



**Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Jaczewskiego 8b, 20-090 Lublin
Telefon sekr.(81) 448 64 50**

Lublin, 31.08.2023

Dr hab. n. med. Zofia Danilczuk, prof. UML

**Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr Grzegorza Kazka
pt. " Wpływ wybranych kompleksów wanadu z ligandami organicznymi na zaburzenia
metaboliczne w modelach *in vitro*"**

wykonanej w Zakładzie Wstępnych Badań Farmakologicznych Katedry Farmakodynamiki,
Wydział Farmaceutyczny Collegium Medicum Uniwersytet Jagielloński w Krakowie
pod kierunkiem dr hab. n. farm. Moniki Papież oraz
dr Anny Jurowskiej

Zaburzenia metaboliczne obejmujące cukrzycę, otyłość czy hipercholesterolemię z towarzyszącym nadciśnieniem, tworzącymi już aktualnie jednostkę kliniczną zwaną zespołem metabolicznym, stanowią szybko narastający problem a koszty leczenia zarówno społeczne jak i indywidualne są ogromne. Cukrzyca charakteryzuje się dużymi stężeniami glukozy we krwi, hiperglikemią spowodowaną niedoborem insuliny, często w połączeniu z insulinoopornością. Cukrzyca typu I , w której stwierdza się bezwzględny niedobór insuliny, dotyczy najczęściej pacjentów młodocianych, natomiast w cukrzycy typu II obserwuje się względny niedobór insuliny z towarzyszącą zmniejszoną na nią wrażliwością określaną jako insulinooporność i może dotyczyć osób w każdym wieku. Hiperglikemia jest następstwem niekontrolowanego uwalniania glukozy przez wątrobę i zmniejszenia wychwytu glukozy przez mięśnie szkieletowe w połączeniu ze zmniejszoną syntezą glikogenu. W wyniku zaburzeń metabolicznych trwających wiele lat dochodzi do rozwoju różnorodnych powikłań cukrzycy, dotyczących chorób naczyń – makroangiopatii obejmujących rozwój miażdżycy i powikłania zakrzepowe, neuropatie nerwów obwodowych czy uszkodzenia nerek (nefropatii cukrzycowej), a także mikroangiopatii m. in. w siatkówce oka. Współistniejące nadciśnienie zwiększa ryzyko uszkodzenia nerek a leczenie spowalnia postęp nefropatii cukrzycowej i zmniejsza ryzyko zawału serca. Poszukiwanie więc skutecznej terapii, w świetle wyżej wymienionych zaburzeń metabolicznych jak również obserwowanych trudno leczących się powikłań, jest ważnym celem badaczy.

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Grzegorza Kazka pt. " Wpływ wybranych kompleksów wanadu z ligandami organicznymi na zaburzenia metaboliczne w modelach *in vitro*" podejmuje badania efektów farmakologicznych nowo zsyntetyzowanych związków wanadu, które potencjalnie mogłyby być stosowane w zaburzeniach metabolicznych.

Przedstawione w niej badania były realizowane w ramach projektu „ Kompleksy wanadu – innowacyjne metalofarmaceutyku w leczeniu cukrzycy”, finansowanego z funduszy Unii Europejskiej w ramach Funduszu Rozwoju Regionalnego – Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka (UDA-

POIG.01.03.01-12-174/09). Część badań została przeprowadzona poza wymienionym projektem, w ramach badań własnych Autora (Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, nr k/ZDS/007134/).

