

UNIwersytet Jagielloński

Collegium Medicum



Autoreferat przedstawiający opis osiągnięć naukowych

Monika Kubacka

KATEDRA FARMAKODYNAMIKI

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY

UNIwersytet Jagielloński Collegium Medicum

KRAKÓW 2019

Spis treści

1. Imię i Nazwisko.....	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	3
4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.) stanowiących podstawę habilitacji.....	4
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego.....	4
4.2. Wykaz prac stanowiących podstawę habilitacji.....	4
4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania - prezentacja wyników stanowiących podstawę habilitacji.....	6
4.3.1. Wprowadzenie.....	6
4.3.2. Cel pracy.....	12
4.3.3. Wyniki badań i dyskusja.....	18
4.3.4. Podsumowanie.....	41
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo badawczych.....	43
5.1. Aktywność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora.....	43
5.2. Aktywność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora.....	45
5.3. Podsumowanie całego dorobku naukowego.....	51
6. Piśmiennictwo.....	52

1. Imię i nazwisko

Monika Kubacka

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

2010 doktor nauk farmaceutycznych - Katedra Farmakodynamiki, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

Tytuł rozprawy doktorskiej: „**Badania farmakologiczne wybranych pochodnych piperazyny o potencjalnym działaniu krążeniowym**”

Promotor: prof. dr hab. Barbara Filipek

Praca została wyróżniona przez Radę Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie

2002 magister farmacji - Katedra Farmakodynamiki, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

Tytuł pracy magisterskiej: ”Ocena wpływu na układ sercowo-naczyniowy nowych chiralnych i achiralnych ksantonowych aminoalkoholi”

Promotor: prof. dr hab. Ryszard Czarmecki

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

01.10.2011 – obecnie; **adiunkt** - Katedra Farmakodynamiki, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

01.10.2002 – 30.09.2011 **asystent** - Katedra Farmakodynamiki, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

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

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Przedmiotem istotnego osiągnięcia naukowego, będącego podstawą ubiegania się o stopień doktora habilitowanego jest powiązany tematycznie cykl **pięciu** publikacji zatytułowanych:

„Wpływ nowych ligandów receptorów α_1 - i β -adrenergicznych na układ krążenia ze szczególnym uwzględnieniem ich efektów hemodynamicznych oraz plejotropowych”

Cykl obejmuje 5 oryginalnych artykułów pełnotekstowych, opublikowanych w anglojęzycznych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, posiadających *impact factor*. Zgodnie z analizą bibliometryczną łączny współczynnik *impact factor* cyklu wynosi **IF = 16,135** a odpowiadająca mu punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego to **135** punktów. We wszystkich pracach jestem pierwszym autorem a mój średni udział procentowy w prezentowanych publikacjach wynosi **71 %**

4.2. Wykaz prac stanowiących podstawę habilitacji

H1 - **Monika Kubacka**, Grzegorz Kazek, Magdalena Kotańska, Barbara Filipek, Anna Maria Waszkielewicz, Szczepan Mogilski. Anti-aggregation effect of aroxyalkyl derivatives of 2-methoxyphenylpiperazine is due to their 5-HT_{2A} and α_2 -adrenoceptor antagonistic properties. A comparison with ketanserin, sarpogrelate, prazosin, yohimbine and ARC239. *Eur J Pharmacol.* 2018 Jan 5;818:263-270.

(Elsevier; IF₂₀₁₈ = 3.04; MNiSW₂₀₁₈ = 30 pkt)

H2 – **Monika Kubacka**, Magdalena Kotańska, Grzegorz Kazek, Anna Maria Waszkielewicz, Henryk Marona, Barbara Filipek, Szczepan Mogilski. Involvement of the NO/sGC/cGMP/K⁺ channels pathway in vascular relaxation evoked by two non-quinazoline α 1-adrenoceptor antagonists. *Biomed Pharmacother.* 2018 Jul;103:157-166.

(Elsevier; IF₂₀₁₈ = 3.457; MNiSW₂₀₁₈ = 25 pkt)

H3 - **Monika Kubacka**, Monika Zadrożna, Barbara Nowak, Magdalena Kotańska, Barbara Filipek, Anna Maria Waszkielewicz, Henryk Marona, Szczepan Mogilski. Reversal of cardiac, vascular and renal dysfunction by non-quinazoline α 1-adrenolytics in DOCA-salt hypertensive rats; a comparison with prazosin, a quinazoline based α 1-adrenoceptor antagonist. *Hypertens Res.* 2019 Mar 12. doi: 10.1038/s41440-019-0239-1.

(Springer Nature; IF₂₀₁₉ = 3.439; MNiSW₂₀₁₉ = 25 pkt)

H4 - **Monika Kubacka**, Magdalena Kotańska, Małgorzata Szafarz, Krzysztof Pocięcha, Anna Maria Waszkielewicz, Henryk Marona, Barbara Filipek, Szczepan Mogilski. Beneficial effects of non-quinazoline α 1-adrenolytics on hypertension and altered metabolism in fructose-fed rats. A comparison with prazosin. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2019, <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2019.04.003>.

(Elsevier; IF₂₀₁₉ = 3.318; MNiSW₂₀₁₉ = 30 pkt)

H5 – **Monika Kubacka**, Natalia Szkaradek, Szczepan Mogilski, Katarzyna Pańczyk, Agata Siwek, Anna Gryboś, Barbara Filipek, Paweł Żmudzki, Henryk Marona, Anna Maria Waszkielewicz. Design, synthesis and cardiovascular evaluation of some aminoisopropanoloxo derivatives of xanthone. *Bioorg Med Chem.* 2018 Jul 30;26(13):3773-3784.

(Elsevier; IF₂₀₁₈ = 2.881; MNiSW₂₀₁₈ = 25 pkt)

4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania - prezentacja wyników stanowiących podstawę habilitacji

4.3.1. Wprowadzenie

Zaburzenia metaboliczne wraz z nadciśnieniem, leżące u podstaw pozostałych schorzeń układu krążenia wiążą się ze zwiększonym ryzykiem przedwczesnej śmierci z przyczyn sercowo-naczyniowych [1,2]. Nadciśnienie tętnicze jest wieloczynnikowym zaburzeniem hemodynamicznym, wywołanym patologicznymi zmianami mechanizmu kontroli ciśnienia krwi. Około 90% przypadków nadciśnienia ma charakter samoistny, a jego przyczyny upatruje się w rozmaitych czynnikach środowiskowych i genetycznych, które manifestują się m.in. podwyższoną aktywnością układu współczulnego oraz układu renina-angiotensyna-aldosteron. Z kolei najistotniejszym czynnikiem patogenetycznym wywołującym stymulację adrenergiczną a w konsekwencji nadciśnienie tętnicze jest otyłość brzuszna i hiperinsulinemia [3,4,5].

Długotrwale utrzymujące się, nieleczone nadciśnienie tętnicze prowadzi do powikłań narządowych, obejmujących przede wszystkim serce, naczynia tętnicze oraz nerki. Uszkodzenie tych narządów prowadzi w dalszej kolejności do rozwoju niewydolności serca, zawału serca, niewydolności nerek, udaru mózgu [2,3].

Na przestrzeni ostatniej dekady pojawiło się pojęcie zespołu metabolicznego, określanego jako współistnienie powiązanych ze sobą czynników ryzyka, które wybitnie przyczyniają się do rozwoju chorób sercowo-naczyniowych o podłożu miażdżycowym oraz cukrzycy typu 2. Zalicza się tu otyłość centralną i insulinooporność a także upośledzoną tolerancję glukozy, hipertriglicydemię oraz podwyższone ciśnienie tętnicze [6].

Kluczowe dla rozwoju nadciśnienia i zespołu metabolicznego wydają się być otyłość brzuszna i insulinooporność. U pacjentów z otyłością brzuszną ma miejsce zatrzymanie sodu i wody w organizmie z jednoczesnym zwiększeniem objętości wewnątrznaczyniowej co prowadzi do rozwoju nadciśnienia w wyniku przeciążenia objętościowego [5,7]. Ponadto, zarówno nadciśnienie jak i zaburzenia metaboliczne cechują się występowaniem podobnych, wzajemnie powiązanych elementów w patogenezie; uszkodzenia śródbłonka, zmniejszonej biodostępności tlenu azotu, aktywacji układu współczulnego, układu renina-angiotensyna-aldosteron, czy przewlekłego zapalenia ogólnoustrojowego o słabym nasileniu. Ponadto,

zespół metaboliczny z reguły wywołuje zmiany w stężeniu i aktywności różnych czynników procesów agregacji i krzepnięcia, co związane jest ze zmniejszeniem biodostępności tlenu azotu i z nasileniem stresu oksydacyjnego oraz nadwrażliwością na katecholaminy [2,5,6,8].

Zarówno nadciśnienie jak i zaburzenia metaboliczne, ze względu na złożoną i wieloczynnikową patogenezę zwykle nie odpowiadają na monoterapię i wymagają leczenia kilkoma lekami o różnych punktach uchwytu [1,9,10]. W leczeniu nadciśnienia tętniczego u osób z zespołem metabolicznym korzystne wydaje się być stosowanie leków niepowodujących zwiększenia insulinooporności, takich jak leki wpływające na układ renina-angiotensyna-aldosteron czy hamujące aktywność układu adrenergicznego, o korzystnym wpływie na profil lipidowy i gospodarkę węglowodanową, o jednoczesnym działaniu antyagregacyjnym i poprawiającym funkcję śródbłonna [6,7].

Ze względu na rolę układu współczulnego w rozwoju zaburzeń metabolicznych, nadciśnienia i jego powikłań (udar mózgu, zawał serca, arytmie, niewydolność serca) leki modulujące aktywność układu sympatycznego mają już ugruntowaną pozycję w farmakoterapii chorób układu sercowo-naczyniowego [4,11]. Początkowo stosowano leki działające ośrodkowo sympatykolitycznie takie jak klonidyna czy metyldopa. Natomiast przełomem było wprowadzenie w latach 70-tych ubiegłego stulecia do leczenia chorób sercowo-naczyniowych leków blokujących receptory β -adrenergiczne [11]. Zgodnie z najnowszymi wytycznymi beta-blokery są stosowane przede wszystkim u pacjentów po przebytych zawale mięśnia sercowego, z niewydolnością serca oraz z chorobą niedokrwioną serca i towarzyszącym nadciśnieniem. Mimo wysokiej skuteczności beta-blokery I i II generacji zwiększają insulinooporność oraz zmniejszają termogenezę, co przyczynia się do pogłębienia istniejących zaburzeń metabolicznych [3,7]. Pod tym względem najkorzystniejsze wydają się być beta-blokery III generacji, z dodatkową komponentą naczyniorozszerzającą, wśród których największe znaczenie ma karwedilol o dodatkowym działaniu α_1 -adrenolitycznym oraz nebiwolol, o dodatkowym działaniu zwiększającym uwalnianie tlenu azotu [7,12,13]. Związki takie jak karwedilol lub nebiwolol nie pogłębiają zaburzeń gospodarki lipidowej i węglowodanowej, przeciwnie, istnieją doniesienia o ich korzystnym wpływie na insulinooporność i poprawie wrażliwości tkanek na insulinę. Ponadto, substancje te cechuje dodatkowe działanie antyoksydacyjne (karwedilol) oraz antyagregacyjne (nebiwolol), co ma również istotne znaczenie w kontekście ich wpływu na homeostazę układu krążenia [12,14].

Leki α_1 -adrenolityczne wprowadzono do leczenia na przełomie lat 70/80 ubiegłego stulecia. Były to związki zawierające w swojej strukturze układ chinazoliny: prazosyna (1976), terazosyna (1987). Nieco później wprowadzono do terapii doksazosynę (1991). W farmakoterapii nadciśnienia stosowany jest ponadto urapidyl, zaliczany do pochodnych fenylopiperyminy. Najnowsze α_1 -adrenolityki to związki o działaniu przede wszystkim uroselektywnym, stosowane w leczeniu łagodnego przerostu prostaty [15,16].

Podstawowy mechanizm działania leków α_1 -adrenolitycznych polega na blokadzie receptorów α_1 -adrenergicznych, sprzężonych z białkiem Gq i z układem sygnalizacyjnym, wykorzystującym jony Ca^{2+} , co warunkuje ich pobudzający charakter i zdolność do aktywacji mitogennych odpowiedzi oraz regulacji procesów wzrostu i proliferacji. Skurcz naczyń odbywa się przede wszystkim za pośrednictwem receptorów α_1 -adrenergicznych co ma kluczowe znaczenie w regulacji przepływu krwi, oporu obwodowego i ciśnienia tętniczego. W przypadku zmian miażdżycowych w naczyniach wieńcowych działanie naczyniokurczące amin katecholowych poprzez receptory α_1 -adrenergiczne jest nasilone a wraz z rozwojem nadciśnienia zwiększa się wrażliwość naczyń na działanie amin katecholowych poprzez te receptory [17].

Niewątpliwą zaletą leków α_1 -adrenolitycznych jest fakt iż powodują one, w przeciwieństwie do większości leków hipotensyjnych, spadek frakcji LDL cholesterolu, a także poprawiają wrażliwość tkanek na insulinę i metabolizm glukozy. Ich stosowanie może poprawić profil metaboliczny u pacjentów z nadciśnieniem i towarzyszącą cukrzycą [1,9,10].

Badania kliniczne wskazują na znaczące działanie hipotensyjne leków α_1 -adrenolitycznych oraz na ich potencjalną zdolność do cofania przerostu lewej komory serca [17]. Jednak nie we wszystkich badaniach klinicznych wykazano wymierne korzyści związane z blokadą receptorów α_1 -adrenergicznych przy użyciu dostępnych obecnie leków. W badaniu ALLHAT stosowanie doksazosyny związane było ze zwiększonym ryzykiem zastoinowej niewydolności krążenia. Przyczyną tego zjawiska mógł być fakt, iż antagoniści receptorów α_1 -adrenergicznych tacy jak prazosyna i doksazosyna wykazują działanie proapoptotyczne i nekrotyczne i w tym mechanizmie mogą indukować apoptozę kardiomiocytów [9,18,19]. Działanie proapoptotyczne tych substancji jednak nie jest związane z blokadą receptorów α_1 -adrenergicznych, a wynika z obecności układu chinazolinowego w ich cząsteczkach, co wykazano w licznych badaniach [18,19,20,21]. Związki takie jak metylourapidyl, tamsulozyna czy fenoksybenzamina nie indukowały apoptozy w podobnych warunkach.

Natomiast chinazolinowe α_1 -adrenolityki (prazosyna i doksazosyna) badane są obecnie pod kątem ich zastosowania w chorobach nowotworowych, m. in. w raku prostaty, pęcherza moczowego czy w raku piersi [18,19,20,21]. W farmakoterapii układu sercowo-naczyniowego przez wiele lat stosowane były przede wszystkim chinazolinowe α_1 -adrenolityki takie jak prazosyna i doksazosyna. Jednakże, obecność w ich strukturze układu chinazoliny mogła zmniejszać korzystne efekty wynikające z blokady receptorów α_1 -adrenergicznych.

W świetle złożonej patofizjologii zespołu metabolicznego i nadciśnienia; jednostek chorobowych których odpowiednia kontrola w dalszym ciągu, pomimo wielu dostępnych leków, stanowi duży problem terapeutyczny [10,22] poszukiwania nowych substancji o działaniu hipotensyjnym wśród ligandów receptorów adrenergicznych, o lepszym profilu działania i większym bezpieczeństwie są całkowicie uzasadnione.

Badania nad nowymi skutecznymi związkami hipotensyjnymi, o korzystniejszym profilu działania wśród ligandów receptorów α_1 -adrenergicznych prowadzone były zatem w grupach związków nie zawierających układu chinazoliny. Związki takie mogą wykazywać korzystny wpływ na układ sercowo-naczyniowy związany z działaniem α_1 -adrenolitycznym, a zarazem być pozbawione wad typowych dla chinazolinowych α_1 -adrenolityków, szczególnie działania proapoptotycznego.

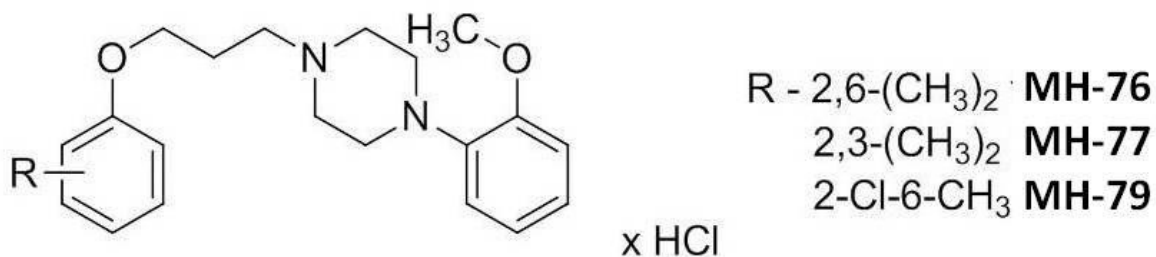
Efektom poszukiwań w grupie aroksyalkilowych pochodnych (2-metoksyfenylo)piperazyny, było wyselekcjonowanie związków **MH-76** (Chlorowodorek 1-(3-(2,6-dimetylofenoksy)propylo)-4-(2-metoksyfenylo)-piperazyny), **MH-77** (Chlorowodorek-1-(3-(2,3-dimetylofenoksy)propylo)-4-(2-metoksyfenylo)-piperazyny) i **MH-79** (Chlorowodorek 1-(3-(2-chloro-6-metylofenoksy)propylo)-4-(2-metoksyfenylo)-piperazyny) (Rys.1) o szczególnie korzystnym profilu działania:

- Badania radioreceptorowe oraz biofunkcjonalne wykazały, że substancje te silnie wiążą się z receptorami α_1 -adrenergicznymi oraz są ich kompetycyjnymi antagonistami ($K_i\alpha_1 \approx 2$ nM, $pA_2 = 8.801-8.534$), wykazując przy tym znaczącą selektywność α_1/α_2 (MH-76, MH-79). W przypadku związku MH-77 selektywność α_1/α_2 była niewielka [B4]

- Badania biofunkcjonalne wykazały również iż związki MH-76 i MH-79 silniej blokują receptory α_{1A} - oraz α_{1D} -adrenergiczne, a nieco słabiej (ok. 20x) wiążą się z receptorami α_{1B} -adrenergicznymi [B5]
- Substancje MH-76 i MH-79 cechuje wysokie powinowactwo i aktywność agonistyczna w stosunku do receptorów 5-HT_{1A} ($K_i \approx 0.5-10$ nM) [B14]
- Związki MH-77 i MH-79 cechują się wysokim powinowactwem oraz aktywnością antagonistyczną w stosunku do receptorów 5-HT_{2A} ($K_i \approx 36-160$ nM) [B14].

Ponadto związki MH-76 i MH-79 charakteryzuje:

- Znacząca aktywność przeciwarrytmiczna, w modelu arytmii adrenergicznej *iv* i *po* oraz wywołanej okluzją i reperfuzją tętnicy wieńcowej; badane związki przewyższały siłą działania takie substancje jak propranolol, chinidyna czy urapidyl [B6]
- Brak wpływu na zapis EKG, zarówno w przypadku izolowanego serca jak i *in vivo*, również w wysokich dawkach. Nie obserwowano zmian w czasie trwania odcinka PQ, zespołu QRS oraz, co najważniejsze, odstępu QT [B6]
- Długotrwała i dawkozależna aktywność hipotensyjna po podaniu jednokrotnym *iv* i *po*, bez wywoływania tachykardii kompensacyjnej [B5]
- **brak efektów cytotoksycznych** w wysokim stężeniu 10 μ M na izolowanych kardiomiocytach mysich (HL-1). Chinazolinowe α_1 -adrenolityki w analogicznym stężeniu 10 μ M wykazywały odmienne efekty: prazosyna zmniejszała liczbę żywych kardiomiocytów, zwiększała przepuszczalność błon i zwiększała stężenie wewnątrzkomórkowego wapnia. Z kolei doksazosyna zmniejszała wielkość jąder komórkowych i zwiększała kondensację chromatyny. Ponadto, doksazosyna nasilała aktywność kaspaz 3 i 7, co może wskazywać na inicjację procesu apoptozy. Testowany również urapidyl, podobnie jak związki MH-76 i MH-79 nie wykazywał wpływu cytotoksycznego ani nie zaburzał innych parametrów życiowych izolowanych kardiomiocytów mysich (wyniki w trakcie publikacji).



