Uniwersytet Jagielloński Wydział Farmaceutyczny
Katedra Farmakodynamiki

Pracownia Wstępnych Badań Farmakologicznych

ROZPRAWA DOKTORSKA

Małgorzata Zygmunt

Powinowactwo do receptorów adrenergicznych a aktywność farmakologiczna 7,8-dipodstawionych analogów teofiliny

Promotor:
Prof. dr hab. BARBARA FILIPEK

Kraków 2005

SPIS TREŚCI

I. WSTĘP. 4
II. CEL PRACY. 21
III WZORY BADANYCH ZWIĄZKÓW. 23
IV. METODYKA. 29

1. Materiały. 29

1.1 Badane związki. 29
1.2 Związki odniesienia. 29
1.3 Stosowane leki i odczynniki. 29
1.4 Zwierzęta. 30
1.5 Aparatura. 30
1.6 Obliczenia statystyczne. 31

2. Badania skriningowe nowych pochodnych metyloksantyn. 32
2.1 Oznaczenie powinowactwa do receptorów α_1 -, α_2 -, β_1 - adrenergicznych w korze mózgowej szczura 32
2.2 Oznaczenie toksyczności ostrej wg Litchfielda i Wilcoxona. 34
2.3 Oznaczenie profilaktycznej aktywności przeciwarytmicznej. 34
2.3.1. Model arytmii adrenalinowej wg Szekeresa **34**
2.3.2. Model arytmii barowej wg Szekeresa. **35**
2.4 Oznaczenie wpływu na ciśnienie tętnicze krwi u normotensyjnego szczura. 35
2.5 Oznaczenie wpływu na prawidłowy elektrokardiogram szczura „*in vivo*" 35
2.6 Oznaczenie wpływu na elektrokardiogram, częstotliwość i wypływ wieńcowy izolowanego serca szczura wg Langendorff'a. 36

3. Badania poszerzone dla wyselekcjonowanych związków. 37

3.1 Oznaczenie profilaktycznej aktywności przeciwarytmicznej w modelu arytmii adrenalinowej popodaniu dożołądkowym wg Szekeresa. 37
3.2 Oznaczenie aktywności hipotensyjnej badanych związków po podaniu dożołądkowym 37
3.3 Oznaczenie wpływu badanych związków na presyjne działanie adrenaliny, noradrenaliny, metoksaminy, tyraminy i DMPP. 37
3.4 Oznaczenie aktywności przeciwarytmicznej w niemiarowości wywołanej okluzją i reperfuzją naczynia wieńcowego *„in vitro" wg* Lubbe. 38
3.5 Oznaczenie wpływu na mięśniówkę gładką izolowanego jelita cienkiego królika wg Magnusa. 38

3.6 Wpływ na ośrodkowy układ nerwowy. 39

3.6.1. Wpływ na ruchliwość spontaniczną.....**39**
3.6.2. Wpływ na czas trwania snu tiopentalowego.....**39**

3.7 Oznaczenie działania diuretycznego.....39

V. WYNIKI.....40

1. Badania skriningowe nowych pochodnych metyloksantyn 40
1.1 Powinowactwo do receptorów α_1-, α_2-, β_1 - adrenergicznych w korze mózgowej szczura. 40
1.2 Toksyczność ostra.....42
1.3 Profilaktyczna aktywność przeciwarytmiczna.....43
1.3.1. Model arytmii adrenalinowej.....**43**
1.3.2. Model arytmii barowej **50**
1.4 Aktywność hipotensyjna u normotensyjnego szczura.....55
1.5 Wpływ na prawidłowy elektrokardiogram szczura „*in vivo*”..... 60
1.6 Wpływ na pracę wyosobnionego serca szczura. 65

2. Badania poszerzone dla wyselekcjonowanych związków. 82

2.1 Profilaktyczna aktywność przeciwarytmiczna w modelu arytmii adrenalinowej po podaniu dożołądkowym.....82
2.2 Aktywność hipotensyjna u normotensyjnego szczura po podaniu dożołądkowym.....90
2.3 Wpływ na presyjne działanie adrenaliny, noradrenaliny, metoksaminy, tyraminy i DMPP.....93
2.4 Aktywność przeciwarytmiczna w arytmii wywołanej okluzją i reperfuzją naczynia wieńcowego *„in vitro”*..... 98
2.5 Wpływ na mięśniówkę gładką jelita cienkiego królika. 105
2.6 Wpływ na ośrodkowy układ nerwowy.....107
2.6.1. Wpływ na ruchliwość spontaniczną.....**107**
2.6.1. Wpływ na czas trwania snu tiopentalowego **109**
2.7 Działanie diuretyczne… 111

VI. DYSKUSJA. 112

VII. WNIOSKI.....125

VIII. STRESZCZENIE.....128

IX. PIŚMIENNICTWO. 130

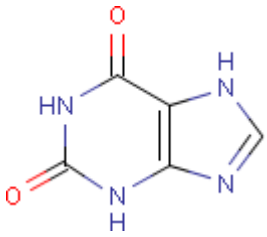
I. WSTĘP

Metyloksantyny są alkaloidami purynowymi, które wyodrębniono między innymi z nasion kawy (*Coffea arabica*), z liści herbaty (*Camelia sinesis*) oraz z nasion drzewa kakaowego (*Theobroma cacao*). Spośród naturalnie występujących metyloksantyn trzy, tj. kofeina, teofilina oraz teobromina, są od wielu lat stosowane jako leki.

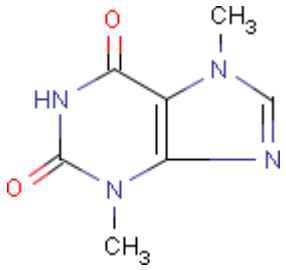
Kofeina - 1,3,7- trimetyloksantyna - jest głównym alkaloidem nasion krzewu kawowego *Coffea arabica*. Wykazuje działanie pobudzające ośrodkowy układ nerwowy, zwłaszcza korę mózgową. Ułatwia koncentrację, wzmacnia pamięć, podnosi sprawność myślową, pobudza ośrodek oddechowy i naczynioruchowy, stymuluje pracę serca, działa moczopędnie. Jest stosowana jako środek zwiększający aktywność psychiczną, pobudzający ośrodek oddechowy i naczynioruchowy oraz jako dodatek do środków uśmierzających ból głowy [67, 89].

- **Teobromina** - 3,7-dimetyloksantyna jest głównym alkaloidem nasion kakaowca *Theobroma cacao*. Teobromina praktycznie pozbawiona jest działania na OUN, natomiast wykazuje efekt diuretyczny i spazmolityczny [67, 89].

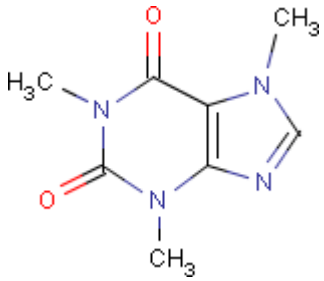
- **Teofilina** - 1,3- dimetyloksantyna - występuje w niewielkich ilościach w liściach herbaty chińskiej *Camelia sinesis*. Rozkurcza mięśnie gładkie, głównie oskrzeli, wpływa stymulująco na czynność układu sercowo-naczyniowego, zwiększa diurezę. Ze względu na silne dzialanie spazmolityczne oraz aktywność przeciwzapalną znalazła zastosowanie w leczeniu: astmy oskrzelowej, przewlekłej obturacyjnej choroby płuc (POChP), oddechu Cheyne-Stokesa, bezdechu noworodkowego oraz rozedmy płuc [22, 63, 76, 89, 92].



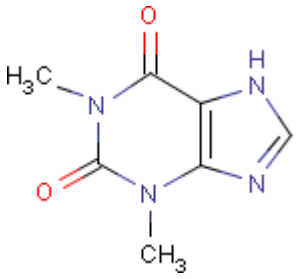
Ksantyna



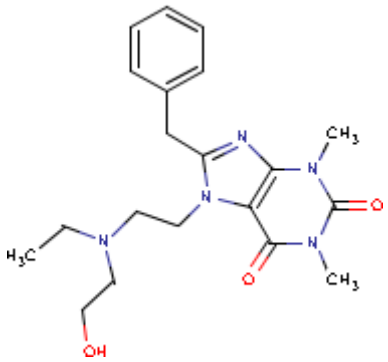
Teobromina



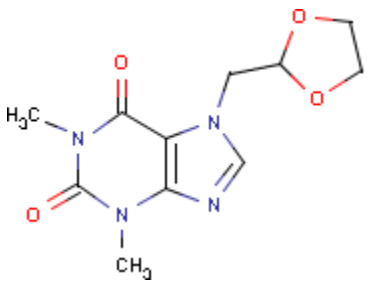
Kofeina



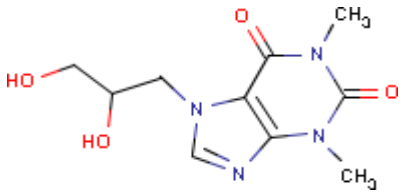
Teofilina



Bamifilina



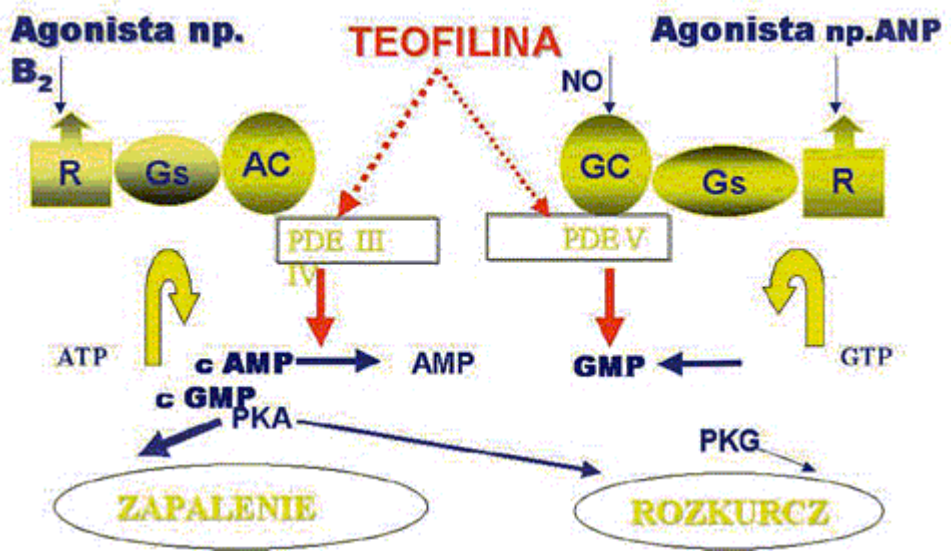
Doksofilina



Diprofilina

Ryc. 1. Wzory naturalnych metyloksantyn i ich pochodnych

Wielokierunkowość ich działania farmakologicznego (działanie pobudzające ośrodkowy i obwodowy układ nerwowy, stymulujące czynność układu sercowo-naczyniowego, spazmolityczne na mięśnie gładkie, diuretyczne), przy równocześnie niskiej toksyczności, sprawia że, zainteresowanie grupą metyloksantyn, w tym również teofiliną nie ustaje. Intensywnie prowadzone są badania mające na celu wyjaśnienie ich mechanizmu działania na poziomie komórkowym [23, 28, 29].



Ryc. 2 Mechanizm działania teofiliny [wg. 21]

Jednym z podstawowych, najwcześniej i najlepiej poznanych mechanizmów działania metyloksantyn, w tym teofiliny, jest nieselektywne hamowanie aktywności fosfodiesterazy (PDE), [23, 29, 90]. W świetle najnowszych badań wydaje się, że zahamowanie fosfodiesterazy, enzymu rozkładającego cykliczne nukleotydy do form nieaktywnych leży u podstaw zarówno rozkurczowego jak i przeciwzapalnego działania teofiliny. Zahamowanie aktywności fosfodiesterazy prowadzi do wzrostu c-AMP i c-GMP w różnych komórkach. Cykliczne nukleotydy pobudzają kinazy białkowe, które

katalizują proces fosforylacji różnych białek komórkowych, w ten sposób regulując ich funkcję [4, 34].

Cykliczne nukleotydy c-AMP i c-GMP odgrywają istotną rolę w regulacji napięcia mięśni gładkich oskrzeli i aktywacji komórek biorących udział w procesach zapalnych. Fizjologiczne stężenie c-AMP i c-GMP jest regulowane przez aktywność izoenzymów PDE oraz substancji pobudzających receptory, zlokalizowane na powierzchni komórki [29, 30].

Zahamowanie PDE przez jej inhibitora - teofilinę prowadzi do wzrostu stężenia cyklicznych nukleotydów i obniżenia wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia oraz obniżenia zdolności przyłączania wapnia do lekkich łańcuchów miozyny, co w konsekwencji prowadzi do relaksacji komórki. W następstwie wzrostu c-AMP dochodzi do otwarcia aktywowanych jonami wapnia kanałów potasowych, co prowadzi do wychodzenia z komórki jonów potasu, hiperpolaryzacji komórki i rozkurczu [23, 96]. Można przypuszczać, że teofilina silniej hamuje PDE u chorych, u których występuje inna ekspresja tego enzymu niż u osób zdrowych. Taką koncepcję potwierdzają badania, w których obserwowano, iż teofilina rozkurcza mięśnie gładkie dróg oddechowych chorych na astmę, a nie rozkurcza mięśni oskrzeli osób zdrowych [23]. Teofilina poprzez wewnątrzkomórkowe podwyższenie cAMP, hamuje proliferację fibroblastów, w związku z tym może być stosowana w schorzeniach hyperproliferacyjnych [71].

Intensywne badania naukowe doprowadziły w ostatnich latach do stwierdzenia, że PDE składa się z szeregu izoenzymów, różniących się między sobą przede wszystkim rozmieszczeniem w poszczególnych tkankach, powinowactwem wobec selektywnych substancji hamujących oraz rodzajem substratów [4].

Dotychczas na podstawie ich reakcji na różne swoiste dla każdego z nich inhibitory zidentyfikowano 11 klas izoenzymów: PDE-I do PDE-XI.

Dziś już wiadomo, że PDE-III odgrywa najważniejszą rolę w rozkurczu mięśni gładkich, natomiast PDE-IV w uwalnianiu mediatorów zapalnych z komórek takich jak mastocyty, eozynofile czy limfocyty T [5, 20]. Ekspresja poszczególnych izoenzymów u chorych może być różna. W monocytach chorych z atopią aktywność PDE-IV jest wyraźnie większa, niż u osób nieatopowych. PDE-IV występuje również w postaci kilku podtypów, które różnią się dystrybucją w poszczególnych komórkach i tkankach. PDE-IVA występuje we wszystkich narządach, PDE-IVB w płucach, sercu, mózgu i

mięśniach, natomiast PDE-IVC w tkance nerwowej, jak również w komórkach zapalnych [20].

PDE-IV wydaje się być enzymem dominującym w regulacji c-AMP w komórkach nabłonka dróg oddechowych i odgrywa ważną rolę w modulowaniu aktywności komórek biorących udział w procesie zapalnym (bazofile, komórki tuczne, monocyty, limfocyty, komórki mięśni gładkich), zarówno w przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc, jak i w astmie [34]. Obecnie poszukuje się selektywnych inhibitorów PDE-IV, które hamują: skurcz oskrzeli wywołany antygenami, nadreaktywność dróg oddechowych, uwalnianie cytokin (IL-2, IL-4, IL-5) odpowiedzialnych za dojrzewanie limfocytów, TNF-α, przenikanie eozynofili, zmniejszają migrację granulocytów kwasochłonnych i obojętnochłonnych, hamują ich degranulację w odpowiedzi na antygen lub histaminę oraz hamują uwalnianie ECP (eozynofilowe białko kationowe), EDN (neurotoksyna eozynofilowa) [4]. Pierwsza generacja inhibitorów PDE-IV (rolipram, dislipram, tibenelast,) dawała szereg działań ubocznych jak nudności, wymioty, hipersekrecję gastryczną. Przy silnym działaniu rozkurczowym i przeciwzapalnym, objawy ze strony przewodu pokarmowego uniemożliwiły wprowadzenie tych preparatów do leczenia. Izoenzym PDE-IV występuje w dwóch konformacjach HPDE-IV i LPDE-IV [21]. HPDE-IV dominuje w oun i jest odpowiedzialna za objawy niepożądane ze strony układu pokarmowego, układu krążenia oraz ośrodkowego układu nerwowego. LPDE-IV występuje w komórkach immunokompetentnych i jest związana z działaniem kurczącym oskrzela i zapaleniem [20, 42]. Obecnie poszukuje się inhibitorów skierowanych głównie na LPDE-IV, co zmniejsza działania niepożądane charakteryzujące inne inhibitory tych enzymów i zwiększa efekt kliniczny. Lekami o zmniejszonym powinowactwie do HPDE-IV są selektywne inhibitory PDE-IV drugiej generacji: cilomilast i roflumilast (w III fazie badań klinicznych). Cilomilast wykazuje mniejsze powinowactwo do HPDE-IV, natomiast zachowuje do LPDE-IV. Roflumilast jest inhibitorem PDE-IV działającym prawdopodobnie wybiórczo na komórki zapalne [105].

