*}^a Laboratory of Bioanalysis, Department of Pharmaceutical Chemistry, Drug Analysis and Radiopharmacy, Medical University of Lodz, ul. Muszyńskiego 1, 90-151, Lodz, Poland^b Department of Bioinorganic Chemistry, Medical University of Lodz, ul. Muszyńskiego 1, 90-151, Lodz, Poland^c School of Pharmacy, Faculty of Health Sciences, University of Eastern Finland, Yliopistoranta 1C, P.O. Box 1627, 70211, Kuopio, Finland

ARTICLE INFO

Handling Editor: Brian S Cummings

Keywords:
Coagulation
Diabetes
Hemostasis
Metformin
Sulfonamides

ABSTRACT

Metformin, the most frequently prescribed medicine for the management of type 2 diabetes, has been shown to reduce cardiovascular events in diabetic patients in pre-clinical and clinical studies. The present work reports the design, synthesis, and biological assessment of the impact of six benzenesulfonamide biguanides on various aspects of hemostasis, cell function, red blood cell integrity (RBC), and their ability to uptake glucose in human umbilical endothelial cells (HUVECs). It was found that all synthesized *o*- and *m*-benzenesulfonamides, particularly derivatives with nitro (**3**) and amino groups (**4**), are characterized by a good safety profile in HUVECs, which was further confirmed in the cellular integrity studies. The biguanide analogues with methoxy group (**1**, **2**) and an amino substituent (**5**, **6**) significantly increased glucose utilization in HUVECs, similarly to the parent drug. Intriguingly, compounds **1**, **3**, and **6** favourably influenced some of the coagulation parameters. Furthermore, derivative **3** also slowed the process of fibrin polymerization, indicating more beneficial anti-coagulant properties than metformin. None of the novel metformin analogues interact strongly with the erythrocyte lipid-protein bilayer. Our findings indicate that derivative **3** has highly desirable anti-coagulant properties, and compounds **1** and **6** have potential dual-action activity, including anti-hyperglycaemic properties and anti-coagulant activity. As such, these derivatives can be used as lead molecules for further development of anti-diabetic agents with a beneficial effect on hypercoagulability.

1. Introduction

One of the most common chronic metabolic diseases worldwide, with a constantly increasing incidence, is diabetes mellitus (DM) [1,2]. During the last three decades, its prevalence has nearly quadrupled, and diabetes patients currently represent more than 8.8% of the world population [3,4]. DM is a cluster of metabolic disorders manifested by chronic hyperglycaemia arising from impaired insulin secretion, defects in insulin action or both [1,2]. These complex and multi-factorial metabolic disorders result in an impaired physiological balance between the processes of coagulation and fibrinolysis; this favours the development of a prothrombotic state characterized by both increased platelet number and over-activation, and by coagulation factors disorders and hypofibrinolysis. This phenomenon is commonly referred to as

diabetic thrombophilia (hypercoagulability) [5–8]. Numerous studies have found chronic hyperglycemia and insulin resistance to be associated with the upregulation of various plasma coagulation factors, including fibrinogen, factor VII, VIII, XI, XII, and von Willebrand factor (vWF), tissue factor (TF) and thrombin [2,5]. Moreover, in the course of diabetes, the abnormal, thick clot structures and significantly enhanced levels of plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) are observed, which inhibit fibrinolysis [5–9]. In diabetic patients, altered glucose metabolism, impairment of insulin signalling, systemic arterial hypertension, low-grade inflammatory state, and enhanced reactive oxidant species (ROS) generation also promote irreversible alterations in the endothelium, consequently leading to its dysfunction. All the aforementioned processes are conducive to the formation and growth of atherosclerotic plaque, and its destabilization, which constitutes the

* Corresponding author.

E-mail addresses: agnieszkazajda95@gmail.com (A. Zajda), joanna.sikora@umed.lodz.pl (J. Sikora), mira.hynninen@gmail.com (M. Hynninen), janne.tampio@uef.fi (J. Tampio), kristiina.huttunen@uef.fi (K.M. Huttunen), magdalena.markowicz@umed.lodz.pl (M. Markowicz-Piasecka).<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110381>

Received 30 November 2022; Accepted 3 February 2023

Available online 4 February 2023

0009-2797/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

morphological basis for the occurrence of atherosclerotic complications, including acute coronary syndrome, stroke and peripheral vascular diseases [6,10–13].

Due to the resulting unfavourable vascular profile, consisting of enhanced thrombotic environment coupled with accelerated atherosclerosis, patients with diabetes are at particular risk of vascular ischaemia and often require appropriate anticoagulant or/and anti-platelet therapy. However, there is still a lack of unambiguous guidelines concerning optimal antithrombotic management in diabetics, and the patients often receive similar treatment regimens to non-DM patients [5,6,9]. Until recently, the basis of oral anticoagulation therapy has been treatment with vitamin K antagonists (VKA), such as warfarin. Nevertheless, the clinical utilization of warfarin is limited by its narrow therapeutic index, highly variable pharmacological response, and the necessity of regular monitoring of international normalized ratio (INR), as well as extensive drug-food interactions [5,14–16]. In the past decade, however, this approach has been revolutionized by the development of direct oral anticoagulants (DOACs) including thrombin inhibitor (dabigatran) and factor Xa inhibitors (rivaroxaban, apixaban, and edoxaban) [9,17].

According to the latest recommendations of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD), metformin, a synthetic biguanide, constitutes the first-line drug of choice, used both as monotherapy in the initial stages of type 2 diabetes mellitus (T2DM) and as combined drug therapy with insulin or other oral antihyperglycemic medications in further stages [18,19]. Apart from its glucose-lowering properties, metformin has also been found to exert a favourable influence on the cardiovascular system, such as preventing cardiac and vascular disease; this is believed to result from its capacity to prevent endothelial lesions and damage, and the negative effects of angiotensin II and to lower oxidative stress and inflammation [20,21]. Furthermore, *in vitro* studies highlight its ability to decrease platelet activation and adhesion, as well as its anti-aggregation effect based on reducing spontaneous and ADP-induced aggregation [21–23]. However, in spite of its promising and multidirectional pharmacological properties, metformin possesses regrettably unfavourable pharmacokinetic properties due to its chemical structure and strongly hydrophilic character [24,25]. Heretofore, several attempts have been made to synthesize novel biguanide derivatives to improve its pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. Recent reports indicate that structural modification of a metformin backbone into sulfonamides, such as nitrobenzene sulfonamides, halogenated benzenesulfonamides and alkyl sulfonamides, may bestow the product with more potent anti-coagulant properties than the parent drug, metformin [21,26–28].

The present study describes the synthesis of several novel benzenesulfonamide biguanides, differing in the type (CH_3 , NH_2 , NO_2), and position (*ortho*-, *meta*-, *para*-) of their aromatic ring substituents. It also performs a biological appraisal of the newly-synthesized sulfonamide-based derivatives on various aspects of hemostasis, including plasma and vascular parameters, coagulation, and fibrinolysis. Their effects on cell growth, integrity, morphology, and mitochondrial function were assessed using experimental *in vitro* models of the vasculature: human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and human aortal smooth muscle cells (AoSMC). The studied compounds were also screened for their glucose utilization properties and potential anticoagulant activity, by measuring their prothrombotic time (PT), partially activated thromboplastin time (APTT), thrombin time (TT). They were then tested with regard to clot formation and fibrinolysis test (CL-test), and the activity of coagulation Xa factor, thrombin, and antithrombin III (AT). Finally, their biocompatibility in a model of human red blood cells (RBCs) was evaluated using RBC lysis assay and microscopic examination. Our findings indicate that the chemical modification of a biguanide skeleton into benzenesulfonamides may potentially serve as lead for the development of new therapeutic representatives with more potent anticoagulant activity than those of the parent drug, or with multimodal action, including hypoglycaemic effects and highly desirable anti-

coagulant properties.

2. Materials and methods

2.1. Materials for biological studies

All reagents used for biological research are presented in [Supplementary materials](#).

2.2. Synthetic materials and methods

More detailed synthetic materials and methods are described in the [Supplementary information](#).

2.3. Procedure for synthesis of sulfonamide derivatives

General procedure for the synthesis of new metformin derivatives was published previously [26]. Brief description of the synthesis route is described in [Supplementary materials](#).

2.3.1. N^1,N^1 -Dimethyl- N^4 -(3-methoxybenzenesulfonamide)-biguanidine (1)

Compound **1** was prepared from 3-methoxybenzenesulfonyl chloride to yield a white solid, 0.40 g, (56%). $^1\text{H NMR}$ ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ ppm 8.03 (bs, 1H), 7.43 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.33 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.11 (dd, $J = 8.2, 2.6$ Hz, 1H), 6.96 (bs, 1H), 6.71 (bs, 1H), 3.80 (s, 3H), 2.91 (s, 6H). $^{13}\text{C NMR}$ ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ ppm 159.81, 159.11, 158.39, 145.56, 130.04, 117.82, 116.85, 111.06, 55.49, 36.53 (2C). MS (ESI^+) for $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$ ($\text{M} + \text{H}^+$): Calcd 300.36, Found 300.20. Anal. Calcd for $(\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_3\text{S} \cdot 0.20 \text{ DMF})$: C, 44.38; H, 5.91; N, 22.31; Found: C, 44.59; H, 5.62; N, 22.43.

2.3.2. N^1,N^1 -Dimethyl- N^4 -(4-methoxybenzenesulfonamide)-biguanidine (2)

Compound **2** was prepared from 4-methoxybenzenesulfonyl chloride to yield a white solid, 0.36 g, (50%). $^1\text{H NMR}$ ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ ppm 8.05 (bs, 1H), 7.70 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.02 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.91 (bs, 1H), 6.66 (bs, 1H), 3.80 (s, 3H), 2.91 (s, 6H). $^{13}\text{C NMR}$ ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ ppm 161.33, 159.79, 158.37, 136.26, 127.70 (2C), 113.86 (2C), 55.52, 36.51 (2C). MS (ESI^+) for $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$ ($\text{M} + \text{H}^+$): Calcd 300.36, Found 300.20. Anal. Calcd for $(\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_3\text{S} \cdot 0.20 \text{ DMF})$: C, 44.38; H, 5.91; N, 22.31; Found: C, 44.72; H, 5.60; N, 22.13.

2.3.3. N^1,N^1 -Dimethyl- N^4 -(3-nitrobenzenesulfonamide)-biguanidine (3)

Compound **3** was prepared from 3-nitrobenzenesulfonyl chloride to yield a yellowish solid, 0.34 g, (56%). $^1\text{H NMR}$ ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ ppm 8.48 (s, 1H), 8.38 (dd, $J = 8.2, 2.3$ Hz, 1H), 8.21 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.95 (bs, 1H), 7.82 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.91 (bs, 2H), 2.91 (s, 6H). $^{13}\text{C NMR}$ ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ ppm 159.57, 158.38, 147.67, 145.93, 132.02, 130.93, 126.04, 120.43, 36.63 (2C). MS (ESI^+) for $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_6\text{O}_4\text{S}$ ($\text{M} + \text{H}^+$): Calcd 315.33, Found 315.10. Anal. Calcd for $(\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_6\text{O}_4\text{S} \cdot 0.30 \text{ DMF})$: C, 38.94; H, 4.83; N, 24.99; Found: C, 39.63; H, 4.21; N, 24.06.

2.3.4. N^1,N^1 -Dimethyl- N^4 -(2-aminobenzenesulfonamide)-biguanidine (4)

Compound **4** was prepared from N^1,N^1 -dimethyl- N^4 -(2-nitrobenzenesulfonamide)-biguanidine (**7**) as reported earlier (Ref. [29]) by hydrogenating the compound in the presence of 10% Pd/C in MeOH/DMF (10:1) under H_2 atm overnight. The reaction mixture was filtered through the celite and washed with MeOH. The solvent was removed and the residue was triturated with CH_2Cl_2 to yield a brownish solid, 0.11 g, (93%). $^1\text{H NMR}$ ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ ppm 7.95 (bs, 1H), 7.53 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.19 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H), 6.91 (bs, 1H), 6.76 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 6.58 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H), 5.73 (bs, 2H), 2.90 (s, 6H); $^{13}\text{C NMR}$ ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ ppm 159.52, 158.21, 145.65, 132.37, 127.56, 125.15, 116.57, 115.00, 36.59 (2C). MS (ESI^+) for $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}$ ($\text{M} + \text{H}^+$): Calcd 285.35, Found 285.10. Anal. Calcd for $(\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_6\text{O}_2\text{S} \cdot 0.2 \text{ DMF})$: C,

39.05; H, 5.28; N, 24.61; Found: C, 39.22; H, 5.10; N, 24.46.

2.3.5. *N*¹,*N*¹-Dimethyl-*N*⁴-(3-aminobenzenesulfonamide)-biguanidine (5)

Compound 5 was prepared from *N*¹,*N*¹-dimethyl-*N*⁴-(3-nitrobenzenesulfonamide)-biguanidine (3) by hydrogenation, similarly to compound 4, to yield a brownish solid, 0.29 g, (80%). ¹H NMR ((CD₃)₂SO): δ ppm 6.86 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.85 (s, 1H), 6.84 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.65 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.93 (bs, 1H), 6.62 (bs, 1H), 5.45 (bs, 2H), 2.91 (s, 6H); ¹³C NMR ((CD₃)₂SO): δ ppm 159.89, 158.39, 149.02, 144.78, 129.07, 116.28, 112.57, 110.50, 36.51 (2C). MS (ESI⁺) for C₁₀H₁₇N₆O₂S (M + H)⁺: Calcd 285.35, Found 285.00. Anal. Calcd for (C₁₀H₁₆N₆O₂S)⁺ * 0.3 DMF * 0.2 DCM: C, 41.24; H, 5.71; N, 26.00; Found: C, 40.85; H, 5.30; N, 25.99.

2.3.6. *N*¹,*N*¹-Dimethyl-*N*⁴-(4-aminobenzenesulfonamide)-biguanidine (6)

Compound 6 was prepared from *N*¹,*N*¹-dimethyl-*N*⁴-(4-nitrobenzenesulfonamide)-biguanidine (8) by hydrogenation, similarly to compound 4, to yield a brownish solid, 0.28 g, (78%). ¹H NMR ((CD₃)₂SO): δ ppm 7.39 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.80 (bs, 1H), 6.60 (bs, 1H), 6.55 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 5.76 (bs, 1H), 5.73 (bs, 1H), 2.90 (s, 6H); ¹³C NMR ((CD₃)₂SO): δ ppm 159.75, 158.36, 151.61, 130.22, 127.40 (2C), 112.42 (2C), 36.47 (2C). MS (ESI⁺) for C₁₀H₁₇N₆O₂S (M + H)⁺: Calcd 285.35, Found 285.10. Anal. Calcd for (C₁₀H₁₆N₆O₂S)⁺ * 0.3 DMF * 0.6 DCM: C, 38.67; H, 5.28; N, 23.53; Found: C, 38.77; H, 5.04; N, 23.90.

2.4. Biological material for stability studies

Stability studies were performed using mouse liver and brain S9 fractions. The preparation of biological material is described in detail in [Supplementary materials](#).

2.5. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) analyses

Quantification of biguanidines (1–6) was determined by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). The conditions of analyses are presented in detail in [Supplementary materials](#).

2.6. Enzymatic and chemical stability of biguanidines

The chemical and enzymatic stability of the examined molecules 1–6 was investigated in accordance with the previously described protocol [30]. An accurate description of stability studies is included in [Supplementary materials](#).

2.7. Preparation of biological material for coagulation screening tests and RBCs lysis assay

All experiments using biological material (plasma, erythrocytes) were conducted in conformity with Polish national directives. The study protocols were endorsed by the Bioethics Committee of the Medical University of Lodz, Poland (approval no. RNN/105/20/KE).

General procedure for the preparation of biological material for Basic Coagulation Studies and RBCs Lysis Assay has been placed in our prior articles [28,30]. Full particulars of the preparation of biological material for coagulation screening tests and RBCs Lysis Assay are also given in [Supplementary materials](#).

2.8. Primary cell growth and morphology

The influence of synthesized compounds on HUVEC and AoSMC cell growth was evaluated using colorimetric WST-1 test described previously [31]. A comprehensive description of these studies is also incorporated in [Supplementary materials](#).

2.9. Glucose utilization assay

The impact of studied molecules 1–6 on the intracellular uptake of glucose was tested using a fluorescent marker 2-NBDG (2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose in HUVEC cells culture. The cells were treated with tested compounds 1–6 (at 0.3 and 0.6 μmol/mL) or glucose (0.1 and 0.5 μmol/mL) which was a positive control. After 24 h of stimulation, the cells were rinsed, cultured with glucose-free DMEM, and then incubated with insulin 100 nmol/L. Afterwards, the cells were treated with 2-NBDG (50 μmol/L), followed by intensive rinsing, cell lysis, and subsequent fluorescence measurements. A detailed description of the method was featured in our previous publication [28] and is shown in [Supplementary materials](#).

2.10. Mitochondrial membrane potential

The effects of examined compounds 1–6 on mitochondrial membrane potential (ΔΨ_m) were estimated using a cytofluorimetric dye (JC-1). The aggregation level of the JC-1 reagent in mitochondria, reflecting the changes in ΔΨ_m, was evaluated by flow cytometry and defined as the ratio of red-to-green mean fluorescence intensity. Healthy cells are characterized by high ΔΨ_m, which is demonstrated by forming J-aggregates manifesting intense red fluorescence. A general procedure for this experiment has formerly been presented [30]. The study on the mitochondrial membrane potential of HUVECs is outlined in detail in [Supplementary materials](#).

2.11. HUVEC integrity studies

The impact of sulfonamide derivatives 1–6 on the integrity and barrier function of HUVEC was analysed by measuring the real-time change in electronic impedance, reported as a unitless parameter, the cellular index (CI). The experiments were carried out for 48 h, and then the reading of the CI values was taken. The findings are given as mean ± SD of 'normalized cell index' (nCI), which constitutes the real-time cellular impedance expressed as a percentage of the value at the reference time. The experimental protocol is given in detail elsewhere [32] as well as is placed in [Supplementary materials](#).

2.12. Red blood cells lysis assay and morphology

The impact of tested compounds 1–6 on erythrocyte membrane integrity was examined by lysis assay which is based on spectrophotometric measurements of released haemoglobin (Hgb) as described previously [33]. The amount of Hgb released from erythrocyte suspension was measured after 1-h and 24-h of co-incubation with tested compounds. The integrity of the RBC membrane was also performed after 1-h and 24-h of incubation. [Supplementary materials](#) incorporate a concise description of these experiments.

2.13. Coagulation screening tests

As part of the search for anticoagulant activity of sulfonamides 1–6, the following tests were performed PT, INR, APTT, and TT. The entire experiment was conducted in strict accordance with the routine laboratory diagnostic procedure described previously [33] and is also clarified in detail in [Supplementary materials](#).

2.14. Activity of antithrombin III (AT)

The measurement of AT activity in human plasma was carried spectrophotometrically, which has previously been presented [34]. Antithrombin was incubated with test compounds and thrombin with an excess of heparin for 60 s. After the chromogenic substrate had been added to the test sample, *p*-nitroaniline (*p*NA) was released in an amount proportional to the level of antithrombin. The amount of released *p*NA

was determined in a kinetic test measuring the rise in absorbance at $\lambda = 405$ nm using a coagulometer program. A precise description of the mentioned method is included in [Supplementary materials](#).

2.15. Activity of factor X

Colorimetry, the routine optical method of instrumental analysis, was used to establish factor X activity in human plasma [34]. In this method, pNA (yellowish colour) is released by the action of a specific factor Xa substrate. The enzymatic activity of factor X is in direct proportion to the change in absorbance of the pNA at $\lambda = 405$ nm. A brief outline of this method is given in [Supplementary materials](#).

2.16. Clot formation and lysis test (CL-test)

To determine the influence of selected compounds **1**, **3**, **4**, and **6** on overall hemostasis potential, further in-depth analyses were conducted using a multiparametric CL-test. The process of clot formation and its lysis have been analysed thoroughly by continuous transmittance change reading. The general procedure for this method has been explained previously [35,36]. In addition, the above method was discussed in [Supplementary materials](#).

2.17. Coagulation assay

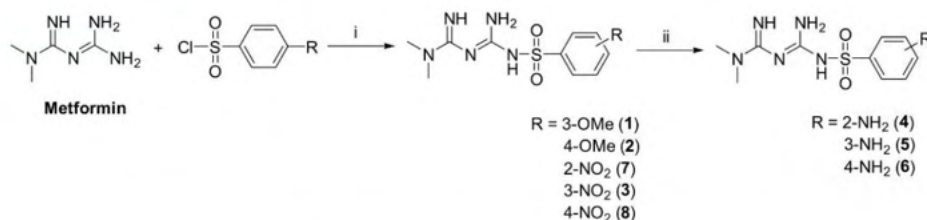
The coagulation assay has been conducted in accordance with the formerly published protocol [33,36]. Brief description of the conducted study is comprised in [Supplementary materials](#).

2.18. Amidolytic activity of thrombin

The exact procedure of the amidolytic activity of thrombin measurement (spectrophotometry) has been featured elsewhere [37]. This availability of the catalytic center of the serine protease was determined by adding a colourless chromogenic substance D-Phe-Pip-Arg-pNA which changes colour to yellow as a result of the hydrolysis of the peptide bond and the transformation of the substrate into pNA. The absorbance of tested samples was measured at $\lambda = 405$ nm. [Supplementary materials](#) also incorporate a concise description of the spectrophotometric study.

2.19. Data analysis

In the statistical analysis, the following tests were used: Shapiro-Wilk test, Levene's test, the paired *t*-test (Statistica 12.0 - StatSoft, Kraków, Poland) as well as one-way ANOVA (GraphPad Prism 5 software - San Diego, CA, USA). Particulars of the statistical analysis are included in [Supplementary materials](#).



Scheme 1. Synthesis of metformin sulfonamide derivatives; a) CH₂Cl₂, rt, 20 h, 39–80%; b) 10% Pd/C, H₂, MeOH/DMF, 20 h, 39–80%.

3. Results

3.1. Synthesis of metformin sulfonamide derivatives and their chemical and enzymatic stabilities

Methoxy (*meta*- and *para*-substituted) and 3-nitro-sulfonamide metformin derivatives (**1–3**) were prepared as previously described. Briefly, commercial sulfonyl chlorides were coupled with basic metformin to obtain the metformin sulfonamide derivatives with moderate to good yields ([Scheme 1](#)) [29]. The similarly-prepared intermediates (**7–8**) and compound **3** were then reduced to obtain the final compounds **4–6**. All the prepared metformin sulfonyl chlorides were chemically stable in buffer solutions (pH 7.4), as well as enzymatically stable in human and mouse plasma or serum, in addition to mouse liver and brain S9 sub-cellular fractions.

3.2. Cell viability assay and morphology

The influence of derivatives **1–6** on the viability of HUVEC and AoSMC lines was evaluated using the WST-1 assay. Both HUVEC and AoSMC were stimulated with the examined biguanides at concentrations range of 0.006–1.5 $\mu\text{mol/mL}$ ([Table 1](#), [Fig. S1](#), [Supplementary materials](#)).