Rys. 1. Wzory chemiczne związków MH-76, MH-77, MH-79

Związki MH-76, MH-77, MH-79 to aroksyalkilowe pochodne 2-metoksyfenylopiperyliny i mogą być rozpatrywane jako analogi urapidylu, który również w swojej strukturze zawiera układ 2-metoksyfenylopiperyliny, a jego mechanizm działania hipotensyjnego, podobnie jak wyselekcjonowanych związków opiera się na blokadzie postsynaptycznych receptorów α_1 -adrenergicznych oraz ośrodkowej regulacji ciśnienia tętniczego i napięcia układu sympatycznego w wyniku aktywacji receptorów 5-HT_{1A} [B5, B14].

Wyselekcjonowane związki mogą okazać się niezwykle korzystne do leczenia czy cofania powikłań krążeniowych i metabolicznych; jako antagoniści receptorów α_1 -adrenergicznych będą zmniejszać opór obwodowy i obciążenie wstępne i następcze serca, powodować spadek triglicerydów oraz poprawiać wrażliwość tkanek na insulinę i metabolizm glukozy. Niewykluczone, iż nowe, niechinazolinowe ligandy receptorów α_1 -adrenergicznych mają olbrzymi potencjał terapeutyczny, zachowując korzystne cechy α_1 -adrenolityków, a będąc pozbawione ich działań niepożądanych.

Ponadto, poszukiwania nowych, skutecznych związków hipotensyjnych prowadzono również w grupie pochodnych ksantonu o potencjalnym działaniu α_1 - i/lub β -adrenolitycznym, wśród których znalazły się analogi znanych beta-blokerów, m.in. karwedilolu.

W obliczu nowych chorób cywilizacyjnych, takich jak zespół metaboliczny czy nadciśnienie, związki o działaniu plejotropowym, wpływające nie tylko bezpośrednio na parametry hemodynamiczne ale także na profil lipidowy, gospodarkę węglowodanową, śródbłonek, działające antyagregacyjnie, mogą być szczególnie cenne i pożądane.

4.3.2. Cel pracy

Celem prowadzonych przeze mnie badań było określenie wpływu na układ krążenia nowych ligandów receptorów α_1 - i β -adrenergicznych ze szczególnym uwzględnieniem ich właściwości hemodynamicznych oraz plejotropowych, takich jak działanie antyagregacyjne, aktywność śródbłonkowa, działanie przeciwzapalne i antyoksydacyjne oraz korzystny wpływ na gospodarkę węglowodanową i lipidową.

Badania prowadzone były w grupie ligandów receptorów adrenergicznych dwutorowo. W pierwszej kolejności, na podstawie wcześniejszych wyników do dalszych badań wyselekcjonowano 3 substancje (MH-76, MH-77, MH-79) i objęto je poszerzonymi badaniami farmakologicznymi, których rezultaty stały się podstawą niniejszego cyklu publikacji (H1 – H4).

Równolegle prowadzono również poszukiwania nowych skutecznych związków hipotensyjnych, o korzystnym profilu działania w obrębie nowo-zsyntezowanych związków, będących ligandami receptorów α_1 i/lub β -adrenergicznych (H5).

4.3.2.1 Szczegółowe cele w badaniach wyselekcjonowanych związków MH-76, MH-77, MH-79

4.3.2.1.1. Aktywność antyagregacyjna

Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że wyselekcjonowane związki są antagonistami receptorów 5-HT_{2A} [B14]. Receptory te występują w układzie krążenia w mięśniówce gładkiej naczyń oraz w płytkach krwi. Znajdujące się w płytkach krwi ziarnistości gęste są magazynem serotoniny w układzie sercowo-naczyniowym. W wyniku aktywacji płytek z ich magazynów wewnątrzkomórkowych uwalniana jest do krążenia serotonina, osiągając lokalnie wysokie stężenia. Uwolniona z płytek serotonina, w sposób autokryny, za pośrednictwem receptorów 5-HT_{2A} nasila dalszą aktywację i agregację płytek [23,24,25]. Receptory 5-HT_{2A} znajdują się również w obrębie mięśniówki gładkiej naczyń krwionośnych i pośredniczą w odpowiedzi skurczowej oraz w procesach migracji i proliferacji komórek mięśni gładkich naczyń. Uwolniona z płytek serotonina pobudza również receptory 5-HT_{2A} znajdujące się w mięśniówce gładkiej naczyń co powoduje ich skurcz, a ponadto potęguje działanie innych czynników wazokonstrykcyjnych [23,25,26]. Szczególne znaczenie ma wywołana serotoniną

amplifikacja odpowiedzi skurczowej naczyń na noradrenalinę. Aminy katecholowe mają także zdolność potęgowania agregacji płytek. W wyniku aktywacji płytkowych receptorów α_2 -adrenergicznych i związanego z tym spadku poziomu cAMP w płytce, zwiększa się wrażliwość płytek krwi na inne czynniki wywołujące agregację takie jak tromboksan (TXA_2) czy ADP [27,28]. Do niedawna uważano że w płytkach występuje jedynie receptor α_{2A} -adrenergiczny. Dlatego też nie wykorzystywano możliwości hamowania agregacji płytek tą ścieżką, gdyż leki blokujące receptory α_{2A} -adrenergiczne, czyli główny podtyp receptora α_2 -adrenergicznego, takie jak johimbina, obarczone były nieakceptowalnymi działaniami niepożądanymi. Jednakże najnowsze badania wykazały również obecność receptora α_{2B} -adrenergicznego w płytkach krwi, a substancje blokujące ten podtyp, bez wpływu na receptor α_{2A} -adrenergiczny, potencjalnie mogą hamować patologiczną aktywację płytek, przy znikomym ryzyku wywoływania krwawień i bez wywoływania działań niepożądanych typowych dla leków silnie i nieselektywnie blokujących receptory α_2 -adrenergiczne [27,28].

W sytuacjach patologicznych, przebiegających z uszkodzeniem śródbłonna, takich jak miażdżycza naczyń, opisane powyżej procesy mogą doprowadzić do utworzenia się zakrzepu i zamknięcia światła naczynia. Substancje blokujące jednocześnie receptory 5-HT_{2A} oraz α_{2B} -adrenergiczne mogą zatem wykazywać nie tylko działanie hipotensyjne, ale także posiadać dodatkowe działanie antyagregacyjne i ochronne na naczynia. **Dlatego też, pierwszym celem prowadzonych przeze mnie badań było oznaczenie aktywności antyagregacyjnej wyselekcjonowanych związków i określenie mechanizmu tego działania. W tym celu:**

- Potwierdzono właściwości antagonistyczne związków w stosunku do receptorów 5-HT_{2A} *in vitro* i *in vivo* wykorzystując ulepszoną metodykę w odniesieniu do poprzednio stosowanych oznaczeń oraz wdrożono nowe oznaczenie aktywności wewnętrznej w oparciu o pomiar wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia
- Oznaczono aktywność wewnętrzną związków w stosunku do receptorów α_{2A} -adrenergicznych poprzez ilościową ocenę aktywacji (rekrutacji) beta arrestyny (na podstawie genu reporterowego beta-laktamazy) oraz w stosunku do receptorów α_{2B} -adrenergicznych w oparciu o pomiar wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia
- Określono aktywność antyagregacyjną w modelach agregacji wywołanych:
 - Kolagenem
 - Serotoniną i podprogowym stężeniem kolagenu
 - Serotoniną i podprogowym stężeniem ADP
 - Adrenaliną i podprogowym stężeniem kolagenu

- Adrenaliną i podprogowym stężeniem ADP

4.3.2.1.2. Aktywność naczyniorozszerzająca

Ze względu na niewielką selektywność α_1/α_2 związek MH-77 nie został zakwalifikowany do dalszych badań.

W procesach powstawania i rozwoju licznych chorób układu sercowo-naczyniowego takich jak miażdżyca, nadciśnienie, czy cukrzyca znaczącą rolę odgrywa dysfunkcja śródbłonka. Śródbłonek aktywnie reaguje na siłę ścinającą oraz bodźce chemiczne i uczestniczy w regulacji ciśnienia i przepływu krwi, reguluje aktywność mięśniówki gładkiej naczyń, ich proliferację i migrację, a także hemostazę i rozwój stanu zapalnego. Komórki śródbłonka mają zdolność syntezy i uwalniania związków o działaniu naczyniorozszerzającym takich jak tlenek azotu (NO), prostacyklina (PGI_2) oraz śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący (EDHF) [29,30,31]. Śródbłonek jest również źródłem substancji naczyniokurczących i proagregacyjnych: endoteliny, tromboksanu, czynnika aktywującego płytki oraz prozapalnych cytokin i molekuł adhezyjnych. Zaburzenia metaboliczne, hiperinsulinemia, hiperglikemia i towarzyszący im stres oksydacyjny mogą prowadzić do uszkodzenia śródbłonka i zmniejszenia biodostępności NO, w wyniku obniżenia aktywności lub rozsprzęgania śródbłonkowej syntazy NO (eNOS). Zmniejszenie puli czynników naczyniorozszerzających prowadzić może do przerostu i utraty elastyczności ściany naczyniowej i rozwoju nadciśnienia tętniczego. Z tego też punktu widzenia zastosowanie związków poprawiających funkcjonowanie śródbłonka może przynieść znaczące korzyści w leczeniu chorób układu sercowo-naczyniowego [29,30,31].

W uprzednio przeprowadzonych badaniach [B4,B5] zaobserwowano znaczącą aktywność wazodylatacyjną związków MH-76 i MH-79, która wynikała nie tylko z działania α_1 -adrenolitycznego, ale również w zjawisko to zaangażowane były inne mechanizmy, niezwiązane z działaniem α_1 -adrenolitycznym np. antagonizm w stosunku do jonów wapnia.

Kolejnym celem było zatem szczegółowe poznanie mechanizmu naczyniorozszerzającego działania badanych związków, ze szczególnym uwzględnieniem niezależnych od receptorów α_1 -adrenergicznych, mechanizmów śródbłonkowych. W tym celu:

- Oznaczono działanie naczyniorozszerzające związków w modelu izolowanej aorty szczura stymulowanej fenylefryną

- Określono działanie naczyniorozszerzające związków w modelu izolowanej aorty szczura stymulowanej fenylefryną przy użyciu rozmaitych narzędzi farmakologicznych w celu potwierdzenia/wykluczenia udziału ścieżki tlenu azotu, prostacykliny, poszczególnych typów kanałów potasowych w mechanizmie działania badanych związków
- Oznaczono stężenie cGMP w aorcie szczura po podaniu MH-76 i MH-79
- Oznaczono wpływ związków MH-76 i MH-79 na stężenie tlenu azotu w ludzkich pierwotnych komórkach śródbłonkowych aorty
- Zbadano wpływ związków MH-76 i MH-79 na aktywność kanałów potasowych w ludzkich komórkach mięśniówki gładkiej aorty

4.3.2.1.3. Aktywność hipotensyjna po podaniu wielokrotnym w modelu nadciśnienia indukowanego octanem deoksykortykosteronu i sodem

Następnie, przewidziane zostało zbadanie aktywności hipotensyjnej wyselekcjonowanych związków MH-76 i MH-79 po ich podaniu wielokrotnym w modelu nadciśnienia wywołanego podaniem octanu deoksykortykosteronu (DOCA) i sodu. W modelu tym na skutek działania mineralokortykosteroidu dochodzi do retencji wody i sodu, uszkodzenia nerek i rozwoju nerkopochodnego złośliwego nadciśnienia. Retencja sodu i wody wywołuje stymulację adrenergiczną, która przyczynia się do gwałtownego rozwoju nadciśnienia wraz z remodelingiem serca, jego włóknieniem i przerostem. Zmiany te najbardziej zbliżone są do zmian obserwowanych u ludzi z nadciśnieniem i współistniejącą niewydolnością serca i nerek [32,33,34]. **Kolejnym celem było zatem szczegółowe zbadanie zdolności związków do cofania remodelingu serca i uszkodzenia nerek w warunkach nadciśnienia złośliwego.** Jako związku odniesienia użyto prazosyny, chinazolinowego α_1 -adrenolityku, aby porównać działanie związków blokujących receptory α_1 -adrenergiczne z różnych grup chemicznych i potwierdzić lub wykluczyć niekorzystny wpływ układu chinazoliny w warunkach znacznego obciążenia układu krążenia. W tym celu:

- Zbadano aktywność hipotensyjną po podaniu przewlekłym u zwierząt z już rozwiniętym nadciśnieniem
- Oznaczono stężenie noradrenaliny w osoczu
- Oznaczono poziom markerów stanu zapalnego: CRP w osoczu oraz IL-6 w nerkach

- Określono aktywność antyoksydacyjną związków
- Zbadano protekcyjne działanie związków na śródbłonek
- Przeprowadzono szczegółowe badania histopatologiczne oceniające zmiany w:
 - Sercu: (hipertrofia, grubość lewej komory, zwłóknienie śródmiąższowe, naciek leukocytny, apoptoza kardiomiocytów)
 - Naczyniach wieńcowych (hialinizacja, arteriopatie i zmiany aterogenne, mineralizacja ściany naczyniowej)
 - Nerkach (hipertrofia, zwłóknienie śródmiąższowe, uszkodzenie kłębuszków i kanalików nerkowych, naciek leukocytny)
 - Naczyniach nerkowych (zmiany aterogenne)

4.3.2.1.4. Aktywność MH-76 i MH-79 po podaniu wielokrotnym w modelu zespołu metabolicznego

Na koniec, przewidziano określenie aktywności wyselekcjonowanych związków MH-76 i MH-79 po ich podaniu wielokrotnym w modelu zespołu metabolicznego wywołanego fruktozą. U szczurów karmionych fruktozą rozwijają się objawy charakterystyczne dla zespołu metabolicznego takie jak otyłość brzuszna i insulinooporność, upośledzona tolerancja glukozy, hipertriglicerydemia i nadciśnienie [35,36]. Przyczyn tych zmian upatruje się w zależnym od insuliny uszkodzeniu śródbłonna, nadmiernej aktywacji współczulnej, nadmiernym stresie oksydacyjnego i przewlekłym stanie prozapalnym o słabym nasileniu [36,37]. Związki MH-76 i MH-79, niechinazolinowe α_1 -adrenolityki mogą okazać się korzystniejsze, aniżeli potencjalnie szkodliwe chinazolinowe związki, wykazując obok efektu hemodynamicznego również korzystny wpływ na profil lipidowy i gospodarkę węglowodanową. **Kolejnym celem było zatem szczegółowe zbadanie wpływu związków MH-76 i MH-79 na gospodarkę węglowodanową i profil lipidowy i wyjaśnienie mechanizmu obserwowanych efektów, a także porównanie uzyskanych rezultatów z efektami otrzymanymi dla prazosyny, α_1 -adrenolityka chinazolinowego.** W tym celu:

- zbadano aktywność hipotensyjną MH-76 i MH-79 po podaniu przewlekłym u zwierząt z już rozwiniętym zespołem metabolicznym
- określono parametry farmakokinetyczne związków MH-76, MH-79

- dokonano pomiarów masy ciała oraz glikemii na czczo przed rozpoczęciem, w trakcie oraz po zakończeniu eksperymentu
- wykonano test obciążenia glukozą po podaniu dożołądkowym
- określono ilość tkanki tłuszczowej, masę wątroby i serca
- oznaczono stężenie triglicerydów, cholesterolu i kwasu moczowego w osoczu
- oznaczono stężenie insuliny i określono insulinooporność metodą HOMA-IR
- zbadano protekcyjne działanie związków na śródbłonek
- oznaczono stężenie TNF- α w tkance tłuszczowej
- oznaczono właściwości antyoksydacyjne MH-76, MH-79 oraz prazosyny

4.3.2.2. Szczegółowe cele w badaniach nowo-zsyntezowanych ligandów receptorów α_1 -i/lub β -adrenergicznych

Na podstawie korzystnych wyników osiągniętych we wcześniejszych pracach [A3,B8] zaplanowano syntezę nowych związków, pochodnych ksantonu. Wcześniejsze badania w tej grupie związków wykazały ich korzystne działanie w układzie sercowo-naczyniowym, szczególnie przeciwarytmiczne i hipotensyjne, będące wynikiem blokowania receptorów α_1 -i/lub β -adrenergicznych. Ponieważ układ ksantonu występuje w wielu związkach pochodzenia zarówno naturalnego jak i syntetycznego o wielokierunkowym działaniu farmakologicznym, można było przypuszczać iż związki te będą także wykazywać wielokierunkowe działanie. Dlatego też zsyntezowano związki hybrydowe, w których do układu ksantonu wprowadzono układy farmakoforowe występujące w strukturach znanych β -blokerów: karwedilolu, nadololu, karteololu oraz antagonisty kanałów wapniowych, werapamilu. **Celem przeprowadzonych badań było określenie aktywności krążeniowej nowo-zsyntezowanych związków.** Wykonano następujące badania:

- Oznaczenie powinowactwa i aktywności wewnętrznej w stosunku do poszczególnych klas receptorów adrenergicznych (badania radioreceptorowe, badania biofunkcjonalne wykorzystujące narządy izolowane: aortę szczura stymulowaną fenylefryną (receptor α_1 -adrenergiczny), tchawicę świnki morskiej (receptor β_2 -adrenergiczny)),

- Oznaczenie zdolności do hamowania napływu jonów wapnia (w przypadku analogu werapamilu)
- Oznaczenie działania β -adrenolitycznego *in vivo* (test hamowania izoprenaliny)
- Oznaczenie aktywności hipotensyjnej po jednokrotnym podaniu
- Oznaczenie aktywności przeciwartrymicznej w modelu arytmii indukowanej adrenaliną
- Oznaczenie właściwości antyagregacyjnych
- Określenie wpływu na zapis EKG

4.3.3. Wyniki badań i dyskusja

4.3.3.1. Badania wyselekcjonowanych związków MH-76, MH-77, MH-79

H1. Monika Kubacka, Grzegorz Kazek, Magdalena Kotańska, Barbara Filipek, Anna Maria Waszkielewicz, Szczepan Mogilski. Anti-aggregation effect of aroxyalkyl derivatives of 2-methoxyphenylpiperazine is due to their 5-HT_{2A} and α ₂-adrenoceptor antagonistic properties. A comparison with ketanserin, sarpogrelate, prazosin, yohimbine and ARC239. *Eur J Pharmacol.* 2018 Jan 5;818:263-270

(Elsevier; IF₂₀₁₈ = 3.04; MNiSW₂₀₁₈ = 30 pkt)

Zgodnie z założonymi celami, badania rozpoczęto od określenia potencjalnego działania antyagregacyjnego wyselekcjonowanych związków i próby wyjaśnienia mechanizmu tego efektu. W pierwszej kolejności potwierdzono ich działanie antagonistyczne w stosunku do receptorów 5-HT_{2A} *in vitro* (komórki transfekowane ludzkim receptorem 5-HT_{2A}, izolowana aorta szczura stymulowana serotoniną) oraz *in vivo* (hamowanie presyjnego działania serotoniny). Badania przy użyciu komórek transfekowanych ludzkim receptorem 5-HT_{2A} wykazały że związki te są antagonistami receptorów 5-HT_{2A}, jednakże ich siła działania antagonistycznego jest mniejsza aniżeli związków odniesienia takich jak ketanseryna czy sarpogrelat. Podobne wyniki uzyskano w badaniu biofunkcyjnym wykorzystującym izolowaną aortę szczura stymulowaną serotoniną. Eksperyment ten był istotny ponieważ oznaczenia aktywności antyagregacyjnej wykonywane były przy wykorzystaniu krwi szczurzej, dlatego kluczowe było określenie aktywności antagonistycznej w stosunku do szczurzych receptorów 5-HT_{2A}. Badanie to było zbliżone do wykonanego eksperymentu w pracy doktorskiej, eksperyment ten jednak wykonano ponownie, stosując udoskonaloną

metodykę. (Z pierścieni aorty usunięto śródbłonek, którego obecność mogłaby interferować w wyniku aktywacji śródbłonkowych receptorów 5-HT_{1B}, 5-HT_{2B}. Ponadto, wyniki obliczono na podstawie odpowiedzi maksymalnej tkanki na depolaryzujący roztwór KCl, dzięki czemu uniknięto ryzyka tachyfilaksji związanej z dwukrotną ekspozycją tkanki na serotoninę, która mogłaby dać fałszywie dodatnie wyniki). W dalszej kolejności należało potwierdzić aktywność antagonistyczną w stosunku do receptorów 5-HT_{2A} *in vivo*. Określono zatem zdolność związków do hamowania presyjnego działania serotoniny. Eksperyment ten był również podobny do wykonanego uprzednio, jednak i w tym przypadku poprawiono warsztat metodyczny; wzięto pod uwagę możliwość tachyfilaksji w wyniku kilkukrotnego podania serotoniny, jak również zbadano w analogicznych warunkach związek odniesienia sarpogrelat. Eksperyment ten wykonano tylko dla związków które wykazały zdolność do blokady receptorów 5-HT_{2A}, obecnych w aorcie szczura. Dlatego też, badania tego nie przeprowadzono dla związku MH-76 który nie znosił skurczu aorty szczura stymulowanej serotoniną. MH-76 również w badaniach na komórkach transfekowanych ludzkim receptorem 5-HT_{2A} okazał się być słabym antagonistą tego receptora.

