mgr Grzegorz Kazek

Streszczenie rozprawy doktorskiej:

Wpływ wybranych kompleksów wanadu z ligandami organicznymi na zaburzenia metaboliczne w modelach *in vitro*

Niezmiennie od wielu lat cukrzyca typu 2 jest globalnym, społecznym problemem zdrowotnym, który dotyka około 10% światowej populacji. Znacznie szerszym i wciąż narastającym problemem zdrowotnym w skali globalnej są zaburzenia gospodarki glukozowo-lipidowej z towarzyszącą insulinoopornością, które z czasem mogą prowadzić do pełnoobjawowej cukrzycy typu 2 i innych poważnych konsekwencji zdrowotnych. Jedną z nich jest rozwój niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby (*nonalcoholic fatty liver disease*, NAFLD), która występuje u około 25% populacji i szacuje się, że do 2030 roku będzie ona najczęstszym wskazaniem do przeszczepienia wątroby.

Pomimo szerokiego spektrum dostępnych leków przeciwcukrzycowych, duża część pacjentów ma trudności z uzyskaniem wystarczającej poprawy klinicznej i zmniejszeniem ryzyka powikłań cukrzycy typu 2. Wyjaśnia to dużą liczbę związków ocenianych w badaniach klinicznych. Obecnie nie ma zarejestrowanych farmakoterapii w leczeniu NAFLD, podobnie w „przedcukrzycowych" zaburzeniach metabolicznych, w których postępowanie farmakologiczne nie jest ugruntowane. I choć związki wanadu nie są wymieniane wśród głównych grup farmakoterapeutycznych zaburzeń metabolicznych, ich ponad 100-letnia historia zastosowań klinicznych i liczne dowody z badań przedklinicznych wskazują na potencjał działania przeciwcukrzycowego. Obecnie najbardziej obiecującym kierunkiem badań jest poszukiwanie aktywnych farmakologicznie nowych związków wanadu w postaci jego kompleksów, które posiadają liczne przewagi nad związkami organicznymi.

Celem badań była ocena aktywności farmakologicznej nowo opracowanych i zsyntetyzowanych kompleksów wanadu poprzez badanie ich wpływu na procesy metaboliczne związane z różnymi zaburzeniami metabolizmu glukozy i lipidów, z uwzględnieniem różnych mechanizmów i modeli komórkowych reprezentujących docelowe tkanki działania przeciwcukrzycowego.

We wstępnych, przesiewowych testach przebadano 110 nowo zsyntetyzowanych kompleksów wanadu z różnych grup strukturalnych, które uzyskały międzynarodową ochroną patentową. 93% przebadanych kompleksów wykazało większą aktywność w stymulacji zużycia glukozy przez miocyty C2C12, niż bis(maltolato)oksowanad(IV) (BMOV), metylowy analog bis(etylomaltolato)oksowanadu(IV) (BEOV), którego efektywność przeciwcukrzycowa została potwierdzona w badaniach klinicznych. Około 50% kompleksów wykazało lepszą efektywność niż BMOV w akumulacji lipidów przez adipocyty 3T3-L1 oraz w wydzielaniu insuliny przez komórki beta trzustki RINm5F. Liczne kompleksy wykazały aktywność większą niż związki o potwierdzonej klinicznie efektywności przeciwcukrzycowej, np. glibenklamid, rosiglitazon czy metformina, przy braku efektów cytotoksycznych. Zidentyfikowano kompleksy wanadu o wysokiej aktywności farmakologicznej posiadające dodatkowo zróżnicowany profil aktywności wobec użytych modeli komórkowych.

W ramach badań po raz pierwszy przedstawiono opis syntezy i charakterystykę fizyko-chemiczną nowych kompleksów wanadu(V) typu ONS z tioanilidowymi pochodnymi

