

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY Z ODDZIAŁEM MEDYCYNY LABORATORYJNEJ

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY



**Joanna Raczak-Gutknecht**

Ocena farmakologiczna udziału receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych w efektach mydriatycznych pochodnych imidazoliny w oparciu o analizę ilościowych zależności struktura-aktywność (QSAR)

Praca doktorska wykonana w Katedrze  
Biofarmacji i Farmakodynamiki GUMed

Promotor:

**Prof. dr hab. Roman Kaliszan,**  
czł. rzecz. PAN, czł. koresp. PAU

Promotor pomocniczy:

**Prof. dr hab. Antoni Nasal**

Gdańsk 2017

**Praca doktorska finansowana była ze  
środków Narodowego Centrum Nauki,  
grant PRELUDIUM nr  
2014/13/N/NZ7/04231**

## Spis treści:

<b>I.</b>	<b>WSTĘP</b> .....	6
<b>1.</b>	<b>Pojęcie receptora farmakologicznego</b> .....	6
<b>1.1.</b>	<b>Receptory <math>\alpha</math>-adrenergiczne</b> .....	6
<b>1.1.1.</b>	<b>Charakterystyka i klasyfikacja receptorów <math>\alpha</math>-adrenergicznych</b> .....	6
<b>1.1.2.</b>	<b>Receptory <math>\alpha</math>-adrenergiczne typu <math>\alpha_2</math></b> .....	8
<b>1.1.2.1.</b>	<b>Budowa receptorów <math>\alpha_2</math>-adrenergicznych</b> .....	9
<b>1.1.2.2.</b>	<b>Właściwości farmakologiczne i rola fizjologiczna receptorów <math>\alpha_2</math>-adrenergicznych</b> .....	12
<b>1.1.2.3.</b>	<b>Rozmieszczenie receptorów <math>\alpha_2</math>- adrenergicznych w tkankach</b> .....	13
<b>2.</b>	<b>Mydriaza</b> .....	14
<b>2.1.</b>	<b>Czynniki wpływające na zmiany średnicy źrenicy oka</b> .....	14
<b>2.2.</b>	<b>Mechanizm mydriazy wywołanej pochodnymi imidazoliny</b> .....	15
<b>2.3.</b>	<b>Zastosowanie modelu mydriazy oka u szczurów w badaniach farmakologicznych</b> .....	19
<b>3.</b>	<b>Związki o budowie imidazolinowej - ogólna charakterystyka działania farmakologicznego</b> .....	20
<b>4.</b>	<b>Modelowanie molekularne</b> .....	21
<b>5.</b>	<b>Ilościowe zależności struktura-aktywność (QSAR)</b> .....	23
<b>5.1.</b>	<b>Właściwości fizykochemiczne związków</b> .....	25
<b>5.2.</b>	<b>Deskryptory molekularne z chemii obliczeniowej</b> .....	28
<b>5.3.</b>	<b>Empiryczne modele matematyczne</b> .....	29
<b>5.3.1.</b>	<b>Równanie Hanscha</b> .....	29
<b>5.3.2.</b>	<b>Model Free-Wilsona</b> .....	29
<b>5.4.</b>	<b>Analiza korelacji</b> .....	30
<b>II.</b>	<b>CEL PRACY</b> .....	32

<b>III.</b>	<b>MATERIAŁY I METODY</b> .....	33
1.	Badanie wpływu związków imidazolinowych na szerokość źrenicy oka szczura ..	33
1.1.	Zwierzęta doświadczalne .....	33
1.2.	Badane związki chemiczne.....	33
1.3.	Przebieg eksperymentu farmakologicznego.....	37
1.4.	Analiza wyników.....	38
2.	Analiza strukturalna pochodnych imidazoliny.....	39
2.1.	Oznaczanie lipofilowości badanych związków metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej.....	39
2.1.1.	Odczynniki chemiczne.....	39
2.1.2.	Przygotowanie buforu do fazy ruchomej oraz próbek analizowanych związków .	40
2.1.3.	Oznaczenia analityczne z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (RP-HPLC-ESI-TOF-MS).....	40
3.	Deskryptory strukturalne pochodzące z modelowania molekularnego .....	42
<b>IV.</b>	<b>WYNIKI</b> .....	44
1.	Działanie mydriatyczne pochodnych imidazoliny .....	44
1.1.	Wpływ johimbiny na efekty mydriatyczne klonidyny, rilmenidyny, moksonidyny, marsanidyny i 7-metylomarsanidyny .....	52
1.2.	Wpływ AGN192403 na działanie mydriatyczne klonidyny .....	53
1.3.	Analiza farmakologiczna zaangażowania podtypów receptora $\alpha_2$ -adrenergicznego w działaniu mydriatycznym klonidyny, marsanidyny oraz 7-metylomarsanidyny .....	54
2.	Wyniki analizy strukturalnej badanych pochodnych imidazolinowych .....	61
2.1.	Parametr lipofilowości związków, log $k_w$ , oznaczony przy użyciu RP HPLC/MS.	61
2.2.	Deskryptory strukturalne imidazolin otrzymane metodą półempiryczną .....	65
3.	Analiza QSAR.....	65
<b>V.</b>	<b>DYSKUSJA</b> .....	67

<b>VI.</b>	<b>WNIOSKI</b> .....	76
<b>VII.</b>	<b>PIŚMIENICTWO</b> .....	77
<b>VIII.</b>	<b>STRESZCZENIE</b> .....	90
<b>IX.</b>	<b>ABSTRACT</b> .....	92
<b>X.</b>	<b>SPIS TABEL I RYCIN</b> .....	94
<b>XI.</b>	<b>CURRICULUM VITAE</b> .....	96
<b>XII.</b>	<b>LISTA PUBLIKACJI</b> .....	97

# I. WSTĘP

## 1. Pojęcie receptora farmakologicznego

Receptory są to wyspecjalizowane białka na powierzchni błony komórkowej lub we wnętrzu komórki, do których mogą przyłączać się ligandy o określonej budowie. Umożliwiają komunikację wnętrza komórki ze środowiskiem zewnętrznym za pomocą różnorodnych substancji sygnałowych: hormonów, neuroprzekaźników, antygenów. W przypadku przyłączenia się do receptora związku o właściwościach agonistycznych, wyzwany jest bodziec, a następnie efekt farmakologiczny.

Farmakolodzy rozważają koncepcję układu cząsteczek odpowiedzialnych za wywołanie efektu farmakologicznego od początku XX wieku. Pojęcie miejsca, do którego mogą przyłączać się ligandy, po raz pierwszy wprowadzili Paul Ehrlich i John N. Langley [1,2]. Jednak nowoczesną teorię receptorową zapoczątkował A.J. Clark uznając, że działanie leku jest uwarunkowane przez jego połączenie się z receptorem, natomiast siła działania zależy od ilości zajętych przez lek receptorów.

Teoria receptorowa umożliwiła znaczne poszerzenie wiedzy na temat działania leków na organizm, budowy receptorów, wyszczególnienie ich podtypów, a także bardziej celowane projektowanie i wytwarzanie nowych związków chemicznych, z których niektóre stały się lekami. Do tej pory brakuje jednak wysoce selektywnych ligandów różnych grup receptorów. Najbardziej pożądanym byłoby zsyntezowanie związków ściśle specyficznych wobec określonego typu receptora, gdyż tylko takie związki mogłyby stać się lekami o zredukowanych działaniach niepożądanych [3,4].

### 1.1. Receptory $\alpha$ -adrenergiczne

#### 1.1.1. Charakterystyka i klasyfikacja receptorów $\alpha$ -adrenergicznych

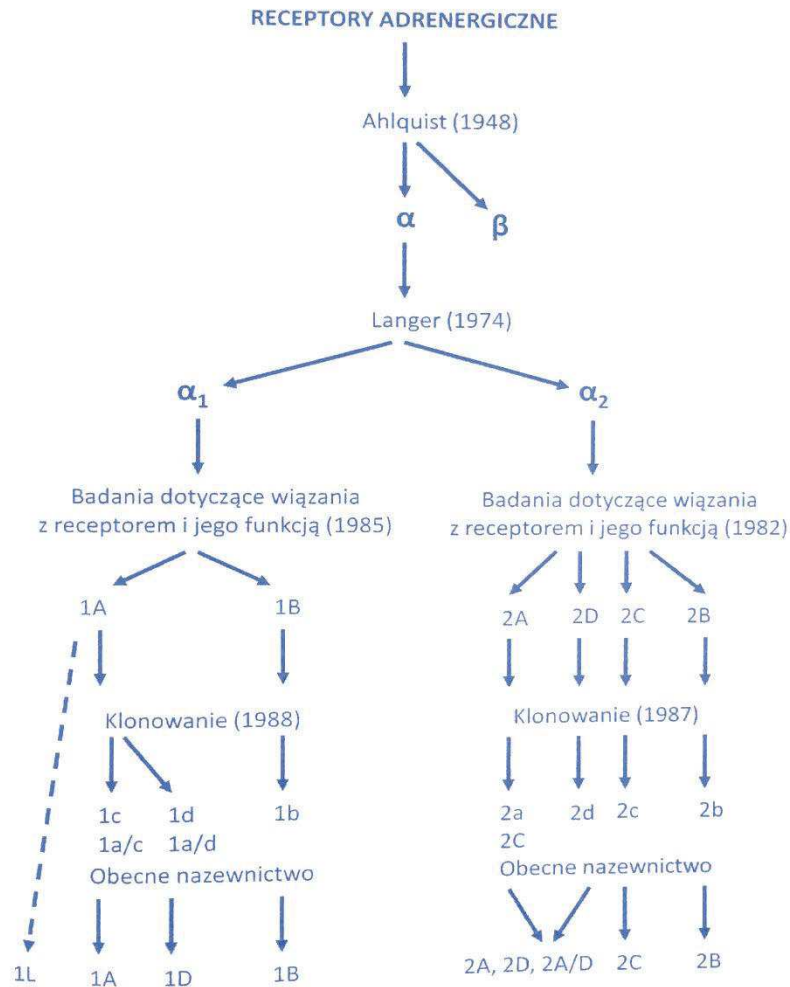
Układ adrenergiczny pełni ważną rolę w dostosowywaniu organizmu do zmiennych warunków otoczenia, pozwala szybko reagować na nagłe zmiany. Neuroprzekaźnikami w tym układzie są noradrenalina i adrenalina. Adrenalinę po raz pierwszy znaleziono

w nadnerczach (*glandulae adrenales*) i stąd wzięła się jej nazwa. Adrenalina pozbawiona rodnika metylowego przy atomie azotu (*non radical adrenalina*) to noradrenalina [2,5,6]. Związki te (tzw. katecholaminy) działają poprzez wiązanie się z poszczególnymi receptorami, powodując zmiany ich konformacji i rozpoczynając szereg procesów biochemicznych.

Interakcje ligandów z receptorami pociągają za sobą określone odpowiedzi farmakologiczne. Często jeden ligand łączy się z różnymi typami receptorów wywołując różne efekty, co w przypadku leków nie zawsze jest zjawiskiem korzystnym.

W miarę rozwoju badań odkryto, że receptory  $\alpha$ -adrenergiczne mogą różnić się pod względem farmakologicznym i czynnościowym. W 1948 roku Raymond Ahlquist odkrył różnice w powinowactwie receptorów adrenergicznych do serii agonistów i zaproponował ich podział na dwie grupy: receptory  $\alpha$ -adrenergiczne – wykazujące większe powinowactwo do noradrenaliny i receptory  $\beta$ -adrenergiczne – o większym powinowactwie do adrenaliny [2,7]. Klasyfikacja ta okazała się jednak niewystarczająca, dalsze badania doprowadziły do podziału receptorów  $\alpha$ -adrenergicznych na presynaptyczne i postsynaptyczne [8,9]. Następnie za pomocą technik radioizotopowych i biologii molekularnej podzielono receptory na  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  [10,11]. Obecnie wyróżniamy 3 główne grupy receptorów adrenergicznych:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ , a badania prowadzone w ciągu ostatnich lat wykazały heterogenność każdej z tych grup (Rysunek 1).

W miarę uzyskiwania dalszych informacji na temat receptorów adrenergicznych dokonano dalszych podziałów i wyróżniono podgrupy receptorów. Wśród receptorów  $\alpha_1$ -adrenergicznych wyodrębniono podtypy:  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  i  $\alpha_{1D}$  (wcześniej sugerowano istnienie podtypu  $\alpha_{1C}$ , okazało się jednak, że jest on kodowany przez ten sam gen, co podtyp  $\alpha_{1A}$ ). Trwają badania nad identyfikacją jeszcze jednego podtypu:  $\alpha_{1L}$ , lecz dotychczas nie został on sklonowany. Istnieją podejrzenia, że również ten podtyp jest produktem genu kodującego  $\alpha_{1A}$  i prawdopodobne jest, że podtyp  $\alpha_{1L}$  jest funkcjonalnym fenotypem receptora  $\alpha_{1A}$ -adrenergicznego [11,12].



Rys. 1. Klasyfikacja receptorów adrenergicznych [13].

### 1.1.2. Receptory $\alpha$ -adrenergiczne typu $\alpha_2$

W oparciu o badania przeprowadzone z zastosowaniem technik wiązania radioligandów i biologii molekularnej, receptory  $\alpha_2$ -adrenergiczne są według bieżącej klasyfikacji podzielone na podtypy:  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$ ,  $\alpha_{2D}$  [13–19]. W latach 1990-ych odkryto, że poszczególne podtypy receptorów są odmiennymi białkami. Zidentyfikowane zostały geny kodujące poszczególne podtypy receptorów [20,21].

Receptory  $\alpha_2$ -adrenergiczne u człowieka są produktami odrębnych genów:  $\alpha_2$ -C10,  $\alpha_2$ -C4 i  $\alpha_2$ -C2, mieszczących się odpowiednio na chromosomach: 10, 4 i 2. Geny te kodują odpowiednio podtypy  $\alpha_{2A}$   $\alpha_{2B}$  i  $\alpha_{2C}$  receptorów adrenergicznych [6,16,20,22].



Również u szczurów wyodrębniono 3 geny kodujące receptory  $\alpha_2$ -adrenergiczne:  $\alpha_2$ -RNG,  $\alpha_2$ -RG10 i  $\alpha_2$ -RG20. Według klasyfikacji kodują one odpowiednio podtypy  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$  i  $\alpha_{2D}$  receptorów adrenergicznych [23–25].

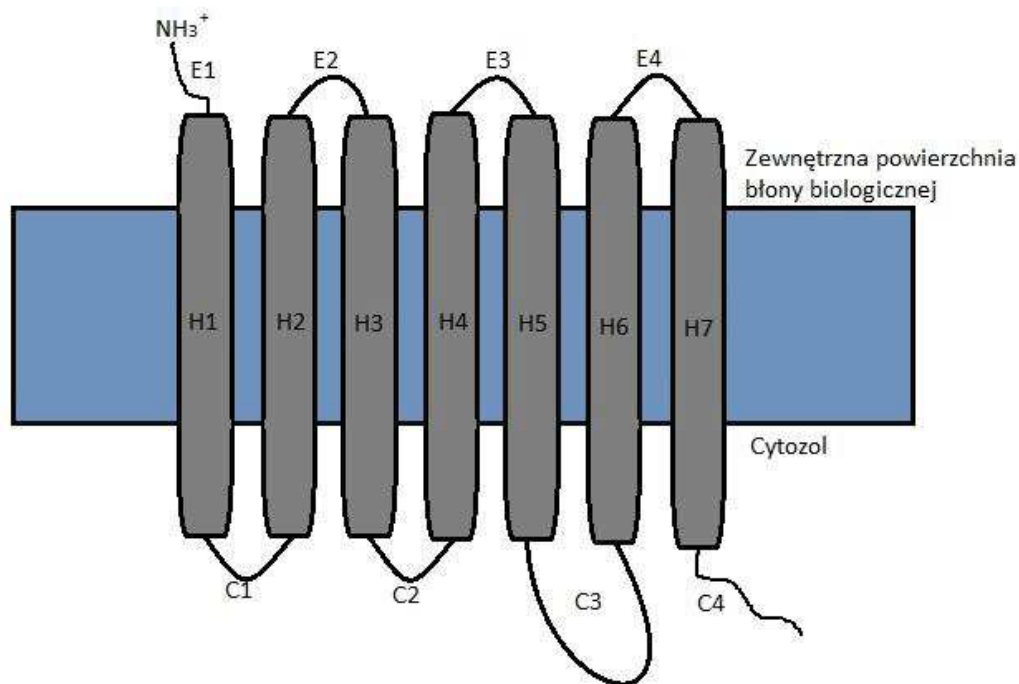
Badania z wykorzystaniem radioligandów wykazały, że podtypy receptorów  $\alpha_{2B}$  i  $\alpha_{2C}$  posiadają podobne właściwości u różnych gatunków ssaków. Podtyp  $\alpha_{2A}$  ( $\alpha_{2D}$ ) natomiast różni się w zależności od gatunku u którego występuje i można go podzielić na dwa profile. Profil występujący u człowieka, świni i królika został nazwany  $\alpha_{2A}$ , natomiast podtypem  $\alpha_{2D}$  nazwano jego odpowiednik u gryzoni (szczura, myszy, świnki morskiej) i krowy. Istnieje hipoteza, że podtypy  $\alpha_{2A}$  i  $\alpha_{2D}$ , mimo że różnią się właściwościami farmakologicznymi, pochodzą od tego samego genu i są odmianami ortologicznymi tego samego receptora, występującymi u różnych gatunków [17,26–30]. Według innych badań, podtypy  $\alpha_{2A}$  i  $\alpha_{2D}$  uznawane są za ten sam podtyp receptora, zidentyfikowany u różnych gatunków ( $\alpha_{2A/D}$ ) [31].

Receptor  $\alpha_{2A}$ -adrenergiczny został po raz pierwszy zidentyfikowany w ludzkich płytkach krwi, oraz w śledzionie królika [32,33], podtyp  $\alpha_{2B}$  w płucach i nerkach szczurów [32,34], natomiast podtyp  $\alpha_{2C}$  w linii komórkowej nerek oposa [35]. Podtyp  $\alpha_{2D}$  odkryto w gruczołach podszczękowych u szczura i w szyszynce u bydła [6,33,36].

Badania nad właściwościami i klasyfikacją receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych wciąż trwają. Sformułowana została hipoteza o istnieniu podtypów receptorów  $\alpha_{2A}$ -adrenergicznych ( $\alpha_{2A1}$  i  $\alpha_{2A2}$ ), oraz  $\alpha_{2B}$ -adrenergicznych ( $\alpha_{2B1}$  i  $\alpha_{2B2}$ ), lecz kwestie ich podziału nie zostały ostatecznie wyjaśnione [37].

### **1.1.2.1. Budowa receptorów $\alpha_2$ -adrenergicznych**

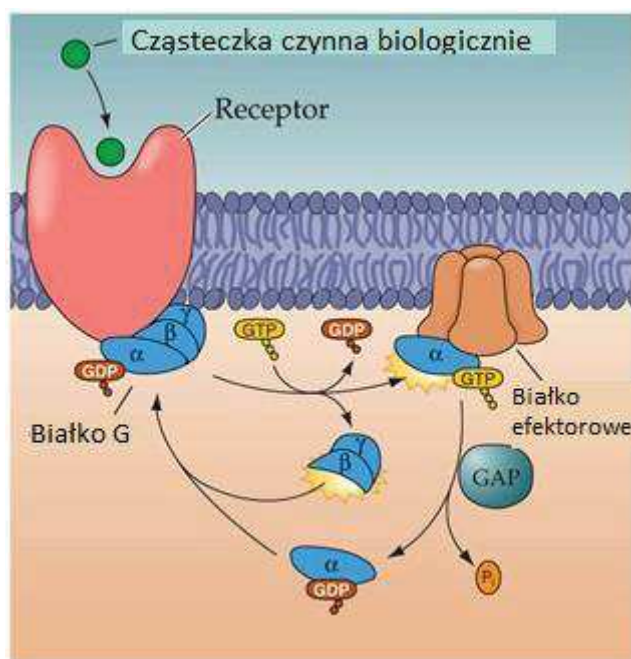
Receptory adrenergiczne są grupą receptorów metabotropowych, sprzężonych z białkiem regulacyjnym G. Pobudzenie receptorów przez neuroprzekaźnik (adrenalinę, noradrenalinę) lub inny ligand, wiąże się z aktywacją odpowiedniego białka G, co prowadzi do zainicjowania ciągu reakcji biochemicznych.



Rys. 2. Budowa receptorów metabotropowych, sprzężonych z białkiem G [38].

Receptor adrenergiczny jest pojedynczym, nierozgałęzionym łańcuchem, zawierającym kilkaset aminokwasów (w większości glikoprotein), który w 7 miejscach przenika przez błonę komórkową. Fragmenty zanurzone w błonie lipidowej mają kształt  $\alpha$ -helikalny, a każdy z nich zbudowany jest z 20-25 hydrofobowych aminokwasów, połączonych sześcioma pętlami: trzema zewnątrzkomórkowymi i trzema wewnątrzkomórkowymi. Na zewnątrz komórki łańcuch jest zakończony aminowym odcinkiem N-końcowym, który jest miejscem rozpoznawania neuroprzekazników i bierze udział w umiejscawianiu receptorów w błonie. Odcinki transmembranowe, przenikające błonę oraz pętle zewnętrzne tworzą w błonie komórkowej miejsce, do którego przyłączają się ligandy. [20,39]. Natomiast część wewnątrzkomórkowa, zanurzona w cytozolu (odcinek C-końcowy), wraz z pętlą c3 (Rys.1), pełni ważną rolę w tworzeniu sygnału wewnątrzkomórkowego, wiązaniu z innymi białkami wewnątrzkomórkowymi i regulacji zakotwiczenia receptora w błonie [4].

Miejscem, do którego przyłączane jest białko regulatorowe G, jest pętla wewnątrzkomórkowa, łącząca segmenty H5 i H6 (Rys. 2), helisę oraz wewnątrzkomórkowy łańcuch peptydowy, zaangażowany także w proces fosforylacji [39].



Rys. 3. Mechanizm działania receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych, rysunek zmodyfikowany wg [40].

Białko G jest heterotrimerem zbudowanym z trzech podjednostek:  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ . W stanie spoczynku białko to pozostaje w formie kompleksu  $\alpha\beta\gamma$  i nie jest połączone z receptorem. GDP połączone jest z podjednostką  $\alpha$ . Gdy do receptora przyłączy się agonista, GDP zastąpione zostaje przez GTP, po czym kompleks białka G rozpada się na  $\alpha$ -GTP i podjednostki  $\beta$  i  $\gamma$ . Aktywna podjednostka  $\alpha$ -GTP może stymulować (białko *Gas*) lub hamować (białko *Gai*) i inne białka (np. enzymy). Gdy GTP ulega hydrolizie do GDP i nieorganicznej reszty fosforanowej, proces ulega przerwaniu i podjednostka  $\alpha$ -GDP odłącza się od efektora i łączy się w kompleks białka G z dwiema pozostałymi podjednostkami ( $\beta$  i  $\gamma$ ) (Rys. 3) [41].

Receptory  $\alpha_2$ -adrenergiczne sprzężone są z białkiem G i hamują aktywność cyklazy adenylanowej oraz syntezę cAMP. Receptory presynaptyczne regulują wydzielanie noradrenaliny na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego.

### 1.1.2.2. Właściwości farmakologiczne i rola fizjologiczna receptorów $\alpha_2$ -adrenergicznych

Receptory  $\alpha_2$ -adrenergiczne są zaangażowane w szereg procesów, zarówno fizjologicznych (np.: regulacja ciśnienia krwi i czynności serca, agregacja płytek krwi, percepcja bólu czy regulacja szerokości źrenicy), jak patologicznych (np.: nadciśnienie, depresja, jaskra, padaczka) [16,31,42]. Receptory te rozmieszczone są zarówno w ośrodkowym układzie nerwowym, jak i w tkankach obwodowych.

Wciąż brakuje informacji na temat szczegółowej roli tych receptorów, a zwłaszcza roli ich podtypów w wielu procesach zachodzących w organizmie. Dlatego poszukiwane są i testowane farmakologicznie selektywne ligandy poszczególnych podtypów receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych, o właściwościach zarówno agonistycznych jak antagonistycznych.

Pobudzenie receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych, umiejscowionych postsynaptycznie w naczyniach, powoduje skurcz. W mechanizm ten zaangażowane są jony wapnia aktywowane przez endogenne agonisty postsynaptycznego receptora  $\alpha_2$ -adrenergicznego. Blokada tych receptorów może powodować miejscowy skurcz naczyń krwionośnych, znajdujących się w oku [2,43,44]. Pobudzenie receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych w rdzeniu przedłużonym prowadzi do zwolnienia częstości akcji serca, obniżenia ciśnienia krwi, czy do zaburzenia procesu termoregulacji, jak również do zmniejszenia wydzielania śliny (prawdopodobnie przez bezpośredni wpływ na receptory postsynaptyczne zlokalizowane na neuronach parasympatycznych w pniu mózgu) [45].

W większości efektów wywołanych przez związki agonistyczne wobec receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych pośredniczy najprawdopodobniej podtyp  $\alpha_{2A}$ . Podtyp ten jest głównym podtypem receptora adrenergicznego, zlokalizowanego w większości struktur mózgu [30]. Jest on odpowiedzialny za działanie hipotensyjne, bradykardię [46], działanie przeciwbólowe, uspokajające i hipotermiczne [31,47–49]. Badania wskazują, że podtyp ten może być również częściowo odpowiedzialny za skurcz naczyń krwionośnych [46] i działanie przeciwzapalne [31].

Podtyp  $\alpha_{2B}$  również może odpowiadać za wiele efektów farmakologicznych, np. zwężenie naczyń krwionośnych [50], działanie przeciwbólowe [51,52], a także za działanie gastroprotecyjne klonidyny i rilmenidyny [53,54]. Może też brać udział

w mechanizmie nadciśnienia tętniczego spowodowanego nadmiernym spożyciem soli kuchennej [55].

Podtypy  $\alpha_{2B/C}$  mogą odpowiadać za działanie przeciwbólowe [31], natomiast podtyp  $\alpha_{2C}$  może brać udział w regulacji uwalniania przekaźników [56] oraz w mechanizmie stresu-zależnej depresji [57].

### **1.1.2.3. Rozmieszczenie receptorów $\alpha_2$ -adrenergicznych w tkankach**

Receptory  $\alpha_2$ -adrenergiczne rozmieszczone są w różnych tkankach i występują zarówno w ośrodkowym jak obwodowym układzie nerwowym [58–61]. Występują między innymi w mięśniach gładkich, tkance tłuszczowej, płytkach krwi, neuronach i nabłonku. Liczna populacja receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych, najprawdopodobniej podtypu  $\alpha_{2D}$ , występuje też w jądrze Edingera-Westphalla w mózgu [62]. Podtyp  $\alpha_{2A}$  jest najczęściej występującym podtypem receptora  $\alpha_2$ -adrenergicznego i rozmieszczony jest w większości struktur mózgowych. Największe zagęszczenie podtypu  $\alpha_{2C}$  występuje w jądrze ogoniastym [30].

W oku receptory  $\alpha_2$ -adrenergiczne rozmieszczone są w komórkach mięśni gładkich tętnicówki, naczyniach krwionośnych spojówki, wyrostkach rzęskowych oraz na szlaku odpływu cieczy wodnistej. Rozmieszczenie i gęstość podtypów receptorów  $\alpha$ -adrenergicznych w strukturach oka jest ważnym czynnikiem determinującym odpowiedź na poszczególne leki okulistyczne [45,63]. Receptory presynaptyczne występują w zakończeniach nerwowych, gdzie hamują wydzielanie adrenaliny, lub noradrenaliny (regulacja odbywa się na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego), natomiast postsynaptyczne umiejscowione są m. in. w płytkach krwi, wątrobie, trzustce, nerkach i oku [43,64,65].

Postsynaptyczne receptory  $\alpha_{2A/D}$  mogą zwiększać miejscowo przepływ krwi przez korę przedczołową mózgu i poprawiać funkcje pamięciowe [66].

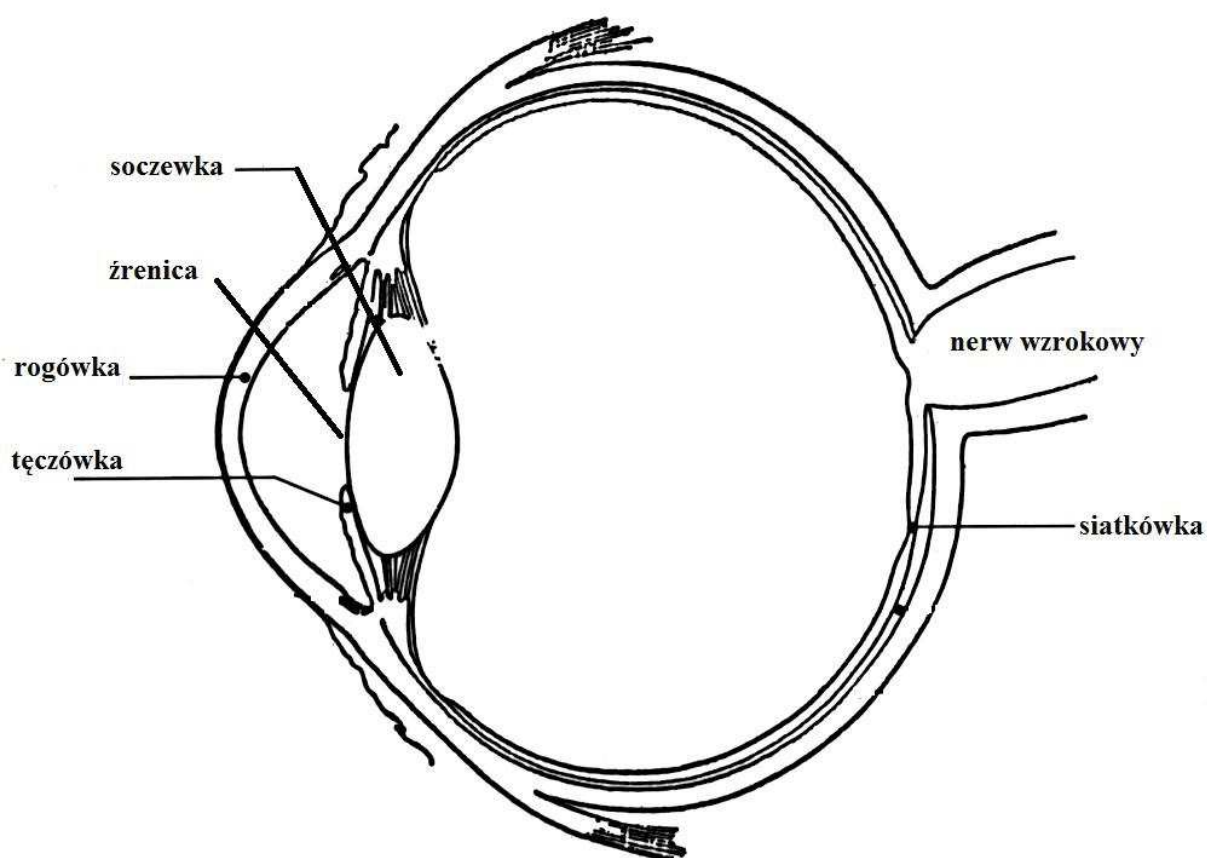
Badania wskazują, że presynaptyczne autoreceptory najprawdopodobniej należą głównie do podtypu  $\alpha_{2A/D}$  [67].