Przeprowadzone badania wykazały że związki MH-77 oraz MH-79 mają zdolność blokowania zarówno ludzkich jak i szczurzych receptorów 5-HT_{2A} (*in vitro* oraz *in vivo* w obrębie układu sercowo-naczyniowego), co wskazuje na ich potencjalną przydatność w zaburzeniach, w których patofizjologię zaangażowana jest serotoninina i receptory 5-HT_{2A}: remodeling naczyń i zmiany miażdżycowe, choroby naczyń obwodowych, nadciśnienie płucne. Mogą być również przydatne w celu hamowania nadmiernej agregacji płytek, szczególnie u pacjentów wykazujących oporność na zwykle stosowane leki przeciwplatekcyjne, aspirynę czy kłopidogrel, ze względu na rolę serotoniny w procesach aktywacji płytek i jej uwrażliwiające działanie na pozostałe czynniki wyzwalające agregację [24,25]. Należy jednak podkreślić, że ich aktywność antagonistyczna w stosunku do receptorów 5-HT_{2A} jest znacznie słabsza aniżeli ketanseryny lub sarpogrelatu.

Ponieważ w procesy agregacji płytek zaangażowane są również aminy katecholowe i receptory α_2 -adrenergiczne, w następnym etapie badań określono aktywność wewnętrzną związków w stosunku do receptorów α_{2A} - oraz α_{2B} -adrenergicznych, wykorzystując linie komórkowe transfekowane ludzkimi receptorami α_{2A} - oraz α_{2B} -adrenergicznymi. Badane związki, szczególnie MH-79 silniej blokowały receptory α_{2B} -, aniżeli α_{2A} -adrenergiczne, jednakże również ich siła działania była słabsza aniżeli związków odniesienia: prazosyny – antagonisty receptorów α_1/α_{2B} -adrenergicznych, johimbiny – nieselektywnego antagonisty

receptorów α_2 -adrenergicznych oraz ARC239 – związku o selektywnym działaniu α_{2B} -adrenolitycznym.

Powyższe badania pozwalają zakwalifikować związki MH-76, MH-77 oraz MH-79 jako słabych antagonistów receptorów 5-HT_{2A} i/lub α_{2A} - oraz α_{2B} -adrenergicznych. Przystąpiono zatem do zbadania ich działania antyagregacyjnego. Wykorzystano tutaj krew szczurzą, ze względu na łatwość pozyskania i powszechną dostępność tego materiału. Agregację badano we krwi pełnej w oparciu o metodę impedancyjną, która pozwala na badanie procesów agregacji w warunkach znacznie bardziej zbliżonych do fizjologicznych aniżeli ma to miejsce w przypadku badania agregacji przy wykorzystaniu osocza bogatopłytkowego [38,39].

Właściwości antyagregacyjne badanych związków określono wykorzystując rozmaite substancje wyzwalające agregację. W pierwszym etapie badań nad agregacją do jej wywołania wykorzystano kolagen - naturalny i najbardziej fizjologiczny stymulator tego procesu. W wyniku połączenia się kolagenu z m.in. płytkowymi receptorami GP4 dochodzi do wzrostu poziomu wapnia w płytce, zmiany jej kształtu i uwolnienia z ziarnistości gęstych serotoniny i ADP oraz syntezy TXA₂. W wyniku tych zmian dochodzi do aktywacji białka GP IIb/IIIa i finalnej agregacji płytek. Jest to najbardziej ogólny i fizjologiczny model agregacji i w zasadzie wszystkie związki które mają zdolność hamowania agregacji niezależnie od jej mechanizmu będą w tym modelu wykryte [23,40]. W doświadczeniu tym wszystkie przebadane związki miały zdolność hamowania agregacji indukowanej kolagenem, przy czym ketanseryna – silny antagonist receptorów 5-HT_{2A}, ARC238 – silny antagonist receptorów α_{2B} -adrenergicznych oraz MH-77, umiarkowany antagonist receptorów 5-HT_{2A}, α_{2A} -/ α_{2B} -adrenergicznych wykazały najsilniejsze działanie hamujące agregację płytek. Pozostałe związki, a także sarpogrelat i prazosyna wykazały słabsze działanie antyagregacyjne.

Aby potwierdzić udział receptorów 5-HT_{2A} w mechanizmie działania antyagregacyjnego badanych substancji wykorzystane zostały modele agregacji zależne od serotoniny. W modelach tych serotonina działa jako koagonista agregacji indukowanej niskimi, podprogowymi stężeniami kolagenu lub ADP. Fizjologicznie, wszystkie związki będące czynnikami wyzwalającymi agregację współdziałają razem angażując w proces agregacji płytek wiele receptorów i ścieżek. Wiele czynników współdziała ze sobą (ADP, TXA₂, 5-HT). Tak jest również w przypadku serotoniny, która sama jest słabym aktywatorem agregacji płytek, jednak uwalniana z gęstych ziarnistości trombocytów znacząco nasila działanie innych czynników indukujących agregację np. kolagenu lub ADP [24,41]. W doświadczeniach tych

największą aktywność wykazują substancje, których mechanizm działania przeciwplatekowego oparty jest o blokadę receptorów 5-HT_{2A} a zatem eksperymenty te służyły do potwierdzenia szlaku zaangażowanego w mechanizm działania antyagregacyjnego badanych związków. Jedynie związki, które mają zdolność blokady receptorów 5-HT_{2A} (MH-77, MH-79, ketanseryna, sarpogrelat) hamowały agregację wywołaną przez serotoninę i podprogowe stężenia kolagenu w sposób specyficzny, o czym świadczą uzyskane wartości IC₅₀ – które były niższe aniżeli wartości IC₅₀ uzyskane w modelu agregacji wywołanej samym kolagenem. Ponadto, tylko te substancje miały zdolność hamowania agregacji wywołanej przez serotoninę i podprogowe stężenia ADP.

Lekami blokującymi receptory 5-HT_{2A}, stosowanymi w leczeniu chorób sercowo-naczyniowych była ketanseryna oraz sarpogrelat. Ketanseryna została jednak wycofana gdyż wydłużała odstęp QT w zapisie EKG i była potencjalnie arytmogenna [25]. Należy podkreślić fakt, iż związki MH-76 oraz MH-79 nie powodują wydłużenia odstępu QT.

Drugi mechanizm potencjalnie zaangażowany w działanie antyagregacyjne badanych substancji to blokada receptorów α_{2A}/α_{2B} -adrenergicznych. Podobnie jak serotonina, adrenalina jest słabym aktywatorem płytek, jednak może znacznie zwiększyć wrażliwość płytek na inne czynniki wyzwalające agregację [27,28]. Związki mające zdolność blokowania receptorów α_{2A}/α_{2B} -adrenergicznych (MH-76, MH-77, MH-79, johimbina, ketanseryna), jak również związki blokujące jedynie podtyp α_{2B} -adrenergiczny (prazosyna, ARC239) wykazały aktywność antyagregacyjną w modelach agregacji zależnych od adrenaliny (agregacja wywołana przez adrenalinę i podprogowe stężenia kolagenu lub ADP), w których związki selektywnie blokujące receptory 5-HT_{2A} były nieaktywne (sarpogrelat).

Najnowsze badania wskazują na udział płytkowych receptorów α_2 -adrenergicznych i nadmiernej stymulacji adrenergicznej jako przyczynę zwiększonej aktywności płytek i oporności na działanie zwykle stosowanych leków przeciwplatekowych tj. aspiryny lub kłopidogrelu. Dodatkowa blokada receptorów α_{2B} -adrenergicznych u pacjentów leczonych kłopidogrelem lub aspiryną wydaje się być wysoce korzystna, przynosząc dodatkowe działanie przeciwplatekowe przy minimalnych skutkach ubocznych [27,28].

Przeprowadzone badania wskazują na możliwość wykorzystania innych szlaków przekazywania sygnału celem zahamowania patologicznej agregacji płytek: szlaku zależnego od serotoninę i receptorów 5-HT_{2A} oraz szlaku zależnego od adrenaliny i receptorów α_{2B} -adrenergicznych. Hamowanie agregacji w tych szlakach skutkować może jedynie

zmniejszeniem patologicznej agregacji płytek, bez wpływu na prawidłową rolę płytek dzięki czemu ryzyko krwawień byłoby minimalne. Z drugiej strony dodatkowa blokada tych ścieżek wydaje się być korzystna zwłaszcza u pacjentów opornych na zwykle stosowane leki przeciwplatekcyjne, gdyż hamować będzie resztkową reaktywność płytek, co skutkować będzie lepszą profilaktyką pierwotną i wtórną np. zawału serca [23,27,28].

Badane związki są antagonistami receptorów 5-HT_{2A} oraz/lub α_{2A}/α_{2B} -adrenergicznych o umiarkowanej sile działania i wykazują działanie antyagregacyjne w wyniku blokowania ścieżek przekazywania sygnału zależnych od tych receptorów. Związek MH-77 wykazał silniejsze działanie antyagregacyjne w agregacji wywołanej kolagenem aniżeli sarpogrelat, silny i selektywny antagonist receptorów 5-HT_{2A}. Jednoczesna, umiarkowana blokada kilku szlaków sygnałowych może być niekiedy bardziej korzystna, zwłaszcza w jednostkach chorobowych o skomplikowanej patofizjologii, aniżeli stosowanie silnych, selektywnych antagonistów poszczególnych receptorów i ścieżek, w kontekście zarówno skuteczności jak i profilu działań niepożądanych.

H2. Monika Kubacka, Magdalena Kotańska, Grzegorz Kazek, Anna Maria Waszkielewicz, Henryk Marona, Barbara Filipek, Szczepan Mogilski. Involvement of the NO/sGC/cGMP/K⁺ channels pathway in vascular relaxation evoked by two non-quinazoline α_1 -adrenoceptor antagonists. *Biomed Pharmacother.* 2018 Jul;103:157-166.

(Elsevier; IF₂₀₁₈ = 3.457; MNiSW2018 = 25 pkt)

Bardzo silna aktywność naczyniorozszerzająca wyselekcjonowanych związków, jak również niewielka liczba badań dotyczących zależnej od śródbłonna aktywności wazodylatacyjnej wśród leków blokujących receptory α_1 -adrenergiczne była przesłanką do przeprowadzenia poszerzonych badań nad aktywnością śródbłonkową związków MH-76 i MH-79. W pierwszym etapie badań, wykorzystując model izolowanej aorty szczura stymulowanej fenylefryną, porównano działanie naczyniorozszerzające związków w preparatach tkankowych z zachowanym śródbłonkiem oraz w preparatach z usuniętym mechanicznie śródbłonkiem. Usunięcie śródbłonna spowodowało zmniejszenie aktywności naczyniorozszerzającej badanych związków ale nie prazosyny, co wskazuje, że mechanizm działania naczyniorozszerzającego związków MH-76 i MH-79 jest częściowo zależny od śródbłonna, natomiast działanie wazodylatacyjne prazosyny jest niezależne od śródbłonna.

Śródbłonek wydziela 3 najważniejsze czynniki naczyniorozszerzające: tlenek azotu (NO), prostacyklinę (PGI₂) oraz zależny od śródbłonka czynnik hiperpolaryzujący (EDHF) [29,30,42]. Działanie EDHF widoczne jest przede wszystkim w naczyniach oporowych [42], a ponieważ badania przeprowadzone były na aorcie, więc oceniono powiązanie aktywności śródbłonkowej związków ze ścieżką PGI₂ oraz NO. Tlenek azotu powstaje w reakcji katalizowanej przez syntazę tlenku azotu (NOS). W śródbłonku głównym izoenzymem jest śródbłonkowa syntaza tlenku azotu (eNOS), której aktywność zależna jest od kalmoduliny i jonów wapnia. W reakcji katalizowanej przez NOS dochodzi do utleniania azotu L-Argininy tlenem cząsteczkowym, a produktami tej reakcji jest tlenek azotu i L-cytrulina. Uwolniony tlenek azotu dociera do komórek mięśniówki gładkiej naczyń, gdzie aktywuje rozpuszczalną cyklazę guanylową (sGC), co powoduje zwiększenie wewnątrzkomórkowego stężenia cGMP. cGMP aktywuje kinazę białkową G (PKG). PKG aktywuje kanały potasowe prowadząc do hiperpolaryzacji komórek mięśniowych, zahamowania uwalniania jonów Ca²⁺ z siateczki sarkoplazmatycznej i spadku wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia, co w efekcie powoduje rozkurcz mięśniówki gładkiej, zahamowanie procesów jej proliferacji i przebudowy [29,30,43,44].

Ponieważ związki MH-76 i MH-79 wykazały niezależną od blokady receptorów α₁-adrenergicznych aktywność śródbłonkową, w dalszym etapie badań sprawdzono czy ich działanie naczyniorozszerzające jest zależne od szlaku NO/cGMP. W tym celu przeprowadzono kolejne eksperymenty wykorzystując rozmaite narzędzia farmakologiczne. Określono działanie naczyniorozszerzające związków po uprzedniej inkubacji tkanek z L-NAME, który jest inhibitorem syntazy tlenku azotu. L-NAME zmniejszyła aktywność wazodylatacyjną MH-76 i MH-79 do poziomu porównywalnego z efektem mechanicznego usunięcia śródbłonka, co wskazuje na udział ścieżki NO w działaniu naczyniorozszerzającym tych substancji. Ponadto, inkubacja aorty z inhibitorem kalmoduliny, również zmniejszyła naczyniorozszerzające działanie badanych związków, co potwierdza udział NOS w ich mechanizmie działania, gdyż jest to enzym zależny od wapnia i kalmoduliny. W celu potwierdzenia udziału tlenku azotu w mechanizmie działania badanych związków, zbadano ich wpływ na produkcję NO również w innym modelu, o większej zgodności fizjologicznej i biochemicznej z organizmem ludzkim – przeprowadzono badania z użyciem ludzkich pierwotnych komórek śródbłonkowych aorty. Doświadczenie to wykazało że MH-76 oraz MH-79, podobnie jak L-arginina zwiększają produkcję NO, natomiast prazosyna nie wpływała na wewnątrzkomórkowe stężenie tlenku azotu.

Ponieważ NO stymuluje produkcję cGMP w komórkach mięśniówki naczyniowej, w następnym etapie badań określono udział cGMP w mechanizmie działania naczyniorozszerzającego związków. W tym celu izolowaną aortę inkubowano z ODQ – selektywnym inhibitorem sGC, a następnie oznaczano działanie wazodylatacyjne związków. ODQ znacząco zmniejszał siłę działania naczyniorozszerzającego związków, co wskazuje na udział ścieżki NO/sGC/cGMP w ich mechanizmie działania. W celu potwierdzenia tej obserwacji, oznaczono immunoenzymatycznie poziom cGMP w aortach eksponowanych na działanie badanych związków. Badanie to wykazało, iż związki MH-76 i MH-79 zwiększały poziom cGMP w aortach z zachowanym śródbłonkiem, natomiast nie miały wpływu na stężenie cGMP w aortach uprzednio pozbawionych endotelium. Badanie to potwierdziło iż obserwowany po podaniu związków wzrost cGMP jest zależny od NO oraz potwierdziło udział ścieżki NO-sGC-cGMP w ich mechanizmie działania. Ponadto, doświadczenie to wykluczyło bezpośrednie działanie aktywizujące związków na sGC.

W dalszym etapie badań określono udział prostacykliny w mechanizmie działania związków. W tym celu aortę inkubowano z indometacyną, inhibitorem cyklooksygenazy a następnie badano działanie naczyniorozszerzające związków. Indometacyna nie zmniejszała wazodylatacji wywołanej MH-76 i MH-79, co wyklucza udział ścieżki prostacykliny w mechanizmie działania związków.

Również wykluczono udział cAMP w mechanizmie działania związków. W wyniku aktywacji np. receptorów β -adrenergicznych dochodzi do aktywacji cyklazy adenylanowej i wzrostu stężenia cAMP w komórce, a następnie aktywacji odpowiednich kinaz, efektem czego jest rozszerzenie naczyń. Jednak, ani SQ 22536 (inhibitor cyklazy adenylanowej), ani propranolol, (nieselektywny antagonist receptorów β -adrenergicznych), nie wpływały na działanie naczyniorozszerzające związków.

W dalszej kolejności zbadano udział poszczególnych kanałów potasowych w działaniu wazodylatacyjnym związków MH-76 oraz MH-79. Kanały potasowe występują zarówno w komórkach śródbłonka jak i mięśni gładkich naczyń i odgrywają ważną rolę w regulacji napięcia naczyń krwionośnych. Otwarcie kanałów potasowych pod wpływem czynników uwalnianych ze śródbłonka, zwiększenia stężenia cAMP i cGMP i aktywacji odpowiednich kinaz, prowadzi do wypływu jonów potasu z komórki, czego następstwem jest hiperpolaryzacja, zamknięcie zależnych od potencjału kanałów wapniowych i rozkurcz naczyń krwionośnych. Jak dotąd opisano cztery główne typy kanałów potasowych: kanały

zależne od potencjału – K_V , kanały aktywowane jonami wapnia – K_{Ca} , wśród których wyróżnia się kanały o dużym (BK_{Ca}), średnim (IK_{Ca}) i małym (SK_{Ca}) przewodnictwie, kanały wrażliwe na ATP (zależne od ATP) – K_{ATP} , kanały wewnątrzprostownicze (dokomórkowe prostowniki, dokomórkowe prostownicze kanały potasowe) K_{IR} [45]. Działanie naczyniorozszerzające związków było zmniejszone w obecności blokerów poszczególnych typów kanałów potasowych (tetraetyloamonium, iberiotoksyna – blokery BK_{Ca} , glibenklamid – bloker K_{ATP} , 4-aminopirydyna bloker K_V), co wskazuje na udział tych kanałów w mechanizmie działania MH-76 i MH-79.