aminokwasów, które poddano poszerzonym badaniom aktywności farmakologicznej. Kompleksy te wykazały inhibicję ludzkich białkowych fosfataz tyrozynowych (PTP1B, LAR, SHP1 i SHP2) w zakresie submikromolarnym, a także hamowanie fosfataz nietyrozynowych (CDC25A i PPA2), podobnie do kompleksu BMOV. Kompleksy typu ONS zwiększały transport znakowanej radioaktywnie [14C]-deoksy-D-glukozy do miocytów C2C12, a jeden z nich, VC070, również nasilał ten transport w adipocytach 3T3-L1. Kompleksy te hamowały glukoneogenezę w hepatocytach HepG2, ale żaden z nich nie zmniejszał akumulacji lipidów w modelu NAFLD w tych samych komórkach. W porównaniu z badanymi równolegle, również nowo zsyntezowanymi kompleksami wanadu typu ONO z aldehydem 5-bromosalicylowym i podstawionymi benzhydrazydami jako składnikami ligandów typu zasady Schiffa, kompleksy ONS wykazywały silniejsze hamowanie białkowych fosfataz tyrozynowych, ale kompleksy ONO wykazały na ogół większą aktywność w modelach komórkowych. Kompleksy z tej grupy hamowały wątrobową glukoneogenezę oraz akumulację lipidów w hepatocytach HepG2, w modelu NAFLD. Ponadto większość aktywnych kompleksów z obu grup wykazała w użytych modelach lepsze efekty niż kompleks BMOV. Kompleksy z obu grup aktywowały szlaki sygnałowe AKT i ERK w hepatocytach w porównywalnym stopniu. Jeden z kompleksów typu ONO, VC068, wykazał aktywność we wszystkich powyższych modelach, a także zwiększał zużycie glukozy w miocytach C2C12 oraz odwracał upośledzenie transportu [14C]-deoksy-D-glukozy do hepatocytów HepG2 wywołane insulinoopornością.

Wybrany, reprezentatywny kompleks typu ONO, VC036, nasilał proces adipogenezy w adipocytach 3T3-L1 w znacząco większym stopniu niż rosiglitazon. Jednakże nie wpływał on na redukcję wewnątrzkomórkowej zawartości lipidów w adipocytach już zróżnicowanych, o dużej zwartości lipidów. W badaniach zużycia glukozy przez te komórki kompleks VC067 nie wykazał aktywności, w przeciwieństwie do kompleksu VC048, pomimo wysokiej inhibicji PTP1B przez te kompleksy należące do grupy ONO.

Zidentyfikowano różnice w aktywności zarówno całych grup kompleksów ONO i ONS, jak i różnice w aktywności kompleksów w obrębie danej grupy oraz wskazano na niektóre cechy strukturalne, które wiązać się mogą z tymi efektami. Zaobserwowane różnice w efektywności kompleksów ONS i ONO w różnych modelach i mechanizmach komórkowych mogą wynikać ze specyficznego lub selektywnego działania tych kompleksów, zależnie od tkanki reprezentowanej przez zastosowany model komórkowy. W świetle uzyskanych wyników wydaje się jednak, że zróżnicowanie to może być determinowane raczej stanem metabolicznym, strukturalnym czy fenotypowym, niż samym typem komórek oraz interakcją struktur kompleksów.

Liczba nowo opracowanych i przebadanych w ramach badań kompleksów wanadu oraz szeroki zakres użytych modeli eksperymentalnych pozwolił na uzyskanie znaczących wyników w odniesieniu do obecnego stanu wiedzy. Rezultaty badań stanowią mocną podstawę do dalszego rozwoju badań nad selektywnym lub specyficznym działaniem nowych kompleksów wanadu, co może pomóc w opracowaniu kompleksów o ulepszonych właściwościach farmakologicznych w zaburzeniach metabolicznych. Wydaje się to ważne również wobec wzrastającej liczby badań nad kompleksami wanadu i coraz to nowych możliwości ich zastosowania, także w innych obszarach terapeutycznych.

Grzegorz Kazek, MSc

Summary of the doctoral dissertation:

Effect of selected vanadium complexes with organic ligands on metabolic disturbances in *in vitro* models

Invariably, for years, type 2 diabetes has been described as a global, social health problem, affecting approximately 10% of the world's population. A much broader and still growing health problem on a global scale consists in disorders of glucose and lipid metabolism with accompanying insulin resistance, which can lead to symptomatic type 2 diabetes and other serious health consequences. Among these consequences is the nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), which affects about 25% of the population, and it is estimated to become the most common indication for liver transplantation by 2030.

Despite the availability of a wide range of antidiabetic drugs, a large proportion of patients struggle to achieve sufficient clinical improvement and reducing the risk of complications associated with T2D. This explains the high number of compounds being evaluated in clinical trials. Currently, there are no approved pharmacotherapies for treating NAFLD or metabolic disorders associated with prediabetic conditions, as pharmacological interventions in this area are not well-established. While vanadium compounds are not considered primary pharmacotherapeutic options for metabolic disorders, their over 100-year history of clinical applications and numerous preclinical evidence suggest their potential in antidiabetic action. Currently, the most promising direction of research is the search for pharmacologically active new vanadium compounds in the form of their complexes, which have several advantages over organic compounds.