Nowoczesna konstrukcja rozprawy doktorskiej została przygotowana na podstawie patentu międzynarodowego /WO2014073992A1/ i krajowego oraz 5 artykułów oryginalnych, opublikowanych w czasopiśmie o międzynarodowym zasięgu, o wspólnym wskaźniku oddziaływania *impact factor* 10.136. Należy podkreślić, iż w 3 artykułach mgr Grzegorz Kazek jest pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym, a wiodący udział w realizacji części farmakologicznej w patencie międzynarodowym oceniony został na 85%, natomiast w pracach doświadczalnych tworzących opracowanie od 60-70%, potwierdzonym oświadczeniami współautorów. Dodatkowo, dla opracowania tematu rozprawy Doktorant powołuje się na kolejne 5 artykułów oryginalnych, których jest współautorem, o łącznym wskaźniku oddziaływania *impact factor* 14.247. Wszystkie prace powstały w tym samym Zespole badawczym, o uznanej pozycji międzynarodowej.

W przedłożonej rozprawie doktorskiej zamieszczono w kolejności: stronę tytułową, źródła finansowania, spis prac stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, spis treści, oraz zwięzłe opracowanie osiągnięć Doktoranta z odpowiednio zatytułowanymi rozdziałami, które odzwierciedlają klasyczne części dysertacji naukowych. Następnie zamieszczono streszczenia w języku polskim i angielskim oraz spis literatury, cytowanej przy redagowaniu rozprawy oraz dołączono w całości oryginalne prace stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej i oświadczenia współautorów.

W pierwszym rozdziale pt.: „Zarys problematyki i kluczowe potrzeby badawcze uzasadniające podjęcie tematu” mgr Grzegorz Kazek, w oparciu o dobrze dobrane piśmiennictwo, przybliży Czytelnikowi tematykę rozprawy doktorskiej, uzasadniając konieczność poszukiwania nowych związków w leczeniu zaburzeń metabolicznych. Doktorant podkreślił w oparciu o dane Światowej Organizacji Zdrowia z 2016 roku, że cukrzyca jest siódmą najczęstszą przyczyną zgonów na świecie. Brak skutecznej terapii, często wynikającej z oporności stosowanych leków u wielu pacjentów z cukrzycą typu 2, ale również z takimi zaburzeniami metabolicznymi jak: otyłość i rozwijające się w konsekwencji insulinooporność, stan przedcukrzycowy czy niealkoholowe stłuszczenie wątroby, uzasadnia potrzebę poszukiwania nowych skutecznych i bezpiecznych substancji/leków.

Mgr Grzegorz Kazek, wprowadzając Czytelnika w zagadnienia problematyki badawczej, na podstawie licznie zgromadzonej bibliografii, wspomina o 100-letniej tradycji zastosowania związków wanadu w klinice. W przytoczonych przez Doktoranta pozycjach bibliograficznych (np. nr 4) i aktualnej wiedzy medycznej, ok. 100-lat (1899 rok) temu, związki nieorganiczne wanadu były stosowane u kilku pacjentów z cukrzycą oraz u zdrowych osobników ale bez większego sukcesu. To zastosowanie można było uznać za „0” fazę badań klinicznych. Oczywiście, kolejne lata dwudzieste ubiegłego wieku i obecne przyniosły rozwój badań, ale jak dotąd, związki wanadu jako leki, nigdy nie były stosowane w terapii cukrzycy. Ponieważ wiedza powszechna na temat wanadu w porównaniu z innymi pierwiastkami jest niewielka, dodatkowo, interesujące dla Czytelnika byłaby informacja czy związki wanadu występują jako makro- czy mikroelementy w przyrodzie oraz jaka jest ich rola fizjologiczna w organizmie, jakie jest zapotrzebowanie organizmu na ten pierwiastek, czy są obserwowane niedobory i z jakimi objawami związane? Czy były w tym kierunku prowadzone badania?