Out of the tested compounds, sulfonamides **3**, and **4** revealed the least effect on HUVEC viability, decreasing HUVEC viability by 36.73% and 10.86%, respectively, over the entire concentration range ([Fig. S1](#)). The *meta*-substituted sulfonamides, such as compounds **1**, and **5** demonstrated a more potent inhibitory impact on HUVEC growth (IC₅₀ values were 0.907 ± 0.09 $\mu\text{mol/mL}$, and 0.928 ± 0.04 $\mu\text{mol/mL}$) while the *para*-derivatives (**2**, **6**) had the least, with respective IC₅₀ values of 0.755 ± 0.10 $\mu\text{mol/mL}$ and 0.708 ± 0.04 $\mu\text{mol/mL}$.

All studied compounds demonstrated a comparatively good safety profile on AoSMCs, with much weaker impact on their viability; as such it was not possible to determine IC₅₀ values in the concentration range of 0.006–1.5 $\mu\text{mol/mL}$ ([Table 1](#), [Fig. S1](#), [Supplementary materials](#)). The greatest inhibitory effect was observed for *m*-, *p*-methoxy substituted benzenesulfonamides (**1–2**) which inhibited AoSMC viability by roughly 48–49% at 1.5 $\mu\text{mol/mL}$. In contrast, 70–77% survival was observed for

Table 1

The effects of compounds **1–6** on HUVEC and AoSMC cells growth. The results (IC₅₀ values, $\mu\text{mol/mL}$) are presented as mean \pm SD ($n = 6–8$). In the previous studies, metformin did not demonstrate any influence on HUVEC and AoSMC viability up to 1.5 $\mu\text{mol/mL}$ [28].

Compound	Viability - IC ₅₀ [$\mu\text{mol/mL}$]	
	HUVEC cells	AoSMC cells
1	0.907 ± 0.09	>52% at 1.5 $\mu\text{mol/mL}$
2	0.755 ± 0.10	>51% at 1.5 $\mu\text{mol/mL}$
3	>63% at 1.5 $\mu\text{mol/mL}$	>54% at 1.5 $\mu\text{mol/mL}$
4	>89% at 1.5 $\mu\text{mol/mL}$	>98% at 1.5 $\mu\text{mol/mL}$
5	0.928 ± 0.04	>70% at 1.5 $\mu\text{mol/mL}$
6	0.708 ± 0.04	>77% at 1.5 $\mu\text{mol/mL}$

the compounds with an amino group (5–6), at a concentration of 1.5 $\mu\text{mol/mL}$. Intriguingly, the *o*-amino derivative (4) not only demonstrated the least effect on HUVECs, but also on AoSMCs within the entire concentration range of 0.006–1.5 $\mu\text{mol/mL}$: AoSMCs viability was found to be over 86.26%.

The effects of examined metformin analogues 1–6 on HUVEC and AoSMC cell viability were examined under an inverted microscope with phase contrast (after 24 h of co-stimulation). Exemplary microphotographs of cells stimulated with metformin derivatives at 1.5 $\mu\text{mol/mL}$ or the concentration closed to their IC_{50} value are illustrated in Fig. 1 and Fig. S2 (Supplementary materials). The microscopic images were taken after 24 h of co-stimulation.

The microscopic analysis proved that the treatment of HUVECs with compounds 2, 5–6 triggered the appearance of rounded and shrunken cells. Additionally, biguanides 1 and 3 tended to lengthen the cells. In the case of compounds 5–6, more dead cells were detected compared to controls. In AoSMCs, incubation with studied compounds 1–6 resulted in an increased number of shrunken as well as rounded cells. Unquestionably, the greatest number of rounded, shrunken and clumped cells, as well as a lower number of viable cells, was observed in the case of compounds 5–6 at 1.5 $\mu\text{mol/mL}$.

3.3. Glucose utilization assay

The effect of compounds 1–6 on intracellular glucose uptake by HUVECs was determined using a fluorescent indicator (2-NBDG; 2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose). The 2-NBDG reagent is commonly used to monitor glucose utilization in live cells, and to indicate cell viability. *D*-glucose was found to have a slight inhibitory effect on 2-NBDG uptake ($4.4 \pm 1.0 \mu\text{mol/L}$ vs. $6.4 \pm 1.1 \mu\text{mol/L}$ for control, Fig. 2). Hence, the reference molecule, metformin, appears to significantly elevate glucose utilization in HUVECs at both studied concentrations ($11.1 \pm 1.6 \mu\text{mol/L}$ at 0.5 $\mu\text{mol/mL}$, $11.0 \pm 2.2 \mu\text{mol/L}$ at 1.0 $\mu\text{mol/mL}$ vs. $6.4 \pm 1.1 \mu\text{mol/L}$ for control; $p < 0.001$). The most approximate effects to the reference compound, metformin, were noted in the case of biguanide 5, i.e. substituted with an NH_2 moiety in the *meta* position (Table S1, Supplementary materials). This compound enhanced glucose uptake both at 0.3 $\mu\text{mol/mL}$ as well as 0.6 $\mu\text{mol/mL}$, and was $8.5 \pm 0.8 \mu\text{mol/L}$, and $8.5 \pm 0.7 \mu\text{mol/L}$, respectively ($p < 0.05$). Similar effects were also noted in the case of biguanides 1, 2, and 6 at the higher tested concentration. Notably, sulfonamide 1, with a

methoxy substituent in the *meta* position, at 0.6 $\mu\text{mol/mL}$ contributed to glucose uptake of $9.6 \pm 2.6 \mu\text{mol/L}$ vs. $6.4 \pm 1.1 \mu\text{mol/L}$ in the case of the control; $p < 0.05$. Importantly, derivative 3 was found to increase glucose uptake at 0.6 $\mu\text{mol/mL}$; although the obtained result was not statistically significant ($8.1 \pm 0.7 \mu\text{mol/L}$ vs. $6.4 \pm 1.1 \mu\text{mol/L}$; NS, $p > 0.05$). Otherwise, compound 4 did not affect glucose utilization in HUVECs.

3.4. Mitochondrial membrane potential

The effects of the studied compounds on mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi\text{M}$) in HUVECs were determined by flow cytometry using the JC-1 fluorescent cationic probe (Fig. 3, Table S2, Supplementary materials). In healthy cells, characterized by high $\Delta\Psi\text{M}$, occur complexes called J-aggregates (intensive red fluorescence) while in cells with low $\Delta\Psi\text{M}$, the monomeric forms of JC-1 (green fluorescence) are present. A higher red-to-green fluorescence ratio, indicates greater polymerization of the mitochondrial membrane.

A significant diminution in the red-to-green fluorescence ratio ($p < 0.05$) was noted after FCCP treatment (positive control). However, no significant changes were recorded following 24-h of co-stimulation with metformin at 0.5 $\mu\text{mol/mL}$, 1.0 $\mu\text{mol/mL}$, and biguanides 1–3 at 0.3 $\mu\text{mol/mL}$, 0.6 $\mu\text{mol/mL}$, as well as derivative 4 at 0.3 $\mu\text{mol/mL}$. Incubation of the cells with biguanides 5–6 at both 0.3 $\mu\text{mol/mL}$, and 0.6 $\mu\text{mol/mL}$ led to a significant drop in $\Delta\Psi\text{M}$, defined as lower red-to-green fluorescence ratio (respectively, $p < 0.001$). A significant decrease in $\Delta\Psi\text{M}$ was also noted for compound 4 ($p < 0.001$), but only at the highest tested concentration (0.6 $\mu\text{mol/L}$).

3.5. HUVEC integrity studies

The present study also assessed the impact of the examined compounds on endothelial monolayer integrity. The received outcomes of 36-h co-stimulation of HUVECs with compounds 1–6 are presented in Fig. 4, Table S3, and Table S4 (Supplementary materials). The findings indicate that both sulfonamide structure and concentration influenced barrier properties, including cell integrity, viability, adhesion and shape, expressed by nCI.

None of the tested compounds demonstrated any significant effect on HUVEC cell function at either 0.3 or 0.6 $\mu\text{mol/mL}$ within 12 h of stimulation. However, a statistically-significant reduction in nCI, i.e. by

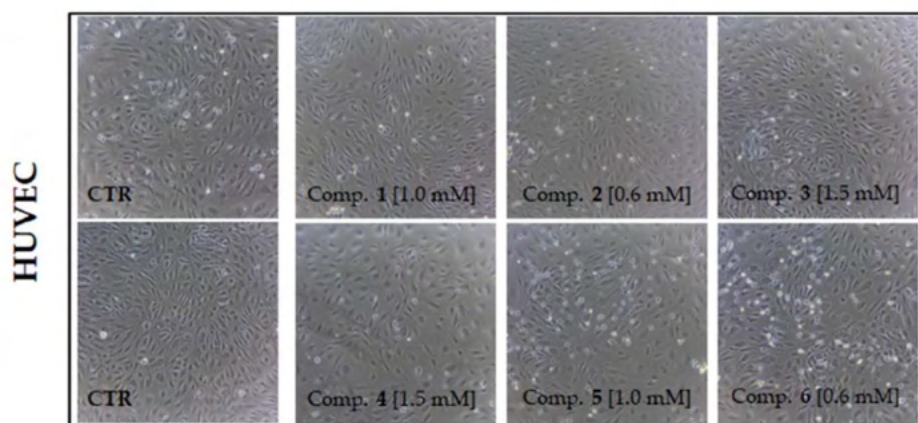


Fig. 1. The effect of sulfonamides 1–6 on HUVEC viability and morphology after 24-h of incubation. Cells were cultured without (control, CTR) and with compounds 1–6 at a concentration of 0.006–1.5 $\mu\text{mol/mL}$. Representative cell images are shown for concentrations closed to IC_{50} values or 1.5 $\mu\text{mol/mL}$ (100-fold magnification). In the previous studies, metformin was found to not affect the viability and morphology of HUVEC cells in our previous study [21].

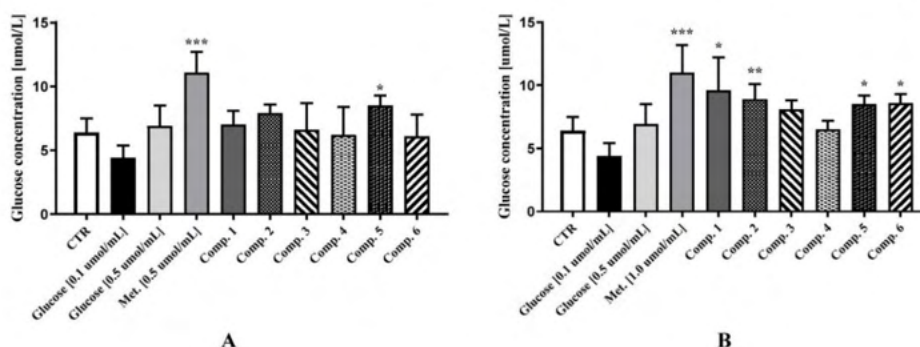


Fig. 2. The impact of metformin analogues 1–6 at the concentration of 0.3 µmol/mL (A), 0.6 µmol/mL (B); and D-glucose on the 2-NBDG uptake in HUVEC cells. The cells were incubated in the presence of compounds examined biguanides for 24 h prior to the experiments. The next day, the cells were glucose-starved for 2 h, and immediately stimulated with insulin for 30 min, and next with 2-NBDG for 45 min. The outcomes are presented as mean \pm SD; $n = 4$. The asterisk denotes a statistically significant difference between the samples treated with compounds and control; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

30–60% (at various time points of the experiment), was recorded for compounds 1–6 at 0.3 and 0.6 µmol/mL after 24 h of stimulation. The tested biguanides triggered a substantially greater reduction in nCl value when applied at a concentration of 0.6 µmol/mL compared to 0.3 µmol/mL. The least effect was demonstrated by derivative 4, possessing an amino substituent at 2 position in the benzene aromatic ring; the nCl value was reduced by only 33.47% at the highest tested concentration (0.6 µmol/mL) (1.068 ± 0.206 vs. 1.606 ± 0.085 for control, $p < 0.001$) after 36-h stimulation.

3.6. Red blood cells lysis assay and morphology

In addition to their interactions with plasma proteins, the tested biguanides may also initiate interactions with blood cells. Therefore, a red blood cell lysis assay was also performed. The impact of metformin derivatives 1–6 on the integrity of the RBC membrane is depicted in Fig. S3 and Fig. S4 (Supplementary materials). The amount of Hgb released from erythrocyte suspension under the influence of the tested compounds was measured spectrophotometrically, and the integrity of the RBC membrane was assessed after 1 h and 24 h of co-incubation with the test derivatives at concentrations of 0.006–1.5 µmol/mL. After 1 h of incubation, neither compounds 1 (*m*-methoxy), 2 (*p*-methoxy) nor biguanide 3 (*m*-nitro) were found to reveal any effect on the RBC membrane within the entire tested concentration range. Although the other compounds significantly increased the rate of hemolysis, the degree of RBC hemolysis accounted for less than 5%, which is considered clinically irrelevant. For example, after 1 h of incubation with compound 4 (0.6 µmol/mL), the degree of erythrocytes hemolysis was 1.72 ± 0.57 (Fig. S3, Supplementary materials). None of the metformin derivatives induced clinically relevant hemolysis after 24 h of incubation.

The tested erythrocytes were also subjected to morphological examination under a phase contrast microscope. No pathological changes were observed after 1 h and 24 h of incubation (Fig. 5, Fig. 6). However, a tendency to form echinocytes and stomatocytes was noticed in the case of biguanides 1–6. The number of such changes was found to increase after 24-h exposure to the tested compounds. Undoubtedly, these changes are physiological and wholly reversible [38].

3.7. Basic coagulation tests: PT, INR, APTT, TT

The influence of sulfonamides 1–6 on the basic coagulation parameters is shown in Table 2. Of the tested compounds, those with a substituent in the *meta* position (1, 3, 5) were found to significantly extend PT, INR, APTT and TT at the highest tested concentration (1.5 µmol/

mL). For example, *m*-nitro biguanide(3) extended the extrinsic coagulation pathway (14.56 ± 0.90 vs. 12.7 ± 0.73 s for control, $p < 0.001$), INR (1.16 ± 0.07 vs. 1.01 ± 0.06 s for control, $p < 0.01$), intrinsic coagulation pathway (44.92 ± 5.09 vs. 34.88 ± 5.69 s for control, $p < 0.05$) and fibrin polymerization (20.05 ± 0.58 vs. 13.5 ± 0.28 s for control, $p < 0.001$). Compounds 2, 4, 6 also affected all measured coagulation parameters when given at 1.5 µmol/mL; however, PT and INR values were not found to change significantly ($p > 0.05$). It is important to note that the changes observed for sulfonamides 1, 2, 5, and 6 were detected at a higher concentration (1.5 µmol/mL) than their IC_{50} values. Metformin derivatives 1, 4 (0.006, 0.3–1.5 µmol/mL), 2 (0.3–1.5 µmol/mL), 3 (1.5 µmol/mL), 5 (0.6–1.5 µmol/mL), as well as 6 (over the entire concentration range) significantly prolonged APTT; however, the results were outside the range of reference values (26.7–40.0 s), which may be of potential importance in further studies. Generally speaking, the *para*-substituted derivatives (2, 6) appeared to significantly shorten TT at 0.006–0.06 µmol/mL, but prolong TT at the higher concentrations, i.e., 0.3–1.5 µmol/mL (NS, $p > 0.5$). Importantly, a significant rise in TT was recorded for the *o*-amino metformin analogue (4) at 0.6 µmol/mL (19.25 ± 1.61 vs. 14.88 ± 1.70 ; $p < 0.001$).

3.8. Activity of antithrombin III (AT)

AT, a single-chain plasma glycoprotein which is a major blood clotting regulator, plays a pivotal role in haemostasis by inhibiting thrombin (IIa) and other clotting factors, including IXa, Xa, XIa, XIIa and kallikrein [39]. The rapid assay of AT activity based on chromogenic substrate, used in the present study, is based on the principle that thrombin is inhibited by AT in the presence of excess heparin [40].

The effect of the analysed compounds on AT activity (%) is shown in Fig. 7 and Table S5 (Supplementary materials). Among the examined compounds, biguanide 3 at 1.5 µmol/mL, compound 1 at 0.06 µmol/mL, 0.6 µmol/mL and 1.5 µmol/mL, and derivative 6 at both 0.6 µmol/mL and 1.5 µmol/mL, significantly increased the activity of AT. For instance, compound 1, with a methoxy substituent in the benzene ring in the *meta* position, significantly enhanced the AT activity to $144.25 \pm 3.50\%$ at 0.06 µmol/mL ($p < 0.05$) and $136.00 \pm 3.74\%$ at 0.6 µmol/mL ($p < 0.05$). Nevertheless, it should be pointed out that the outcomes for compounds 1 and 6 at 1.5 µmol/mL were observed at a concentration causing appreciable HUVEC death. Compounds 1 and 6 also caused a rise in the activity of AT when applied at 0.3 µmol/mL; however, these changes were not statistically significant ($p > 0.05$). In the case of compound 3, AT activity was increased to $140.00 \pm 5.77\%$ ($p < 0.05$) compared to $121.50 \pm 4.43\%$ for the controls. Significantly, derivative

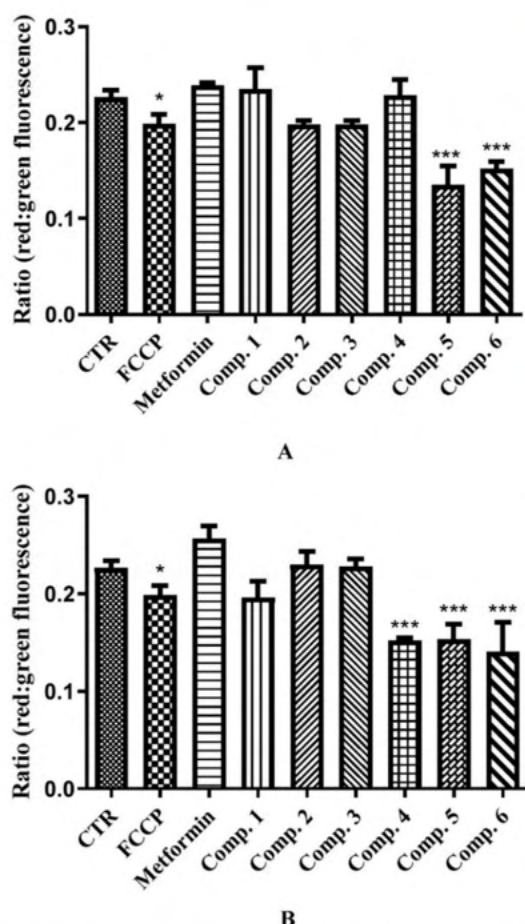


Fig. 3. The influence of metformin at the concentration of 0.5 µmol/mL (A), 1.0 µmol/mL (B), as well as its analogues 1–6 at 0.3 µmol/mL (A), 0.6 µmol/mL (B) on the mitochondrial membrane potential. FCCP at 10 µmol/L was used as a positive control. The outcomes are presented as ratio between red and green fluorescence (recorded as mean fluorescence intensity). The asterisk denotes a statistically significant difference between the samples treated with compounds and control; * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

3 at 0.3 µmol/mL, led to a discernible drop in AT activity (111.00 ± 3.74%, $p < 0.05$). None of the remaining derivatives (2, 4, 5) exerted any relevant influence on AT activity.

3.9. Factor X activity

The effects of compounds 1, 3–6 on FX activity were determined by examining alterations in plasma coagulation time (PT), which is in direct proportion to the FX activity in the examined plasma. FX, the so-called Stuart–Prower factor, is a vitamin K engaged in the intrinsic and extrinsic paths of the blood coagulation cascade. Under the influence of factor IXa or factor VIIa, FX is transformed into its active form, factor Xa (FXa), which is the major physiologic prothrombin activator [41].

Based on these results, the most promising biguanides were selected to test their influence on factor X activity. The effects of derivatives 1,

3–6 on the FX activity (%) are illustrated in Fig. 8 and Table S6 (Supplementary materials). All of the examined compounds inhibited FX activity, although some changes were not statistically significant. A significant decrease in Stuart–Power factor activity was noticed for derivatives 1, 4, and 5 ($p < 0.05$) as well as compound 6 (NS, $p > 0.05$) at 0.6 µmol/mL.

3.10. Clot formation and lysis test (CL-test)

Based on the results of the basic coagulation, factor X, and anti-thrombin activity tests into consideration, compounds 1, 3, 4, and 6 were selected for further in-depth studies regarding their impact on the overall potential of clot formation and fibrinolysis (CL_{AUC}) using the CL-test [35]. The findings offer an insight into the kinetic parameters of the following processes: clot formation, stabilization, and fibrinolysis by continuous transmittance alteration reading (Fig. 9, Table S7, Supplementary materials).

3.10.1. Overall potential of clot formation and fibrinolysis (CL_{AUC})

Compounds 1, 3, and 6 significantly increased the area under the curve (AUC) of clot formation and fibrinolysis (Table S7, Supplementary materials). However, derivative 1, with a methoxy substituent in the benzene aromatic ring in the meta position, did not reveal any effects on the overall potential of clot formation and fibrinolysis (CL_{AUC} constant) in the lowest tested concentrations (0.06–0.3 µmol/mL), and derivative 4, with an o-amino moiety, did not show any impact at concentrations of 0.06 µmol/mL, 0.6 µmol/mL or 1.5 µmol/mL (CL_{AUC} constant). Among the tested metformin analogues, compounds 1 and 4 appear to be the most neutral biguanides towards the overall potential of clot formation and fibrinolysis. Derivatives 1, 3, 4, and 6 were also found to greatly extend the overall duration of clot formation and fibrinolysis (T) particularly at the highest tested concentrations.

3.10.2. Kinetic parameters of clot formation phase

The impact of the examined biguanides on thrombin time (Tt) was evaluated, i.e. the time passed from the addition of exogenous thrombin (0.5 U/mL) to the initiation of clot formation. No significant changes in Tt were noted for derivatives 1, 6 (Tt constant) over the whole concentration range. A significant increase in Tt (↑Tt, $p < 0.05$, $p < 0.01$; respectively) were observed for compound 3 at 0.3–1.5 µmol/mL, and a significant decrease for compound 4 at 0.3 µmol/mL (↓Tt, $p < 0.05$). Importantly, derivatives 1, 4, and 6 did not appear to affect the initial velocity of plasma clotting (Fvo constant); however, compound 3 at 0.3–1.5 µmol/mL significantly reduced Fvo (↓Fvo; $p < 0.05$, $p < 0.01$; respectively), which was directly related to a significant rise in plasma clotting time (↑Tf) ($p < 0.05$, $p < 0.01$; appropriately). Derivative 3 also considerably decreased the maximum clotting (↓Fmax) at the highest tested concentration, while biguanide 1, significantly increased Fmax (↑Fmax, at 0.06–0.6 µmol/mL; $p < 0.05$) as well as Tf (↑Tf, at 0.06–1.5 µmol/mL) ($p < 0.05$, $p < 0.01$; appropriately).