The aim of the study was to evaluate the pharmacological activity of newly developed and synthesized vanadium complexes by studying their effects on metabolic processes related to various disruptions in glucose and lipid metabolism. This evaluation considered diverse mechanisms and cell models that represent target tissues for antidiabetic effects.

The preliminary screening involved the examination of 110 newly synthesized vanadium complexes from various structural groups, which have obtained international patent protection. 93% of the tested complexes showed higher activity in stimulating glucose uptake by C2C12 myocytes compared to bis(maltolato)oxovanadium(IV) (BMOV) and its methyl analogue bis(ethylmaltolato)-oxovanadium(IV) (BEOV), which have demonstrated antidiabetic efficacy in clinical studies. Approximately 50% of the complexes showed better efficiency than BMOV in lipid accumulation by 3T3-L1 adipocytes and insulin secretion by RINm5F pancreatic beta cells. Numerous complexes exhibited greater activity than clinically confirmed antidiabetic compounds such as glibenclamide, rosiglitazone, or metformin, without cytotoxic effects. Vanadium complexes with high pharmacological activity were identified, exhibiting diverse activity profiles across the used cell models.

As part of the research, the synthesis and physicochemical characteristics of new vanadium(V) complexes of the ONS type with thioanilide derivatives of amino acids were described for the first time. These complexes were subjected to extensive pharmacological activity studies. The

complexes exhibited inhibition of human protein tyrosine phosphatases (PTP1B, LAR, SHP1, and SHP2) in the submicromolar range, as well as inhibition of non-tyrosine phosphatases (CDC25A and PPA2), similar to the BMOV complex. The ONS-type complexes increased the transport of radiolabeled [14C]-deoxy-D-glucose into C2C12 myocytes. Specifically, VC070, one of the ONS complexes, also enhanced this transport in 3T3-L1 adipocytes. These complexes inhibited gluconeogenesis in HepG2 hepatocytes, but none of them reduced lipid accumulation in a non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) model in the same cells. Compared to the simultaneously tested newly synthesized vanadium complexes of the ONO type with 5-bromosalicylaldehyde and substituted benzhydrazides as ligand components of Schiff base type, the ONS complexes exhibited stronger inhibition of protein tyrosine phosphatases. However, the ONO complexes generally showed higher activity in cellular models. Complexes from ONO group inhibited hepatic gluconeogenesis and lipid accumulation in HepG2 hepatocytes in the NAFLD model. Furthermore, most of the active complexes from both groups showed better effects in the used models than the BMOV complex. Complexes from both groups activated AKT and ERK signaling pathways in hepatocytes to a comparable extent. One of the ONO-type complex, VC068, exhibited activity in all the aforementioned models and also increased glucose consumption in C2C12 myocytes. It also reversed the impaired transport of [14C]-deoxy-D-glucose into HepG2 hepatocytes caused by insulin resistance.

The selected representative ONO-type complex, VC036, significantly enhanced adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes to a greater extent than rosiglitazone. However, this complex did not affect the reduction of intracellular lipid content in fully differentiated adipocytes with high lipid content. In glucose consumption tests conducted on these cells, the VC067 complex showed no activity, unlike the VC048 complex, despite both ONO-type complexes having a high inhibition of PTP1B.

Differences in the activity were identified both between the entire groups of ONO and ONS complexes and within each group. Certain structural characteristics were also indicated to be associated with these effects. The observed differences in the effects of ONS and ONO complexes in different models and cellular mechanisms may stem from the specific or selective actions of these complexes, depending on the tissue represented by the cellular model used. However, based on the obtained results, it appears that this diversity may be determined more by the metabolic, structural, or phenotypic state rather than the cell type itself and the interaction of complex structures.

The significant number of newly developed and examined vanadium complexes and the diverse experimental models employed in this study have yielded substantial findings that contribute to the current state of knowledge. These research results provide a solid basis for future investigations into the selective or specific actions of new vanadium complexes, which can aid in the development of complexes with improved pharmacological properties for metabolic disorders. This is particularly important given the expanding body of research on vanadium complexes and their potential application in other therapeutic areas.