W przypadku receptorów adrenergicznych również częstotliwość stymulacji ma znaczenie fizjologiczne. Przy wysokich częstotliwościach, pobudzenie  $\alpha_{2A}$ -adrenoreceptorów hamuje wydzielanie neuroprzekaźnika, natomiast podtyp  $\alpha_{2C}$  reguluje jego wydzielanie przy niskich częstotliwościach stymulacji [56].

## 2. Mydriaza

### 2.1. Czynniki wpływające na zmiany średnicy źrenicy oka

Źrenica (*pupilla*) – jest u człowieka otworem o średnicy 3 do 8 mm, odpowiedzialnym za regulację ilości światła padającego na siatkówkę (Rys. 4). Chroni wnętrze gałki ocznej przed nadmiernym naświetleniem. Posiada zdolność kurczenia się i rozszerzania, za pomocą zwieracza i rozwieracza źrenicy, zależnie od zmian oświetlenia [68,69].



Rys. 4. Budowa oka.

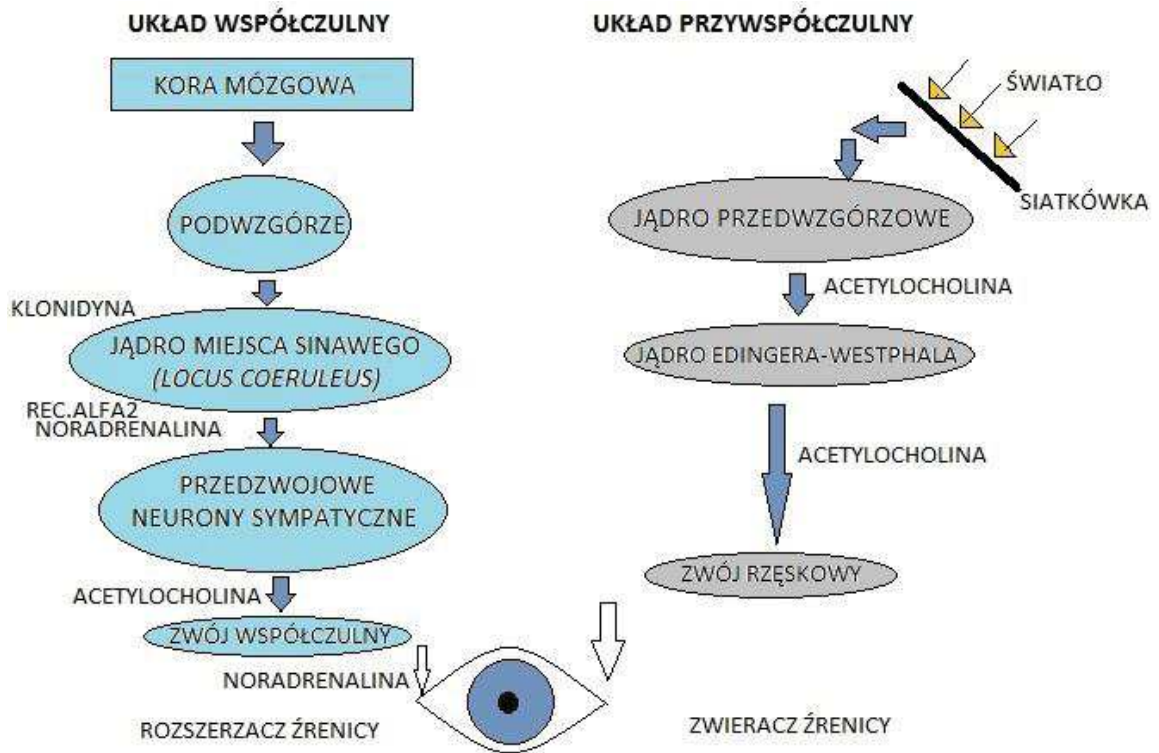
Oprócz reakcji fizjologicznej na światło, źrenica może zmieniać swoją szerokość pod wpływem choroby lub leków i innych substancji farmakologicznie czynnych (atropina, pochodne imidazoliny). Takie zjawisko nazywane jest mydriazą, czyli nadmiernym, nieadekwatnym do oświetlenia rozszerzeniem źrenicy oka.

## 2.2. Mechanizm mydriazy wywołanej pochodnymi imidazoliny

Oko, aby odbierać sygnały wzrokowe, wyposażone jest w wyspecjalizowane tkanki i struktury, a także mechanizmy, zapewniające dobre widzenie w zmieniających się warunkach otoczenia. Gdy światło pada na rogówkę — zewnętrzną warstwę gałki ocznej, jego część zatrzymuje się na nieprzepuszczalnej tęczęwce, a tylko niewielka ilość przedostaje się przez mały otwór – źrenicę, do siatkówki. W jaskrawym oświetleniu źrenica ulega zwężeniu, a w ciemności rozszerza się. Taka regulacja umożliwia doprowadzenie do siatkówki optymalnej ilości światła, dostosowanej do panujących warunków i umożliwiającej jak najlepsze widzenie (Grabowska 1997).

W regulacji szerokości źrenicy biorą udział dwa mięśnie pobudzone przez autonomiczny system nerwowy: zwieracz i rozwieracz źrenicy. Mięsień rozwieracz, zbudowany z promieniście rozmieszczonych na całej powierzchni tęczęwki włókien mięśniowych, jest kontrolowany przez układ współczulny i odpowiada za rozszerzenie źrenicy [69]. Zwieracz, zbudowany z okrężnych włókien mięśniowych, ułożonych pierścieniowo, unerwiony jest przez układ przywspółczulny. Służy do zmniejszania szerokości źrenicy. Zjawisko zwężenia źrenicy nosi nazwę miozy, zaś rozszerzenie źrenicy oka nazywane jest mydriazą. Środki farmakologiczne zwężające i rozszerzające źrenicę, nazywane są, więc odpowiednio miotykami i mydriatykami. W normalnych warunkach szerokość źrenicy ulega stale niewielkim zmianom. Stymulacja układu przywspółczulnego pobudza zwieracz źrenicy, co powoduje jej zwężenie. Natomiast pobudzenie układu współczulnego powoduje skurcz rozwieracza źrenicy i jej rozszerzenie. Udział poszczególnych struktur układu nerwowego w reakcji w regulacji średnicy źrenicy oka szczura przedstawia Rys. 5.

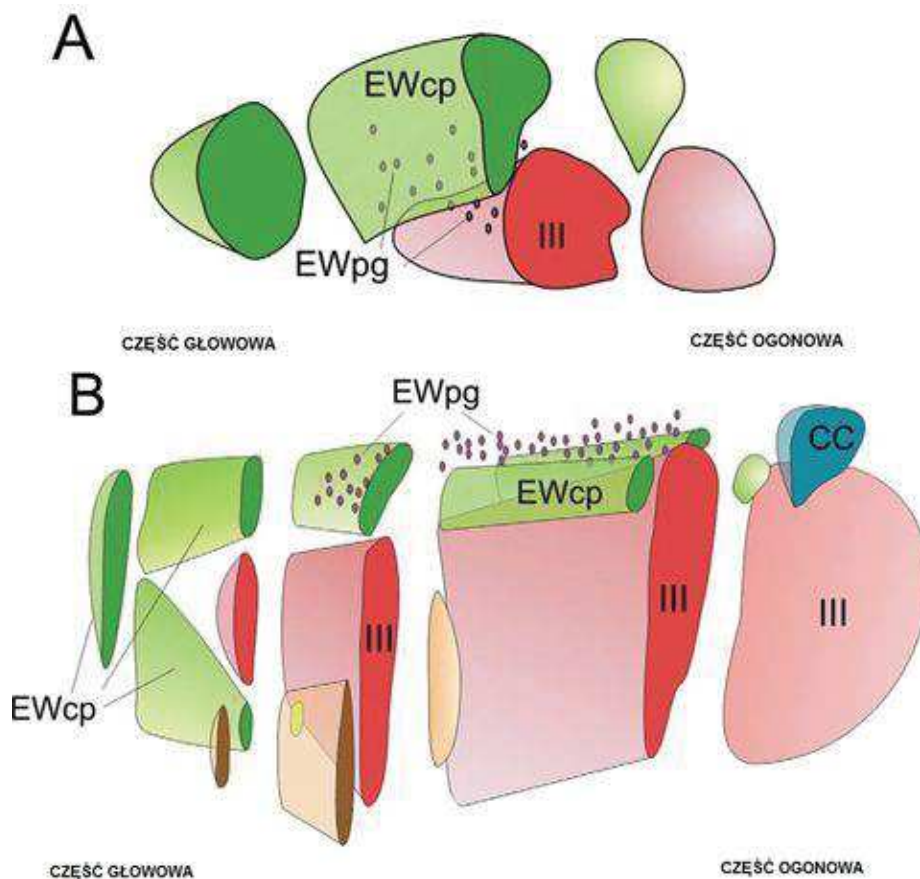




Rys. 5. Schemat reakcji mydriatycznej oka szczura - rysunek zmodyfikowany na podstawie [45,70].

W 1954 r. Wawrick odkrył, że przywspółczulne, przedzwojowe komórki unerwiające tęczówkę znajdują się w jądrze Edingera - Westphala i jądrze brzuszno-przedniobocznym nerwu okoruchowego [71].





Rys. 6. Jądro Edingera-Westphala. A – u szczura, B – u człowieka. Lokalizacja i zróżnicowanie komórek w obrębie jądra Edingera-Westphala. Objasnienia symboli: EWcp- ośrodkowe populacje komórek, EWpg- przedzwojowe populacje komórek. Zmodyfikowany rysunek na podstawie pracy Kozicza [72].

Jądro Edingera-Westphala (Rys. 6) jest główną strukturą w mózgu odpowiedzialną za efekt mydriatyczny. Rozpoczyna się przedzwojowymi włóknami parasympatycznymi, kontrolującymi ciało rzęskowe i mięsień zwieracz źrenicy [73]. Znajdują się w nim liczne ośrodkowe postsynaptyczne receptory  $\alpha_2$ -adrenergiczne, których pobudzenie powoduje bezpośredni efekt rozszerzenia źrenicy [45,74]. Za jego pomocą kontrolowana jest też akomodacja oka [72]

W latach 70. ubiegłego wieku Walland i Kobinger [75,76] odkryli, że klonidyna po podaniu dożylnym wywołuje rozszerzenie źrenicy oka szczura. Pierwotnie założyli oni, że efekt ten jest wynikiem bezpośredniego działania pobudzającego leku na tęczęwkę,

jednak późniejsze badania dowiodły, że mydriaza obserwowana pod wpływem klonidyny jest pochodzenia ośrodkowego i odpowiedzialna za ten efekt jest stymulacja receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych w jądrze Edingera-Westphalla, doprowadzająca do spadku aktywności włókien układu parasympatycznego, które unerwiają tęczęwkę oka [74,77–80]. Liczne badania przeprowadzone na różnych gatunkach zwierząt laboratoryjnych dowiodły, że nie tylko klonidyna, ale również jej pochodne zawierające w cząsteczce układ imidazoliny, a także inne heterocykliczne pierścienie pięcioczłonowe, np. imidazolu, oksazoliny, tiazoliny, mogą wywoływać rozszerzenie źrenicy. Wykazano też, że związki zwane umownie „imidazolinami” wywołują rozszerzenie źrenicy u kotów, szczurów i myszy [74,77,81,82]. Udział ośrodkowych receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych w działaniu mydriatycznym analogów imidazoliny został ostatecznie potwierdzony wynikami licznych doświadczeń fizjologicznych i farmakologicznych.

Według Kossa mydriazę oka u szczurów można wywołać na drodze stymulacji elektrycznej nerwu kulszowego, co skutkuje zmniejszeniem przywspółczulnego sygnału nerwowego docierającego do tęczęwki oka zwierząt i rozszerzeniem źrenicy [74,83]. Badania na szczurach z zastosowaniem agonistów receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych, klonidyny, guanoksabenzu oraz UK-14,304 wykazały, że antagonisty tych receptorów: johimbina, RX781094 i RS21361, całkowicie hamują efekty mydriatyczne wywołane przez wymienione imidazoliny [80,84,85]. Natomiast działanie rozszerzające źrenicę oka zwierząt nie było znoszone przez takie selektywne antagonisty receptora  $\alpha_1$ -adrenergicznego jak prazosyna czy korynantyna. Potwierdza to, że w efekcie mydriatycznym klonidyny, guanoksabenzu i UK 14,302 pośredniczą znajdujące się w jądrze Edingera-Westphala receptory  $\alpha_2$ -adrenergiczne [82,86]. Także rilmenidyna – „mieszany” agonista receptorów  $I_1$ -imidazolinowych i  $\alpha_2$ -adrenergicznych, wywołuje zależną od dawki długotrwałą mydriazę, znoszoną przez wybiórczego antagonistę receptora  $\alpha_2$ -adrenergicznego: RS-79948 [73,87].

Stwierdzono, że metamfetamina również wywołuje rozszerzenie źrenicy oka u szczurów, gdyż wywiera działanie stymulujące na receptory typu  $\alpha_2$  w sposób pośredni, hamując wychwyt zwrotny noradrenaliny i zwiększając uwalnianie neuroprzekaźnika z zakończeń nerwowych. Efekt ten ulega zahamowaniu pod wpływem idazoksanu i johimbiny, co świadczy o udziale w rozszerzeniu źrenicy, wywołanym metamfetaminą, receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych [88]. Podobne rezultaty osiągnięto podając zwierzętom

deksamfetaminę - inny środek o pośrednim, sympatykomimetycznym mechanizmie działania, związanym z uwalnianiem endogennej noradrenaliny z zakończeń nerwowych. Efekt amfetaminy również był antagonizowany przez idazoksan i johimbinę, natomiast antagonistą receptora  $\alpha_1$ -adrenergicznego, fenoksybenzamina, nie wykazał wpływu na szerokość źrenicy [89].

Brak zaangażowania receptorów  $\beta$ -adrenergicznych w zjawisko mydriazy, obserwowane po podaniu zwierzętom klonidyny, potwierdzają rezultaty doświadczeń z przedstawicielem  $\beta$ -adrenolityków, pindololem, który nie wywoływał żadnych zmian szerokości źrenicy oka [77,87,88]. Yu i Koss oraz Raczak-Gutknecht i in. wykazali, że mydriaza wywołana dożylnym podaniem szczurom klonidyny jest zależna od ośrodkowych receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych, natomiast receptory imidazolinowe typu  $I_1$  nie odgrywają istotnej roli w tym efekcie [73,90].

Ponieważ receptory  $\alpha_2$ -adrenergiczne nie stanowią jednorodnej grupy, wciąż nie jest ostatecznie wyjaśnione, który ich podtyp (podtypy) pośredniczy w działaniu mydriatycznym pochodnych imidazoliny [62]. Badania biochemiczne z wykorzystaniem radioligandów oraz doświadczenia farmakologiczne, w których określony został wpływ dostępnych antagonistów receptora  $\alpha_2$ -adrenergicznego na mydriazę wywołaną podaniem klonidyny szczurom sugerują, że receptory postsynaptyczne typu  $\alpha_2$ , występujące w korze mózgowej i jądrze Edingera-Westphala, które pośredniczą w działaniu rozszerzającym źrenicę oka wywieranym przez klonidynę, należą prawdopodobnie do podtypu  $\alpha_{2D}$ . Ostateczną odpowiedź na to pytanie utrudnia fakt, że nie są dotychczas znane selektywne agonisty wszystkich podtypów receptora  $\alpha_2$ -adrenergicznego.

### **2.3.Zastosowanie modelu mydriazy oka u szczurów w badaniach farmakologicznych**

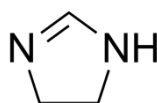
Powszechnie stosowane metody radioizotopowe *in vitro*, służące do wyznaczenia parametrów  $K_a$  lub  $K_i$  nowootrzymanyh związków imidazolinowych do receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych i/lub imidazolinowych, pozwalają jedynie na oszacowanie powinowactwa danej pochodnej. Nie można natomiast stwierdzić, czy dana pochodna wykazuje właściwości agonistyczne czy antagonistyczne względem danego receptora.

Dla uzyskania tych informacji niezbędne jest uzupełnienie badań biochemicznych testami farmakologicznymi *in vivo*. Umożliwiają one zdobycie informacji nie tylko dotyczących właściwości agonistycznych lub antagonistycznych danego liganda, ale również określenie jego powinowactwa do ośrodkowych receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych oraz względnej siły działania na źrenicę oka (w porównaniu ze związkiem modelowym - klonidyną). Dogodnym modelem farmakodynamicznym jest model mydriazy ocznej u szczura wg Kossa [80]. Test ten w obecnej zmodyfikowanej wersji polega na śledzeniu na ekranie monitora przebiegu procesu mydriazy, obserwowanej przy pomocy mikroskopu stereoskopowego, po podaniu dożylnym uśpionym zwierzętom badanego związku aktywnego farmakologicznie w dawkach skumulowanych. Doświadczenia można prowadzić w nieobecności i w obecności antagonisty receptora  $\alpha_2$ -adrenergicznego, zastosowanego w dawce jednorazowej przed aplikacją badanego związku. Ocenę efektu mydriatycznego w mm, względem kontroli, można prowadzić w szerokim zakresie dawek, rzędu od kilku do ponad tysiąca  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , podawanych temu samemu zwierzęciu [91].

Model mydriazy u szczurów jest obecnie z powodzeniem stosowany do przedklinicznej oceny właściwości farmakologicznych nowosyntezyowanych ligandów receptora  $\alpha_2$ -adrenergicznego o strukturze imidazolinowej [73,74]. Jego niewątpliwą zaletą jest to, że pozwala jednocześnie określić, czy badana pochodna imidazolinowa ma cechy agonisty czy antagonisty podtypów receptora typu  $\alpha_2$ -adrenergicznego, a także zidentyfikować związki, które selektywnie łączą się z receptorem  $I_1$ -imidazolinowym, gdyż w tym przypadku nie obserwuje się efektu rozszerzenia źrenicy oka zwierząt.

### 3. Związki o budowie imidazolinowej - ogólna charakterystyka działania farmakologicznego

Wiele leków posiada w swojej strukturze pięcioczłonowy pierścień imidazolinowy:



Ze względu na zdolność oddziaływania z licznymi typami receptorów, np.  $\alpha_1$ - i  $\alpha_2$ -adrenergicznymi,  $I_1$ - i  $I_2$ -imidazolinowymi, histaminergicznymi czy dopaminergicznymi, związki z grupy pochodnych imidazoliny mogą wywoływać różnorodne działania farmakologiczne, m.in. działanie hipotensyjne, zwłaszcza w przypadku hiperlipidemii i zaburzeń gospodarki węglowodanowej (rilmenidyna, moksonidyna), antyarytmiczne (klonidyna, rilmenidyna, moksonidyna), obniżające ciśnienie śródgałkowe w jaskrze oraz neuroprotekcyjne na siatkówkę oka (brimonidyna, apraklonidyna), przeciwdziałające przerostowi lewej komory serca w nadciśnieniu (klonidyna, rilmenidyna, moxonidyna) [92], przeciwuczuleniowe (antazolina), anemizujące błonę śluzową nosa (ksylometazolina, oksymetazolina, tetryzolina) [45,49,93] oraz ogólnie znieczulające i przeciwbólowe (deksmedetomidyna, fadolmidyna) [94]. Wykazano, że połączenie deksmedetomidyny z innymi środkami wywołującymi znieczulenie ogólne pozwala na zmniejszenie ich dawek (stężeń) niezbędnych do wywołania znieczulenia. Zdecydowało to o przydatności pochodnych imidazoliny, jako środków wspomagających działanie anestetyczne [95].

Niektóre analogi imidazoliny są wykorzystywane również w leczeniu uzależnień od opioidów (lofeksydyna, klonidyna) [16,31], jako środki przeciwbacze (lewamizol) [96], przeciwwirusowe i przeciwnowotworowe [97] oraz uważane są za potencjalne środki przeciwdepresyjne (BU 224) [98,99].

Czasem między wywieranymi przez imidazoliny efektami zachodzi korelacja w sposób zależny od dawki, np. hipotensja i bradykardia skorelowane są z działaniem mydriatycznym [100].

## 4. Modelowanie molekularne

Modelowanie molekularne jest komputerową wizualizacją struktur cząsteczek, umożliwiającą, na podstawie teoretycznych modeli, obliczenie parametrów ilościowo opisujących budowę cząsteczki. Do obliczeń wykorzystywane są programy komputerowe (np.: *Hyperchem*, *Gaussian*, *Chem 3D*). Obliczone parametry dotyczą standardowo związków w próżni. Wstępnym celem modelowania jest uzyskanie struktury cząsteczki o możliwie najniższej energii całkowitej (minimum globalne),

ponieważ taka forma związku jest najtrwalsza i związek najprawdopodobniej występuje w takiej postaci w warunkach naturalnych.

Programy obliczają minimum globalne poprzez optymalizację geometryczną, czyli obliczanie energii dla różnych konformacji cząsteczki i wybór konformacji o najniższej energii. Istnieje ryzyko, że program szukając możliwie najbardziej stabilnej konformacji, wyznaczy jedynie jakieś minimum lokalne, dlatego ważne jest, aby zbadać energię całkowitą dla wielu konformacji cząsteczki. Istnieją dwie podstawowe metody przeprowadzania optymalizacji geometrycznej: metoda mechaniki molekularnej – mniej czasochłonna, ale równocześnie mniej dokładna, oraz metoda mechaniki kwantowej – wnosząca więcej informacji, lecz jednocześnie pochłaniająca dużo czasu komputerowego [101,102].

Modelowanie molekularne rozpoczyna się od narysowania schematu cząsteczki związku, rozmieszczając atomy i wiązania w przestrzeni. Następnie program komputerowy tworzy na tej podstawie trójwymiarowy model cząsteczki. Dalej następuje etap odnalezienia konformacji cząsteczki o minimalnej energii, w którym ustalone zostają odpowiednie długości wiązań, kąty i odległości między atomami. Z kolei wybierana jest metoda obliczeniowa opisująca strukturę i właściwości cząsteczki, oparta o zasady mechaniki kwantowej lub mechaniki molekularnej. W dalszej kolejności ustalane są parametry limitujące czas i dokładność obliczeń. Prowadzone są następujące obliczenia:

- *Single point* – opisujące właściwości energetyczne i termodynamiczne cząsteczek związków (energia całkowita, energia wiązań, orbitali, moment dipolowy, ciepło tworzenia;
- związane z dynamiką molekularną, pozwalające na symulację zmian konformacji związków w określonych warunkach;
- związane z optymalizacją geometryczną – poszukiwanie konformacji o minimalnej energii;
- analiza QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) – metoda polega na poszukiwaniu zależności między aktywnością biologiczną a parametrami struktury testowanych związków;



- określenie przejść elektronowych, wywołanych promieniowaniem IR (podczerwonym) i UV-VIS (ultrafioletowym), umożliwiających rozpoznanie grup funkcyjnych lub struktur w cząsteczce [101,102].

## 5. Ilościowe zależności struktura-aktywność (QSAR)

Przedmiotem zainteresowań naukowców związanych z przemysłem farmaceutycznym jest najczęściej identyfikacja struktur chemicznych, które mogłyby stać się nowymi lekami. Wciąż poszukiwane są selektywne związki, które łącząc się z jednym typem/podtypem receptora wywoływałyby pojedynczy efekt farmakologiczny, nie powodując jednocześnie efektów niepożądanych. Niestety wytwarzając związek chemiczny o określonej strukturze, trudno przewidzieć dokładnie, jaki będzie efekt farmakologiczny jego działania. Nie jest również łatwe zaprojektowanie takiej struktury, która wywoła jedną określoną reakcję organizmu [103].

Aby znaleźć cząsteczkę, o odpowiedniej aktywności biologicznej, lepszych właściwościach, czy większej selektywności receptorowej, która mogłaby zostać nowym lekiem, trzeba zsyntezować, a następnie przetestować bardzo wiele związków. Niestety wiele z nich, z różnych powodów, nie ma szans na to, by zostać lekiem.

Przy poszukiwaniu nowych leków, oprócz nowych związków, często wykorzystuje się znane już struktury, modyfikując jedynie ich podstawniki. Daje to możliwość uzyskania ogromnej liczby nowych związków, jednak testowanie każdego z nich „po kolei” pochłaniałoby dużo czasu i wymagało dużych nakładów finansowych. Dlatego niezbędna jest wstępna selekcja związków i wybranie najlepiej rokujących jako potencjalne leki.

W metodologii poszukiwania nowych leków, ważną rolę odgrywa określenie zależności między właściwościami strukturalnymi a aktywnością biologiczną związków. Określeniem matematycznych zależności między strukturą molekularną a właściwościami biologicznymi związków zajmują się metody QSAR (Quantitative Structure - Activity Relationships). Podstawą QSAR jest założenie występowania zależności pomiędzy różnicami w działaniu biologicznym grupy związków a wybranymi parametrami opisującymi zmiany w ich strukturze. Na podstawie istotnych statystycznie korelacji budowany jest model w postaci równania regresji (zwykle wieloparametrowej),

za pomocą, którego można przewidywać właściwości (aktywność) dowolnych związków pochodnych o zdefiniowanej strukturze chemicznej.

Pierwsze próby odnalezienia zależności między różnymi właściwościami związków podejmowane były już w XIX wieku. W 1863 roku A. F. A. Cros przeprowadził badania, w których zaobserwował wzrost toksyczności alkoholi u ssaków wraz ze spadkiem ich rozpuszczalności w wodzie [104,105]. W 1968 roku Crum-Brown i Fraser, badając efekt biologiczny wywierany przez alkaloidy przed i po metylacji azotu, doszli do wniosku, że aktywność biologiczna ( $\Phi$ ) jest zależna od składu chemicznego cząsteczki (C):

$$\Phi = f(C) \qquad \text{Równ. 1}$$

Pod koniec XIX wieku, Meyer, Richet i Overton niezależnie od siebie odkryli, że istnieje liniowa korelacja pomiędzy lipofilnością a efektem biologicznym [105,106].

W 1935 roku Hammett odkrył, że między zmianą energii swobodnej związku, spowodowaną wprowadzeniem podstawnika, a jego powinowactwem elektronowym, istnieje zależność liniowa. Na tej podstawie, po wyznaczeniu  $\sigma$  (stała Hammetta) dla wielu związków, ustalono, że można je podzielić na dwie grupy: akceptory elektronów i donory elektronów [107]. Na podstawie modelu Hammetta, Taft w 1956 roku przedstawił propozycję rozdzielenia efektów polarnych, sterycznych i rezonansowych podstawników w związkach alifatycznych [105,106]. W 1964 roku Hansch i Fujita zaproponowali równanie łączące parametry hydrofobowe ze stałymi elektronowymi Hammetta.

Celem analizy QSAR jest otrzymanie dla grupy badanych związków zestawu parametrów istotnie skorelowanych z biologiczną aktywnością. Zależność ta zapisana jest w postaci równania, za pomocą którego, znając strukturę, można prognozować aktywność nowych lub jeszcze nietestowanych związków [108].

Aktywność związku zależna jest od struktury całej cząsteczki i nawet niewielka zmiana w budowie chemicznej może w znacznym stopniu zmieniać właściwości farmakologiczne pochodnej.

Główne cechy budowy cząsteczek mające wpływ na aktywność, to:

- grupy chemiczne decydujące o hydrofobowości;
- rozmieszczenie ładunków elektronowych w cząsteczce;



- struktura przestrzenna cząsteczki oraz energia różnych konformacji [107].

QSAR opiera się o ekstratermodynamiczną zasadę, że cząsteczki o podobnej budowie zachowują się podobnie w takich samych warunkach środowiska, a różnice w aktywności związków wynikają z różnic w budowie cząsteczki [109].

Dzięki badaniu ilościowych zależności struktura-aktywność (QSAR) można przewidywać efekt biologiczny nietestowanych biologicznie związków na podstawie ich właściwości fizykochemicznych lub innych cech związanych ze strukturą. Dodatkowo możliwe jest wskazanie, które z chemicznych właściwości regulują określony typ efektu farmakologicznego. QSAR mogą też dostarczać wskazówek, jak modyfikować właściwości strukturalne, żeby uzyskać pożądaną odpowiedź farmakologiczną [110].

W przypadku znalezienia i opisanie równaniem zależności struktura-aktywność możliwe jest wskazanie podstawników lub fragmentów cząsteczek odpowiedzialnych za określony efekt farmakologiczny. Możliwe jest też wyeliminowanie fragmentów struktur odpowiedzialnych za działania niepożądane. W efekcie analiza QSAR może przyczynić się do przewidywania właściwości poszczególnych pochodnych oraz do projektowania nowych związków o lepszej aktywności, o ukierunkowanym działaniu farmakologicznym. Może też znacząco ograniczyć liczbę syntetyzowanych struktur, spośród których prowadzone są poszukiwania jako słabo rokujących na nowy lek [102].

## 5.1. Właściwości fizykochemiczne związków

O właściwościach farmakologicznych cząsteczki decydują właściwości fizykochemiczne, czyli parametry opisujące budowę przestrzenną związku oraz jego cechy mierzone eksperymentalnie. Struktury chemiczne w analizie QSAR zakodowane są pod postacią wielu deskryptorów cząsteczkowych [108]. Właściwości fizykochemiczne najczęściej wykorzystywane w analizie QSAR ze względu na dogodność pomiaru, to m. in. lipofilowość, hydrofobowość (może być zmierzona dla całej cząsteczki lub dla określonego jej fragmentu/podstawnika), właściwości elektronowe (stała Tafta, Hammetta), parametry steryczne [102,106], rozpuszczalność w wodzie, refrakcja molowa (MR), a także liczne parametry uzyskane za pomocą obliczeń molekularnych.

- Lipofilowość

Lipofilowość (hydrofobowość) jest jedną z najczęściej branych pod uwagę właściwości, przy projektowaniu leków, ze względu na wpływ, jaki wywiera na przenikanie związków przez błony komórkowe, wchłanianie w jelitach, transport w organizmie, rozmieszczenie w tkankach i stopień wiązania leków z białkami osocza. Wszystkie te cechy decydują o dostępie leku do receptora [102,108].