Kanały potasowe mogą być pośrednio aktywowane przez czynniki naczyniorozszerzające za pośrednictwem kinaz białkowych. Czynniki naczyniorozszerzające pobudzają syntezę cyklicznych nukleotydów cGMP i cAMP, które z kolei aktywują odpowiednie kinazy białkowe. Kanały potasowe mogą być również aktywowane bezpośrednio [45,46,47]. Aby określić rodzaj interakcji jaki zachodzi między badanymi związkami a kanałami potasowymi wykonano dalsze doświadczenia. Oznaczono działanie naczyniorozszerzające związków w obecności blokerów kanałów K_{Ca} oraz K_{ATP} w aorcie pozbawionej śródbłonna. Zarówno glibenklamid jak i TEA zmniejszyły działanie wazodylatacyjne MH-76 i MH-79. Przyczyny tego zjawiska mogły być następujące:

- MH-76 i MH-79 bezpośrednio aktywują kanały potasowe
- Tlenek azotu, (którego produkcja nasilana jest przez MH-76 i MH-79) uwalniany jest z innych źródeł niż śródbłonek, skutkiem czego jest aktywacja kanałów potasowych
- Badane związki mają zdolność aktywacji cyklicznej guanylowej, czego efektem jest aktywacja kanałów potasowych
- W wyniku skurczu aorty wywołanego fenylefryną, a zatem pobudzeniem receptorów α_1 -adrenergicznych dochodzi do aktywacji ścieżki PLC-IP₃/DAG – Ca^{2+} /PKC i zahamowania aktywności kanałów potasowych. Badane związki w wyniku działania α_1 -adrenolitycznego przeciwdziałają tej aktywacji a dodanie inhibitorów kanałów potasowych w takiej sytuacji zmniejsza działanie wazodylatacyjne α_1 -adrenolityków

Eksperyment wykorzystujący ludzkie komórki mięśniówki gładkiej aorty i oparty o detekcję jonów talu a oceniający wpływ związków na aktywność kanałów potasowych wykazał iż związki te nie aktywują prądów potasowych bezpośrednio, w przeciwieństwie do substancji

takich jak pinacidil czy NS-1619, które bezpośrednio aktywują kanały K_{ATP} oraz BK_{Ca} a które były związkami odniesienia w tym eksperymencie.

Kolejna możliwość, iż niewielkie ilości NO produkowane pozaśródbłonkowo, aktywują sGC, PKG a następnie kanały potasowe również została wykluczona, gdyż eksperyment przeprowadzony na aorcie szczura stymulowanej fenylefryną, pozbawionej endotelium i w obecności inhibitora syntazy tlenku azotu wykazał, iż L-NAME w takim układzie nie osłabia działania wazodylatacyjnego związków.

Również możliwość iż badane związki aktywują cyklazę guanylową została wyeliminowana. Przeprowadzono eksperyment na aorcie szczura stymulowanej fenylefryną, pozbawionej endotelium i w obecności inhibitora cyklazy guanylowej ODQ, który wykazał iż ODQ nie zmniejsza działania naczyniorozszerzającego związków. Ponadto, w badaniu immunoenzymatycznym wykazano, iż w aortach pozbawionych śródbłonka MH-76 i MH-79 nie zwiększają stężenia cGMP.

Zatem wpływ związków na kanały potasowe jest pośredni i wynika z ich działania zwiększającego uwalnianie tlenku azotu i pobudzenia ścieżki NO-sGC-cGMP a następnie otwarcia kanałów potasowych oraz z działania hamującego aktywację PKC wynikającego z działania α_1 -adrenolitycznego.

Podsumowując, w pracy wykazano iż MH-76 oraz MH-79 oprócz działania α_1 -adrenolitycznego wykazują także zdolność do zwiększania uwalniania tlenku azotu przez śródbłonek, czego następstwem jest aktywacja sGC i zwiększenie stężenia cGMP oraz otwarcie kanałów potasowych. Natomiast prazosyna nie wpływa na wydzielanie NO a jej działanie naczyniorozszerzające nie jest zależne od śródbłonka.

H3. Monika Kubacka, Monika Zadrożna, Barbara Nowak, Magdalena Kotańska, Barbara Filipek, Anna Maria Waszkielewicz, Henryk Marona, Szczepan Mogilski. Reversal of cardiac, vascular, and renal dysfunction by non-quinazoline α_1 -adrenolytics in DOCA-salt hypertensive rats: a comparison with prazosin, a quinazoline-based α_1 -adrenoceptor antagonist. *Hypertens Res.* 2019 Mar 12. doi: 10.1038/s41440-019-0239-1.

(Springer Nature; IF₂₀₁₉ = 3.439; MNiSW₂₀₁₉ = 25 pkt)

Aktywność hipotensyjna związków oceniana była do tej pory po podaniu jednokrotnym normotensyjnym zwierzętom. Należało zatem sprawdzić czy związki te wykażą działanie hipotensyjne po podaniu wielokrotnym u zwierząt z rozwiniętym uprzednio nadciśnieniem. Wybrano model nadciśnienia wywołanego podaniem octanu deoksykortykosteronu (DOCA) przy jednoczesnym obciążeniu sodem. Głównym mechanizmem powstawania nadciśnienia tętniczego w tym modelu jest bezpośredni wpływ mineralokortykosteroidu - DOCA na cewki nerkowe, gdzie poprzez receptory mineralokortykosteroidowe dochodzi do zatrzymania wody i sodu, i hiperwolemii. Konsekwencją tego jest wzrost oporu obwodowego, nasilenie aktywności współczulnej i rozwój ciężkiego nadciśnienia. Nadciśnienie wywołane w tym mechanizmie skutkuje uszkodzeniem nerek, remodelingiem serca i naczyń, polegającym ich na przeroście, zwłóknieniu, nacieku leukocytarnym oraz uszkodzeniu śródbłonna naczyń krwionośnych. Zmiany uzyskane w tym modelu są charakterystyczne dla nadciśnienia z towarzyszącą niewydolnością serca [32,33,34]. Mając na uwadze wyniki badania klinicznego ALLHAT, w którym stosowanie chinazolinowego α_1 -adrenolityku doksazosyny wiązało się ze zwiększoną liczbą incydentów sercowo-naczyniowych, szczególnie nowych przypadków rozwoju niewydolności serca, zasadne było przebadanie związków MH-76 i MH-79 właśnie w tym modelu nadciśnienia i porównanie z działaniem α_1 -adrenolityku chinazolinowego. W tym celu zwierzętom podawano DOCA (20 mg/kg *s.c.* 2xtydz) a wodę pitną zastąpiono roztworem 1% NaCl i 0.2% KCl przez 12 tygodni. Badane związki MH-76, MH-79 (10 mg/kg/dzień *i.p.*) oraz prazosynę (0.4 mg/kg/dzień *i.p.*) podawano przez ostatnie 6 tygodni eksperymentu. Dawki zostały dobrane na podstawie wcześniej przeprowadzonych eksperymentów [B5,B6] oraz krótkiego pilotażowego eksperymentu, a różnice w dawkach pomiędzy testowanymi substancjami a prazosyną wynikały z ich odmiennego powinowactwa do receptorów α_1 -adrenergicznych (K_i prazosyna = 0.1nM, K_i MH-76, MH-79 = około 2 nM). Ciśnienie tętnicze mierzone było w sposób nieinwazyjny, przy użyciu mankietów ogonowych, w odstępach tygodniowych przez 12 tygodni trwania eksperymentu.

U szczurów z rozwiniętym nadciśnieniem związki MH 76 oraz MH 79 znacząco obniżały ciśnienie tętnicze krwi jednak wykazywały tygodniowy okres latencji. Prazosyna obniżała ciśnienie tętnicze już w pierwszym tygodniu podawania i wykazywała silniejsze działanie hipotensyjne, powodując większe i szybsze spadki ciśnienia tętniczego. Jednak w ostatnim tygodniu trwania eksperymentu wartości skurczowego ciśnienia tętniczego w grupach otrzymujących DOCA i MH-76/MH-79/prazosynę nie różniły się znacząco między sobą i były zbliżone do wartości ciśnienia tętniczego krwi szczurów kontrolnych. Ponadto, wszystkie α_1 -adrenolityki zmniejszały zwłóknienie śródmiąższowe mięśnia sercowego oraz grubość ściany lewej komory serca, co wydaje się być skorelowane z ich silnym działaniem hipotensyjnym.

Jednakże prazosyna nie zmniejszała hipertrofii serca (wyrażonej jako indeks masa serca/masa ciała). Ponadto częstotliwość akcji serca była znacząco większa u szczurów otrzymujących DOCA oraz DOCA i prazosynę, co wskazywać może na rozwój niewydolności serca oraz tachykardię kompensacyjną w odpowiedzi na działanie prazosyny. Z drugiej strony działanie hipotensyjne związzków MH-76 i MH-79 nie wiązało się ze wzrostem częstotliwości akcji serca, przeciwnie, MH-79 powodował zmniejszenie częstotliwości akcji serca, jak również oba związki zmniejszały przerost mięśnia sercowego. Dodatkowo, działanie prazosyny związane było ze wzrostem stężenia noradrenaliny w osoczu, co sugeruje iż prazosyna powoduje wtórną aktywację układu współczulnego, co potwierdzają wyniki innych badań, w których stosowanie prazosyny związane było z aktywacją adrenergiczną [48]. Jak wykazano we wcześniejszej pracy [B14], MH-76 i MH-79, analogi urapidylu, podobnie jak urapidyl są agonistami receptorów 5-HT_{1A} [49] i mogą, w wyniku pobudzenia ośrodkowych receptorów 5-HT_{1A} w strefie presyjnej, w dogłowym brzuszno-bocznym obszarze rdzenia przedłużonego (*rostral ventrolateral medulla*) hamować napięcie układu współczulnego [50], dzięki czemu nie wywołują tachykardii kompensacyjnej oraz skuteczniej hamują przerost mięśnia sercowego.

Badania apoptozy kardiomiocytów metodą TUNEL nie wykazały istotnych różnic między poszczególnymi grupami eksperymentalnymi. Nieznaczne, nieznamiennie nasilenie apoptozy obserwowano w grupie otrzymującej DOCA oraz DOCA i prazosynę.

Badania na izolowanej aorcie pobranej od szczurów otrzymujących DOCA wykazały znaczne osłabienie wazodylatacyjnej odpowiedzi naczynia po podaniu karbacholu – analogu acetylocholiny. Karbachol wywołuje rozkurcz aorty w wyniku aktywacji śródbłonkowych

receptorów muskarynowych, czego skutkiem jest napływ jonów wapnia do wnętrza komórki, aktywacja syntazy tlenu azotu i synteza tlenku azotu [30,42]. Powstały tlenek azotu dyfunduje do leżącej pod śródbłonkiem mięśniówki gładkiej, pobudza rozpuszczalną syntazę guanylową, czego efektem jest zwiększenie stężenia wewnątrzkomórkowego cGMP i rozkurcz naczyń. Upośledzenie naczyniorozszerzającej odpowiedzi na karbachol wskazuje na uszkodzenie śródbłonka. Aorty pobrane od szczurów otrzymujących DOCA+MH-76 oraz DOCA+MH-79 cechowały się silniejszą odpowiedzią na działanie karbacholu przy czym MH-79 wykazał najsilniejsze działanie protekcyjne na śródbłonek. Naczynia pobrane od szczurów z grupy DOCA-MH-79 wykazywały zbliżony stopień relaksacji po podaniu karbacholu do naczyń pobranych od szczurów z grupy kontrolnej. Natomiast prazosyna nie wykazała znaczącego działania ochronnego na śródbłonek naczyniowy.

Badania histopatologiczne okołonaczyniowego obszaru tętnic lewej komory obejmowały ocenę występowania komórek piankowatych, nasilenie włóknienia okołonaczyniowego oraz naciek limfocytarny. Badaniami objęto także drobne naczynia wieńcowe i tu oceniano zmiany o charakterze miażdżycowym w obrębie błony wewnętrznej (*tunica intima*), takie jak obecność makrofagów, występowanie komórek piankowatych, nagromadzenie lipidów, migracja komórek mięśni gładkich naczyń, transformację komórek nabłonkowych i stopień uszkodzenia błony wewnętrznej. Zarówno zmiany okołonaczyniowe jak i zmiany o charakterze miażdżycowym w największym stopniu były łagodzone przez MH-79.

Oceniono również stopień mineralizacji ściany naczyniowej. Co ciekawe, patologia ta występowała tylko u szczurów otrzymujących DOCA i prazosynę. Zmiany te nie występowały w pozostałych grupach eksperymentalnych.

Ocenie histopatologicznej poddano także tętnice nerkowe. Oceniano stopień akumulacji leukocytów i ich adhezję do śródbłonka, uszkodzenie śródbłonka, akumulację komórek zapalnych w obrębie błony wewnętrznej, obecność komórek piankowatych, nagromadzenie lipidów, odkładanie się włókniaka oraz fenestrację błony sprężystej wewnętrznej. Zmiany te łagodzone były przez wszystkie badane substancje, jednak najmniej korzystne efekty obserwowane były w grupie szczurów otrzymujących DOCA i prazosynę. Dodatkowo zaobserwowano, niezależnie od powyższych obserwacji obejmujących głównie błonę wewnętrzną naczyń, remodeling i włóknienie w obrębie błony środkowej (*tunica media*) tętnic nerkowych u szczurów otrzymujących DOCA. Co więcej,

zmiany te były nasilone w grupie szczurów otrzymujących DOCA i prazosynę a dodatkowo w grupie tej zaobserwowano także zmiany w fenotypie, kształcie i orientacji komórek mięśniówki gładkiej.

Przewlekłe podawanie mineralokortykosteroidu jakim jest DOCA i jednoczesne obciążenie sodem powoduje znaczące uszkodzenie struktury nerek [32,51]. U szczurów obserwowano powiększenie nerek, zwłóknienie i stwardnienie kłębuszków nerkowych oraz śródmiąższowe zwłóknienie cewek nerkowych. W wyniku tego uszkodzenia dochodzi do rozwoju stanu zapalnego, a naciek leukocytny i wydzielane przez komórki cytokiny prozapalne przyczyniają się do pogłębienia tego stanu. Prazosyna znacząco zmniejszała uszkodzenie kłębuszków nerkowych, przypuszczalnie ze względu na jej największą aktywność hipotensyjną. Natomiast związek MH-79 najefektywniej łagodził uszkodzenie cewek nerkowych a działanie to skorelowane było z najsilniejszym hamowaniem nacieku komórek immunologicznych przez MH-79.

Ponieważ uszkodzenie nerek związane jest ze stanem zapalnym i generacją reaktywnych form tlenu oznaczono w homogenatach nerkowych stężenie IL-6 oraz poziom peroksydacji lipidów oraz stężenie niebiałkowych tioli. Oznaczono również stężenie CRP w osoczu. Wyniki tych oznaczeń wskazują iż wszystkie badane α_1 -adrenolityki zmniejszają stężenie CRP oraz przywracają prawidłowy poziom tioli niebiałkowych w nerkach. Natomiast związek MH-76 obniżał stężenie IL-6 oraz hamował peroksydację lipidów, co wskazuje na jego dodatkowe działanie przeciwzapalne/antyoksydacyjne, potwierdzone z resztą w kolejnej pracy [H5]. Jednak finalnie związek MH-76 nie przewyższał protekcyjnym działaniem związku MH-79. Badanie to również ujawniło, iż podawanie prazosyny skutkowało podniesieniem stężenia IL-6 w nerce, które znacząco przewyższało stężenie IL-6 w nerkach szczurów otrzymujących tylko DOCA.

Łącząc obserwacje z badań oceniających dysfunkcję śródbłonna przeprowadzonych na aortach pobranych z poszczególnych grup eksperymentalnych z badaniami histopatologicznymi obejmującymi cewki nerkowe, naczynia nerkowe oraz naczynia sercowe, można stwierdzić, iż najkorzystniejsze działanie protekcyjne w obrębie śródbłonna i zdolność do hamowania patologicznych zmian w histoarchitekturze naczyń nerkowych i wieńcowych wykazał związek MH-79.

W warunkach prawidłowych komórki śródbłonna wyścielają naczynia krwionośne i stanowią pierwszą barierę pomiędzy krwią a tkankami. Prawidłowo funkcjonujący śródbłonek pełni

liczne funkcje takie jak regulacja napięcia ścian naczyń krwionośnych, utrzymywanie równowagi pomiędzy procesami krzepnięcia i fibrynolizy. Pod wpływem działania bodźców prozapalnych dochodzi do zwiększenia przepuszczalności śródbłonka i zwiększonego napływu komórek układu immunologicznego. Istotną rolę pełnią tutaj cytokiny prozapalne, reaktywne formy tlenu i wydzielane przez śródbłonek molekuly adhezyjne, co prowokuje dalszy napływ komórek układu odpornościowego. Prowadzi to do przebudowy ściany naczyniowej, włóknienia, proliferacji i migracji komórek mięśni gładkich naczyń. Główną cechą dysfunkcji śródbłonka jest zmniejszenie ilości tlenu azotu, które może być wynikiem obniżenia aktywności i ekspresji lub rozprężania eNOS, albo też zmniejszenie biodostępności tlenu azotu w wyniku jego reakcji z anionorodnikiem ponadtlenkowym [52,53,54]. W poprzedniej pracy (H2) wykazano, iż związki MH-76 oraz MH-79, w przeciwieństwie do prazosyny mają zdolność zwiększania produkcji NO oraz zależnego od śródbłonka cGMP. W opisywanej pracy MH-79 wykazał najsilniejsze działanie hamujące dysfunkcję śródbłonka i jako jedyny zmniejszał naciek komórek stanu zapalnego w obrębie nerek oraz najefektywniej chronił przed naczyniowymi powikłaniami nadciśnienia. Wydaje się zatem iż to działanie ochronne związku MH-79 na śródbłonek obok działania α_1 -adrenolitycznego, warunkuje zdolność MH-79 do hamowania patologicznych zmian w sercu i w nerkach.

Podsumowując, w pracy wykazano korzystny wpływ związków MH-76 i MH-79 na wywołane DOCA i sodem nadciśnienie oraz dysfunkcję serca, nerek i naczyń krwionośnych. Działanie protekcyjne związków można przypisać ich efektowi hipotensyjnemu, wynikającemu z działania α_1 -adrenolitycznego i z działania hamującego aktywność układu współczulnego. Ponadto MH-79 zmniejszał dysfunkcję śródbłonka, przez co zmniejszony został naciek komórek zapalnych w obrębie nerek i ich włóknienie oraz zmniejszeniu uległy zmiany miażdżycowe i arteriopatje naczyń sercowych i nerkowych. Prazosyna, pomimo silnego działania hipotensyjnego i związanych z tym korzyści ujawniła niekorzystny wpływ na naczynia wieńcowe (mineralizacja) i nerkowe (włóknienie). Prazosyna nie zmniejszała dysfunkcji śródbłonka. Praca wskazuje również iż nowe substancje o działaniu α_1 -adrenolitycznym i efektach plejotropowych mogą okazać się niezwykle korzystne w farmakoterapii chorób sercowo-naczyniowych. Praca wskazuje również na wymierne korzyści jakie może przynieść stosowanie substancji o działaniu protekcyjnym i poprawiającym integralność śródbłonka.