W dalszej części zarysu problematyki rozprawy Doktorant opisuje, na podstawie literatury, mechanizm działania wanadu i jego związków w odniesieniu do zagadnień cukrzycy i niektórych zaburzeń metabolicznych. Dobrze rozpoznany mechanizm działania molekularnego wanadu jest hamowanie białkowych fosfataz tyrozynowych, zwłaszcza PTP1B, które wydają się kluczowe dla fosforylacji receptora insuliny, przekazywania sygnałów podobnego jak w przypadku działania samej insuliny. Istotnym efektem działania związków wanadu jest aktywowanie transportu glukozy i jej wychwyt przez komórki i narządy docelowe. Związki wanadu są również inhibitorami innych fosfataz, takich jak: SHP1, SHP2 czy LAR, które mają znaczenie w sygnalizacji insulinowej, w wielu szlakach metabolicznych i w czynnikach transkrypcyjnych. Bardzo ważnym i rozpoznany mechanizmem

działania przeciwcukrzycowego związków wanadu, jest aktywacja licznych szlaków sygnałowych i czynników transkrypcyjnych, takich jak: AMPK, PI3K-PKB-GSK-3 β /AKT-mTOR, NF- κ B, MAPK (MEK1/2-ERK) i wzrost ekspresji PPAR γ . W tym miejscu Autor zaznaczył, że wiele stosowanych obecnie leków przeciwcukrzycowych charakteryzuje podobnym mechanizmem działania. Następnie, Doktorant, opisuje dodatkowy wpływ związków wanadu na tkanki docelowe tj. tkankę mięśniową, tłuszczową, wątrobę i trzustkę związane z zaburzeniami metabolicznymi podkreślając, że wiele z tych mechanizmów jest jeszcze niepoznanych.

W dalszej części rozważania, mgr Grzegorz Kazek koncentruje się na opisie trudności w związku z budową i właściwościami w opracowaniu nowych leków opartych na wanadzie.

Następnym etapem rozprawy mgr Grzegorza Kazka jest jasno sformułowany cel badań, który dotyczy oceny aktywności farmakologicznej nowo zsyntetyzowanych związków kompleksowych wanadu w zakresie metabolizmu węglowodanów i lipidów w modelach komórkowych, w kontekście potencjalnego zastosowania w farmakoterapii chorób metabolicznych. Dodatkowo, Doktorant sformułował szczegółowe cele, które dotyczą: 1. oceny przydatności skringingu fenotypowego z użyciem różnych modeli komórkowych w badaniach efektywności farmakologicznej związków wanadu, 2. oceny zależności między strukturą badanych kompleksów wanadu a różnicami w efektach farmakologicznych, jak również istotną, 3. ocenę związków wanadu w innych zaburzeniach metabolicznych, jak: niealkoholowe stłuszczenie wątroby czy insulinooporność, a także ważne 4. ocenę efektów cytotoksycznych wybranych kompleksów wanadu.

W metodyce rozprawy mgr Grzegorz Kazek wskazał na wykorzystane modele doświadczalne i metody eksperymentalne zastosowane w badaniach aktywności farmakologicznej. Doktorant wykorzystał modele komórkowe, które odpowiadają głównym narządom związanym z mechanizmami patogenezy cukrzycy i zaburzeń metabolicznych oraz stanowią docelowe komórki farmakoterapii tych zaburzeń: miocyty, adipocyty, hepatocyty i komórki beta trzustki. Modele te charakteryzuje, co ważne, potwierdzona publikacjami użyteczność w badaniach aktywności farmakologicznej kandydatów na leki. Wykorzystane modele i metody eksperymentalne opisane są szczegółowo w oryginalnych artykułach Autora rozprawy, dlatego po zapoznaniu się z pracami, słuszne będzie nie opisywać ich w recenzji. Należy podkreślić, że dołączone przez Autora podrozdziały w części metodyki badań, tj. „Wybór i optymalizacja metod analitycznych” oraz „Zapewnienie wysokiej jakości wyników” pokazuje jak ogromną ilość starań dołożono w przygotowanie i wykonanie wiarygodnych badań.