Miarą lipofilowości są współczynnik podziału P (ang. *partition coefficient*) lub stała hydrofobowości ( $\pi$ ). Hydrofobowość można wyznaczyć doświadczalnie, na podstawie względnego rozdziału związku w mieszaninie n-oktanol/woda. Mieszanina ta w założeniu odwzorowuje układ faz polarnych i niepolarnych w organizmie ssaków. Stosunek stężenia związku w n-oktanolu do stężenia związku w roztworze wodnym, to współczynnik podziału – P. Zwykle używa się wartości  $\log P$ :

$$\log P = \log \frac{\text{stężenie badanego związku w n-oktanolu}}{\text{stężenie badanego związku w wodzie}} \quad \text{Równ. 2}$$

Związki hydrofobowe o zbyt wysokim współczynniku P mogą silnie wiązać się z fazami lipidowymi w organizmie i pozostawać w nich do biotransformacji. Natomiast związki hydrofilowe o bardzo niskim współczynniku P, pozostają w fazie wodnej, z której mogą zostać zbyt łatwo wydalone. Dlatego poszukiwane są związki o optymalnej wartości współczynnika P, których właściwości lipofilno-hydrofilne umożliwiłyby przenikanie przez błony w stopniu umożliwiającym dostęp do odpowiedniego receptora [107]. Zmiany w strukturze cząsteczki, np. przez dodawanie określonych podstawników, powodują odpowiednie zmiany jej współczynnika P.

Hansch i in. [111] postawili hipotezę, że związki o różnej budowie, wykazujące podobny mechanizm oddziaływania z tym samym receptorem, będą wykazywać podobne wartości współczynnika P. Na przykład, związki dla których  $\log P$  przybiera wartość około 2 docierają do OUN [107].

Współczynnik podziału można obliczyć teoretycznie przy wykorzystaniu udziału cząstkowego różnych podstawników. Udział ten wyrażany jest m. in. stałą

hydrofobowości ( $\pi$ ). Jest to miara hydrofobowości podstawnika względem atomu wodoru. Wartości ( $\pi$ ) są charakterystyczne dla poszczególnych podstawników, jednak różnią się dla podstawników aromatycznych i alifatycznych. Stosowane są także inne fragmentaryczne stałe lipofilowości wraz ze zdefiniowanymi poprawkami strukturalnymi [102].

- Parametry elektronowe

Parametry elektronowe wpływają na stopień jonizacji związku, co decyduje również o zdolności jego przenikania przez błony komórkowe oraz o sile wiązania z receptorem. Dla podstawników umieszczonych w pierścieniach główny parametr elektronowy, to Hammetta ( $\sigma$ ), charakteryzująca elektronodonorowe i elektronoakceptorowe właściwości podstawnika.

- Właściwości steryczne

Lek łączy się z receptorem w ściśle określonym miejscu w organizmie. Jego dotarcie i umocowanie w odpowiednim miejscu receptora zależy od kształtu, objętości oraz rozmiaru cząsteczki. Do liczbowego opisu właściwości sterycznych związku mogą służyć stała Tafta ( $E_s$ ), określająca objętość zajmowaną przez grupę atomów, czy refrakcja molowa (R):

$$R = (n^2 - 1) / (n^2 + 2) * M/d \quad \text{Równ. 3}$$

$n$  – współczynnik refrakcji,  $M$  – masa molowa,  $d$  – gęstość,  $(n^2 - 1) / (n^2 + 2)$  – poprawka, określająca zdolność podstawnika do polaryzacji.

Innym parametrem określającym właściwości steryczne związków może być steryczny parametr Verloopa. Można go wyliczyć za pomocą programu *sterimol*, w oparciu o wielkości kątów długości wiązań, promieni van der Waalsa, czy też konformacji podstawników. Najczęściej stosuje się parametry przestrzennych rozmiarów cząsteczek i układów farmakoforowych po zoptymalizowaniu energetycznym ich

struktury lub symulacji zakotwiczenia („docking”) w założonym miejscu wiążącym zakładanego receptora farmakologicznego.

- Inne parametry fizykochemiczne

Istnieje wiele parametrów opisujących strukturę cząsteczek. Należą do nich m. in. moment dipolowy, odległości między atomami, wiązania wodorowe, konformacje molekularne. Ze względu na trudności w pomiarach niektóre z parametrów eksperymentalnych (np. moment dipolowy) nie zawsze mogą być brane pod uwagę podczas analizy QSAR.

## 5.2. Deskryptory molekularne z chemii obliczeniowej

Deskryptory molekularne stanowią numeryczną formę opisu właściwości chemicznych cząsteczki w analizie QSAR. Można podzielić je na grupy [108]:

- deskryptory *topologiczne* – opisują połączenia atomów w cząsteczce; używane są do modelowania właściwości biologicznych, fizykochemicznych i farmakokinetycznych (rozmiar cząsteczki, kształt, rozgałęzienia łańcuchów węglowodorowych, wiązania wielokrotne);
- deskryptory *geometryczne* – wyliczane są na podstawie trójwymiarowych współrzędnych atomów w cząsteczce, opisują cechy przestrzenne, np. rozmiar cząsteczki, kształt, rozmieszczenie atomów w cząsteczce; dostarczają informacji na temat związków o podobnej strukturze i konformacjach cząsteczki (MoRSE);
- deskryptory *konstytucyjne* – dotyczące składu cząsteczki bez informacji o tym, w jaki sposób atomy są połączone. Nie zmieniają się wraz ze zmianą konformacji cząsteczki, dlatego za ich pomocą nie można rozróżnić izomerów (masa cząsteczkowa, liczba i rodzaj atomów, liczba wiązań i pierścieni);
- deskryptory *elektronowe* – dotyczą właściwości cząsteczki związanych z rozkładem elektronów i energią wiązań (moment dipolowy,  $E_{\text{HOMO}}$ ,  $E_{\text{LUMO}}$ , energia całkowita);
- deskryptory *fizykochemiczne* – łączą strukturę chemiczną cząsteczki z jej mierzalnymi właściwościami chemicznymi (refrakcja molowa, CLOGP);

## 5.3. Empiryczne modele matematyczne

W analizie QSAR najbardziej popularne są modele matematyczne Hanscha i Free-Wilsona [104,106,107,112].

### 5.3.1. Równanie Hanscha

W 1964 roku Corwin Hansch opublikował model matematyczny zwany równaniem Hanscha lub modelem ekstratermodynamicznym.

Model zakłada, że losy cząsteczki związku chemicznego w organizmie zależą od wielu czynników takich jak równowaga lipofilno-hydrofilna, która w przypadku optymalnej wartości współczynnika P, umożliwia przenikanie przez błony, od kształtu i wielkości cząsteczki, rozkładu elektronów, które wpływają na powinowactwo cząsteczki do receptora. Hansch zaproponował równanie, którego ogólny zapis ma postać [106,107]:

$$\log \frac{1}{C} = -k_1\pi^2 + k_2\pi + k_3\sigma + k_4E_S + k_5 \quad \text{Równ. 4}$$

gdzie:

$\frac{1}{C}$  – aktywność związku;

$k_1, k_2, k_3, k_4, k_5$  – stałe otrzymane w wyniku analizy regresji;

$\pi$  – stała hydrofobowa opisująca podstawniki; jest zależna od swobodnej energii cząsteczki;

$\sigma$  – stała Hammetta, jest odpowiedzialna za efekty elektronowe, różni się w zależności od podstawnika;

$E_S$  – stała Tafta, odpowiedzialna za parametry przestrzenne podstawników;

### 5.3.2. Model Free-Wilsona

W 1964 roku Free i Wilson zaproponowali model matematyczny oparty na założeniu, że suma aktywności wnoszonej przez pojedyncze podstawniki i fragmenty związku jest równa całkowitej aktywności biologicznej związku. Zależność tę można zapisać w postaci równania [106,107,112]:

$$\text{Całkowita aktywność} = \mu + \sum G_i X_i$$

Równ. 5

gdzie:

$\mu$  – średnia aktywność biologiczna całej grupy związków badanych;

$G_i$  – udział aktywności wnoszonej przez podstawnik  $X_i$ .

Późniejsze prace wykazały równoważność modeli Hanscha i Free-Wilsona.

## 5.4. Analiza korelacji

Analiza korelacyjna jest podstawową metodą ilościowej oceny siły związku między zmiennymi niezależnymi (np.: deskryptory molekularne) a zmiennymi zależnymi (np.: właściwości materiałowe, fizykochemiczne, aktywność biologiczna). Zależność między zmiennymi można opisać liczbowo za pomocą wielu parametrów, m. in siły (wielkości) – najczęściej wyrażanej, jako współczynnik korelacji liniowej Pearsona –  $r$ ; istotności (wiarygodności), wyrażonej w postaci liczbowej jako poziom istotności –  $p$ . Współczynnik Pearsona jest miarą siły związku prostoliniowego między dwiema mierzalnymi zmiennymi. Wartości współczynnika  $r$  mogą mieścić się w przedziale  $[-1, 1]$ .

Znak przy współczynniku korelacji decyduje o jej kierunku. Gdy przyjmuje wartości ujemne, mamy do czynienia z korelacją negatywną (przy wzroście wartości zmiennej  $X$ , wartości zmiennej  $Y$  maleją). Znak dodatni, świadczy o korelacji pozytywnej (wzrostowi wartości zmiennej  $X$ , towarzyszy wzrost wartości zmiennej  $Y$ ). Wartość bezwzględna współczynnika Pearsona informuje o sile zależności [113]:

$|r| = 0$  – brak korelacji

$|r| = [0,1-0,3]$  – korelacja słaba

$|r| = [0,3-0,5]$  – korelacja przeciętna

$|r| = [0,5-0,7]$  – korelacja wysoka

$|r| = [0,7-0,9]$  – korelacja bardzo wysoka

$|r| = [0,9-1]$  – korelacja prawie pełna.

$(r)^2$  – współczynnik determinacji (kwadrat współczynnika korelacji) przekazuje informacje o tym, jaka część zmienności w próbie została wyjaśniona regresją.

Istotność, wiarygodność korelacji przedstawiana jest w postaci liczby: poziom istotności – p. Im mniejsza ta liczba, tym wyższa jest istotność korelacji.

Regresja wielokrotna jest modelem stosowanym do poszukiwania zależności struktura-aktywność. Pozwala ilościowo ocenić relacje pomiędzy zmiennymi niezależnymi (deskryptory molekularne) a zmiennymi zależnymi (właściwości biologiczno-chemiczne). Równanie przedstawiające technikę regresji liniowej ma postać [105]:

$$y = a_0 + a_1x_1 + \dots + a_nx_n \quad \text{Równ. 6}$$

gdzie:

y – zmienna zależna (np. aktywność biologiczna);

$a_0$  – wyraz wolny równania;

$a_1, \dots, a_n$  – współczynniki regresji obliczone na podstawie zestawu danych, dla których znane są zmienne zależne i niezależne;

$x_1, \dots, x_n$  – zmienne niezależne (parametry struktury związków).

## II. CEL PRACY

Celem pracy była ocena udziału ośrodkowych receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych (z uwzględnieniem ich podtypów) w efekcie mydriatycznym, wywieranym przez reprezentacyjną grupę leków i innych pochodnych imidazoliny na oko szczura. Realizacja zadania badawczego zaplanowana została w dwóch etapach. W pierwszym etapie oznaczono parametry farmakodynamiczne badanych imidazolin, takie jak powinowactwo receptorowe i siła działania w nieobecności oraz w obecności antagonistów receptorowych.

Uzyskane miary aktywności farmakologicznej miały posłużyć do wyprowadzenia ilościowych zależności struktura-aktywność (QSAR) w oparciu o parametry struktury, pozyskane metodami chemii obliczeniowej. Wyniki analizy farmakodynamicznej (farmakologicznej) oraz analizy QSAR zostały przedyskutowane pod kątem receptorowych (molekularnych) mechanizmów działania pochodnych imidazolinowych i kierunków ich modyfikacji strukturalnych w celu uzyskania wybiórczo działających leków.



### III. MATERIAŁY I METODY

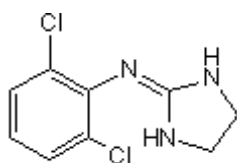
#### 1. Badanie wpływu związków imidazolinowych na szerokość źrenicy oka szczura

##### 1.1. Zwierzęta doświadczalne

W badaniach wykorzystano szczury szczepu Wistar, samce o masie ciała 200-350 g. Przed eksperymentem szczury przebywały w pomieszczeniu o stałej temperaturze 21°C, miały dostęp do wody i standardowej paszy bytowej.

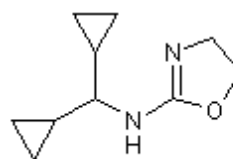
##### 1.2. Badane związki chemiczne

Do doświadczeń farmakologicznych wytypowano 20 pochodnych imidazolin, których wzory chemiczne oraz nazwy systematyczne przedstawiono poniżej:



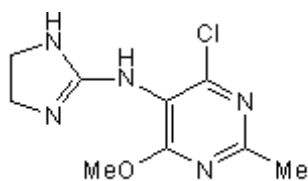
**klonidyna**

N-(2,6-dichlorofenylo)-4,5-dihydro-1H-imidazo-2-amina



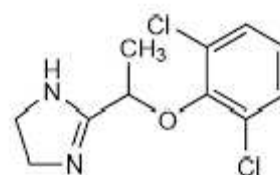
**rilmenidyna**

N-(dicyklopropylometylo)-4,5-dihydrooksazolo-2-amina



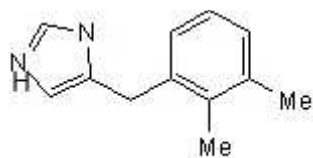
**moksonidyna**

4-chloro-N-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-ylo)-6-metoksy-2-metylopirymidyno-5-amina



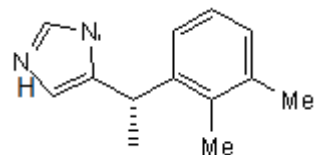
**lofeksydyna**

2-[1-(2,6-dichlorofenoksy)etylo]-4,5-dihydro-1H-imidazol



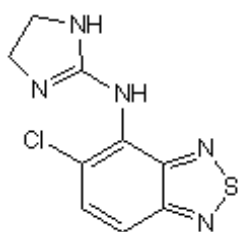
**detomidyna**

4-(2,3-dimetylobenzyl)-1H-imidazol



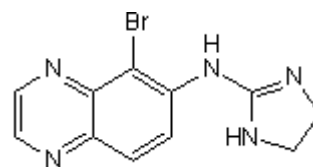
**deksmedetomidyna**

(S)-4-[1-(2,3-dimetylofenylo)etylo]-1H-imidazol



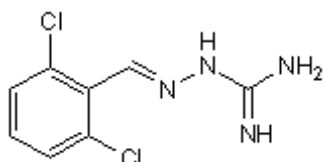
**tizanidyna**

5-chloro-N-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-ylo)benzo[c][1,2,5]tiadiazolo-4-amina



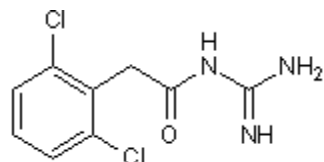
**brimonidyna**

5-bromo-N-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-ylo)-chinoksalino-6-amina



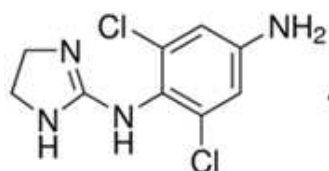
**guanabenz**

2-(2,6-dichlorofenylo)metylidenoamino]guanidyna



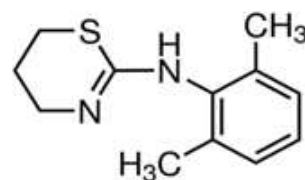
**guanfacyna**

N-(diaminometylideno)-2-(2,6-dichlorofenylo)acetamid



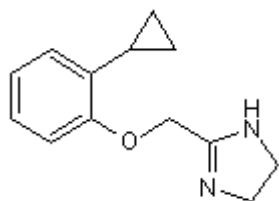
**p-aminoklonidyna**

(2,6-dichloro-N<sup>1</sup>-(imidazolidyn-2-ylideno)benzeno-1,4-diamina



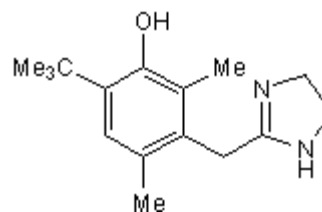
**ksylazyna**

N-(2,6-dimetylofenylo)-5,6-dihydro-4H-1,3-tiazino-2-amina



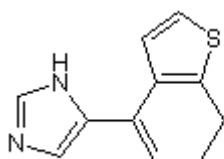
**cirazolina**

2-[(2-cyklopropylofenoksy)metylo]-4,5-dihydro-1*H*-imidazol



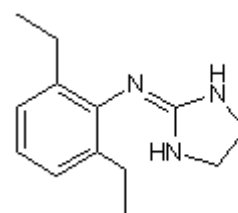
**oksymetazolina**

6-tert-butylo-3-[(4,5-dihydro-1*H*-imidazol-2-ylo)metylo]-2,4-dimetylofenol



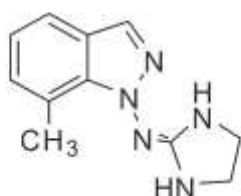
**RWJ 52353**

5-(6,7-dihydrobenzo[*b*]tiofen-4-ylo)-1*H*-imidazol



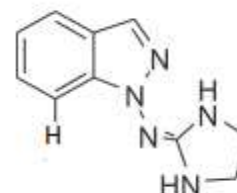
**ST-91**

*N*-(2,6-dietylofenylo)-4,5-dihydro-1*H*-imidazolo-2-amina



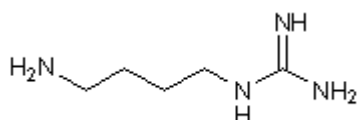
**7-metylomarsanidyna**

1-[(imidazolidyn-2-ylo)imino]7-metylo-1*H*-indazol



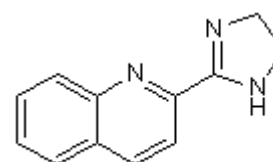
**marsanidyna**

1-[(imidazolidyn-2-ylo)imino]-1*H*-indazol



**agmatyna**

1-(4-aminobutylo)guanidyna



**BU224**

2-(4,5-dihydro-1*H*-imidazol-2-ylo)chinolina

Badane związki pochodziły od następujących producentów:

- Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA) – chlorowoderek klonidyny, hemifumaran rilmenidyny, chlorowoderek moksonidyny, chlorowoderek lofeksydyny, chlorowoderek deksmedetomidyny, jednowodny chlorek detomidyny, chlorowoderek tizanidyny, chlorowoderek *p*-aminoklonidyny, chlorowoderek ksylazyny, chlorowoderek johimbiny
- Tocris Cookson Ltd.(Bristol, UK) – winian brimonidyny, chlorowoderek cirazoliny, octan guanabenzu, chlorowoderek guanfacyny, chlorowoderek oksymetazoliny, ST-91, siarczan agmatyny, chlorowoderek BU224.

Chlorowoderek marsanidyny i chlorowoderek 7-metylomarsanidyny zostały zsyntezowane w zespole Prof. F. Sączewskiego w Zakładzie Technologii Chemicznej Środków Leczniczych, Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

W niektórych doświadczeniach zostały również wykorzystane następujące związki zaliczane do antagonistów podtypów receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych:

- maleinian BRL 44408 – maleinian 2-(4,5-dihydro-1*H*-imidazol-2-ilometrylo)-1-metylisindoliny),
- dichlorowoderek ARC 239 – (dichlorowoderek 2-{2-[4-(2-methoksyfenylo)-1-piperazylo]etylo}-4,4-dimetylo-1,3(2*H*,4*H*)-izochinolinodionu),
- dichlorowoderek JP 1302 – (dichlorowoderek N-[4-(4-metylo-1-piperazylo)fenylo]-9-akrydynaminy),
- chlorowoderek RX 821002 – (chlorowoderek 2-(2-methoksy-2,3-dihydro-1,4-benzodioxyn-2-yl)-4,5-dihydro-1*H*-imidazolu)
- chlorowoderek AGN 192403 – (chlorowoderek 2-endo-amino-3-ekso-izopropylodicyklo[2.2.1]heptanu)

Producentem wymienionych wyżej związków był Tocris Cookson Ltd.(Bristol, UK)

Wszystkie badane związki zostały, przed podaniem szczurom, rozpuszczone w 0,9 % roztworze NaCl i podawane były zwierzętom do żyły udowej w objętości 0,1 ml/100g m.c.

### 1.3. Przebieg eksperymentu farmakologicznego

Doświadczenia przeprowadzono według zmodyfikowanej metody Kossa [74]. Każde zwierzę usypiano roztworem uretanu w dawce 1,5 g/kg m. c., podawanym dootrzewnowo w objętości 1 ml/100g m. c. Po stwierdzeniu stanu pełnego znieczulenia (tj. po upływie około 20 min od wstrzyknięcia uretanu) preparowano żyłę udową szczura i umieszczano w niej wenflon, przez który podawane były roztwory każdego z badanych związków imidazolinowych.

Żrenicę oka mierzono za pomocą mikroskopu stereoskopowego (MST 132 LAB TK PZO, Warszawa), zaopatrzonego w zielony filtr światła oraz kamerę umożliwiającą obserwowanie zmian średnicy źrenicy na ekranie komputera oraz na cyfrową rejestrację wyników eksperymentów.

Doświadczenia przeprowadzono w zaciemnionym pomieszczeniu, żeby wyeliminować wpływ światła słonecznego na szerokość źrenicy, co mogłoby zakłócić przebieg eksperymentu. Początkowa wartość średnicy źrenicy oka zwierząt wynosiła ok. 0,70 mm.

Każda z pochodnych imidazoliny podawana była, za pomocą strzykawki, do żyły udowej szczura w rosnących dawkach skumulowanych. Objętość roztworów zawierających poszczególne dawki związków wynosiła 0,1 ml/kg m.c. Po upływie 5 min od wstrzyknięcia danej dawki, w czasie których reakcja źrenicy oka ulegała stabilizacji i utrzymywała się na stałym poziomie, przeprowadzano pomiar szerokości źrenicy z dokładnością do 0,01 mm.

Aby wyeliminować ewentualny wpływ objętości roztworu każdej z dawek badanego związku na szerokość źrenicy oka zwierząt przeprowadzono również doświadczenie kontrolne, polegające na dożylnym podaniu w objętości 0,1 ml/kg m.c. serii roztworów 0,9% NaCl w odstępach 5min.

W przypadku klonidyny, marsanidyny, 7-metylomarsanidyny, cirazoliny, guanabenzu, guanfacyny, deksmedetomidyny, tizanidyny, p-aminoklonidyny, detomidyny, oksymetazoliny, brimonidyny, ST-91, RWJ 52353, lofeksydyny, ksylazyny i BU-224 stosowano następujące dawki: 1, 3, 5, 10, 30, 50, 100, 300, 500, 1000 µg/kg. Jedynie

moksonidyna oraz rilmenidyna podawane były dodatkowo w dawce 3000 µg/kg. Ze względu na słabą rozpuszczalność agmatyny, nie było możliwe podanie szczirom wyższych dawek tego związku.

Część doświadczeń przeprowadzona została w obecności johimbiny – nieselektywnego antagonisty receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych. Związek ten podawano dożylnie w jednorazowej dawce 1,5 mg/kg 10 min przed serią skumulowanych dawek danej pochodnej imidazoliny.

Doświadczenia z klonidyną, marsanidyną i 7-metylomarsanidyną zostały wykonane dodatkowo w obecności selektywnych antagonistów podtypów receptora  $\alpha_2$ -adrenergicznego: BRL 44408 (selektywny antagonist  $\alpha_{2A}$ ), ARC239 (selektywny antagonist  $\alpha_{2B}$ ), JP 1302 (selektywny antagonist  $\alpha_{2C}$ ) oraz związku RX 821002, zaliczanego do środków preferencyjnie blokujących receptor  $\alpha_{2D}$ -adrenergiczny. W przypadku trzech pierwszych wymienionych antagonistów, każdy z nich zastosowano w jednorazowej dawce dożylniej 10 min przed podaniem szczirom serii skumulowanych dawek klonidyny, marsanidyny i 7-metylomarsanidyny. Dawki te wynosiły dla: JP 1302 – 1 mg/kg, ARC 239 – 0,5 mg/kg, BRL 44408 – 1 mg/kg, natomiast RX821002 zastosowano w dawce 0,05mg/kg, AGN192403 – 5mg/kg.

Na badania z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych wyraziła zgodę Lokalna Komisja Etyczna do spraw doświadczeń na zwierzętach w Gdańsku (Uchwała Nr 46/2011 z dnia 14.11.2011 r.)

#### **1.4. Analiza wyników**

Maksymalny efekt mydriatyczny każdego z badanych związków został obliczony jako przyrost szerokości źrenicy oka szcziura w porównaniu z wartością kontrolną  $E_{max}$  (mm). Wartości  $E_{max}$  przedstawiono jako średnie z minimum pięciu doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi. Zależności między obserwowanymi efektami mydriatycznymi a rosnącymi logarytmicznie dawkami badanych związków (µg/kg) przedstawiono w formie krzywych dawka-efekt mydriatyczny, skonstruowanych przy

użyciu oprogramowania GraphPad PRISM 6,07 (La Jolla California USA). Z krzywych tych obliczono (w  $\mu\text{g}/\text{kg}$  lub w molach/kg) również wartości dawek równoefektywnych ( $\text{ED}_{50}$ ), czyli dawek badanego związku wywołujących 50% maksymalnego efektu mydriatycznego.

Na podstawie wyników doświadczeń z antagonistami receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych, wyliczono również wartości  $pA_2$  (ujemny logarytm dziesiętny ze stężenia molowego antagonisty, które jest konieczne dla podwojenia stężenia agonisty umożliwiającego uzyskanie takiego samego efektu farmakologicznego w nieobecności braku obecności antagonisty) [114].

Analiza ANOVA ( $p=0.02$ ) oraz test Tukey'a, przeprowadzone dla eksperymentów z antagonistami poszczególnych podtypów receptorów (BRL44408, ARC239, JP-1302 and RX821002), potwierdziły, że w przypadku klonidyny podtyp receptora adrenergicznego  $\alpha_{2D}$  jest zaangażowany w reakcję źrenicy wywołaną testowanymi imidazolinami.

Analizy statystyczne i obliczenia przeprowadzono przy użyciu programu Statistica (StatSoft, Inc. 2014), oprogramowanie do analizy danych wersja 12, [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).

Do zbadania różnic w działaniu antagonistów poszczególnych podtypów receptorów wykorzystano test Anova oraz test Tukey'a. Wyniki testów potwierdziły, że RX 821002 (antagonista receptorów  $\alpha_{2D}$ -adrenergicznych) najsilniej antagonizuje mydriatyczne działanie imidazolin.

## **2. Analiza strukturalna pochodnych imidazoliny**

### **2.1.Oznaczenie lipofilowości badanych związków metodą wysokosprawnej chromatografii ciekowej**

#### **2.1.1. Odczynniki chemiczne**

Wodorowęglan amonu zakupiono w firmie Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), 25% roztwór amoniaku pochodził z zakładów POCH (Gliwice, Polska). Producentem metanolu o wysokiej czystości (przeznaczonego do analiz LC-MS) była firma J.T. Baker

(Griesheim, Niemcy). Wodę dejonizowaną, użytą do sporządzenia buforów oraz do przygotowania próbek związków imidazolinowych, otrzymano z demineralizatora Direct-Q 3W-R (Millipore SAS, Molsheim, Niemcy).

### **2.1.2. Przygotowanie buforu do fazy ruchomej oraz próbek analizowanych związków**

Wodorowęglan amonu został użyty do sporządzenia buforu w celu kontroli pH fazy ruchomej w trakcie procesu chromatograficznego. Bufor ten przygotowano w stężeniu 10 mM, rozpuszczając odpowiednią naważkę substancji w wodzie demineralizowanej. Przy pomocy pH-metru (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Szwajcaria) (skalibrowanego wodnymi buforami) doprowadzono wartość pH buforu do poziomu 10,7 poprzez dodatek odpowiedniej ilości 25% roztworu amoniaku. Gotowy bufor przefiltrowano przez filtry nylonowe o średnicy porów 45  $\mu\text{m}$ , a następnie odgazowano na łaźni ultradźwiękowej.

Naważki wielkości 1mg każdej z pochodnych imidazoliny rozpuszczono w objętości 1 ml metanolu uzyskując roztwory o stężeniu 1mg/ml. Następnie roztwory te połączono uzyskując mieszaninę o stężeniu 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### **2.1.3. Oznaczenia analityczne z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii ciekowej sprzężonej ze spektrometrią mas (RP-HPLC-ESI-TOF-MS)**

Oznaczenia chromatograficzne przeprowadzone zostały techniką wysokosprawnej chromatografii ciekowej w odwróconym układzie faz (RP HPLC), przy użyciu zestawu Agilent Technologies 1260 (Santa Clara, CA, USA), sprzężonego z spektrometrem mas z analizatorem czasu przelotu (TOF) model 6224. Do oznaczeń chromatograficznych zastosowana została kolumna *X Bridge-C18* (Waters Ltd., Milford, MA, USA) o wymiarach 3 mm x 50 mm, oraz o średnicy ziaren 2-5  $\mu\text{m}$ . Szybkość przepływu fazy ruchomej (f) wynosiła 0,5 ml/min, objętość nastrzyku 2  $\mu\text{l}$ , a temperatura (T) kolumny 25 °C. Ze względu na złożony skład oznaczanej mieszaniny oraz odmienne właściwości fizykochemiczne analitów wykorzystano metodę elucji gradientowej według [115], w której zawartość modyfikatora organicznego – metanolu, zmieniała się liniowo w zakresie od 5 – 80 %.



W oznaczeniach analitycznych, jako źródło jonów wykorzystano jonizację metodą elektrorozpylania (ang. electrospray ionization ESI) w trybie jonizacji dodatniej. Ciśnienie rozpylacza wynosiło 50 psi przy napięciu kapilary 4000 V, natomiast przepływ oraz temperatura gazu suszącego wynosiły odpowiednio 11 L/min oraz 350 °C. Napięcie na stożku, oktopolu oraz fragmentorze wynosiło odpowiednio 65 V, 750 V oraz 84 V. Wszystkie oznaczenia nalityczne przeprowadzono w trybie przemiatania (ang. scan) w zakresie 50-1200 m/z.

Aby umożliwić ocenę dokładności pomiaru masy, w czasie trwania sekwencji analiz do źródła jonów doprowadzany był roztwór mas referencyjnych. Oznaczenia chromatograficzne zostały przeprowadzone za pomocą 3 metod gradientowych o czasie trwania analiz odpowiednio 30, 90 i 270 min. Ponadto wyznaczona została objętość retencji substancji niezatrzymywanej ( $V_0$ ) z wykorzystaniem roztworu kwasu cytrynowego.

Dane analityczne (wartości czasów retencji,  $t_R$ , wartości masy do ładunku  $-m/z$ , intensywność) dotyczące oznaczanych związków zostały zebrane za pomocą oprogramowania Mass Hunter Acquisition B.04 [116]. Analiza jakościowa oraz identyfikacja oznaczanych analitów, została wykonana przy użyciu programu Mass Hunter Qualitative Analysis B.05 [116]. Masy monoizotopowe oraz wzory sumaryczne niezbędne do identyfikacji oznaczanych związków zostały sprawdzone w bazie danych Chemspider [117].