Leki te mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu astmy i POChP. Roflumilast może być kojarzony z innymi lekami np. teofiliną.

Selektywne inhibitory PDE w przyszłości mogą przynosić również znaczące korzyści w leczeniu raka, chorób serca, depresji, jako czynniki immunomodulujące, w

leczeniu chorób autoimmunologicznych reumatoidalnego zapalenia stawów, stwardnienia rozsianego oraz cukrzycy typu II [43, 91, 105].

Inny mechanizm działania teofiliny polega na nieselektywnym, kompetycyjnym blokowaniu receptorów adenozynowych A_1, A_2 i A_3. Adenozyna jest nukleotydem występującym w wielu komórkach, uwalnianym w sytuacjach związanych z pobudzeniem układu sympatycznego np.: stresem, hipoksją, jej poziom wzrasta również u chorych na astmę po prowokacji alergenowej [51, 97]. Jest jedną z fizjologicznych substancji kurczących oskrzela [97]. Uwolniona adenozyna jest rozkładana do nieczynnych metabolitów, takich jak: inozyna, hipoksantyna czy kwas moczowy [57, 97].

W badaniach prowadzonych zarówno *in vitro,* jak i na zdrowych ochotnikach wykazano, że adenozyna nie wywiera istotnego wpływu na napięcie mięśni gładkich oskrzeli. Podana natomiast wziewnie osobom z astmą oskrzelową powoduje wystąpienie duszności. W badaniach *in vitro* obserwowano również, istotny wpływ adenozyny na kurczliwość mięśni gładkich jedynie w oskrzelach astmatyków [7, 23, 29]. Ten adenozynopodobny skurcz oskrzeli to mechanizm pośredni, indukowany w części za pośrednictwem komórki tucznej i uwalnianych przez nią: histaminy oraz metabolitów kwasu arachidonowego (przede wszystkim leukotrienów). Efekty oddziaływania tych związków na tkankę płucną są znoszone zarówno przez jej antagonistów, w tym teofilinę jak i kromoglikany a także leki blokujące receptory histaminowe H_1 [29, 51].

Działanie adenozyny na mięśnie gładkie oskrzeli jest z pewnością procesem bardziej złożonym niż tylko uwalnianiem mediatorów z komórki tucznej. Indukowany przez nią skurcz oskrzeli rozwija się po około 1 do 3 minutach, znacznie szybciej niż po prowokacji swoistym alergenem i nie zawsze towarzyszy mu oznaczalny wzrost stężenia histaminy we krwi obwodowej [23, 29].

Teofilina zapobiega poadenozynowemu skurczowi oskrzeli, co potwierdza fakt, że w stężeniach terapeutycznych jest silnym antagonistą receptorów adenozynowych w komórce mięśniowej, niemniej nie jest to dowód, że ten mechanizm leży u podstaw jej rozkurczowego działania [23, 45]. Należy się więc spodziewać, że antagonizm wobec receptorów adenozynowych jest jednym z ważniejszych mechanizmów działania teofiliny na komórki biorące udział w reakcjach odpornościowych i zapalnych, natomiast jego udział w bronchodylatacji, podobnie jak rola adenozyny w indukowaniu skurczu

oskrzeli, pozostaje dyskusyjny [28]. Ostatnio wykazano, iż teofilina poprzez blokowanie receptorów adenozynowych, osłabia ból występujący podczas niedokrwienia [100].

Istnieją pewne przesłanki, że teofilina może wpływać na gromadzenie się wapnia w mięśniach gładkich dróg oddechowych [23, 46, 90, 92]. Wewnątrzkomórkowe stężenie jonów wapnia jest regulowane natężeniem ich przepływu przez kanały błonowe, uwalnianiem jonów z wewnętrznych magazynów komórki oraz przez dynamikę cyklu przemian fosfatydyloinozytolu (IP_3), [28].

Wprawdzie teofilina pozostaje bez wpływu na przechodzenie jonów wapnia przez kanały potencjałozależne (voltagedependent), ale wydaje się, że ma ona wpływ na wejście wapnia do komórki przez kanały receptorowozależne (receptor operated). Teofilina prawdopodobnie wpływa na przemiany fosfatydyloinozytolu, który odpowiada za uwalnianie wapnia z wewnątrzkomórkowych zapasów poprzez pobudzanie receptorów błonowych. Teofilina hamuje mediowanie IP_3, uwalnianie wapnia z zapasów oraz wchodzenie wapnia z przestrzeni pozakomórkowej [23].

Doniesienia literaturowe wskazują również, iż metyloksantyny mają wpływ na neurony serotoninergiczne. Kofeina , teofilina, teobromina oraz pentoksyfilina, w części presynaptycznej neuronu ułatwiają syntezę i uwalnianie serotoniny, a pentoksyfilina hamuje ponadto jej wychwyt zwrotny. Wyniki badań behawioralnych na zwierzętach wykazały ponadto, że kofeina wpływa pobudzająco na część postsynaptyczną neuronu serotoninergicznego. Działania tego nie obserwowano w przypadku teofiliny i pentoksyfiliny [65]. Rozważa się również bezpośrednie działanie przeciwzapalne teofiliny [21, 28].

Efekty farmakologiczne metyloksantyn mogą być wynikiem jednego z przedstawionych mechanizmów działania lub ich wypadkową. Jedną z najczęściej stosowanych w lecznictwie metyloksantyn jest teofilina.

Teofilina podana doustnie dobrze i szybko wchłania się z przewodu pokarmowego. Maksymalne stężenie w surowicy po podaniu doustnym występuje po 1-2 h, a w postaci o przedłużonym działaniu po 4 -12 h [92]. Teofilina wiąże się z białkiem osocza w 53 - 65%, a u noworodków lub dorosłych z chorobami wątroby wiązanie jest zmniejszone do ok. 40 %. Jest metabolizowana wątrobie do kwasów 1,3-dimetylomoczowego i 1-metylomoczowego oraz 3-metyloksantyny [92]. Okres półtrwania u dorosłych niepalących wynosi 7-9 godz., u palących 4 -5 h, u chorych z

niewydolnością wątroby > 24 h, u dzieci > 1 roku 3-5 godz., u wcześniaków powyżej 24 h [92]. Jest wydalana z moczem głównie w postaci metabolitów.

Na szybkość wydalania teofiliny mają wpływ takie czynniki jak: wiek, dieta, leki, używki oraz choroby. Przyspieszenie wydalania teofiliny powodują:

- dieta wysokobiałkowa
- młody wiek (1-16 lat)
- aktywacja enzymów mikrosomalnych wątrobowy przez:
  - barbiturany, rifampicynę, alkohol
  - inne leki jak np.: fenytoina, karbamazepina

Natomiast zwolnienie wydalania teofiliny obserwuje się u:

- ✓ noworodków i wcześniaków
- ✓ ludzi powyżej 60 roku życia
- ✓ osób otyłych
- ✓ przy diecie wysoko-węglowodanowej [8, 20].

Teofilina znalazła zastosowanie głównie w leczeniu astmy oskrzelowej i innych chorób układu oddechowego, przebiegających z obturacją dróg oddechowych. Wykazano, że dodanie małej dawki teofiliny do kortykosteroidów w astmie łagodnej i umiarkowanej lepiej kontroluje przebieg choroby i pozwala na ograniczenie dawki stosowanych kortykosteroidów, co w kontekście wieloletniego leczenia astmy oskrzelowej ma ważne znaczenie, opóźnia bowiem czas wystąpienia objawów niepożądanych przewlekłej sterydoterapii [41, 44].

Przewlekła obturacyjna choroba płuc, obok astmy należy do najczęściej występujących chorób układu oddechowego. Obie choroby charakteryzuje ograniczenie drożności dróg oddechowych. Główną przyczyną obturacji stwierdzanej u chorych na astmę, są zmiany w dużych oskrzelach, u chorych na POChP, zmiany w oskrzelach drobnych i w tkance płuc. Wspólną cechą obu chorób jest ograniczenie przepływu powietrza przez drogi oddechowe [111]. Wprawdzie obturacja dróg oddechowych w obu chorobach jest wynikiem postępującego procesu zapalnego i wiąże się z napływem komórek zapalnych, to jednak rodzaj komórek i profil uwalnianych przez nie cytokin w astmie i POChP są różne [16]. W patogenezie astmy podstawowe znaczenie ma

aktywacja komórek tucznych, eozynofilów, limfocytów CD4+ i uwalnianych przez nie cytokin. Natomiast w POChP najistotniejszą rolę odgrywa aktywacja granulocytów obojętnochłonnych i makrofagów. Uwalniane przez nie enzymy proteolityczne np. elastaza są prawdopodobnie przyczyną degradacji ścian pęcherzyków płucnych, która prowadzi do powstania rozedmy płuc [20]. Teofilina znalazła zastosowanie zwłaszcza w okresie przewlekłej hipoksji i hipowentylacji, które prowadzą do powstania nadciśnienia płucnego. U chorych na POChP, podobnie jak u chorych na astmę, obserwowano zmniejszenie po teofiline dobowej zmienności FEV_1, zwłaszcza w nocy. Stosowanie teofiliny u chorych na POChP może spowodować poprawę objawów klinicznych, bez jakichkolwiek zmian w parametrach spirometrycznych. Jest to możliwe dzięki zmniejszeniu rozdęcia płuc i zmniejszeniu objętości zalegającej. Teofilina powoduje wzrost ciśnienia parcjalnego tlenu (pO_2), obniżenie ciśnienia parcjalnego dwutlenku węgla (pCO_2) i wzrost utlenowania krwi tętniczej (SiO_2), zwłaszcza u chorych z zaawansowanymi zmianami obturacyjnymi. U chorych na POChP niezwykle istotne jest zwiększenie napędu oddechowego jak również poprawa pracy mięśni oddechowych [20].

Choć teofilina obniża ciśnienie parcjalne tlenu w tkance mózgowej, nawet w dużych, niefizjologicznych dawkach nie wpływa na napęd oddechowy w odpowiedzi na hipoksję i hiperkapnię, nie zmienia odpowiedzi chemoreceptorów na ciśnienie parcjalne tlenu, co ma duże znaczenie zwłaszcza u chorych na POChP z całkowitą niewydolnością oddechową. Przyspieszenie liczby oddechów, korzystne u chorych na POChP, może być czasami zjawiskiem niepożądanym, zwłaszcza w napadzie astmy [20, 21].

Wykazano także korzystne działanie teofiliny u chorych z zespołem bezdechów sennych. Po miesiącu stosowania jej w dawce 800 mg/dobę obserwowano zmniejszenie liczby bezdechów nocnych. Może być również zastosowana u chorych z zaburzeniami oddechu typu Cheyne-Stokesa [20, 22].

Przez wiele lat teofilinie przypisywano tylko działanie rozkurczające mięśnie gładkie dróg oddechowych, przewodu pokarmowego i naczyń krwionośnych. Dopiero w latach 80 zwrócono uwagę na przeciwzapalne i immunomodulujące działanie teofiliny. Dziś już wiadomo, że efekt ten występuje już przy stosunkowo niskich dawkach teofiliny we krwi (10 μg/ml), przy których nie zawsze zaznacza się wyraźne działanie rozkurczowe [20].

Teofilina reguluje aktywność wielu typów komórek ważnych z punktu widzenia patogenezy astmy i innych chorób obturacyjnych, komórek układu immunologicznego oraz komórek biorących udział w procesie zapalnym [20]. Teofilina *in vitro* działa na wszystkie komórki biorące udział w procesie zapalnym: mastocyty, eozynofile, makrofagi, neutrofile, limfocyty, komórki śródbłonka [20]. Wykazano, że w warunkach *in vitro*, teofilina hamuje uwalnianie wolnych rodników tlenowych z monocytów, makrofagów i eozynofilów oraz hamuje wydzielanie leukotrienu (LTB4), [2, 41, 56, 106, 109]. Teofilina hamuje słabo wczesną fazę reakcji alergicznej, która jest odpowiedzią na działanie takich mediatorów, jak histamina, leukotrien D_4, prostaglandyna D_2, uwalnianych z komórek tucznych wkrótce po kontakcie z alergenem [68, 101]. Teofilina wpływa na różnicowanie się limfocytów Th (T pomocniczych) w większym stopniu w kierunku Th_1, które są odpowiedzialne za produkcję interferonu-γ (IFN–γ) oraz zmniejsza liczbę Th_2 odpowiedzialnych za produkcję cytokin prozapalnych [20, 28]. Ponadto znacząco nasila aktywność procesów apoptozy czyli spontanicznej śmierci limfocytów. Hamuje chemotaksję limfocytów T stymulowanych IL-2, IL-8, czynnikiem aktywującym płytki (PAF) oraz leukotrienem B_4, a także migrację tych komórek przez obniżenie ekspresji cząsteczek przylegania antygenu związanego z czynnością limfocytów 1 (LFA-1) i osłabienie adherencji [28]. Te efekty działania leku, mogą tłumaczyć obserwowane w trakcie leczenia teofiliną obniżenie ilości limfocytów T w śluzówce oskrzeli u chorych na astmę, co w efekcie prowadzi do wygaszenia dynamiki procesu immunologicznego i zapalnego w oskrzelach [28].

Teofilina podana doustnie w małych dawkach, zmniejsza poziom krążących we krwi prozapalnych cytokin: interleukiny-4 (IL-4), oraz IL-5 u chorych z łagodną postacią atopowej astmy [20, 28]. Stymuluje natomiast syntezę IL-10, cytokiny o udowodnionym działaniu przeciwzapalnym, której produkcja w astmie oskrzelowej jest znacznie obniżona. Zahamowanie IL-4, regulujacej syntezę IgE, powoduje zmniejszenie produkcji IgE oraz prowadzi do hamowania proliferacji Th_2 jak również obniżenia ekspresji cząsteczek adhezyjnych komórek naczyń śródbłonka 1 (VCAM-1) na powierzchni komórek zapalnych. Obniżenie natomiast poziomu IL-5, pośredniczącej w rekrutacji i infiltracji eozynofilów, zmniejsza uwalnianie mediatorów zapalnych z eozynofilów takich jak : ECP, eozynofilowa endopeptydaza (EDP), EDN oraz rodniki tlenowe [28]. Teofilina hamuje również produkcję białka zapalnego makrofagów 1α

(MIP-1α), które pełni funkcję wspomagającą działanie IL-5 [28]. Teofilina hamuje produkcję IL-2, IL-13 oraz zmniejsza ekspresję receptorów dla IL-2 tj. cząsteczek CD25 [28]. Wymienione wyżej cytokiny odgrywają istotną rolę w patogenezie astmy oskrzelowej jako mediatory wzmożonej ekspresji adhezyn, chemotaksji limfocytów T i eozynofilów oraz aktywacji i degranulacji granulocytów kwasochłonnych. Zahamowana przez teofilinę synteza cytokin może świadczyć o regulacyjnym wpływie tego leku na ekspresję genów. W związku z tym jej działanie przeciwzapalne może wynikać w części z wpływu na zdolność komórek efektorowych do produkcji cytokin jeszcze w okresie poprzedzającym kontakt z alergenem (działanie profilaktyczne), jak również z hamowania aktywności komórek w trakcie formowania się nacieku zapalnego. Teofilina przywraca bowiem prawidłową aktywność procesom apoptozy granulocytów kwasochonnych, obecnych w alergicznym nacieku zapalnym w oskrzelach astmatyków [29]. Teofilina wpływa na procesy apoptozy granulocytów prawdopodobnie poprzez zablokowanie receptorów adenozynowych A_{2A} [114].

Teofilina istotnie hamuje również późną fazę reakcji alergicznej, zależną od napływu komórek zapalnych [29, 62]. Biorą w niej udział mediatory uwalniane z eozynofilów, granulocytów i limfocytów, odpowiedzialne za rozwój nadreaktywności oskrzelowej. Znajduje to potwierdzenie w badaniach klinicznych, w których obserwowano obniżenie liczby limfocytów pomocniczych i aktywnych granulocytów kwasochłonnych ($EG2^+$), uwalniających białko o silnym działaniu cytotoksycznym ECP [28].

Hamowanie uwalniania białek zasadowych i neurotoksyny z komórek kwasochłonnych, jak również hamowanie uwalniania cytokin z makrofagów i limfocytów T, składa się na jej działanie immunomodulacyjne [110].