3.10.3. Kinetic parameters of clot stabilization phase

All selected compounds were found to prolong clot stabilization time (↑Tc), depending on the concentration, which was reflected by a significant growth in Sc. This implies that analysed compounds may affect the structure of the formed clot.

3.10.4. The kinetic parameters of the fibrinolysis phase

The third stage investigated the effect on the initial velocity of fibrinolysis (Lvo), the maximum fibrinolysis (Lmax), fibrinolysis time (Tl), and the area under the fibrinolysis curve (Sl). None of the examined biguanides significantly influences the initial velocity of fibrinolysis (Lvo constant), fibrinolysis time (Tl constant), or the area under the fibrinolysis curve (Sl constant) at concentrations: 0.06–1.5 µmol/mL. In addition, derivative 4 was not found to affect the maximum fibrinolysis value (Lmax constant). In the case of compounds 1, and 6, a significant

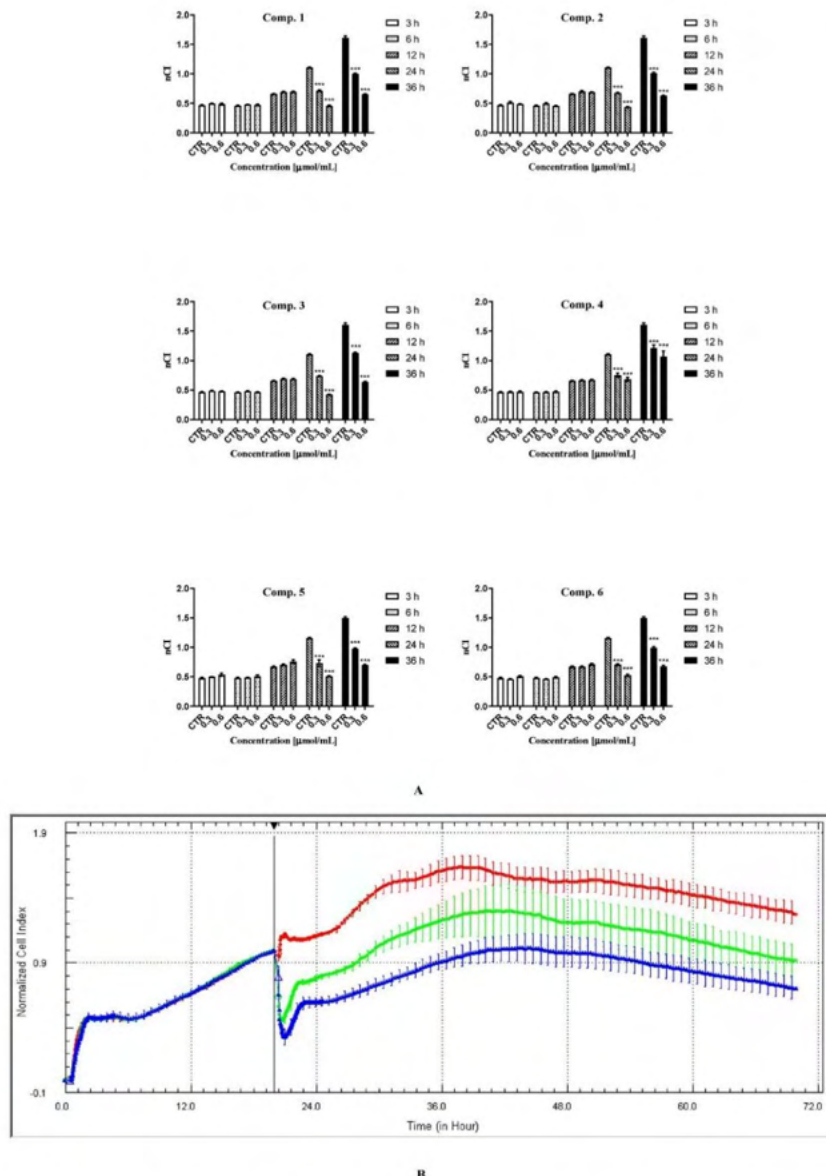


Fig. 4. Effects of compounds 1–6 on the integrity of HUVECs was analysed with use of RTCA-DP system. **A)** The effect of the exposure of compounds 1–6 on normalized Cell Index (nCI) at selected time points (3, 6, 12, 24 and 36 h). The results are presented as mean \pm SD, $n = 4-5$. An asterisk denotes a significant difference between sample treated with biguanide and control sample; $***p < 0.001$. **B)** The effects of compound 4 on the barrier properties of HUVECs. The picture presents representative plots of one experiment conducted in duplicates (the results are presented as a mean (solid line) \pm standard deviation). For the statistical analysis there were conducted three independent experiments. Red line – control (unstimulated cells); green line – compound at the concentration of 0.3 $\mu\text{mol/mL}$; navy blue line – 0.6 $\mu\text{mol/mL}$.

rise in maximum fibrinolysis ($\uparrow\text{Lmax}$) was recorded; and it was directly related to the increase in Fmax . In contrast, biguanide 3 at 1.5 $\mu\text{mol/mL}$ was shown to significantly reduce maximum fibrinolysis ($\downarrow\text{Lmax}$; $p < 0.05$). Most likely, the observed change might have been closely connected with a drop in Fmax ($\downarrow\text{Fmax}$; $p < 0.05$) noted at 1.5 $\mu\text{mol/mL}$

(Table S7, Supplementary materials).

3.11. Coagulation assay

The next stage used a coagulation assay to evaluate the influence of

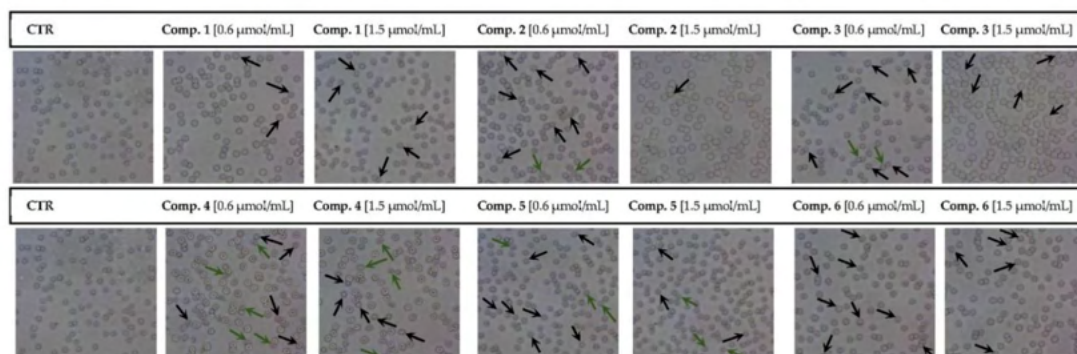


Fig. 5. Impact of synthesized biguanides 1–6 on erythrocytes morphology at the highest tested concentrations (0.6–1.5 $\mu\text{mol/mL}$) after 1-h incubation. The representative phase-contrast images are depicted in magnification of 400 times; echinocytes are marked with black arrows, stomatocytes are marked with green arrows.

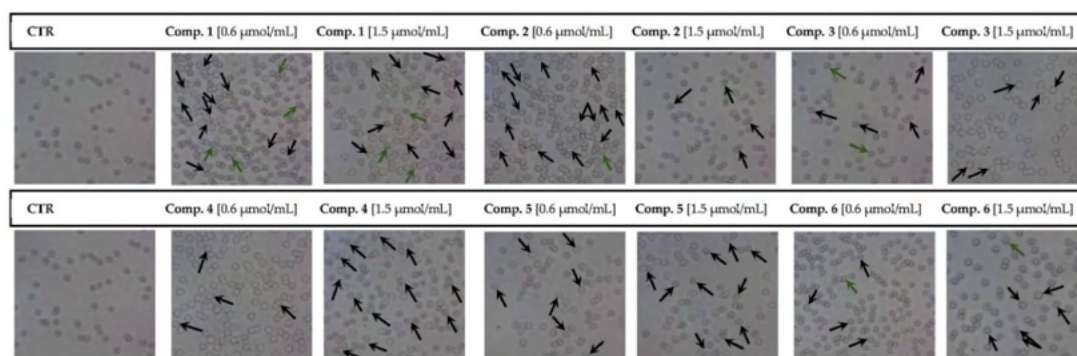


Fig. 6. Impact of synthesized biguanides 1–6 on erythrocytes morphology at the highest tested concentrations (0.6–1.5 $\mu\text{mol/mL}$) after 24-h incubation. The representative phase-contrast images are depicted in magnification of 400 times; echinocytes are marked with black arrows, stomatocytes are marked with green arrows.

selected compounds on the coagulation process after endogenous thrombin generation (Fig. 10, Table S8; Supplementary materials) caused by a mixture of small amounts of thrombin (0.00312 IU/mL) and calcium chloride (0.005 mmol/mL). In general, sulfonamides 1, 3, 4, and 6 significantly prolonged thrombin generation time ($\uparrow\text{TGt}$) over the entire concentration range. The examined compounds did not induce significant changes in maximum clotting (F_{max} constant). Nonetheless, a significant increase in plasma clotting time ($\uparrow\text{Tf}$) and a decrease in initial plasma clotting velocity ($\downarrow\text{Fvo}$) was found for all analysed compounds within the whole concentration range; this indicates that these biguanides delay clot formation after the endogenous thrombin generation. Importantly, the coagulation potential remained constant (S constant) for compounds 4, and 6, but decreased ($\downarrow S$) for derivatives 1 and 3 at 0.6–1.5 $\mu\text{mol/mL}$ (respectively, $p < 0.01$, $p < 0.05$).

3.12. Amidolytic activity of thrombin

Thrombin, a hemostatic agent, commonly known as coagulation factor II, represents an especially important component of the blood coagulation cascade: it transforms soluble fibrinogen into insoluble strands of fibrin, activates the following coagulation factors: V, VII, VIII, XIII, and builds complexes with thrombomodulin and protein C [42]. Hence, the study analysed the impact of novel biguanides on the

amidolytic activity of thrombin.

Fig. 11 illustrates the impact of examined biguanides (1–6) on the amidolytic activity of thrombin (Table S9, Supplementary materials) which was quantified using a highly-specific thrombin substrate releasing a pNA chromophore. Biguanides 1 and 5 significantly lowered the velocity of the enzymatic reaction (dA/dt) at 1.5 $\mu\text{mol/mL}$ ($p < 0.05$). In addition, compound 6, possessing an amino substituent in the aromatic ring in the *para* position, considerably slowed dA/dt at 0.3 $\mu\text{mol/mL}$ ($p < 0.05$), 0.6 $\mu\text{mol/mL}$ (NS, $p > 0.05$), and 1.5 $\mu\text{mol/mL}$ ($p < 0.01$). Derivative 6 reduced dA/dt to 3.49 ± 0.14 ($p < 0.05$) at 0.3 $\mu\text{mol/mL}$ and 2.81 ± 0.37 ($p < 0.01$) at 1.5 $\mu\text{mol/mL}$. Additionally, a discernible drop in the maximum activity (A_{max}) was recorded for sulfonamide 6 at 0.3 $\mu\text{mol/mL}$ ($p < 0.05$), 0.6 $\mu\text{mol/mL}$ (NS; $p > 0.05$), as well as 1.5 $\mu\text{mol/mL}$ ($p < 0.05$); this value corresponds to a reduction in maximum amount of p-NA released from the chromogenic substance. All studied compounds displayed slight inhibitory effects on dA/dt as well as A_{max} ; however, these changes were statistically insignificant.

4. Discussion

Polytherapy (i.e. combination therapy) is associated with an extremely high-risk of clinically significant drug-drug and drug-food interactions, adverse effects, toxicity and polypragmasy. A promising

Table 2
The effects of newly synthesized biguanides **1–6** on basic coagulation parameters.

Compound	Concentr. [$\mu\text{mol/mL}$]	PT [s]	INR	APTT [s]	TT [s]	
1	0 (CTR)	13.98 \pm 0.40	1.12 \pm 0.03	37.30 \pm 2.37	14.48 \pm 1.33	
	0.006	14.18 \pm 0.57	1.15 \pm 0.03	39.68 \pm 2.93 **	11.03 \pm 0.31 **	
	0.06	14.08 \pm 0.97	1.11 \pm 0.08	44.45 \pm 10.43	16.75 \pm 0.62 *	
	0.3	14.14 \pm 0.42	1.12 \pm 0.03	41.27 \pm 4.19 *	15.73 \pm 3.60	
	0.6	14.58 \pm 0.63	1.16 \pm 0.06	48.55 \pm 3.22 **	15.70 \pm 0.50	
	1.5	15.04 \pm 0.74 *	1.21 \pm 0.07 **	53.50 \pm 3.42 **	21.30 \pm 2.40 **	
	2	0 (CTR)	13.54 \pm 0.69	1.08 \pm 0.05	35.76 \pm 3.85	14.60 \pm 0.81
		0.006	14.14 \pm 1.79	1.13 \pm 0.14	35.10 \pm 4.74	11.63 \pm 0.24 **
		0.06	13.88 \pm 0.84	1.11 \pm 0.07	41.80 \pm 4.59	11.10 \pm 0.73 *
		0.3	13.54 \pm 0.96	1.08 \pm 0.07	41.92 \pm 5.99 *	14.03 \pm 1.89
		0.6	13.48 \pm 0.56	1.08 \pm 0.04	55.04 \pm 9.05 *	17.33 \pm 1.93
		1.5	14.54 \pm 1.18	1.16 \pm 0.09	52.26 \pm 3.00 **	20.08 \pm 1.15 **
3	0 (CTR)	12.70 \pm 0.73	1.01 \pm 0.06	34.88 \pm 5.69	13.50 \pm 0.28	
	0.006	12.88 \pm 0.80	1.03 \pm 0.06	30.84 \pm 7.34	12.60 \pm 1.17	
	0.06	12.98 \pm 0.98	1.04 \pm 0.08	32.10 \pm 6.69	12.73 \pm 0.89	
	0.3	13.36 \pm 1.35	1.07 \pm 0.11	35.26 \pm 5.96	13.18 \pm 1.04	
	0.6	14.38 \pm 0.95 **	1.14 \pm 0.09 **	39.40 \pm 3.90	14.85 \pm 1.25	
	1.5	14.56 \pm 0.90 **	1.16 \pm 0.07 **	44.92 \pm 5.09 *	20.05 \pm 0.58 **	
4	0 (CTR)	13.02 \pm 0.46	1.04 \pm 0.04	35.38 \pm 5.13	14.88 \pm 1.70	
	0.006	12.56 \pm 0.30	1.00 \pm 0.03	40.07 \pm 7.12 **	11.98 \pm 1.53	
	0.06	12.78 \pm 0.45	1.02 \pm 0.04	40.17 \pm 8.38	12.43 \pm 0.69	
	0.3	12.96 \pm 0.45	1.04 \pm 0.03	43.72 \pm 8.21 *	13.73 \pm 1.45	
	0.6	13.64 \pm 0.57	1.09 \pm 0.04	44.70 \pm 9.04 *	19.25 \pm 1.61 **	
	1.5	13.98 \pm 0.99	1.12 \pm 0.08	68.40 \pm 23.03 *	26.53 \pm 1.63 **	
5	0 (CTR)	12.82 \pm 0.74	1.03 \pm 0.06	38.32 \pm 0.55	13.52 \pm 0.93	
	0.006	13.20 \pm 1.04	1.05 \pm 0.08	38.24 \pm 3.23	11.60 \pm 1.22	
	0.06	13.56 \pm 1.15	1.08 \pm 0.09	38.86 \pm 2.78	12.44 \pm 0.78	
	0.3	13.60 \pm 1.22	1.09 \pm 0.09	41.62 \pm 2.48	13.46 \pm 1.11	
	0.6	14.18 \pm 1.65	1.13 \pm 0.13	44.52 \pm 3.17 *	15.94 \pm 2.66	
	1.5	14.52 \pm 1.38 *	1.15 \pm 0.12	51.10 \pm 6.43 *	24.28 \pm 3.03 **	
6	0 (CTR)	12.28 \pm 0.19	0.98 \pm 0.02	35.56 \pm 2.65	15.18 \pm 1.92	
	0.006	12.34 \pm 0.21	0.99 \pm 0.02	40.18 \pm 2.74 *	12.20 \pm 0.87 **	
	0.06	12.72 \pm 0.42 *	1.02 \pm 0.03 *	41.34 \pm 4.90 *	12.60 \pm 0.65 *	
	0.3	12.36 \pm 0.66	0.99 \pm 0.05	44.78 \pm 4.11 **	14.00 \pm 1.99	
	0.6	12.54 \pm 0.51	1.00 \pm 0.04	47.16 \pm 5.63 *	16.44 \pm 1.07	
	1.5	12.94 \pm 0.46	1.04 \pm 0.04	54.20 \pm 3.93 **	32.70 \pm 12.51 *	

The data are presented as mean \pm standard deviation, $n = 4–6$. Values in bold are statistically significant in comparison to control samples. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. The reference values: PT: 9.7–14.6 s; INR: 0.85–1.15; APTT: 26.7–40.0 s; TT: 14.0–18.0 s for 3.0 UNIH/mL of thrombin.

alternative is based on multi-target drug strategies in which a single molecule selectively modulates different molecular targets. This approach can offer better efficacy and safety than single-target agents [43–47]. Multimodal drugs combine different structural subunits in a single scaffold, thus allowing molecular identification by more than one bioreceptor. For instance, a multimodal drug that both decreases blood glucose and possesses anti-coagulant activity would be extremely desirable for treating diabetes and countering its related complications [45–47].

In recent years, many preclinical and clinical studies have found metformin to have favourable pleiotropic effects on various clinical domains, including obesity, cardiovascular disease, liver diseases, renal diseases, neurodegenerative diseases and cancers, and even aging [47–49]. In view of its good safety profile, long-term use in humans, and many additional effective properties, metformin has become a promising treatment option for many complex comorbidities coexisting with diabetes, prompting researchers to identify derivatives with improved pharmacokinetic properties.

It is worth mentioning that sulfonamide derivatives currently make up one of the largest biologically pertinent and well-described compound libraries. In medicinal chemistry, the sulfonamide moiety is a frequently-recurring structural motif, on account of their wide spectrum of pharmacological activities and versatile structure. As much, many sulfonamide-based molecules are involved in studies aimed at the development of potential medicinal compounds offering better efficacy and less toxicity against a variety of complex diseases [50,51].

In spite of advances in medicine, diabetes is still linked with increased morbidity and mortality, mainly due to vascular complications and thrombosis. Many attempts have been made to synthesizing novel compounds with anticoagulant activity including derivatives with a sulfonamide structure. Among these, a pyrazole analog with a 2'-methylsulfonylphenyl piperidine group, amino(methyl) pyrrolidine-based sulfonamides, and arylsulfonamidopiperidone derivatives have shown potent and selective inhibitory FX activity, while a triazole-based sulfonamide with a chlorine substituent strongly inhibits thrombin [52–56].

The present study describes the synthesis and penetrating analysis of six promising sulfonamide-based analogues of metformin. To obtain a novel metformin derivative with a potential dual action, while including the glucose-lowering and anti-coagulation properties of the parent drug, one of the terminal nitrogen atoms in the metformin backbone was modified with a benzenesulfonamide group. This group, in turn, was substituted with either a methoxy (comp. **1**, **2**), nitro (comp. **3**) or amino (comp. **4**, **5**, **6**) moieties (Scheme 1). All examined compounds were found to be stable in human and mouse plasma/serum, and none of them underwent metabolic transformations in mouse liver or brain subcellular fractions.

Endothelial cells (EC) and vascular smooth muscle cells (VSMC) are the fundamental components of blood vessel walls. As they are responsible for the development and formation of the vasculature, and enable the repair and remodelling connected with blood vessel growth, they play a crucial role in the progression of CVD [57–59]. Therefore, the present study evaluated the influence of derivatives **1–6** on the function of two human cell lines: HUVECs, and AoSMCs. Similarly to our previous study [28], all examined molecules **1–6** showed a less influence on the viability of AoSMC cells than the HUVECs. The derivatives with a nitro substituent (**3**) or an amino group (**4**) substituted at position 3 or 2 in the aromatic ring did not affect either HUVEC or AoSMC viability at concentrations up to 1.5 $\mu\text{mol/mL}$. The remaining compounds (**1**, **2**, **5**, **6**) demonstrated more potent inhibition on HUVEC cells at concentrations of 1.0–1.5 $\mu\text{mol/mL}$. Furthermore, these results were also

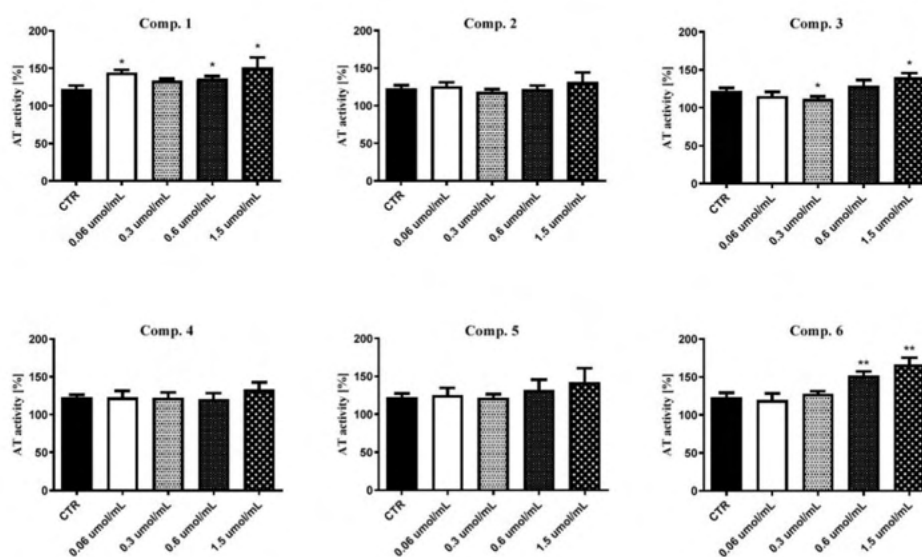


Fig. 7. The impact of biguanides 1–6 on the activity of anti-thrombin III (AT) (data are presented as mean \pm SD; $n = 4$ –6). The asterisk denotes a statistically significant difference between the samples treated with compounds and control; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

confirmed by careful phase contrast examination.

Metformin is an effective anti-diabetic drug, which exerts a glucose-lowering effect through multiple sites of action and multiple mechanisms, including decreasing glucose output in the liver, reducing intestinal glucose absorption, restoring the secretion of insulin in pancreatic beta-cells and facilitating glucose uptake and utilization in the peripheral tissues of muscle and adipose. Based on the results of the HUVEC and AoSMC viability assay and morphology, the novel metformin analogues were tested up to 0.6 $\mu\text{mol/mL}$. Our findings indicate that, similarly to metformin, those with a methoxy group (1, 2), or an amino substituent (5, 6) at position 3 or 4 in the aromatic ring significantly elevated glucose utilization in endothelial cells at the higher tested concentration (Fig. 2). The *m*-amino derivative (5) was particularly promising in this regard, as it improved glucose uptake at both 0.3 and 0.6 $\mu\text{mol/mL}$, and demonstrated the most comparable effects to the parent drug, metformin.

