STRESZCZENIE

Choroby układu sercowo-naczyniowego stanowią najczęstszą przyczynę śmierci na świecie. Na przestrzeni trzech minionych dekad globalna częstość występowania chorób układu krążenia wzrosła o 93% (z 271 mln w 1990 r. do 523 mln w 2019 r.), a śmiertelność zwiększyła się o około 54% (z 12,1 mln w 1990 r. do 18,6 mln w 2019 r.). Główną przyczyną rozwoju większości jednostek chorobowych z tej grupy schorzeń jest występowanie kilku czynników ryzyka, takich jak: podwyższone wartości ciśnienia tętniczego krwi, cukrzyca, zaburzenia lipidowe, otyłość, brak aktywności fizycznej, palenie tytoniu oraz czynniki psychospołeczne. Rozpowszechnienie czynników ryzyka oraz wydłużenie średniego czasu życia ludzkiego sprawiają, że choroby układu sercowo-naczyniowego stanowią ogromne obciążenie społeczno-ekonomiczne dla systemów opieki zdrowotnej i społeczności, pomimo nieustającego postępu medycyny i dostępności szerokiej gamy leków. Istnieje zatem uzasadniona potrzeba poszukiwania nowych rozwiązań farmakoterapeutycznych.

Celem niniejszej pracy doktorskiej była ocena aktywności α_1-adrenolitycznej 12-tu nowo zsyntezowanych pochodnych 5,5-dimetylohydantoiny (MG-15, OJ-1, OJ-2, OJ-3, OJ-4, OJ-5, OJ-6, OJ-7, OJ-8, PY-1, PY-10, PY-11) ze szczególnym uwzględnieniem działania biologicznego w obrębie układu sercowo-naczyniowego oraz wyselekcjonowanie struktur o potencjale terapeutycznym w chorobach układu krążenia. Otrzymane do badań związki zostały zaprojektowane i zsyntezowane w Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych Wydziału Farmaceutycznego UJ – Collegium Medicum pod kierownictwem Prof. dr hab. Jadwigi Handzlik.

Dla osiągnięcia zamierzonych celów przeprowadzono zarówno badania *in vitro* jak i *in vivo,* które zrealizowano w dwóch etapach. W ramach badań wstępnych dokonano oznaczenia powinowactwa do receptorów α_1- i β_1-adrenergicznych, aktywności wewnętrznej względem poszczególnych podtypów receptora α_1-adrenergicznego przy użyciu komórek linii CHO-K1 z ekspresją jednego z trzech podtypów (α_{1A}, α_{1B} albo α_{1D}) ludzkiego receptora α_1-adrenergicznego, aktywności hipotensyjnej po jednorazowym podaniu dożylnym, profilaktycznej aktywności przeciwarytmicznej w modelu arytmii adrenalinowej i barowej oraz wpływu nowo zsyntezowanych związków na prawidłowy elektrokardiogram szczura. Badania wstępne pozwoliły na wyselekcjonowanie czterech struktur oznaczonych symbolami: MG-15, OJ-2, PY-1 i PY-10, które wykazały najwyższą antagonistyczną aktywność wewnętrzną względem trzech podtypów ludzkiego receptora α_1-adrenergicznego *in vitro* oraz wyraźne działanie hipotensyjne i przeciwarytmiczne. W badaniach *in vitro* związki MG-15,

PY-1 i PY-10 prezentowały preferencyjność wobec podtypu α_{1B} w stosunku do podtypu α_{1A} i α_{1D}, natomiast związek OJ-2 wykazał niewielką (2-krotną) preferencję wobec podtypu α_{1A} i α_{1D} w stosunku do podtypu α_{1B} receptora adrenergicznego.

W ramach badań poszerzonych dokonano oznaczenia przepuszczalności przez sztuczną błonę komórkową w modelu transportu pasywnego *in vitro* (test PAMPA), aktywności przeciwarytmicznej w zaburzeniach rytmu izolowanego serca szczura wywołanych okluzją i reperfuzją lewego naczynia wieńcowego oraz działania przeciwpłytkowego wyselekcjonowanych związków w trzech modelach agregacji płytek krwi pełnej szczura *in vitro*. Ponadto, zweryfikowano działanie hipotensyjne, hipoglikemizujące i hipolipemizujące oraz wpływ nowo zsyntezowanych pochodnych na aktywność enzymów antyoksydacyjnych, takich jak dysmutaza ponadtlenkowa i katalaza w mięśniu sercowym, osoczowe stężenie azotanów i azotynów oraz ADMA po wielokrotnym podawaniu dootrzewnowym w zwierzęcym modelu nadciśnienia tętniczego wywołanym deksametazonem. Wyznaczono również podstawowe parametry farmakokinetyczne wyselekcjonowanych związków.