Sugeruje się, iż efekt przeciwzapalny teofiliny, może być również wynikiem zahamowania produkcji tlenku azotu z L-argininy u astmatyków. Tlenek azotu odgrywa ważną rolę w patofizjologii astmy i jego produkcja jest podwyższona u astmatyków. Tlenek azotu (w ilościach pikomolowych) jest syntetyzowany z L-argininy, przez enzym syntazę NO (cNOS), izoenzym *konstytutywny* , który występuje w komórkach śródbłonka i neuronach. Aktywacja tego enzymu powoduje rozkurz mięśni gładkich w drogach oddechowych, przez podwyższenie produkcji cGMP i otwarcie kanałów potasowych K_{Ca} zależnych od Ca^{2+}. Izoenzym *indukowany* (iNOS) pobudzany w nabłonku przez

prozapalne cytokiny powoduje syntezę NO (w ilościach nanomolowych), który oprócz efektu bronchodilatacyjnego, posiada aktywność prozapalną i cytotoksyczną. U astmatyków iNOS jest aktywowana w komórkach biorących udział w procesach zapalnych, takich jak : makrofagi, eozynofile, neutrofile. Cytokiny produkowane przez Th_2 podwyższają aktywność arginazy metabolizującej L-argininę, co w konsekwencji prowadzi do powstania $ONOO^{-}$, który ma właściwości prozapalne, cytotoksyczne oraz bronchospastyczne w drogach oddechowych. W przyszłości lokalne podawanie selektywnych inhibitorów arginazy, może być nową metodą leczenia astmy [82].

Efektem działania rozkurczowego i przeciwzapalnego jest poprawa wartości wskaźników spirometrycznych oraz wymiany gazowej w płucach.:

- zwiększenie pojemności życiowej (VC)
- zwiększenie natężonej pojemności wydechowej pierwszosekundowej (FEV_1)
- obniżenie oporu oskrzelowego (R_t)
- zmniejszenie objętości zalegającej (RV), [20, 22]

Teofilina wykazuje działanie bronchoprotekcyjne, hamuje skurcz mięśni gładki oskrzeli w wyniku prowokacji histaminą, metacholiną oraz wysiłkiem fizycznym. Ten efekt pozostaje także bez zależności z działaniem rozkurczowym i występuje już przy stężeniu teofiliny w surowicy poniżej 10 μg/ml.

Najnowsze badania potwierdzają, że inotropowe działanie teofiliny na włókna mięśnia przepony zależy od uwalniania wapnia z retikulum endoplazmatycznego, a nie od napływu wapnia przez błonę komórkową. To działanie może wynikać z bezpośredniego działania teofiliny na kanały sarkoplazmatyczne albo być wynikiem interakcji z przeciwstawnym działaniem pobudzonych do skurczu sprzężonych włókien mięśni szkieletowych [23].

Nadmierne wytwarzanie neuropeptydów: neurokininy, substancji P, oraz peptydu zależnego od genu kalcytoniny (CGRP- Calcytonin Gen Relatet Peptide) jest uważane za jedną z zasadniczych przyczyn wzmożonego wytwarzania śluzu, a także rozwoju nadreaktywności i stanu zapalnego oskrzeli w astmie [23, 29].

Wykazano, że teofilina w stężeniach odpowiadających zakresowi terapeutycznemu, podczas elektrycznej stymulacji izolowanych fragmentów oskrzeli świnki morskiej,

znamiennie obniża uwalnianie neuropeptydów z niecholinergicznych zakończeń nerwowych włókien C. W piśmiennictwie jednak brak opisów podobnych badań wykonanych *in vitro* na tkankach ludzkich [23].

Endogenne katecholaminy, a w szczególności adrenalina, biorą udział w regulacji napięcia mięśni gładkich oskrzeli w astmie. Początkowo u zwierząt doświadczalnych, a następnie w badaniach klinicznych u ludzi, w tym u astmatyków, wykazano, że teofilina zwiększa uwalnianie tego związku z nadnerczy, jednakże wzrost ten nie jest zbyt wielki, a efekt zaznacza się zwłaszcza po teofiline podanej dożylnie [23].

Również wpływ teofiliny na układ krążenia wydaje się być związany ze wzrostem wytwarzania katecholamin. Pod ich wpływem nasila się praca serca, zwiększa zapotrzebowanie mięśnia sercowego na tlen, co zwłaszcza u chorych z niestabilną chorobą niedokrwienną serca może prowadzić do wystąpienia bólów wieńcowych, nasilenia zaburzeń rytmu serca, spadku ciśnienia tętniczego. Te objawy występują zwykle po szybkim podaniu teofiliny dożylnie, zwłaszcza u chorych wcześniej leczonych preparatami doustnymi, oraz w trakcie skojarzonego leczenia teofiliną i β_2-mimetykami, zwłaszcza nieselektywnymi [20].

U niektórych chorych wpływ teofiliny na układ przewodzący (działanie chronotropowo dodatnie) może być korzystny. W wyniku działania teofiliny u chorych z migotaniem przedsionków z wolną czynnością komór obserwowano przyspieszenie pracy serca, a u chorych z zespołem chorej zatoki zmniejszenie częstości zahamowań zatokowych. U chorych ze stabilną chorobą wieńcową stwierdzano również poprawę tolerancji wysiłku po leczeniu teofiliną [20].

Teofilina zwiększa siłę skurczową prawej komory i obniża ciśnienie w tętnicy płucnej, co jest również korzystne u chorych z przewlekłym sercem płucnym w okresie niewydolności krążenia. U tych chorych dodatkowe korzyści przynosi moczopędne działanie teofiliny, wynikające ze wzrostu siły skurczowej mięśnia serca i nasilenia przepływu krwi przez nerki [20, 22].

Teofilina powoduje również wzrost stężenia tyroksyny i kortyzolu. Tyroksyna zmniejsza reaktywność mięśni gładkich, a kortyzol działa przeciwzapalnie [23].

Ostatnie doniesienia literatutowe wskazują również, na możliwość zastosowania teofiliny, jako leku wspomagającego w leczeniu nowotworów prostaty, jajnika oraz płuc. Wykazano, iż teofilina hamowała wzrost komórek nowotworowych, stosowana sama

oraz w połączeniu z lekami przeciwnowotworowymi takimi jak: cisplatyna, paklitaksol, wzmagając ich działanie. Molekularny mechanizm poprzez który teofilina może zwiększać apoptozę komórek nowotworowych, jest prawdopodobnie związany z tym, iż podwyższny poziom cAMP, zmniejsza wewnątrzkomórkowy poziom białka hamującego apoptozę komórek nowotworowych (Bcl-2). Stwarza to nadzieję, iż taka łączona terapia, zwiększy skuteczność leczenia oraz przyczyni się do znacznego zredukowania dawki leku przeciwnowotworowego, a w związku z tym zmniejszy działania niepożądane [58].

Podczas leczenia teofiliną mogą wystąpić działania niepożądane, które są wynikiem przekroczenia stężenia terapeutycznego. Korzystne terapeutyczne stężenia teofiliny w surowicy wynoszą 5-15 μg/ml. Przy stężeniu teofiliny nie przekraczającym 20 μg/ml objawy niepożądane występują rzadko. Czasem jednak już przy poziomie terapeutycznym 10-15 μg/ml mogą wystąpić objawy niepożądane ze strony przewodu pokarmowego: nudności i wymioty, które nasilają się wraz ze wzrostem stężenia teofiliny w surowicy [20]. Teofilina powoduje wzrost wydzielania soku żołądkowego, może nasilać objawy choroby wrzodowej, rozluźnia mięśnie dolnego zwieracza przełyku, może nasilać objawy refluksu, być powodem zgagi i pieczenia za mostkiem, pobudza perystaltykę, a przyspieszony pasaż może być przyczyną biegunek. Działania niepożądane ze strony układu pokarmowego zależą od dawki, ale i od postaci przyjmowanego leku. Znacznie częściej występują w trakcie stosowania preparatów doustnych [20, 93].

Objawami przedawkowania teofiliny są : bóle głowy, zawroty głowy, nadmierna pobudliwość, bezsenność. Poza tym czasami może wystąpić zamroczenie i dezorientacja. Przy przekroczeniu zakresu terapeutycznego (>20 μg/ml) występują drżenia mięśniowe, nadkwasota, objawy hipoglikemii, zaburzenia pracy serca pod postacią przyspieszenia rytmu zatokowego i pobudzeń przedwczesnych, zwłaszcza komorowych [20, 63].

Przy stężeniu teofiliny przekraczającym 30 μg/ml nasila się niebezpieczna niemiarowość pracy serca, do migotania komór włącznie, oraz może dojść do niedotlenienia ośrodkowego układu nerwowego, mogą wystąpić drgawki lub śpiączka [20].

Wystąpienie pierwszych objawów niepożądanych nakazuje w miarę możliwości określić stężenie leku we krwi, a przy braku takich możliwości – zmniejszyć stosowaną dawkę lub, gdy występują objawy wskazujące na znaczne przekroczenie stężenia leku we

krwi, odstawić lek. Wzrostów stężenia teofiliny w surowicy można w znacznym stopniu uniknąć stosując preparaty o przedłużonym działaniu. W ten sposób można nie tylko znacznie zmniejszyć działania niepożądane, ale również wydłużyć czas działania teofiliny, a tym samym skuteczniej kontrolować objawy astmy oskrzelowej i poprawić czynność płuc [20].

Poza teofiliną do lecznictwa wprowadzono syntetyczne jej analogi tj. doksofilinę, diprofilinę oraz bamifilinę [26, 90].

Doksofilina [7-(1,3-dioksalan-2-ylometylo)-teofilina] – jest nowym ksantynowym lekiem rozszerzającym oskrzela (Ryc.1). Podobnie do teofiliny, jej mechanizm działania jest związany z zahamowaniem fosfodiesterazy, ale wykazuje także słabe powinowactwo do receptorów adenozynowych A_1 i A_2, co pozwala wyjaśnić jej lepszy profil bezpieczeństwa. Doksofilina może być stosowana u pacjentów astmatycznych z chorobą wrzodową, gdyż w przeciwieństwie do teofiliny, w mniejszym stopniu pobudza wydzielanie soku żołądkowego [73]. Nie wykazuje również działania kardiostymulującego, nie zaburza rytmu pracy serca, nie wpływa na ciśnienie tętnicze krwi oraz nie wykazuje objawów pobudzenia OUN [31]. Mniejsze działania niepożądane powodują, iż doksofilina może być skutecznym lekiem, w leczeniu obturacyjnych chorób płuc [38, 39].

Diprofilina [7 –(2,3-dihydroksypropylo) – teofilina] – jest pochodną teofiliny, mającą podobny mechanizm działania oraz zastosowanie kliniczne (Ryc.1). W porównianiu do teofiliny nie wykazuje znamiennego wpływu na częstotliwość pracy serca. Jest stosowana jako lek: w dychawicy oskrzelowej, chronicznym zapaleniu oskrzeli, rozedmie płuc, w leczeniu niewydolności mięśnia sercowego, w niewydolności naczyń wieńcowych serca, w niewydolności oddechowej, pomocniczo w leczeniu nadciśnienia [26, 59, 67].

Bamifilina [8-benzylo-7-(2-{etylo-(2-hydroksyetylo)-amino}-etylo-teofilina] – mechanizm działania związany jest z selektywnym blokowaniem receptora A_1 oraz z zahamowaniem PDE (Ryc.1). W porównaniu z teofiliną oraz enprofiliną, bamifilina zwiększa kurczliwość i zwalnia czynność mięśnia sercowego, działa słabo nasennie, pobudza oddychanie [10]. Zastosowanie znalazła w leczeniu astmy oskrzelowej oraz POChP. Szczególnie zalecana jest pacjentom z POChP, związaną z przeciążeniem

mięśnia wdechowego. Wykazano, iż bamifilina stosowana u pacjentów z *anginą pectoris*, zmniejsza niedokrwienie mięśnia sercowego, prawdopodobnie poprzez redystrybucję przepływu wieńcowego krwi, co może być spowodowane działaniem antagonistycznym wobec receptora A_1. Bamifilina znosi również niedokrwienie obserwowane u pacjentów podczas angioplastyki [53]. Zmniejsza uszkodzenie płuc indukowane endotoksynami, w związku z tym może być stosowana w leczeniu ciężkich stanów oddechowych związanych z posocznicą [61]. W leczeniu astmy oskrzelowej zastosowanie znalazły **enprofilina** oraz 3-isobutyl-8-pyrrolidinoksantyna **(IPDX)**, selektywnie blokujące receptory A_{2B} [47].

Prowadzone w ostatnich latach badania, nad zależnością pomiędzy budową chemiczną pochodnych metyloksantyn, a ich wpływem na receptory adenozynowe, doprowadziły do uzyskania licznych syntetycznych pochodnych, o bardziej wybiórczym i niejednokrotnie nowym profilu działania farmakologicznego, z równoczesnym ograniczeniem działań niepożądanych.

Poprzez modyfikacje chemiczne teofiliny, polegające na wprowadzeniu różnych podstawników w położenie 7, uzyskano związki o bardziej wybiórczym działaniu farmakologicznym. Najbardziej aktywnym okazał się dichlorowodorku 7-β-hydroksy-γ-(N_4-fenolotiopropylo-piperazyno)-propyloteofiliny **(tazyfilina)**, związek wykazujący długotrwały efekt przeciwhistaminowy, w wyniku blokowania receptorów H_1. Związek ten wykazał także słabe powinowactwo do receptorów adrenergicznych i serotoninowych [26, 90].

Pochodne 7,8-dipodstawionych teofiliny mogą wykazywać odmienny profil farmakologiczny. Związkiem o działaniu antagonistycznym w stosunku do angiotensyny II okazała się 7-tetrazolo-bifenylo-metylo-8-(2-butenylo)-teofilina [12]. Natomiast 7-(tietanylo-3-)-8-bromoteofilina wykazała efekt przeciwzapalny [64].

Na drodze chemicznej modyfikacji struktury metyloksantyn, otrzymano 1,3 – dipropylo - 8- (3 – noradamantylo) - ksantynę (**KW-3902**), związek będący selektywnym antagonistą receptora A_1, który znajduje się w trakcie badań jako potencjalny lek w ostrej niewydolności nerek, posiada bowiem działanie diuretyczne i natriuretyczne, hamuje transport kwasu p-aminohipurowego w nerkach [87]. Innymi selektywnymi antagonistami receptora A_1, którzy mogą znaleźć zastosowanie w niewydolności nerek są (S)-1,3-dipropyl-8-[2-(5,6-epoksynorbornylo)]-ksantyna (**CVT-**

124) oraz 1,3-dipropyl-8-cyclopentylksantyna (**DPCPX**), [54] Poza tym antagoniści receptora A_1 zmniejszają uszkodzenie płuc indukowane endotoksynami, w związku z tym **DPCPX**, może być stosowany w leczeniu ciężkich stanów oddechowych związanych z posocznicą [61].

Natomiast antagonista rec. A_1 8-(p-sulfofenylo) teofilina **(8-SPT)** znosi bezdech w czasie snu, co wskazuje na fizjologiczną rolę endogennej adenozyny w obwodowym układzie nerwowym, jako związku modulującego ekspresję bezdechu w czasie snu [17].

Przykładem związku, który mógłby być stosowany w chorobie Parkinsona jest antagonista A_{2A} (E)-1,3-dietylo-8-(3,4-dimetoksystyrylo)-7-metyloksantyna **(KW-6002)**, będący w III fazie badań klinicznych. Zastosowanie selektywnego antagonisty receptora **A_{2A}** (E)-8-(3,4-dimetoksystyrylo)-1,3-dipropylo-7-metyloksantyna **(KF-17837)** hamuje ekspresję COX-2 oraz uwalnianie PGE2 w komórkach mikrogleju, co może mieć pewne znaczenie w chorobach neurodegeneracyjnych OUN takich jak choroba Alzheimera [49, 82, 86]. W leczeniu w choroby Alzheimera może znaleźć zastosowanie 1,3-dipropylo-8-oksocyklo-pentyloksantyna (**KFM-19**).

Natomiast agoniści receptora A_1 mogą hamować ataki epileptyczne {np. 5`-N-etylokarboksyamidoadenozyna **(NECA)** i (R (-) N^6 - (fenyloizopropylo) adenozyna **(R-PIA)**. Aktywacja receptora A_1 poprzez podanie N^6-cyklopentyloadenozyny **(CPA)** może zwiększać utylizację glukozy w tkankach obwodowych przy braku insuliny, co może być przydatne w leczeniu pacjentów cierpiących na cukrzycę [24]. Wreszcie stymulacja receptora A_1 przez 2 – chloro -N^6 – cyklopentyloadenozynę **(CCPA)** może działać przeciwbólowo, również w bólach migrenowych [3, 55].