As reported by Patel et al., hyperglycaemia increases the production of H_2O_2 , and O_2^- and hyperpolarizes the mitochondrial membrane in HUVEC; this in turn, leads to its dysfunction over time [60]. Presently, one of the major subcellular aims of metformin action concerns mitochondrial accumulation. Metformin has been found to induce depolarization of the mitochondrial membrane, elevate AMP/ATP and lactate-to-pyruvate ratios, and reduce glucose production [61,62]. In the present study, analogue 4 at 0.6 $\mu\text{mol/mL}$, and analogues 5, 6 at both 0.3 and 0.6 $\mu\text{mol/mL}$ significantly decreased $\Delta\Psi\text{M}$ in HUVECs. Hence, new potential biguanide therapeutic agents targeting mitochondria might be of great value in preventing endothelial dysfunction and treating the causative and secondary defects of diabetes.

Markowicz-Piasecka et al. report that metformin does not appear to influence the integrity or adherence of HUVEC cells at concentrations of 0.006–1.5 $\mu\text{mol/mL}$ based on non-invasive RTCA-DP analysis [21]. In the present study, our findings indicate that none of the examined compounds, similarly to metformin, significantly influenced nCL at any tested concentration within the first 12 h of incubation. This suggests that biguanides 1–6 do not influence the immediate cellular response or their adhesion. However, unlike metformin, after 24 h of stimulation, a significant drop in HUVEC integrity was recorded for all derivatives,

especially at the higher tested concentration, i.e., 0.6 $\mu\text{mol/mL}$. The outcomes obtained in HUVEC integrity studies are consonant with those from the WST-1 assay.

In patients with diabetes, chronic hyperglycaemia may also contribute to the disturbances of morphological structure and physiological functions of erythrocytes, which have been implicated in the pathophysiology of diabetes and its complications; e.g. insufficient microcirculation perfusion or hypoxia [38,63,64]. It is important that any administered drugs should not adversely interact with any blood components, and the issue of hemocompatibility is a key criterion that restricts the clinical applicability of new potential medicinal substances. Markowicz-Piasecka et al. report that metformin did not exert any effect on these cells over the entire tested concentration range (0.006–1.5 $\mu\text{mol/mL}$) [33]. In the present study, none of the tested derivatives demonstrated any adverse effect on erythrocyte integrity or morphology (the degree of RBC hemolysis $< 5\%$), implying that none of the newly-synthesized metformin analogues interact strongly with the lipid-protein bilayer.

As patients with diabetes often suffer complications associated with cardiovascular diseases, manifested by thromboembolic events, there is a need for compounds that can improve basic parameters of hemostasis. Metformin does not appear to affect the intrinsic or extrinsic coagulation pathway (PT, APTT), nor the process of fibrin polymerization (TT) [33]. Unlike metformin, all studied compounds significantly prolonged both APTT, and TT, while biguanides 1, 3, and 5 also extended PT. Hence, all of these newly-synthesized benzenesulfonamides might exert beneficial effects on plasma hemostasis. However, it is worth noting that the obtained values of APTT and TT were outside the range of reference values, which may be of vital importance in further studies.

Chronic hyperglycemia induces non-enzymatic glycosylation of natural anticoagulants, such as antithrombin III, proteins C and S. This may manifest in deficiencies in their activity and levels, thereby increasing the plausibility of plaque formation and thrombotic events among T2DM patients [65]. Our experiments revealed that compounds 1 and 3 significantly increased AT activity, which can account for their observed effects on PT, APTT, and TT. Furthermore, a significant rise in AT activity was also observed for compound 6; however, these changes

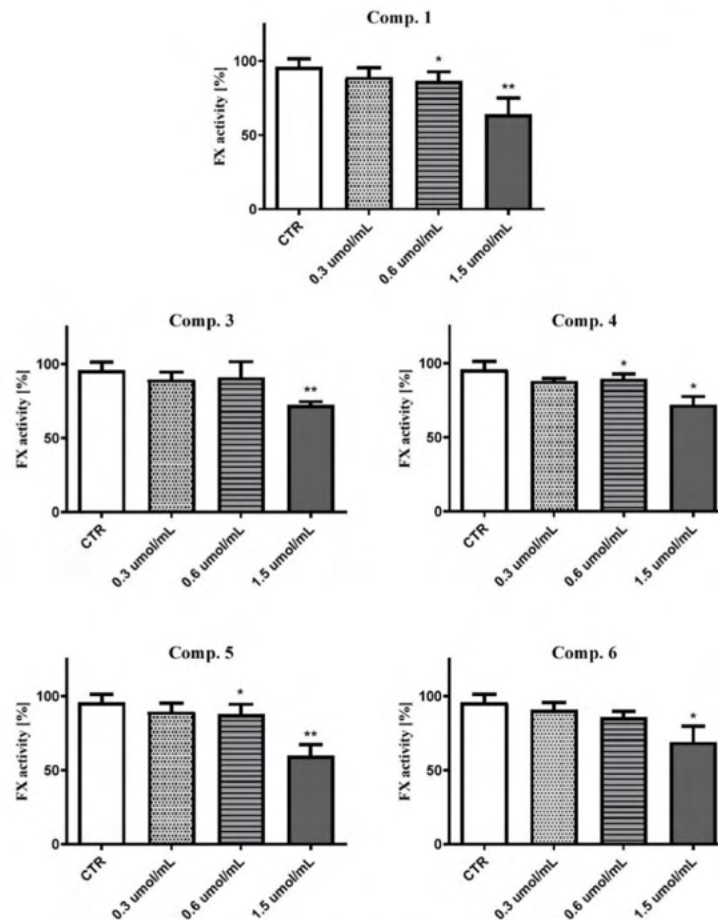


Fig. 8. The influence of compounds 1, 3–6 on the activity of factor X. The outcomes are presented as mean \pm SD; $n = 4$. The asterisk denotes a statistically significant difference between the samples treated with compounds and control; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

are visible at concentrations that are close to or higher than its IC_{50} value towards HUVECs. All these findings indicate that the obtained sulfonamides have more profound anti-coagulant properties than metformin.

To determine their influence on the extrinsic and intrinsic coagulation pathways, the study examined the effect of the selected biguanides on factor X activity. All chosen compounds (1, 3, 4, 5, and 6) significantly reduced the activity of FX depending on the tested concentration. Interestingly enough, in the case of *m*-substituted benzenesulfonamides (1, 3, 5), a significant drop in Stuart-Prower factor activity was observed, which might be closely related to the significant prolongation of PT, APTT and TT, thus confirming their anti-coagulant activity.

The impact of the selected derivatives (1, 3, 4, 6) on kinetic parameters of coagulation and fibrinolysis process was measured using an optical method based on turbidimetry. It was found that *m*-nitro biguanide (3) significantly extended thrombin time (\uparrow TT). This was in line with the results of the TT assay, suggesting that derivative 3 may influence fibrin polymerization, thereby modifying thrombin activity.

Fibrin structure is widely believed to affect both the mechanical and fibrinolytic stability of the existing clot. In CL-test, the addition of a high concentration of exogenous thrombin to a sample containing diluted

plasma triggers off the formation of a fibrin clot; any changes in Fmax or Tf can indicate that tested compounds affect the structure or arrangement of the formed clot. Compound 3 considerably reduced both maximum clotting velocity (\downarrow Fmax) ($p < 0.5$) and initial clot formation velocity (\downarrow Fvo), and increased plasma clotting time (\uparrow Tf) at the highest tested concentrations (0.3–1.5 μ mol/mL). The observed changes for these parameters might be evidence that compound 3 has potential anti-coagulant properties, probably induced by its inhibitory effect on the amidolytic activity of thrombin.

Referring to the parameters of fibrinolysis, it should be mentioned that test compounds (1, 3, 4, 6) did not affect the initial velocity of fibrinolysis (Lvo constant), fibrinolysis time (Tl constant) or the area under the fibrinolysis curve (Sl constant) over the entire concentration range. This indicates that the previously-formed clots were lysed at a similar time as in the case of the controls. These findings indicate that stimulation with the test compounds is not associated with any risk of delaying fibrinolysis.

The process of thrombin generation is the central element of the hemostatic process, and the course of thrombin generation is influenced by the rate of formation, its structure, and its mechanical and fibrinolytic

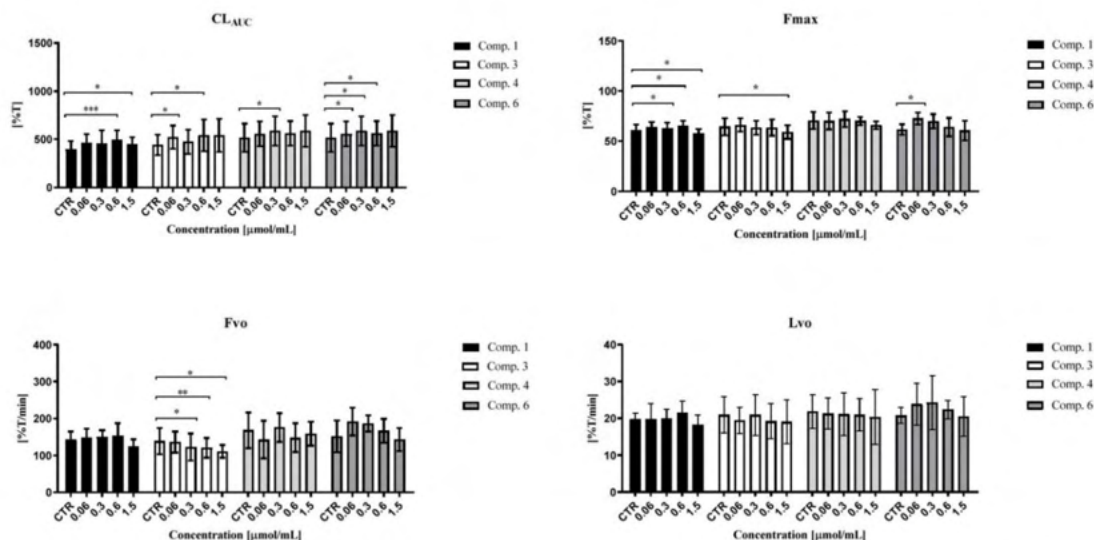


Fig. 9. Effects of chosen sulfonamides **1**, **3**, **4**, **6** on overall potential of clot formation and fibrinolysis (CL_{AUC}), and selected parameters of clot formation and fibrinolysis process: maximum clotting (F_{max}); initial plasma clotting velocity (F_{vo}); initial clot fibrinolysis velocity (L_{vo}) (the results are presented as means, $n = 5-8$). The asterisk denotes a statistically significant difference between the samples treated with compounds and respective controls; $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$. Metformin did not influence the overall potential of clot formation and fibrinolysis (CL_{AUC}) over the entire concentration range and dimethyl biguanide did not influence the kinetic parameters of the clot formation process and fibrinolysis (F_{max} , F_{vo} , L_{vo} constants) [34].

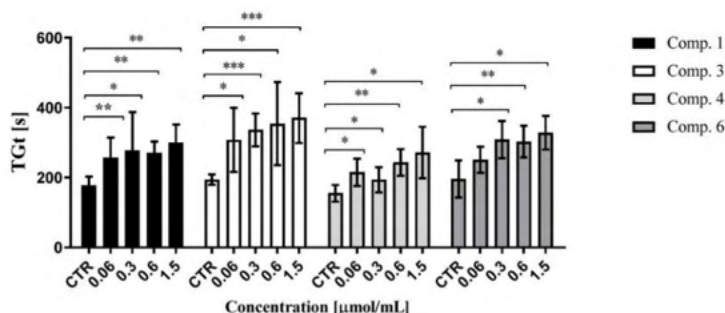


Fig. 10. The influence of selected compounds **1**, **3**, **4**, **6** on thrombin generation time (TGT) (mean \pm SD, $n = 5-7$) after 3 min incubation in plasma; final volume 500 μ L. The asterisk denotes a statistically significant difference between the samples treated with compounds and control; $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$.

stability. This knowledge is of vital importance for developing novel anti-thrombotic agents or hemostatics [66,67]. The coagulation assay found an increase in thrombin generation time (TGT) and plasma clotting time (\uparrow Tf), together with a decrease in initial plasma clotting velocity (\downarrow Fvo). Hence, it appears that all tested compounds exert beneficial effects on plasma coagulation by delaying clot formation after thrombin generation or altering the activity of coagulation factors.

Based on these findings, the fact that thrombin is involved in the development and progression of arterial and venous thrombosis, and that thrombin inhibition constitutes a key target in innovative antithrombotic pharmacotherapy, the amidolytic activity of thrombin was analysed by spectrophotometric inhibition assay [68]. It was found that *p*-aminobenzenesulfonamide (**6**) demonstrates the most potent inhibitory effect on the maximum activity (A_{max}) and initial reaction velocity (dA/dt) over the entire concentration range; this confirms the prior results from the coagulation assay, i.e. elevated TGT. A

statistically-significant decrease in the velocity of the enzymatic reaction (dA/dt) was also observed for *p*-substituted benzenesulfonamides (**1**, **5**); however, these favourable effects were recorded at the highest concentration, which contributed to a substantial drop in HUVEC viability.

5. Conclusions

Our findings suggest that *m*-nitrobenzenesulfonamide (**3**) exhibits highly desirable anti-coagulant activity, while *m*-methoxybenzenesulfonamide (**1**) and *p*-aminobenzenesulfonamide (**6**) demonstrate anti-hyperglycaemic properties and more potent anti-coagulant activity than metformin. However, it is essential to continue further *in vivo* studies to receive a complete model of the efficacy and safety of these newly-synthesized sulfonamide-based metformin analogues. The derivatives, demonstrating promising glucose-lowering activity and

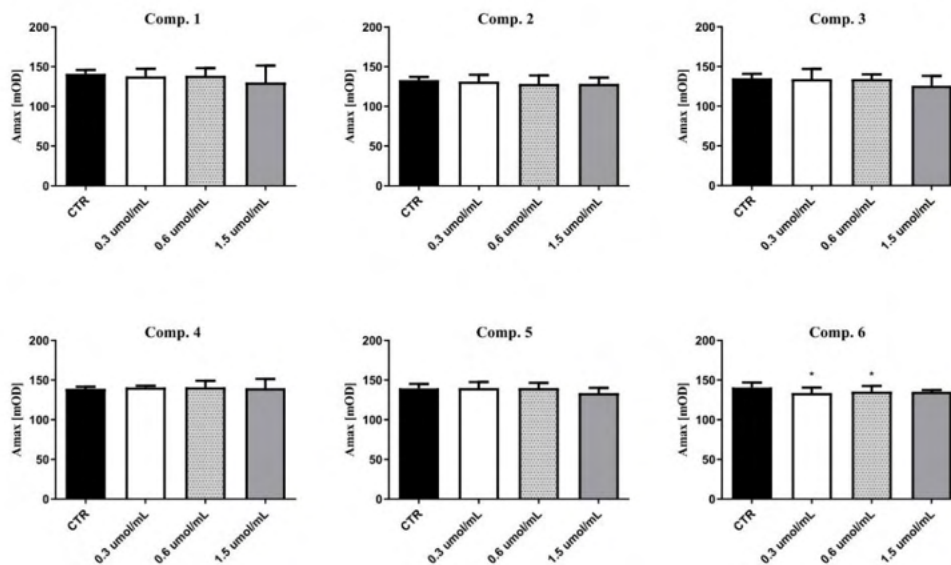


Fig. 11. The effect of metformin analogues 1–6 on maximum activity (Amax) after 3 min incubation in plasma; final volume 500 μ L. The results are presented as mean \pm standard deviation. $n = 5$ –7. The asterisk denotes a statistically significant difference between the samples treated with compounds and control; * $p < 0.05$.

potentially stronger anti-coagulant properties than metformin, can be considered excellent candidates as prototypes in the design and development of new and more effective multimodal agents based on the metformin scaffold with a substituted sulfonamide moiety.

Funding

The work was financially supported by the Medical University of Lodz (grant number 503/3-015-01/503-31-001-19-00, 503/3-016-02/503-31-001-19-00, and 503/3-015-01/503-99-006) and the Sigrid Juselius Foundation.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

The authors would like to thank Ms. Tiina Koivunen for her valuable assistance with the synthesis of novel compounds.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110381>.

References

- [1] J. Silva, E. Souza, A. Echazú Böschemeyer, C. Costa, H. Bezerra, E. Feitosa, Diagnosis of diabetes mellitus and living with a chronic condition: participatory study, *BMC Publ. Health* 18 (2018) 699. <https://doi.org/10.1186/s12889-018-5637-9>.

- [2] American Diabetes Association, Diagnosis and classification of diabetes mellitus, *Diabetes Care* 32 (2009) S62–S67. https://doi.org/10.2337/dc09_S062.
- [3] Y. Zheng, S. Ley, F. Hu, Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications, *Nat. Rev. Endocrinol.* 14 (2018) 88–98. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.151>.
- [4] G. Siasos, G. Skotsimara, E. Oikonomou, M. Sagris, M. Vasiliaki Chara, E. Bletsas, P. Stampoulouglou, P. Theofilis, G. Charalampous, D. Tousoulis, Antithrombotic treatment in diabetes mellitus: a review of the literature about antiplatelet and anticoagulation strategies used for diabetic patients in primary and secondary prevention, *Curr. Pharmacaut. Des.* 26 (2020) 2780–2788. <https://doi.org/10.2174/138161282666200417145605>.
- [5] X. Li, N. Weber, D. Cohn, M. Hollmann, J. DeVries, J. Hermanides, B. Preckel, Effects of hyperglycemia and diabetes mellitus on coagulation and hemostasis, *J. Clin. Med.* 10 (2021) 2419. <https://doi.org/10.3390/jcm10112419>.
- [6] N. Vazzana, P. Ranalli, C. Cuccurullo, G. Davi, Diabetes mellitus and thrombosis, *Thromb. Res.* 129 (2012) 371–377. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2011.11.052>.
- [7] D. Schneider, Factors contributing to increased platelet reactivity in people with diabetes, *Diabetes Care* 32 (2009) 525–527. <https://doi.org/10.2337/dc08-1865>.
- [8] M. Carr, Diabetes mellitus: a hypercoagulable state, *J. Diabet. Complicat.* 15 (2001) 44–54. [https://doi.org/10.1016/s1056-8727\(00\)00132-x](https://doi.org/10.1016/s1056-8727(00)00132-x).
- [9] R. Ajjan, N. Kietsiriroje, L. Badimon, G. Vilahur, D. Gorog, D. Angiolillo, D. Russell, B. Rocca, R. Storey, Antithrombotic therapy in diabetes: which, when, and for how long? *Eur. Heart J.* 42 (2021) 2235–2259. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab128>.
- [10] A. Arce Esquivel, A. Bunker, M. Laughlin, Effects of type 2 diabetes on arterial endothelium. Recent advances in the pathogenesis, prevention and management of type 2 diabetes and its complications, *IntechOpen* 10 (2011) 155–178. [doi: 10.5772/23502](https://doi.org/10.5772/23502).
- [11] C. Sena, F. Carrilho, R. Seica, Endothelial dysfunction in type 2 diabetes: targeting inflammation. Endothelial dysfunction - old concepts and new challenges, *IntechOpen* 10 (2018) 231–249. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76994>.
- [12] H. Chirayath, An overview of endothelial dysfunction in diabetes, *Vasc. Dis. Ther.* 1 (2016) 1–3. <https://doi.org/10.15761/VDT.1000104>.
- [13] P. Verhaem, M. Hoylaerts, The pivotal role of the endothelium in haemostasis and thrombosis, *Acta Clin. Belg.* 61 (2006) 213–219. <https://doi.org/10.1179/acb.2006.036>.
- [14] K. Harter, M. Levine, S. Henderson, Anticoagulation drug therapy: a review, *West. J. Emerg. Med.* 16 (2015) 11–17. <https://doi.org/10.5811/westjem.2014.12.22933>.
- [15] A. Di Mimio, B. Frigerio, G. Spadarella, A. Ravani, D. Sansaro, M. Amato, J. Kitzmiller, M. Pepi, E. Tremoli, D. Baldassarre, Old and new oral anticoagulants: food, herbal medicines and drug interactions, *Blood Rev.* 31 (2017) 193–203. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2017.02.001>.
- [16] G. Lip, A. Keshishian, A. Kang, X. Li, A. Dhamane, X. Luo, N. Balachander, L. Rosenblatt, J. Mardekian, A. Nadkarui, X. Pan, M. Di Fusco, A. Garcia Reeves, H. Yuce, S. Deitelzweig, Effectiveness and safety of oral anticoagulants in patients with nonvalvular atrial fibrillation and diabetes mellitus, *Mayo Clin. Proc.* 95 (2020) 929–943. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.05.032>.