W kolejnej części rozprawy wyszczególnionej jako „Zakres i przebieg badań” mgr Grzegorz Kazek przedstawił zwięźle kolejność i rezultaty badań nad aktywnością farmakologiczną 110 kompleksów wanadu, nowo zsyntetyzowanych w Zespole Chemii Koordynacyjnej Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierownictwem doktora Ryszarda Grybosia. Badane związki stanowiły kompleksy wanadu na III, IV i V stopniu utlenienia, należące do różnych grup strukturalnych. Część tych związków, typu ONO (pochodne hydrazonów) zostało opatentowanych i zbadana ich aktywność farmakologiczna w kierunku działania przeciwcukrzycowego. Dalsze badania skringingowe aktywności farmakologicznej 110 związków oraz ocena efektywności badanych kompleksów względem związków o potwierdzonym klinicznie działaniu przeciwcukrzycowym takich jak: rosiglitazon, glibenklamid, metformina czy kompleks wanadu BMOV, opisany w literaturze, pozwoliły na wskazanie najbardziej aktywnych związków do dalszych badań. Te wyniki zawarte zostały w *Artykule I*.

Następnie, Autor, powołując się na kolejne artykuły będące podstawą rozprawy, opisuje osiągnięcia badawcze nad udoskonalaniem budowy strukturalnej wybranych kompleksów wanadu w celu poprawy ich właściwości fizyko-chemicznych a także opisuje badania farmakologiczne, uwzględniając, równie ważne, badania cytotoksyczności. Na uwagę zasługują cenne badania wpływu wybranych związków wanadu w modelu komórkowym niealkoholowej choroby wątroby oraz dodatkowo badania kompleksów ONO na proces różnicowania preadipocytów do adipocytów oraz stymulację zużycia glukozy przez te komórki.

Należy podkreślić, że zgromadzono imponującą ilość wyników, które mgr Grzegorz Kazek przedstawił w postaci kolejnego wyróżnionego rozdziału rozprawy jako „Najważniejsze rezultaty badań i ich znaczenie” w postaci 21 punktów. Doktorant, co jest bardzo cenne, do każdego uzyskanego efektu dodaje swój komentarz i wyjaśnienie, które precyzuje bardzo jasno i dokładnie. Jednocześnie, mgr Grzegorz Kazek zaznacza, że rezultaty zawarte w tym rozdziale są podsumowaniem badań opisanych w *Patencie i Artykułach*, w których znajduje się szerokie omówienie uzyskanych wyników oraz ich dyskusja.

Z tego samego powodu, jako Recenzent rozprawy, której podstawą są prace opublikowane i były już przedmiotem wnikliwej oceny, pozwolę sobie przytoczyć za Autorem najważniejsze badania i osiągnięcia farmakologiczne oraz nasuwające się zapytania związane z opracowanymi wynikami prac.

W pkt nr 7, Autor przytacza rezultaty badań dla niektórych kompleksów wanadu, porównując związki zarówno typu ONO i jak ONS z BMOV w zakresie hamowania fosfataz. Okazało się, że kompleksy obu typów nie wykazały selektywności względem badanych fosfataz tyrozynowych. W tym miejscu nasuwa się pytanie, w jaki sposób dobierano stężenia/dawkę stosowanych kompleksów, bowiem przy dużych stężeniach substancje mogą tracić selektywność względem substratu? Czy Autor mógłby się pokusić o wyjaśnienie tego efektu?

Ciekawe są również wyniki badanych kompleksów ONS i ONO odnośnie hamowania aktywności nietyrozynowych (pkt 8), fosfatazy o podwójnej specyficzności CDC25A i fosfatazy serynowo-treoninowej PPA2, gdyż istotnie, ta różnorodność mechanizmu danych związków niejednokrotnie może być przyczyną działań niepożądanych czy ograniczeń klinicznych.

Przeprowadzono badania siły inhibicji fosfataz tyrozynowych kompleksów wanadu typu ONS w porównaniu do kompleksów typu ONO, w których okazało się, że są one silniejszymi inhibitorami fosfataz ale wykazywały słabszą aktywność w modelach komórkowych, w mniejszym stopniu nasilały zużycie glukozy i transport znakowanej izotopowo [¹⁴C]-deoksy-D-glukozy w miocytach C2C12. W tym miejscu, Doktorant sugeruje, że dla tego efektu istotne znaczenie może mieć struktura liganda organicznego wanadu ale także znaczenie innych mechanizmów wanadu, niezwiązanych z aktywnością fosfataz tyrozynowych.