Modyfikacje w grupie 7,8-pochodnych teofiliny prowadzone od szeregu lat w Katedrze Chemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego w Krakowie doprowadziły do uzyskania chlorowodorku 7-(β-hydroksy-γ-morfolino)-propylo-8-amino-teofiliny **(P_{23})**, związku poprawiającego krążenie mózgowe, a równocześnie obniżającego ciśnienie tętnicze krwi [26, 90].

W ramach kontynuacji wyżej wymienionych badań, zsyntetyzowano serię 7,8-dipodstawionych pochodnych teofiliny o spodziewanym działaniu przeciwarytmicznym, hipotensyjnym oraz α-adrenolitycznym, które stały się przedmiotem badań farmakologicznych przedstawionych w niniejszej pracy.

II. CEL PRACY

Celem pracy było oznaczenie powinowactwa do receptorów adrenergicznych, aktywności przeciwarytmicznej i hipotensyjnej serii nowych 7,8-dipodstawionych pochodnych teofiliny (CH-9 – CH-21), oraz określenie zależności pomiędzy strukturą chemiczną a właściwościami farmakologicznymi, w porównaniu do struktury wiodącej tj. dichlorowodorku 7-β-hydroksy-γ-(N_4-fenoksyetylopiperazyno)-propylo-teofiliny (CH-1).

We wstępnych badaniach farmakologicznych oznaczono:

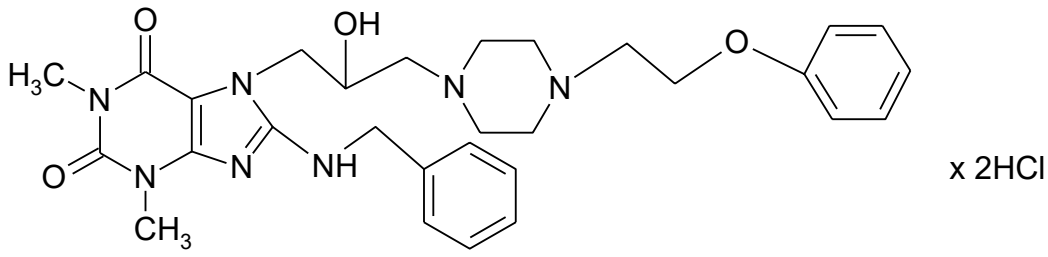
- powinowactwo do receptorów α_1-, α_2- oraz β_1-adrenergicznych
- toksyczność ostrą po podaniu dożylnym
- aktywność przeciwarytmiczną w modelu arytmii adrenalinowej i barowej po podaniu dożylnym
- wpływ na ciśnienie skurczowe i rozkurczowe krwi u normotensyjnego szczura po podaniu dożylnym
- wpływ na elektrokardiogram szczura (*in vivo* i *in vitro*)

Ponadto dla wyselekcjonowanych aktywnych związków oznaczono:

- toksyczność ostrą po podaniu dożołądkowym
- aktywność przeciwarytmiczną w modelu arytmii adrenalinowej po podaniu dożołądkowym
- wpływ na ciśnienie skurczowe i rozkurczowe krwi u normotensyjnego szczura po podaniu dożołądkowym
- wpływ na presyjne działanie adrenaliny, noradrenaliny, metoksaminy, tyraminy i DMPP
- aktywność przeciwarytmiczną w komorowych zaburzeniach rytmu izolowanego serca szczura, wywołanych okluzją i reperfuzją naczynia wieńcowego *in vitro*
- wpływ na mięśniówkę gładką wyosobnionego jelita cienkiego królika

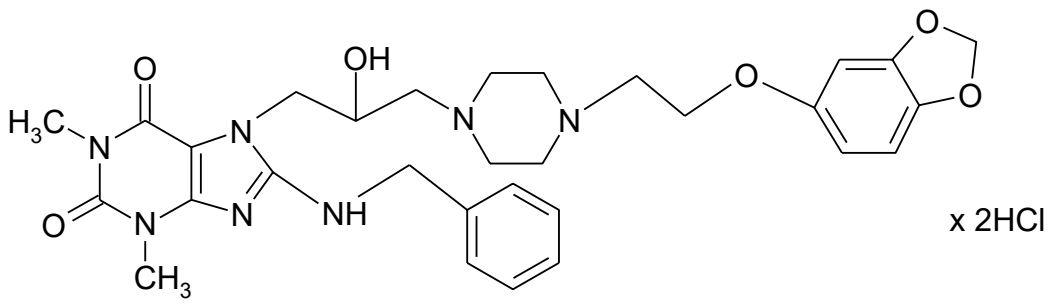
- wpływ na OUN (ruchliwość spontaniczna i czas trwania snu tiopentalowego)
- działanie diuretyczne

III. WZORY BADANYCH ZWIĄZKÓW



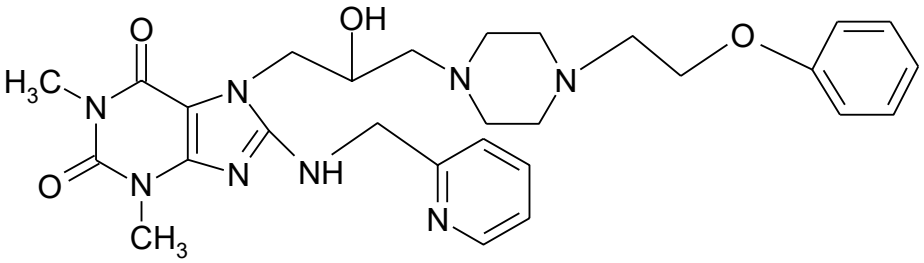
CH-9

Dichlorowodorek 7-β-hydroksy-γ-(N_4-fenoksyetylopiperazyno)-propylo-8-benzyloamino-teofiliny



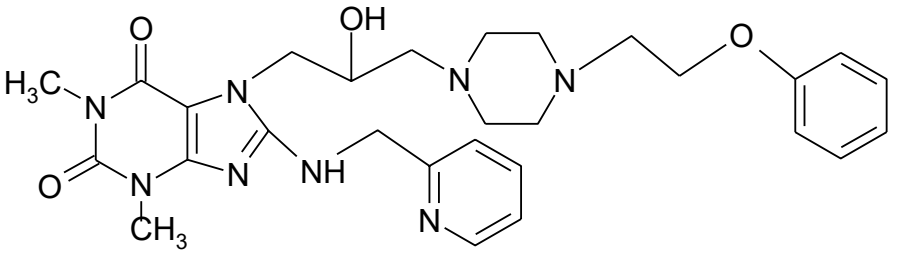
CH-10

Dichlorowodorek 7-β-hydroksy-γ-(N_4-metylenodioksy-fenoksyetylopiperazyno)-propylo-8-benzyloamino-teofiliny



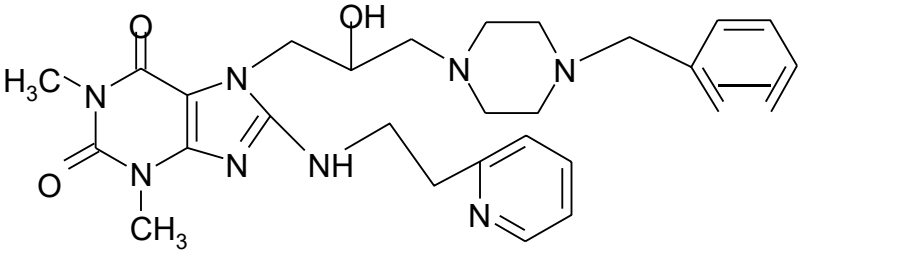
CH-11

Trichlorowodorek 7-β-hydroksy-γ-(N_4-fenoksyetylopiperazyno)-propylo-8-(2-pikoliloamino)-teofiliny



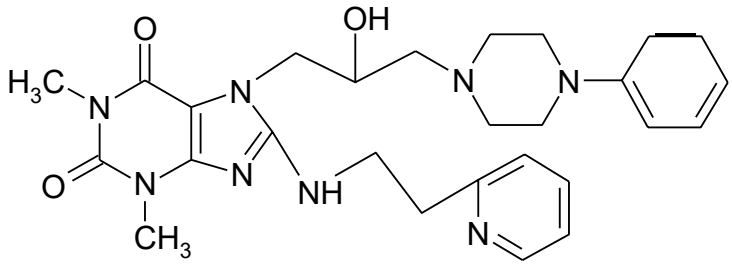
CH-12

Trichlorowodorek 7-β-hydroksy-γ-(N_4-fenoksyetylopiperazyno)-propylo-8-[2-(2'-pirydyloetylo)-amino]-teofiliny



CH-13

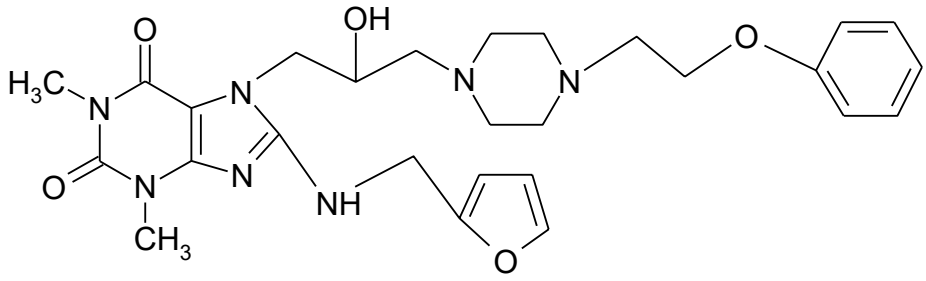
Trichlorowodorek 7-β-hydroksy-γ-(N_4-benzylopiperazyno)-propylo-8-[2-(2'-pirydyloetylo)-amino]-teofiliny



x 2HCl

CH-14

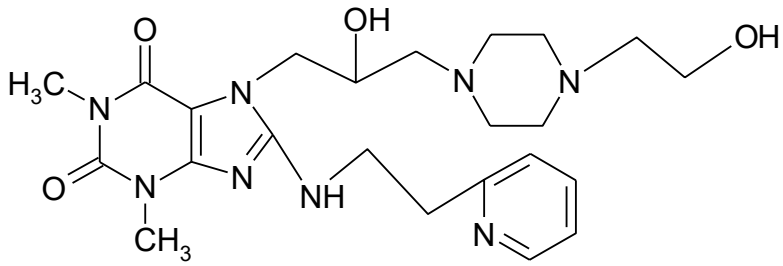
Dichlorowodorek 7-β-hydroksy-γ-(N_4-fenylopiperazyno)-propylo-8-[2-(2'-pirydyloetylo)-amino]-teofiliny



x 2HCl

CH-15

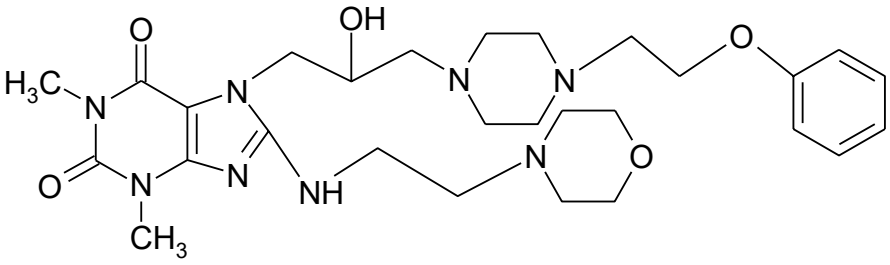
Dichlorowodorek 7-β-hydroksy-γ-[(N_4-fenoksyetylo)-piperazyno]-propylo-8-furfuryloamino-teofiliny



x 3HCl

CH-16

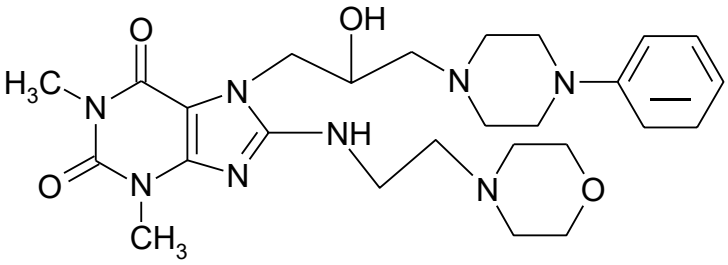
Trichlorowodorek 7-β-hydroksy-γ-[N_4-(2-hydroksyetylo) piperazyno]-propylo-8-[2-(2-pirydylo)-etyloamino]-teofiliny



x 3HCl

CH-17

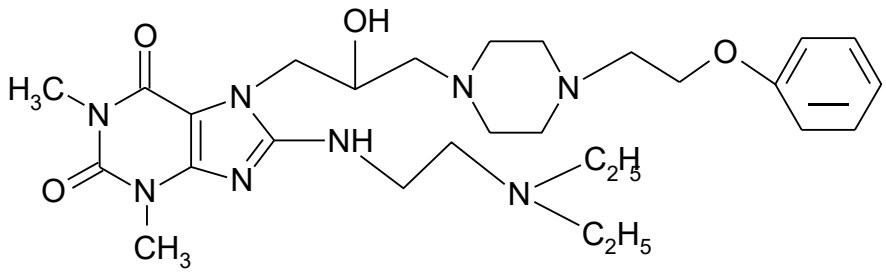
Trichlorowodorek 7-β-hydroksy-γ-[(N_4-fenoksyetylo) piperazyno)-propylo-8-[2-(morfolino)-etyloamino]-teofiliny



x 2HCl

CH-18

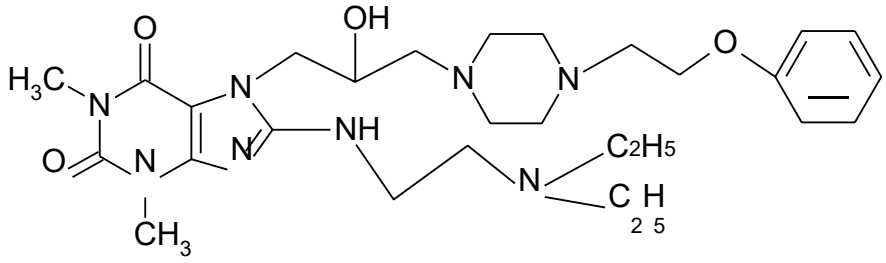
Dichlorowodorek 7-β-hydroksy-γ-(N_4-fenylopiperazyno)-propylo-8-[(2-morfolino)-etyloamino]-teofiliny



x 3HCl

CH-19

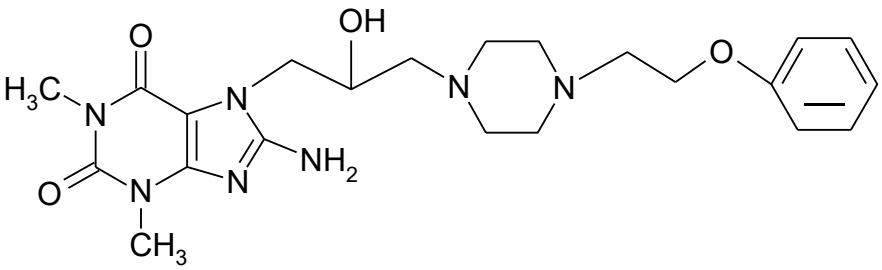
Trichlorowodorek 7-β-hydroksy-γ-(N_4-fenylopiperazyno)-propylo-8-[2-(N,N-dietyloamino)-etyloamino]-teofiliny



x 3HCl

CH-20

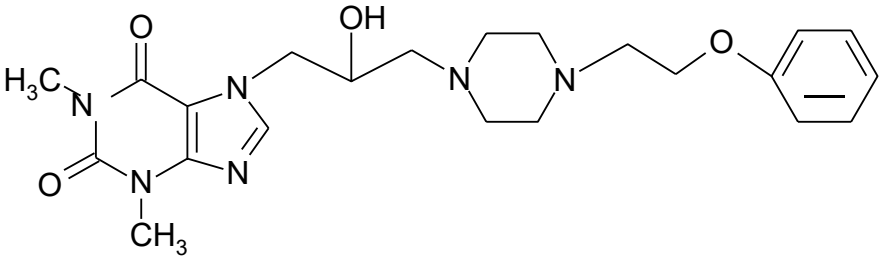
Trichlorowodorek 7-β-hydroksy-γ-(N_4-fenoksyetylopiperazyno)-propylo-8-[2-(N,N-dietyloamino)-etyloamino]-teofiliny



CH-21

Trichlorowodorek 7-β-hydroksy-γ-(N_4-fenoksyetylopiperazyno)-propylo-8-aminoteofiliny

Związek odniesienia



CH-1

Dichlorowodorek 7-β-hydroksy-γ-(N_4-fenoksyetylopiperazyno)-propylo-teofiliny

IV. METODYKA

1. Materiały

1.1 Badane związki

13 nowych 7,8-dipodstawionych pochodnych teofiliny zsyntetyzowano w Katedrze Chemii Farmaceutycznej CM UJ w Krakowie. Wzory chemiczne i symbole badanych związków przedstawiono w rozdziale III.