H4 - **Monika Kubacka**, Magdalena Kotańska, Małgorzata Szafarz, Krzysztof Pociecha, Barbara Filipek, Anna Waszkielewicz, Henryk Marona, Szczepan Mogilski. Beneficial effects of non-quinazoline α_1 -adrenolytics on hypertension and altered metabolism in fructose-fed rats. A comparison with prazosin. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2019, <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2019.04.003>.

(Elsevier; IF₂₀₁₉ = 3.318; MNiSW₂₀₁₉ = 30 pkt)

Kolejnym etapem badań nad związkami MH-76 oraz MH-79 było określenie ich wpływu na nadciśnienie i zaburzenia metaboliczne charakterystyczne dla zespołu metabolicznego. W tym celu związki te podawano przewlekłe szczurom z już rozwiniętym zespołem metabolicznym. Model metaboliczny wywołano podając szczurom do picia zamiast wody 20% roztwór fruktozy przez 12 tygodni. U szczurów karmionych fruktozą rozwijają się objawy charakterystyczne dla zespołu metabolicznego takie jak otyłość brzuszna i insulinoooporność, upośledzona tolerancja glukozy, hipertriglicydemia i nadciśnienie. Po 12 tygodniach podawania 20% roztworu fruktozy u zwierząt zaobserwowano łagodne nadciśnienie oraz podwyższone stężenie glukozy na czczo. Na tej podstawie przyjęto, iż zespół metaboliczny został pomyślnie wywołany i zaczęto podawanie związków MH-76 oraz MH-79 w dawce 5 mg/kg *ip* dziennie, równoległe z dalszym podawaniem 20% roztworu fruktozy przez kolejne 6 tygodni. Jako związku odniesienia ponownie użyto prazosyny. Związki MH-76 i MH-79 podawano w wybranej dawce 5 mg/kg *ip*, uznanej na podstawie wcześniejszych eksperymentów [B6, H3] jako dawce skutecznej i bezpiecznej. Biorąc pod uwagę różnice w powinowactwie do receptorów α_1 -adrenergicznych pomiędzy badanymi związkami a prazosyną, dawkę prazosyny odpowiednio zmniejszono (0.2 mg/kg *ip*/dzień).

Ciśnienie tętnicze mierzone było w sposób nieinwazyjny, przy użyciu mankietów ogonowych, w odstępach tygodniowych przez cały czas trwania eksperymentu tj. 18 tygodni. W okresie od 12 do 18 tygodnia trwania eksperymentu szczury otrzymujące fruktozę cechowały się podwyższonym ciśnieniem skurczowym, natomiast szczury które obok fruktozy otrzymywały MH-76, MH-79 lub prazosynę wykazywały ciśnienie skurczowe zbliżone do wartości ciśnienia skurczowego szczurów kontrolnych. Zatem MH-76, MH-79 i prazosyna wykazały działanie hipotensyjne u zwierząt z zespołem metabolicznym.

Szczury otrzymujące fruktozę charakteryzowały się znacznie większym przyrostem masy ciała i finalnie większą masą ciała oraz znaczną otyłością brzuszną. Tutaj szczególnie korzystny okazał się związek MH-76; szczury otrzymujące fruktozę i MH-76 cechowały się

mniejszym przyrostem masy ciała, mniejszą końcową masą ciała oraz brakiem otyłości brzusznej. Również MH-79 znacząco zmniejszała otyłość brzuszną. Natomiast zwierzęta otrzymujące fruktozę i prazosynę nie różniły się pod względem masy ciała i ilości brzusznej tkanki tłuszczowej od szczurów otrzymujących fruktozę.

Szczury otrzymujące fruktozę cechowały się hiperglikemią na czczo oraz insulinoopornością, określoną wskaźnikiem HOMA-IR (*homeostatic model assessment – insulin resistance*). Wszystkie badane α_1 -adrenolityki: MH-76, MH-79 oraz prazosyna zmniejszały hiperglikemię, natomiast MH-76 dodatkowo zmniejszała insulinooporność. U szczurów otrzymujących fruktozę wykazano również podniesione stężenie triglicerydów i ten parametr korzystnie zmniejszały MH-76 oraz MH-79 a słabiej prazosyna. Również wszystkie α_1 -adrenolityki hamowały proces peroksydacji lipidów w wątrobie.

Hiperinsulinemia wraz z otyłością brzuszną wywiera działanie aktywujące układ współczulny, w wyniku czego dochodzi do wzrostu oporu obwodowego i rozwija się nadciśnienie tętnicze. Patologia ta może pogłębiać się gdyż zwiększony opór obwodowy utrudnia przenikanie glukozy do tkanek [37,55]. W pracy wykazano, iż blokada receptorów α_1 -adrenergicznych zarówno przez MH-76, MH-79 jak i przez prazosynę skutkowała obniżeniem ciśnienia tętniczego oraz poprawą glikemii na czczo. Przypuszczalnie, α_1 -adrenolityki, w wyniku ich działania naczyniorozszerzającego ułatwiają przenikanie glukozy z krwi do aktywnych metabolicznie tkanek.

Natomiast żadna z tych substancji nie poprawiała tolerancji glukozy, co wykazano w teście doustnego obciążenia glukozą. Można zatem stwierdzić, iż korzystny wpływ α_1 -adrenolityków na metabolizm glukozy jest wynikiem ich działania obwodowego, poprawiającego pasaż glukozy do tkanek, natomiast związki te nie wpływają na wydzielanie insuliny.

Przeprowadzone badania wykazały iż MH-76, MH-79 oraz prazosyna mają działanie hipotensyjne oraz zmniejszają stężenie glukozy i triglicerydów we krwi na czczo u szczurów z zespołem metabolicznym, co wynika najprawdopodobniej z ich działania α_1 -adrenolitycznego. Natomiast różnice w działaniu hipoglikemizującym oraz zmniejszającym stężenie triglicerydów we krwi pomiędzy poszczególnymi α_1 -adrenolitykami mogą wynikać z ich odmiennych parametrów farmakokinetycznych, dlatego też określono podstawowe parametry farmakokinetyczne testowanych substancji tj. okres półtrwania, objętość dystrybucji oraz biodostępność po podaniu dożylnym i dootrzewnownym związków MH-76,

MH-79 i porównano z danymi literaturowymi uzyskanymi dla prazosyny [56]. Badania te wykazały, iż okres półtrwania MH-76, MH-79 jest prawie trzykrotnie dłuższy, aniżeli prazosyny, zatem różnicą w okresie półtrwania można częściowo tłumaczyć słabsze efekty metaboliczne prazosyny.

W badaniach wykazano także, iż w tkance tłuszczowej pochodzącej od szczurów otrzymujących fruktozę występuje znacznie podwyższone stężenie TNF- α , jak również podniesione jest stężenie markera peroksydacji lipidów (MDA). MH-76 jako jedyny obniżał stężenie TNF- α i zmniejszał nasilenie peroksydacji lipidów w tkance tłuszczowej. Przyczyna znacznie wyższej efektywności MH-76 w porównaniu do MH-79 oraz prazosyny może mieć charakter farmakodynamiczny, ale może też wynikać z odmiennych właściwości fizykochemicznych/farmakokinetycznych tego związku. Porównując wartości objętości dystrybucji dla związków MH-76 i MH-79 można zauważyć iż wartość tego parametru dla związku MH-76 jest dwukrotnie wyższa aniżeli dla MH-79, dlatego też MH-76 wykazywał silniejsze działanie farmakologiczne aniżeli MH-79 w tkance tłuszczowej. Z kolei przyczyny w odmiennych efektach działania MH-76 i prazosyny można upatrywać w różnicach fizykochemicznych tych substancji (objętość dystrybucji prazosyny jest większa aniżeli MH-76); gdyż logP (współczynnik podziału oktanol/woda) dla MH-76 wynosi 4.5, a dla prazosyny tylko 1.45, zatem prazosyna może w mniejszym stopniu penetrować do tkanki tłuszczowej aniżeli MH-76, mimo większej objętości dystrybucji.

W omawianej pracy jedynie związek MH-76 zmniejszał insulinooporność. Badania nad wpływem α_1 -adrenolityków na insulinooporność przeprowadzone przez inne ośrodki [55], wykazały iż substancje te nie wpływają na insulinooporność. Można zatem przypuszczać, iż inne efekty, niezwiązane z działaniem α_1 -adrenolitycznym, wraz z korzystnymi parametrami farmakokinetycznymi związku MH-76 są odpowiedzialne za korzystne działanie MH-76 zmniejszające insulinooporność. W pracy wykazano iż MH-76 obniżał stężenie TNF- α w tkance tłuszczowej, cytokiny ściśle powiązanej ze stanem zapalnym i insulinoopornością [5,6].

W patogenezie zespołu metabolicznego głównymi czynnikami wyzwalającymi są otyłość brzuszna oraz insulinooporność. Nadmierne spożycie fruktozy skutkuje otyłością brzuszną zarówno u zwierząt laboratoryjnych jak i u ludzi. W wyniku nadmiernej podaży fruktozy dochodzi do przerostu i dysfunkcji adipocytów [5,37], co prowadzi do aktywacji czynnika NF- κ B i produkcji prozapalnych cytokin, m. in. TNF- α , aktywacji rozmaitych kinaz i

produkcji reaktywnych form tlenu [57]. W wyniku produkcji i uwalniania prozapalnych cytokin z adipocytów, tkankę tłuszczową naciekają makrofagi i rozwija się miejscowe a potem także ogólnoustrojowe zapalenie o słabym nasileniu [5,57]. Odkryto, iż zwiększona produkcja TNF- α w tkance tłuszczowej jest ściśle powiązana z insulinoopornością; wykazano iż TNF- α hamuje m.in. wychwyt glukozy przez mięśnie w wyniku aktywacji prozapalnych ścieżek przekazywania sygnału, które hamują działanie insuliny na poziomie białka IRS [58]. Zatem wykazana zdolność związku MH-76 do normalizacji stężenia TNF- α i peroksydacji lipidów w tkance tłuszczowej może być częściowo również mechanizmem jego działania hamującego insulinooporność.

Insulinooporność przyczynia się również do rozwoju dysfunkcji śródbłonna. W warunkach prawidłowych insulina powoduje rozszerzenie naczyń w wyniku aktywacji ścieżki PI3K-Akt, co powoduje nasilenie aktywności eNOS i uwalnianie tlenu azotu przez komórki śródbłonna, co oczywiście przyczynia się do lepszego wychwytu glukozy przez tkanki [8]. Jednak w warunkach insulinooporności ta ścieżka przekazywania sygnału jest upośledzona, a komórki śródbłonna zamiast tlenu azotu produkują endotelinę-1. Ponadto, zwiększone stężenie glukozy we krwi także przyczynia się do rozwoju dysfunkcji śródbłonna. Ponadfizjologiczne stężenie glukozy skutkuje nasilonym procesem nieenzymatycznej glikacji białek, nukleotydów i lipidów a tworzące się końcowe produkty glikacji (AGEs) indukują stres oksydacyjny i zaburzają czynność większości komórek i tkanek ustroju. Związanie się AGEs ze swoistym receptorem dla nasilonych produktów glikacji (RAGE, *receptor for advanced glycation end-products*) na powierzchni komórek śródbłonna staje się sygnałem do wewnątrzkomórkowego tworzenia reaktywnych form tlenu i aktywacji transkrypcji czynników prozapalnych. Reaktywne formy tlenu zmniejszają biodostępność tlenu azotu w wyniku jego degradacji przez anionorodnik ponadtlenkowy [6,8]. Rozwijająca się dysfunkcja śródbłonna skutkuje zmniejszonym przepływem krwi i zmniejszonym wychwytem glukozy przez tkanki, co pogłębia istniejącą patologię.

Badania na izolowanej aorcie pobranej od szczurów otrzymujących fruktozę wykazały osłabienie wazodylatacyjnej odpowiedzi naczynia po podaniu karbacholu, co wskazuje na dysfunkcję śródbłonna. MH-79 oraz MH-76 zmniejszyły dysfunkcję śródbłonna również i w tym doświadczeniu, co jest zgodne ze wcześniejszymi obserwacjami, prezentowanymi w pracach H2 i H3. Prazosyna, również i w tym przypadku nie łagodziła dysfunkcji śródbłonna. Brak działania śródbłonkowego przypuszczalnie nie wynika z różnic farmakokinetycznych między substancjami, gdyż prazosyna nie wykazywała wpływu na działanie śródbłonna

również w badaniach *in vitro* (H2), ponadto objętość dystrybucji dla związku MH-76 oraz prazosyny jest podobna.

Związki MH-76, MH-79 chroniły przed dysfunkcją śródbłónka, przypuszczalnie w wyniku nasilenia produkcji tlenu azotu przez komórki śródbłónka, (co wykazano w pracy H2), co wyjaśnia dlaczego te związki a nie prazosyna poprawiały insulinooporność. MH-76, prawdopodobnie ze względu na dodatkową zdolność do zmniejszania stężenia TNF- α i peroksydacji lipidów w tkance tłuszczowej, okazał się być najskuteczniejszy w odwracaniu wywołanej fruktozą insulinooporności. Dodatkowo, istnieją doniesienia iż TNF- α także przyczynia się do pogłębiania uszkodzenia śródbłónka, w wyniku hamowania protekcyjnego działania insuliny na śródbłonek, a substancje blokujące działanie TNF- α wykazują działanie hamujące insulinooporność oraz ochronne na śródbłonek [6,8,59,60]. Zatem hamujący wpływ MH-76 na stężenie TNF- α może przyczyniać się do jego zdolności do odwracania dysfunkcji śródbłónka i zmniejszania insulinooporności.

W omawianej pracy związek MH-76 okazał się być najkorzystniejszy; hamował rozwój otyłości brzusznej, normalizował hiperglikemię i insulinooporność oraz hipertriglicydemię. Jego korzystne działanie wynika ze zdolności do blokowania receptorów α_1 -adrenergicznych, korzystnych parametrów fizykochemicznych oraz farmakokinetycznych, działania protekcyjnego na śródbłonek, hamującego peroksydację lipidów oraz zmniejszającego stężenie TNF- α w obrębie tkanki tłuszczowej. MH-79 nie wykazał zdolności do zmniejszania stężenia TNF- α w tkance tłuszczowej i mimo działania chroniącego śródbłonek okazał się mniej korzystny, zmniejszał otyłość brzuszną, hiperglikemię i hipertriglicydemię ale nie normalizował insulinooporności w takim stopniu jak MH-76. Zatem w mechanizmie działania MH-76, obok działania śródbłonkowego, jego aktywność anty-TNF- α oraz antyoksydacyjna, wraz z korzystnymi parametrami farmakokinetycznymi decyduje o jego wysokiej skuteczności w znoszeniu zaburzeń metabolicznych. Natomiast niższa skuteczność prazosyny może być wynikiem jej niekorzystnych właściwości farmakokinetycznych oraz brakiem opisywanych efektów plejotropowych, które są istotne w mechanizmie działania MH-76 oraz MH-79. Praca wskazuje również na potencjalne korzyści jakie może przynieść stosowanie α_1 -adrenolityków o plejotropowych efektach w leczeniu nadciśnienia współistniejącego z zaburzeniami metabolicznymi.

H5 – **Monika Kubacka**, Natalia Szkaradek, Szczepan Mogilski, Katarzyna Pańczyk, Agata Siwek, Anna Gryboś, Barbara Filipek, Paweł Żmudzki, Henryk Marona, Anna Maria Waszkielewicz. Design, synthesis and cardiovascular evaluation of some aminoisopropanoloxo derivatives of xanthone. *Bioorg Med Chem.* 2018 Jul 30;26(13):3773-3784.

(Elsevier; IF₂₀₁₈ = 2.881; MNiSW₂₀₁₈ = 25 pkt)

Ostatnia praca cyklu dotyczy aktywności krążeniowej nowo-zsyntezowanych związków hybrydowych, w których do układu ksantonu wprowadzono układy farmakoforowe występujące w strukturach znanych β -blokerów: karwedilolu, nadololu oraz antagonisty kanałów wapniowych, werapamilu. Badaniami objęto grupę 8 związków, wśród których związki 1 i 3 to ksantonowe analogi nadololu, związek 6 to analog karwedilolu, a związek 7 zawiera układ charakterystyczny dla werapamilu.

Badania radioreceptorowe wykazały iż związki te wykazują powinowactwo do receptorów α_1 -i lub β_1 -adrenergicznych, przy czym związki 1, 3 i 4, wiązały się głównie z receptorami β_1 -, nie wykazując lub wykazując znacząco mniejsze powinowactwo do receptorów α_1 -adrenergicznych, związki 2 i 8 wykazały najwyższe powinowactwo do receptorów α_1 -adrenergicznych, natomiast pozostałe związki (5, 6, 7) wiązały się zarówno z receptorami α_1 -jak i β_1 -adrenergicznymi. Żadna z substancji nie wykazała istotnego powinowactwa do receptorów α_2 -adrenergicznych.

W kolejnym etapie badań określono aktywność wewnętrzną w stosunku do receptorów α_1 -adrenergicznych dla tych związków które w badaniach radioreceptorowych najsilniej wiązały się z tymi receptorami (związki 2, 5, 6, 8). Wykorzystano tutaj model izolowanej aorty szczura stymulowanej fenylefryną. Badanie to wykazało iż związki te są antagonistami receptorów α_1 -adrenergicznych.

W dalszym etapie badań oznaczono hamujący wpływ związków na bronchodylatoryjne działanie izoprenaliny, wykorzystując izolowaną tchawicę świnki morskiej. Badanie to miało na celu sprawdzić czy związki mają zdolność blokowania receptorów β_2 -adrenergicznych. Badanie to zostało przeprowadzone dla substancji które wykazały powinowactwo do receptorów β_1 -adrenergicznych i wykazało iż związki 1, 3-7 są antagonistami receptorów β_2 -adrenergicznych.

Ażeby potwierdzić iż związki 1, 3-7 mają zdolność blokowania receptorów β_1/β_2 *in vivo* przeprowadzono dla tych substancji test hamowania tachykardii wywołanej izoprenalina. Wszystkie przebadane związki zmniejszyły tachykardię indukowaną izoprenalina, przy czym najsilniejsze działanie blokujące chronotropowy efekt dodatni wywołany izoprenalina wykazał związek 3, co zgodne jest z jego najwyższym powinowactwem do receptorów β_1 -adrenergicznych wśród badanych substancji. Warto również nadmienić, że związek 3 był już wcześniej opisywany i wstępnie badany w innych testach farmakologicznych w postaci wolnej zasady [61]. Natomiast do opisywanych tu badań farmakologicznych został przekazany jako chlorowodorek.

Dodatkowo, dla związku 7, analogu werapamilu przeprowadzono badanie oceniające jego zdolność do hamowania napływu jonów wapnia przez napięciowo zależne kanały wapniowe. Wykorzystano tutaj izolowaną aortę szczura stymulowaną depolaryzującym roztworem KCl, a jako związku odniesienia użyto werapamilu. Związek 7 powodował rozkurcz izolowanej aorty szczura stymulowanej KCl (60 mM), jednak jego zdolność do hamowania prądu wapniowego, wyrażona jako IC_{50} była ok. 1000 x mniejsza aniżeli werapamilu, co wskazuje, że związek 7 posiada tylko słabe zdolności hamowania prądów wapniowych.