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że wyselekcjonowane pochodne 5,5-dimetylohydantoiny (MG-15, OJ-2, PY-1, PY-10) wykazują istotne działanie farmakologiczne w obrębie układu sercowo-naczyniowego, które najprawdopodobniej wynika z ich silnych właściwości α_1-adrenolitycznych. Związki te prezentowały istotną aktywność hipotensyjną zarówno po jednorazowym podaniu dożylnym u normotensyjnego szczura, jak i po wielokrotnym podawaniu dootrzewnowym w zwierzęcym modelu nadciśnienia tętniczego wywołanego deksametazonem, a także profilaktyczną aktywność przeciwarytmiczną w modelu arytmii adrenalinowej *in vivo* oraz w modelu poreperfuzyjnych zaburzeń rytmu izolowanego serca szczura. Co więcej, wyselekcjonowane związki wykazały dodatkowe właściwości przynoszące szereg istotnych korzyści terapeutycznych w chorobach układu sercowo-naczyniowego, a mianowicie: działanie hipoglikemizujące, hipolipemizujące, antyoksydacyjne oraz przeciwpłytkowe.

Uzyskane wyniki wykazały jednoznacznie, że spośród czterech wyselekcjonowanych pochodnych 5,5-dimetylohydantoiny najlepszym profilem farmakokinetyczno-farmakodynamicznym charakteryzuje się związek oznaczony symbolem MG-15. Związek ten prezentował najsilniejsze działanie antagonistyczne wobec receptora α_{1A}-, α_{1B}-, α_{1D}-adrenergicznego z wartościami IC_{50} wynoszącymi odpowiednio 0,02; 0,002 oraz 2,19 nM. W komórkach z ekspresją receptora α_{1A}-adrenergicznego związek MG-15 hamował

wewnątrzkomórkową transdukcję sygnału indukowaną fenylefryną z porównywalną siłą jak tamsulozyna (IC_{50} = 0,03 nM), natomiast jego działanie antagonistyczne względem podtypu α_{1D} było słabsze aniżeli prazosyny, terazosyny, tamsulozyny i związku BMY7375, lecz silniejsze niż urapidilu (IC_{50} = 184,40 nM). Co ważne, w komórkach z ekspresją receptora α_{1B}-adrenergicznego związek MG-15 hamując 85-krotnie silniej wewnątrzkomórkową transdukcję sygnału indukowaną fenylefryną aniżeli związek odniesienia o najwyższej aktywności antagonistycznej tj. prazosyna (IC_{50} = 0,17 nM), wykazał wysoką preferencyjność względem podtypu α_{1B}: 10-krotną w porównaniu do podtypu α_{1A} oraz 1000-krotną w porównaniu do podtypu α_{1D} receptora adrenergicznego. Co interesujące, związek MG-15 obniżał ciśnienie tętnicze krwi po jednorazowym podaniu dożylnym w dawce 16-krotnie niższej aniżeli związek odniesienia – urapidil (0,0625 mg/kg *vs.* 1,0 mg/kg). Poza tym, pochodna ta wykazała najsilniejsze profilaktyczne działanie antyarytmiczne w modelu arytmii adrenalinowej (ED_{50} = 0,038 mg/kg), wykazując lepszą skuteczność niż urapidil (ED_{50} = 1,108 mg/kg). Co ważne, związek MG-15 nie wydłużał czasu trwania odstępu QT, co może świadczyć o braku potencjału proarytmicznego oraz minimalizuje ryzyko wystąpienia polimorficznego częstoskurczu komorowego *torsades de pointes* i nagłego zgonu sercowego. Ponadto, związek ten, jako jedyny, obniżał istotnie statystycznie osoczowe stężenie ADMA po wielokrotnym podawaniu drogą dootrzewnową w zwierzęcym modelu nadciśnienia tętniczego wywołanym deksametazonem, co może świadczyć o jego korzystnym wpływie na funkcję śródbłonka. Przeprowadzone badania wykazały również, że związek MG-15 ma dobrą zdolność wchłaniania po podaniu doustnym (*Pe* = 4,35 x 10^{-6} cm/s) i najdłuższy okres półtrwania w fazie eliminacji (7,18 h) po jednorazowym podaniu dootrzewnowym, co jest niezwykle ważne w opracowaniu nowych leków.

Obiecujące wyniki badań uzyskane dla związku MG-15 pozwalają stwierdzić, że ta nowo zsyntezowana pochodna 5,5-dimetylohydantoiny może stanowić strukturę modelową dla opracowania kandydata na lek o potencjale terapeutycznym w chorobach układu sercowo-naczyniowego. Związek MG-15, podobnie jak trzy pozostałe aktywne farmakologicznie struktury (OJ-2, PY-1, PY-10), zawiera w swojej cząsteczce ugrupowanie *orto*-metoksyfenylopiperazynowe, a zatem wykazuje podobieństwo strukturalne do leków α_1-adrenolitycznych – urapidilu i naftopidilu, natomiast jego unikalną cechą jest długi łańcuch węglowy (heksylowy) łączący wspomniany motyw strukturalny w pozycji 1 rdzenia hydantoiny. Przeprowadzone badania stanowią podstawę do dalszych badań nad skutecznością, bezpieczeństwem stosowania i toksycznością związku MG-15.