1.2 Związki odniesienia

Jako związków odniesienia użyto związku CH-1 (dichlorowodorek 7-β-hydroksy-γ-(N_4-fenoksyetylopiperazyno)- propyloteofiliny) oraz aminofiliny, propranololu, chinidyny.

1.3 Stosowane leki i odczynniki

- Adrenalina (Adrenalinum hydrochloricum – Polfa)
- Chinidyna (Chinidinum sulfuricum – Polfa)
- Chlorek baru (Barium chloratum – P.O.Ch)
- Chlorek magnezu (Magnesii chloridum – P.O.Ch)
- Chlorek wapnia (Calcii chloridum – P.O.Ch)
- Chlorek potasu (Kalii chloridum – P.O.Ch)
- Chlorek sodu (Natrii chloridum isotonica – Polfa)
- DMPP (Dimethylphenylpiperazinum – Sigma)
- Fentolamina (Phentolamine hydrochloride – Sigma)
- Glukoza bezwodna (Glucosum – Polfa)
- Heparyna (Heparinum sulfuricum – Polfa)

- [^{3}H]-CGP-12177 (aktywność specyficzna 48 Ci/mmol, Amersham)
- [^{3}H]-Klonidyna (aktywność specyficzna 70.5 Ci/mmol,NEN)
- [^{3}H]-Prazosyna (aktywność specyficzna 19.5 Ci/mmol,NEN)
- Klonidyna (Clonidine hydrochloride – Sigma)
- Metoksamina (Methoxamine hydrochloride – Sigma)
- Noradrenalina (Levonor – Polfa)
- Płyn scyntylacyjny (OptiPhase „HiSafe"3 – Wallac Oy, Finland)
- Propranolol (Propranololum hydrochloricum – Polfa)
- Tiopental (Thiopentone sodium – Helfa – Frenon – Arzneimittel – Germany)
- Tyramina (Tyramine – Sigma)
- Wodorowęglan sodowy (Natrii hydrocarbonas – P.O.Ch)

1.4 Zwierzęta

Białe myszy rasy Swiss/Alb., samce o masie ciała 18 - 25 g, szczury normotensyjne szczepu Wistar o masie ciała 180 - 350 g oraz króliki rasy mieszanej o masie ciała 2.5 - 3.5 kg. Zwierzęta przebywały w standardowych klatkach odpowiednich do ich rozmiarów, w pomieszczeniu o temperaturze 20 - 24 ^{o}C (cykl świetlny 12-godzinny). Karmione były standardową paszą granulowaną. Do picia otrzymywały wodę wodociągową w dowolnych ilościach.

1.5 Aparatura

- Aparat do pomiaru ciśnienia tętniczego u małych zwierząt – DATAMAX-BPL-8 (firmy Columbus Instruments, Ohio)
- Cieplarka – Thermoblock TB - 941 T (JW ELECTRONIC)
- Elektrokardiograf, typ Multicard E - 30
- Homogenizator – ULTRA TURRAX, T 25 basic (IKA LABORTECHNIK)

- Kardiomonitor CMK - 405

- Kardiotachometr CTK - 301
- Licznik scyntylacyjny – WALLAC 1409 DSA (firmy Wallac Oj, Finland)
- Pompa perystaltyczna, typ 315
- Rejestrator TZ 4100
- Transformator separacyjny TSK - 301
- Wirówka MPW – 375

1.6 Obliczenia statystyczne

Wyniki przedstawiono jako średnie pomiarów ± błąd standardowy średniej (± SEM). Przy porównywaniu wartości średnich dla dwóch różnych grup stosowano test t-Studenta dla prób niepowiązanych, natomiast przy porównaniu wartości średnich obliczonych przed podaniem i po podaniu związku (więcej niż jeden pomiar) stosowano analizę wariancji (test ANOVA). Różnicę średnich uznawano za znamienną statystycznie przy poziomie istotności $p<0.05$.
Wartości LD_{50} i ED_{50} obliczono przy użyciu metody Litchfielda i Wilcoxona [75].
Wartość stężenia badanego związku, które powodowało hamowanie wiązania odpowiedniego radioliganda o 50% (IC_{50}), oznaczono przy zastosowaniu programu komputerowego GraphPAD/Prism. Stałą hamowania (K_i) obliczono stosując wzór Chenga-Prusoffa [25].

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{L_O}{K_D}}$$

gdzie: L_O – stężenie znakowanego liganda

K_D – stała dysocjacji wiązania znakowanego liganda

2. Badania skriningowe nowych pochodnych metyloksantyn

2.1 Oznaczenie powinowactwa do receptorów α_1-, α_2-, β_1-adrenergicznych w korze mózgowej szczura

Powinowactwo do receptorów adrenergicznych typu α_1, α_2, β_1 oznaczono w korze mózgowej szczura. Tkankę homogenizowano przy użyciu homogenizatora ULTRA TURRAX w 10 ml 50 mM buforu Tris-HCl o pH 7.6. Homogenat wirowano z prędkością 20.000 x g przez 20 minut w temperaturze 0-4^o C. Otrzymany pelet homogenizowano w tej samej objętości buforu i ponownie wirowano przez 20 minut (20.000 x g) w temperaturze 0-4^{o}C. Ostateczny pelet zawieszano w buforze Tris-HCl w proporcji 1 g na 35 ml buforu.

- Receptor adrenergiczny α_1

Powinowactwo badanych związków do receptora adrenergicznego typu α_1 badano przy użyciu [^{3}H]-prazosyny (aktywność specyficzna 19.5 Ci/mmol, NEN) jako specyficznego liganda. Mieszanina inkubacyjna o objętości 300 µl zawierała 240 µl zawiesiny tkankowej, 30 µl radioliganda (w stężeniu 0.2 nM) oraz 30 µl buforu zawierającego od 7-8 stężeń badanych związków. Inkubacja została przeprowadzona w płytkach [MAFCNOB 10, Millipore]. Wiązanie niespecyficzne oznaczano w obecności 10 µM fentolaminy. Próbki w dwukrotnych powtórzeniach inkubowano w temperaturze 30 ^{o}C przez 30 minut. Inkubację przerywano przez filtrację (Millipore) przez filtry Whatman GF/C płucząc 2 x 100 µl buforu. Filtry umieszczano w naczyńkach scyntylacyjnych i zalewano płynem scyntylacyjnym. Radioaktywność mierzono w liczniku scyntylacyjnym WALLAC 1409 DSA. Wiązanie specyficzne określane było jako różnica pomiędzy wiązaniem całkowitym, a wiązaniem niespecyficznym.

- Receptor adrenergiczny α_2

Powinowactwo badanych związków do receptora adrenergicznego typu α_2 badano przy użyciu [^{3}H]-klonidyny (aktywność specyficzna 70.5 Ci/mmol, NEN) jako specyficznego liganda. Mieszanina inkubacyjna o objętości 300 µl zawierała 240 µl zawiesiny tkankowej, 30 µl radioliganda (w stężeniu 2 nM) oraz 30 µl buforu zawierającego od 7-8 stężeń badanych związków. Inkubacja została przeprowadzona w płytkach [MAFCNOB 10, Millipore]. Wiązanie niespecyficzne oznaczano w obecności 10 µM klonidyny. Próbki w dwukrotnych powtórzeniach inkubowano w temperaturze 30 ^{o}C przez 25 minut. Inkubację przerywano przez filtrację (Millipore) przez filtry Whatman GF/C płucząc 2 x 100 µl buforu. Filtry umieszczano w naczyńkach scyntylacyjnych i zalewano płynem scyntylacyjnym. Radioaktywność mierzono w liczniku scyntylacyjnym WALLAC 1409 DSA. Wiązanie specyficzne określane było jako różnica pomiędzy wiązaniem całkowitym, a wiązaniem niespecyficznym.

- Receptor adrenergiczny β_1

Powinowactwo badanych związków do receptora adrenergicznego typu β_1 badano przy użyciu [^{3}H]-CGP12177 (aktywność specyficzna 48 Ci/mmol, Amersham) jako specyficznego liganda. Mieszanina inkubacyjna o objętości 300 µl zawierała 240 µl zawiesiny tkankowej, 30 µl radioliganda (w stężeniu 0.2 nM) oraz 30 µl buforu zawierającego od 7-8 stężeń badanych związków. Inkubacja została przeprowadzona w płytkach [MAFCNOB 10, Millipore]. Wiązanie niespecyficzne oznaczano w obecności 1 µM propranololu. Próbki w dwukrotnych powtórzeniach inkubowano w temperaturze
37 ^{o}C przez 60 minut. Inkubację przerywano przez filtrację (E-DOS, Zeiss) przez filtry Whatman GF/C płucząc 2 x 100 µl buforu. Filtry umieszczano w naczyńkach scyntylacyjnych i zalewano płynem scyntylacyjnym. Radioaktywność mierzono w liczniku scyntylacyjnym WALLAC 1409 DSA. Wiązanie specyficzne określane było jako różnica pomiędzy wiązaniem całkowitym, a wiązaniem niespecyficznym.

2.2 Oznaczenie toksyczności ostrej wg Litchfielda i Wilcoxona [75]

Toksyczność ostrą oznaczono na myszach. Badane związki podawano dożylnie i dożołądkowo (aktywne, wyselekcjonowane w badaniach skriningowych). Grupy doświadczalne dla każdej dawki liczyły po 6 zwierząt. Obserwację zachowania się zwierząt prowadzono przez 6 godzin, a śmiertelność odczytywano po 24 godzinach.

2.3 Oznaczenie profilaktycznej aktywności przeciwarytmicznej

2.3.1. Model arytmii adrenalinowej wg Szekeresa [104]

Szczurom znieczulonym ogólnie (tiopental, 60 mg/kg *i.p.*) w celu wywołania niemiarowości podawano dożylnie (*i.v.*) adrenalinę w dawce 20 μg/kg, w objętości 1 ml/kg. Badane związki podawano dożylnie, w stałej objętości 1ml/kg, na 15 minut przed arytmogenem. W grupie kontrolnej, otrzymującej 0.9 % NaCl, po około 5 - 10 sekundach od momentu wstrzyknięcia adrenaliny obserwowano u wszystkich zwierząt zwolnienie czynności serca, ekstrasystole oraz bloki przedsionkowo-komorowe. Opisane zaburzenia doprowadzały do śmierci około 50% zwierząt. Za kryterium działania przeciwarytmicznego przyjęto zmniejszenie wyżej opisanych objawów arytmii, zabezpieczenie przed ich wystąpieniem oraz osłonę przed śmiercią.

2.3.2. Model arytmii barowej wg Szekeresa [104]

Badania przeprowadzono na szczurach w znieczuleniu ogólnym (tiopental, 60 mg/kg *i.p.*). Chlorek baru w dawce 32 mg/kg, w stałej objętości 1 ml/kg, wstrzykiwano do żyły ogonowej. Badane związki podawano dożylnie na 15 minut przed arytmogenem. W grupie kontrolnej otrzymującej 0.9% NaCl, po 10 - 15 sekundach od podania $BaCl_2$, obserwowano krótkotrwałą bradykardię zatokową przechodzącą w rytm komorowy z całkowicie zniekształconymi zespołami QRS, prowadzący do asystoli i śmierci około 67% zwierząt po około 3 - 5 minutach. Za aktywność przeciwarytmiczną przyjęto zmniejszenie liczby przedwczesnych pobudzeń nadkomorowych i komorowych, zapobieganie fibrylacji oraz przedłużenie czasu przeżycia zwierząt w stosunku do kontroli.

2.4 Oznaczenie wpływu na ciśnienie tętnicze krwi u normotensyjnego szczura

Doświadczenie wykonano na normotensyjnych, znieczulonych tiopentalem (60 mg/kg *i.p.*) szczurach. Badane związki podawano dożylnie w dawce 1/10 LD_{50}, a w przypadku związków aktywnych dodatkowo w dawce 1/40 i 1/20 LD_{50}. Ciśnienie krwi mierzono w tętnicy szyjnej wspólnej, przy pomocy aparatu do pomiaru ciśnienia krwi u małych zwierząt typu DATAMAX, firmy Columbus Instruments (Ohio), przed podaniem oraz po 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 minutach od podania związku.

2.5 Oznaczenie wpływu na prawidłowy elektrokardiogram szczura „in vivo"

Badania elektrokardiograficzne wykonano aparatem typu Multicard E-30, stosując odprowadzenie dwubiegunowe II, przy szybkości przesuwu taśmy 50 mm/sek i kalibracji napięcia 1mV = 1cm. Po wykonaniu w narkozie tiopentalowej (60 mg/kg *i.p.*) elektrokardiogramów kontrolnych, podawano dożylnie badane

związki w dawce 1/5 LD_{50}. Zapisu EKG dokonywano powtórnie po 1, 5 i 15 minutach od momentu podania związku.

2.6 Oznaczenie wpływu na częstotliwość, wypływ wieńcowy i elektrokardiogram izolowanego serca szczura wg metody Langendorffa [72]

Szczurom, samcom (180 - 350g), podawano dootrzewnowo heparynę w objętości 1 ml/kg. Po upływie 30 minut zwierzęta zabijano, szybko wycinano serce i umieszczano je w płynie odżywczym o pH=7.4, o składzie (mmol/l): NaCl (120.0), KCl (5.6), $MgCl_2$ (2.2), $CaCl_2$ (2.4), $NaHCO_3$ (19.0), glukoza (10), natlenionym karbogenem (95% O_2 i 5% CO_2). Następnie wyizolowane serce zawieszano, poprzez podwiązanie aorty na metalowej kaniuli i perfundowano przefiltrowanym płynem odżywczym (filtr Sartorius, typ SM 65) pod ciśnieniem 70 cmH_2O. Zawieszone serce podłączano do elektrokardiografu przy pomocy dwóch stalowych, nierdzewnych elektrod (jedną umieszczano bezpośrednio w mięśniu sercowym, drugą na metalowej kaniuli). Po 15 minutowym okresie adaptacyjnym rejestrowano krzywą EKG. Następnie badany związek dodawano do płynu odżywczego perfundującego serce we wzrastających stężeniach : 10^{-9}, 3 x 10^{-9}, 10^{-8}, 3 x 10^{-8}, 10^{-7}, 3 x 10^{-7}, 10^{-6}, 3 x 10^{-6}, 10^{-5}, 3 x 10^{-5}, 10^{-4} [M]. Zapisu EKG dokonywano przed podaniem związku oraz po 5 minutach od podania odpowiedniego stężenia badanego związku. Równocześnie przy pomocy cylinderka miarowego mierzono wypływ wieńcowy (ml/min).

3. Badania poszerzone dla wyselekcjonowanych związków

3.1 Oznaczenie profilaktycznej aktywności przeciwarytmicznej w modelu arytmii adrenalinowej po podaniu dożołądkowym wg Szekeresa [104]

Niemiarowość poadrenalinową wywoływano wg metody opisanej uprzednio. Badane związki podawano dożołądkowo na 60 minut przed dożylnym wstrzyknięciem arytmogenu. Za kryterium działania przeciwarytmicznego przyjęto zmniejszenie lub zabezpieczenie przed wystąpieniem zaburzeń rytmu serca oraz osłonę przed śmiercią (w porównaniu z grupą kontrolną).

3.2 Oznaczenie aktywności hipotensyjnej badanych związków po podaniu dożołądkowym

Badane związki podawano szczurom dożołądkowo w zakresie dawek 1/40 - 1/10 LD_{50}. Pomiaru ciśnienia skurczowego i rozkurczowego dokonywano przed i po 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60,70, 80, 90 minutach od podania związku wg opisu umieszczonego uprzednio.

3.3 Oznaczenie wpływu badanych związków na presyjne działanie adrenaliny, noradrenaliny, metoksaminy, tyraminy i DMPP

Badania wykonano na normotensyjnych szczurach (190 - 250 g). Ciśnienie tętnicze krwi mierzono w tętnicy szyjnej wspólnej (wg metody opisanej w punkcie 2.3.). Po kontrolnym zapisie ciśnienia tętniczego podawano dożylnie kolejno: adrenalinę (A - 2 μg/kg), noradrenalinę (NA - 2 μg/kg), metoksaminę (Met - 150 μg/kg), tyraminę (Tyr - 200 μg/kg) oraz DMPP (100 μg/kg), a następnie badane związki (1/40 - 1/10 LD_{50} *i.v.*). Po 5 minutach od podania odpowiedniego związku ponownie podawano A, NA, Met, Tyr i DMPP, w kolejności jak wyżej rejestrując za każdym razem wartości ciśnienia tętniczego.

Przy ocenie wyników brano pod uwagę przyrosty ciśnienia skurczowego, indukowane podawaniem wyżej wymienionych substancji przed i po podaniu badanego związku.