Wartości chromatograficznego parametru lipofilowości ( $\log k_w$ ) pochodnych imidazoliny wyliczono zgodnie z procedurą opisaną w pracy [118] na podstawie wartości czasów retencji, otrzymanych z trzech przebiegów gradientowych. Obliczenia przeprowadzono w oparciu o Równ. 7 i 8:

$$k_0 = 10^{\log k_w - S\varphi_0} \quad \text{Równ. 7}$$

gdzie:  $\varphi_0$  oznacza początkową zawartość modyfikatora organicznego dla liniowego gradientu,  $S$  – parametr nachylenia dla równania Snydera-Soczewińskiego,  $\log k_w$  – parametr lipofilowości wyrażony w postaci  $\log k$  ekstrapolowanej do czystego buforu.

$$t'_R = \begin{cases} t_0 k_0, & \text{dla } t_R \leq t_d \\ t_d \frac{t_0}{b} \log \left( 2,303 b k_0 \left( 1 - \frac{t_d}{t_0 k_0} \right) + 1 \right), & \text{dla } t_d < t_R \leq t_G + t_d \\ t_d + t_G - \frac{t_0}{2,303 b} + \left( t_0 k_0 - t_d + \frac{t_0}{2,303 b} \right) 10^{-\frac{b t_G}{t_0}}, & \text{dla } t'_R > t_G + t_d \end{cases} \quad \text{Równ. 8}$$

gdzie:  $t'_R$  – skorygowany czas retencji,  $t_R$  – czas retencji,  $t_0$  – czas martwy,  $k_0$  – wartość współczynnika retencji, odpowiadającą składowi fazy w początkowej objętości frakcji modyfikatora organicznego,  $t_G$  – czas trwania gradientu.

### 3. Deskryptory strukturalne pochodzące z modelowania molekularnego

Modelowanie cząsteczkowe badanych pochodnych imidazolinowych oraz obliczenia deskryptorów opisujących ich strukturę, przeprowadzono przy użyciu programu HyperChem Release 8.0 (Hypercube Inc., Gainesville, FL, USA).

Geometria cząsteczek związków została zoptymalizowana metodą mechaniki molekularnej polem siłowym MM+. Dalsza optymalizacja struktur ligandów przeprowadzona została w oparciu o metody półempiryczne za pomocą pola siłowego AM1 i algorytmu Polak-Ribiere (limit gradientu 0,01 – 1,00 Å). Następnie obliczono wartości deskryptorów cząsteczkowych związków: energii najwyższego zajętego ( $E_{\text{HOMO}}$ ) oraz najniższego niezajętego ( $E_{\text{LUMO}}$ ) orbitalu molekularnego, momentu dipolowego ( $\mu$ ), maksymalnych i minimalnych elektronowych ładunków elektronowych na poszczególnych atomach w cząsteczkach imidazolin (odpowiednio  $\text{Max}_{\text{ch}}$  i  $\text{Min}_{\text{ch}}$ ), energii całkowitej ( $E_{\text{T}}$ ), masy cząsteczkowej (M), refrakcji molowej (MR), polaryzowalności (P), powierzchni i objętości Van der Waalsa, (odpowiednio  $\text{VdW}_{\text{surf}}$  i  $\text{VdW}_{\text{vol}}$ ), oraz subcząsteczkowego parametru polarności ( $\Delta$ ), zdefiniowanego jako różnica najmniejszej oraz największej gęstości elektronowej na dwóch atomach w cząsteczce.

Za pomocą programu Hyperchem oraz ACD (Advanced Chemistry Development, Toronto, Canada) obliczone zostały również teoretyczne wartości współczynnika podziału

*n*-oktanol-woda (odpowiednio CLOGP<sub>HYP</sub>, oraz CLOGP<sub>ACD</sub>), a także wartości stałej kwasowości pK<sub>a</sub> związków.

Analizę QSAR przeprowadzono stosując program Statistica (StatSoft, Inc. (2014) wersja 12 [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)).

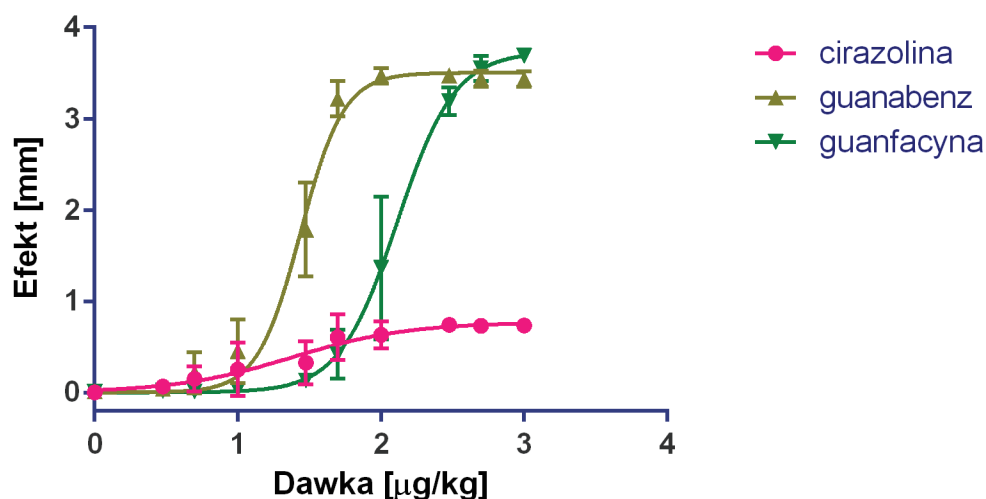
Mając na uwadze różnorodności budowy pochodnych imidazoliny wykorzystanych w badaniu, wyodrębniono z serii 18 związków podgrupę 12 imidazolin zawierających w swojej strukturze mostek –NH–, oddzielający układ imidazoliny od pierścienia (hetero)arylowego. Dla tej subserii przeprowadzono osobną analizę QSAR. W skład podgrupy wchodziły: klonidyna, p-aminoklonidyna, rilmenidyna, moksonidyna, brimonidyna, tizanidyna, ksylazyna, ST-91, marsanidyna and 7-methylmarsanidyna. W analizie QSAR uwzględniono dodatkowo wyliczony parameter elektronowy N<sub>ch</sub>, oznaczający wielkość nadmiarowego ładunku elektronowego na atomie azotu. Nie znaleziono istotnych korelacji łączących aktywność mydriatyczną log(1/ED<sub>50</sub>) z tym parametrem ani z pozostałymi deskryptorami strukturalnymi imidazolin.

## IV. WYNIKI

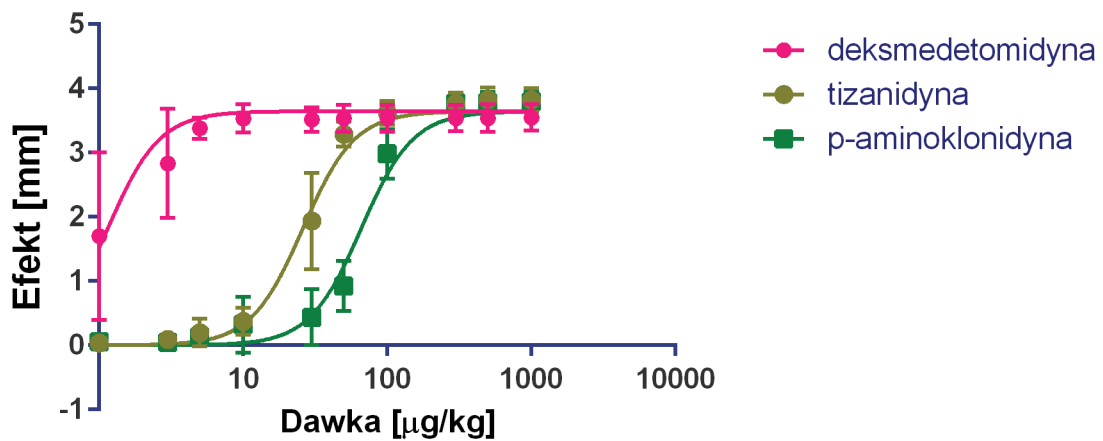
### 1. Działanie mydriatyczne pochodnych imidazoliny

Przebadano wpływ 20 związków imidazolinowych na szerokość źrenicy oka szczura. Grupę tę tworzyły: klonidyna, rilmenidyna, moksonidyna, marsanidyna, 7-metylomarsanidyna, cirazolina, guanabenz, guanfacyna, deksmedetomidyna, tizanidyna, p-aminoklonidyna, detomidyna, oksymetazolina, brimonidyna, ST-91, RWJ 52353, lofeksydyna, ksylazyna, agmatyna oraz BU224. Otrzymane wartości  $E_{max}$ ,  $ED_{50}$  oraz  $\log(1/ED_{50})$  zebrano w Tab.1.

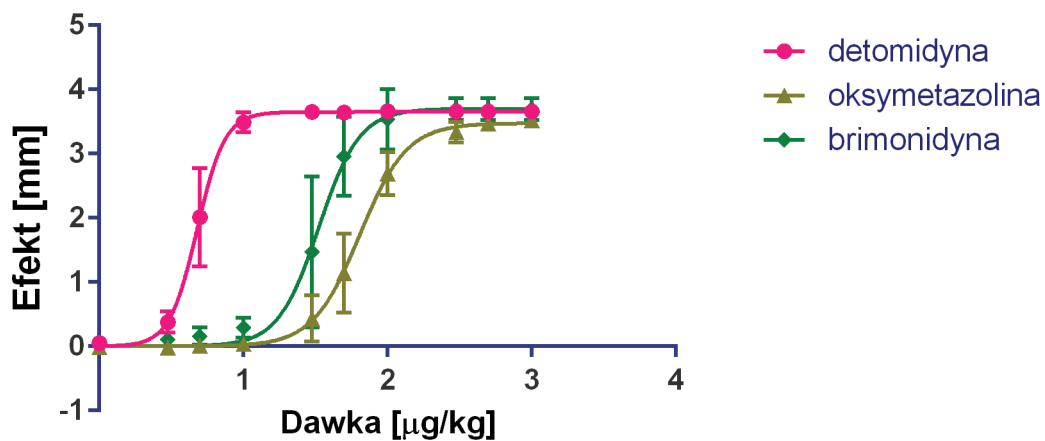
Na Rys. 7-16 przedstawiono krzywe zależności dawka-efekt mydriatyczny dla 18 badanych pochodnych imidazoliny: cirazoliny, guanabenzu, guanfacyny, deksmedetomidyny, tizanidyny, p-aminoklonidyny, detomidyny, oksymetazoliny, brimonidyny, ST-91, RWJ 52353, lofeksydyny, ksylazyny, klonidyny, rilmenidyny, moksonidyny, marsanidyny oraz 7-metylomarsanidyny.



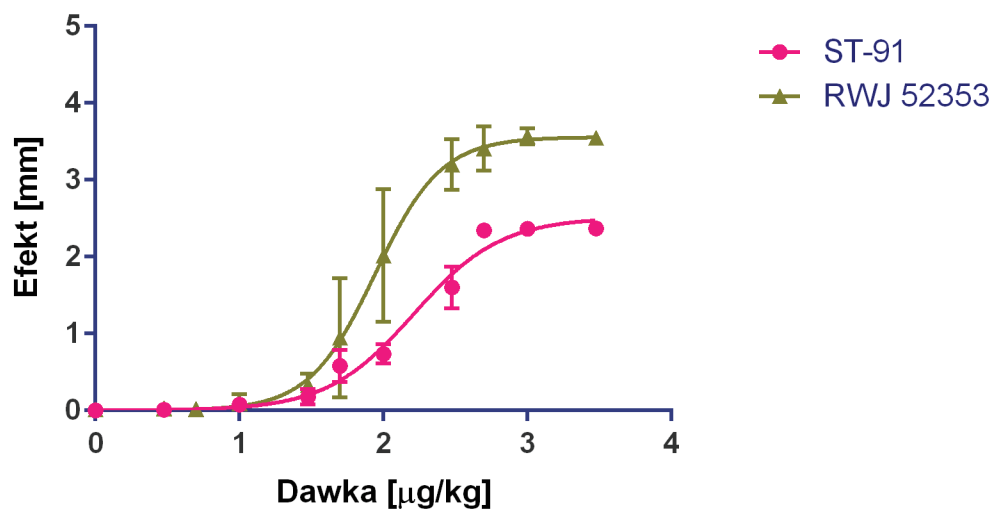
Rys. 7. Krzywe zależności dawka-efekt mydriatyczny dla cirazoliny, guanabenzu i guanfacyny.



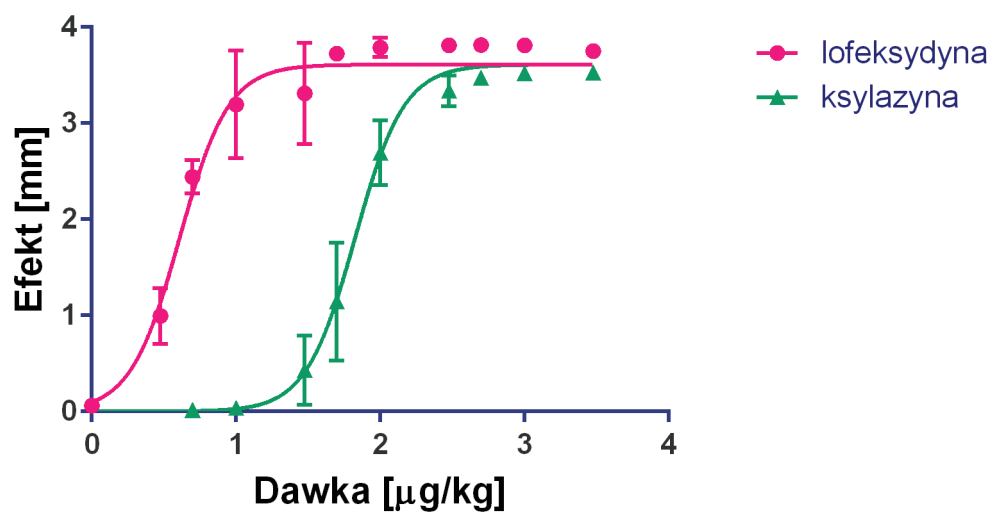
Rys. 8. Krzywe zależności dawka-efekt mydriatyczny dla deksmedetomidyny, tizandyny i p-aminoklonidyny.



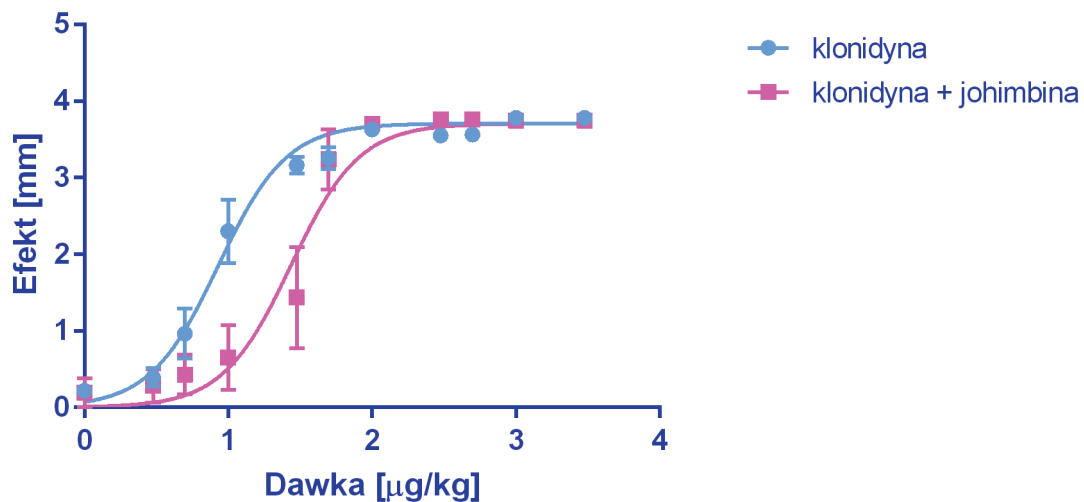
Rys. 9. Krzywe zależności dawka-efekt mydriatyczny dla detomidyny, oksymetazoliny i brimonidyny.



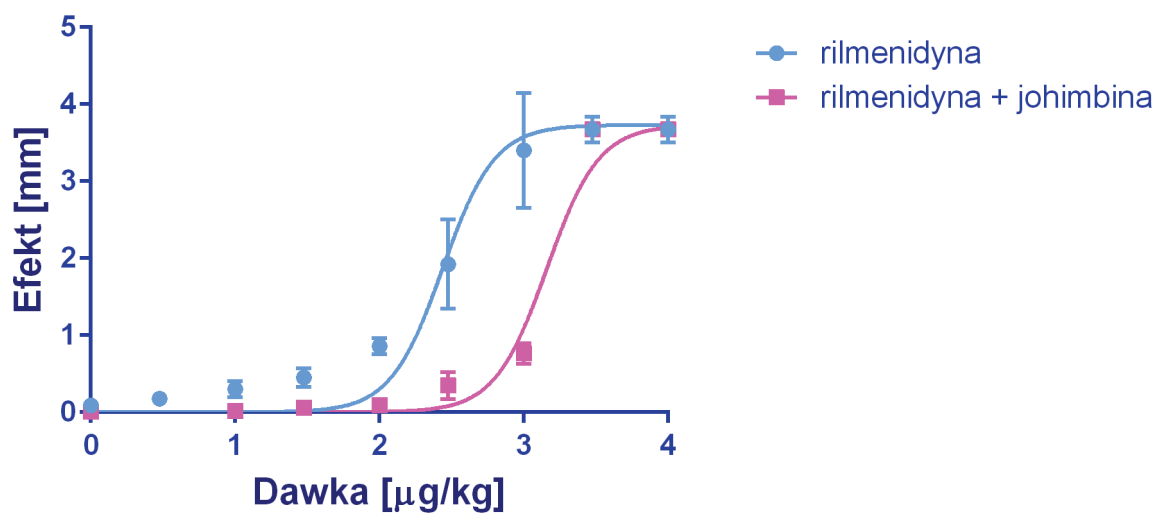
Rys. 10. Krzywe zależności dawka-efekt mydriatyczny dla ST-91 i RWJ 52353.



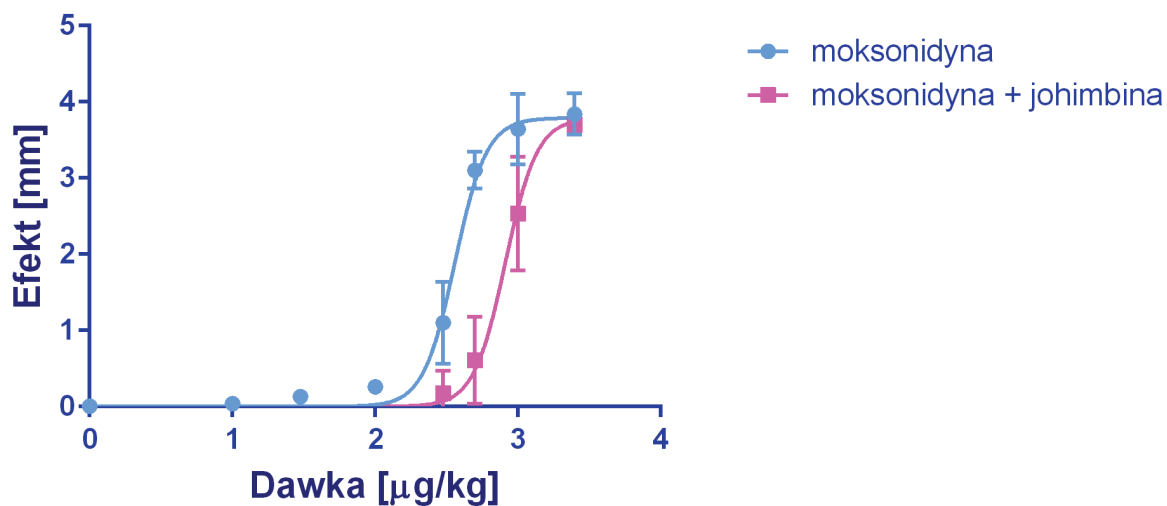
Rys. 11. Krzywe zależności dawka-efekt mydriatyczny dla lofeksydyny i ksylazyny.



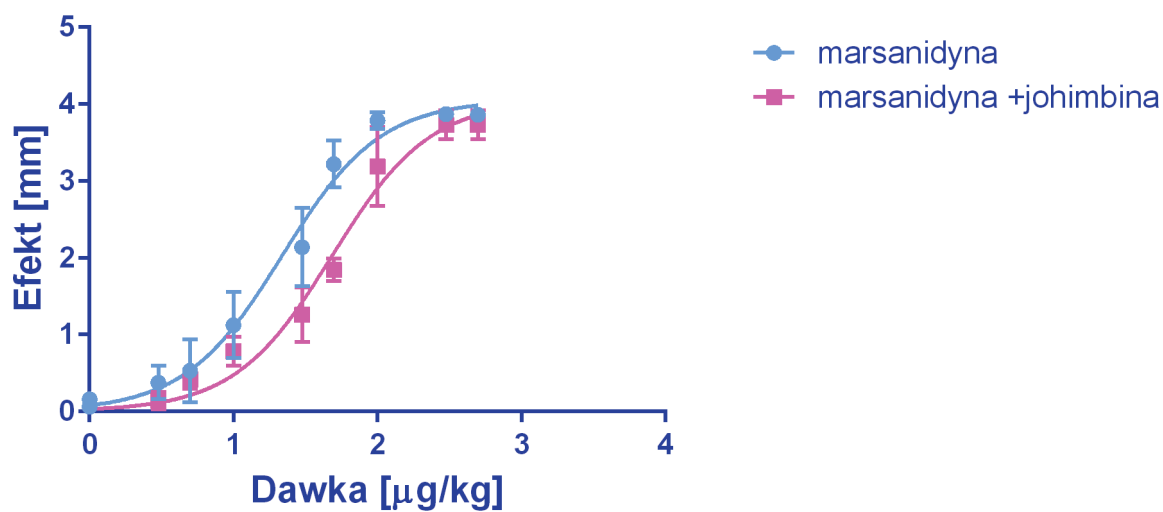
Rys.12. Krzywe zależności dawka-efekt dla klonidyny oraz dla klonidyny w obecności johimbiny.



Rys. 13. Krzywe zależności dawka-efekt mydriatyczny dla rilmenidyny oraz dla rilmenidyny w obecności johimbiny.

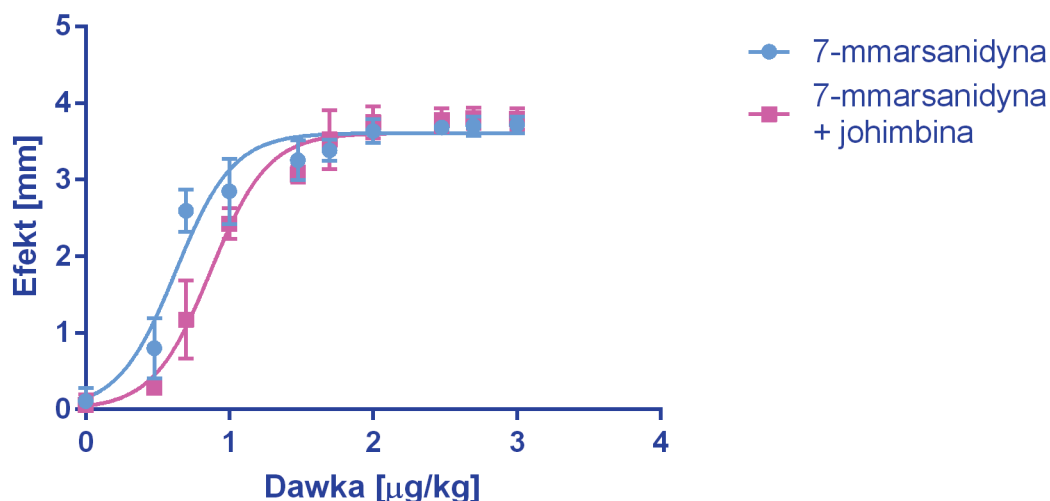


Rys. 14. Krzywe zależności dawka-efekt mydriatyczny dla moksosidyny oraz dla moksosidyny w obecności johimbiny.



Rys. 15. Krzywe zależności dawka-efekt mydriatyczny dla marsanidyny oraz dla marsanidyny w obecności johimbiny.





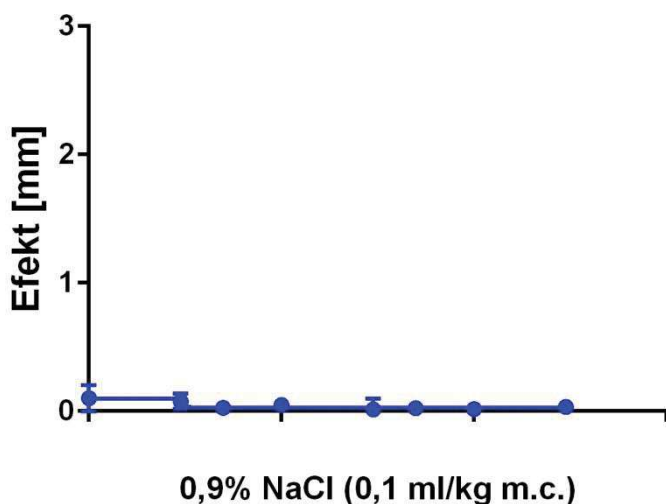
Rys. 16. Krzywe zależności dawka-efekt mydriatyczny dla 7-metylomarsanidyny oraz dla 7-metylomarsanidyny w obecności johimbiny.

Agmatyna w zakresie dawek od  $10^{-9}$  mol/kg do  $10^{-7}$  mol/kg nie wywierała po podaniu dożylnym wpływu na szerokość źrenicy oka szczura. Podanie wyższych dawek okazało się niemożliwe ze względu na ograniczoną rozpuszczalność związku w 0,9 % roztworze NaCl. BU 224, agonista receptorów imidazolinowych typu  $I_2$ , zgodnie z przewidywaniami nie wywołał po podaniu dożylnym w zakresie dawek od  $1\mu\text{g/kg}$  do  $1000\mu\text{g/kg}$ , efektu mydriatycznego, dlatego można go traktować jako kontrolę „ujemną”.

Przeprowadzono również eksperyment kontrolny, podając szczurom dożylnie 0,9 % roztwór NaCl. Kolejne objętości tego roztworu, odpowiadające używanym skumulowanym dawkom pochodnych imidazoliny, nie wpływały na szerokość źrenicy oka zwierząt (Rys. 17).

Tab. 1. Parametry farmakologiczne badanych imidazolin.

Lp.	Związek	E <sub>max</sub> [mm]	ED50[μg/kg]	ED <sub>50</sub> [mol/kg]	Log(1/ED50)
1.	klonidyna	3,62(±0,04)	8,33(±0,02)	3,50x10 <sup>-8</sup>	7,46
2.	p-aminoklonidyna	3,80(±0,09)	68,27(±0,02)	2,78x10 <sup>-7</sup>	6,56
3.	brimonidyna	3,68(±0,09)	33,23(±0,33)	1,14x10 <sup>-7</sup>	6,94
4.	cirazolina	0,77(±0,09)	23,72(±0,11)	1,1x10 <sup>-7</sup>	6,96
5.	detomidyna	3,65(±0,04)	4,78(±0,11)	2,57x10 <sup>-8</sup>	7,59
6.	deksmedetomidyna	3,55(±0,10)	1,63(±0,25)	8,13x10 <sup>-9</sup>	8,09
7.	guanabenz	3,50(±0,06)	27,48(±0,22)	1,19x10 <sup>-7</sup>	6,92
8.	guanfacyna	3,73(±0,08)	129,9(±1,03)	5,28x10 <sup>-7</sup>	6,28
9.	moksonidyna	3,76(±0,1)	361,0(±1,01)	1,49x10 <sup>-6</sup>	5,83
10.	oksymetazolina	3,47(±0,06)	64,15(±0,22)	2,46x10 <sup>-7</sup>	6,61
11.	rilmenidyna	3,86(±0,15)	266,6(±2,06)	1,48x10 <sup>-6</sup>	5,83
12.	tizanidyna	3,82(±0,06)	27,98(±0,32)	1,10x10 <sup>-7</sup>	6,97
13.	ksylazyna	3,84(±0,1)	90,54(±1,59)	4,11x10 <sup>-7</sup>	6,39
14.	marsanidyna	3,97(±0,1)	45,65(±1,07)	2,27x10 <sup>-7</sup>	6,64
15.	7-metylomarsanidyna	3,58(±0,08)	5,03(±1,08)	2,32x10 <sup>-8</sup>	7,64
16.	RWJ 52353	3,56(±0,11)	87,68(±0,44)	3,67x10 <sup>-7</sup>	6,44
17.	ST-91	2,51(±0,09)	162,5(±0,43)	7,48x10 <sup>-7</sup>	6,13
18.	lofeksydyna	3,71(±0,06)	4,18(±0,23)	1,61x10 <sup>-8</sup>	7,79
19.	agmatyna	Bd	Bd	0	0
20.	BU224	Bd	Bd	0	0



Rys. 17. Odpowiedź źrenicy oka szczura na serię objętości 0,9 % roztworu NaCl.

Dodatkowo w badaniu ujęto związek BU-224, będący ligandem receptora imidazolinowego I<sub>2</sub>, stanowiący negatywną kontrolę. W przypadku agmatyny, ze względu na trudności z rozpuszczalnością, nie było możliwe podanie wyższych dawek tego związku, co mogło być przyczyną braku efektu mydriatycznego.

Spośród 18 analogów imidazoliny, które wywoływały rozszerzenie źrenicy oka szczura, 16 znanych jest jako agonisty receptora  $\alpha_2$ -adrenergicznego, o zróżnicowanym powinowactwie i selektywności wobec tego receptora [29,119] zaś pozostałe dwa: marsanidyna i 7-metylomarsanidyna, to nowo otrzymane pochodne [120]. Dla 13 związków, a mianowicie: guanabenzu, deksmedetomidyny, RWJ-52353, 7-metylomarsanidyny, klonidyny, detomidyny, brimonidyny, lofeksydyny, guanfacyny, moksonidyny, apraklonidyny, tizanidyny i ksylazyny, wartości  $E_{max}$  mieściły się między od 3,5 do 3,8 mm (Tab. 1). W przypadku marsanidyny obserwowano najsilniejszy spośród badanych związków efekt mydriatyczny ( $E_{max} = 3,97 \pm 0,10$  mm). Dwie kolejne pochodne imidazoliny: oksymetazolina i ST-91, wykazywały słabsze maksymalne efekty rozszerzania źrenicy, wynoszące odpowiednio:  $3,47 \pm 0,06$  mm oraz  $2,51 \pm 0,09$  mm. Najsłabsze działanie mydriatyczne obserwowano dla cirazoliny ( $E_{max} = 0,77 \pm 0,06$  mm).

W przypadku rilmenidyny, moksonidyny, maksymalne efekty mydriatyczne wynosiły odpowiednio:  $3,86 \pm 0,15$  mm i  $3,76 \pm 0,10$  mm, ale wystąpiły one po podaniu znacznie wyższych dawek ( $10^{-5}$  mol/kg) w porównaniu do innych pochodnych imidazoliny.

Wartości ED<sub>50</sub> (μg/kg) badanych związków, obliczone na podstawie krzywych dawka-efekt mydriatyczny wykazały znaczne zróżnicowanie (od 1,63 μg/kg dla deksmedetomidyny do 361,0 μg/kg dla moksonidyny).