Podsumowując przeprowadzone badania dotyczące profilu receptorowego związków 1-8 można stwierdzić, iż związki 2 i 8 to substancje selektywnie blokujące receptory α_1 -adrenergiczne, związki 1, 3, 4, 7 to nieselektywne β -blokery, natomiast związki 5 i 6 wykazują profil działania zbliżony do karwedilolu i zdolność do blokowania receptorów α_1 - oraz β -adrenergicznych.

Dalszy etap badań to ocena działania hipotensyjnego po jednokrotnym, dożylnym podaniu. Najsilniejsze działanie hipotensyjne wykazał związek 8, który zaliczony został do selektywnych α_1 -adrenolityków, a w badaniach receptorowych wykazał najwyższe, spośród badanych substancji powinowactwo do receptorów α_1 -adrenergicznych. Również znaczące działanie hipotensyjne wykazał związek 2, podobnie jak związek 8 o selektywnym działaniu α_1 -adrenolitycznym. Z drugiej strony związki o nieselektywnym działaniu blokującym receptory β_1/β_2 -adrenergiczne (1, 4), nie wykazały znaczącego działania hipotensyjnego, wręcz przeciwnie, początkowo zwiększały one ciśnienie tętnicze. Przyczyną obserwowanego efektu presyjnego może być zdolność związków do blokady receptorów β_2 -adrenergicznych znajdujących się w mięśniach gładkich naczyń i wzrost oporu obwodowego. Z kolei związek 3, najsilniejszy z badanych β -blokerów, pod koniec godzinowego okresu obserwacji

wywoływał spadek ciśnienia tętniczego, najprawdopodobniej w wyniku spadku rzutu serca i działania chronotropowo ujemnego, na co wskazują wyniki badania EKG, przeprowadzone dla związku 3 w analogicznej dawce. Związek 7 także wykazał istotne działanie hipotensyjne, prawdopodobnie w wyniku blokady receptorów adrenergicznych oraz kanałów wapniowych. Związki 5 i 6, analogi karwedilolu, również wykazały istotne działanie hipotensyjne, a mechanizm tego działania polega z jednej strony na blokadzie receptorów α_1 -adrenergicznych w mięśniówce gładkiej naczyń krwionośnych, co skutkuje spadkiem oporu obwodowego, a z drugiej strony na blokadzie receptorów β -adrenergicznych i zmniejszeniem pojemności minutowej serca. Opisujący tu mechanizm działania pozwala zaklasyfikować związki 5 i 6 jako β -blokery z komponentą naczyniorozszerzającą. Takie substancje są szeroko stosowane w leczeniu chorób sercowo-naczyniowych, m. in. nadciśnienia i ze względu na unikatowy profil działania są szczególnie cenne. β -blokery trzeciej generacji posiadają unikalne właściwości, m.in. – dzięki zablokowaniu receptorów α_1 -adrenergicznych – zmniejszają opór obwodowy, redukują insulinooporność i poprawiają kontrolę glikemii oraz zmniejszają stężenie triglicerydów we krwi, a zatem nie wykazują metabolicznych działań niepożądanych charakterystycznych dla β -blokerów wcześniejszych generacji. Z drugiej strony blokada sercowych receptorów β -adrenergicznych przeciwdziała charakterystycznej dla niektórych leków blokujących receptory α_1 -adrenergiczne tachykardii kompensacyjnej [62].

Leki blokujące receptory adrenergiczne są także cennymi lekami przeciwarytmicznymi, szczególnie w arytmiiach wywołanych zwiększoną aktywnością układu współczulnego, w mechanizmie nadmiernej aktywności ośrodka ektopowego czy automatyzmu wyzwalanego. Te mechanizmy związane są z nadmierną ilością amin katecholowych i charakterystyczne są dla zaburzeń rytmu serca występujących po zawale mięśnia sercowego i związanych z niedokrwieniem mięśnia sercowego [4,63,64]. Dlatego też sprawdzono potencjalną aktywność przeciwarytmiczną badanych związków w modelu arytmii indukowanej adrenaliną. Najsilniejsze działanie przeciwarytmiczne wykazały związki 3, 5 oraz 8. Aktywność przeciwarytmiczna związków 3 i 5 była zbliżona do propranololu, na co wskazują podobne wartości EC_{50} i wynika z ich działania blokującego receptory β - (związek 3) oraz α_1 -/ β -adrenergiczne. Nieco słabsze, ale również istotne działanie przeciwarytmiczne wykazał związek 8, który charakteryzował się selektywnym działaniem α_1 -adrenolitycznym. W interpretacji tych wyników należy wziąć pod uwagę iż w sercu szczura receptory α_1 -adrenergiczne znajdują się w znacznie większej gęstości aniżeli w sercu człowieka a ich

blokada normalizuje poziom wapnia w kardiomiocytach i wywiera działanie przeciwaritmiczne. Dlatego też, związki o działaniu α_1 -adrenolitycznym wykazują znaczącą aktywność przeciwaritmiczną u tego gatunku [65, B6].

W celu wychwycenia możliwych działań niepożądanych badanych związków, a także wykluczenia potencjalnego działania proarytmicznego związanego z wydłużeniem odstępu QT dokonano oceny ich wpływu na zapis EKG. Badania tego dokonano po dożylnym podaniu związków, w najwyższej stosowanej dawce. Badane związki, poza 4 i 7 nie wpływały na czas trwania odcinka PQ, zespołu QRS oraz odstępu QT. Co istotne, związki 2 i 8, o selektywnym działaniu α_1 -adrenolitycznym nie wpływały na częstotliwość akcji serca, a zatem nie wywoływały one tachykardii kompensacyjnej. Pozostałe związki (1,3,4,5,6,7) o działaniu blokującym receptory beta-adrenergiczne zmniejszały częstotliwość akcji serca. Efekt chronotropowy ujemny był mniej nasilony po podaniu związków 5 i 6, które wykazały działanie blokujące receptory α_1/β -adrenergiczne, co wynika z przeciwstawnych efektów blokady receptorów α_1 - oraz β -adrenergicznych na częstotliwość akcji serca. Natomiast, w przypadku związków 4 i 7 obserwowanej bradykardii towarzyszyło wydłużenie odstępu PQ w zapisie EKG. Zjawisko to może być wyjaśnione faktem iż β -blokery w wysokich dawkach, a także antagoniści kanałów wapniowych mogą wydłużać czas przewodzenia impulsów z przedsionków do komór, co manifestuje się wydłużeniem odstępu PQ w zapisie EKG [66]. Żaden z badanych związków nie wydłużał czasu trwania zespołu QRS ani odcinka QT, co wskazuje iż substancje te nie wpływają ani na depolaryzację ani na repolaryzację komór, a zatem w testowanych dawkach nie wykazują proarytmicznych właściwości.

Na koniec, ponieważ istnieją doniesienia iż pochodne ksantonu wykazują właściwości antyagregacyjne [67] sprawdzono, czy badane pochodne również takie właściwości wykazują. Związki 1-6 oraz 8 hamowały dawkozależnie agregację płytek wywołaną kolagenem. Dwa związki o najsilniejszym działaniu przeciwpłytkowym (3 oraz 5) zbadano dodatkowo w modelu agregacji wywołanej adrenaliną i podprogowym stężeniem kolagenu, jednakże otrzymane wartości IC_{50} były wyższe aniżeli w modelu agregacji wywołanej samym kolagenem, co wskazuje, że inne, nie związane z receptorami adrenergicznymi mechanizmy są zaangażowane w antyagregacyjne efekty badanych związków. Co interesujące, karwedilol, w żadnym z przeprowadzonych modeli agregacji nie wykazał działania hamującego agregację płytek.

Podsumowując, wyniki opisywanej pracy wykazały iż przebadane pochodne ksantonu wykazują działanie hipotensyjne a niektóre także przeciwarrytmiczne. Ponadto, badane związki w testowanych dawkach nie wpływają na czas trwania zespołu QRS oraz odstępu QT. Ich mechanizm działania zbliżony jest do macierzystych związków i polega na działaniu antagonistycznym wobec receptorów α_1 -adrenergicznych (2,8), α_1 - oraz β -adrenergicznych (5,6), β -adrenergicznych (związki 1,3,4) oraz działaniu β -adrenolitycznym i blokującym prądy wapniowe (związek 7). Wprowadzenie ugrupowania ksantonu do struktury znanych β -blokerów osłabia z jednej strony ich działanie hipotensyjne oraz przeciwarrytmiczne, z drugiej znowu strony niesie za sobą dodatkowe korzystne właściwości, którego nie wykazują macierzyste struktury tj. działanie antyagregacyjne.

4.3.4. Podsumowanie oraz omówienie ewentualnego wykorzystania otrzymanych wyników

Na podstawie wyników badań, których rezultatem jest cykl publikacji, będący podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego, można wyciągnąć następujące wnioski:

- Związki MH-76, MH-77 oraz MH-77 wykazują działanie antyagregacyjne poprzez hamowanie płytkowych receptorów 5-HT_{2A} serotonergicznym oraz/lub α_{2A}/α_{2B} -adrenergicznych.
- MH-76 oraz MH-79 oprócz działania α_1 -adrenolitycznego wykazują także zdolność do zwiększania uwalniania tlenu azotu przez śródbłonek czego następstwem jest aktywacja sGC i zwiększenie stężenia cGMP oraz otwarcie kanałów potasowych. Prazosyna nie wpływa na wydzielanie NO a jej działanie naczyniorozszerzające nie jest zależne od śródbłonek.
- MH-76 i MH-79 wykazały znamienne działanie hipotensyjne i zmniejszające remodeling serca w modelu nadciśnienia wywołanego DOCA i sodem. Działanie protekcyjne związków można przypisać ich efektowi hipotensyjnemu wynikającemu z działania α_1 -adrenolitycznego i z działania hamującego aktywność układu współczulnego. Prazosyna wykazała silne działanie hipotensyjne i hamujące włóknienie serca, ale nie zmniejszała hipertrofii serca, przypuszczalnie wskutek

wtórnej stymulacji układu współczulnego, na co wskazuje wzrost stężenia noradrenaliny w osoczu i wyższa częstotliwość akcji serca.

- W modelu nadciśnienia wywołanego DOCA i sodem MH-79 znacząco zmniejszał dysfunkcję śródbłonna, przez co zmniejszał naciek komórek zapalnych w obrębie nerek i ich włóknienie oraz hamował rozwój zmian miażdżycowych i innych arteriopatii naczyń sercowych i nerkowych. Prazosyna, pomimo silnego działania hipotensyjnego i związanych z tym korzyści ujawniła niekorzystny wpływ na naczynia wieńcowe (mineralizacja) i nerkowe (włóknienie). Prazosyna nie zmniejszała dysfunkcji śródbłonna.
- W modelu zespołu metabolicznego wywołanego fruktozą MH-76 okazał się być najkorzystniejszy; hamował rozwój otyłości brzusznej, normalizował hiperglikemię i insulinooporność oraz hipertriglicydemię. Jego korzystne działanie wynika ze zdolności do blokowania receptorów α_1 -adrenergicznych, korzystnych parametrów farmakokinetycznych, działania protekcyjnego w obrębie śródbłonna, działania antyoksydacyjnego oraz zmniejszającego stężenie TNF- α i peroksydację lipidów w obrębie tkanki tłuszczowej.
- Przebadane pochodne ksantonu wykazały działanie hipotensyjne a niektóre również przeciwoarytmiczne. Ich mechanizm działania zbliżony jest do wyjściowych związków (karwedilol, nadolol, werapamil) i polega na działaniu antagonistycznym wobec receptorów α_1 - i/lub β -adrenergicznych, a wprowadzenie ugrupowania ksantonu do struktury macierzystych związków te właściwości osłabia. Z drugiej strony, wprowadzenie ugrupowanie ksantonu niesie za sobą dodatkowe działanie antyagregacyjne badanych pochodnych, którego macierzyste związki nie wykazują

Przeprowadzone badania wykazały również

- Aktywność antyagregacyjną antagonistów nie tylko receptorów α_{2A} - ale także α_{2B} -adrenergicznych (związek ARC239),
- Aktywność antyagregacyjną prazosyny, której mechanizmem może być blokada płytkowych receptorów α_{2B} -adrenergicznych
- Potencjalne możliwości jakie niesie za sobą zastosowanie antagonistów receptorów 5-HT $_{2A}$ oraz α_{2B} -adrenergicznych w sytuacjach związanych z nadmierną, patologiczną

aktywnością płytek krwi, zwłaszcza w przypadku oporności na aspirynę lub pochodne tienopirydyny

- Korzyści jakie niesie za sobą obok działania α_1 -adrenolitycznego, dodatkowe działanie protekcyjne w obrębie śródbłonka w przypadku nadciśnienia tętniczego oraz zaburzeń metabolicznych w porównaniu do selektywnej blokady receptorów α_1 -adrenrenergicznych

Przeprowadzone badania kwalifikują się do badań podstawowych i przedstawiają oryginalne eksperymentalne prace badawcze, mające na celu zdobycie nowej wiedzy z zakresu farmakologii eksperymentalnej oraz chemii farmaceutycznej. Uzyskane wyniki mogą pomóc w stworzeniu nowych, skutecznych związków hipotensyjnych, o korzystniejszym profilu działania, które obok działania hemodynamicznego posiadają dodatkowe właściwości plejotropowe, takie jak działanie antyagregacyjne, aktywność śródbłonkowa, działanie przeciwzapalne i antyoksydacyjne oraz korzystny wpływ na gospodarkę węglowodanową i lipidową. Poszerzone badania farmakologiczne pozwoliły określić interesującą aktywność związków MH-76 oraz MH-79 o działaniu hemodynamicznym i dodatkowych właściwościach plejotropowych, co czyni je korzystniejszymi od substancji działających tylko antagonistycznie wobec receptorów α_1 -adrenrenergicznych. Związki MH-76, MH-79 można traktować jako struktury modelowe w procesie poszukiwania nowych leków mogących znaleźć zastosowanie w leczeniu nadciśnienia oraz zaburzeń metabolicznych.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

5.1. Aktywność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

W trakcie studiów farmaceutycznych na Wydziale Farmaceutycznym UJ CM zainteresowałam się tematyką poszukiwania związków biologicznie aktywnych oraz określaniem ich mechanizmów działania. Na IV roku studiów zapisałam się do Koła Farmakologicznego działającego przy Katedrze Farmakodynamiki UJ CM, gdzie zapoznawałam się z metodyką badań na zwierzętach. Moja praca w ramach Koła Farmakologicznego została wyróżniona; w 2001 r. podczas **39 International Medical**

Student's Conference w Krakowie zdobyłam wyróżnienie za pracę pt.: "Wstępna ocena farmakologiczna wpływu na układ krążenia nowych chiralnych pochodnych ksantonu".

Badania nad aktywnością przeciwartmniczną nowo-zsyntezowanych związków – aminoalkoholowych pochodnych ksantonu stały się podstawą mojej pracy magisterskiej pt." Ocena wpływu na układ sercowo-naczyniowy nowych chiralnych i achiralnych ksantonowych aminoalkoholi", którą obroniłam z wyróżnieniem w 2002 r.

Bezpośrednio po zakończeniu studiów rozpoczęłam pracę w Katedrze Farmakodynamiki UJ CM na etacie asystenta. W latach 2003-2011 **kierowałam projektami dla młodych naukowców** finansowanym przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, pt.:

- „Oznaczenie aktywności farmakologicznej terpenoidowych pochodnych piracetamu i kwasu γ -aminomasłowego”, 2003-2005
- „Ocena wpływu nowych pochodnych aminowych oraz aminoalkanolowych na układ sercowo – naczyniowy”, 2006 –2008
- „Ocena aktywności farmakologicznej pochodnych piperazyny ze szczególnym uwzględnieniem wpływu na układ krążenia”, 2009 – 2011

Efektom tych badań były publikacje dotyczące aktywności przeciwdrgawkowej terpenowych analogów GABA [A1], jak również dotyczące działania przeciwdrgawkowego i przeciwbólowego w grupie benzyłowych pochodnych mocznika [A2,B1]. Moje zainteresowania naukowe koncentrowały się głównie jednak na farmakologii układu krążenia. W dalszych badaniach naukowych kontynuowałam poszukiwania aktywnych krążeniowo związków w grupie aminowych pochodnych ksantonu oraz piperazyny, a wyniki tych badań zostały opublikowane [A3].

Kontynuując prace badawcze i rozwijając swoje zainteresowania farmakologią układu sercowo-naczyniowego i rolą układu adrenergicznego w fizjologii i patofizjologii krążenia poszerzyłam swoje umiejętności badawcze o metody wykorzystujące narządy izolowane. We współpracy z pracownikami Katedry Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych zbadałam aktywność wewnętrzną serii nowo-zsyntezowanych arylopiperazynowych pochodnych fenytoiny w odniesieniu do receptorów α_1 -adrenergicznych, czego efektem była kolejna publikacja [A4].

Ponieważ pochodne arylopiperazynowe wykazują znaczne powinowactwo do receptorów α_1 -adrenergicznych i związaną z nimi aktywność krążeniową, dalsze prace badawcze nad

nowymi związkami o potencjalnym działaniu krążeniowym prowadziłam właśnie w tej grupie chemicznej. Związki te zostały zsyntezowane w Zakładzie Chemii Bioorganicznej przez prof. dr hab. Henryka Maronę. Badania ich aktywności w obrębie układu krążenia stały się podstawą mojej rozprawy doktorskiej, zatytułowanej "Badania farmakologiczne wybranych pochodnych piperazyny o potencjalnym działaniu krążeniowym", którą **obroniłam w wyróżnieniem** w 2010 roku. W pracy tej wykazałam znaczącą aktywność hipotensyjną i przeciwartmicyzną 6 z 8 przebadanych związków i wyjaśniłam ich mechanizm działania.

Podsumowanie dorobku naukowego przed otrzymaniem stopnia doktora:

Liczba publikacji: **4**

Łączny *impact factor* : **7,644**

Łączna liczba punktów MNiSW: **70 pkt**

5.2. Aktywność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora (badania już zakończone oraz aktualnie prowadzone)

Uzyskane w pracy doktorskiej wyniki zostały opublikowane w latach 2011-2013 [B4, B5, B6]. Aktywność wybranych pochodnych piperazynowych została również opatentowana:

Henryk Marona, Barbara Filipek, Monika Kubacka, Gabriel Nowak, 2014, Patent nr PL385662 (A1), Patent nr PL 215845 (B1) A61K 31/495 A61P 9/06 A61P 9/12 A61P 25/00 C07D 295/088 C07D 295/096 na wynalazek pt. Pochodne 1-(aroksyalkilo)-4-2(metoksyfenylo)piperazyny i ich zastosowania. Zakres terytorialny ochrony patentowej: Polska, Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej, Warszawa dn. 28. 02. 2014 WUP 02/14

W dalszym ciągu moja działalność naukowa koncentrowała się wokół związków o aktywności krążeniowej. Kontynuowałam zatem eksperymenty dla najbardziej aktywnych związków wyselekcjonowanych w ramach pracy doktorskiej.

W roku 2014 mój projekt pt.: „Antagoniści receptora alfa1-adrenergicznego oraz 5-HT2A serotoninergicznego o niechinazolinowej budowie i plejotropowych efektach jako nowa perspektywa leczenia nadciśnienia i zespołu metabolicznego” otrzymał finansowanie z

Narodowego Centrum Nauki (**Projekt SONATA 8: DEC-2014/15/D/NZ7/01807 - Kierownik projektu**). Przeprowadzone w ramach projektu prace badawcze dotyczyły najaktywniejszych związków wyselekcjonowanych w trakcie pracy doktorskiej a poszerzone badania nad ich aktywnością farmakologiczną stały się podstawą niniejszej pracy habilitacyjnej [H1, H2, H3, H4]. Wyniki eksperymentów zostały szczegółowo opisane w punkcie 4.3 niniejszego autoreferatu. Dzięki współpracy z dr Moniką Zadroźną z Zakładu Cytobiologii Katedry Farmakobiologii UJ CM, kierowanej przez prof. dr hab. Gabriela Nowaka możliwe było przeprowadzenie szczegółowych badań histopatologicznych (praca H3), a dzięki współpracy z dr Małgorzatą Szafarz z Zakładu Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej UJ CM, kierowanego przez dr hab. Elżbietę Wyskę, prof. UJ możliwe było oznaczenie parametrów farmakokinetycznych badanych związków (praca H4).