Wśród kompleksów ONS tylko VC070 zwiększał transport znakowanej glukozy do adipocytów, ale też najsilniejszy wpływ na ten transport w miocytach C2C12. Autor podkreśla, że jedynym aminokwasem wyjściowym różniącym VC070 od innych związków kompleksowych wanadu była leucyna, co sugeruje że kompleks ten może oddziaływać na transporter aminokwasów SLC7A5 (LAT1), który jest głównym transporterem leucyny. W grupie kompleksów wanadu typu ONO: VC032 i VC067 również wzmacniały transport znakowanej glukozy tylko w miocytach, nie wykazując takiej aktywności w adipocytach. Dalsze badania dotyczyły wpływu kompleksów wanadu zarówno typu ONS i ONO na zużycie glukozy przez miocyty C2C12 podczas 24-godzinnej inkubacji, gdzie obserwowano słabszy wpływ od kompleksów typu ONO. Doktorant zaznaczył, że różnice te między tymi kompleksami, zarówno w zużyciu i transporcie glukozy, mogą wynikać z biotransformacji kompleksów i specjacji wanadu. W tym eksperymencie nie obserwowano również efektów cytotoksycznych.

Bardzo interesujące wyniki otrzymano badając wpływ kompleksów wanadu w modelu komórkowym na niealkoholową stłuszczeniową chorobę wątroby. Kompleksy ONS nie wykazywały wpływu na akumulację lipidów podobnie jak porównywany kompleks BMOV. Natomiast dwa kompleksy ONO wykazywały wyraźnie obniżenie ilości wewnątrzkomórkowych lipidów w hepatocytach. Jednakże, wśród wielu kompleksów tej grupy związków obserwowano wzrost akumulacji lipidów w hepatocytach, bez efektu cytotoksycznego, co może wskazywać na hepatotoksyczność odpowiadającą polekowemu stłuszczeniowemu zapaleniu wątroby. Ten efekt niepożądany jest formą uszkodzenia wątroby i jest często obserwowany podczas terapii różnymi farmaceutykami. Doktorant wyjaśniając efekt, wskazał, że obecność bromu w pierścieniach aromatycznych ligandów może

powodować biodehalogenację z możliwością generowania szczególnie reaktywnych metabolitów o działaniu-toksycznym.

Bardzo ważnymi badaniami w wykazaniu skuteczności farmakologicznej kompleksów wanadu w kierunku farmakoterapii zaburzeń metabolicznych były badania inhibicji glukoneogenezy, gdzie wszystkie kompleksy typu ONO i ONS znacznie hamowały ten proces, a niektóre (grupa ONO) wykazując aktywność nieco większą, porównywalną z metforminą. Kompleksy ONO: VC067 i VC068 odwracały upośledzenie transportu znakowanej glukozy do hepatocytów spowodowane hiperinsulinemią oraz insulinoopornością indukowana kwasem oleinowym i czynnikiem prozapalnym TNF.

Dalsze badania z wybranymi kompleksami typu ONS i ONO koncentrowały się wykazaniu wzrostu fosforylacji kinaz AKT i ERK w hepatocytach, które są efektorami molekularnymi insuliny oraz związków wanadu, co potwierdziło mechanizm obu grup wanadu zbieżny z mechanizmami działania insuliny w zakresie szlaków sygnalizacyjnych.

Dla niektórych kompleksów typu ONO, VC048 i VC067 przeprowadzono wstępne badania wpływu na zużycie glukozy w adipocytach 3T3-L1 oraz VC036 na proces różnicowania preadipocytów. Wykazano tu różnice w efektach działania w zależności od struktury kompleksu i jego wpływem na rodzaj i stan komórek.