- [17] A. Mavronanoli, S. Barco, S. Konstantinides, Antithrombotics and new interventions for venous thromboembolism: exploring possibilities beyond factor IIa and factor Xa inhibition, *Res. Pract. Thromb. Haemost.* 5 (2021) e12509. <https://doi.org/10.1002/rth2.12509>.
- [18] J. Besse, D. Weder, A. Tsapas, P. Rossing, G. Mingrone, C. Mathieu, D. D'Alessio, M. Davies, Update to: management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2018. A consensus report by the American diabetes association (ADA) and the European association for the study of diabetes (EASD), *Diabetes Care* 43 (2020) 487–493. <https://doi.org/10.2337/dci19.0066>.
- [19] American Diabetes Association, Standards of medical care in diabetes—2022 abridged for primary care providers, *Clin. Diabetes* 40 (2022) 10–38. <https://doi.org/10.2337/cd22-as01>.
- [20] Y. Han, H. Xie, Y. Liu, P. Gao, X. Yang, Z. Shen, Effect of metformin on all-cause and cardiovascular mortality in patients with coronary artery diseases: a systematic review and an updated meta analysis, *Cardiovasc. Diabetol.* 18 (2019) 96. <https://doi.org/10.1186/s12933-019-0900-7>.
- [21] M. Markowicz-Piasecka, K. Huttunen, M. Broncel, J. Sikora, Sulfenamide and sulfonamide derivatives of metformin – a new option to improve endothelial function and plasma haemostasis, *Sci. Rep.* 9 (2019) 6573. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43083-z>.
- [22] J. Colwell, Treatment for the procoagulant state in type 2 diabetes, *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.* 30 (2001) 1011–1030. [https://doi.org/10.1016/s0889-8529\(05\)70225-5](https://doi.org/10.1016/s0889-8529(05)70225-5).
- [23] H. Gin, G. Freyburger, M. Boisseau, J. Aubertin, Study of the effect of metformin on platelet aggregation in insulin dependent diabetics, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 6 (1989) 61–67. [https://doi.org/10.1016/0168-8227\(89\)90058-2](https://doi.org/10.1016/0168-8227(89)90058-2).
- [24] A. Cameron, L. Logie, K. Patel, S. Erhardt, S. Bacon, P. Middleton, J. Harthill, C. Forreath, J. Coats, C. Kerr, H. Curry, D. Stewart, K. Sakamoto, P. Repisak, M. Paterson, I. Hassinen, G. McDougall, G. Rena, Metformin selectively targets redox control of complex I energy transduction, *Redox Biol.* 14 (2018) 187–197. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.08.018>.
- [25] M. Markowicz-Piasecka, K. Huttunen, L. Mateusiak, E. Mikiciuk-Olasik, J. Sikora, Is metformin a perfect drug? Updates in pharmacokinetics and pharmacodynamics, *Curr. Pharmaceut. Des.* 23 (2017) 2532–2550. <https://doi.org/10.2174/1381612822666161201152941>.
- [26] M. Markowicz-Piasecka, J. Sikora, A. Zajda, M. Huttunen, Novel halogenated sulfonamide biguanides with anti-coagulation properties, *Bioorg. Chem.* 94 (2020) 103444. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103444>.
- [27] M. Markowicz-Piasecka, A. Sadkowska, J. Sikora, M. Broncel, K. Huttunen, Novel sulfonamide based analogs of metformin exert promising anti coagulant effects without compromising glucose lowering activity, *Pharmaceuticals* 13 (2020) 323. <https://doi.org/10.3390/ph13100323>.
- [28] A. Zajda, J. Sikora, K. Huttunen, M. Markowicz-Piasecka, Structural comparison of sulfonamide based derivatives that can improve anti-coagulation properties of metformin, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022) 4132. <https://doi.org/10.3390/ijms23084132>.
- [29] J. Rautio, M. Vermerou, I. Auferhaer, K. Huttunen, Glutathione S-transferase selective release of metformin from its sulfonamide prodrug, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24 (2014) 5034–5036. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.09.019>.
- [30] M. Markowicz-Piasecka, J. Huttunen, A. Zajda, J. Sikora, K. Huttunen, Sulfonamide metformin derivatives induce mitochondrial associated apoptosis and cell cycle arrest in breast cancer cells, *Chem. Biol. Interact.* 352 (2022) 109795. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109795>.
- [31] M. Markowicz-Piasecka, J. Huttunen, J. Sikora, K. Huttunen, Sulfenamide derivatives can improve transporter-mediated cellular uptake of metformin and induce cytotoxicity in human breast adenocarcinoma cell lines, *Bioorg. Chem.* 87 (2019) 321–334. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.03.036>.
- [32] M. Chalubinski, K. Zemanek, W. Skowron, K. Wojdan, P. Gorzelak, M. Broncel, The effect of 7 ketocholesterol and 25-hydroxycholesterol on the integrity of the human aortic endothelial and intestinal epithelial barriers, *Inf. Res.* 62 (2013) 1015–1023. <https://doi.org/10.1007/s00011-013-0660-x>.
- [33] M. Markowicz-Piasecka, J. Sikora, L. Mateusiak, E. Mikiciuk-Olasik, K. Huttunen, New prodrugs of metformin do not influence the overall haemostasis potential and integrity of the erythrocyte membrane, *Eur. J. Pharmacol.* 811 (2017) 208–221. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.06.011>.
- [34] M. Markowicz-Piasecka, K. Huttunen, L. Mateusiak, E. Mikiciuk-Olasik, J. Sikora, Sulfenamide and sulfonamide derivatives of metformin can exert anticoagulant and profibrinolytic properties, *Chem. Biol. Interact.* 284 (2018) 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.02.012>.
- [35] B. Kostka, J. Para, J. Sikora, A multiparameter test of clot formation and fibrinolysis for in-vitro drug screening, *Blood Coagul. Fibrinolysis* 18 (2007) 611–618. <https://doi.org/10.1097/MBC.0b013e31803282ddeb19>.
- [36] J. Sikora, M. Markowicz-Piasecka, M. Broncel, E. Mikiciuk-Olasik, Extract of *Aronia melanocarpa*-modified hemostasis: in vitro studies, *Eur. J. Nutr.* 53 (2014) 1493–1502. <https://doi.org/10.1007/s00394-014-0653-8>.
- [37] M. Markowicz-Piasecka, E. Mikiciuk-Olasik, J. Sikora, Stability of erythrocyte membrane and overall hemostasis potential - a biocompatibility study of mebrofemin and other iminodiacetic acid derivatives, *Pharmacol. Rep.* 67 (2015) 1230–1239. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.05.021>.
- [38] M. Stasiuk, G. Kijanka, A. Kozubek, Zmiany kształtu erytrocytów i czynniki je wywołujące, *Postepy Biochem.* 55 (2009) 425–433.
- [39] J. Heit, Thrombophilia : Clinical and Laboratory Assessment and Management. Consultative Hemostasis and Thrombosis, third ed., Elsevier Inc., 2013, pp. 205–239. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-2296-9.00014-2>.
- [40] D. Perry, Practical-Haemostasis.com. Antithrombin Assays, 2022. <https://practical-haemostasis.com/Thrombophilia/atassays.html>. (Accessed 25 June 2022).
- [41] H. Ashikaga, K. Chien, *Molecular Basis of Cardiovascular Disease*, second ed., Elsevier Inc., 2004, pp. 498–518. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7216-9428-3.50033-0>.
- [42] M. Bijak, M. Bobrowski, Znaczenie inhibitorów trombin w farmakoterapii przeciwzakrzepowej, *Borgis - Postepy Nauk Medycznych.* 10 (2010) 819–825.
- [43] D. Wojtczak, J. Kasznicki, J. Drzewoski, Pros and cons of polypharmacy in elderly patients with diabetes, *Clin. Diabetol.* 6 (2017) 34–38. <https://doi.org/10.5603/DK.2017.0006>.
- [44] N. Masnoon, S. Shakib, L. Kalisch Ellett, G. Gaughey, What is polypharmacy? A systematic review of definitions, *BMC Geriatr.* 17 (2017) 230. <https://doi.org/10.1186/s12877-017-0621-2>.
- [45] X. Makhoba, J. Viegas, R. Mosa, F. Viegas, O. Poee, Potential impact of the multi-target drug approach in the treatment of some complex diseases, *Drug Des. Dev. Ther.* 14 (2020) 3235–3249. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S257494>.
- [46] F. Lillich, J. Imig, E. Proschak, Multi target approaches in metabolic syndrome, *Front. Pharmacol.* 11 (2021) 554961. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.554961>.
- [47] A. Artasensi, A. Pedretti, G. Vistoli, L. Fumagalli, Type 2 diabetes mellitus: a review of multi-target drugs, *Molecules* 25 (2020) 1987. <https://doi.org/10.3390/molecules25081987>.
- [48] N. Fajkis, M. Kolačzkowski, M. Marcinkowska, Repositioning strategy, a new uses for old drugs, *Wiadomości Chemiczne* 72 (2018) 11–12.
- [49] Z. Lv, Y. Guo, Metformin and its benefits for various diseases, *Front. Endocrinol.* 11 (2020) 191. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00191>.
- [50] S. Apaydin, M. Türök, Sulfonamide derivatives as multi target agents for complex diseases, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 29 (2019) 2042–2050. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.06.041>.
- [51] F. Carta, A. Scozzafava, C. Supuran, Sulfonamides: a patent review (2008 – 2012), *Expert Opin. Ther. Pat.* 22 (7) (2012) 747–758. <https://doi.org/10.1517/13543776.2012.698264>.
- [52] J. Qiao, X. Cheng, J. Smallheer, R. Galenno, S. Drummond, D. Pinto, D. Cheney, K. He, P. Wong, J. Luettgen, R. Knabb, R. Wexler, P. Lam, Pyrazole-based factor Xa inhibitors containing N-arylpiperidinyl P4 residues, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17 (2007) 1432–1437. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.11.071>.
- [53] Y. Shi, D. Sitkoff, J. Zhang, W. Han, Z. Hu, P. Stein, Y. Wang, L. Kennedy, S. O'Connor, S. Ahmad, E. Liu, S. Seiler, P. Lam, J. Robl, J. Macor, K. Atwal, R. Zahler, Amino(methyl) pyrrolidines as novel scaffolds for factor Xa inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17 (2007) 5952–5958. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.07.063>.
- [54] Y. Shi, S. O'Connor, D. Sitkoff, J. Zhang, M. Shi, S. Bisaha, Y. Wang, C. Li, Z. Ruan, R. Lawrence, H. Klei, K. Kish, E. Liu, S. Seiler, L. Schweizer, T. Steinbacher, W. Schumacher, J. Robl, J. Macor, K. Atwal, P. Stein, Arylsulfonamidopiperidone derivatives as a novel class of factor Xa inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21 (2011) 7516–7521. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.06.098>.
- [55] J. Smallheer, S. Wang, M. Laws, S. Nakajima, Z. Hu, W. Han, I. Jacobson, J. Luettgen, K. Rossi, A. Rendina, R. Knabb, R. Wexler, P. Lam, M. Quan, Sulfonamidolactam inhibitors of coagulation factor Xa, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1 (18) (2008) 2428–2433. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.02.054>.
- [56] R. Siles, Y. Kawasaki, P. Ross, E. Freire, Synthesis and biochemical evaluation of triazole/tetrazole-containing sulfonamides against thrombin and related serine proteases, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21 (2011) 5305–5309. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.07.023>.
- [57] V. van Hinsbergh, Endothelium—role in regulation of coagulation and inflammation, *Semin. Immunopathol.* 34 (2012) 93–106. <https://doi.org/10.1007/s00281-011-0285-5>.
- [58] M. Li, M. Qian, K. Kyler, J. Xu, Endothelial—vascular smooth muscle cells interactions in atherosclerosis, *Front. Cardiovasc. Med.* 5 (2018) 151. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00151>.
- [59] S. Moss, M. Bates, P. Parrino, T. Woods, Isolation of endothelial cells and vascular smooth muscle cells from internal mammary artery tissue, *Ochsner J.* 7 (2007) 133–136.
- [60] H. Patel, J. Chen, K. Das, M. Kavdia, Hyperglycemia induces differential change in oxidative stress at gene expression and functional levels in HUVEC and HMVEC, *Cardiovasc. Diabetol.* 12 (2013) 142. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-12-142>.
- [61] A. Zajda, K. Huttunen, J. Sikora, M. Podsiadlik, M. Markowicz-Piasecka, Is metformin a geroprotector? A peek into the current clinical and experimental data, *Mech. Ageing Dev.* 191 (2020) 111350. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111350>.
- [62] J. Kim, Y. You, Regulation of Organelle Function by Metformin, *IUBMB Life* 69 (2017) 459–469. <https://doi.org/10.1002/iub.1633>.
- [63] Y. Wang, P. Yang, Z. Yan, Z. Liu, Q. Ma, Z. Zhang, Y. Wang, Y. Su, The relationship between erythrocytes and diabetes mellitus, *J. Diabetes Res.* (2021) 6656062. <https://doi.org/10.1155/2021/6656062>.
- [64] G. Gabreanu, S. Angelescu, Erythrocyte membrane in type 2 diabetes mellitus, *Discoveries* 4 (2016) e60. <https://doi.org/10.15190/d.2016.7>.
- [65] O. Addai-Mensah, M. Annani-Akollor, F. Nsofoah, L. Fondjo, E. Owiredo, K. Danquah, R. Dunech, F. Anpoussal, Effect of poor glycemic control on plasma levels and activity of protein C, protein S, and antithrombin III in type 2 diabetes mellitus, *PLoS One* 14 (2019), e0223171. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223171>. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223171>.

Publikacja III

A. Zajda et al.

Chemico-Biological Interactions 373 (2023) 110381

- [66] A. Wolberg, R. Campbell, Thrombin generation, fibrin clot formation and hemostasis, *Transfus. Apher. Sci.* 38 (2008) 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2007.12.005>.
- [67] A. Tripodi, Thrombin generation: a global coagulation procedure to investigate hypo and hyper coagulability, *Haematologica* 105 (2020) 2196–2199. <https://doi.org/10.3324/haematol.2020.253047>.
- [68] M. Bijak, R. Ziewiecki, J. Saluk, M. Ponczek, I. Pawlaczek, H. Krotkiewski, B. Wachowicz, P. Nowak, Thrombin inhibitory activity of some polyphenolic compounds, *Med. Chem. Res.* 23 (2014) 2324–2337. <https://doi.org/10.1007/s00044-013-0829-4>.

Materials and methods

1. Materials for biological studies

Basic coagulation studies were carried out using Bio-Ksel reagents (Grudziądz, Poland): Bio-Ksel PT plus reagent (tromboplastin and solvent), APTT reagent, calcium chloride, and thrombin (3.0 UNIH/mL) for TT experiments. The methods were calibrated, and the coefficient of variation was calculated (PT, APTT, TT experiments), using a calibrator (Bio-Ksel, Grudziądz, Poland), normal plasma (Bio-Ksel, Grudziądz, Poland) and water for injection (Polpharma, Gdańsk, Poland).

Factor X activity was determined using factor X-depleted plasma (Bio-Ksel, Grudziądz, Poland), thromboplastin (Bio-Ksel, Grudziądz, Poland) and 0.9% saline. Antithrombin III activity was studied using chromogenic substrate (Bio-Ksel, Grudziądz, Poland), and Tris buffer (50 mM) with heparin (2 U/mL) (Bio-Ksel, Grudziądz, Poland). The amidolytic activity of thrombin was determined using chromogenic substrate S-2238 (Chromogenix, Italy).

The following reagents were used for the CL-test: thrombin (Biomed Lublin, Lublin, Poland), recombinant tissue plasminogen activator (t-PA; Boehringer-Ingelheim (Ingelheim am Rhein, Germany), Tris-buffered saline (TBS; Polish Chemical Reagents, Gliwice, Poland), sodium chloride, and calcium chloride (Polish Chemical Reagents, Gliwice, Poland).

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were purchased from Lonza (Clonetics, Basel, Switzerland), and cultured according to the manufacturer's guidelines. The following reagents were used for HUVEC maintenance: EGM-2—medium + bullet kit (Lonza, Clonetics, Basel, Switzerland), accutase (Sigma, St. Louis, MO, USA), and HEPES buffered saline solution (Lonza, Clonetics, Basel, Switzerland).

Human aortal smooth muscle cells (AoSMCs) were purchased from ScienCell Research Laboratories (Carlsbad, CA, USA) and cultured according to the manufacturer's guidelines. The composition of the AoSMC cell culture medium was as follows: 500 mL basal medium (SMC, ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA, USA), 10 mL fetal bovine serum (FBS, ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA, USA), 5 mL smooth muscle cell growth supplement (SMCGS, ScienCell Research Laboratories, USA), and 5 mL penicillin/streptomycin solution (ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA, USA). The AoSMCs were passaged in trypsin/EDTA (ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA, USA), Trypsin Neutralizing Solution (ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA, USA). Poly-L-Lysine (ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA, USA) was used to coat the culture flasks.

Cell viability was determined using WST-1 assay (Takara, Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, France). HUVECs integrity was measured by the real-time cell electric impedance sensing system using E-Plate 16 View (Roche & ACEA Biosciences, Santa Clara, CA, USA) and phosphate-buffered saline (PBS, Biomed Lublin, Lublin, Poland). Glucose uptake was studied using 2-NBDG (2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Red blood cell lysis was assayed using Triton X-100 (Polish Chemical Reagents, Gliwice, Poland).

2. Synthetic materials and methods

All reagents and solvents used in analytical studies were commercial and high purity, i.e. of analytical grade or ultra-gradient HPLC-grade and purchased either from Merck KGaA / Millipore-Sigma (Munich, Germany), J.T. Baker (Deventer, The Netherlands), VWR International, LCC (Radnor, PA, USA), or ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA). Reactions were monitored by thin-layer chromatography using aluminum sheets coated with silica gel 60 F₂₄₅ (0.24 mm) with suitable visualization. Flash chromatography purification was performed on silica gel 60 (0.063-0.200 mm mesh). ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded on a Bruker Avance 500 spectrometer (Bruker Biospin, Fällanden, Switzerland) operating at 500.13 and 125.75 MHz respectively, using tetramethylsilane as an internal standard. Not all pH-dependent protons of the compounds were observed. ESI-MS spectra were recorded by a Finnigan LCQ quadrupole ion trap mass spectrometer (Finnigan MAT, San Jose, CA, USA) equipped with an electrospray ionization source. Over 97% purities were obtained for the final products by elemental analysis (C, H, N) with a Perkin Elmer 2400 Series II CHNS/O organic elemental analyzer (Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA).

3. General Procedure for Synthesis of Sulfonamide Derivatives

Metformin (N,N-dimethyl imidodicarbonimidic diamide hydrochloride) (1.0 eq.) in 1 M NaOH (1.5 eq.) was stirred at room temperature for 30 min. Water was evaporated *in vacuo* and the residue was dissolved in MeOH. The solvent was evaporated and the residue was redissolved in cold anhydrous MeOH. NaCl was filtered out of the solution and the filtrate was evaporated to yield basic metformin as a white solid (99%).

Basic metformin (2.0 eq.), and commercial sulfonyl chlorides (1.0 eq.) were dissolved in anhydrous CH₂Cl₂ and stirred under argon for three hours. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was purified by flash column chromatography eluting with 0-10% MeOH in CH₂Cl₂ to obtain the compounds **1-6** or the intermediates **7-8** (39-80%).

4. Biological Material for Stability Studies

Mouse liver and brain S9 fractions were prepared by collecting fresh tissues from the animals in compliance with the European Commission Directives 2010/63/EU and 86/609 and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Eastern Finland (No. ESAVI/3347/04.10.07/2015). The liver or brain homogenates were prepared by homogenizing freshly-collected tissues with 50 mM Tris-buffered saline (TBS) (pH 7.4) (1:4 *w/v*) using an Ultra Turrax dispersing instrument (X1020, Ystral GmbH, Dottingen, Germany). The homogenates were centrifuged at 9 000 rpm for 20 min at 4 °C, and the supernatant was collected. Protein concentrations of both fractions were determined by Bio-Rad Protein Assay using the Bradford method (EnVision, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Biological material was stored at -80 °C before use. Mouse serum and human plasma were purchased from Merck KGaA / Millipore-Sigma (Munich, Germany).

5. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Analyses

Quantification of biguanidines (**1-6**) was determined by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). The system consisted of an Agilent 1100 binary pump (Agilent Technologies Inc., Wilmington, DE, USA), 1100 micro vacuum degasser, HP 1050 Autosampler, HP 1050 variable wavelength detector, operating at 235 nm. The chromatographic separations were achieved on an Agilent Zorbax SB-C18 analytical column (4.6 mm x 150 mm, 5 µm) (Agilent Technologies Inc., Wilmington, DE, USA) by isocratic elution of water containing 0.1% formic acid (pH ca. 3.0) and acetonitrile containing 0.1% formic acid with ratios varying from 70:30 (*v/v*) to 80:20 (*v/v*). The retention times of the compounds were ca. 2.0-5.0 min at the flow rate of 1.0 mL/min at room temperature. The lower limits of quantification for the compounds were within the range 0.05-0.5 µM. These HPLC methods were accurate (100 ± 10% of nominal concentration), precise (RSD% < 10%), and selective (no interfering peaks) over the range 0.5-50 µM.

6. Enzymatic and chemical stability of Biguanidines

Enzymatic and chemical stabilities of compounds **1-6** in mouse serum, liver and brain S9 fractions, in human plasma, or in TBS (pH 7.4) were determined at 37 °C. The incubation mixtures were prepared by mixing the S9 subcellular fractions (final protein concentration 1.0 mg/mL) with TBS (pH 7.4) or serum/plasma with 10 mmol/L stock solution of studied compounds in DMSO (the final concentrations of compounds were 100 µmol/L and the DMSO concentration was 2%). The mixtures were incubated for six hours and the samples (100 µL) were withdrawn at appropriate intervals. The proteins in the samples were precipitated with ice-cold acetonitrile (100 µL) and the samples were centrifuged for 5 min at 12 000 x g at room temperature. The supernatants were collected and analysed by the HPLC method described above. In the chemical stability study with TBS, the S9 fractions or plasma were replaced with the same volume of buffer.

7. Preparation of biological material for coagulation screening tests and RBCs Lysis Assay

The tested material constituted a remnant of routine diagnostic studies earmarked for removal as medical waste. The blood was collected into vacuum tubes stuffed with 3.2% buffered sodium citrate, an anti-clotting agent, by a ratio of 1:9. Then, blood collection tubes were centrifuged at 3000× g for 10 minutes at room temperature using a Micro 22R centrifuge (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany). After centrifugation, the obtained platelet poor plasma (PPP) was collected with a plastic Pasteur pipette, and used immediately or stored in small aliquots for up to one month at -30° C. Before each experiment, PPP was restored at 37 °C for 15 min. Once thawed, the PPP was not frozen again nor used for retesting.

RBCs separated from the plasma were washed three times with 0.9% sodium chloride solution, and then used for the studies within 24 hours.

8. Primary cell growth and morphology

The influence of tested compounds **1–6** on the growth of HUVECs and AoSMCs was studied using the WST-1 cell viability assay (Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, France). Briefly, both HUVEC and AoSMC were seeded on 96-well microplates at densities of 7500 and 5000 cells per well and cultured for 24 hours. When 70% confluence was reached, the cells were stimulated with tested compounds diluted in medium (1 + 9; v = 100 μ L; the pure medium was added to the control wells) and microplates were incubated for another 24 hours (37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂). Thereafter, the cells were rinsed with 100 μ L culture medium, and WST-1 reagent diluted in medium (100 μ L) was added. The microplates were incubated once more (37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂) for next 1.5 hours, followed by an absorbance reading at $\lambda = 450$ nm using a microplate reader (iMARK, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The experiments were conducted in triplicates ($n = 6$), and the results were presented as mean \pm SD. The cellular viability was presented as a percentage of the control samples which constituted 100% viability. The concentration-response curves (GraphPad Prism 5, San Diego, CA, USA) were employed to determine the IC₅₀ value, i.e. the concentration at which the examined compound exerts half of its maximal inhibitory effect. The variability coefficient of the method was counted (CV(HUVEC) = 7.41%, $n = 8$; CV(AoSMC) = 4.89%, $n = 6$).

The effect of six studied compounds on HUVEC and AoSMC morphology was examined using an inverted microscope with phase contrast (magnification 100 \times) (Opta-Tech, Warszawa, Poland, software OptaView 7).