Badania farmakologiczne w grupie pozostałych pochodnych arylopiiperazyny wykonywałam w ramach 2 projektów finansowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego:

- **Projekt K/DSC/000794**, 2012-2014 „Ocena właściwości farmakologicznych wybranych pochodnych piperazyny ze szczególnym uwzględnieniem ich aktywności krążeniowej, ośrodkowej oraz wpływu na łagodny rozrost prostaty” – kierownik projektu
- **Projekt K/ZDS/006235**, 2016-2018 „Poszerzone badania nad mechanizmem działania na układ sercowo-naczyniowy aryloksyalkilowych pochodnych arylopiiperazyny oraz arylopiiperazynowych pochodnych hydantoiny” – kierownik projektu

Badania przeprowadzone w ramach powyższych projektów dotyczyły oceny selektywności 5-HT_{1A}/α₁ [B2] oraz 5-HT₇/α₁ [B7] w grupie arylopiiperazynowych pochodnych hydantoiny i były wykonane dzięki współpracy z dr hab. Jadwigą Handzlik z Katedry Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych UJ CM kierowanej przez prof. dr hab. Katarzynę Kieć-Kononowicz. Również w ramach tych projektów zbadano szczegółowo mechanizm działania wybranego antagonisty receptorów α₁- i β-adrenergicznych z grupy pochodnych piperazyny [B10], zsyntezowanego przez prof. dr hab. Henryka Maronę z Zakładu Chemii Bioorganicznej UJ CM.

Ponieważ pochodne arylopiiperazyny mogą być także ligandami receptorów serotonergicznych 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₃ w ośrodkowym układzie nerwowym,

przeprowadzono badania oceniające obok aktywności krążeniowej również ich aktywność ośrodkową, ze szczególnym uwzględnieniem działania przeciwdepresyjnego i przeciwlękowego związanego z wpływem na poszczególne receptory serotonergiczne [B14]. Kolejne prace o podobnej tematyce powstały we współpracy z dr hab. Anną Waszkielewicz z Zakładu Chemii Bioorganicznej UJ CM [B12] oraz dr Anną Czopek z Katedry Chemii Farmaceutycznej kierowanej przez prof. dr hab. Macieja Pawłowskiego [B15]. Prace te wykonano w ramach wymienionych wyżej projektów naukowych.

Nawiązano także współpracę z pracownikami Zakładu Farmacji Klinicznej UJ CM, kierowanym przez prof. dr hab. Annę Wesołowską. W ramach tej współpracy oznaczono aktywność wewnętrzną wobec receptorów 5-HT₃ serotonergicznym związku EMD 386088 o działaniu anksjolitycznym [B9].

Poszukując nowych związków o potencjalnym działaniu hipotensyjnym i/lub przeciwartmicznym wraz ze współpracownikami Katedry Farmakodynamiki UJ CM przeprowadzono badania, które zaowocowały publikacjami; w grupie nowych pochodnych ksantenu, zsyntezowanych w Zakładzie Chemii Bioorganicznej UJ CM, we współpracy z dr hab. Anną Rapacz [B8] oraz w grupie pochodnych piperolidyn-2-onu, we współpracy z prof. dr hab. Jackiem Sapą [B3].

Pozostając w obrębie związków aktywnych krążeniowo nawiązano współpracę z dr hab. Mariuszem Mojzychem z Wydziału Chemii, Uniwersytetu Przyrodniczo-Humanistycznego w Siedlcach. W wyniku tej współpracy otrzymano grupę pochodnych sildenafilu, których aktywność naczyniorozszerzająca i jej mechanizm były przedmiotem kolejnej publikacji [B13].

W ramach projektów badawczych prowadzonych ze współpracownikami Katedry Farmakodynamiki rozpoczęto eksperymenty mające na celu znalezienie związków o działaniu przeciwbólowym i przeciwzapalnym. We współpracy z dr Szczepanem Mogilskim poszukiwano nowych struktur o potencjalnym działaniu przeciwbólowym i przeciwzapalnym w grupie pochodnych pyrrolo[3,4-d]pirydazynonu oraz wyjaśniano ich mechanizm działania [B11].

W latach 2010-2013 byłam wykonawcą w projekcie współfinansowanym z Narodowego Centrum Badań i Rozwoju, z udziałem firmy Adamed, pt.: „Opracowanie innowacyjnego leku stosowanego w terapii schorzeń ośrodkowego układu nerwowego (OUN) – schizofrenii,

depresji, lęku” (**Projekt KB/88/12655/IT1-C/U/08, 2007-2013**), kierowanym przez dr hab. Marcina Kołaczekowskiego. Moje zadanie badawcze polegało na ocenie działania cholinolitycznego i przeciwhistaminowego wybranych struktur w oparciu o techniki wykorzystujące m. in. narządy izolowane. Celem tych badań było wyeliminowanie związków o silnym działaniu cholinolitycznym z dalszych badań i poszukiwań potencjalnego leku w terapii schorzeń ośrodkowego układu nerwowego, gdyż działanie cholinolityczne niesie ze sobą wiele działań niepożądanych, takich jak: suchość w jamie ustnej, zaburzenia widzenia, utrudnione oddawanie moczu, zaparcia, tachykardia i przede wszystkim nieakceptowalne upośledzenie funkcji poznawczych [68]. Z kolei działanie antagonistyczne wobec receptorów H1 związane jest z silnym działaniem nasennym i uspokajającym i może także częściowo odpowiadać za szybki wzrost masy ciała obserwowany po lekach przeciwpsychotycznych [69]. Zadaniem moim było w tym projekcie wychwycenie związków o silnym działaniu cholinolitycznym i/lub przeciwhistaminowym z jednej strony, a z drugiej wskazanie substancji pozbawionych działania cholinolitycznego, a zatem również potencjalnych działań niepożądanych związanych z tym mechanizmem.

W latach 2010-2013 uczestniczyłam również w projekcie współfinansowanym ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka pt.: „Opracowanie innowacyjnej grupy związków o aktywności stabilizującej potencjał błony komórkowej” (**Projekt POIG.01.01.02-12-012/09-00, 2010-2013**). Moje zadanie badawcze polegało na ocenie wpływu na układ sercowo-naczyniowy wybranych związków w ramach zadań farmakologii bezpieczeństwa, a także określeniu ich działania miejscowo-znieczulającego. W ostatnich kilku dekadach wiele leków zostało wycofanych z rynku, ze względu na niekorzystne działania niepożądane w obrębie układu sercowo-naczyniowego [70]. Dlatego tak ważne jest oznaczanie potencjalnych działań niepożądanych dla nowych substancji z udokumentowaną skutecznością farmakologiczną.

W latach 2013-2015 byłam oraz od roku 2018 jestem wykonawcą części badań farmakologicznych w dwóch **projektach OPUS**, finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki, otrzymanych przez współpracowników Katedry Farmakodynamiki UJ CM pt.:

- „Badanie aktywności farmakologicznej nowych, nioselektywnych inhibitorów transportu zwrotnego kwasu gamma-aminomasłowego (GABA) w wybranych modelach behawioralnych z wykorzystaniem sztucznej inteligencji jako metody

analizy i klasyfikacji zachowań oraz predykcji efektywnych i toksycznych przedziałów dawkowania” (**OPUS 3: DEC-2012/05/B/NZ7/02705**), kierownik dr hab. Kinga Sałat

- Analiza i ocena skuteczności działania anorektycznego oraz bezpieczeństwa nowych ligandów receptora H3 histaminowego (**OPUS 11: 2016/23/B/NZ7/01063**), 2017-2020, kierownik dr hab. Magdalena Kotańska

W obu projektach moje zadanie badawcze obejmowało przeprowadzenie oceny bezpieczeństwa stosowania potencjalnych środków leczniczych i ich wpływu na układ sercowo-naczyniowy. Wyniki tych badań są częściowo w trakcie procedury związanej z uzyskaniem patentu, a częściowo są opracowywane i przygotowywane do publikacji.

W latach 2012-2018 byłam wykonawcą części badań farmakologicznych w **Projekcie MAESTRO 1: DEC-2011/02/A/NZ4/00031**, - “Receptory H3/H4 histaminowe jako atrakcyjny cel poszukiwań substancji biologicznie aktywnych”, finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki i kierowanym przez prof. dr hab. Katarzynę Kieć-Kononowicz z Katedry Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych UJ CM. Rezultatem badań przeprowadzonych w ramach tego grantu były prace B16, dotycząca działania przeciwbólowego i przeciwzapalnego ligandów receptorów H₄, a także prace B17 oraz B19, dotyczące aktywności farmakologicznej wybranych ligandów receptora H₃-histaminowego.

W związku z otrzymaniem finansowania własnego projektu z Narodowego Centrum Nauki, możliwością zakupu odpowiedniej aparatury i podniesieniu warsztatu badawczego, kolejnym kierunkiem moich zainteresowań badawczych było poszukiwanie związków o właściwościach antyagregacyjnych i wyjaśnianie mechanizmu tego działania. Prace badawcze prowadzone były wraz z dr hab. Magdaleną Kotańską z Katedry Farmakodynamiki UJ CM oraz dr hab. Agnieszką Zagórką i dr Moniką Marcinkowską z Katedry Chemii Farmaceutycznej UJ CM. Efektem tej współpracy są dwie prace [B18, B20], w których zademonstrowane zostały aktywne związki i wyjaśniony został ich mechanizm działania. Równocześnie rozpoczęłam badania nad aktywnością antyagregacyjną antagonistów receptorów 5-HT_{2A} w ramach grantu SONATA pt.: „Synteza i badania farmakologiczne nowych pochodnych benzizoksazolopropylopirolidyny jako wielofunkcyjnych ligandów o potencjalnych właściwościach prokognitywnych i przeciwpsychotycznych” (**Projekt**

SONATA 8: DEC-2014/15/D/NZ7/01789), finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki i kierowanego przez dr Monikę Marcinkowską z Katedry Chemii Farmaceutycznej UJ CM.

Podsumowując, do chwili obecnej brałam udział łącznie w 12 projektach naukowych, w tym: 5 grantach finansowanych z NCN (1 jako kierownik projektu – konkurs SONATA), 1 grantie dofinansowanym przez POIG, oraz 5 projektach własnych/statutowych na utrzymanie potencjału badawczego, finansowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego jako kierownik projektu. Brałam również udział w projekcie współfinansowanym przez NCBiR oraz firmę ADAMED jako kierownik zadania (dokładne informacje zawarłam w załączniku 7).

Od 2011 roku sprawowałam opiekę naukową nad 11 magistrantami podczas wykonywania prac magisterskich (szczegóły w załączniku 7), a jedna z prac, prezentowana podczas Ogólnopolskiego Kongresu Polskiego Towarzystwa Studentów Farmacji otrzymała III miejsce. Opiekuję się również studentami Farmakologicznego Koła Naukowego działającego przy Katedrze Farmakodynamiki UJ CM.

Otrzymałam również Nagrodę Dziekana Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum za działalność naukową w roku 2015 (załącznik 7). Współpracuję naukowo z kilkoma ośrodkami badawczymi (dokładne informacje zawarłam w załączniku 7).

Podsumowanie dorobku naukowego po otrzymaniu stopnia doktora (z wyłączeniem publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe):

Liczba publikacji: **20**

Łączny *impact factor* : **52,201**

Łączna liczba punktów MNiSW: **506**

5.3 Podsumowanie całego dorobku naukowego

Łączna liczba publikacji: **29**, w tym:

- publikacje znajdujące się w bazie Journal Citation Reports z *impact factor*: **28**
- publikacje znajdujące się w bazie Journal Citation Reports bez *impact factor*: **1**

Łączny *impact factor* : **75.98**

Łączna liczba punktów MNiSW: **711**

Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science: **237**

Indeks Hirscha według bazy Web of Science: **10**

Liczba projektów badawczych: **12**, w tym:

- Kierownik projektu: **6**
- Wykonawca: **6**

Łączna ilość streszczeń ze zjazdów: **48**, w tym:

- Międzynarodowych: 3
- Krajowych o zasięgu międzynarodowym: 37
- Krajowych: 8

(Dane na dzień 17.04.2019)

6. Piśmiennictwo

1. Pessina AC, Ciccariello L, Perrone F, Stoico V, Gussoni G, Scotti A, Muggeo M. Clinical efficacy and tolerability of alpha-blocker doxazosin as add-on therapy in patients with hypertension and impaired glucose metabolism. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2006 Mar;16(2):137-47.
2. Seravalle G, Grassi G. Obesity and hypertension. *Pharmacol Res.* 2017 Aug;122:1-7. doi: 10.1016/j.phrs.2017.05.013.
3. Landsberg L, Aronne LJ, Beilin LJ, Burke V, Igel LI, Lloyd-Jones D, Sowers J. Obesity-related hypertension: pathogenesis, cardiovascular risk, and treatment: a position paper of The Obesity Society and the American Society of Hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2013 Jan;15(1):14-33. doi: 10.1111/jch.12049.
4. Manolis AJ, Poulimenos LE, Kallistratos MS, Gavras I, Gavras H. Sympathetic overactivity in hypertension and cardiovascular disease. *Curr Vasc Pharmacol.* 2014 Jan;12(1):4-15.
5. Tsatsoulis A, Mantzaris MD, Bellou S, Andrikoula M. Insulin resistance: an adaptive mechanism becomes maladaptive in the current environment - an evolutionary perspective. *Metabolism.* 2013 May;62(5):622-33. doi: 10.1016/j.metabol.2012.11.004
6. Vykoukal D, Davies MG. Vascular biology of metabolic syndrome. *J Vasc Surg.* 2011 Sep;54(3):819-31. doi: 10.1016/j.jvs.2011.01.003.
7. Kotsis V, Jordan J, Micic D, Finer N, Leitner DR, Toplak H, Tokgozoglul L, Athyros V, Elisaf M, Filippatos TD, Redon J, Redon P, Antza C, Tsioufis K, Grassi G, Seravalle G, Coca A, Sierra C, Lurbe E, Stabouli S, Jelakovic B, Nilsson PM. Obesity and cardiovascular risk: a call for action from the European Society of Hypertension Working Group of Obesity, Diabetes and the High-risk Patient and European Association for the Study of Obesity: part A: mechanisms of obesity induced hypertension, diabetes and dyslipidemia and practice guidelines for treatment. *J Hypertens.* 2018 Jul;36(7):1427-1440. doi: 10.1097/HJH.0000000000001730.
8. Huang PL. eNOS, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Trends Endocrinol Metab.* 2009 Aug;20(6):295-302. doi: 10.1016/j.tem.2009.03.005.
9. Chapman N, Chen CY, Fujita T, Hobbs FD, Kim SJ, Staessen JA, Tanomsup S, Wang JG, Williams B. Time to re-appraise the role of alpha-1 adrenoceptor antagonists in the management of hypertension? *J Hypertens.* 2010 Sep;28(9):1796-803. doi: 10.1097/HJH.0b013e32833b912c.
10. Dell'Omo G, Penno G, Del Prato S, Pedrinelli R. Doxazosin in metabolically complicated hypertension. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2007 Nov;5(6):1027-35.
11. Seravalle G, Mancia G, Grassi G. Role of the sympathetic nervous system in hypertension and hypertension-related cardiovascular disease. *High Blood Press Cardiovasc Prev.* 2014 Jun;21(2):89-105. doi: 10.1007/s40292-014-0056-1.
12. Rath G, Balligand JL, Dessy C. Vasodilatory mechanisms of beta receptor blockade. *Curr Hypertens Rep.* 2012 Aug;14(4):310-7. doi: 10.1007/s11906-012-0278-3.

13. Rozec B, Quang TT, Noireaud J, Gauthier C. Mixed beta3-adrenoceptor agonist and alpha1-adrenoceptor antagonist properties of nebivolol in rat thoracic aorta. *Br J Pharmacol*. 2006 Apr;147(7):699-706.
14. Manrique C, Giles TD, Ferdinand KC, Sowers JR. Realities of newer beta-blockers for the management of hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2009 Jul;11(7):369-75. doi: 10.1111/j.1751-7176.2009.00140.x.
15. Widecka K. Leki α -adrenolityczne i działające centralnie. Nadciśnienie tętnicze. 2007, Suplement A: A1-A26.
16. Schwinn DA, Roehrborn CG. Alpha1-adrenoceptor subtypes and lower urinary tract symptoms. *Int J Urol*, 2008, 15, 193-199.
17. Shannon R, Chaudhry M. Effect of alpha1-adrenergic receptors in cardiac pathophysiology. *Am Heart J*. 2006 Nov;152(5):842-50.
18. Eiras S, Fernández P, Piñeiro R, Iglesias MJ, González-Juanatey JR, Lago F. Doxazosin induces activation of GADD153 and cleavage of focal adhesion kinase in cardiomyocytes en route to apoptosis. *Cardiovasc Res*. 2006 Jul 1;71(1):118-28.
19. Qian X, Li M, Wagner MB, Chen G, Song X. Doxazosin Stimulates Galectin-3 Expression and Collagen Synthesis in HL-1 Cardiomyocytes Independent of Protein Kinase C Pathway. *Front Pharmacol*. 2016 Dec 20;7:495. doi: 10.3389/fphar.2016.00495
20. Bilbro J, Mart M, Kyprianou N. Therapeutic value of quinazoline-based compounds in prostate cancer. *Anticancer Res*. 2013 Nov;33(11):4695-700.
21. Kyprianou N, Vaughan TB, Michel MC. Apoptosis induction by doxazosin and other quinazoline alpha1-adrenoceptor antagonists: a new mechanism for cancer treatment? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2009 Dec;380(6):473-7. doi: 10.1007/s00210-009-0462-4.
22. Jain KS, Bariwal JB et al. Recent advances in selective alpha1-adrenoreceptor antagonists as antihypertensive agents. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16, 4759-4800.
23. De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Broos K, Salles II, Deckmyn H. Antiplatelet drugs. *Br J Haematol*. 2008 Aug;142(4):515-28.
24. Duerschmied D, Ahrens I, Mauler M, Brandt C, Weidner S, Bode C, Moser M. Serotonin antagonism improves platelet inhibition in clopidogrel low-responders after coronary stent placement: an in vitro pilot study. *PLoS One*. 2012;7(2):e32656.
25. Saini HK, Takeda N, Goyal RK, Kumamoto H, Arneja AS, Dhalla NS. Therapeutic potentials of sarpogrelate in cardiovascular disease. *Cardiovasc Drug Rev*. 2004 Spring;22(1):27-54.
26. Ayme-Dietrich E, Aubertin-Kirch G, Maroteaux L, Monassier L. Cardiovascular remodeling and the peripheral serotonergic system. *Arch Cardiovasc Dis*. 2017 Jan;110(1):51-59.
27. Béres BJ, Tóth-Zsámboki E, Vargová K, László A, Masszi T, Kerecsen G, Préda I, Kiss RG. Analysis of platelet alpha2-adrenergic receptor activity in stable coronary artery disease patients on dual antiplatelet therapy. *Thromb Haemost*. 2008 Nov;100(5):829-38.