3.4 Oznaczenie aktywności przeciwarytmicznej w niemiarowości wywołanej okluzją i reperfuzją naczynia wieńcowego „ in vitro" wg metody Lubbe [79]

Serce wyosobniano i podwieszano analogicznie jak w metodzie Langendorff'a [72]. Po 15 minutowym okresie adaptacyjnym wywoływano niedotlenienie mięśnia sercowego przez zamknięcie, przy pomocy specjalnego zacisku, lewej tętnicy wieńcowej. Po 15 minutach zacisk usuwano i przez 30 minut zapisywano elektrokardiogram w sposób ciągły. Równocześnie przy użyciu cylinderka mierzono wypływ wieńcowy (ml/min) bezpośrednio przed okluzją, w czasie okluzji i reperfuzji. Badany związek, w odpowiednim stężeniu molowym dodawano do płynu odżywczego na 15 minut przed okluzją i utrzymywano przez cały czas trwania eksperymentu. Aktywność każdego stężenia badano na 5 - 6 sercach. Rozpoznawanie i określanie ilościowe arytmii prowadzono zgodnie z wytycznymi zawartymi w „The Lambeth Conventions" [107]. Dla oceny intensywności arytmii przyjęto punktową skalę opisaną przez Bernauera [6], gdzie wystąpienie w ciągu 30 minutowego okresu reperfuzji:

- mniej niż 10 ekstrasystoli = 1 punkt
- więcej niż 10 ekstrasystoli = 2 punkty
- tachykardii lub trzepotania komorowego = 3 punkty
- fibrylacji = 4 punkty

3.5 Oznaczenie wpływu na mięśniówkę gładką izolowanego jelita cienkiego królika wg metody Magnusa [80]

Wpływ badanych związków na mięśniówkę gładką badano na izolowanym jelicie cienkim królika wg klasycznej metody Magnusa [80]. Zwierzęta zabijano, wypreparowywano i wycinano odcinki jelita cienkiego długości 3-4 cm, które umieszczano w natlenionym płynie Chenoweth-Koelle. Następnie odcinek jelita jednym końcem mocowano do uchwytu w naczyńku termostatowym o pojemności 50 ml, zawierającym natleniony płyn Chenoweth-Koelle o temperaturze 37 ^{o}C, a

drugim do izometrycznego przetwornika. Skurcze spontaniczne jelita, przy obciążeniu 1 g, zapisywano na rejestratorze typu TZ-4100. Badane związki podawano we wzrastających stężeniach od 10^{-8} do 10^{-4} M, rejestrując wpływ każdej dawki przez 5 minut.

3.6 Oznaczenie wpływu na ośrodkowy układ nerwowy

3.6.1 Wpływ na ruchliwość spontaniczną

Myszom (18 - 24 g) podawano dożołądkowo badany związek w dawkach odpowiadających 1/40 - 1/10 $LD_{50p.o.}$ Zwierzęta kontrolne otrzymywały 0.5% metylocelulozę. Po upływie 60 minut myszy wkładano pojedynczo do specjalnie skonstruowanych klatek z fotokomórkami połączonymi z licznikiem elektronicznym. Ilość wykonywanych ruchów rejestrowano w ciągu 30 minut.

3.6.2 Wpływ na czas trwania snu tiopentalowego

Tiopental w dawce 55 mg/kg, wstrzykiwano myszom dootrzewnowo po 60 minutach od momentu dożołądkowego podania badanego związku (1/40 - 1/10 LD_{50}) lub 0.5% metylocelulozy (w przypadku kontroli), w objętości 1 ml/kg. Czas trwania snu narkotycznego liczono od momentu utraty do momentu powrotu odruchu postawy.

3.7. Oznaczenie działania diuretycznego.

Szczury głodzone przez 24 godz. nawadniano izotonicznym roztworem chlorku sodowego, w dawce 25 ml/kg per os. Badane związki podawano również dożołądkowo w dawce 25 mg/kg w objętości 1 ml/kg. Następnie zwierzęta umieszczano pojedynczo w klatkach metabolicznych i zbierano mocz po 1h, 2h , 3h, 4h, 5h oraz 24h. Ilość wydalonego moczu po podaniu badanych związków porównywano z grupą kontrolną, przy czym za działanie diuretyczne związków przyjęto co najmniej 3-krotne zwiększenie ilości wydalanego moczu w stosunku do kontroli.

V.WYNIKI

1. Badania skriningowe nowych pochodnych metyloksantyn

1.1 Powinowactwo do receptorów adrenergicznych w korze mózgowej szczura

Powinowactwo badanych związków do receptorów adrenergicznych oznaczono w korze mózgowej szczura. Najsilniejsze powinowactwo do receptorów α_1-adrenergicznych wykazały związki **CH-19, CH-20, CH-15, CH-14, CH-12, CH-18** (K_i = 143-383 nM), nieco słabsze związki **CH-9, CH-10, CH-11, CH-17** (K_i = 462-880 nM), a najsłabsze związek **CH-21** (K_i = 1330 nM) oraz związek odniesienia **CH-1** (K_i = 1400 nM). Natomiast dwa związki tj. **CH-13** i **CH-16,** nie wypierały z miejsc wiążących w korze mózgowej szczura znakowanej [^{3}H]-prazosyny, co sugeruje brak powinowactwa tych związków do receptorów α_1-adrenergicznych. Największe powinowactwo do receptorów α_2-adrenergicznych wykazały związki **CH-9**, **CH-20**, **CH-19**, **CH-1**, **CH-11** oraz **CH-21** (K_i = 152-790 nM). Związki **CH-17**, **CH-15**, **CH-18**, **CH-12**, **CH-10** wykazały słabsze powinowactwo do receptorów α_2-adrenergicznych (K_i = 980-6058nM). Pozostałe badane związki tj. **CH-13**, **CH-14** oraz **CH-16**, podane w stężeniu do 50 μM, nie wypierały z miejsc wiążących w korze mózgowej szczura znakowanej [^{3}H]-klonidyny (Tab.1).

Wszystkie badane związki, podane w stężeniu do 100 μM, nie wypierały z miejsc wiążących w korze mózgowej szczura znakowanego [^{3}H]-CGP12177, co świadczy o braku powinowactwo badanych związków do receptorów β_1–adrenergicznych.

Tabela 1. Powinowactwo badanych związków do receptorów α_1 - i α_2-adrenergicznych

Związek	[^{3}H]-Prazosyna α_1		[^{3}H]-Klonidyna α_2	
	IC_{50} (nM)	**K_i (nM)**	**IC_{50} (nM)**	**K_i (nM)**
CH-1	427.9 ± 35.0	1400 ± 100	719.0 ± 192.6	400 ± 33
CH-9	153.2 ± 33.2	462± 15	441.1 ± 98.4	152 ± 7
CH-10	148.1 ± 28.2	478± 44	492.5 ± 81.2	6058 ± 12
CH-11	455 ± 12.0	876 ± 41	351.0 ± 46.8	575 ± 59
CH-12	427.9 ± 35.0	366 ± 35	427.9 ± 35.0	4299 ± 300
CH-13		>10 000		>50 000
CH-14	427.9 ± 35.0	254 ± 20		>50 000
CH-15	427.9 ± 35.0	244 ± 44	427.9 ± 35.0	1302 ± 68
CH-16		>50 000		>50 000
CH-17	427.9 ± 35.0	880 ± 100	427.9 ± 35.0	980 ± 90
CH-18	427.9 ± 35.0	383 ± 60	427.9 ± 35.0	2700 ± 600
CH-19	427.9 ± 35.0	143 ± 8	427.9 ± 35.0	389 ± 64
CH-20	427.9 ± 35.0	225 ± 11	427.9 ± 35.0	372 ± 23
CH-21	427.9 ± 35.0	1330 ± 140	427.9 ± 35.0	790 ± 170

1.2 Toksyczność ostra

Wartości LD_{50} oznaczone na myszach dla wszystkich pochodnych metyloksantyn po podaniu dożylnym oraz dla wybranych, aktywnych związków po podaniu dożołądkowym zebrano w Tab. 2. Jak wynika z przedstawionych w Tabeli wartości LD_{50}, związki **CH-11**, **CH-17** i **CH-18** wykazały zbliżoną lub nieco niższą toksyczność od związku **CH-1** i aminofiliny przy podaniu dożylnym, natomiast pozostałe związki okazały się bardziej toksyczne o związku odniesienia. Podane dożołądkowo, za wyjątkiem **CH-9**, wykazały mniejszą toksyczność od aminofiliny.

Tabela 2. Toksyczność ostra badanych związków wg Litchfielda i Wilcoxona

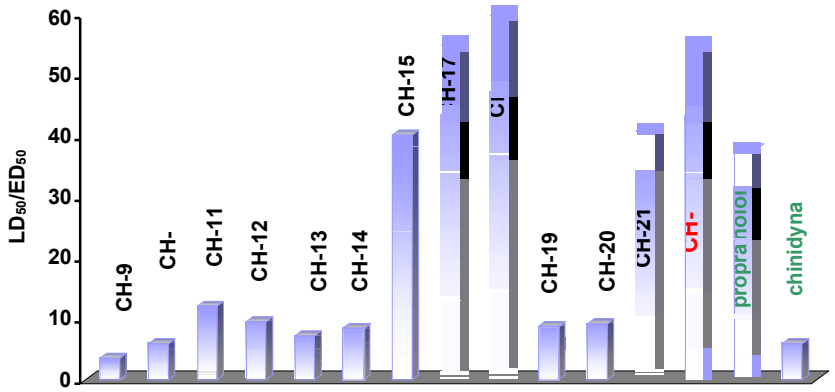
Związek	LD_{50} (mg/kg) *i.v.*	LD_{50} (mg/kg) *p.o.*
CH-1	192 (176.9 – 208.3)	1040.0 (852.4-1268.8)
CH-9	75 (59.0 – 95.2)	469.0 (321.8-665.3)
CH-10	90 (76.6 – 109.7)	–
CH-11	205 (18.,2 – 228.2)	1258.4 (1009.6 - 1496.7)
CH-12	87.6 (69.0 – 102.3)	635.4 (465.0-769.3)
CH-13	48.8 (36.9 - 64.5)	–
CH-14	68.5 (57.0 – 83.4)	
CH-15	43.4 (32.6 – 57.0)	832.0 (713.8 - 973.8)
CH-16	106 (84.4 – 119.7)	–
CH-17	198 (179.6 – 216.2)	1354.0 (1143.5 - 1567.0)
CH-18	23.,2 (211.8 – 249.7)	1132.0 (947.6-1391.0)
CH-19	62 (49.7 – 75.0)	–
CH-20	65.6 (52.0 – 87.4)	–
CH-21	5.,3 (42,3 – 65,7)	862.3 (745.0-953.5)
aminofilina	190.0 *	540.0 (528.0-552.0)

* dane z piśmiennictwa [102]

1.3. Profilaktyczna aktywność przeciwarytmiczna

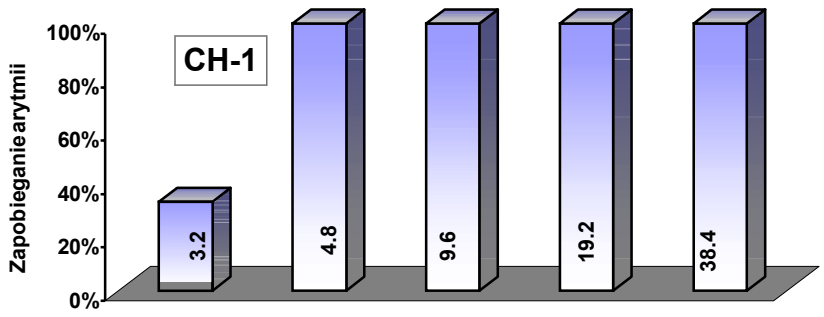
1.3.1. Model arytmii adrenalinowej

Z przebadanych związków 12, oznaczonych symbolami: **CH-9**, **CH-10**, **CH-11**, **CH-12**, **CH-13**, **CH-14**, **CH-15**, **CH-17**, **CH-18**, **CH-19**, **CH-20** i **CH-21** oraz związek odniesienia **CH-1**, podanych dożylnie na 15 minut przed arytmogenem, wykazało istotną aktywność przeciwarytmiczną w tym teście (Ryc.3, Tab.3). Z porównania wartości indeksów terapeutycznych wynika, że 5 związków oraz struktura wiodąca charakteryzowało się dużym bezpieczeństwem. Pozostałe wykazały mniejsze bezpieczeństwo stosowania.



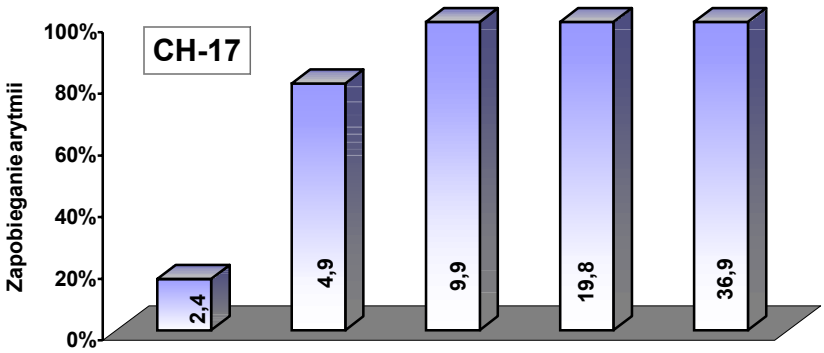
Ryc.3. Porównanie indeksów terapeutycznych badanych związków i związków odniesienia w modelu arytmii adrenalinowej u szczura po podaniu dożylnym

Premedykacja związkiem odniesienia **CH-1** w dawkach odpowiadających 1/5, 1/10, 1/20, 1/40 LD_{50} na 15 minut przed arytmogenem całkowicie zapobiegała wystąpieniu bloków oraz pobudzeń przedwczesnych indukowanych adrenaliną. Osłabienie aktywności przeciwaytmicznej obserwowano dopiero po podaniu związku CH-1 w dawce odpowiadającej 1/60 LD_{50}. Obliczona wartość ED_{50} dla związku **CH-1** w tym modelu arytmii wynosi: 3.5 mg/kg, Indeks terapeutyczny = 54.9 (Ryc. 4, Tab. 3).



Ryc.4. Aktywność przeciwarytmiczna związku **CH-1** (3.2, 4.8, 9.6, 19.2, 38.4 mg/kg) w modelu arytmii adrenalinowej u szczura po podaniu dożylnym

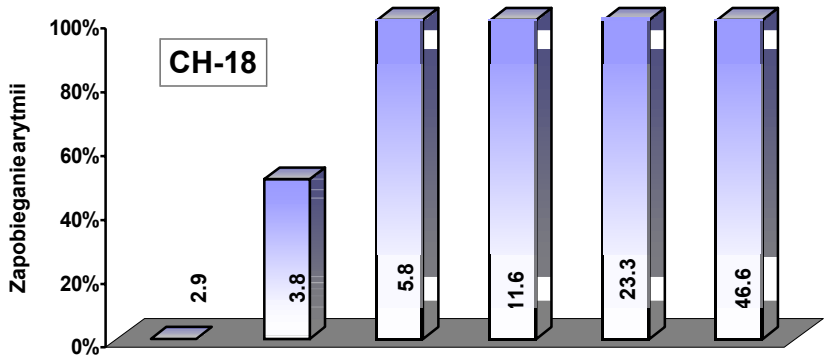
Związek **CH-17** w dawkach równoważnych 1/5, 1/10 i 1/20 LD_{50} całkowicie zabezpieczał badane zwierzęta przed zaburzeniami poadrenalinowymi i śmiercią. W dawce 1/40 LD_{50} zabezpieczał 60% zwierząt przed bradykardią i 80% przed blokami oraz ekstrasystolami, a całkowicie chronił zwierzęta przed bigeminią i śmiercią. Podanie 1/80 LD_{50} prowadziło do osłabienia działania przeciwarytmicznego związku: zabezpieczenie przed ekstrasystolami u 17% zwierząt, przed blokami i śmiercią u ok. 34% zwierząt. Obliczona wartość ED_{50} dla związku **CH-17** w tym modelu arytmii wynosi: 3.6 mg/kg, Indeks terapeutyczny = 55 (Ryc.5, Tab.3).