9. Glucose Utilization Assay

HUVECs were plated at a density of 20000 cells per well in 48-well plates, and cultured under standard conditions for 24 hours (medium EGM-2, Lonza, Basel, Switzerland; volume 0.2 mL). On the following day, studied derivatives **1–6** were added at concentrations of 0.3 and 0.6 μ mol/mL, then incubation of HUVECs was continued for another 24 hours. In this study, cells treated only with EGM-2 medium (0.2 μ mol/mL) were employed as controls, while wells treated with D-glucose (final concentration in a sample of 0.1 and 0.5 μ mol/mL) constituted positive controls, i.e. they were incubated under the same conditions as the wells with the tested compounds. After 24 hours of incubation, the cells were washed with PBS (Biomed Lublin, Lublin, Poland), and subsequently cultured for two hours in glucose-free DMEM medium supplemented with 1% BSA (bovine serum albumin, Sigma, St. Louis, MO, USA). The cells were then co-treated with insulin (final concentration 100 nmol/L) for 30 minutes. Shortly thereafter, the medium was removed and the cells were treated with 2-NBDG (final concentration 50 μ mol/L) for 30 minutes, then the solutions of each well were discarded. The cells were rinsed twofold with 100 μ L PBS, and lysed using 1% Triton X-100 solution in PBS. The fluorescence signal was read using a microplate reader (Biotek, Instruments, Winooski, VT, USA) at $\lambda = 480/530$ nm.

The concentration of intracellular 2-NBDG in the studied wells was determined based on a calibration curve; this was constructed by adding appropriate amounts of 2-NBDG, at concentrations of 0.1–25 μ mol/L, in lysis buffer, then recording the fluorescence intensity. The outcomes are presented as mean \pm SD, $n = 4$. The coefficient of variation for the assay was estimated (CV = 13.1%, $n = 6$).

10. Mitochondrial membrane potential

HUVEC were seeded on 24-well plates at densities of 50 000 cells per well and cultured for 24 hours. The following day, the cells were stimulated with examined compounds diluted in medium (1 + 24; v = 250 μ L), and then incubated for the next 24 hours (37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂). The cells were then collected using accutase (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) and centrifuged (1200 rpm, 5 min). Following this, the supernatants were carefully removed and the cells were suspended again in 100 μ L of buffer solution (PBS), while the FCCP control samples were resuspended in 100 μ L of the 10 μ M FCCP control solution. The FCCP control (carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone, mitochondrial oxidative phosphorylation uncoupler) was used as a control in the flow cytometry data analysis, and to compensate for spectra overlap of green monomers into the red aggregate channel. The samples were vortexed and incubated for another five minutes in the dark at room temperature. A solution of JC-1 in a complete medium (V = 100 μ L) was added to the samples and this was incubated for 30 minutes. The fluorescence was measured immediately on a cytometer (CytoFlex, blue laser, 480 nm, Beckman-Coulter, Indianapolis, IN, US). The received results were counted by means of Kaluza

2.1 (Beckman-Coulter) software. The data (recorded as Mean Fluorescence Intensity (MFI)) are presented as the mean \pm SD, $n = 3$. The coefficient of variation for the assay was determined ($CV = 5.86\%$ $n = 3$).

11. HUVEC integrity studies

The impact of sulfonamide derivatives 1–6 on the integrity and barrier properties of the HUVECs was analysed in real-time using an RTCA DP Analyzer (Roche & ACEA Biosciences, Santa Clara, CA, US). The HUVECs from one cell suspension were seeded on three separate E-16 plates (Roche & ACEA Biosciences, Santa Clara, CA, USA) at a density of 15 000 cells per well, and cultured until the cells achieved plateau phase. Each of the plates included two control wells. Then, the medium was discarded from each well, and the solutions of the test compounds dissolved in cell culturing medium (100 μ L) or pure medium (100 μ L, control) were added. After 48 hours of measurements, the experiments were discontinued, then the values of CI were read. The findings are presented as mean \pm SD of 'normalized cell index' (nCI), calculated by the division of a CI value at a certain time point by the CI value at a reference time point. The experiments were conducted in triplicates ($n = 5$ –6). The method was validated and the coefficient of variability (CV) was calculated as 9.88%–12.03%, depending on the measured time point ($n = 6$).

12. Red blood cells lysis assay and morphology

In the first stage, 2% RBC suspension in 0.9% saline was meticulously vortexed, and then incubated at 37 °C for one hour and 24 hours (static conditions, incubator, Falc Instruments, Treviglio, Italy) with the examined compounds at concentrations of 0.006 to 1.5 μ mol/mL or pure 0.9% NaCl (control). Following this, the samples were centrifuged at 1000 \times g for 10 min. The amount of hemoglobin released from the erythrocytes under the influence of the derivatives was measured spectrophotometrically ($\lambda = 550$ nm, Cecil Ce 2021 spectrophotometer). The outcomes are featured as the degree of hemolysis, which constituted a percentage of the released hemoglobin. A sample containing 10 μ L of 2.0% v/v Triton X-100 was used as a positive control (100% of hemolysis), whereas a sample of saline solution, representing spontaneous hemolysis of RBCs, was employed as negative control. The results for the one-hour and 24-hour incubations are presented as mean \pm standard deviation (SD), $n_{(1h)} = 4$, $n_{(24h)} = 5$, and the coefficient of variability was calculated: $CV_{(1h)} = 9.18\%$, $n = 4$; $CV_{(24h)} = 12.01\%$, $n = 5$.

Based on the above procedure, controls and test samples for RBC morphology were prepared. The RBCs were subjected to microscope examination using a phase-contrast Opta-Tech inverted microscope, at 400-times magnification, equipped with software (OptaView 7, Warsaw, Poland).

13. Basic Coagulation Tests: PT, INR, FBG, APTT, TT

The impact of novel sulfonamides 1–6 on the basic coagulation parameters (PT, INR, APTT, and TT) was determined using a CoagChrom-3003 coagulometer (Bio-Ksel, Grudziądz, Poland). The tests were carried out in triplicates ($n = 4$ –6). The control samples consisted of a mixture of distilled water and methanol (1:1) which was the solvent for the tested compounds.

The results are presented as mean \pm standard deviation (SD). The methods were validated using Bio-Ksel normal plasma which was dissolved in water for injection (Polpharma, Gdańsk, Poland). Coefficients of variability for all experiments were calculated (PT: $CV = 4.69\%$, APTT: $CV = 3.65\%$, TT: $CV = 4.88\%$). The reference values for each test are as follows: PT: 9.7–14.6 s; APTT: 26.7–40.0 s; TT: 14.0–18.0 s for 3.0 UNIH/mL of thrombin.

14. Activity of Antithrombin III (AT)

The tested samples contained pre-warmed PPP diluted 30-fold (50 μ L), thrombin (10 U/mL) dissolved in Tris buffer (50 mM) in the presence of excess heparin (2 U/mL) (50 μ L), and 10 μ L of studied derivatives. The prepared samples were incubated for one minute at 37 °C. The control samples consisted of a mixture of distilled water and methanol (1:1). As a result of the addition of a chromogenic substrate ($V = 50$ μ L, dissolved in water for injection), *p*-nitroaniline was released in an amount proportional to the level of antithrombin. The activity of AT was counted using a calibration curve ($R^2 = 1.0$) performed on a calibrator diluted in the range from 1:30 to 1:120 ($\lambda = 405$ nm) by the coagulometer program (CoagChrom-3003 Bio Ksel, Grudziądz, Poland). The coefficient of variability for the method (CV) was 3.65%, and reference values for AT activity ranged from 80 to 130%.

15. Activity of factor X

The composition of each test sample was as follows: 50 μL of four-fold diluted PPP, 50 μL of deficient plasma factor X, 10 μL of the studied biguanides, and 100 μL PT reagent (thromboplastin). The control samples contained a mixture of distilled water and methanol (1:1). PT time, i.e. the time needed for clot formation after adding the reagent, was determined using a CoagChrom-3003 coagulometer (Bio-Ksel, Grudziadz, Poland), and factor X activity was calculated by a calibration curve ($R^2 = 0.999$) performed on a calibrator diluted in the range 1:5–1:80 (Brown and Kouides, Haemophilia, 2008, 1176–1182). The observed variation in plasma coagulation time is proportional to the concentration and activity (%) of factor X in the plasma incubated with the tested compounds. The coefficient of variability for the method was calculated as CV = 1.95%, and the reference range of factor X activity is 77-131%.

16. Clot formation and lysis test (CL-test)

To determine the influence of selected compounds **1**, **3**, **4**, and **6** on overall hemostasis potential, further in-depth studies were conducted based on continuous measurement of changes in optical transmittance over time using a multiparametric CL-test, as described previously by Kostka et al. (Blood Coagul. Fibrinolysis, 2007, 18, 611–618), and Sikora et al. (Eur. J. Nutr., 2014, 53, 1493–1502). The test samples were added to Semi-Micro Cuvettes (Medlab Products, Poland) thus: 470 μL of three-fold diluted human citrate plasma, 10 μL of the examined compounds, and 10 μL of t-PA (final concentration in a sample 220 ng/mL). Clot formation was initiated by the addition of thrombin (10 μL , final concentration 0.5 IU/mL). The final volume of the sample was 500 μL . The clot formation and lysis curves were recorded at $\lambda = 405$ nm, using a spectrophotometer (Cecil CE 2021; London, UK) with circulating thermostated water (37 °C) and a Model 300 Electronic Stirrer (Rank Brothers Ltd., Cambridge, UK). The results are presented as mean \pm SD, and the experiments were conducted in triplicates ($n = 5$ –8).

The obtained graphs were analysed using dedicated software (Kostka et al., Blood Coagul. Fibrinolysis, 2007, 18, 611–618) to determine the kinetic parameters of clot formation, stabilization, and fibrinolysis. The following parameters of clot formation were measured: T_t —thrombin time (s), F_{max} —maximum clotting (%T), T_f —plasma clotting time (s), F_{vo} —initial plasma clotting velocity (%T/min), S_r —area under the clot formation curve (%Txmin). The parameters of the clot stabilization phase included T_c —clot stabilization time (s), S_c —area under the curve of stable clot formation (%Txmin). The parameters of fibrinolysis comprised L_{max} —maximum lysis (%T), T_l —fibrinolysis time (s), L_{vo} —initial clot fibrinolysis velocity (%T/min), S_f —area under the fibrinolysis curve (%Txmin). In addition, the overall potential of clot formation and fibrinolysis, viz. CL_{AUC} and (%Txmin), and the total time of clot formation and fibrinolysis, viz. T and (s), were also evaluated.

The method of clot formation and fibrinolysis was validated, and the coefficient of variation (CV) for pooled human plasma ($n = 7$) was within the range of 3.74–14.53% depending on the calculated parameter (Markowicz-Piasecka et al., Pharmaceuticals, 2020,13, 323).

17. Coagulation Assay

The coagulation assay constitutes a modification of the CL-test. In this study, small amounts of thrombin (0.00312 IU/mL), and calcium chloride (0.005 mmol/ml) were used to initiate a feedback reaction leading to the generation of endogenous thrombin, and coagulation (Markowicz-Piasecka et al., Eur. J. Pharmacol., 2017, 811, 208–221; Sikora et al., Eur. J. Nutr., 2014, 53, 1493–1502). Otherwise, all other conditions were the same as those used for the CL-test (Section 2.17).

The received graphs were analysed to estimate the following parameters: TG_t —thrombin generation time (s), F_{max} —maximum clotting (%T), T_f —plasma clotting time (s), F_{vo} —initial plasma clotting velocity (%T/min), S_f —area under the clot formation curve (%Txmin), T_c —clot stabilization time (s), S_c —area under the curve of coagulation (%Txmin). All calculations were performed using dedicated software (Kostka et al., Blood Coagul. Fibrinolysis, 2007, 18, 611–618).

18. Amidolytic activity of thrombin

The amidolytic activity of thrombin was assessed spectrophotometrically using the chromogenic substrate D-Phe-Pip-Arg-pNA (Markowicz-Piasecka et al., Pharm. Rep., 2015, 67, 1230-1239). Before the experiments, trial studies between compounds and reagents (thrombin and chromogenic substrate) were performed.

Materiały uzupełniające do Publikacji III

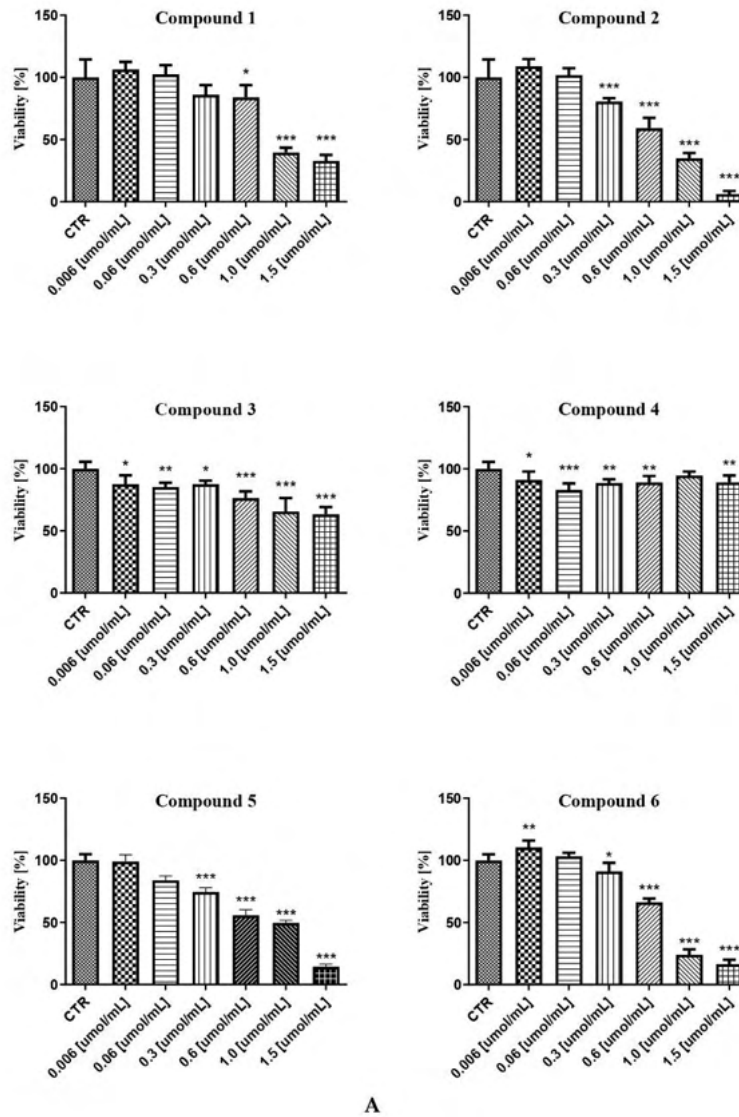
The composition of each test sample (Semi-Micro Cuvettes, Medlab Products, Poland) was as follows, 455 μL of TBS buffer at pH 7.4, 10 μL of thrombin (0.112 IU/mL), 10 μL of examined biguanide derivatives at concentrations of 0.3 $\mu\text{mol/mL}$, 0.6 $\mu\text{mol/mL}$, and 1.5 $\mu\text{mol/mL}$. The control samples consisted of 465 μL of TBS buffer at pH 7.4 and 10 μL of thrombin (0.112 IU/mL). The samples were incubated for three minutes at 37 °C. Afterwards, 25 μL of 2 mmol/L chromogenic substrate was added to start the reaction. The total volume of the sample was 500 μL . The absorbance at 405 nm was measured using a spectrophotometer (Cecil CE2021, London, England) over 10 minutes. The obtained curves were evaluated using a software for establishing of thrombin activity. The following parameters were estimated: dA/dt – initial velocity of reaction, and A_{max} – maximum activity. The coefficient of variability was calculated: $CV = 2.72\%$, $n = 5$.

19. Data analysis

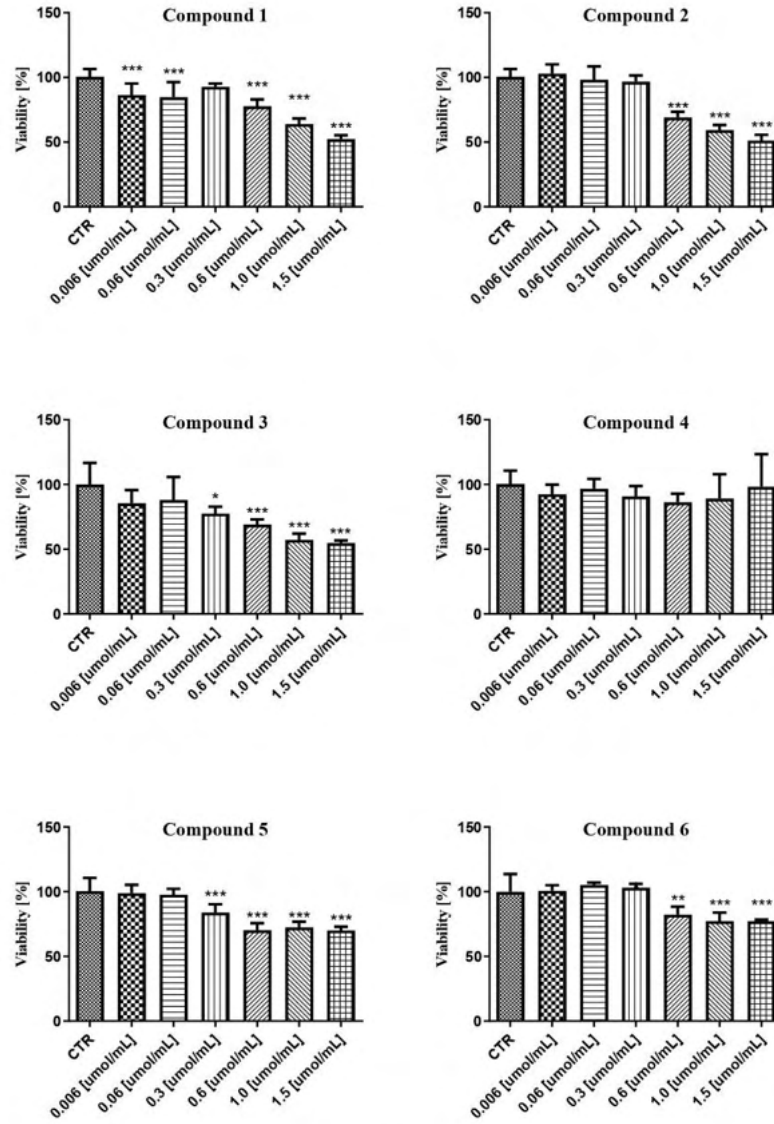
Statistical analysis was performed using commercially-available packages (Statistica 12.0 - StatSoft, Kraków, Poland; GraphPad Prism 5 software - San Diego, CA, USA). The normality of the distribution of continuous variables was determined using the Shapiro-Wilk test, and the homogeneity of variances using Levene's test. The paired *t*-test was employed to test the dependent variables (e.g., studies on biological material), whereas statistically significant differences between the means of independent groups were identified using one-way ANOVA. The results of all the tests were recognized as significant at *p*-values lower than 0.05.

Materiały uzupełniające do Publikacji III

Fig. S1. The impact of examined metformin derivatives on HUVEC (A) and AoSMC (B) cell growth. The obtained outcomes (viability, %) were shown as mean \pm SD. The asterisk denotes the statistically relevant difference between the test sample and control; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.



Materiały uzupełniające do Publikacji III



B

Fig. S2. The effect of sulfonamides 1–6 on AoSMC viability and morphology after 24-h of incubation. Cells were cultured without (control, CTR) and with compounds 1–6 at a concentration of 0.006–1.5 $\mu\text{mol/mL}$. Representative cell images are shown for concentrations closed to IC50 values or 1.5 $\mu\text{mol/mL}$ (100-fold magnification). In the previous studies, metformin was found to not affect the viability and morphology of AoSMC cells in our previous study (Markowicz-Piasecka et al., Sci Rep., 2019, 9, 6573).

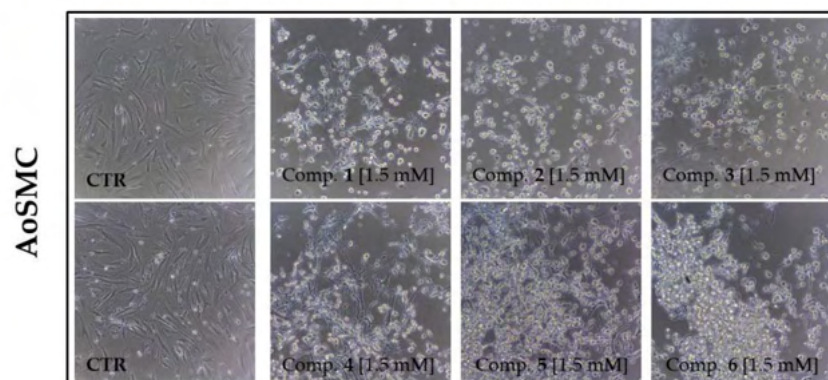


Table S1. Effects of biguanides 1–6 on the intracellular glucose uptake. The results are presented as mean \pm SD, $n = 4$. An asterisk denotes the significant alterations between control and cells treated with glucose, metformin or studied biguanides. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

	Concentration [$\mu\text{mol/mL}$]	Glucose uptake [$\mu\text{mol/L}$]
<i>Control</i>	-	6.4 \pm 1.1
<i>Glucose</i>	0.1	4.4 \pm 1.0
	0.5	6.9 \pm 1.6
	0.5	11.1 \pm 1.6***
<i>Metformin</i>	1.0	11.0 \pm 2.2***
	0.3	7.0 \pm 1.1
<i>Comp. 1</i>	0.6	9.6 \pm 2.6*
	0.3	7.9 \pm 0.7
<i>Comp. 2</i>	0.6	8.9 \pm 1.2**
	0.3	6.6 \pm 2.1
<i>Comp. 3</i>	0.6	8.1 \pm 0.7
	0.3	6.2 \pm 2.2
<i>Comp. 4</i>	0.6	6.5 \pm 0.7
	0.3	8.5 \pm 0.8*
<i>Comp. 5</i>	0.6	8.5 \pm 0.7*
	0.3	6.1 \pm 1.7
<i>Comp. 6</i>	0.6	8.6 \pm 0.7*

Materiały uzupełniające do Publikacji III

Table S2. The data of mitochondrial membrane potential assay. FCCP at 10 $\mu\text{mol/L}$ was used as a positive control. The outcomes are presented as ratio between red and green fluorescence (recorded as mean fluorescence intensity). The results are presented as mean \pm standard deviation; $n = 3$. Values in bold are statistically significant in comparison to control samples; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

<i>Ratio (red:green fluorescence)</i>	
<i>Control</i>	0.226 \pm 0.008
<i>FCCP</i>	0.199 \pm 0.005*
<i>Metformin [0.5 $\mu\text{mol/mL}$]</i>	0.239 \pm 0.003
<i>Metformin [1.0 $\mu\text{mol/mL}$]</i>	0.257 \pm 0.013
<i>Compound 1 [0.3 $\mu\text{mol/mL}$]</i>	0.235 \pm 0.022
<i>Compound 1 [0.6 $\mu\text{mol/mL}$]</i>	0.196 \pm 0.017
<i>Compound 2 [0.3 $\mu\text{mol/mL}$]</i>	0.197 \pm 0.004
<i>Compound 2 [0.6 $\mu\text{mol/mL}$]</i>	0.230 \pm 0.014
<i>Compound 3 [0.3 $\mu\text{mol/mL}$]</i>	0.198 \pm 0.004
<i>Compound 3 [0.6 $\mu\text{mol/mL}$]</i>	0.228 \pm 0.008
<i>Compound 4 [0.3 $\mu\text{mol/mL}$]</i>	0.228 \pm 0.016
<i>Compound 4 [0.6 $\mu\text{mol/mL}$]</i>	0.152 \pm 0.003***
<i>Compound 5 [0.3 $\mu\text{mol/mL}$]</i>	0.135 \pm 0.020***
<i>Compound 5 [0.6 $\mu\text{mol/mL}$]</i>	0.154 \pm 0.015***
<i>Compound 6 [0.3 $\mu\text{mol/mL}$]</i>	0.152 \pm 0.007***
<i>Compound 6 [0.6 $\mu\text{mol/mL}$]</i>	0.140 \pm 0.030***

Materialy uzupełniające do Publikacji III

Table S3. The impact of compounds **1–4** on the integrity of HUVECs analysed in the RTCA-DP system.