Kolejność związków według rosnących wartości ED<sub>50</sub> (μg/kg), obrazujących względne powinowactwo pochodnych imidazoliny do ośrodkowych receptorów α<sub>2</sub>-adrenergicznych, przedstawia się następująco: moksonidyna > rilmenidyna > ST 91 > gunfacyna > ksylazyna > RWJ 44408 > p-aminoklonidyna > oksymetazolina > marsanidyna > brimonidyna > tizanidyna > guanabenz > cirazolina > klonidyna > 7-metylomarsanidyna > detomidyna > lofeksydyna > deksmedetomidyna. Wartości E<sub>max</sub> oraz ED<sub>50</sub> badanych imidazolin zebrano w Tab 1.

### **1.1. Wpływ johimbiny na efekty mydriatyczne klonidyny, rilmenidyny, moksonidyny, marsanidyny i 7-metylomarsanidyny**

W przypadku klonidyny, rilmenidyny, moksonidyny, marsanidyny i 7-metylomarsanidyny doświadczenia przeprowadzono w obecności johimbiny – klasycznego antagonisty receptorów α<sub>2</sub>-adrenergicznych. Wybierając klonidynę do eksperymentów kierowano się tym, że wymieniony związek uważany jest za modelowy w badaniach działania mydriatycznego na szczurach. Z kolei rilmenidyna oraz moksonidyna zaliczane są do „mieszanych” agonistów receptora I<sub>1</sub>-imidazolinowego/α<sub>2</sub>-adrenergicznego. Dlatego ocena udziału receptorów typu α<sub>2</sub> wydawała się interesująca. Natomiast dwie nowo-syntezowane pochodne imidazolinowe: marsanidyna i jej 7-metylowy analog, nie były dotąd badane z wykorzystaniem testu mydriazy ocznej u szczura.

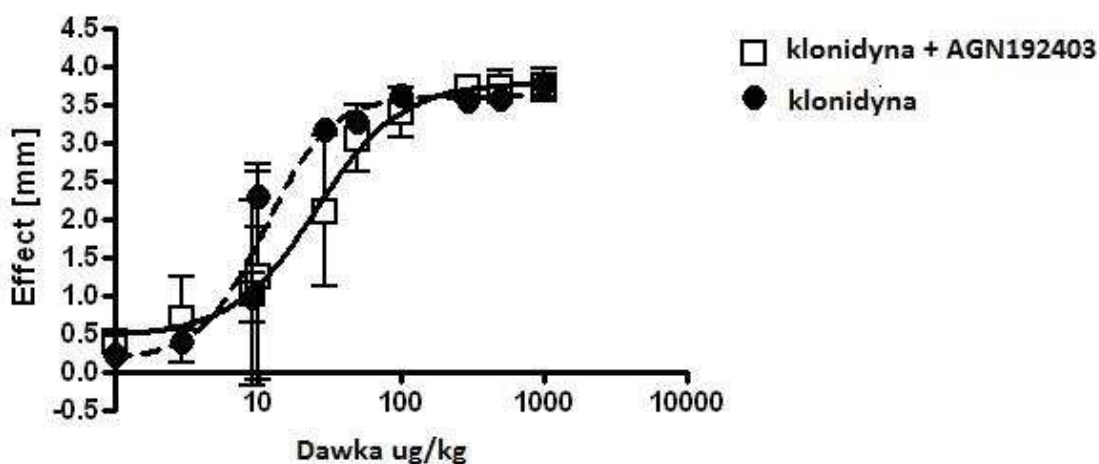
Klonidyna, rilmenidyna, moksonidyna, marsanidyna i 7-metylomarsanidyna, podane szczurom w dawkach skumulowanych, wywołują zależne od dawki działania mydriatyczne, przedstawione w postaci krzywych dawka-efekt na Rys. 12-16. Obliczone wartości ED<sub>50</sub> wynoszą odpowiednio: 8,34 (±0,02); 266,6 (±2,06); 361,0 (±1,01); 45,65 (±1,07); 5,03 (±1,08) μg/kg (Tab. 1.).

Johimbina podana dożylnie szczurom 10 min przed zastosowaniem skumulowanych dawek wymienionych pochodnych imidazoliny powoduje równoległe przesunięcie

krzywych dawka-efekt w prawo, bez obniżenia wartości efektów maksymalnych. Wartości  $ED_{50}$  dla układu klonidyna + johimbina, rilmenidyna +johimbina, moksonidyna + johimbina, marsanidyna +johimbina oraz 7-metylomarsanidyna + johimbina ulegają zwiększeniu i wynoszą odpowiednio: 34,79  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 1262  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 842,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 109,9  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 6,54  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Tab. 2). Obserwowany antagonizm kompetycyjny johimbiny w stosunku do efektów wymienionych imidazolin potwierdza udział receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych w działaniach mydriatycznych tych związków.

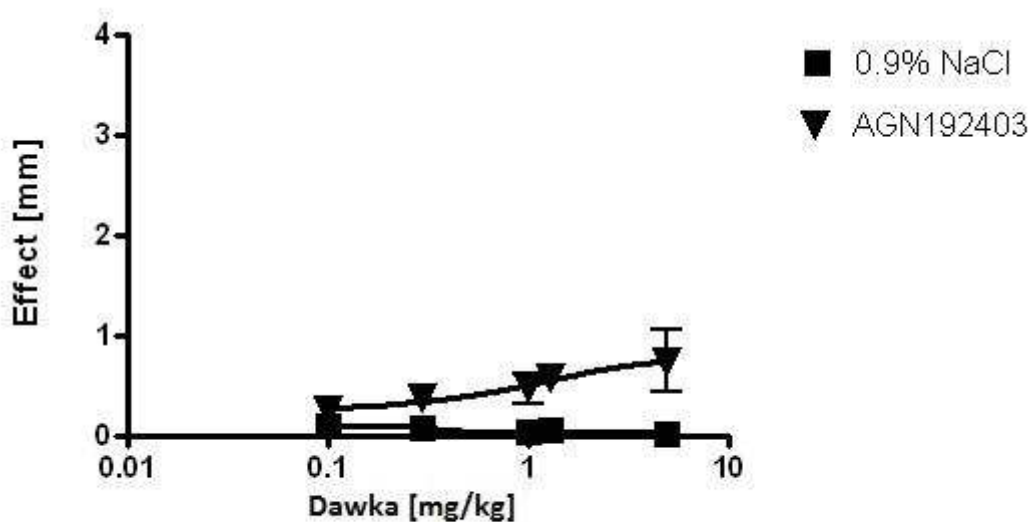
## 1.2. Wpływ AGN192403 na działanie mydriatyczne klonidyny

Dodatkowo przeprowadzono eksperymenty sprawdzające działanie klonidyny w obecności AGN192403, selektywnego antagonisty receptora II-imidazolinowego. Obecność tego związku spowodowała nieznaczne przesunięcie krzywej dawka-efekt dla klonidyny w prawo (Rys.18). Maksymalny efekt mydriatyczny wynosił  $3,69 \pm 0,1$  mm, natomiast wartość parametru  $ED_{50}$  wynosiła  $25,89 \pm 3,4$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ .



Rys. 18. Krzywe zależności dawka-efekt mydriatyczny dla klonidyny oraz dla klonidyny w obecności AGN192403.

Z kolei próba wykonana ze skumulowanymi dawkami AGN192403 (0,1-5 mg/kg) w odstępach 5 min wykazała wystąpienie bardzo słabego efektu mydriatycznego (Rys. 19.).



Rys. 19. Wpływ 0,9% roztworu NaCl i AGN192403 na średnicę źrenicy oka szczura.

### 1.3. Analiza farmakologiczna zaangażowania podtypów receptora $\alpha_2$ -adrenergicznego w działaniu mydriatycznym klonidyny, marsanidyny oraz 7-metylomarsanidyny

Podjęta została próba oceny udziału poszczególnych podtypów receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych w efekcie rozszerzania źrenicy u szczura, wywoływanym przez związki o budowie imidazolinowej. Do doświadczeń wytypowano klonidynę – modelowy związek imidazolinowy oraz dwa nowe analogi imidazolin: marsanidynę oraz 7-metylomarsanidynę, które w doświadczeniach z użyciem znakowanych ligandów wykazywały znaczne powinowactwo do ośrodkowych receptorów układu adrenergicznego

typu  $\alpha_2$  [121]. Doświadczenia przeprowadzono w obecności i nieobecności „klasycznego” antagonisty receptora  $\alpha_2$ -adrenergicznego – johimbiny, a ponadto wykorzystano w nich wybiórcze antagonisty poszczególnych subtypów receptorów wymienionego receptora: BRL44408 (antagonista receptora  $\alpha_{2A}$ -adrenergicznego), ARC239 (antagonista receptora  $\alpha_{2B}$ -adrenergicznego), JP1302 (antagonista receptora  $\alpha_{2C}$ -adrenergicznego) a także związek RX821002, zaliczany do preferencyjnych antagonistów receptora  $\alpha_{2D}$ -adrenergicznego [62].

Poniżej przedstawiono odpowiednie wykresy zależności dawka-efekt mydriatyczny dla badanych związków imidazolinowych (Rys. 20-22). Rysunek 23 przedstawia obraz obserwowanego pod mikroskopem wpływu kolejnych dawek marsanidyny na szerokość źrenicy oka szczura.

Po podaniu zwierzętom wymienionych związków w dawkach skumulowanych, mieszczących się w zakresie 1-1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , obserwowano sigmoidalny przebieg krzywych dawka-efekt (Rys. 20-22). Wartości  $E_{\text{max}}$  dla klonidyny, marsanidyny oraz jej 7-metylowej pochodnej wynosiły odpowiednio:  $3,63 \pm 0,09$  mm,  $3,97 \pm 0,1$  mm oraz  $3,63 \pm 0,09$  mm (Tab. 1).

Uprzednie podanie dożylnie johimbiny oraz związków działających antagoniście wobec podtypów  $\alpha_2$ -receptorów układu sympatycznego: BRL44408, ARC239, JP1302 oraz RX821002, powodowało w każdym przypadku równoległe przesunięcie krzywych dawka-efekt w prawo, przy czym obserwowane maksymalne efekty mydriatyczne klonidyny, marsanidyny i 7-metylomarsanidyny nie różniły się od analogicznych efektów wywołanych przez skumulowane dawki badanych związków imidazolinowych badanych w nieobecności antagonistów receptorowych (Rys. 20-22). Wskazuje to na kompetycyjny antagonizm johimbiny, BRL44408, ARC239, JP1302 oraz RX821002 względem działania na źrenicę oka, wywieranego przez klonidynę, marsanidynę i 7-metylomarsanidynę. Poszczególne wartości  $ED_{50}$  oraz  $pA_2$  zebrano w Tab. 2.

Tab. 2. Wartości ED<sub>50</sub> badanych związków imidazolinowych w obecności i nieobecności antagonistów poszczególnych podtypów receptorów α<sub>2</sub>-adrenergicznych wraz z wartościami pA<sub>2</sub> obliczonymi dla klonidyny, marsanidyny i 7-metylomarsanidyny, badanych w obecności johimbiny, BRL44408, ARC239, JP1302 oraz RX821002.

Wartości ED<sub>50</sub> obliczone za pomocą regresji nieliniowej wraz 95% przedziałami ufności i liczbą stopni swobody (df).

Związek	ED <sub>50</sub> [µg/kg]	pA <sub>2</sub>
<b>klonidyna</b>	8.34 (7.55 - 9.18) df=52	-
<b>klonidyna + johimbina</b>	34.79 (32.89 - 36.80) df=52	6.66 ( 6.54 - 6.79) df=77
<b>klonidyna + BRL44408</b>	8.75 (8.17 - 9.38) df=41	Bd
<b>klonidyna + ARC239</b>	5.56 (4.88 - 6.32) df=52	Bd
<b>klonidyna + JP1302</b>	6.93 (6.58 - 7.30) df=52	Bd
<b>klonidyna + RX821002</b>	524.1 (485.0 - 566.4) df=47	11.23 (11.01 - 11.46) df=97
<b>marsanidyna</b>	45.65 (39.60 - 52.63) df= 47	-
<b>marsanidyna + johimbina</b>	109.9 (84.2 - 143.4) df=47	6.02 (5.79 - 6.24) df=77
<b>marsanidyna + BRL44408</b>	114.3 (89.38 - 146.1) df=33	Bd
<b>marsanidyna + ARC239</b>	109.0 (71.93 - 165.2) df=27	6.55 (6.23 - 6.87) df=57
<b>marsanidyna + JP1302</b>	68.2 (55.98 - 83.08) df=47	Bd
<b>marsanidyna + RX 821002</b>	153.4 (131.1 - 179.6) df=37	8.34 (8.18 - 8.49) df=67
<b>7-metylomarsanidyna</b>	4.94 (4.28 - 5.93) df=42	
<b>7-metylomarsanidyna + johimbina</b>	6.54 (5.89 - 7.24) df=37	5.66 (5.41 - 5.92) df=87
<b>7-metylomarsanidyna + BRL44408</b>	4.14 (3.89 - 4.42) df=37	Bd
<b>7-metylomarsanidyna + ARC239</b>	4.5 (4.21 - 4.81) df=37	Bd
<b>7-metylomarsanidyna + JP1302</b>	5.65 (5.33 - 5.99) df=37	Bd
<b>7-metylomarsanidyna + RX821002</b>	18.11 (16.44 - 19.94) df=47	6.99 (6.81 - 7.17) df=97



Analiza przebiegu krzywych dawka-efekt przedstawionych na Rys. 20 wskazuje na to, że RX821002 – preferencyjny antagonistą podtypu  $\alpha_{2D}$  receptora adrenergicznego, najsilniej hamuje mydriazę wywołaną klonidyną. Świadczy o tym wyraźne równoległe przesunięcie w prawo krzywej dawka-efekt dla klonidyny. Obliczona wartość  $ED_{50}$  dla układu klonidyna + RX821002, wynosząca 524,1 (485,0 – 556,4)  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , jest prawie 50 razy wyższa w porównaniu z analogiczną wartością  $ED_{50}$  dla samej klonidyny, równą 11,23 (11,01 – 11,46)  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Tab. 2).

Z kolei efekt rozszerzenia źrenicy oka szczura wywołany przez klonidynę jest również antagonizowany kompetycyjnie przez johimbinę, ale w znacznie mniejszym stopniu, na co wskazują obliczone na podstawie krzywych dawka-efekt wartości  $ED_{50}$  i  $pA_2$ , które dla klonidyny badanej w obecności johimbiny wynoszą, odpowiednio 34,79 (32,89-36,80)  $\mu\text{g}/\text{kg}$  oraz 6,66 (6,54-6,79), Tab. 2.

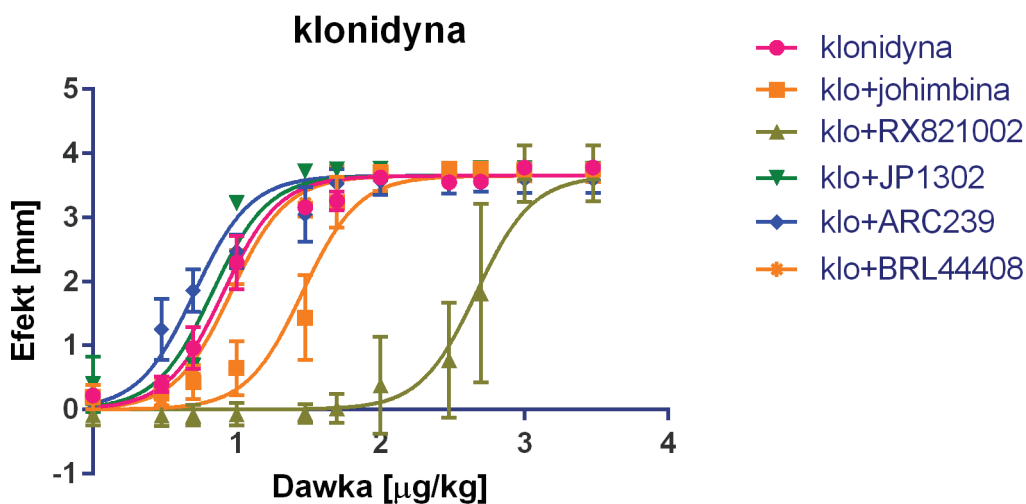
Pozostałe związki zaliczane do selektywnych antagonistów poszczególnych subtypów receptora  $\alpha_2$ -adrenergicznego, a mianowicie BRL44408 (antagonista receptora  $\alpha_{2A}$ -adrenergicznego), ARC239 (antagonista receptora  $\alpha_{2B}$ -adrenergicznego) oraz JP1302 (antagonista receptora  $\alpha_{2C}$ -adrenergicznego), nie wykazywały istotnego wpływu na działanie rozszerzające źrenicę oka szczura, wywołane podaniem skumulowanych dawek klonidyny. Odpowiednie wartości  $ED_{50}$  dla klonidyny oraz dla klonidyny w obecności BRL44408, ARC239 i JP1302 są zbliżone do wartości  $ED_{50}$  obliczonej dla samej klonidyny (Tab. 2). W tych przypadkach nie było możliwe wyliczenie wartości  $pA_2$  z uwagi na nakładanie się krzywych dla klonidyny + BRL44408, klonidyny + ARC239 oraz klonidyny + JP1302 (Rys. 20).

Podobna sytuacja miała miejsce, jeśli chodzi o 7-metylomarsanidynę, której działanie rozszerzające źrenicę oka szczura po podaniu zwierzętom w skumulowanych dawkach było silnie antagonizowane przez RX821002 ( $ED_{50} = 18,11 [16,44-19,91] \mu\text{g}/\text{kg}$ ;  $pA_2 = 6,99 [6,81-7,17]$ ), natomiast słabiej przez johimbinę ( $ED_{50} = 6,54 [5,86-7,24] \mu\text{g}/\text{kg}$ ;  $pA_2 = 5,66 [5,41-5,92]$ ) (Tab. 2). Związki BRL44408, ARC239 oraz JP1302 nie wykazywały istotnego wpływu na efekty mydriatyczne wywierane przez 7-metylomarsanidynę (Tab. 2), co potwierdzają wartości  $ED_{50}$  otrzymane dla tej pochodnej imidazolinowej, badanej w obecności wymienionych antagonistów receptorowych. Wartości te nie różnią się znamienne od wartości  $ED_{50}$  obliczonej dla samej 7-metylomarsanidyny (Tab. 2). Podobnie jak w przypadku klonidyny, nie udało się obliczyć wartości parametru  $pA_2$  dla

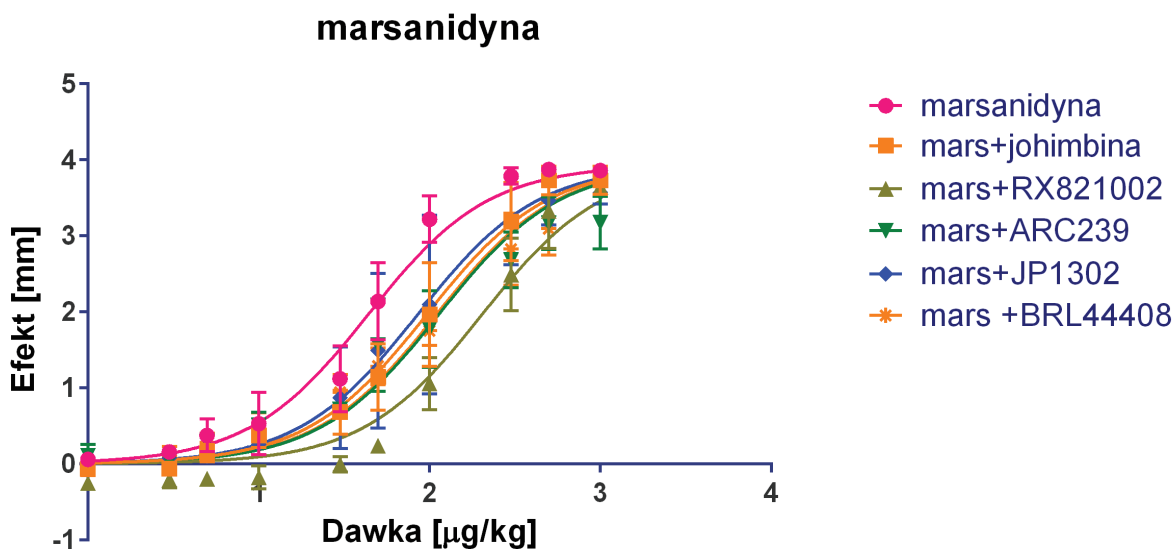
7-metylomarsanidyny, badanej w obecności BRL44408, ARC239 oraz JP1302, ze względu na nakładanie się poszczególnych krzywych dawka-efekt mydriatyczny (Rys. 22).

Na Rys. 21 widoczne jest wyraźne równoległe przesunięcie w prawo krzywej dawka-efekt dla marsanidyny badanej w obecności RX821002. Działanie antagonistyczne johimbiny wobec omawianego efektu tej pochodnej imidazolinowej jest mniej zaznaczone, czego dowodem są wyliczone wartości  $pA_2$ , wynoszące odpowiednio 8,34 (8,18-8,49) dla układu marsanidyna + RX821002 oraz 6,02 (5,79-6,24) dla układu marsanidyna + johimbina (Tab. 2). Związki ARC239 oraz JP1302 wywołują jedynie niewielkie przesunięcie równoległe krzywych dawka-efekt mydriatyczny dla marsanidyny. Wartości  $pA_2$  obliczone dla tych związków nie różnią się w sposób statystycznie znamieny w porównaniu z analogiczną wartością obliczoną dla układu marsanidyna + johimbina.

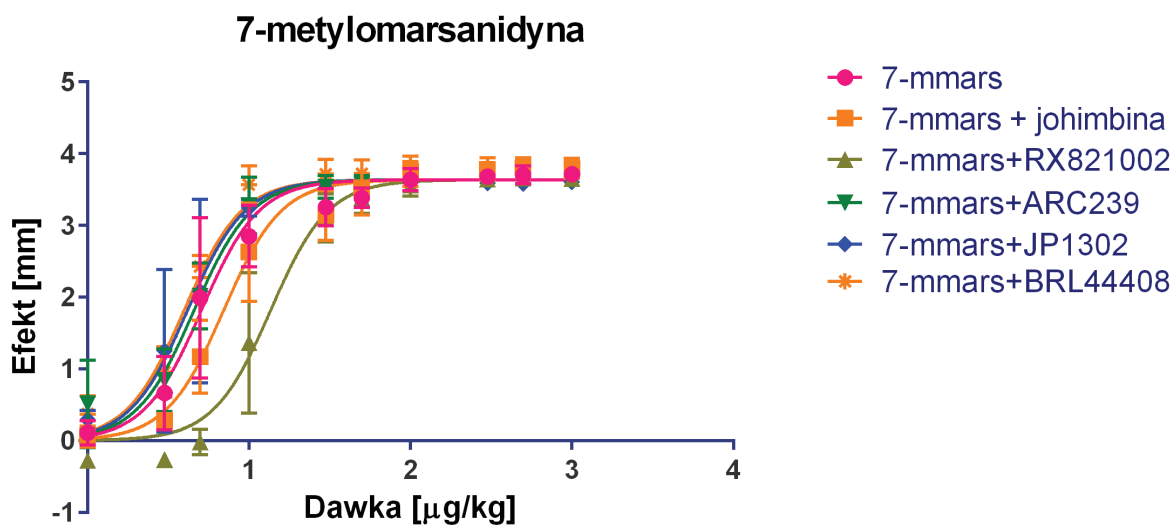
Również w obecności BRL44408 praktycznie nie zaobserwowano przesunięcia krzywej dawka-efekt dla marsanidyny. Dlatego niemożliwe było obliczenie parametru  $pA_2$  dla tego układu Tab. 2.



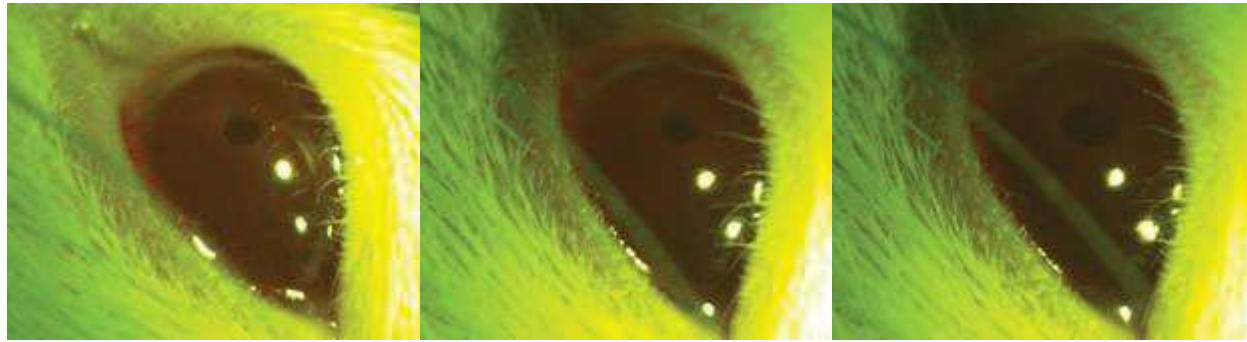
Rys. 20. Krzywa zależności dawka-efekt dla klonidyny w obecności antagonistów receptora  $\alpha_2$ -adrenergicznego oraz jego podtypów.



Rys. 21. Krzywa zależności dawka-efekt dla marsanidyny w obecności antagonistów receptora  $\alpha_2$ -adrenergicznego oraz jego podtypów.



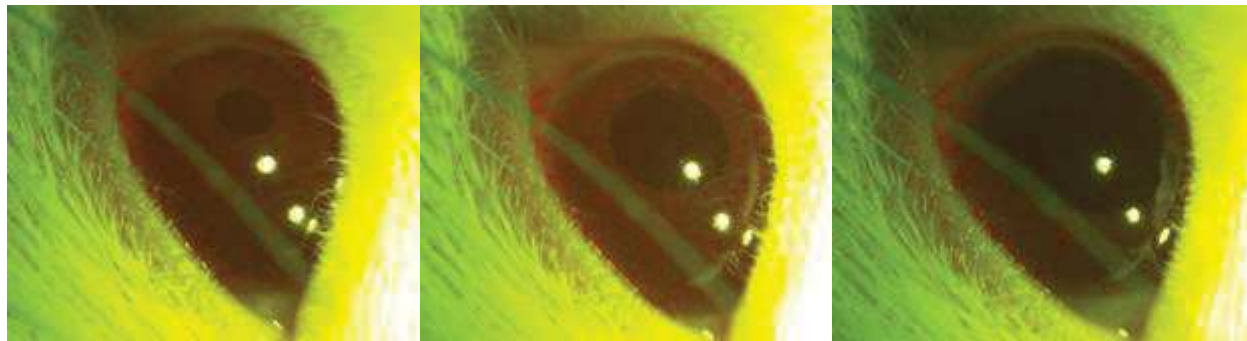
Rys. 22. Krzywa zależności dawka-efekt dla 7-metylmarsanidyny w obecności antagonistów receptora  $\alpha_2$ -adrenergicznego oraz jego podtypów.



**control**

**1µg/kg**

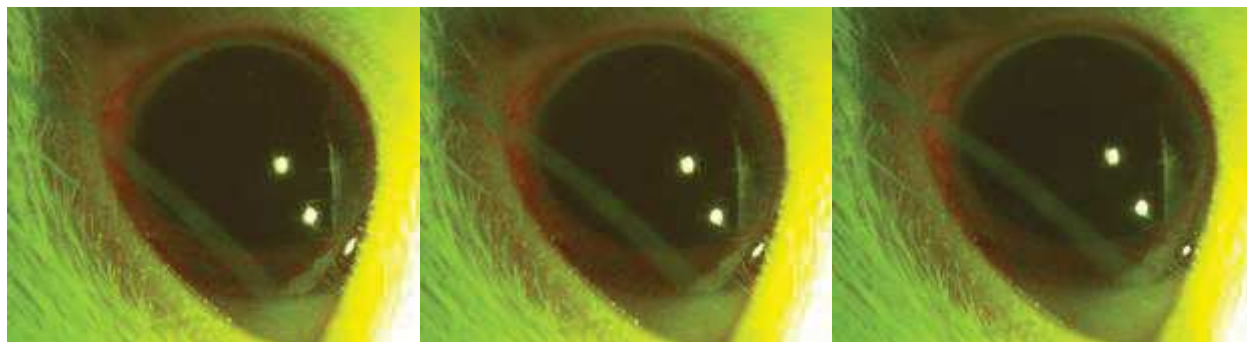
**3µg/kg**



**5µg/kg**

**10µg/kg**

**30µg/kg**



**50µg/kg**

**100µg/kg**

**300µg/kg**

Rys. 23. Zmiany średnicy źrenicy szczura po podaniu skumulowanych dawek marsanidyny.

## 2. Wyniki analizy strukturalnej badanych pochodnych imidazolinowych

### 2.1. Parametr lipofilowości związków, $\log k_w$ , oznaczony przy użyciu RP HPLC/MS

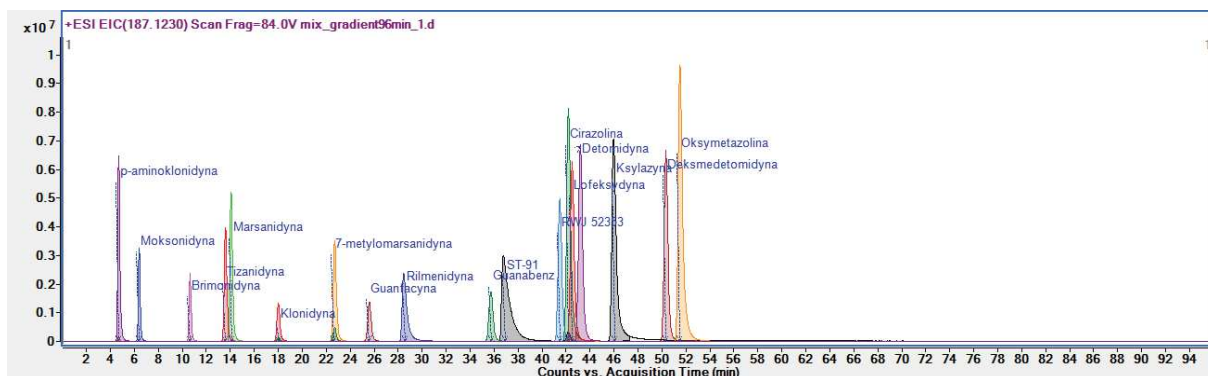
W wyniku analizy RP HPLC mieszaniny badanych pochodnych imidazolin przeprowadzonej techniką gradientową z wykorzystaniem spektrometrii mas, uzyskano dobrą separację poszczególnych związków, które zostały następnie zidentyfikowane w oparciu o ich stosunek masy do ładunku ( $m/z$ ). Przykładowy chromatogram przedstawiający piki poszczególnych imidazolin rozdzielone z ich mieszaniny techniką gradientowej RP HPLC (Rys. 24). Obliczone wartości  $\log k_w$  ( $\log k_w$  eksp) zebrano w Tab. 3.

Tab. 3. Parametry strukturalne związków imidazolinowych.