Ryc.5. Aktywność przeciwarytmiczna związku **CH-17** (2.4, 4.9, 9.9, 19.8, 36.9 mg/kg) w modelu arytmii adrenalinowej u szczura podaniu dożylnym

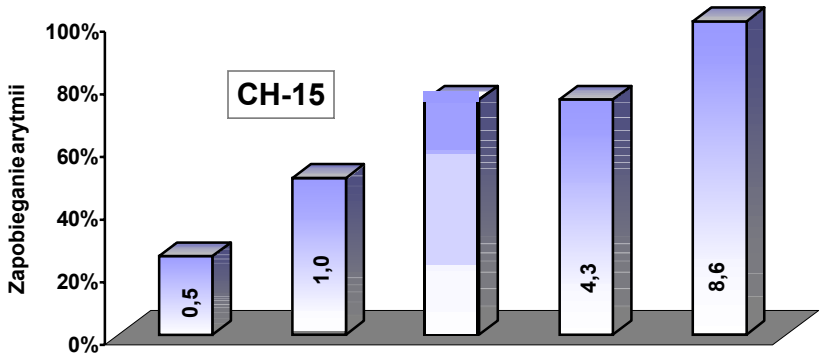
Związek **CH-18**, podany na 15 min przed arytmogenem, w dawkach odpowiadających 1/5, 1/10 i 1/20 LD_{50}, całkowicie zapobiegał zaburzeniom poadrenalinowym i zabezpieczał zwierzęta przed śmiercią. W dawce 1/40 LD_{50} zapobiegał bradykardii i blokom u ok. 67% zwierząt oraz całkowicie chronił przed

śmiercią. W dawce 1/60 LD_{50} zabezpieczał 50% zwierząt przed bradykardią, ekstrasystolami i blokami oraz 63% zwierząt przed śmiercią. Dopiero w dawce 1/80 LD_{50} obserwowano zanik aktywności i wystąpienie ekstrasystoli (u 100% zwierząt), bloków i bradykardii (u 75% zwierząt). Zaburzenia te doprowadzały do śmierci 50% zwierząt. Obliczona wartość ED_{50} dla związku **CH-18** w tym modelu arytmii wynosi: 3.9 mg/kg, Indeks terapeutyczny = 59.8 (Ryc.6, Tab.3).



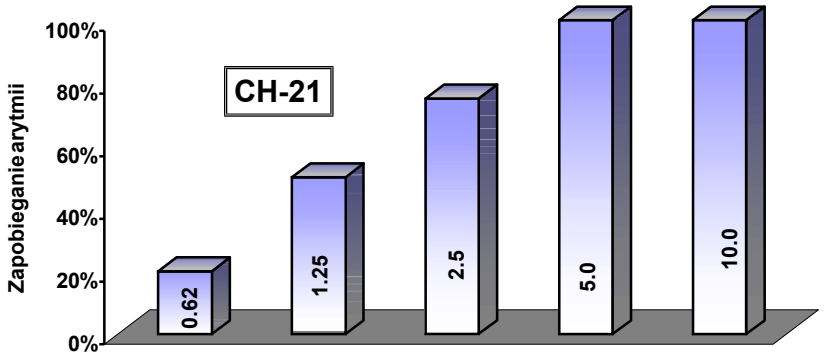
Ryc.6. Aktywność przeciwarytmiczna związku **CH-18** (2.9, 3.8, 5.8, 11.6, 23.3, 46.6 mg/kg) w modelu arytmii adrenalinowej u szczura po podaniu dożylnym

Związek **CH-15** podany w dawce 1/5 LD_{50} całkowicie zabezpieczał badane zwierzęta przed wszystkimi rodzajami zaburzeń poadrenalinowych oraz śmiercią. Natomiast w dawce 1/10 LD_{50} 75% zwierząt chronił przed zaburzeniami poadrenalinowymi. Po podaniu dawki 1/20 i 1/40 LD_{50} zwierzęta nadal chronił przed śmiercią oraz częściowo przed blokami (50-25% zwierząt), ekstrasystolami (75-50% zwierząt) i bigeminią (37%). Dopiero podanie dawki 0,5 mg/kg odpowiadającej 1/80 LD_{50} prowadziło do znacznego osłabienia aktywności przeciwarytmicznej badanego związku. Obliczona wartość ED_{50} dla związku **CH-15** w tym modelu arytmii wynosi: 1.08 mg/kg, Indeks terapeutyczny = 40.2 (Ryc. 7, Tab. 3).



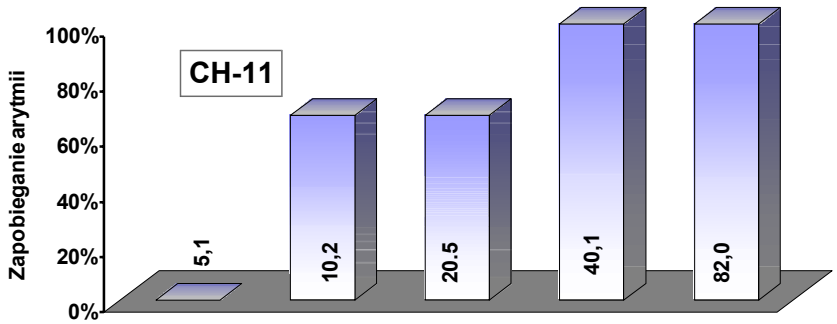
Ryc.7. Aktywność przeciwarytmiczna związku **CH-15** (0.5, 1.0, 2.1, 4.3, 8.6 mg/kg) w modelu arytmii adrenalinowej u szczura po podaniu dożylnym

Związek **CH-21**, podany na 15 min przed arytmogenem, w dawce 1/5 LD_{50}, całkowicie zapobiegał zaburzeniom poadrenalinowym i zabezpieczał zwierzęta przed śmiercią. Natomiast podany w dawkach odpowiadających 1/10, 1/20 LD_{50} zmniejszał wystąpienie ekstrasystoli u ok. 100-75% zwierząt i nadal całkowicie chronił je przed śmiercią. W dawce 1/40 LD_{50} zapobiegał ekstrasystolom ok. 50% zwierząt i chronł 25% zwierząt przed śmiercią. Dopiero w dawce 1/80 LD_{50} obserwowano zanik aktywności i wystąpienie ekstrasystoli (u 80% zwierząt), bloków i bradykardii (u 100% zwierząt). Zaburzenia te doprowadzały do śmierci 50% zwierząt. Obliczona wartość ED_{50} dla związku **CH-21** w tym modelu arytmii wynosi: 1.25 mg/kg, Indeks terapeutyczny = 40.2 (Ryc.8, Tab.3).



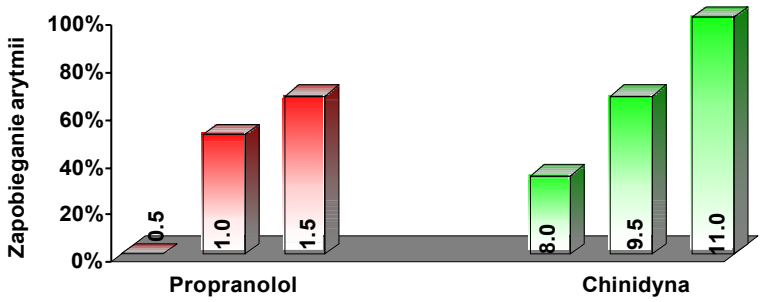
Ryc.8. Aktywność przeciwarytmiczna związku **CH-21** (0.62, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0 mg/kg) w modelu arytmii adrenalinowej u szczura po podaniu dożylnym

Związek **CH-11** podany w zakresie dawek od 2/5 – 1/5 LD_{50} zapobiegał przedwczesnym pobudzeniom komorowym i nadkomorowym, wywołanych podaniem adrenaliny oraz chronił zwierzęta przed śmiercią. Podany w zakresie dawek 1/10 – 1/20 LD_{50} zabezpieczał ok. 60% zwierząt przed wystąpieniem zaburzeń poadrenalinowych. Aktywność przeciwarytmiczna związku **CH-11** zanikała po podaniu dawki 5.1 mg/kg tj. 1/40 LD_{50}. Wyliczona wartość ED_{50} = 16.5 (9.5 – 28.6) mg/kg, a IT = 12.1 (Ryc.9, Tab.3).



Ryc.9. Aktywność przeciwarytmiczna związku **CH-11** (5.1, 10.2, 20.5, 41.0, 82.0 mg/kg) w modelu arytmii adrenalinowej u szczura po podaniu dożylnym

Związek odniesienia **propranolol** podany w dawce 1.0 i 1.5 mg/kg chronił odpowiednio 50.0 i 66.7% zwierząt przed wystąpieniem ekstrasystoli. W dawce 0.5 mg/kg obserwowano zanik aktywności przeciwarytmicznej (Ryc. 10). **Chinidyna** w dawce 11.0 mg/kg zabezpieczała przed arytmią 100% zwierząt. W dawce 8.0 i 9.5 mg/kg wywierała działanie ochronne u 33.8 i 66.7% zwierząt w stosunku do kontroli (Ryc. 10). Wartości ED_{50} i IT dla związków odniesienia przedstawiono w Tab.3.



Ryc.10. Aktywność przeciwarytmiczna propranololu (0.5, 1.0, 1.5 mg/kg) i chinidyny (8.0, 9.5, 11.0 mg/kg) w modelu arytmii adrenalinowej szczura po podaniu dożylnym

Tabela 3. Profilaktyczna aktywność przeciwarytmiczna badanych związków i związków odniesienia

Droga podania związków: *i.v.* Arytmogen: adrenalina (20 μg/kg *i.v.*) Znieczulenie ogólne: tiopental (60 mg/kg *i.p.*)

Związek	**ED_{50} (mg/kg)**	**Indeks terapeutyczny (LD_{50}/ED_{50})**
CH-1	3.5 (2.9-4.1)	54.9
CH-9	21.2 (16.5-27.8)	3.54
CH-11	16.5 (9.5-28.6)	12.1
CH-12	9.2 (6.3-19.5)	9.5
CH-15	1.0 (0.64 – 1.76)	40.2
CH-17	3.6 (2.6-5.0)	55.0
CH-18	3.9 (3.5-4.5)	59.8
CH-21	1.25 (9.1-24.7)	40.2
Chinidyna	8.70 (8.0-9.4)	6.0
Propranolol	1.05 (0.64 - 1.73)	37.0

Związki **CH-9**, **CH-10**, **CH-12**, **CH-13**, **CH-14**, **CH-19** i **CH-20**, z wyjątkiem **CH-16,** podane w zakresie dawek odpowiadających 2/5 - 1/10 LD_{50} wykazały efekt przeciwarytmiczny w tym modelu arytmii, ale posiadały mniejsze bezpieczeństwo stosowania (Tab. 4). Natomiast związek **CH-16** nie wykazał działania przeciwarytmicznego.

Tabela 4. Profilaktyczna aktywność przeciwarytmiczna badanych związków

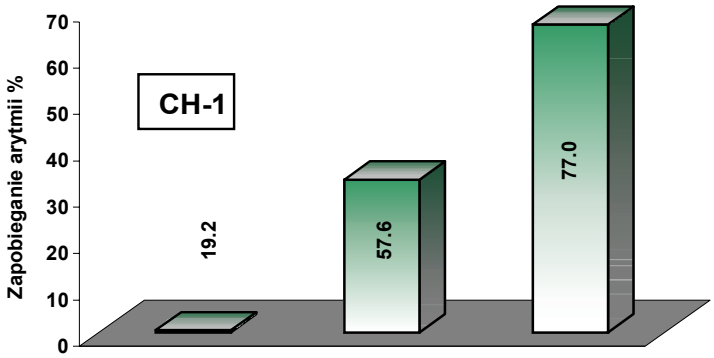
Droga podania związków: *i.v.*
Arytmogen: adrenalina (20 μg/kg *i.v.*)
Znieczulenie ogólne: tiopental (60 mg/kg *i.p.*)

Związek	**ED_{50} (mg/kg)**	**Indeks terapeutyczny (LD_{50}/ED_{50})**
CH-9	21.2 (16.5-27.8)	3.54
CH-10	14.9 (9.6-20.8)	6.0
CH-12	9.2 (6.3-19.5)	9.5
CH-13	6.7 (5.2-8.1)	7.2
CH-14	7.9 (6.0- 9.3)	8.5
CH-19	7.1 (5,9- 8,9)	8.7
CH-20	7.1 (5.2- 9.5)	9.2

1.3.2. Model arytmii barowej

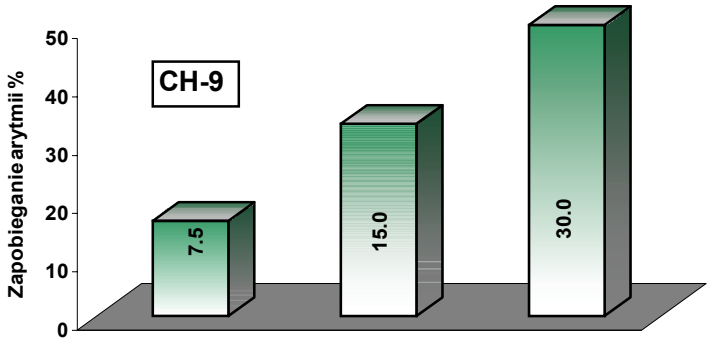
Trzy z przebadanych związków, tj.: **CH-9**, **CH-10 i CH-11** oraz związek odniesienia **CH-1**, podane dożylnie na 15 minut przed arytmogenem, wykazywały aktywność przeciwarytmiczną w tym teście (Tab. 5).

- Związek **CH-1** podany dawce 2/5 LD_{50} i.v zapobiegał wystąpieniu przedwczesnych pobudzeń nadkomorowych i komorowych u 66,4% zwierząt oraz całkowicie zabezpieczał zwierzęta przed śmiercią. Podany w dawce 57.6 mg/kg chronił 33% zwierząt przed wystąpieniem ekstrasystoli oraz zmniejszał śmiertelność zwierząt o 33.7%. Aktywność przeciwarytmiczna związku **CH-1** zanikała po podaniu dawki 1/10 LD_{50}. Obliczona wartość ED_{50} dla związku **CH-1** w tym modelu arytmii wynosi: 58.7 mg/kg, Indeks terapeutyczny = 3.2 (Ryc.11, Tab.5).



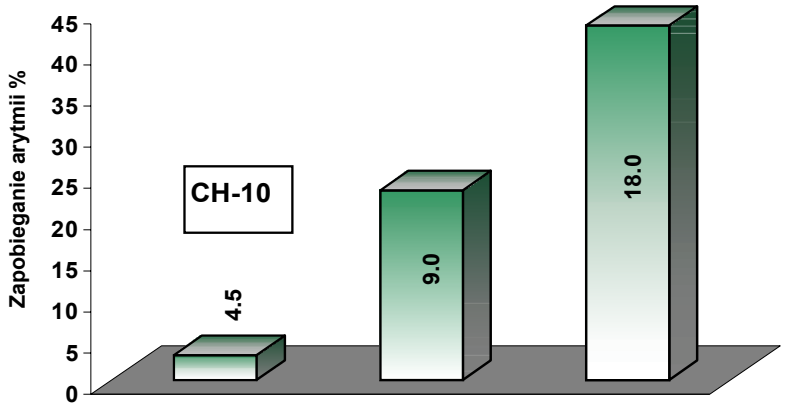
Ryc.11. Aktywność przeciwarytmiczna związku **CH-1** (19.2, 57.6, 77.0 mg/kg) w modelu arytmii barowej u szczura po podaniu dożylnym

- Związek **CH-9** podany w zakresie dawek odpowiadających 2/5-1/5 LD_{50} i.v. na 15 minut przed arytmogenem zabezpieczał zwierzęta przed wystąpieniem fibrylacji (u ok. 33-17%) i ekstrasystoli (u ok. 16.4-50%) oraz całkowicie (w dawce wyższej) lub częściowo (w dawce niższej) chronił zwierzęta przed śmiercią. Obliczona wartość ED_{50} dla związku **CH-9** w tym modelu arytmii wynosi: 11.8 mg/kg, Indeks terapeutyczny = 6.3 (Ryc.12, Tab. 5).



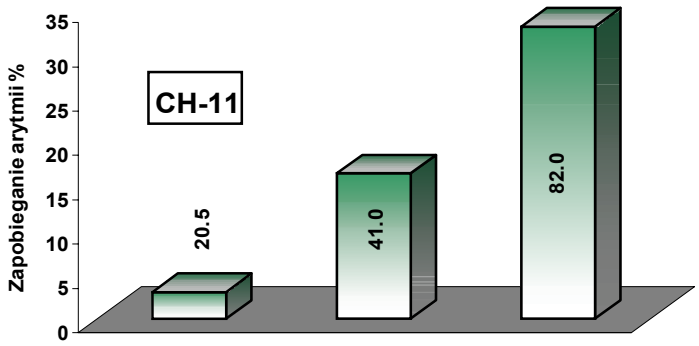
Ryc.12. Aktywność przeciwarytmiczna związku **CH-9** (7.5, 15.0, 30.0 mg/kg) w modelu arytmii barowej u szczura po podaniu dożylnym

Związek **CH-10** w dawce 1/5 i 1/10 LD_{50} i.v zapobiegał wystąpieniu fibrylacji u ok. 27% zwierząt i ekstrasystolom u 43-23% oraz całkowicie lub częściowo zabezpieczał zwierzęta przed śmiercią (Tab. 5). Aktywność przeciwarytmiczna związku **CH-10** zanikała po podaniu dawki 1/20 LD_{50}. Obliczona wartość ED_{50} dla związku **CH-10** w tym modelu arytmii wynosi: 13.7 mg/kg, Indeks terapeutyczny = 6.5 (Ryc.13).