<i>Compound</i>	<i>Concentration</i>	<i>3 hours</i>	<i>6 hours</i>	<i>12 hours</i>	<i>24 hours</i>	<i>36 hours</i>
<i>CTR</i>	-	0.466 ± 0.026	0.460 ± 0.022	0.659 ± 0.017	1.106 ± 0.018	1.606 ± 0.085
1	0.3 µmol/mL	0.496 ± 0.016	0.477 ± 0.009	0.695 ± 0.018	0.712 ± 0.029***	1.001 ± 0.026***
	0.6 µmol/mL	0.485 ± 0.034	0.471 ± 0.030	0.696 ± 0.031	0.455 ± 0.029***	0.654 ± 0.020***
2	0.3 µmol/mL	0.515 ± 0.037	0.496 ± 0.031	0.701 ± 0.034	0.678 ± 0.020***	1.015 ± 0.030***
	0.6 µmol/mL	0.486 ± 0.014	0.455 ± 0.019	0.689 ± 0.017	0.439 ± 0.018***	0.630 ± 0.021***
3	0.3 µmol/mL	0.488 ± 0.021	0.480 ± 0.023	0.690 ± 0.022	0.738 ± 0.019***	1.131 ± 0.033***
	0.6 µmol/mL	0.477 ± 0.011	0.466 ± 0.009	0.688 ± 0.016	0.423 ± 0.019***	0.637 ± 0.024***
4	0.3 µmol/mL	0.469 ± 0.025	0.463 ± 0.028	0.667 ± 0.022	0.750 ± 0.085***	1.116 ± 0.172***
	0.6 µmol/mL	0.471 ± 0.031	0.472 ± 0.031	0.671 ± 0.021	0.682 ± 0.077***	1.068 ± 0.206***

The results are presented as mean ± SD, $n = 4-6$. The table includes the calculated normalized Cell Index values (nCI) for control and compounds **1–4** after selected time points (3 – 36 h) of incubation. An asterisk denotes the statistically significant difference between sample treated with compounds and controls ample (***) $p < 0.001$.

Table S4. The impact of compounds **5–6** on the integrity of HUVECs analysed in the RTCA-DP system.

<i>Compound</i>	<i>Concentration</i>	<i>3 hours</i>	<i>6 hours</i>	<i>12 hours</i>	<i>24 hours</i>	<i>36 hours</i>
<i>CTR</i>	-	0.477 ± 0.024	0.478 ± 0.021	0.671 ± 0.021	1.156 ± 0.023	1.498 ± 0.045
5	0.3 µmol/mL	0.502 ± 0.005	0.485 ± 0.009	0.706 ± 0.031	0.735 ± 0.025***	0.976 ± 0.034***
	0.6 µmol/mL	0.559 ± 0.041	0.526 ± 0.030	0.784 ± 0.044	0.502 ± 0.026***	0.696 ± 0.021***
6	0.3 µmol/mL	0.461 ± 0.018	0.463 ± 0.015	0.673 ± 0.024	0.708 ± 0.040***	0.994 ± 0.039***
	0.6 µmol/mL	0.507 ± 0.041	0.492 ± 0.040	0.713 ± 0.038	0.524 ± 0.044***	0.677 ± 0.043***

The results are presented as mean ± SD, $n = 4-6$. The table includes the calculated normalized Cell Index values (nCI) for control and compounds **4–6** after selected time points (3 – 36 h) of incubation. An asterisk denotes the statistically significant difference between sample treated with compounds and controls ample (***) $p < 0.001$.

Fig. S3. Effects of tested compounds 1–6 on the hemolysis of erythrocytes after 1-h incubation. Positive control was Triton X-100 which constituted (100% hemolysis). The data are presented as mean \pm SD; $n = 4$. The asterisk denotes significant differences compared to respective control ($*p < 0.05$).

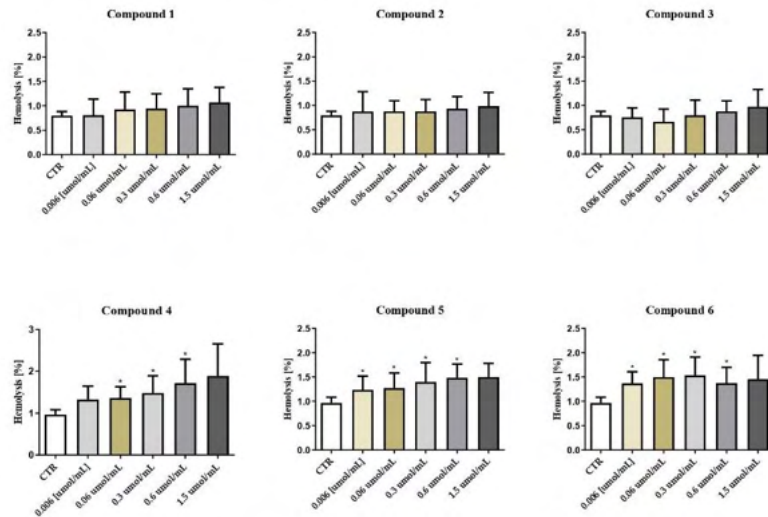
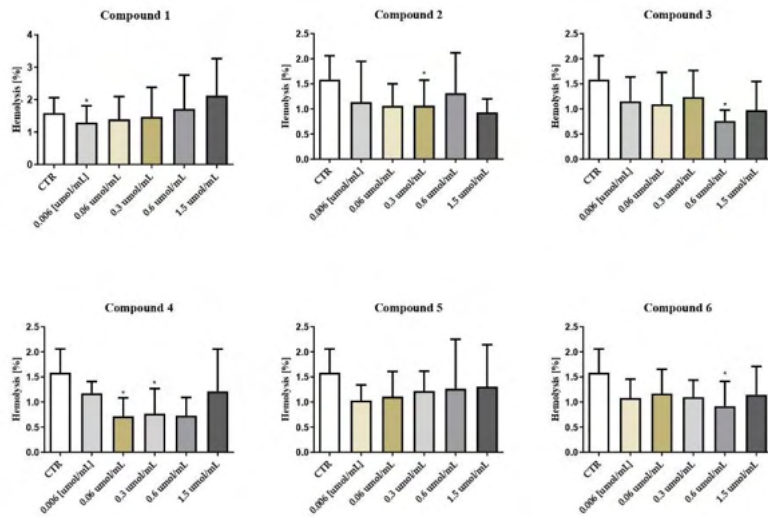


Fig. S4. Effects of tested compounds 1–6 on the hemolysis of erythrocytes after 24-h incubation. Positive control was Triton X-100 which constituted (100% hemolysis). The data are presented as mean \pm SD; $n = 5$. The asterisk denotes significant differences compared to respective control ($*p < 0.05$).



Materialy uzupełniające do Publikacji III

Table S5 Effects of biguanides **1–6** on the activity of anti-thrombin III (AT) (data are presented as mean \pm SD; $n = 4-6$). The asterisk denotes a statistically significant difference between the samples treated with compounds and control; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

<i>Compound</i>	<i>Control</i>	<i>0.06 $\mu\text{mol/mL}$</i>	<i>0.3 $\mu\text{mol/mL}$</i>	<i>0.6 $\mu\text{mol/mL}$</i>	<i>1.5 $\mu\text{mol/mL}$</i>
1	122.00 \pm 4.97	144.25 \pm 3.50*	133.00 \pm 3.00	136.00 \pm 3.74*	150.50 \pm 14.20*
2	122.80 \pm 4.49	125.80 \pm 5.50	118.00 \pm 3.81	121.80 \pm 4.76	131.60 \pm 12.90
3	121.50 \pm 4.43	115.25 \pm 5.85	111.00 \pm 3.74*	129.00 \pm 7.62	140.00 \pm 5.77*
4	122.50 \pm 3.89	122.50 \pm 9.33	122.00 \pm 7.46	119.83 \pm 8.61	132.83 \pm 9.85
5	122.25 \pm 5.25	125.00 \pm 9.76	121.75 \pm 4.99	131.75 \pm 13.99	142.50 \pm 18.45
6	123.00 \pm 6.27	119.50 \pm 8.81	127.75 \pm 3.59	151.50 \pm 5.97**	175.00 \pm 9.31**

Table S6. Effects of compounds **1, 3-6** on the activity of factor X. The results are presented as mean \pm SD; $n = 4$. The asterisk denotes a statistically significant difference between the samples treated with compounds and control; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

<i>Compound</i>	<i>Factor X activity [%]</i>			
	<i>Control</i>	<i>0.3 $\mu\text{mol/mL}$</i>	<i>0.6 $\mu\text{mol/mL}$</i>	<i>1.5 $\mu\text{mol/mL}$</i>
1		89.25 \pm 6.29	86.25 \pm 6.60*	64.00 \pm 11.05**
3		89.50 \pm 5.07	91.00 \pm 10.49	72.00 \pm 2.58**
4	95.75 \pm 5.50	88.00 \pm 1.83	89.50 \pm 3.42*	72.00 \pm 5.60*
5		89.50 \pm 5.97	87.75 \pm 6.75*	59.75 \pm 7.63**
6		90.75 \pm 5.25	85.75 \pm 3.77	69.00 \pm 10.86*

Materiały uzupełniające do Publikacji III

Table S7. The effects of synthesized sulfonamide derivatives of metformin **1**, **3**, **4**, **6** on the kinetic parameters of clot formation and fibrinolysis (CL-test).

Compound	Concentr. [μmol/mL]	Parameters												
		Tt [s]	Fmax [%T]	Tf [s]	Fvo [%T/min]	Tc [s]	Lmax [%T]	Tl [s]	Lvo [%T/min]	Sf [%T x min]	Sc [%T x min]	Sl [%T x min]	S [%T x min]	T [s]
1	0 (CTR)	32.37 ± 4.86	60.97 ± 5.44	66.87 ± 6.57	143.33 ± 20.98	242.00 ± 38.80	61.48 ± 4.69	199.67 ± 24.11	19.78 ± 1.61	47.17 ± 7.61	240.57 ± 53.65	108.37 ± 25.25	396.11 ± 85.97	307.22 ± 28.02
	0.06	30.57 ± 5.81	63.85 ± 5.15*	74.23 ± 9.97*	148.33 ± 24.04	272.50 ± 57.48	64.08 ± 5.41*	221.83 ± 46.84	19.80 ± 4.14	53.98 ± 8.02**	281.64 ± 65.07*	116.14 ± 16.93	425.61 ± 49.56	314.68 ± 31.56
	0.3	30.23 ± 2.23	62.60 ± 5.56*	71.42 ± 7.24*	150.17 ± 17.50	271.83 ± 55.73	62.37 ± 4.07	209.83 ± 42.74	19.97 ± 2.41	52.32 ± 9.20*	299.12 ± 75.39*	122.98 ± 47.25	455.01 ± 138.35	285.62 ± 18.05*
	0.6	32.92 ± 4.64	65.03 ± 5.47*	75.92 ± 10.48**	153.17 ± 33.63	295.50 ± 49.70***	65.22 ± 4.81*	221.17 ± 51.67	21.53 ± 3.23	56.24 ± 8.08**	311.77 ± 60.01***	116.50 ± 20.98	495.19 ± 98.83***	414.37 ± 48.11**
	1.5	36.87 ± 7.65	57.67 ± 4.37	87.12 ± 12.40**	123.27 ± 20.53	296.67 ± 40.26**	57.32 ± 4.63	222.17 ± 34.78	18.18 ± 2.69	57.29 ± 8.78***	277.46 ± 49.64	115.57 ± 14.36	450.34 ± 68.23*	426.10 ± 57.04**
3	0 (CTR)	45.95 ± 11.03	64.45 ± 8.50	81.43 ± 10.21	138.42 ± 34.97	250.67 ± 51.37	64.08 ± 8.19	198.50 ± 44.33	20.95 ± 4.86	60.81 ± 9.35	263.97 ± 73.20	118.35 ± 25.18	443.06 ± 105.01	309.45 ± 36.14
	0.06	46.15 ± 7.37	66.07 ± 6.67	88.73 ± 9.22	135.92 ± 28.74	291.17 ± 59.43**	65.23 ± 6.43	222.50 ± 38.84	19.45 ± 3.57	68.05 ± 9.01*	314.61 ± 86.23*	139.83 ± 28.49**	486.17 ± 90.76*	313.38 ± 24.38
	0.3	51.87 ± 14.22*	63.47 ± 6.96	91.30 ± 17.35*	122.17 ± 36.50*	278.33 ± 62.39	63.23 ± 6.93	208.00 ± 48.14	20.87 ± 5.49	66.71 ± 13.69	289.25 ± 84.98	120.13 ± 33.56	476.09 ± 125.40	311.07 ± 23.43
	0.6	52.35 ± 13.31*	63.50 ± 8.06	97.88 ± 15.57**	120.57 ± 26.85**	318.33 ± 83.83*	62.72 ± 8.46	227.83 ± 62.97	19.23 ± 4.75	72.09 ± 15.04*	332.79 ± 114.61*	136.47 ± 39.16	541.35 ± 163.28*	454.47 ± 58.86***
	1.5	54.90 ± 11.71**	59.13 ± 6.85*	103.83 ± 18.33**	110.87 ± 16.85*	356.33 ± 112.38	58.40 ± 7.19*	237.83 ± 69.91	19.05 ± 5.99	71.84 ± 15.19*	342.27 ± 116.66	125.92 ± 42.54	540.07 ± 170.89	476.77 ± 63.95***
4	0 (CTR)	34.15 ± 5.84	70.50 ± 8.53	72.03 ± 12.85	168.13 ± 48.29	256.38 ± 61.93	69.70 ± 8.09	219.50 ± 57.35	21.84 ± 4.59	57.10 ± 9.36	285.72 ± 71.80	145.37 ± 40.61	516.63 ± 146.32	316.48 ± 59.90
	0.06	34.71 ± 6.57	70.10 ± 8.45	82.36 ± 17.14	142.56 ± 50.86	297.13 ± 60.94	69.31 ± 8.24	235.63 ± 44.75	21.25 ± 4.25	63.70 ± 7.65*	322.59 ± 81.66*	154.33 ± 46.01	557.39 ± 130.95	319.41 ± 50.37
	0.3	30.37 ± 3.70*	71.96 ± 8.06	73.95 ± 8.31	175.63 ± 39.25	313.63 ± 89.25**	71.26 ± 8.45	241.50 ± 65.18	21.11 ± 5.79	60.91 ± 5.66	342.23 ± 94.17**	160.54 ± 43.12	586.56 ± 151.99*	310.55 ± 60.15
	0.6	33.26 ± 5.75	70.06 ± 4.00	80.31 ± 10.99	147.70 ± 38.68	305.75 ± 71.16***	69.06 ± 4.35	229.50 ± 58.91	20.96 ± 4.40	63.37 ± 7.48*	343.68 ± 87.37***	152.50 ± 45.52	562.42 ± 126.59	441.06 ± 69.94**
	1.5	37.35 ± 8.80	65.95 ± 3.61	87.81 ± 19.03	158.64 ± 32.54	349.50 ± 102.63**	65.40 ± 4.01	249.75 ± 89.03	20.36 ± 7.43	67.08 ± 13.13*	359.51 ± 107.07*	148.49 ± 51.68	587.63 ± 165.77	452.70 ± 78.10**
6	0 (CTR)	31.36 ± 4.39	61.68 ± 5.17	69.36 ± 6.36	151.60 ± 43.10	232.00 ± 36.83	61.18 ± 4.84	178.00 ± 22.75	20.78 ± 2.11	48.28 ± 4.97	233.73 ± 50.33	105.79 ± 23.07	387.80 ± 75.27	348.02 ± 40.50
	0.06	29.70 ± 5.45	72.56 ± 6.23*	70.74 ± 8.90	191.40 ± 37.57	280.00 ± 49.73*	71.48 ± 4.97*	200.00 ± 51.43	23.82 ± 5.76	60.51 ± 9.29*	332.00 ± 82.39*	143.64 ± 57.98	536.15 ± 148.81*	337.34 ± 26.26
	0.3	29.88 ± 1.50	69.72 ± 7.16	71.64 ± 6.21	186.60 ± 22.03	282.00 ± 39.88**	68.78 ± 7.29	194.80 ± 45.62	24.24 ± 7.34	58.94 ± 6.04*	317.14 ± 43.47*	130.96 ± 30.30	509.01 ± 75.59*	311.60 ± 27.68*
	0.6	31.62 ± 3.72	64.08 ± 9.19	73.34 ± 4.91	166.80 ± 32.17	275.80 ± 54.66**	64.38 ± 8.42	191.60 ± 34.46	22.34 ± 2.44	55.64 ± 6.31**	292.90 ± 86.85*	115.19 ± 31.60	463.74 ± 123.89*	398.74 ± 51.47
	1.5	35.76 ± 2.97	60.56 ± 9.74	83.90 ± 10.92	143.00 ± 30.86	296.40 ± 68.22*	59.58 ± 10.13	209.20 ± 60.13	20.52 ± 5.31	60.23 ± 13.57	294.58 ± 95.88	122.54 ± 41.68	477.34 ± 148.28	431.18 ± 58.53*

The results are presented as mean ± standard deviation. $n = 5-8$. The asterisk denotes a statistically significant difference between the samples treated with compounds and control; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Tt—thrombin time. Fmax—maximum clotting. Tf— plasma clotting time. Fvo—initial plasma clotting velocity. Tc—clot stabilization time. Lmax — maximum lysis. Tl — fibrinolysis time. Lvo—initial clot fibrinolysis velocity. Sf—area under the clot formation curve. Sc—area under the curve of a stable clot formation. Sr — area under the fibrinolysis curve. S — overall potential of clot formation and fibrinolysis. T—total time of the process of clot formation and fibrinolysis.

Materiały uzupełniające do Publikacji III

Table S8. The effects of synthesized sulfonamide derivatives of metformin **1**, **3**, **4**, **6** on the process of coagulation after generation of endogenous thrombin (Coagulation Assay).

<i>Parameters</i>								
<i>Comp.</i>	Concentr. [μmol/mL]	TGt [s]	Fmax [%T]	Tf [s]	Fvo [%T/min]	Sf [%T x min]	Sc [%T x min]	S [%T x min]
1	0 (CTR)	177.17 ± 24.96	77.92 ± 4.45	97.78 ± 28.43	119.85 ± 33.03	84.83 ± 26.78	522.56 ± 94.09	1499.60 ± 94.55
	0.06	257.17 ± 57.01**	78.92 ± 5.46	156.28 ± 70.88	79.10 ± 32.18	135.84 ± 57.26	360.36 ± 162.14*	1494.14 ± 121.14
	0.3	277.83 ± 109.61*	74.08 ± 6.69	158.50 ± 80.12	78.30 ± 39.74**	124.89 ± 42.30	350.92 ± 126.12**	1394.67 ± 172.60
	0.6	271.00 ± 31.72**	72.52 ± 5.76**	142.83 ± 57.13	68.95 ± 30.70*	113.46 ± 43.92	319.66 ± 103.57**	1370.60 ± 124.33**
	1.5	299.17 ± 52.78**	71.65 ± 5.47	129.20 ± 30.30***	66.78 ± 24.88***	99.96 ± 22.77	310.10 ± 106.10***	1356.82 ± 100.83*
3	0 (CTR)	194.00 ± 14.35	79.57 ± 8.88	111.77 ± 37.62	121.03 ± 38.44	100.59 ± 28.16	511.05 ± 129.62	1527.90 ± 182.70
	0.06	307.57 ± 91.84*	80.87 ± 7.29	199.46 ± 79.61*	61.80 ± 40.62*	171.36 ± 61.28*	293.97 ± 135.21*	1494.69 ± 160.58
	0.3	336.29 ± 46.69***	78.50 ± 11.77	185.17 ± 66.55*	46.29 ± 25.07**	146.36 ± 51.02	266.91 ± 138.64***	1446.50 ± 228.52
	0.6	354.14 ± 118.93*	75.41 ± 10.63	214.50 ± 90.51*	48.20 ± 41.94**	176.15 ± 82.00	269.02 ± 160.94**	1409.06 ± 209.79*
	1.5	370.29 ± 71.36***	75.07 ± 8.61	226.14 ± 124.87	37.94 ± 15.86**	164.44 ± 84.20	247.76 ± 52.61**	1360.72 ± 183.82*
4	0 (CTR)	155.00 ± 23.74	76.78 ± 2.08	123.94 ± 42.90	148.80 ± 17.48	119.46 ± 47.00	504.39 ± 53.33	1476.15 ± 35.84
	0.06	215.00 ± 38.68*	79.20 ± 0.76	200.60 ± 58.68	87.30 ± 25.46*	193.55 ± 60.06	349.27 ± 76.22*	1492.10 ± 16.81
	0.3	193.80 ± 36.10*	77.64 ± 2.16	179.26 ± 68.34	96.50 ± 34.85	157.28 ± 67.23	388.62 ± 157.93	1503.06 ± 101.75
	0.6	243.00 ± 38.46**	77.02 ± 4.68	166.20 ± 64.35	77.08 ± 35.50*	151.14 ± 46.84	300.09 ± 138.03*	1456.82 ± 106.82
	1.5	271.60 ± 73.75*	73.08 ± 5.25	117.54 ± 33.61	65.24 ± 23.33***	110.51 ± 33.72	312.53 ± 111.68*	1372.99 ± 92.32
6	0 (CTR)	195.40 ± 53.19	82.04 ± 3.82	101.28 ± 20.61	114.34 ± 23.54	93.86 ± 18.88	526.06 ± 53.59	1574.48 ± 74.97
	0.06	251.00 ± 36.97	85.26 ± 4.64	210.40 ± 55.13*	68.00 ± 14.07*	208.47 ± 49.41**	458.43 ± 377.59	1587.42 ± 94.52
	0.3	308.60 ± 53.56*	80.84 ± 5.40	190.40 ± 13.61**	56.58 ± 13.02**	172.10 ± 16.03**	256.06 ± 82.50**	1511.69 ± 92.63
	0.6	302.60 ± 45.64**	82.32 ± 6.48	149.40 ± 35.80*	53.60 ± 9.13**	128.77 ± 32.48	295.66 ± 111.28*	1541.16 ± 128.88
	1.5	328.40 ± 48.15*	70.60 ± 17.18	149.00 ± 18.23*	48.36 ± 12.89**	106.94 ± 30.67	244.96 ± 119.58*	1329.69 ± 310.22

The results are presented as mean ± standard deviation. $n = 5-7$. The asterisk denotes a statistically significant difference between the samples treated with compounds and control; * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$. TGt—thrombin generation time. Fmax—maximum clotting. Tf— plasma clotting time. Fvo—initial plasma clotting velocity. Sf—area under the clot formation curve. Sc—area under the curve of a stable clot formation. S — overall potential of clot formation.