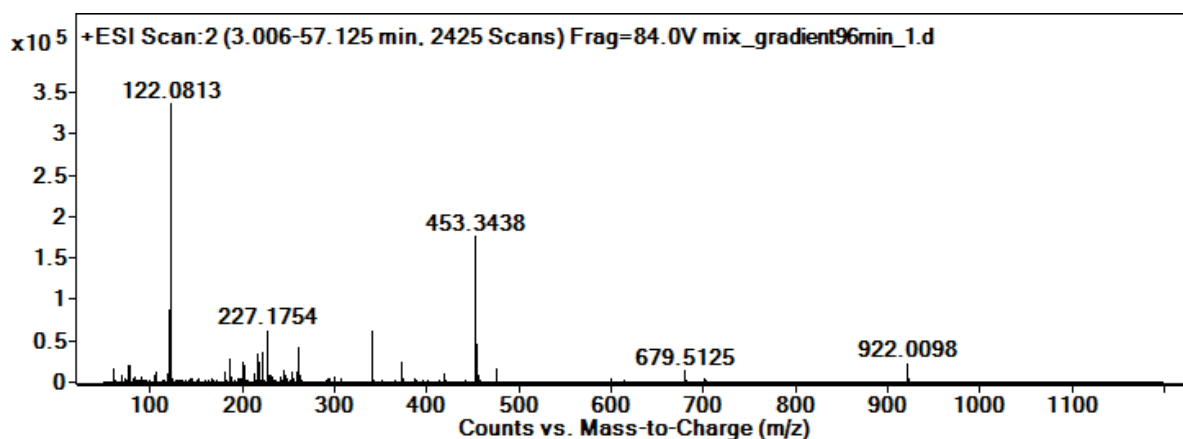
Lp.	Związek	$\log k_w$ dośw.	CLOGP ACD	CLOGP HYP	Objętość	Objętość (Approx)	Objętość (Grid)	$pK_{aACD}$
1.	klonidyna	2,08	1,41	0,28	621,56	309,26	397,21	8,10
2.	rilmnidyna	2,54	0,57	1,90	613,91	260,44	386,36	7,88
3.	moksonidyna	1,49	0,84	0,60	696,14	349,95	444,70	7,11
4.	cirazolina	3,15	3,19	0,48	718,29	348,24	449,55	9,84
5.	guanabenz	2,77	2,49	0,16	635,54	355,93	399,53	7,66
6.	guanfacyna	2,39	1,12	-0,33	625,43	286,70	382,81	7,34
7.	deksmedetomidyna	3,55	3,1	0,69	670,48	356,01	412,59	6,65
8.	tizanidyna	1,92	0,65	2,41	653,53	285,92	413,11	7,48
9.	p-aminoklonidyna	1,29	0,29	-1,44	656,73	321,55	416,47	9,26
10.	detomidyna	3,16	2,75	0,29	633,10	344,22	397,43	7,14
11.	oksymetazolina	3,63	4,52	1,46	836,56	431,81	495,29	10,61
12.	brimonidyna	1,94	0,96	1,03	703,48	316,34	441,79	7,69
13.	ST-91	2,95	2,37	1,83	726,19	327,35	441,91	10,67

14.	<b>RWJ 52353</b>	3,13	3,04	-0,99	672,05	298,97	414,23	6,55
15.	<b>lofeksydyna</b>	3,2	3,59	0,19	707,23	363,39	431,02	Bd
16.	<b>ksylazyna</b>	3,35	2,37	1,75	685,36	333,73	421,17	7,67
17.	<b>marsanidyna</b>	1,97	1,24	0,01	297,08	297,08	400,44	7,26
18.	<b>7-metylomarsanidyna</b>	2,4	0,56	-0,02	690,40	323,77	431,51	7,31

Lp	Związek	Polaryzowalność	Refrakcja	$\mu$	$E_{HOMO}$	$E_{LUMO}$	Energia całkowita	Max ładunek	Min ładunek
1.	<b>klonidyna</b>	22,66	62,24	2,939	-9,09816	-0,39371	-60958,1	0,23	-0,28
2.	<b>rilmenidyna</b>	19,72	49,52	2,045	-9,15555	1,298482	51477,09	0,22	-0,28
3.	<b>moksonidyna</b>	23,62	61,21	2,072	-9,12753	-0,70499	-70215,6	0,23	-0,28
4.	<b>cirazolina</b>	24,65	66,75	1,306	-9,27169	0,143727	-60345,7	0,20	-0,29
5.	<b>guanabenz</b>	22,53	61,36	1,937	-8,69051	-0,02583	-62453,1	0,23	-0,36
6.	<b>guanfacyna</b>	23,52	63,18	4,948	-9,8989	-0,60648	-68359,6	0,26	-0,37
7.	<b>deksmedetomidyna</b>	24,60	67,59	3,146	-8,90516	0,711332	-52985,9	0,25	-0,21
8.	<b>tizanidyna</b>	25,02	68,13	2,432	-9,06802	-1,62627	-66019,8	0,63	-0,31
9.	<b>p-aminoklonidyna</b>	24,01	65,79	4,452	-8,81106	-0,22592	-66055,4	0,23	-0,33
10.	<b>detomidyna</b>	22,76	63,12	3,467	-8,95172	0,664646	-49396,9	0,25	-0,21
11.	<b>oksymetazolina</b>	30,93	81,28	1,094	-8,88156	0,175466	-71802,4	0,22	-0,30
12.	<b>brimonidyna</b>	26,19	72,01	2,953	-9,01736	-1,12295	-67611,4	0,25	-0,28
13.	<b>ST-91</b>	26,14	70,57	2,978	-8,93862	0,097794	-58721,4	0,22	-0,28
14.	<b>RWJ 52353</b>	25,89	71,30	4,113	-8,56899	-0,50608	-58592,7	0,60	-0,45
15.	<b>lofeksydyna</b>	25,61	69,04	1,701	-9,2927	-0,33202	-70432	0,20	-0,29
16.	<b>ksylazyna</b>	25,95	70,73	1,69	-8,70322	0,281257	-54536,2	0,20	-0,30
17.	<b>marsanidyna</b>	22,15	61,34	2,625	-8,09614	-0,05125	-56788,4	0,22	-0,27
18.	<b>7-metylomarsanidyna</b>	24,40	66,08	1,865	-8,19348	0,403616	-61030,7	0,20	-0,27

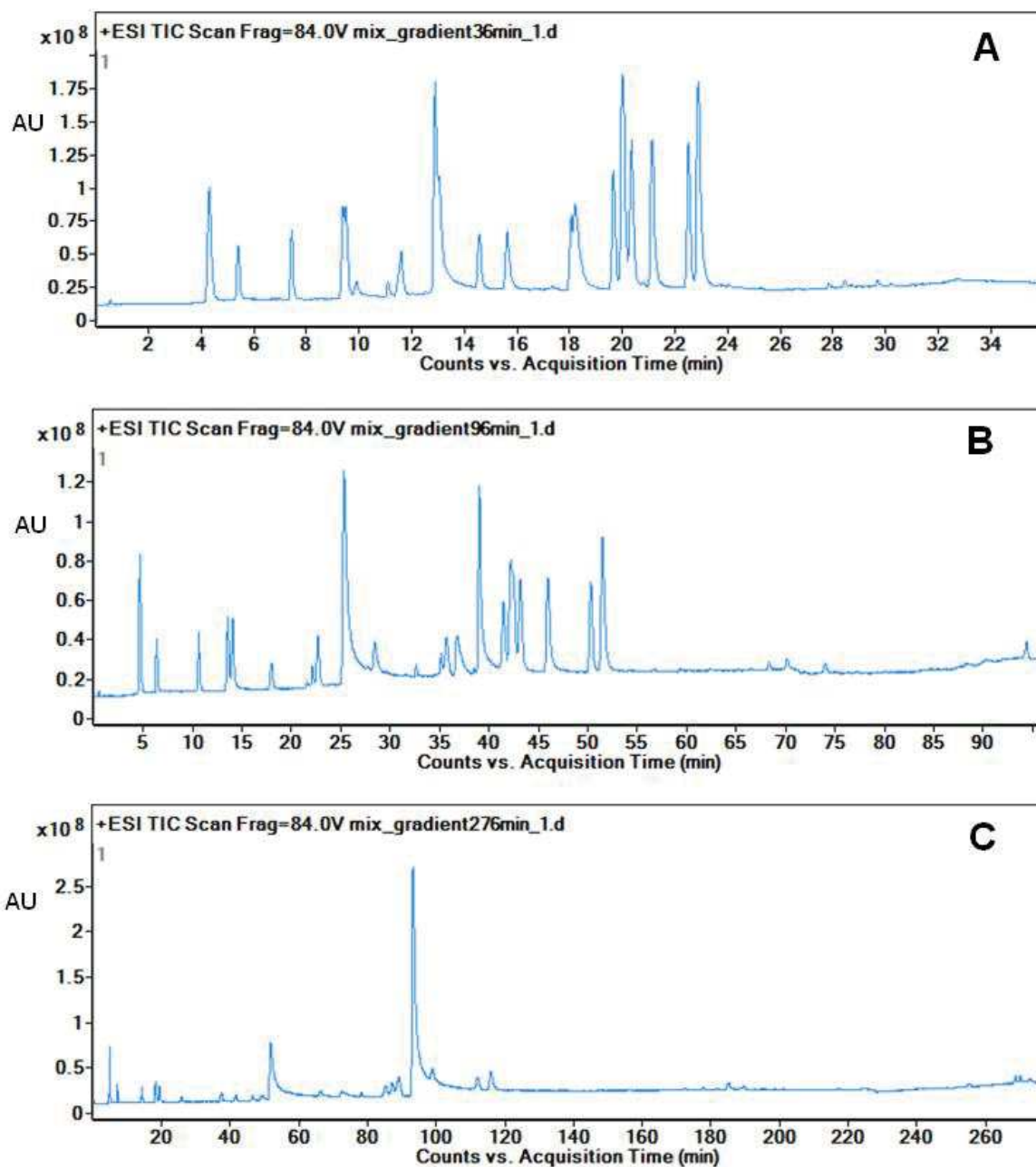


Rys. 24. Chromatogram mieszaniny badanych pochodnych imidazolin. Rozdzielenie przeprowadzono na kolumnie *X Bridge C18* (wymiary: 3 mm x 50 mm, o wielkości ziaren 2.5  $\mu\text{m}$ ) z zastosowaniem gradientowej RP-HPLC-ESI-TOF-MS ( $t_G = 90$  min).



Rys. 25. Przykładowe widmo mas otrzymane w wyniku oznaczania mieszaniny analitów z zastosowaniem techniki RP-HPLC-ESI-TOF-MS w trybie przemiatań (ang. *scan*).





Rys. 26. Przykładowe chromatogramy otrzymane za pomocą oznaczeń RP-HPLC-ESI-TOF-MS z wykorzystaniem 3 różnych metod gradientowych: A-36 min, B-96 min, C-276 min.



## 2.2. Deskryptory strukturalne imidazolin otrzymane metodą półempiryczną

W wyniku przeprowadzonego modelowania molekularnego otrzymano 16 parametrów strukturalnych charakteryzujących zarówno wielkość cząsteczek badanych związków (parametry objętościowe), jak i właściwości elektronowe i geometrię cząsteczek imidazolin. Deskryptory te zdefiniowane zostały w części Materiały i metody rozprawy doktorskiej. Wartości liczbowe wymienionych parametrów, łącznie z wyliczonymi teoretycznie wartościami współczynników podziału w układzie *n*-oktanol-woda (CLOGP<sub>HYP</sub>, CLOGP<sub>ACD</sub>) oraz stałej kwasowości (pK<sub>a</sub>) umieszczono w Tab. 3.

## 3. Analiza QSAR

W analizie ilościowych zależności między działaniem mydriatycznym pochodnych imidazolin a ich strukturą chemiczną (QSAR) uwzględniono 18 związków. Podjęto próbę znalezienia korelacji między pochodzącymi z przeprowadzonych eksperymentów farmakologicznymi miarami aktywności mydriatycznej związków, wyrażonej w postaci logarytmów odwrotności ED<sub>50</sub> (mol/kg) a wartościami parametrów opisujących strukturę imidazolin, wyszczególnionymi w Tab. 3. Obok deskryptorów pochodzących z modelowania molekularnego i wyliczonych teoretycznie (CLOGP<sub>HYP</sub>, CLOGP<sub>ACD</sub>, pK<sub>a</sub>) wzięto pod uwagę również wartości parametru lipofilowości związków log *k<sub>w</sub>*, oznaczonymi metodą RP HPLC ESI TOF MS.

Ponieważ efekty mydriatyczne związków imidazolinowych związane są z ich działaniem pobudzającym ośrodkowe receptory α<sub>2</sub>-adrenergiczne, przeprowadzono analizę zależności log (1/ED<sub>50</sub>) badanych pochodnych w funkcji log *k<sub>w</sub>*. Niestety, nie udało się uzyskać istotnej statystycznie korelacji między wymienionymi parametrami. Podobnie dla całej serii 18 badanych imidazolin nie znaleziono znamiennej statystycznie korelacji pomiędzy log(1/ED<sub>50</sub>) a obliczonymi teoretycznie miarami ich lipofilowości, CLOGP<sub>HYP</sub> i CLOGP<sub>ACD</sub>. Także wartości pK<sub>a</sub> nie wносиły istotnego wkładu do zależności struktura – aktywność w grupie analogów imidazolin.

Jedynie w podgrupie 8 pochodnych imidazoliny (klonidina, lofeksydyna, moksonidyna, brimonidyna, medetomidyna, detomidyna, cirazolina i oksymetazolina), dla których dysponowano eksperymentalnie wyznaczonymi za pomocą HPLC, na kolumnie Unisphere w pH 11.7, literaturowymi wartościami  $\log k_w$  [143], znaleziono istotną zależność między  $\log(1/ED_{50})$  a  $\log k_w$ :

$$\log(1/ED_{50}) = 0.862(\pm 0.207) \log k_w + 6.534(\pm 0.201) \quad \text{Równ. 9}$$

gdzie:  $n = 8$ ;  $R = 0.862$ ;  $R^2 = 0.74$ ;  $R^2_{\text{corr}} = 0.700$ ;  $F(1,6) = 17$ ;  $p < 0.006$

W wyniku zamiany wartości  $\log k_w$  w Równ. 9, na parametry  $CLOGP_{\text{HYP}}$  i  $CLOGP_{\text{ACD}}$  związków uzyskano jednak zależności pozbawione znamienności statystycznej.

Rozważając w prowadzonej analizie QSAR elektronowe parametry pochodnych imidazolinowych, odzwierciedlające ich właściwości elektronowe, pod uwagę wzięto następujące deskryptory: moment dipolowy ( $\mu$ ), energię najwyższego zajętego oraz niezajętego ( $E_{\text{HOMO}}$ ) orbitalu molekularnego, maksymalnych i minimalnych ładunków na poszczególnych atomach w cząsteczkach imidazolin (odpowiednio:  $\text{Max}_{\text{ch}}$  and  $\text{Min}_{\text{ch}}$ ) oraz wartości subcząsteczkowego parameteru polarności,  $\Delta$ . Nie znaleziono istotnych statystycznie zależności pomiędzy  $\log(1/ED_{50})$  a powyższymi deskryptorami.

Deskryptory charakteryzujące wielkość cząsteczek badanych związków, takie jak refrakcja molowa (MR), energia całkowita ( $E_T$ ), polaryzowalność (P) i Masa molowa (M), powierzchnia i objętość Van der Waalsa (odpowiednio  $\text{VdW}_{\text{surf}}$  i  $\text{VdW}_{\text{vol}}$ ) również zostały wzięte pod uwagę w analizie QSAR. Także w tym przypadku nie znaleziono istotnych statystycznie korelacji między wartościami  $\log(1/ED_{50})$ , a wymianionymi parametrami strukturalnymi pochodnych imidazoliny.

## V. DYSKUSJA

Grupa 20 związków imidazolinowych wytypowanych do badań składała się z 19 pochodnych, które według danych literaturowych, pochodzących z doświadczeń radioizotopowych, wykazywały zróżnicowane powinowactwo do receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych, oraz związku BU224 należącego do wybiórczych ligandów receptora  $I_1$ -imidazolinowego. Wśród 19 imidazolin można wyróżnić 17 związków znanych w lecznictwie lub wykorzystywanych tylko w doświadczeniach farmakologicznych, zaś 2 kolejne: marsanidyna i 7-metylomarsanidyna to pochodne nowo zsyntezowane, wykazujące aktywność krążeniową [120].

W przypadku 18 analogów imidazolinoliny obserwowano zależne od dawki efekty rozszerzania źrenicy oka szczurów. Świadczą o tym otrzymane wartości efektów maksymalnych, opisujące względną siłę działania agonistycznego związków względem ośrodkowych receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych, jak i wartości  $ED_{50}$  ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), stanowiące miary powinowactwa badanych imidazolin do tych receptorów.

Zarówno wartości  $E_{\text{max}}$  jak i  $ED_{50}$  okazały się zróżnicowane (Tab. 1), co wykorzystano w przeprowadzonej w niniejszej pracy analizie QSAR. Zaobserwowano także wyraźną aktywność mydriatyczną marsanidyny i 7-metylomarsanidyny, które w pracy doktorskiej zostały po raz pierwszy zbadane pod kątem wpływu na szerokość źrenicy oka szczurów.

Johimbina jest powszechnie używanym w badaniach aktywności mydriatycznej antagonistą receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych. Z doświadczeń radioizotopowych wiadomo, że wiąże się ona ze wszystkimi podtypami receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych, jednak wykazuje największe powinowactwo do podtypów  $\alpha_{2A}$  i  $\alpha_{2C}$ , natomiast niższe do podtypów  $\alpha_{2B}$  i  $\alpha_{2D}$  tych receptorów. Wartości  $pK_i$  oznaczone z wykorzystaniem linii komórkowych i tkanek, wykazujących obecność tylko jednego podtypu receptora  $\alpha_2$ -adrenergicznego:  $\alpha_{2A}$  (komórki HT29),  $\alpha_{2B}$  (tkanka płucna noworodków szczurzych),  $\alpha_{2C}$  (komórki nerki oposa) oraz  $\alpha_{2D}$  (komórki PC12), wynosiły odpowiednio: 8,72; 7,95; 8,94 oraz 7,27.

Przeprowadzone wybrane doświadczenia z johimbiną – klasycznym antagonistą receptora  $\alpha_2$ -adrenergicznego, podawaną dożylnie szczurom 10 min przed skumulowanymi dawkami klonidyny, rilmenidyny, moksonidyny, marsanidyny oraz 7-metylomarsanidyny,

potwierdziły udział tego receptora w mechanizmie rozszerzania źrenicy oka zwierząt, opisywany przez innych autorów [73,122,123]

Agmatyna, nieselektywny ligand receptora  $\alpha_2$ -adrenergicznego, charakteryzujący się powinowactwem głównie do innych receptorów (np.  $I_1/I_2$  – imidazolinowych) [124], nie wywierała działania mydriatycznego na oko szczurów w zastosowanych dawkach (od 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  do 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Mogło to wynikać również z ograniczonej rozpuszczalności związku, która uniemożliwiła jego aplikację dożylną w dawkach wyższych (do 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), które podawane były w przypadku pozostałych badanych imidazolin. Zgodnie z przewidywaniami, również BU224, selektywny ligand receptora  $I_2$ -imidazolinowego, niewykazujący praktycznie powinowactwa do receptora  $\alpha_2$ -adrenergicznego, nie wywierał działania mydriatycznego i dlatego został wykorzystany jako kontrola ujemna.

W przypadku klonidyny – modelowego związku imidazolinowego, wykorzystywanego w badaniach efektów mydriatycznych, przeprowadzono dodatkowy eksperyment z AGN192403 – jedynym obecnie dostępnym związkiem, zaliczanym do wybiórczych antagonistów receptora  $I_1$ -imidazolinowego. Związek ten, podany w dawce 5 mg/kg, przed zastosowanymi skumulowanymi dawkami klonidyny w zakresie od 1 do 3000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , nie powodował istotnego przesunięcia w prawo krzywej dawka-efekt dla klonidyny. AGN192403 podany osobno szczurom dożylnie w dawkach skumulowanych 0,1-5 mg/kg wywoływał (dość nieoczekiwanie) nieznaczny wzrost szerokości źrenicy oka szczura, co może świadczyć o tym, że oprócz działania antagonistycznego wobec receptora  $I_1$ -imidazolinowego, związek ten może zachowywać się jak częściowy agonista receptora  $\alpha_2$ -adrenergicznego. Uzyskane w przypadku klonidyny wyniki doświadczeń z AGN192403 oraz opisane przez nas wcześniej rezultaty analogicznego eksperymentu z rilmenidyną, badaną w obecności AGN192403, potwierdzają teorię Kossa [73], że w działaniu mydriatycznym pochodnych imidazolin pośredniczą ośrodkowe receptory  $\alpha_2$ -adrenergiczne, natomiast receptory typu  $I_1$  nie są w ten mechanizm zaangażowane.

W pracy doktorskiej po raz pierwszy zbadano działanie mydriatyczne nowosyntezyzowanych pochodnych imidazolinowych: marsanidyny oraz 7-metylomarsanidyny na modelu szczurzym. Związki te, należące do indazolowych pochodnych imidazolin, zostały otrzymane przez Sączewskiego i in. [121]. Marsanidyna wykazuje w doświadczeniach radioizotopowych na błonach komórkowych mózgu szczurów wysokie powinowactwo do receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych ( $K_i = 14,05 \text{ nM}$ ), oraz selektywność względem tych receptorów (współczynnik selektywności  $\alpha_2/I_1 = 3879$ ).

7-metylomarsanidyna odznacza się, w porównaniu z marsanidyną, nieco niższym powinowactwem do receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych ( $K_i = 53,6$  nM), a także wyraźnie mniejszą wartością współczynnika selektywności  $\alpha_2/I_1$ , równą 7,2 [125]. Oba związki posiadają działanie agonistyczne względem ośrodkowych receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych, co potwierdzają wyniki wcześniejszych eksperymentów na szczurach, w których obserwowano ich efekty hipotensyjne oraz zwalniające częstość akcji serca [125,126].

Marsanidyna i 7-metylomarsanidyna wywoływały zależne od dawki rozszerzenie źrenicy oka szczurów, a obserwowana wartość efektu maksymalnego 7-metylomarsanidyny ( $E_{max} = 3,52 \pm 0,1$  mm) była zliżona do związku modelowego – klonidyny ( $E_{max} = 3,63 \pm 0,09$  mm), zaś w przypadku marsanidyny nawet większa ( $E_{max} = 3,97 \pm 0,1$  mm). Porównanie wartości  $ED_{50}$ , obliczonych dla wymienionych związków z krzywych dawka-efekt mydriatyczny świadczy o tym, że marsanidyna wykazuje około 5 razy większe powinowactwo do receptora typu  $\alpha_2$  od klonidyny, zaś powinowactwa 7-metylomarsanidyny i klonidyny są zbliżone (Tab. 1). Stanowi to potwierdzenie rezultatów otrzymanych przez Sączewskiego i in. [125] w doświadczeniach radioizotopowych [125], że marsanidyna charakteryzuje się kilkakrotnie większym od 7-metylomarsanidyny powinowactwem do adrenoreceptora układu sympatycznego typu  $\alpha_2$ .

Silne działanie ośrodkowe klonidyny, marsanidyny, 7-metylomarsanidyny oraz klonidyny może wynikać również z właściwości fizykochemicznych tych związków. Obliczony teoretycznie przy użyciu oprogramowania ACD parametr lipofilności, CLOGP, dla 7-metylomarsanidyny wynosi 1,70 i jest wyższy niż w przypadku klonidyny (1,41) oraz marsanidyny (1,24) [127]. Według danych literaturowych [125], wartość  $pK_a$  klonidyny wynosi 8,2, a więc w warunkach fizjologicznego pH, wynoszącego 7,4, związek ten występuje głównie w postaci zjonizowanej, a jedynie 14% stanowi forma niezjonizowana. Marsanidyna i 7-metylomarsanidyna charakteryzują się niższą zasadowością (wartości  $pK_a$  dla tych związków wynoszą odpowiednio 6,32 and 6,53), dlatego w pH 7,4 występują one głównie jako niezjonizowane zasady (odpowiednio w 92% i 82%). Może to wyjaśniać ich znaczną zdolność do przenikania przez barierę krew-mózg. Potwierdzają to wyniki badań Boblewskiego i in. [126], w których marsanidyna i 7-metylomarsanidyna podane dożylnie uśpionym szczurom w dawce 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  wywołują znaczny spadek ciśnienia tętniczego krwi oraz częstości akcji serca. Jednak dla marsanidyny efekty te są słabsze niż w przypadku 7-metylomarsanidyny

i wynoszą -30 mm Hg i -49 uderzeń/min względem -43 mm Hg and -122,9 uderzeń/min. [126].

W niniejszej pracy podjęto również próbę oceny farmakologicznej udziału poszczególnych podtypów receptora  $\alpha_2$ -adrenergicznego w działaniu pochodnych imidazoliny z zastosowaniem modelu mydriazy ocznej u szczura. Dotychczasowe dane pochodzące z jedynej publikacji Heala i in. [88] sugerowały, że postsynaptyczne receptory  $\alpha_2$ -adrenergiczne, zlokalizowane w korze mózgowej oraz w jądrze Edingera-Westphala u szczurów, za pośrednictwem których związki imidazolinowe wywierają efekty rozszerzenia źrenicy oka, należą głównie do podtypu  $\alpha_{2D}$ . Hipoteza ta została sformułowana w oparciu o rezultaty pochodzące z eksperymentów przeprowadzonych zarówno *in vitro* jak *in vivo*. Pierwsze z nich zostały przeprowadzone na mózgu szczura z wykorzystaniem serii ligandów o zróżnicowanym powinowactwie do poszczególnych subtypów receptora  $\alpha_2$ -adrenergicznego ( $\alpha_{2A}$  –  $\alpha_{2D}$ ). Oznaczone radioizotopowo wartości  $pK_i$ , charakteryzujące wypieranie [ $^3H$ ] RX821002 z preparatów błon komórkowych kory mózgowej zwierząt przez wymienione ligandy, bardzo dobrze korelowały z wartościami  $pK_i$ , opisującymi wiązanie tych samych związków do receptora  $\alpha_{2D}$ -adrenergicznego w preparacie gruczołu podszczękowego szczura, przedstawionymi wcześniej przez Michela i in. [128]. Jednocześnie nie stwierdzono istotnych statystycznie korelacji z wartościami  $pK_i$ , które charakteryzowały wiązanie tej samej grupy ligandów z podtypami  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  oraz  $\alpha_{2C}$  receptora  $\alpha_2$ -adrenergicznego, zlokalizowanymi w tkankach śledziony królika ( $\alpha_{2A}$ ) i nerki szczura ( $\alpha_{2B}$ ) [128] oraz występującymi w linii komórkowej nerek oposa (OK) -  $\alpha_{2C}$  [129]. W tej samej publikacji Heal i in. [88] oznaczyli również w doświadczeniu na świadomych szczurach w warunkach *in vivo* siłę działania szeregu antagonistów receptora  $\alpha_2$ -adrenergicznego, które hamowały mydriazę wywołaną podaniem klonidyny. Miarami działania antagonistycznego związków były wartości  $-\log ID_{50}$ , które silnie korelowały z wartościami  $pK_i$  opisującymi wiązanie ligandów z podtypem  $\alpha_{2D}$ , podczas gdy zaobserwowano jedynie słabe korelacje analogicznych wartości  $pK_i$  dla pozostałych podtypów receptora  $\alpha_2$  adrenergicznego.

Brak antagonistów o wysokiej wybiórczości względem poszczególnych podtypów receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych uniemożliwiał praktycznie wykazanie w prostym doświadczeniu *in vivo*, który podtyp receptora może pośredniczyć w działaniu mydriatycznym wywieranym przez imidazoliny u szczurów. Obecnie związki o takich właściwościach są dostępne, a wśród nich np. BRL4408, ARC239, JP-1302.



BRL44408 jest wybiórczym antagonistą receptorów  $\alpha_{2A}$ -adrenergicznych, posiadającym duże powinowactwo do tego podtypu receptora. W badaniach radioizotopowych oznaczone na liniach komórek jajnika chomika chińskiego (CHO), transfekowanych ludzkimi receptorami  $\alpha_{2A}$ -,  $\alpha_{2B}$ - oraz  $\alpha_{2C}$ - adrenergicznymi, wartości  $K_i$  dla tego związku dla wynosiły, odpowiednio, 109, 1800 i 700 nM [130].

ARC239 charakteryzuje się wysokim powinowactwem oraz znaczną selektywnością wobec receptora  $\alpha_{2B}$ -adrenergicznego. Stałe wiązania,  $pK_i$ , tej pochodnej, pochodzące z doświadczeń na liniach komórkowych (CHO), wykazujących ekspresję białka ludzkich receptorów adrenergicznych podtypów:  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  i  $\alpha_{2C}$ , przybierają wartości odpowiednio: 6,65; 8,03 i 7,78 [119].

JP-1302 jest nowym, silnym oraz wysoce specyficznym antagonistą receptorów  $\alpha_{2C}$ -adrenergicznych. W badaniach radioizotopowych prowadzonych przy użyciu [ $^3$ H]-rauwolescyliny na błonach komórkowych komórek linii S115, transfekowanych jednym z trzech podtypów ludzkich receptorów adrenergicznych  $\alpha_2$  ( $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$ ), stała  $K_i$  tego związku dla podtypu  $\alpha_{2C}$  była równa 28 nM. Wartości  $K_i$  otrzymane dla pozostałych podtypów receptora  $\alpha_2$ -adrenergicznego wynosiły: dla receptora  $\alpha_{2A}$  - 3150 nM dla receptora  $\alpha_{2B}$  - 1470 nM [131].

Związek RX821002 może być uważany za antagonistę różnicującego podtyp  $\alpha_{2A}$ , od  $\alpha_{2D}$  receptorów adrenergicznych. Eksperymenty *in vitro*, przeprowadzone na skrawkach kory mózgowej wykazały, że pochodna ta wykazuje znacznie wyższe powinowactwo do receptorów  $\alpha_{2D}$  u świnki morskiej ( $pK_d = 9,7$ ), w porównaniu z podtypem  $\alpha_{2A}$  u królika ( $pK_d = 8,2$ ) [132]. Ponieważ RX821002 charakteryzuje się również wyraźnym powinowactwem wobec receptorów  $\alpha_{2B}$ - oraz  $\alpha_{2C}$ -adrenergicznych (wartości  $pK_i$  oznaczane na komórkach linii CHO, wykazujących ekspresję białka ludzkich receptorów podtypu  $\alpha_{2B}$  i  $\alpha_{2C}$  równe są 8,77 oraz 9,52), można zaliczyć go do preferencyjnych antagonistów receptora  $\alpha_{2D}$ - adrenergicznego [133].