Kończąc ten rozdział, w ostatnich trzech punktach 19-21, mgr Grzegorz Kazek w przystępny i klarowny sposób podsumował osiągnięcia badawcze, odpowiednio je komentując, w czym po części wyręczył Recenzenta.

Zgromadzone dane są niezmiernie ciekawe i intrygujące, z prawdziwą przyjemnością zapoznałam się z tymi badaniami. Badania farmakologiczne związków wanadu przeprowadzono z użyciem modeli komórkowych, takie badania wstępne są oczywiście bardzo ważne. Istotne będą rezultaty badań tych nowo zsyntetyzowanych związków w aspekcie działania farmakologicznego na cały organizm, gdyż będzie przekładać się na możliwość stosowania w terapii przeciwcukrzycowej. Czy były już może w tym zakresie czynione obserwacje własne?

Gdyby więc Doktorant miał wyróżnić wśród tylu związków te, które są najważniejszymi kandydatami do uznania ich za leki w przyszłości, na jakie związki ze względu na budowę i właściwości przeciwcukrzycowe (oprócz tego już jednego wymienionego-VC068) należy zwrócić uwagę i w pierwszej kolejności badać?

Powyższe uwagi i zapytania w żadnym razie nie umniejszają ogromnej roli osiągnięć badawczych, nowatorskich i wysoce aplikacyjnych.

Stwierdzam, że cel pracy został zrealizowany z należytą starannością uzyskując wiarygodne wyniki, a mgr Grzegorz Kazek, dokonując oceny trudności w syntezy nowych związków, zmiany ich konformacji w budowie a więc poprawiania parametrów fizykochemicznych, które byłyby korzystne dla lepszej farmakokinetyki związków, wykazał dojrzałość w ocenie problemu jako badacz-chemik i farmakolog. W opracowywanych rozdziałach rozprawy i pracach, będących podstawą rozprawy, wykazał się rzetelną wiedzą farmakologiczną, umiejętnością planowania eksperymentów i procedur badawczych, właściwą interpretacją wyników konfrontowanymi z danymi literaturowymi.

Należy podkreślić ogromną rolę i wielką wartość aplikacyjną osiągnięć mgr Grzegorza Kazka w przygotowaniu i realizacji badań, które miały udowodnić przydatność nowo zsyntetyzowanych związków wanadu w terapii zaburzeń metabolicznych. Powyższe badania budzą nadzieję na bardziej skuteczną terapię cukrzycy i innych zaburzeń metabolicznych, wyjaśnienie mechanizmów leżących u podstaw rozwoju tych chorób.

Biorąc pod uwagę dorobek naukowy Mgr Grzegorza Kazka, poparty wykazem bibliograficznym, wysoką ocenę dysertacji ale również udział w pracach doskonałego Zespołu naukowego Wydziału farmaceutycznego i Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie należy mieć pewność co do dobrego przygotowania Doktoranta do samodzielnej pracy naukowej.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Grzegorza Kazka pt. " Wpływ wybranych kompleksów wanadu z ligandami organicznymi na zaburzenia metaboliczne w modelach *in vitro*" spełnia wszystkie kryteria ustawowe stawiane dysertacjom naukowym zgodnie z art.13 ust.1 ustawy z dn. 14 marca 2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz 595, z późn. zm.). W związku z tym wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki farmaceutyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie wniosek o dopuszczenie mgr Grzegorza Kazka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie ze względu na fakt, iż przedstawione w pracy badania są nowatorskie i wnoszą ogromny wkład w poznanie nowych związków, były podstawą opracowanych patentów: międzynarodowego i krajowego oraz zostały opublikowane w bardzo dobrych czasopismach o wysokiej renomie, wnoszę o wyróżnienie niniejszej rozprawy.

Katedra i Zakład Farmakologii
Doświadczalnej i Klinicznej
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
Zofia Danilczuk
dr hab. n. med. Zofia Danilczuk