Materiały uzupełniające do Publikacji III

Table S9. The effects of synthesized compounds 1–6 on amidolytic activity of thrombin.

<i>Compound</i>	<i>Concentr.</i> [$\mu\text{mol/mL}$]	<i>A_{max}</i> [mOD]	<i>dA/dt</i> [mOD/min]	<i>T 90</i> [s]	<i>S 90</i>
1	0 (CTR)	141.00 ± 4.85	4.50 ± 0.57	66.64 ± 8.05	4990.00 ± 703.28
	0.3	137.80 ± 9.52	4.43 ± 0.68	68.06 ± 7.28	5532.00 ± 608.13
	0.6	138.60 ± 9.61	4.54 ± 0.86	66.94 ± 9.59	5352.00 ± 500.32
	1.5	130.32 ± 21.07	3.49 ± 0.93*	81.72 ± 12.26**	5852.00 ± 689.11
2	0 (CTR)	133.00 ± 4.30	4.05 ± 0.37	72.14 ± 3.42	5290.00 ± 369.19
	0.3	131.00 ± 8.89	3.94 ± 0.42	71.36 ± 2.28	5156.00 ± 385.98
	0.6	128.20 ± 10.64	4.05 ± 0.56	66.24 ± 10.97	4552.00 ± 995.40
	1.5	128.40 ± 7.86	3.68 ± 1.13	80.20 ± 18.41	5722.00 ± 1439.19
3	0 (CTR)	135.20 ± 5.63	4.57 ± 0.41	63.60 ± 4.52	4668.00 ± 271.70
	0.3	134.00 ± 12.85	4.37 ± 0.76	71.90 ± 5.01*	5688.00 ± 899.51
	0.6	134.00 ± 6.32	4.53 ± 0.65	68.64 ± 11.40	5410.00 ± 1329.14
	1.5	125.80 ± 12.58	3.52 ± 1.10	82.62 ± 14.77	7164.00 ± 1634.96*
4	0 (CTR)	139.00 ± 2.65	4.66 ± 0.49	65.96 ± 7.76	5032.00 ± 713.95
	0.3	140.60 ± 2.19	4.25 ± 0.65	78.56 ± 2.18*	6160.00 ± 289.74*
	0.6	140.80 ± 8.32	4.24 ± 0.29	73.12 ± 3.56	5920.00 ± 721.28
	1.5	139.60 ± 11.93	3.91 ± 0.63	81.76 ± 20.02	6296.00 ± 1588.12
5	0 (CTR)	139.40 ± 5.77	4.28 ± 0.28	71.68 ± 10.91	5336.00 ± 1071.13
	0.3	139.80 ± 7.60	4.17 ± 0.28	72.38 ± 4.71	5504.00 ± 623.88
	0.6	139.80 ± 6.83	3.92 ± 1.02	84.26 ± 20.34	6654.00 ± 1810.34
	1.5	133.60 ± 6.66	3.87 ± 0.37*	74.32 ± 15.33	5664.00 ± 1839.14
6	0 (CTR)	140.60 ± 6.50	4.18 ± 0.35	73.84 ± 3.89	5730.00 ± 167.78
	0.3	133.80 ± 6.76*	3.49 ± 0.14*	83.08 ± 5.05	6138.00 ± 636.22
	0.6	135.40 ± 7.02*	3.53 ± 0.29	87.30 ± 11.84	6622.00 ± 1186.83
	1.5	135.20 ± 2.28	2.81 ± 0.37**	108.74 ± 18.56*	8310.00 ± 1329.17*

The results are presented as mean ± standard deviation; $n = 5-7$. Values in bold are statistically significant in comparison to control samples. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$.

Oświadczenia osoby ubiegającej się o stopień doktora

Oświadczenia autora rozprawy doktorskiej



UNIWERSYTET
MEDYCZNY
W ŁODZI

Łódź, 25.04.2023r.
.....
(miejsowość, data)

mgr farm. Agnieszka Zajda

Zakład Chemii Farmaceutycznej,
Analizy Leków i Radiofarmacji
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

prof. dr hab. n. med. Anna Kilanowicz-Sapota
Przewodnicząca Rady Nauk Farmaceutycznych

OŚWIADCZENIE AUTORA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Ja, niżej podpisana **Agnieszka Zajda** informuję Przewodniczącą Rady Naukowej ds. Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, iż zarówno badania stanowiące podstawę mojej rozprawy doktorskiej, jak i sama praca pt.

„Analiza aktywności biologicznej nowych analogów metforminy o budowie sulfonamidowej”

nie były wcześniej podmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w żadnej wyższej uczelni, instytucie badawczym i/lub jednostce badawczo-rozwojowej.

Świadoma odpowiedzialności prawnej oświadczam, iż niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przeze mnie samodzielnie oraz nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

25.04.2023r., Agnieszka Zajda
.....
(data i podpis)

Oświadczenia autora rozprawy doktorskiej



UNIwersytet
MEDYCZNY
W ŁODZI

Łódź, 25.04.2023r.
.....
(miejsowość, data)

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

mgr farm. Agnieszka Zajda

Zakład Chemii Farmaceutycznej,
Analizy Leków i Radiofarmacji
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż

1. w publikacji „Agnieszka Zajda, Kristiina M. Huttunen, Joanna Sikora, Maria Podsiedlik, Magdalena Markowicz-Piasecka. Is metformin a geroprotector? A peek into the current clinical and experimental data. Mechanisms of Ageing and Development, 2020, 191, 111350.”
<https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111350>,

mój wkład w powstanie powyższej pracy polegał na przeglądzie dostępnej literatury naukowej, graficznej edycji pracy, współudziale w napisaniu i zredagowaniu manuskryptu oraz odpowiedzi na otrzymaną recenzję.

Mój udział procentowy szacuję na 70%.

2. w publikacji „Agnieszka Zajda, Joanna Sikora, Kristiina M. Huttunen, Magdalena Markowicz-Piasecka. Structural comparison of sulfonamide-based derivatives that can improve anti-coagulation properties of metformin. International Journal of Molecular Sciences. 2022, 23, 4132.”
<https://doi.org/10.3390/ijms23084132>,

mój udział w powstaniu powyższej pracy polegał na przeglądzie dostępnej literatury naukowej, współtworzeniu koncepcji i planu pracy, autorstwie manuskryptu oraz wykonaniu części eksperymentalnej – test utylizacji glukozy; pomiar czasu PT, APTT i TT; badanie aktywności antytrombiny III oraz czynnika X; test tworzenia skrzepu i fibrynolizy; test krzepnięcia po generacji

Oświadczenia autora rozprawy doktorskiej

endogennej trombiny. Brałam również udział w opracowaniu, analizie statystycznej i interpretacji osiągniętych wyników. Uczestniczyłam w przygotowaniu odpowiedzi dla Recenzentów oraz tworzeniu korekty manuskryptu.

Mój udział procentowy szacuję na 65%.

3. w publikacji „Agnieszka Zajda, Joanna Sikora, Mira Hynninen, Janne Tampio, Kristiina M. Huttunen, Magdalena Markowicz-Piasecka. Substituent effects of sulfonamide derivatives of metformin that can dually improve cellular glucose utilization and anti-coagulation. *Chemico-Biological Interactions*. 2023, 373, 110381.” <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110381>,

mój wkład w powstanie powyższej pracy polegał na przeglądzie dostępnej literatury naukowej, współtworzeniu koncepcji i planu pracy, autorstwie manuskryptu oraz udziale w wykonaniu części eksperymentalnej – test żywotności oraz badanie morfologiczne komórek HUVEC i AoSMC; badanie integralności komórek HUVEC; test utylizacji glukozy; badanie potencjału błony mitochondrialnej; pomiar czasu PT, APTT i TT; badanie aktywności antytrombiny III oraz czynnika X; test tworzenia skrzepu i fibrynolizy; test krzepnięcia po generacji endogennej trombiny; pomiar aktywności amidolitycznej trombiny; test lizy krwinek czerwonych oraz badanie morfologiczne erytrocytów. Brałam również udział w opracowaniu, analizie statystycznej i interpretacji osiągniętych wyników. Uczestniczyłam w przygotowaniu odpowiedzi dla Recenzentów oraz tworzeniu korekty manuskryptu.

Mój udział procentowy szacuję na 55%.

Agnieszka Zajda

(podpis)

Oświadczenia współautorów publikacji naukowych

Oświadczenia współautorów



UNIWERSYTET
MEDYCZNY
W ŁODZI

.....

(miejsowość, data)

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Dr hab. n. farm. Magdalena Markowicz-Piasecka, prof. uczelni

Zakład Chemii Farmaceutycznej,
Analizy Leków i Radiofarmacji
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż

1. w publikacji „Agnieszka Zajda, Kristiina M. Huttunen, Joanna Sikora, Maria Podsiedlik, **Magdalena Markowicz-Piasecka**. Is metformin a geroprotector? A peek into the current clinical and experimental data. Mechanisms of Ageing and Development, 2020, 191, 111350.”
<https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111350>,

mój wkład w powstanie powyższej pracy polegał na zainicjowaniu tematu pracy przeglądowej, zebraniu części literatury, przygotowaniu planu publikacji oraz kilku podrozdziałów oraz końcowej edycji manuskryptu.

Mój udział procentowy szacuję na 15%.

2. w publikacji „Agnieszka Zajda, Joanna Sikora, Kristiina M. Huttunen, **Magdalena Markowicz-Piasecka**. Structural comparison of sulfonamide-based derivatives that can improve anti-coagulation properties of metformin. International Journal of Molecular Sciences. 2022, 23, 4132.”
<https://doi.org/10.3390/ijms23084132>,

mój udział w powstaniu powyższej pracy polegał na współtworzeniu koncepcji i planu prac, nadzorze nad poprawnością wykonywanych eksperymentów, udziale w opracowywaniu wyników oraz finalnej korekcie manuskryptu i odpowiedziach na recenzje.

Mój udział procentowy szacuję na 15%.

Oświadczenia współautorów

3. w publikacji „Agnieszka Zajda, Joanna Sikora, Mira Hynninen, Janne Tampio, Kristiina M. Huttunen, **Magdalena Markowicz-Piasecka**. Substituent effects of sulfonamide derivatives of metformin that can dually improve cellular glucose utilization and anti-coagulation. *Chemico-Biological Interactions*. 2023, 373, 110381.” <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110381>,

mój wkład w powstanie powyższej pracy polegał na współtworzeniu koncepcji i planu prac, nadzorze nad poprawnością wykonywanych eksperymentów, udziale w opracowywaniu wyników oraz finalnej korekcie manuskryptu i odpowiedziach na recenzje.

Mój udział procentowy szacuję na 15%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. prac przez mgr farmacji Agnieszkę Zajdę jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych. Oświadczam, że samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część prac wskazuje na indywidualny wkład mgr Agnieszki Zajdy w opracowanie koncepcji, wykonanie części eksperymentalnej, opracowanie i interpretację wyników powyższych prac.



Signed by / Podpisano przez:

Magdalena Justyna
Markowicz-Piasecka
Uniwersytet Medyczny
w Łodzi

Date / Data: 2023-04-25

Podpis: 1:22

Oświadczenia współautorów



Łódź, 25.04.2023 r.
(miejsowość, data)

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Dr hab. n. med. Joanna Sikora, Prof. uczelni

Zakład Chemii Bionieorganicznej
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż

1. w publikacji „Agnieszka Zajda, Kristiina M. Huttunen, Joanna Sikora, Maria Podsiedlik, Magdalena Markowicz-Piasecka. Is metformin a geroprotector? A peek into the current clinical and experimental data. Mechanisms of Ageing and Development, 2020, 191, 111350.”
<https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111350>,

mój wkład w powstanie powyższej pracy polegał na konsultacji merytorycznej podczas przygotowywania publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na 5%.

2. w publikacji „Agnieszka Zajda, Joanna Sikora, Kristiina M. Huttunen, Magdalena Markowicz-Piasecka. Structural comparison of sulfonamide-based derivatives that can improve anti-coagulation properties of metformin. International Journal of Molecular Sciences. 2022, 23, 4132.”
<https://doi.org/10.3390/ijms23084132>,

mój udział w powstaniu powyższej pracy polegał na konsultacji merytorycznej podczas przygotowywania publikacji oraz przygotowaniu odpowiedzi na recenzje.

Mój udział procentowy szacuję na 10%.

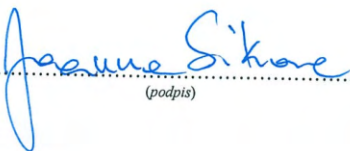
Oświadczenia współautorów



3. w publikacji „Agnieszka Zajda, Joanna Sikora, Mira Hynninen, Janne Tampio, Kristiina M. Huttunen, Magdalena Markowicz-Piasecka. Substituent effects of sulfonamide derivatives of metformin that can dually improve cellular glucose utilization and anti-coagulation. *Chemico-Biological Interactions*. 2023, 373, 110381.” <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110381>,

mój wkład w powstanie powyższej pracy polegał na konsultacji merytorycznej otrzymanych wyników oraz edycji końcowej wersji manuskryptu.

Mój udział procentowy szacuję na 10%.


.....
(podpis)

Oświadczenia współautorów



Kuopio 29.3.2023
.....
(place, date)

STATEMENT OF THE CO-AUTHOR

Kristiina M. Huttunen, PhD

Associate Professor
School of Pharmacy
Faculty of Health Sciences
University of Eastern Finland

STATEMENT

Hereby I declare that

1. at work: Agnieszka Zajda, **Kristiina M. Huttunen**, Joanna Sikora, Maria Podsiedlik, Magdalena Markowicz-Piasecka. Is metformin a geroprotector? A peek into the current clinical and experimental data. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2020, 191, 111350.
<https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111350>,

I participated in critically evaluating and correcting the manuscript.

I estimate my percentage contribution to 5%.

2. at work: Agnieszka Zajda, Joanna Sikora, **Kristiina M. Huttunen**, Magdalena Markowicz-Piasecka. Structural comparison of sulfonamide-based derivatives that can improve anti-coagulation properties of metformin. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, 23, 4132.
<https://doi.org/10.3390/ijms23084132>,

I designed and synthesized the studied compounds, and participated in writing of the manuscript.

I estimate my percentage contribution to 10%.

Oświadczenia współautorów

3. at work: Agnieszka Zajda, Joanna Sikora, Mira Hynninen, Janne Tampio, **Kristiina M. Huttunen**, Magdalena Markowicz-Piasecka. Substituent effects of sulfonamide derivatives of metformin that can dually improve cellular glucose utilization and anti-coagulation. *Chemico-Biological Interactions*. 2023, 373, 110381. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110381>.

I designed and synthesized the studied compounds, participated in writing and correcting the manuscript, and supervised the students (Mira and Janne).

I estimate my percentage contribution to 10%.

 Kristiina Huttunen
.....
(signature)

Oświadczenia współautorów

Łódź, 27.03.2023 r.
.....
(miejsowość, data)

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA

mgr farm. Maria Podsiedlik

Zakład Chemii Farmaceutycznej,
Analizy Leków i Radiofarmacji
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż

w publikacji „Agnieszka Zajda, Kristiina M. Huttunen, Joanna Sikora, **Maria Podsiedlik**, Magdalena Markowicz-Piasecka. Is metformin a geroprotector? A peek into the current clinical and experimental data. Mechanisms of Ageing and Development, 2020, 191, 111350.”

<https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111350>,

mój wkład w powstanie powyższej pracy polegał na przeglądzie literatury oraz przygotowaniu fragmentu publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na 5%.

Maria Podsiedlik
.....
(podpis)

Oświadczenia współautorów



Kuopio 28.3.23
(place, date)

STATEMENT OF THE CO-AUTHOR

Mira Hynninen

School of Pharmacy
Faculty of Health Sciences
University of Eastern Finland

STATEMENT

Hereby I declare that at work:

Agnieszka Zajda, Joanna Sikora, **Mira Hynninen**, Janne Tampio, Kristiina M. Huttunen, Magdalena Markowicz-Piasecka. Substituent effects of sulfonamide derivatives of metformin that can dually improve cellular glucose utilization and anti-coagulation. *Chemico-Biological Interactions*. 2023, 373, 110381. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110381>.

I participated in the HPLC method development and stability studies of new metformin derivatives.

I estimate my percentage contribution to 5%.



(signature)

Oświadczenia współautorów



Kuopio 28.3.2023
(place, date)

STATEMENT OF THE CO-AUTHOR

Janne Tampio

School of Pharmacy
Faculty of Health Sciences
University of Eastern Finland

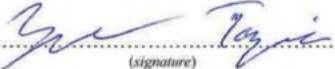
STATEMENT

Hereby I declare that at work:

Agnieszka Zajda, Joanna Sikora, Mira Hynninen, **Janne Tampio**, Kristiina M. Huttunen, Magdalena Markowicz-Piasecka. Substituent effects of sulfonamide derivatives of metformin that can dually improve cellular glucose utilization and anti-coagulation. *Chemico-Biological Interactions*. 2023, 373, 110381. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110381>.

I participated in the student supervision (Mira Hynninen) and the development of the HPLC methods for the novel metformin derivatives.

I estimate my percentage contribution to 5 %.


(signature)

Wykształcenie

2014-2020 – studia magisterskie, kierunek: Farmacja, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Wydział Farmaceutyczny.

Praca magisterska przygotowana w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji pod kierunkiem naukowym dr hab. n. med. Joanny Sikory, prof. uczelni (promotor) oraz dr n. farm. Magdaleny Markowicz-Piaseckiej: „Badania biozgodności nowych sulfonamidowych pochodnych metforminy”, została wyróżniona I miejscem w Wydziałowym Konkursie Prac Magisterskich oraz II miejscem w Ogólnopolskim Konkursie Prac Magisterskich Wydziałów Farmaceutycznych Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego.

Całkowity dorobek naukowy

Autorstwo lub współautorstwo pięciu prac naukowych (jeden artykuł przeglądowy oraz cztery prace eksperymentalne) o łącznym współczynniku **IF = 27.251** oraz punktacji **MEiN = 540** zgodnie z punktacją za rok publikacji artykułów.

1. **Zajda A.**, Sikora J., Hynninen M., Tampio J., Huttunen K., Markowicz-Piasecka M. Substituent effects of sulfonamide derivatives of metformin that can dually improve cellular glucose utilization and anti-coagulation. *Chemico-Biological Interactions*. 2023, 373, 110381, **IF₂₀₂₂ = 5.168; 100 p MEiN₂₀₂₂**.
2. **Zajda A.**, Sikora J., Huttunen K., Markowicz-Piasecka M. Structural comparison of sulfonamide-based derivatives that can improve anti-coagulation properties of metformin. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, 23, 4132, **IF₂₀₂₂ = 6.208; 140 p MEiN₂₀₂₂**.
3. Markowicz-Piasecka M., Huttunen J., **Zajda A.**, Sikora J., Huttunen K. Sulfonamide metformin derivatives induce mitochondrial-associated apoptosis and cell cycle arrest in breast cancer cells. *Chemico-Biological Interactions*. 2022, 352, 109795, **IF₂₀₂₂ = 5.168; 100 p MEiN₂₀₂₂**.
4. **Zajda A.**, Huttunen K., Sikora J., Podsiedlik M., Markowicz-Piasecka M. Is metformin a geroprotector? A peek into the current clinical and experimental data. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2020, 191, 111350, **IF₂₀₂₀ = 5.432; 100 p MEiN₂₀₂₀**.

5. Markowicz-Piasecka M., Sikora J., **Zajda A.**, Huttunen K. Novel halogenated sulfonamide biguanides with anti-coagulation properties. *Bioorganic Chemistry*. 2020, 94:103444, IF₂₀₂₀ = 5.275; 100 p MEiN₂₀₂₀.

Publikacje w czasopismach polskich nieindeksowanych:

1. **Zajda A.** Zastosowanie dostępnych na rynku dawek rosuwastatyny u pacjenta z wysokim i bardzo wysokim ryzykiem chorób sercowo-naczyniowych. *Farmakoekonomika Szpitalna*, 2021, nr 55, s.55-60.
2. **Zajda A.** Profilaktyka odleżyn. *Farmakoekonomika Szpitalna*, 2022, nr 56, s. 25-30.
3. **Zajda A.** Standardy postępowania w profilaktyce przeciwoleżynowej z uwzględnieniem aspektów pielęgniarstwa. *Farmakoekonomika Szpitalna*, 2023, nr 57, s. 36-44.

Komunikaty zjazdowe

1. **Zajda A.**, Markowicz-Piasecka M. Analiza aktywności biologicznej nowych analogów metforminy o budowie sulfonamidowej. I Ogólnopolskie Forum Młodych, Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, Lublin, 2 marca 2023 r., referat ustny.
2. **Zajda A.**, Sikora J., Markowicz-Piasecka M. Właściwości przeciwzakrzepowe nowych sulfonamidowych pochodnych metforminy. XXIV Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, Lublin, 22-24 września 2021 r., poster.
3. **Zajda A.** Badania biogodności nowych sulfonamidowych pochodnych metforminy. III Konferencja Naukowo-Szkoleniowa Studentów Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, 12-13 kwietnia 2019 r, poster.

Nagrody za działalność naukową

1. Wyróżnienie dla autora najlepszej prezentacji ustnej podczas Konferencji „I Ogólnopolskie Forum Młodych”, Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, Lublin (2023 r.).
2. Nagroda II stopnia w Ogólnopolskim Konkursie Prac Magisterskich Wydziałów Farmaceutycznych Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego. Naukowa Fundacja Polpharmy, Warszawa (2021 r.).
3. Nagroda I stopnia w Konkursie Prac Magisterskich - Wydział Farmaceutyczny Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (2020 r.).

Wykształcenie i całkowity dorobek naukowy

4. Nagroda II stopnia w Konkursie Prac Naukowych, III Konferencja Naukowo-Szkoleniowa Studentów Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (2019 r.).

Kursy, szkolenia, certyfikaty

2023 r. Certyfikowany kurs Evidence Based Medicine; Kariera w Farmacji.

2022 r. Certyfikowany kurs Regulatory Affairs Specialist; Kariera w Farmacji.

2022 r. Certyfikowany kurs Pharmacovigilance Specialist; Kariera w Farmacji.

2018 r. Certyfikowany kurs GCP – Dobra Praktyka Kliniczna; Soft Communication.

2018 r. Certyfikowany kurs dla Monitorów i kandydatów na Monitorów Badań Klinicznych - poziom zaawansowany; Soft Communication.

2018 r. Certyfikowany kurs zarządzania danymi z badań klinicznych oraz danymi z pharmacovigilance; MSD.