W pracy doktorskiej przeprowadzono ocenę farmakologiczną wpływu na szerokość źrenicy oka szczura klonidyny, marsanidyny oraz 7-metylomarsanidyny w nieobecności oraz w obecności BRL44408, ARC239, JP-1302 oraz RX821002. Dodatkowo użyto także johimbiny – “klasycznego” niewybiórczego antagonisty receptorów  $\alpha_2$  układu sympatycznego. Związki o charakterze antagonistów poszczególnych subtypów receptora  $\alpha_2$ -adrenergicznego zostały zastosowane w tego typu doświadczeniach po raz pierwszy,

z wyjątkiem związku JP-1302, którego wpływ na działanie mydriatyczne deksmedetomidyny był badany uprzednio przez Sallinenena i in. [131].

Otrzymane krzywe zależności dawka-efekt mydriatyczny dla klonidyny oraz marsanidyny i 7-metylomarsanidyny ulegały przesunięciu równoległemu w prawo przez johimbineę, co potwierdza udział ośrodkowych receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych w efekcie rozszerzania źrenicy oka, wywołanym dożylnym podaniem szczurom w dawkach skumulowanych badanych związków imidazolinowych. W przypadku doświadczeń z klonidyną, przeprowadzonych w obecności BRL44408, ARC239, JP-1302 oraz RX821002, wyniki statystycznej analizy przeprowadzonej testem ANOVA ( $p=0,02$ ) oraz testem Tukey'a potwierdziły, że w działaniu mydriatycznym klonidyny pośredniczą głównie receptory  $\alpha_{2D}$ -adrenergiczne. Także w eksperymentach, w których wpływ marsanidyny oraz jej 7-metylowego analogu na szerokość źrenicy oka oceniano farmakologicznie w obecności RX821002, wykazano wyraźny wzrost wartości  $pA_2$  w porównaniu z wartościami  $pA_2$  otrzymanymi dla wymienionych nowych pochodnych imidazolin, badanych w obecności johimbiny (Tab. 2). Dotyczy to szczególnie marsanidyny, gdyż parametr  $pA_2$  dla układu marsanidyna + RX821002 równy jest 8,34 (8,18-8,49), podczas gdy w przypadku układu marsanidyna + johimbina, wartość  $pA_2$  wynosi 6,02 (5,79-6,24). Wprawdzie stwierdzone różnice między  $pA_2$  nie były znamienne statystycznie, można jednak, uwzględniając dodatkowo brak zmian położenia krzywych dawka-efekt mydriatyczny dla badanych imidazolin w obecności BRL44408, ARC239 oraz JP-1302, przypuszczać, że w działaniu mydriatycznym zaangażowany jest przede wszystkim podtyp  $\alpha_{2D}$  receptora  $\alpha_2$ -adrenergicznego [123].

Związki zawierające z cząsteczek układ imidazolinowy wywierają zróżnicowane działania farmakologiczne za pośrednictwem receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych i/lub imidazolinowych [134]. Analogi klonidyny, zaliczane do I generacji środków hipotensyjnych, obniżają ciśnienie tętnicze krwi oraz zmniejszają częstość akcji serca w wyniku stymulacji ośrodkowych receptorów typu  $\alpha_2$  [50]. Moksonidyna i rilmenidyna – przedstawiciele II generacji tych środków leczniczych, wykazującej mniej nasilone objawy niepożądane, mają niższe powinowactwo do receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych, niż do  $I_1$ -imidazolinowych w mózgu [124]. Inne korzystne właściwości farmakologiczne związane z pobudzeniem ośrodkowych receptorów typu  $\alpha_2$  układu sympatycznego przez analogi imidazolin, obejmują działanie obniżające ciśnienie śródgałkowe w jaskrze, wykazywane przez brimonidynę i *p*-aminoklonidynę [42,92], czy też zdolność lofeksydyny



do łagodzenia objawów zespołu odstawienia u osób uzależnionych od opioidów. Konsekwencją stymulacji receptorów typu  $\alpha_2$  układu sympatycznego w mózgu mogą być także wykorzystywane w medycynie działania uspokajające, nasenne czy przeciwbólowe fadolmidyny oraz deksmedetomidyny [94]. Z kolei tizanidyna, będąca agonistą receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych w pniu mózgu i w rdzeniu kręgowym, wywiera działanie przeciwlękowe i rozkurczające, wykorzystywane w leczeniu przykurczów mięśni związanych ze stwardnieniem rozsianym oraz urazami rdzenia kręgowego [135,136].

Badania ilościowych zależności struktura-aktywność (QSAR) oraz zależności między strukturą a aktywnością (SAR) w grupie analogów imidazoliny, stały się w ostatnich kilkunastu latach przedmiotem zainteresowania szeregu autorów [122,137,138]. Przykładowo, Nikolić i in [139] przeprowadzili analizę QSAR w grupie związków imidazolinowych uzyskując statystycznie istotne równanie regresji, wiążące ich stałe powinowactwa do receptorów  $I_1$ -imidazolinowych w płytkach krwi ludzkiej z parametrami strukturalnymi opisującymi lipofilowość, właściwości elektronowe oraz wielkość cząsteczek.

Sączewski i in.[122,140] objęli badaniami grupę otrzymanych przez siebie oraz opisanych wcześniej pochodnych imidazoliny, zawierających w cząsteczce układ indazolu, które wywierały działanie hipotensyjne wskutek blokowania receptorów  $\alpha_1$ -adrenergicznych. Celem analizy było ustalenie czy z oznaczony *in vitro* stałych wiązania tych związków do receptorów typu  $\alpha_1$  można przewidzieć, że właściwości  $\alpha$ -adrenolityczne i efekty krążeniowe, wykazywane przez przez indazolowe analogi imidazoliny zostaną zachowane, gdy w cząsteczkach nowo otrzymanych imidazolin o podobnej strukturze pierścienia indazolu zostanie zastąpiony bioizosterycznym układem indolu. Otrzymane wyniki wykazały, że nie zawsze informacje uzyskane na drodze analizy SAR mają odpowiednią wartość predykcyjną.

Inni autorzy przedstawili wyniki teoretycznych badań przeprowadzonych z wykorzystaniem metody 3D-QSAR oraz technik wirtualnego dokowania w celu oceny działania agonistycznego/antagonistycznego wobec receptorów  $I_1$ -imidazolinowych nowych ligandów o strukturze imidazolinowej, zaprojektowanych jako potencjalne środki przeciwnowotworowe [122].

Mając na względzie fakt, że w ostatnich latach praktycznie brak jest doniesień literaturowych dotyczących poszukiwania ilościowych zależności między strukturą związków imidazolinowych a ich ośrodkowym działaniem farmakologicznym,

oznaczonym w warunkach *in vivo* na całym zwierzęciu, podjęto próbę takiej analizy. W tym celu wykorzystano do oznaczeń wartości dawek równoefektywnych ED<sub>50</sub> dla serii 18 pochodnych imidazoliny o zróżnicowanej strukturze chemicznej, z modelu mydriazy ocznej u szczura.

Pewną inspiracją było też wcześniejsze doniesienie Timmermansa i in. [141] na temat ilościowych zależności struktura-aktywność w grupie działających ośrodkowo hipotensyjnie bliskich analogów klonidyny. Niestety, przeprowadzona w pracy doktorskiej wieloparametrowa analiza regresyjna nie doprowadziła do otrzymania znamiennego statystycznie i posiadającego sens fizyczny modelu, opisującego aktywność farmakologiczną związków (wyrażoną jako  $\log 1/ED_{50}$ ) w funkcji powszechnie wykorzystywanych w badaniach QSAR parametrów cząsteczkowych opisujących lipofilowość oraz właściwości elektronowe i steryczne pochodnych imidazoliny.

Modele QSAR przedstawiane w pracy [141] wydają się złożone. Nawet jeżeli pod względem statystycznym byłyby do zaakceptowania, to ich sens fizyczny może budzić wątpliwości. Wydaje się, że niepowodzenie analizy QSAR w przypadku parametrów farmakodynamicznych wyznaczonych w warunkach *in vivo* na całym zwierzęciu może wynikać ze złożonego mechanizmu oddziaływań lek-receptor  $\alpha_2$ -adrenergiczny, które głównie mają specyficzny charakter polarny. Zdolność do tego typu interakcji jest trudna do opisanego w sposób ilościowy przy użyciu znanych deskryptorów strukturalnych, w przeciwieństwie do niespecyficznych strukturalnie, addytywnych oddziaływań opisywanych przez parametry związane z wielkością cząsteczki. Z drugiej strony, w przypadku związków chemicznych wykazujących bardzo podobne oddziaływanie lek-receptor, obserwowane różnice ich aktywności farmakologicznej mogą wynikać z różnic właściwości farmakokinetycznych tych związków, na przykład lipofilowości opisywanej przez Równ. 9.

W podsumowaniu można stwierdzić, że model mydriazy ocznej u szczurów jest użytecznym narzędziem farmakologicznym w badaniach oddziaływania związków o strukturze imidazolinowej z ośrodkowymi receptorami  $\alpha_2$ -adrenergicznymi. Jego zaletami są niewątpliwie prostota, możliwość przeprowadzenia doświadczeń w szerokim zakresie dawek na jednym zwierzęciu, duża powtarzalność i dokładność uzyskiwanych rezultatów oraz to, że pozwala na porównanie zarówno względnej siły działania związków imidazolinowych, jak i wykazywanego przez nie powinowactwa receptorowego.

Wymienione fakty wskazują na użyteczność opisywanej metody szczególnie w badaniach przedklinicznych nowo-syntezowanych analogów imidazoliny o spodziewanym działaniu na receptor  $\alpha_2$ -adrenergiczny z wyłączeniem możliwych równoczesnych interakcji tych związków z receptorami I1/I2-imidazolinowymi [90,142].

## VI. WNIOSKI

1. Model mydriazy u szczurów może służyć jako prosty i dogodny system oceny interakcji związków o budowie imidazolinowej z ośrodkowymi receptorami  $\alpha_2$ -adrenergicznymi.
2. Badana grupa 19 pochodnych imidazolinowych charakteryzuje się zróżnicowanym powinowactwem do receptora  $\alpha_2$ -adrenergicznego; pochodne te wykazują zależne od dawki wartości maksymalnego efektu mydriatycznego i znaczne różnią się wartościami  $ED_{50}$ .
3. Marsanidyna i 7-metylomarsanidyna są agonistami receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych. Dowodzą tego obserwacje, że związki te wywierają silny efekt mydriatyczny. Doświadczenia z użyciem selektywnych i preferencyjnych antagonistów podtypów receptorów takich jak johimbina, RX821002 ARC 239 i JP1302, potwierdziły sugestię, że zasadniczą rolę w tym efekcie odgrywa podtyp  $\alpha_{2D}$  tego receptora.
4. Receptory  $\alpha_2$ -adrenergiczne pośredniczą w regulacji średnicy źrenicy. Dowodzą tego następujące obserwacje:
  - 4.1. Johimbina hamuje mydriazę
  - 4.2. Najbardziej zaangażowany w proces jest podtyp  $\alpha_{2D}$  receptora adrenergicznego, gdyż efekt mydriatyczny najsilniej blokuje związek RX821002 (preferencyjny antagonist receptorów  $\alpha_{2A/D}$ -adrenergicznych)
  - 4.3. Podtypy receptora  $\alpha_{2B}$  i  $\alpha_{2C}$  najprawdopodobniej nie biorą udziału w mechanizmie rozszerzania źrenicy, gdyż nie powodują przesunięcia krzywych dawka-efekt dla badanych agonistów receptora  $\alpha_2$ -adrenergicznego.
5. Receptory imidazolinowe nie są zaangażowane w efekt mydriatyczny. Dowodzą tego następujące obserwacje, że agonisty receptorów imidazolinowych, bez powinowactwa do  $\alpha_2$ -adrenergicznych, nie wywierają działania mydriatycznego

## VII. PIŚMIENNICTWO

- [1] Limbird LE. Historical perspective for understanding of adrenergic receptors. *Curr Top Membr* 2011;67:1–17. doi:10.1016/B978-0-12-384921-2.00001-X.
- [2] Nalepa I, Vetulani J. Receptory adrenergiczne. W: „Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału”, pod red. Zawilskiej JB, wyd: PWN; 2004, p. 245–73.
- [3] Zawilska JB. Receptory - uwagi wstępne, klasyfikacja. W: „Receptory i Mechanizmy przekazywania sygnału”, pod red. Zawilskiej JB, wyd: PWN; 2004, p. 226–36.
- [4] Vetulani J. Receptory i wtórne przekaźniki. W: „Farmakologia. Podstawy Farmakoterapii”, pod red. Kostowskiego W i Hermana ZS, wyd. PZWL; Warszawa; 2008, p. 64–93.
- [5] Wikberg-Matsson A, Uhlén S, Wikberg JE. Characterization of alpha(1)-adrenoceptor subtypes in the eye. *Exp Eye Res* 2000;70:51–60. doi:10.1006/exer.1999.0753.
- [6] French N.  $\alpha$ 2-Adrenoceptors and I2 sites in the mammalian central nervous system. *Pharmacol Ther* 1995;68:175–208. doi:10.1016/0163-7258(95)02005-5.
- [7] Ahlquist RP. A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol* 1948;153:586–600.
- [8] Dubocovich ML, Langer SZ. Negative feedback regulation of noradrenaline release by nerve stimulation in the perfused cat's spleen: differences in potency of phenoxybenzamine in blocking the pre- and post-synaptic adrenergic receptors. *J Physiol* 1974;237:505–19. doi:10.1113/jphysiol.1974.sp010495.
- [9] Lands AM, Arnold A, McAuliff JP, Ludaena F, P&Brown TGJ. Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature* 1967;214:597–8.
- [10] Bylund DB. Heterogeneity of alpha-2 adrenergic receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 1985;22:835–43. doi:10.1016/0091-3057(85)90536-2.
- [11] Morrow A, Creese I. Characterization of alpha 1-adrenergic receptor subtypes in rat brain: a reevaluation of [3H]WB4104 and [3H]prazosin binding. *Mol Pharmacol* 1986;29:321–30.
- [12] Piascik MT, Perez DM. Alpha1-adrenergic receptors: new insights and directions. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;298:403–10.

- [13] Civantos Calzada B, Aleixandre de Artiñano A. Alpha-adrenoceptor subtypes. *Pharmacol Res* 2001;44:195–208. doi:10.1006/phrs.2001.0857.
- [14] Regan JW, Cotecchia S. The Adrenergic Receptors: New Subtypes, Pharmacology, and Coupling Mechanism. W: *Molecular Biology of G-Protein-Coupled Receptor, pod red. MR Brann*, wyd. Birkhauser Boston; 1992, p. 76–112. doi:10.1007/978-1-4684-6772-7\_4.
- [15] Bylund DB. Subtypes of alpha 1- and alpha 2-adrenergic receptors. *FASEB J* 1992;6:832–9.
- [16] Bylund D, Eikenberg D, Hieble J, Langer S, Lefkowitz R, Minneman K, Molinoff, PB, Ruffolo, RR, Jr Trendelenburg, U. International Union of Pharmacology Nomenclature of Adrenoceptors. *Pharmacol Rev* 1994;46:121–36.
- [17] Trendelenburg A-U, Philipp M, Meyer A, Klebroff W, Hein L, Starke K. All three  $\alpha$ 2-adrenoceptor types serve as autoreceptors in postganglionic sympathetic neurons. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2003;368:504–12. doi:10.1007/s00210-003-0829-x.
- [18] Lomasney JW, Cotecchia S, Lefkowitz RJ, Caron MG. Molecular biology of alpha-adrenergic receptors: implications for receptor classification and for structure-function relationships. *Biochim Biophys Acta* 1991;1095:127–39.
- [19] Hein L, Kobilka BK. Adrenergic receptor signal transduction and regulation. *Neuropharmacology* 1995;34:357–66.
- [20] Raymond JR, Hnatowich M, Lefkowitz RJ, Caron MG. Adrenergic receptors. Models for regulation of signal transduction processes. *Hypertension* 1990;15:119–31. doi:10.1161/01.HYP.15.2.119.
- [21] Docherty JR. Subtypes of functional alpha1- and alpha2-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* 1998;361:1–15.
- [22] Bylund DB. Pharmacological characteristics of alpha-2 adrenergic receptor subtypes. *Ann N Y Acad Sci* 1995;763:1–7.
- [23] Zeng DW, Harrison JK, D'Angelo DD, Barber CM, Tucker AL, Lu ZH, Lynch, K R. Molecular characterization of a rat alpha 2B-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:3102–6.
- [24] Flordellis CS, Handy DE, Bresnahan MR, Zannis VI, Gavras H. Cloning and expression of a rat brain alpha 2B-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:1019–23.

- [25] Lanier SM, Downing S, Duzic E, Homcy CJ. Isolation of rat genomic clones encoding subtypes of the alpha 2-adrenergic receptor. Identification of a unique receptor subtype. *J Biol Chem* 1991;266:10470–8.
- [26] Naselsky DP, Ashton D, Ruffolo RR, Hieble JP. Rabbit alpha2-adrenoceptors: both platelets and adipocytes have alpha2A-pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;298:219–25.
- [27] Docherty JR. Subtypes of functional alpha 1-adrenoceptor. *Cell Mol Life Sci* 2010;67:405–17.
- [28] Trendelenburg AU, Limberger N, Starke K. Subclassification of presynaptic alpha 2-adrenoceptors: alpha 2D-autoreceptors in guinea-pig atria and brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1995;352:49–57.
- [29] Khan ZP, Ferguson CN, Jones RM. Alpha-2 and imidazoline receptor agonists. Their pharmacology and therapeutic role. *Anaesthesia* 1999;54:146–65. doi:10.1046/j.1365-2044.1999.00659.x.
- [30] Bylund DB. Alpha-2 adrenoceptor subtypes: are more better? *Br J Pharmacol* 2005;144:159–60. doi:10.1038/sj.bjp.0706060.
- [31] Gyires K, Zadori ZS, Shujaa N, Al-Khrasani M, Pap B, Mozes MM, Matyus, P. Pharmacological analysis of alpha(2)-adrenoceptor subtypes mediating analgesic, anti-inflammatory and gastroprotective actions. *Inflammopharmacology* 2009;17:171–9. doi:10.1007/s10787-009-0003-2.
- [32] Bylund DB, Ray-Prenger C, Murphy TJ. Alpha-2A and alpha-2B adrenergic receptor subtypes: antagonist binding in tissues and cell lines containing only one subtype. *J Pharmacol Exp Ther* 1988;245:600–7.
- [33] Michel AD, Loury DN, Whiting RL. Differences between the  $\alpha$ 2-adrenoceptor in rat submaxillary gland and the  $\alpha$ 2A- and  $\alpha$ 2B-adrenoceptor subtypes. *Br J Pharmacol* 1989;98:890–7. doi:10.1111/j.1476-5381.1989.tb14618.x.
- [34] Latifpour J, Jones SB, Bylund DB. Characterization of [3H]yohimbine binding to putative alpha-2 adrenergic receptors in neonatal rat lung. *J Pharmacol Exp Ther* 1982;223:606–11.
- [35] Blaxall HS, Murphy TJ, Baker JC, Ray C, Bylund DB. Characterization of the alpha-2C adrenergic receptor subtype in the opossum kidney and in the OK cell line. *J Pharmacol Exp Ther* 1991;259:323–9.

- [36] Simonneaux V, Ebadi M, Bylund DB. Identification and characterization of alpha 2D-adrenergic receptors in bovine pineal gland. *Mol Pharmacol* 1991;40:235–41.
- [37] Xia Y, Uhlen S, Chhajlani V, Lien EJ, Wikberg JE. Further evidence for the existence of two forms of alpha 2B-adrenoceptors in rat. *Pharmacol Toxicol* 1993;72:40–9.
- [38] Zawilska JB, Vetulani J. Receptory - uwagi wstępne. W: "Receptory - struktura, charakterystyka, funkcja", pod red. J. Z. Nowaka J. B. Zawilskiej, Wydawnictwo Naukowe PWN; Warszawa, 1997, p. 19–27.
- [39] Zając M, Pawełczyk E, Jelińska A. "Chemia leków", Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego; Poznań, 2006.
- [40] <https://www.hse.ru/data/2011/06/22/1215686482/Neuroscience.pdf>, 2011.
- [41] Mutshler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Ruth P, Schafer-Korting M. "Mutschler. Farmakologia i toksykologia: podręcznik. Wyd. II, polskie poprawione i uzupełnione, pod re. W. Buczek, MedPharm Polska; Wrocław, 2010, s. 71-71.
- [42] Szabo B. Imidazoline antihypertensive drugs: A critical review on their mechanism of action. *Pharmacol Ther* 2002;93:1–35. doi:10.1016/S0163-7258(01)00170-X.
- [43] Dziubdziela W, Jałowicki P. Receptory alfa-2-adrenergiczne i ich agoniści w praktyce anestezyjologicznej. *Anestezjol Intens Ter* 2002;2:135–40.
- [44] Vetulani J. Receptory adrenergiczne. W: „Receptory – Struktura, charakterystyka, funkcja”, pod red. JZ Nowaka, JB Zawilskiej, wyd: PWN; 1997, s. 42–63.
- [45] Szabadi E, Bradshaw CM. Autonomic pharmacology of alpha(2)-adrenoceptors. *J Psychopharmacol* 1996;10:6–18.
- [46] MacMillan LB, Hein L, Smith MS, Piascik MT, Limbird LE. Central hypotensive effects of the alpha2a-adrenergic receptor subtype. *Science* 1996;273:801–3.
- [47] Hunter JC, Fontana DJ, Hedley LR, Jasper JR, Lewis R, Link RE, Secchi, R Sutton, J, Eglén, R M. Assessment of the role of alpha2-adrenoceptor subtypes in the antinociceptive, sedative and hypothermic action of dexmedetomidine in transgenic mice. *Br J Pharmacol* 1997;122:1339–44. doi:10.1038/sj.bjp.0701520.
- [48] Lakhani PP, MacMillan LB, Guo TZ, McCool B a, Lovinger DM, Maze M, Limbird, L E. Substitution of a mutant alpha2a-adrenergic receptor via “hit and run” gene targeting reveals the role of this subtype in sedative, analgesic, and anesthetic-sparing responses in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:9950–5. doi:10.1073/pnas.94.18.9950.



- [49] Kable JW, Murrin LC, Bylund DB. In vivo gene modification elucidates subtype-specific functions of alpha(2)-adrenergic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;293:1–7.
- [50] Link RE, Desai K, Hein L, Stevens ME, Chruscinski a, Bernstein D, Barsh, G S Kobilka, B K. Cardiovascular regulation in mice lacking alpha2-adrenergic receptor subtypes b and c. *Science* 1996;273:803–5.
- [51] Takano Y, Takano M, Yaksh TL. The effect of intrathecally administered imiloxan and WB4101: possible role of alpha 2-adrenoceptor subtypes in the spinal cord. *Eur J Pharmacol* 1992;219:465–8.
- [52] Takano Y, Yaksh TL. Characterization of the pharmacology of intrathecally administered alpha-2 agonists and antagonists in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1992;261:764–72.
- [53] Gyires K, Mullner K, Ronai AZ. Functional evidence that gastroprotection can be induced by activation of central alpha(2B)-adrenoceptor subtypes in the rat. *Eur J Pharmacol* 2000;396:131–5.
- [54] Gyires K, Zadori ZS, Shujaa N, Minorics R, Falkay G, Matyus P. Analysis of the role of central and peripheral alpha2-adrenoceptor subtypes in gastric mucosal defense in the rat. *Neurochem Int* 2007;51:289–96. doi:10.1016/j.neuint.2007.07.001.
- [55] Makaritsis KP, Handy DE, Johns C, Kobilka B, Gavras I, Gavras H. Role of the alpha2B-adrenergic receptor in the development of salt-induced hypertension. *Hypertension* 1999;33:14–7.
- [56] Hein L, Altman JD, Kobilka BK. Two functionally distinct alpha2-adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. *Nature* 1999;402:181–4. doi:10.1038/46040.
- [57] Sallinen J, Haapalinna A, MacDonald E, Viitamaa T, Lahdesmaki J, Rybnikova E, Pelto-Huikko, M, Kobilka, B K, Scheinin, M. Genetic alteration of the alpha2-adrenoceptor subtype c in mice affects the development of behavioral despair and stress-induced increases in plasma corticosterone levels. *Mol Psychiatry* 1999;4:443–52.
- [58] Scheinin M, Lomasney JW, Hayden-Hixson DM, Schambra UB, Caron MG, Lefkowitz RJ, Freneau, Robert T. Jr. Distribution of  $\alpha$ 2-adrenergic receptor

- subtype gene expression in rat brain. *Mol Brain Res* 1994;21:133–49. doi:10.1016/0169-328X(94)90386-7.
- [59] McCune SK, Voigt MM, Hill JM. Expression of multiple alpha adrenergic receptor subtype messenger RNAs in the adult rat brain. *Neuroscience* 1993;57:143–51.
- [60] Nicholas AP, Hökfelt T, Pieribone VA. The distribution and significance of CNS adrenoceptors examined with in situ hybridization. *Trends Pharmacol Sci* 1996;17:245–55. doi:10.1016/0165-6147(96)10022-5.
- [61] Nicholas AP, Pieribone V, Hokfelt T. Distributions of mRNAs for alpha-2 adrenergic receptor subtypes in rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 1993;328:575–94. doi:10.1002/cne.903280409.
- [62] Heal DJ, Cheetham SC, Butler SA, Gosden J, Prow MR, Buckett WR. Receptor binding and functional evidence suggest that postsynaptic  $\alpha_2$ -adrenoceptors in rat brain are of the  $\alpha_{2D}$  subtype. *Eur J Pharmacol* 1995;277:215–21. doi:10.1016/0014-2999(95)00078-Y.
- [63] McAuliffe-Curtin D, Buckley C. Review of alpha adrenoceptor function in the eye. *Eye (Lond)* 1989;3 ( Pt 4):472–6. doi:10.1038/eye.1989.71.
- [64] Knaus AE, Muthig V, Schickinger S, Moura E, Beetz N, Gilsbach R, Hein, L. Alpha2-adrenoceptor subtypes--unexpected functions for receptors and ligands derived from gene-targeted mouse models. *Neurochem Int* 2007;51:277–81. doi:10.1016/j.neuint.2007.06.036.
- [65] Kamibayashi T, Maze M. Clinical uses of alpha2 -adrenergic agonists. *Anesthesiology* 2000;93:1345–9.
- [66] Avery RA, Franowicz JS, Studholme C, van Dyck CH, Arnsten AF. The alpha-2A-adrenoceptor agonist, guanfacine, increases regional cerebral blood flow in dorsolateral prefrontal cortex of monkeys performing a spatial working memory task. *Neuropsychopharmacology* 2000;23:240–9. doi:10.1016/S0893-133X(00)00111-1.
- [67] Trendelenburg AU, Sutej I, Starke K. Presynaptic alpha 2A/D-autoreceptors in the brain cortex of *Cercopithecus aethiops*. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1997;355:341–6.
- [68] Traczyk WZ, A. Trzebski, „Fizjologia człowieka z elementami fizjologii klinicznej”, pod red. WZ Traczyka i A Trzebskiego; PZWL, Warszawa, 1980.

- [69] Konturek J, „Fizjologia człowieka. Podręcznik dla studentów medycyny”, pod red. J. Konturka, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 1998,
- [70] Hou RH, Samuels ER, Raisi M, Langley RW, Szabadi E, Bradshaw CM. Why patients with Alzheimer’s disease may show increased sensitivity to tropicamide eye drops: role of locus coeruleus. *Psychopharmacology (Berl)* 2006;184:95–106. doi:10.1007/s00213-005-0227-9.
- [71] Warwick R. The ocular parasympathetic nerve supply and its mesencephalic sources. *J Anat* 1954;88:71–93.
- [72] Kozicz T, Bittencourt JC, May PJ, Reiner A, Gamlin PDR, Palkovits M, Horn, Anja K E, Toledo, Claudio A B, Ryabinin, Andrey E. The Edinger-Westphal nucleus: A historical, structural, and functional perspective on a dichotomous terminology. *J Comp Neurol* 2011;519:1413–34. doi:10.1002/cne.22580.
- [73] Yu Y, Koss MC. Rat clonidine mydriasis model: imidazoline receptors are not involved. *Auton Neurosci Basic Clin* 2005;117:17–24. doi:10.1016/j.autneu.2004.10.001.
- [74] Koss MC. Pupillary dilation as an index of central nervous system alpha 2-adrenoceptor activation. *J Pharmacol Methods* 1986;15:1–19. doi:10.1016/0160-5402(86)90002-1.
- [75] Kobinger W, Walland A. Modulating effect of central adrenergic neurones on a vagally mediated cardioinhibitory reflex. *Eur J Pharmacol* 1973;22:344–50.
- [76] Kobinger W, Walland A. Involvement of adrenergic receptors in central vagus activity. *Eur J Pharmacol* 1971;16:120–2.
- [77] Heal DJ, Prow MR, Buckett WR. Clonidine produces mydriasis in conscious mice by activating central alpha 2-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* 1989;170:11–8. doi:10.1016/0014-2999(89)90127-1.
- [78] Koss MC, Christensen HD. Evidence for a central postsynaptic action of clonidine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1979;307:45–50. doi:10.1007/BF00506550.
- [79] Koss MC, San LC. Analysis of clonidine-induced mydriasis. *Invest Ophthalmol* 1976;15:566–70.
- [80] Gherezghiher T, Koss MC. Clonidine mydriasis in the rat. *Eur J Pharmacol* 1979;57:263–6. doi:10.1016/0014-2999(79)90376-5.

- [81] Pitts DK, Marwah J. Chronic cocaine reduces alpha 2-adrenoceptor elicited mydriasis and inhibition of locus coeruleus neurons. *Eur J Pharmacol* 1989;160:201–9. doi:10.1016/0014-2999(89)90492-5.
- [82] Berridge TL, Gadie B, Roach AG, Tulloch IF. alpha 2-Adrenoceptor agonists induced mydriasis in the rat by an action within the central nervous system. *Br J Pharmacol* 1983;78:507–15.
- [83] Hey JA, Koss MC. Opposing central autonomic actions of alpha 1- and alpha 2-adrenoceptor antagonists on oculomotor tone. *Eur J Pharmacol* 1987;139:243–6.
- [84] Doxey JC, Frank LW, Hersom AS. Studies on the pre- and postjunctional activities of alpha-adrenoreceptor agonists and their cardiovascular effects in the anaesthetized rat. *J Auton Pharmacol* 1981;1:157–69.
- [85] Cambridge D. UK-14,304, a potent and selective alpha2-agonist for the characterisation of alpha-adrenoceptor subtypes. *Eur J Pharmacol* 1981;72:413–5.
- [86] Hey JA, Gherezghiher T, Koss MC. Studies on the mechanism of clonidine-induced mydriasis in the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1985;328:258–63. doi:10.1007/BF00515551.
- [87] Koss MC. Rilmenidine produces mydriasis in cats by stimulation of CNS  $\alpha_2$ -adrenoceptors. *Auton Autacoid Pharmacol* 2003;23:51–6. doi:10.1046/j.1474-8673.2003.00276.x.
- [88] Heal DJ, Prow MR, Butler SA, Buckett WR. Mediation of mydriasis in conscious rats by central postsynaptic alpha 2-adrenoceptors. *Pharmacol Biochem Behav* 1995;50:219–24. doi:10.1016/0091-3057(94)00299-X.
- [89] Hey JA, Ito T, Koss MC. Mechanism of dexamphetamine-induced mydriasis in the anaesthetized rat. *Br J Pharmacol* 1989;96:39–44.
- [90] Raczak-Gutknecht J, Frąckowiak T, Nasal A, Rietz J, Paszek M, Buszewska-Forajta M, Kaliszan, R. Effect of the reference imidazoline drugs, clonidine and rilmenidine, on rat eye pupil size confirms the decisive role of  $\alpha_2$ -adrenoceptors on mydriasis. *Int J Pharmacol* 2014;10:470–8. doi:10.3923/ijp.2014.470.478.
- [91] Berridge TL, Gadie B, Roach AG, Tulloch IF.  $\alpha_2$ -Adrenoceptor agonists induce mydriasis in the rat by an action within the central nervous system. *Br J Pharmacol* 1983;78:507–15.
- [92] Head GA, Mayorov DN. Imidazoline receptors, novel agents and therapeutic potential. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2006;4:17–32.