28. Marketou ME, Kintsurashvili E, Androulakis NE, Kontaraki J, Alexandrakis MG, Gavras I, Vardas PE, Gavras H. Blockade of platelet alpha_{2B}-adrenergic receptors: a novel antiaggregant mechanism. *Int J Cardiol.* 2013 Oct 3;168(3):2561-6.
29. Giles TD, Sander GE, Nossaman BD, Kadowitz PJ. Impaired vasodilation in the pathogenesis of hypertension: focus on nitric oxide, endothelial-derived hyperpolarizing factors, and prostaglandins. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2012 Apr;14(4):198-205. doi: 10.1111/j.1751-7176.2012.00606.x.
30. Vanhoutte PM, Shimokawa H, Feletou M, Tang EH. Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. *Acta Physiol (Oxf).* 2017 Jan;219(1):22-96. doi: 10.1111/apha.12646.
31. Yang O, Li J, Kong J. The Endothelium as a Target for the Treatment of Heart Failure. *Cell Biochem Biophys.* 2015 Jul;72(3):751-6. doi: 10.1007/s12013-015-0526-7.
32. Bae EH, Kim IJ, Park JW, Ma SK, Lee JU, Kim SW. Renoprotective effect of rosuvastatin in DOCA-salt hypertensive rats. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25: 1051-1059.
33. Basting T, Lazartigues E. DOCA-Salt Hypertension: an Update. *Curr Hypertens Rep* 2017; 19: 32.
34. Iyer A, Chan V, Brown L. The DOCA-Salt Hypertensive Rat as a Model of Cardiovascular Oxidative and Inflammatory Stress. *Curr Cardiol Rev* 2010; 6: 291-297.
35. Dupas J, Feray A, Goanvec C, Guernec A, Samson N, Bougaran P, Guerrero F, Mansourati J. Metabolic Syndrome and Hypertension Resulting from Fructose Enriched Diet in Wistar Rats. *Biomed Res Int.* 2017;2017:2494067. doi: 10.1155/2017/2494067.
36. Klein AV, Kiat H. The mechanisms underlying fructose-induced hypertension: a review. *J Hypertens.* 2015 May;33(5):912-20. doi: 10.1097/HJH.0000000000000551.
37. Tappy L, Lê KA. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol Rev.* 2010 Jan;90(1):23-46. doi: 10.1152/physrev.00019.2009.
38. Paniccia R, Priora R, Liotta AA, Abbate R. Platelet function tests: a comparative review. *Vasc Health Risk Manag.* 2015 Feb 18;11:133-48.
39. Tóth O, Calatzis A, Penz S, Losonczy H, Siess W. Multiple electrode aggregometry: a new device to measure platelet aggregation in whole blood. *Thromb Haemost.* 2006 Dec;96(6):781-8.
40. Belcher PR, Drake-Holland AJ, Noble MI. The antiplatelet drug target in atherosclerotic diseases. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 2006 Mar;6(1):43-55.
41. Jackson SP. The growing complexity of platelet aggregation. *Blood.* 2007 Jun 15;109(12):5087-95.
42. Grgic I, Kaistha BP, Hoyer J, Köhler R. Endothelial Ca⁺-activated K⁺ channels in normal and impaired EDHF-dilator responses--relevance to cardiovascular pathologies and drug discovery. *Br J Pharmacol.* 2009 Jun;157(4):509-26. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00132.x.
43. Mitchell JA, Ali F, Bailey L, Moreno L, Harrington LS: Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. *Exp Physiol* 2008; 93: 141-147.

44. Mount PF, Kemp BE, Power DA. Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol.* 2007 Feb;42(2):271-9.
45. Ko EA, Han J, Jung ID, Park WS. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res.* 2008 Apr;44(2):65-81.
46. Clements RT, Terentyev D, Sellke FW. Ca²⁺-activated K⁽⁺⁾ channels as therapeutic targets for myocardial and vascular protection. *Circ J.* 2015;79(3):455-62.
47. Tinker A, Aziz Q, Thomas A. The role of ATP-sensitive potassium channels in cellular function and protection in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol.* 2014 Jan;171(1):12-23.
48. Grassi G. Sympathomodulatory Effects of Antihypertensive Drug Treatment. *Am J Hypertens.* 2016 Jun;29(6):665-75. doi: 10.1093/ajh/hpw012.
49. Stoschitzky K, Stoschitzky G, Wonisch M, Brussee H. Differential effects of urapidil and doxazosin on heart rate. *Eur J Clin Pharmacol.* 2007 Mar;63(3):259-62. Epub 2007 Jan 16.
50. van Zwieten PA, Chalmers JP. Different types of centrally acting antihypertensives and their targets in the central nervous system. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1994 Dec;8(6):787-99.
51. Toba H, Yoshida M, Tojo C, Nakano A, Oshima Y, Kojima Y, Noda K, Wang J, Kobara M, Nakata T. L/N-type calcium channel blocker cilnidipine ameliorates proteinuria and inhibits the renal renin-angiotensin-aldosterone system in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Hypertens Res.* 2011; 34: 521-529.
52. Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Endothelial Barrier and Its Abnormalities in Cardiovascular Disease. *Front Physiol* 2015; 9: 6:365.
53. Hirase T, Node K. Endothelial dysfunction as a cellular mechanism for vascular failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012; 302: H499-H505.
54. Ter Maaten JM, Damman K, Verhaar MC, Paulus WJ, Duncker DJ, Cheng C, van Heerebeek L, Hillege HL, Lam CS, Navis G, Voors AA. Connecting heart failure with preserved ejection fraction and renal dysfunction: the role of endothelial dysfunction and inflammation. *Eur J Heart Fail* 2016; 18: 588-598.
55. Tran LT, MacLeod KM, McNeill JH. Selective alpha(1)-adrenoceptor blockade prevents fructose-induced hypertension. *Mol Cell Biochem.* 2014 Jul;392(1-2):205-11. doi: 10.1007/s11010-014-2031-5.
56. Ohkura T, Yamada S, Deguchi Y, Kimura R. Comparative study on pharmacokinetics and in vivo alpha-1 adrenoceptor binding of [³H] Tamsulosin and [³H] Prazosin in rats. *Biol Pharm Bull.* 1999; 22(4) 412-417.
57. Francisqueti FV, Nascimento AF, Minatel IO, Dias MC, Luvizotto RAM, Berchieri-Ronchi C, Ferreira ALA, Corrêa CR. Metabolic syndrome and inflammation in adipose tissue occur at different times in animals submitted to a high-sugar/fat diet. *J Nutr Sci.* 2017 Aug 21;6:e41. doi: 10.1017/jns.2017.42.

58. Nieto-Vazquez I, Fernández-Veledo S, Krämer DK, Vila-Bedmar R, Garcia-Guerra L, Lorenzo M. Insulin resistance associated to obesity: the link TNF-alpha. *Arch Physiol Biochem.* 2008 Jul;114(3):183-94. doi: 10.1080/13813450802181047.
59. Abdelrahman AM, Al Suleimani YM, Ashique M, Manoj P, Ali BH. Effect of infliximab and tocilizumab on fructose-induced hyperinsulinemia and hypertension in rats. *Biomed Pharmacother.* 2018 Sep;105:182-186. doi: 10.1016/j.biopha.2018.05.118.
60. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.* 1995 May;95(5):2409-15.
61. Crowther AF, Howe R, McLoughlin BJ, Mallion KB, Rao BS, Smith LH, Turner RW. B-Adrenergic blocking agents. 12. Heterocyclic compounds related to propranolol. *J Med Chem.* 1972 Mar;15(3):260-266.
62. Fares H, Lavie CJ, Ventura HO. Vasodilating versus first-generation β -blockers for cardiovascular protection. *Postgrad Med.* 2012 Mar;124(2):7-15. doi: 10.3810/pgm.2012.03.2532.
63. Malhotra S, Das MK. Delayed and indirect effects of antiarrhythmic drugs in reducing sudden cardiac death. *Future Cardiol.* 2011 Mar;7(2):203-17. doi: 10.2217/fca.11.3.
64. Pokorný J, Staněk V, Vrána M. Sudden cardiac death thirty years ago and at present. The role of autonomic disturbances in acute myocardial infarction revisited. *Physiol Res.* 2011;60(5):715-28.
65. Pytka K, Lustyk K, Żmudzka E, Kotańska M, Siwek A, Zygmunt M, Dziedziczak A, Śniecikowska J, Olczyk A, Gałuszka A, Śmieja J, Waszkielewicz AM, Marona H, Filipek B, Sapa J, Mogilski S. Chemically Homogenous Compounds with Antagonistic Properties at All α 1-Adrenoceptor Subtypes but not β 1-Adrenoceptor Attenuate Adrenaline-Induced Arrhythmia in Rats. *Front Pharmacol.* 2016 Aug 3;7:229. doi: 10.3389/fphar.2016.00229. eCollection 2016.
66. Merentie M, Lipponen JA, Hedman M, Hedman A, Hartikainen J, Huusko J, Lottonen-Raikaslehto L, Parviainen V, Laidinen S, Karjalainen PA, Ylä-Herttuala S. Mouse ECG findings in aging, with conduction system affecting drugs and in cardiac pathologies: Development and validation of ECG analysis algorithm in mice. *Physiol Rep.* 2015 Dec;3(12). pii: e12639. doi: 10.14814/phy2.12639.
67. Lin KW, Fang SC, Hung CF, Shieh BJ, Yang SC, Teng CM, Lin CN. Synthesis, antiplatelet and vasorelaxing activities of xanthone derivatives. *Arch Pharm (Weinheim).* 2009 Jan;342(1):19-26. doi: 10.1002/ardp.200800002.
68. Haddad PM, Sharma SG. Adverse effects of atypical antipsychotics : differential risk and clinical implications. *CNS Drugs.* 2007;21(11):911-36.
69. Reynolds GP, Kirk SL. Metabolic side effects of antipsychotic drug treatment-pharmacological mechanisms. *Pharmacol Ther.* 2010 Jan;125(1):169-79.

70. Lavery H, Benson C, Cartwright E, Cross M, Garland C, Hammond T, Holloway C, McMahon N, Milligan J, Park B, Pirmohamed M, Pollard C, Radford J, Roome N, Sager P, Singh S, Suter T, Suter W, Trafford A, Volders P, Wallis R, Weaver R, York M, Valentin J. How can we improve our understanding of cardiovascular safety liabilities to develop safer medicines? *Br J Pharmacol*. 2011 Jun;163(4):675-93. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01255.x.

[A1] **Kubacka M**, Librowski T, Czarnecki R, Frackowiak B, Lochyński S. Anticonvulsant and antidepressant activity of the selected terpene GABA derivatives in experimental tests in mice. *Pharmacol Rep*. 2006 Nov-Dec;58(6):936-43.

[A2] Librowski T, **Kubacka M**, Meusel M, Scolari S, Müller CE, Gütschow M. Evaluation of anticonvulsant and analgesic effects of benzyl- and benzhydryl ureides. *Eur J Pharmacol*. 2007 Mar 22;559(2-3):138-49.

[A3] Marona H, Szkaradek N, **Kubacka M**, Bednarski M, Filipek B, Cegla M, Szneler E. Synthesis and evaluation of some xanthone derivatives for anti-arrhythmic, hypotensive properties and their affinity for adrenergic receptors. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2008 Feb;341(2):90-8. doi: 10.1002/ardp.200700156.

[A4] Handzlik J, Maciag D, **Kubacka M**, Mogilski S, Filipek B, Stadnicka K, Kieć-Kononowicz K. Synthesis, alpha 1-adrenoceptor antagonist activity, and SAR study of novel arylpiperazine derivatives of phenytoin. *Bioorg Med Chem*. 2008 Jun 1;16(11):5982-98. doi: 10.1016/j.bmc.2008.04.058.

[B1] Librowski T, **Kubacka M**, Filipek B, Sałat K. Anti-edematous and antinociceptive activities of new ureide derivatives in experimental models of inflammation in rats. *Acta Biol. Crac. Ser. Zool*. 2010, 52, 61-66.

[B2] Handzlik J, Szymańska E, Nędza K, **Kubacka M**, Siwek A, Mogilski S, Handzlik J, Filipek B, Kieć-Kononowicz K. Pharmacophore models based studies on the affinity and selectivity toward 5-HT_{1A} with reference to α 1-adrenergic receptors among arylpiperazine derivatives of phenytoin. *Bioorg Med Chem*. 2011 Feb 1;19(3):1349-60. doi: 10.1016/j.bmc.2010.11.051.

[B3] Sapa J, **Kubacka M**. The possible mechanism of hypotensive activity of some pyrrolidin-2-one derivatives with antagonist properties at alpha1-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol*. 2011 Dec 30;673(1-3):40-8. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.05.010.

[B4] Marona H, **Kubacka M**, Filipek B, Siwek A, Dybała M, Szneler E, Pocięcha T, Gunia A, Waszkielewicz AM. Synthesis, alpha-adrenoceptors affinity and alpha 1-adrenoceptor antagonistic properties of some 1,4-substituted piperazine derivatives. *Pharmazie*. 2011 Oct;66(10):733-9.

- [B5] **Kubacka M**, Mogilski S, Filipek B, Marona H. The hypotensive activity and α -adrenoceptor antagonistic properties of some aroxyalkyl derivatives of 2-methoxyphenylpiperazine. *Eur J Pharmacol.* 2013 Jan 5;698(1-3):335-44. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.10.025.
- [B6] **Kubacka M**, Mogilski S, Filipek B, Marona H. Antiarrhythmic properties of some 1,4-disubstituted piperazine derivatives with α 1-adrenoceptor affinities. *Eur J Pharmacol.* 2013 Nov 15;720(1-3):237-46. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.10.021.
- [B7] Handzlik J, Bojarski AJ, Satała G, **Kubacka M**, Sadek B, Ashoor A, Siwek A, Więcek M, Kucwaj K, Filipek B, Kieć-Kononowicz K. SAR-studies on the importance of aromatic ring topologies in search for selective 5-HT(7) receptor ligands among phenylpiperazine hydantoin derivatives. *Eur J Med Chem.* 2014 May 6;78:324-39. doi: 10.1016/j.ejmech.2014.01.065.
- [B8] Rapacz A, Pytka K, Sapa J, **Kubacka M**, Filipek B, Szkaradek N, Marona H. Antiarrhythmic, hypotensive and α 1-adrenolytic properties of new 2-methoxyphenylpiperazine derivatives of xanthone. *Eur J Pharmacol.* 2014 Jul 15;735:10-6. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.04.010.
- [B9] Jastrzębska-Więsek M, Siwek A, Partyka A, **Kubacka M**, Mogilski S, Wasik A, Kołaczkowski M, Wesołowska A. Pharmacological evaluation of the anxiolytic-like effects of EMD 386088, a partial 5-HT6 receptor agonist, in the rat elevated plus-maze and Vogel conflict tests. *Neuropharmacology.* 2014 Oct;85:253-62. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.05.036.
- [B10] **Kubacka M**, Mogilski S, Bednarski M, Rażny K, Sapa J, Waszkielewicz AM, Marona H, Filipek B. The nitric oxide/soluble cyclic guanylate/cyclic guanosine monophosphate pathway is involved in the cardiovascular effects of a novel α 1- and β -adrenoceptor antagonist. *Pharmacology.* 2014;94(5-6):287-95. doi: 10.1159/000369628.
- [B11] Mogilski S, **Kubacka M**, Redzicka A, Kazek G, Dudek M, Malinka W, Filipek B. Antinociceptive, anti-inflammatory and smooth muscle relaxant activities of the pyrrolo[3,4-d]pyridazinone derivatives: Possible mechanisms of action. *Pharmacol Biochem Behav.* 2015 Jun;133:99-110. doi: 10.1016/j.pbb.2015.03.019.
- [B12] Waszkielewicz AM, **Kubacka M**, Pańczyk K, Mogilski S, Siwek A, Głuch-Lutwin M, Gryboś A, Filipek B. Synthesis and activity of newly designed aroxyalkyl or aroxyethoxyethyl derivatives of piperazine on the cardiovascular and the central nervous systems. *Bioorg Med Chem Lett.* 2016 Nov 1;26(21):5315-5321. doi: 10.1016/j.bmcl.2016.09.037.
- [B13] Mojzych M, **Kubacka M**, Mogilski S, Filipek B, Fornal E. Relaxant effects of selected sildenafil analogues in the rat aorta. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2016;31(3):381-8. doi: 10.3109/14756366.2015.1024674.

[B14] **Kubacka M**, Mogilski S, Bednarski M, Nowiński L, Dudek M, Żmudzka E, Siwek A, Waszkielewicz AM, Marona H, Satała G, Bojarski A, Filipek B, Pytka K. Antidepressant-like activity of aroxyalkyl derivatives of 2-methoxyphenylpiperazine and evidence for the involvement of serotonin receptor subtypes in their mechanism of action. *Pharmacol Biochem Behav.* 2016 Feb;141:28-41. doi: 10.1016/j.pbb.2015.11.013.

[B15] Czopek A, Zagorska A, Kołaczkowski M, Bucki A, Gryzlo B, Rychtyk J, Pawłowski M, Siwek A, Satała G, Bojarski A, **Kubacka M**, Filipek B. NEW SPIROHYDANTOIN DERIVATIVES - SYNTHESIS, PHARMACOLOGICAL EVALUATION, AND MOLECULAR MODELING STUDY. *Acta Pol Pharm.* 2016 Nov;73(6):1545-1554.

[B16] Mogilski S, **Kubacka M**, Łażewska D, Więcek M, Głuch-Lutwin M, Tyszka-Czochara M, Bukowska-Strakova K, Filipek B, Kieć-Kononowicz K. Aryl-1,3,5-triazine ligands of histamine H4 receptor attenuate inflammatory and nociceptive response to carrageen, zymosan and lipopolysaccharide. *Inflamm Res.* 2017 Jan;66(1):79-95. doi: 10.1007/s00011-016-0997-z.

[B17] Łażewska D, Kaleta M, Schwed JS, Karcz T, Mogilski S, Latacz G, Olejarz A, Siwek A, **Kubacka M**, Lubelska A, Honkisz E, Handzlik J, Filipek B, Stark H, Kieć-Kononowicz K. Biphenyloxy-alkyl-piperidine and azepane derivatives as histamine H3 receptor ligands. *Bioorg Med Chem.* 2017 Oct 15;25(20):5341-5354. doi: 10.1016/j.bmc.2017.07.058.

[B18] Marcinkowska M, Kotańska M, Zagórska A, Śniecikowska J, **Kubacka M**, Siwek A, Bucki A, Pawłowski M, Bednarski M, Sapa J, Starek M, Dąbrowska M, Kołaczkowski M. Synthesis and biological evaluation of N-arylpiperazine derivatives of 4,4-dimethylisoquinoline-1,3(2H,4H)-dione as potential antiplatelet agents. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2018 Dec;33(1):536-545. doi: 10.1080/14756366.2018.1437155.

[B19] Szczepańska K, Karcz T, Mogilski S, Siwek A, Kuder KJ, Latacz G, **Kubacka M**, Hagenow S, Lubelska A, Olejarz A, Kotańska M, Sadek B, Stark H, Kieć-Kononowicz K. Synthesis and biological activity of novel tert-butyl and tert-pentylphenoxyalkyl piperazine derivatives as histamine H3R ligands. *Eur J Med Chem.* 2018 May 25;152:223-234. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.04.043.

[B20] Zagórska A, Marcinkowska M, Śniecikowska J, Bucki A, Siwek A, Kubacka M, Kazek G, Sapa J, Kotańska M, Kołaczkowski M. Evaluation of antiplatelet activity of novel guanidine derivatives in the aspects of their adrenergic receptor activity. *Acta Pol. Pharm.* 2018, 75 (2), 525-531.

Monika Kubacka