- [93] Leino T, Viitamaa T, Haapalinna A, Lehtimäki J, Virtanen R. Pharmacological profile of intrathecal fadolmidine, a  $\alpha$ 2- adrenoceptor agonist, in rodent models. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2009;380:539–50. doi:10.1007/s00210-009-0460-6.
- [94] Wiczling P, Bartkowska-Sniatkowska A, Szerkus O, Siluk D, Rosada-Kurasinska J, Warzybok J, Borsuk A, Kaliszan R, Grzeskowiak E, Bienert A. The pharmacokinetics of dexmedetomidine during long-term infusion in critically ill pediatric patients. A Bayesian approach with informative priors. *J Pharmacokinetic Pharmacodyn* 2016;43:315–24. doi:10.1007/s10928-016-9474-0.
- [95] Wiczling P, Bieda K, Przybylowski K, Hartmann-Sobczynska R, Borsuk A, Matysiak J, Kokot, Z J, Sobczynski P, Grzeskowiak E, Bienert A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of propofol and fentanyl in patients undergoing abdominal aortic surgery - a study of pharmacodynamic drug-drug interactions. *Biopharm Drug Dispos* 2016;37:252–63. doi:10.1002/bdd.2009.
- [96] Hess C, Ritke N, Sydow K, Mehling L-M, Ruehs H, Madea B, Musshoff F. Determination of levamisole, aminorex, and pemoline in plasma by means of liquid chromatography-mass spectrometry and application to a pharmacokinetic study of levamisole. *Drug Test Anal* 2014;6:1049–54. doi:10.1002/dta.1619.
- [97] Karashima T, Komatsu T, Niimura M, Kawada C, Kamada M, Inoue K, Udaka, Keiko, Kuroda N, Shuin, T. Novel combination therapy with imiquimod and sorafenib for renal cell carcinoma. *Int J Urol* 2014;21:702–6. doi:10.1111/iju.12401.
- [98] Finn DP, Marti O, Harbuz MS, Valles A, Belda X, Marquez C, Jessop, David S, Lallies M D, Armario A. Behavioral, neuroendocrine and neurochemical effects of the imidazoline I2 receptor selective ligand BU224 in naive rats and rats exposed to the stress of the forced swim test. *Psychopharmacology (Berl)* 2003;167:195–202. doi:10.1007/s00213-003-1392-3.
- [99] Min J-W, Peng B-W, He X, Zhang Y, Li J-X. Gender difference in epileptogenic effects of 2-BFI and BU224 in mice. *Eur J Pharmacol* 2013;718:81–6. doi:10.1016/j.ejphar.2013.09.016.
- [100] Nasal A, Frąckowiak T, Petruszewicz J, Buciński A, Kaliszan R. Mydriasis elicited by imidazol(in)e  $\alpha$ 2-adrenomimetics in comparison with other adrenoceptor-mediated effects and hydrophobicity. *Eur J Pharmacol* 1995;274:125–32.

- [101] Kaliszan R., Turowski M., Markuszewski M., Haber P.: "Podstawy modelowania molekularnego"; Wydział Biotechnologii UG i AMG, Gdańsk 1997.
- [102] Patrick GL. „Chemia medyczna. Podstawowe zagadnienia”, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne; Warszawa, 2003.
- [103] Kaliszan R. QSRR: quantitative structure-(chromatographic) retention relationships. *Chem Rev* 2007;107:3212–46. doi:10.1021/cr068412z.
- [104] Kubinyi H. From narcosis to hyperspace: The history of QSAR. *Quant Struct Relationships* 2002;21:348–56. doi:10.1002/1521-3838(200210)21:4<348::AID-QSAR348>3.0.CO;2-D.
- [105] Nantasenamat C, Isarankura-Na-Ayudhya C, Naenna T, Prachayasittikul V. A practical overview of quantitative structure-activity relationship. *EXCLI J* 2009;8:74–88.
- [106] „Comprehensive medicinal chemistry”, C. Hansch, C; GP Sammes, BJ Taylor (eds.); vol. 4 „Quantitative Drug Design”, CoA. Ramsden (ed.), Pergamon Press, Oxford, 1990.
- [107] Samuła K, Cieniecka A. Wstęp do projektowania leków. Państwowy Zakład wydawnictw lekarskich; 1979.
- [108] Danishuddin, Khan AU. Descriptors and their selection methods in QSAR analysis: paradigm for drug design. *Drug Discov Today* 2016;21:1291–302. doi:10.1016/j.drudis.2016.06.013.
- [109] Chen B, Zhang T, Bond T, Gan Y. Development of quantitative structure activity relationship (QSAR) model for disinfection byproduct (DBP) research: A review of methods and resources. *J Hazard Mater* 2015;299:260–79. doi:10.1016/j.jhazmat.2015.06.054.
- [110] Eriksson L, Johansson E. Multivariate design and modeling in QSAR. *Chemom Intell Lab Syst* 1996;34:1–19. doi:10.1016/0169-7439(96)00023-8.
- [111] Hansch C. The use of homolytic, steric, and hydrophobic constants in a structure-activity study of 1,3-benzodioxole synergists. *J Med Chem* 1968;11:920–4.
- [112] Kubinyi H. QSAR and 3D QSAR in drug design Part 1: methodology. *Drug Discov Today* 1997;2:457–67. doi:10.1016/S1359-6446(97)01079-9.
- [113] A. Stanis. „Przystępny kurs statystyki z zastosowaniem STATISTICA PL na przykładach z medycyny”, wyd. StatSoft Polska, Kraków, 2006.

- [114] Neubig RR, Spedding M, Kenakin T, Christopoulos A. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacol Rev* 2003;55:597–606. doi:10.1124/pr.55.4.4.and.
- [115] Kubik L, Struck-Lewicka W, Kaliszan R, Wiczling P. Simultaneous determination of hydrophobicity and dissociation constant for a large set of compounds by gradient reverse phase high performance liquid chromatography-mass spectrometry technique. *J Chromatogr A* 2015;1416:31–7. doi:10.1016/j.chroma.2015.09.003.
- [116] Mass Hunter acquisition. Mass Hunter Acquisition, Agilent Technologies, Inc., www.agilent.com 2011.
- [117] Wwww.Chempider.com. www.chemspider.com n.d.
- [118] Wiczling P, Kaliszan R. Influence of pH on retention in linear organic modifier gradient RP HPLC. *Anal Chem* 2008;80:7855–61. doi:10.1021/ac801093u.
- [119] Gentili F, Pignini M, Piergentili A, Giannella M. Agonists and antagonists targeting the different alpha2-adrenoceptor subtypes. *Curr Top Med Chem* 2007;7:163–86.
- [120] Wróblewska M, Kasprzyk J, Sączewski F, Kornicka A, Boblewski K, Lehmann A, Rybczyńska, A. Marsanidine and 7-Me-marsanidine, the new hypotensive imidazolines augment sodium and urine excretion in rats. *Pharmacol Reports* 2013;65:1025–32.
- [121] Sączewski F, Kornicka A, Hudson AL, Laird S, Scheinin M, Laurila JM, Rybczyńska A, Boblewski K, Lehmann A, Gdaniec M. 3-[(Imidazolidin-2-yl)imino]indazole ligands with selectivity for the  $\alpha(2)$ -adrenoceptor compared to the imidazoline I(1) receptor. *Bioorg Med Chem* 2011;19:321–9. doi:10.1016/j.bmc.2010.11.020.
- [122] Raczak-Gutknecht J, Nasal A, Frąckowiak T, Kornicka A, Sączewski F, Wawrzyniak R, Kubik Ł, Kaliszana R. Comparative pharmacodynamic analysis of imidazoline compounds using rat model of ocular mydriasis with a test of quantitative structure-activity relationships. *J Pharm Biomed Anal* 2017; Artykuł przyjęty do druku, DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.jpba.2017.03.053>.
- [123] Raczak-Gutknecht J, Frąckowiak T, Nasal A, Kornicka A, Sączewski F, Kaliszan R. Are alpha-2D adrenoceptor subtypes involved in rat mydriasis evoked by new imidazoline derivatives: marsanidine and 7-methylmarsanidine? *Dose Response* 2017; Artykuł przyjęty do druku, DOI: 10.1177/1559325817701213



- [124] Dardonville C, Rozas I. Imidazoline binding sites and their ligands: An overview of the different chemical structures. *Med Res Rev* 2004. doi:10.1002/med.20007.
- [125] Sączewski F, Kornicka A, Rybczyńska A, Hudson AL, Miao SS, Gdaniec M, Boblewski K, Lehmann A. 1-[(Imidazolidin-2-yl)imino]indazole. Highly  $\alpha(2)/I(1)$  selective agonist: Synthesis, X-ray structure, and biological activity. *J Med Chem* 2008;51:3599–608. doi:Doi 10.1021/Jm800112s.
- [126] Boblewski K, Lehmann A, Sączewski F, Kornicka A, Rybczynska A. Vagotomy reveals the importance of the imidazoline receptors in the cardiovascular effects of marsanidine and 7-ME-marsanidine in rats. *Pharmacol Rep* 2014;66:874–9. doi:10.1016/j.pharep.2014.05.009.
- [127] ACD/pKa dB, 2011.
- [128] Michel AD, Loury DN, Whiting RL. Differences between the  $\alpha$  2-adrenoceptor in rat submaxillary gland and the  $\alpha$  2A-and  $\alpha$  2B-adrenoceptor subtypes. *Br J Pharmacol* 1989;98:890–7.
- [129] Bylund DB, Blaxall HS, Murphy TJ, Simonneaux V. Adrenoceptors: Structure, Mechanisms, Function. In: Szabadi E, Bradshaw CM, editors. *Adrenoceptors Struct. Mech. Funct.*, Basel: Birkhauser Verlag; 1991.
- [130] Beeley LJ, Berge JM, Chapman H, Hieble P, Kelly J, Naselsky DP, Rockell C M, Young P W. Synthesis of a selective  $\alpha$ -2A adrenoceptor antagonist, BRL 48962, and its characterization at cloned human  $\alpha$ -adrenoceptors. *Bioorg Med Chem* 1995;3:1693–8.
- [131] Sallinen J, Høglund I, Engström M, Lehtimäki J, Virtanen R, Sirvio J, Wurster S, Savola J-M, Haapalinna A. Pharmacological characterization and CNS effects of a novel highly selective  $\alpha$ 2C-adrenoceptor antagonist JP-1302. *Br J Pharmacol* 2007;150:391–402. doi:10.1038/sj.bjp.0707005.
- [132] Trendelenburg AU, Wahl CA, Starke K. Antagonists that differentiate between  $\alpha$  2A-and  $\alpha$  2D-adrenoceptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1996;353:245–9.
- [133] Audinot V, Fabry N, Nicolas J-P, Beauverger P, Newman-Tancredi A, Millan MJ, Try A, Bornancin F, Canet E, Boutin J A. Ligand modulation of [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S binding at human  $\alpha(2A)$ ,  $\alpha(2B)$  and  $\alpha(2C)$  adrenoceptors. *Cell Signal* 2002;14:829–37.



- [134] Hudson AL, Gough R, Tyacke R, Lione L, Lallies M, Lewis J, Husbands S, Knight P, Murray F, Hutson P, Nutt D J. Novel selective compounds for the investigation of imidazoline receptors. *Ann N Y Acad Sci* 1999;881:81–91.
- [135] Saper JR, Winner PK, Lake AE 3rd. An open-label dose-titration study of the efficacy and tolerability of tizanidine hydrochloride tablets in the prophylaxis of chronic daily headache. *Headache* 2001;41:357–68.
- [136] Lehtimäki J, Leino T, Koivisto A, Viitamaa T, Lehtimäki T, Haapalinna A, Kuokkanen K, Virtanen R. In vitro and in vivo profiling of fadolmidine, a novel potent  $\alpha(2)$ -adrenoceptor agonist with local mode of action. *Eur J Pharmacol* 2008;599:65–71. doi:10.1016/j.ejphar.2008.10.003.
- [137] Nikolic K, Agbaba D. Pharmacophore development and SAR studies of imidazoline receptor ligands. *Mini Rev Med Chem* 2012;12:1542–55.
- [138] Nikolic Katarina, Filipic S, Agbaba D. QSAR study of imidazoline antihypertensive drugs. *Bioorg Med Chem* 2008;16:7134–40. doi:10.1016/j.bmc.2008.06.051.
- [139] Nikolic K, Veljkovic N, Gemovic B, Srdic-Rajic T, Agbaba D. Imidazoline-1 receptor ligands as apoptotic agents: pharmacophore modeling and virtual docking study. *Comb Chem High Throughput Screen* 2013;16:298–319.
- [140] Sączewski J, Hudson A, Scheinin M, Wasilewska A, Sączewski F, Rybczynska A, Ferdousi M, Laurila J M, Boblewski K, Lehmann, A, Watts H, Ma D. Transfer of SAR information from hypotensive indazole to indole derivatives acting at  $\alpha$ -adrenergic receptors: In vitro and in vivo studies. *Eur J Med Chem* 2016;115:406–15. doi:10.1016/j.ejmech.2016.03.026.
- [141] Timmermans PB, van Zwieten PA. Quantitative structure-activity relationships in centrally acting imidazolidines structurally related to clonidine. *J Med Chem* 1977;20:1636–44.
- [142] Raczak-Gutknecht J, Frąckowiak T, Nasal A, Kaliszan R. Mydriasis model in rats as a simple system to evaluate  $\alpha$ 2-Adrenergic activity of the imidazol(in)e compounds. *Pharmacol Reports* 2013;65:305–12.
- [143] Nasal A, Buciński A, Bober L, Kaliszan R. Prediction of pharmacological classification by means of chromatographic parameters processed by principal component analysis. *Int J Pharm* 1997;159:43–55. doi:10.1016/S0378-5173(97)00267-6.

## VIII. STRESZCZENIE

Związki imidazolinowe, pochodne klonidyny – znanego leku obniżającego ciśnienie tętnicze krwi podane dożylnie szczurom, powodują rozszerzenie źrenicy. Działanie to jest związane z pobudzaniem postsynaptycznych receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych w obrębie jądra Edingera-Westfala w mózgu. Eksperyment przeprowadzono wg zmodyfikowanej metody Kossa, polegającej na badaniu wpływu związków imidazolinowych na zmiany szerokości źrenicy u szczurów. Doświadczenia przeprowadzane były na całych zwierzętach *in vivo* podając zwierzętom dożylnie szeroki zakres skumulowanych dawek poszczególnych ligandów i porównując siłę działania mydriatycznego (wyrażoną jako efekt maksymalny,  $E_{max}$ ) oraz powinowactwo tych związków do ośrodkowych receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych (przedstawionych jako wartości dawek równoefektywnych,  $ED_{50}$ ). Do badań wybrano dziewiętnaście pochodnych imidazolin, które w badaniach radioizotopowych wykazywały się zróżnicowanym powinowactwem do receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych w mózgu. Seria badanych związków składała się z: klonidyny, rilmanidyny, moksonidyny, p-aminoklonidyny, brimonidyny, ST 91, gunfacyny, ksylazyny, RWJ 44408, oksymetazolin, brimonidyny, tizanidyny, guanabenzu, cirazolin, agmatyny, detomidyny, lofeksydyny, deksmedetomidyny, marsandyny i 7-metylomaryzonidyny - dwóch nowych imidazolin wykazujących w badaniach *in vitro* znaczne powinowactwo do receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych mózgu, o działaniu hipotensyjnym oraz bradykardię u szczurów. BU224 - analog imidazolin, określany jako selektywny ligand receptorów I2-imidazolinowych, zastosowano jako kontrolę negatywną.

Celem pracy było porównanie działania mydriatycznego grupy związków imidazolinowych. Druga część badania miała na celu potwierdzenie udziału receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych (z uwzględnieniem ich podtypów, zwłaszcza  $\alpha_2D$ ) w efekcie rozszerzania źrenicy u szczurów, wywoływanym przez badane ligandy. W tej części eksperymentu, efekt mydriatyczny związków był badany w obecności antagonistów receptora  $\alpha_2$ -adrenergicznego: johimbiny, BRL44408, ARC 239, JP-1302, RX 821002, a także selektywnego antagonisty receptora I1-imidazolinowego - AGN 192403. Potwierdzono w ten sposób brak udziału receptorów imidazolinowych w mechanizmie rozszerzania źrenicy. Kolejnym celem badania było znalezienie ilościowej zależności między strukturą chemiczną a aktywnością mydriatyczną w grupie imidazolin. Podczas

analizy QSAR brano pod uwagę związane z wartością ED50. Struktury związków zostały poddane modelowaniu molekularnemu.

Eksperymenty farmakologiczne potwierdziły zależną od dawki aktywność mydriatyczną ligandów receptora  $\alpha$ 2-adrenergicznego. Spośród dwudziestu badanych pochodnych, 18 wykazało zróżnicowane zależne od dawki rozszerzenie źrenicy. Zarówno agmatyna, jak i BU224 nie wywołały rozszerzenia źrenicy u szczurów. Eksperymenty z użyciem antagonistów wykazały, że za działanie mydriatyczne wywołane pochodnymi imidazoliny odpowiedzialny jest najprawdopodobniej podtyp  $\alpha$ 2D- receptora adrenergicznego.

W odniesieniu do pełnej serii 18 pochodnych imidazoliny, nie stwierdzono istotnej korelacji między ich wartościami ED50 a obliczonymi parametrami lipofilności (CLOGPHYP i CLOGPACD). Uzyskano natomiast istotną korelację między ED50 a log kw dla podgrupy ośmiu związków z tej grupy.

Powodem braku istotnej zależności QSAR może być złożony mechanizm interakcji receptora  $\alpha$ 2-adrenergicznego. Ze względu na specyficzny polarny charakter oddziaływań, mogą być one trudne do określenia ilościowego a pomocą znanych deskryptorów strukturalnych.

## IX. ABSTRACT

Imidazoline derivatives, having the chemical structure similar to well-known hypotensive drug - clonidine produce pupillary dilation after systemic application to the rats. This action is assumed to be connected with the stimulation of postsynaptic  $\alpha_2$ -adrenoceptors within the Edinger-Westphal nucleus in the brain. The eye pupil dilatory effects of the compounds were determined in anaesthetized male Wistar rats according to Koss method. Applying this model, experiments were carried out *in vivo* in the whole animal with testing a series of well-known and newly synthesized imidazoline agents in a wide range of doses, assessing comparatively the strength of mydriatic action (expressed as maximum effects,  $E_{max}$ ) and the affinity of these compounds towards central  $\alpha_2$ -adrenergic receptors (reflected by values of equieffective doses,  $ED_{50}$ ). Nineteen imidazolines were chosen showing in radioligand binding studies diverse affinity to brain  $\alpha_2$ -adrenoceptors. A series of the compounds tested was composed of: clonidine, rilmenidine, moxonidine, p-aminoclonidine, brimonidine, ST 91, guanabenz, xilazine, RWJ 44408, oxymetazoline, brimonidine, tizanidine, guanabenz, cirazoline, agmatine, detomidine, lofexidine, dexmedetomidine, marsanidine and 7-methylmarsanidine – two new imidazolines exerting marked *in vitro* affinity for brain  $\alpha_2$ -adrenergic receptors and producing hypotensive and bradycardic effects in anaesthetized rats were also included. BU224 – imidazoline analog classified as selective ligand for  $I_2$ -imidazoline receptors was applied as negative control.

The aim of this study was to comparatively determine the mydriatic effect in rats of a group of the imidazoline compounds. The second part of the study was to confirm the contribution of  $\alpha_2$ -adrenoceptors (and their subtypes, especially  $\alpha_{2D}$ ), in the effect evoked by the ligands tested. The animals were pretreated with the following  $\alpha_2$ -adrenoceptor antagonists: yohimbine, BRL44408, ARC 239, JP-1302, RX 821002 and also a selective  $I_1$ -imidazoline receptor antagonist – AGN 192403 to confirm that imidazoline receptors are not involved in mechanism of pupil dilation. The another aim of the study was to find quantitative relationship between the chemical structure and mydriatic activity in a group of imidazolines.

In QSAR analysis half maximum mydriatic effect ( $ED_{50}$ ) was considered. All structures were submitted to molecular modeling.

The pharmacological experiments, confirmed the dose-dependent mydriatic activity of  $\alpha_2$ -adrenoceptor ligands. Among twenty imidazol(in)e derivatives studied, 18 produced varied dose-dependent pupil dilatory effects. For both agmatine as well as BU224 no dilatory effect on the rats pupil was observed. The experiments with use of antagonists showed that mydriatic effect caused by imidazoline derivatives is mediated probably by  $\alpha_{2D}$ -adrenoceptor subtype.

For the full series of imidazol(in)e derivatives considered 18 compounds, no significant correlation was found between their  $ED_{50}$  values and the calculated lipophilicity parameters, ( $CLOGP_{HYP}$  and  $CLOGP_{ACD}$ ). A significant correlation between  $ED_{50}$  and  $\log k_w$  was obtained for a subgroup of eight imidazol(in)es.

The reason of lack of significant QSAR may be a complex mechanism of drug- $\alpha_2$ -adrenergic receptor interactions. Because of their predominantly specific polar nature it may be difficult to quantify with the known structural descriptors contrary to specific molecular bulkiness-related interactions.

## X. SPIS TABEL I RYCIN

Tabele:

Tab. 1. Parametry farmakologiczne badanych imidazolin.

Tab. 2. Wartości ED<sub>50</sub> badanych związków imidazolinowych w obecności i nieobecności antagonistów poszczególnych podtypów receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych wraz z wartościami pA<sub>2</sub> obliczonymi dla klonidyny, marsanidyny i 7-metylomarsanidyny, badanych w obecności johimbiny, BRL44408, ARC239, JP1302 oraz RX821002.

Tab. 3. Parametry strukturalne związków imidazolinowych.

Rysunki:

Rys. 1. Klasyfikacja receptorów adrenergicznych

Rys. 2. Budowa receptorów metabotropowych, sprzężonych z białkiem G

Rys. 3. Mechanizm działania receptorów  $\alpha_2$ -adrenergicznych.

Rys. 4. Budowa oka.

Rys. 5. Schemat reakcji mydriatycznej oka szczura.

Rys. 6. Jadro Edingera-Westphala. A – u szczura, B – u człowieka. Lokalizacja i zróżnicowanie komórek w obrębie jądra Edingera-Westphala. Objasnienia symboli: EWcp- ośrodkowe populacje komórek, EWpg- przedzwojowe populacje komórek.

Rys. 7. Krzywe zależności dawka-efekt mydriatyczny dla cirazoliny, guanabenzu i guanfacyny.

Rys. 8. Krzywe zależności dawka-efekt mydriatyczny dla deksmedetomidyny, tizandyny i p-aminoklonidyny.

Rys. 9. Krzywe zależności dawka-efekt mydriatyczny dla detomidyny, oksymetazoliny i brimonidyny.

Rys. 10. Krzywe zależności dawka-efekt mydriatyczny dla ST-91 i RWJ 52353.

Rys. 11. Krzywe zależności dawka-efekt mydriatyczny dla lofeksydyny i ksylazyny.

Rys.12. Krzywe zależności dawka-efekt dla klonidyny oraz dla klonidyny w obecności johimbiny.

Rys. 13. Krzywe zależności dawka-efekt mydriatyczny dla rilmenidyny oraz dla rilmenidyny w obecności johimbiny.

- Rys. 14. Krzywe zależności dawka-efekt mydriatyczny dla moksonidyny oraz dla moksonidyny w obecności johimbiny.
- Rys. 15. Krzywe zależności dawka-efekt mydriatyczny dla marsanidyny oraz dla marsanidyny w obecności johimbiny.
- Rys. 16. Krzywe zależności dawka-efekt mydriatyczny dla 7-metylomarsanidyny oraz dla 7-metylomarsanidyny w obecności johimbiny.
- Rys. 17. Odpowiedź źrenicy oka szczura na serię objętości 0,9 % roztworu NaCl.
- Rys. 18. Krzywe zależności dawka-efekt mydriatyczny dla klonidyny oraz dla klonidyny w obecności AGN192403.
- Rys. 19. Wpływ 0,9% roztworu NaCl i AGN192403 na średnicę źrenicy oka szczura.
- Rys. 20. Krzywa zależności dawka-efekt dla klonidyny w obecności antagonistów receptora  $\alpha_2$ -adrenergicznego oraz jego podtypów.
- Rys. 21. Krzywa zależności dawka-efekt dla marsanidyny w obecności antagonistów receptora  $\alpha_2$ -adrenergicznego oraz jego podtypów.
- Rys. 22. Krzywa zależności dawka-efekt dla 7-metylomarsanidyny w obecności antagonistów receptora  $\alpha_2$ -adrenergicznego oraz jego podtypów.
- Rys. 23. Zmiany średnicy źrenicy szczura po podaniu skumulowanych dawek marsanidyny.
- Rys. 24. Chromatogram mieszaniny badanych pochodnych imidazoliny. Rozdzielenie przeprowadzono na kolumnie *X Bridge* C18 (wymiary: 3 mm x 50 mm, o wielkości ziaren 2.5  $\mu$ m) z zastosowaniem gradientowej RP-HPLC-ESI-TOF-MS ( $t_G = 90$  min).
- Rys. 25. Przykładowe widmo mas otrzymane w wyniku oznaczania mieszaniny analitów z zastosowaniem techniki RP-HPLC-ESI-TOF-MS w trybie przemiatań (ang. *scan*).
- Rys. 26. Przykładowe chromatogramy otrzymane za pomocą oznaczeń RP-HPLC-ESI-TOF-MS z wykorzystaniem 3 różnych metod gradientowych: A-36 min, B-96 min, C-276 min.

## **XI. CURRICULUM VITAE**





## XII. LISTA PUBLIKACJI

1. J. Raczak-Gutknecht, T. Frąckowiak, A. Nasal, J. Rietz, M. Paszek, M. Buszewska-Forajta, R. Kaliszan: „Effect of the reference imidazoline drugs, clonidine and rilmenidine, on rat eye pupil size confirms the decisive role of  $\alpha_2$ -adrenoceptors on mydriasis”, *Int. J. Pharmacol.* 2014; vol. 10, nr 8, s. 470-478, **wskaźnik Impact Factor: 0.709**
2. J. Raczak-Gutknecht, T. Frąckowiak, A. Nasal, R. Kaliszan: „Mydriasis model in rats as a simple system to evaluate  $\alpha_2$ -adrenergic activity of the imidazol(in)e compounds”, *Pharmacol. Rep.* 2013; vol. 65, nr 2, s. 305-312, **wskaźnik Impact Factor: 2.165**
3. J. Raczak-Gutknecht, A. Nasal, T. Frąckowiak, A. Kornicka, F. Sączewski, R. Wawrzyniak, Ł. Kubik, R. Kaliszan: “Comparative pharmacodynamic analysis of imidazoline compounds using rat model of ocular mydriasis with a test of quantitative structure-activity relationships”, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2017, praca przyjęta do druku 26. 03. 2017, DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.jpba.2017.03.053>, **wskaźnik Impact Factor: 3.169**
4. J. Raczak-Gutknecht, T. Frąckowiak, A. Nasal, A. Kornicka, F. Sączewski, R. Kaliszan: „Are alpha-2D adrenoceptor subtypes involved in rat mydriasis evoked by new imidazoline derivatives: marsanidine and 7-methylmarsanidine?”, *Dose Response*, 2017, praca przyjęta do druku 01. 03. 2017, DOI: 10.1177/1559325817701213 **wskaźnik Impact Factor 1.855**
5. R. Bujak, R. Gadzała-Kopciuch, A. Nowaczyk, J. Raczak-Gutknecht, M. Kordalewska, W. Struck-Lewicka, M. Waszczuk - Jankowska, E. Tomczak, M. Kaliszan, B. Buszewski, M. J. Markuszewski: „New sorbent materials for selective extraction of cocaine and benzoylecgonine from human urine samples”, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2016; vol. 120, s. 397-401, **wskaźnik Impact Factor: 3.169**
6. R. Bujak, R. Gadzała-Kopciuch, A. Nowaczyk, J. Raczak-Gutknecht, M. Kordalewska, W. Struck-Lewicka, M. J. Markuszewski, B. Buszewski: „Selective determination of cocaine and its metabolite benzoylecgonine in environmental samples by newly developed sorbent materials”, *Talanta* 2016; vol. 146, s. 401-409, **wskaźnik Impact Factor: 4.035**
7. M. Buszewska-Forajta, D. Siluk, W. Struck-Lewicka, J. Raczak-Gutknecht, M. J. Markuszewski, R. Kaliszan: „Identification of lipid fraction constituents from grasshopper (*Chorthippus* spp.) abdominal secretion with potential activity in wound healing with the use of GC-MS/MS technique”, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2014; vol. 89, s. 56-66, **wskaźnik Impact Factor: 2.979**
8. P. Gutknecht, B. G. Trzeciak, M. Pietrzykowska, M. Reiwer-Gostomska, A. Molisz, J. Raczak-Gutknecht, K. Nowicka-Sauer, J. Siebert: “Wiedza pacjentów na temat choroby refluksowej przełyku”, *Forum Med. Rodz.* 2015; t. 9, nr 3, s. 291-293

9. P. Gutknecht, T. Winiarski, B. G. Trzeciak, K. Nowicka-Sauer, M. Pietrzykowska, M. Reiwer-Gostomska, A. Molisz, J. Raczak-Gutknecht, J. Siebert: “Zakażenia dróg oddechowych w praktyce lekarza rodzinnego : zgłaszane objawy, stosowane leczenie : obserwacja dwuletnia”, *Fam. Med. Prim. Care Rev.* 2014; t. 16, nr 3, s. 228-230
10. L. Daniłowicz-Szymanowicz, G Raczak, W. Ratkowski, M. Figura-Chmielewska, K. Ambroch-Dorniak, M. Szwoch, M. Kobuszewska-Chwirot, J. Raczak, J. Kubica, G. Świątecka: “Przydatność próby Valsalwy w monitorowaniu wpływu wysiłku fizycznego na czynność autonomicznego układu nerwowego u zdrowych młodych osób”, *Med. Sport.* 2004; vol. 20, nr 2, s. 67-72