Ryc.13. Aktywność przeciwarytmiczna związku **CH-10** (4.5, 9.0, 18.0, mg/kg) w modelu arytmii barowej u szczura po podaniu dożylnym

Związek **CH-11** w zakresie dawek 2/5-1/5 LD_{50} i.v zapobiegał u 34% zwierząt fibrylacji i pobudzeniom komorowym i nadkomorowym (u ok.33-16%) oraz zmniejszał śmiertelność zwierząt w porównaniu do grupy kontrolnej. W dawce odpowiadającej 1/10 LD_{50} efekt przeciwarytmiczny ulegał zanikowi. Obliczona wartość ED_{50} dla związku **CH-11** w tym modelu arytmii wynosi: 82.3mg/kg, Indeks terapeutyczny = 2.5 (Ryc.14, Tab.5).



Ryc.14. Aktywność przeciwarytmiczna związku **CH-11** (20.5, 41.0, 82.0 mg/kg) w modelu arytmii barowej u szczura po podaniu dożylnym

Tabela 5. Profilaktyczna aktywność przeciwarytmiczna badanych związków

Droga podania związków: *i.v.*

Arytmogen: chlorek baru (32 mg/kg *i.v.*)

Znieczulenie ogólne: tiopental (60 mg/kg *i.p.*)

Związek	**Dawka (mg/kg)**	**Ekstrasystole (%)**	**Śmiertelność (%)**
Kontrola (0.9% NaCl)	–	83	67
CH-1	19.2 57.6 77.0	100 50 16.6	67 33.3 0
CH-9	7.5 15.0 30.0	66.6 33.3 33.3	50 33.3 0
CH-10	4.5 9.0 18.0	80 60 40	60 40 0
CH-11	20.5 41.0 82.0	80 66.6 50	40 16.6 0

Wszystkie pozostałe badane związki podane w 1/5 $LD_{50 i.v.}$ nie wykazały istotnego działania przeciwarytmicznego w zaburzeniach rytmu serca wywołanych podaniem chlorku baru (Tab. 6)

Tabela 6. Profilaktyczna aktywność przeciwarytmiczna badanych związków

Droga podania związków: *i.v.*

Arytmogen: chlorek baru (32 mg/kg *i.v.*)

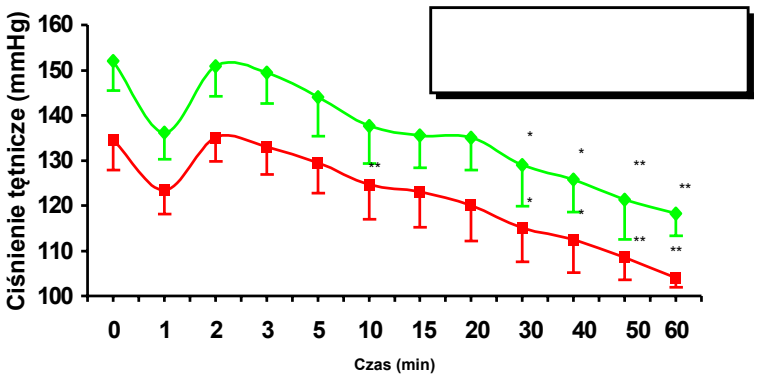
Znieczulenie ogólne: tiopental (60 mg/kg *i.p.*)

Związek	Dawka (mg/kg)	Ekstrasystole (%)	Śmiertelność (%)
Kontrola (0.9% NaCl)	–	83	67
CH-12	17.4	66.6	66.6
CH-13	9.6	50	83.3
CH-14	13.6	80	60
CH-15	8.6	100	100
CH-16	21.2	100	100
CH-17	39.6	75	25
CH-18	46.6	100	100
CH-19	12.4	80	60
CH-20	13,1	80	60
CH-21	10.0	100	100

1.4 Aktywność hipotensyjna u normotensyjnego szczura

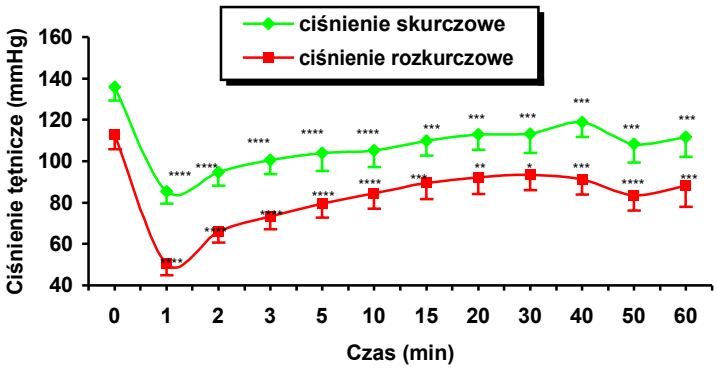
Z przebadanych związków jedynie związki: **CH-9**, **CH-11**, **CH-12**, podobnie jak **CH-1** podane dawce 1/10 $LD_{50 i.v.}$ wykazały dłużej utrzymującą się, istotną aktywność hipotensyjną.

- Związek **CH-1** wywierał znamienne działanie hipotensyjne, począwszy od 30 minut od podania. Obserwowane spadki ciśnienia skurczowego o 23-33.8 mmHg (15.1-22.2%), rozkurczowego o 19.5-30.6 (12.8-22.7%) utrzymywały się powyżej 60 minutowej obserwacji (Ryc. 15).



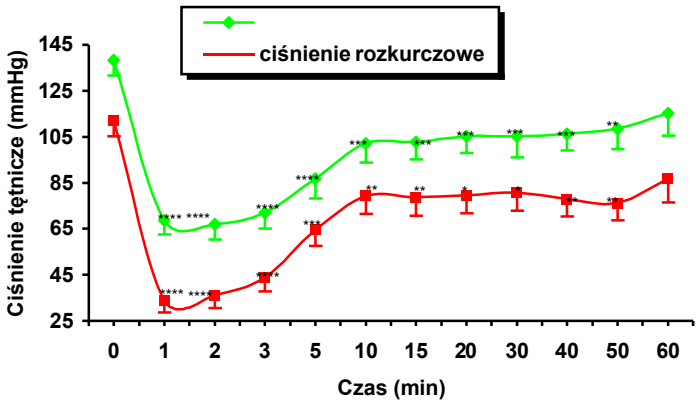
Ryc.15. Wpływ związku **CH-1** na ciśnienie skurczowe krwi u normotensyjnego, znieczulonego tiopentalem szczura (60 mg/kg *i.p.*); *p<0.05, **p<0.02 (test ANOVA)

- Związek **CH-9** obniżał znamiennie ciśnienie skurczowe średnio o 50-20 mmHg (ok. 37-14.7%) oraz ciśnienie rozkurczowe o 62-20 mmHg (55-17.7%). Obserwowany spadek ciśnienia tętniczego utrzymywał się w ciągu 60 minut obserwacji (Ryc. 16).



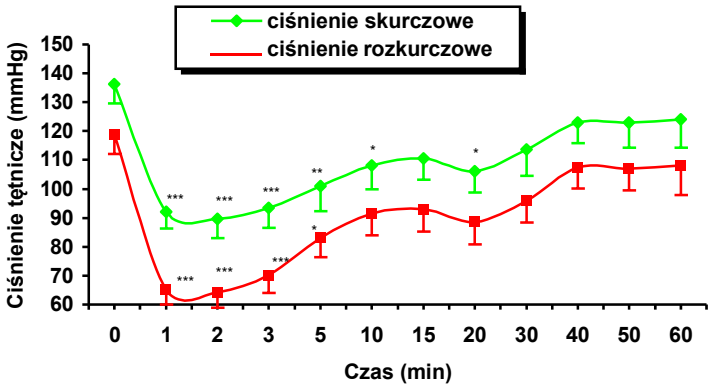
Ryc.16. Wpływ związku **CH-9** na ciśnienie skurczowe krwi u normotensyjnego, znieczulonego tiopentalem szczura (60 mg/kg *i.p.*); *p<0.05, **p<0.02, ***p<0.01, ****p<0.001 (test ANOVA)

- Związek **CH-11** obniżał znamiennie, do 50 minut obserwacji, ciśnienie skurczowe o ok. 70 -23 mmHg (ok. 50-16.6 %), a ciśnienie rozkurczowe o ok. 78-25 mmHg (ok. 70 -22 %), (Ryc. 17).



Ryc.17. Wpływ związku **CH-11** na ciśnienie skurczowe krwi u normotensyjnego, znieczulonego tiopentalem szczura (60 mg/kg *i.p.*); *p<0.05, **p<0.02, ***p<0.01, ****p<0.001 (test ANOVA)

- Związek **CH-12**, podany dożylnie w dawce 1/10 LD_{50}, obniżał znamiennie ciśnienie skurczowe do 20 minut od podania o ok. 46-26 mmHg (34-18 %), a ciśnienie rozkurczowe do 5 minut o 55-36 mmHg (46-30 %), (Ryc. 18).



Ryc.18. Wpływ związku **CH-12** na ciśnienie skurczowe krwi u normotensyjnego, znieczulonego tiopentalem szczura (60 mg/kg *i.p.*); *p<0.05, **p<0.02, ***p<0.01 (test ANOVA)

Pozostałe związki podane w 1/10 $LD_{50 i.v.}$ wywoływały znamienne, bardzo krótkotrwałe (1-5 minut) spadki ciśnienia skurczowego, w granicach 58.7-27.1 mmHg (38.3-20.4 %) oraz rozkurczowego 56.6-24.3 mmHg (40.9-23.8 %), (zw. **CH-10**, **CH-14**, **CH-15**, **CH-17**, **CH-19**, **CH-20** i **CH-21**) lub nie wpływały znacząco na ciśnienie tętnicze krwi u normotensyjnego szczura (**CH-13**, **CH-16**, **CH-18**), (Tab. 7a i 7b).

Tabela 7a. Wpływ badanych związków na ciśnienie tętnicze krwi u normotensyjnego szczura

Droga podania: *i.v.*
Znieczulenie ogólne: tiopental (60 mg/kg *i.p.*)

Związek	Dawka (mg/kg)	Ciśnienie (mmHg)	Czas obserwacji (min)								
			0	**1**	**5**	**10**	**20**	**30**	**40**	**50**	**60**
CH-10	9.0	skurczowe	126.4 ± 15.6	97.8 ± 20.7 **	113.8 ± 13.6	112.0 ± 12.9	112.8 ± 9.3	113.8 ± 10.5	113.0 ± 12.8	115.4 ± 10.5	115.0 ± 12.2
		rozkurczowe	104.0 ± 15.6	69.6 ± 20.5 ****	92.5 ± 12.2	94.0 ± 8.7	98.4 ± 9.7	97.8 ± 11.9	98.0 ± 14.6	99.8 ± 13.8	100.8 ± 12.2
CH-13	4.8	skurczowe	133.2 ± 5.2	130.0 ± 5.8	139.2 ± 5.9	137.5 ± 5.9	143.0 ± 4.4	138.0 ± 7.5	137.3 ± 13.5	138.0 ± 3.2	134.3 ± 12.7
		rozkurczowe	106.5 ± 8.0	98.7 ± 8.3	112.7 ± 14.3	113.2 ± 7.7	115.7 ± 7.4	108.2 ± 8.2	104.7 ± 12.4	104.7 ± 12.2	103.3 ± 12.2
CH-14	6.8	skurczowe	162.0 ± 11.0	139.0 ± 18.3	124.3 ± 10.9	132.3 ± 13.4	137.0 ± 11.7	134.7 ± 13.8	136.0 ± 13.4	143.7 ± 6.8	144.3 ± 13.2
		rozkurczowe	133.7 ± 11.7	110.7 ± 18.9	96.7 ± 10.9	107.3 ± 12.5	112.0 ± 10.6	108.7 ± 13.5	108.0 ± 14.4	116.3 ± 7.5	117.0 ± 14.0
CH-15	4.3	skurczowe	148.0 ± 4.5	98.3 ± 22.8 ***	132.4 ± 11.2	131.0 ± 9.4	129.7 ± 8.3	129.7 ± 6.8	125.3 ± 6.6	126.0 ± 7.0	121.0 ± 5.1
		rozkurczowe	131.0 ± 4.8	77.7 ± 24.0 ***	118.0 ± 11.1	117.3 ± 9.3	117.0 ± 7.5	116.3 ± 6.2	112.0 ± 7.3	113.3 ± 7.8	106.0 ± 5.7
CH-16	10.6	skurczowe	156.7 ± 10.3	156.7 ± 11.4	155.0 ± 13.0	155.0 ± 9.4	155.0 ± 10.4	151.0 ± 7.6	150.0 ± 6.9	147.7 ± 5.7	146.7 ± 7.2
		rozkurczowe	143.3 ± 9.6	144.7 ± 9.8	146.3 ± 11.3	144.3 ± 8.9	144.0 ± 7.5	141.0 ± 6.0	140.0 ± 6.3	141.7 ± 4.8	137.0 ± 5.3
CH-17	19.8	skurczowe	152.4 ± 12.5	93.3 ± 4.9 ****	143.3 ± 9.5	139.3 ± 6.6	136.3 ± 3.8	136.7 ± 2.3	137.3 ± 3.1	136.3 ± 1.7	135.3 ± 0.3
		rozkurczowe	138.3 ± 12.5	81.7 ± 6.4 ****	127.3 ± 9.5	125.7 ± 6.5	124.0 ± 4.7	125.7 ± 2.9	127.3 ± 3.0	127.0 ± 1.5	125.7 ± 0.6

Wyniki przedstawiają średnie ± SEM z 5 - 6 zwierząt w grupie. Różnica statystycznie znamienna w porównaniu z ciśnieniem przed podaniem związku (test ANOVA): **p<0.02, ***p<0.01, ****p<0.001

Tabela 7b. Wpływ badanych związków na ciśnienie tętnicze krwi u normotensyjnego szczura

Droga podania: *i.v.*
Znieczulenie ogólne: tiopental (60 mg/kg *i.p.*)

Związek	Dawka (mg/kg)	Ciśnienie (mmHg)	Czas obserwacji (min)								
			0	**1**	**5**	**10**	**20**	**30**	**40**	**50**	**60**
CH-18	2.9	skurczowe	138.3 ± 15.0	122.0 ± 8.5	125.0 ± 5.5	130.0 ± 5.0	134.3 ± 6.2	135.3 ± 8.1	135.3 ± 9.2	132.7 ± 7.8	132.0 ± 6.3
		rozkurczowe	122.3 ± 17.5	106.7 ± 13.3	111.3 ±8.5	117.3 ± 6.2	120.3 ± 6.3	121.7 ± 7.5	120.7 ± 7.3	119.0 ± 7.0	132.0 ± 6.3
CH-19	4.8	skurczowe	132.3 ± 7.5	95.0 ± 9.5 ***	105.2 ± 9.7 *	114.3 ± 8.9	119.2 ± 11.4	122.7 ± 9.3	123.1 ± 6.5	121.3 ± 9.8	119.8 ± 7.5
		rozkurczowe	119.2 ± 7.3	79.6 ± 10.0 ***	91.3 ± 8.2 *	101.7 ± 8.6	106.5 ± 11.3	108.3 ± 17.5	109.7 ± 10.4	108.2 ± 8.2	107.6 ± 12.7
CH-20	4.6	skurczowe	128.0 ± 4.3	85.8 ± 11.2 ***	96.7 ±5.8 **	109.5 ± 7.7	115.2 ± 8.3	116.5 ± 7.0	118.9 ± 7.8	109.2 ± 12.9	118.6 ± 9.3
		rozkurczowe	105.2 ± 6.5	62.5 ± 8.5 ***	75.3 ± 9.0 **	97.2 ± 4.8	86.6 ± 10.4	91.6 ± 5.2	94.2 ± 9.7	82.6 ± 6.9	83.7 ± 6.4
CH-21	6.6	skurczowe	120.3 ± 7.1	92.1 ± 8.6 *	101.3 ± 5.8	103.4 ± 7.3	112.3 ± 9.2	113.3 ± 9.5	112.6 ± 7.3	113.1 ± 8.2	113.0 ± 5.7
		rozkurczowe	102.0 ± 4.3	77.7 ± 6.2 *	93.9 ± 8.9	95.5 ± 9.6	92.1 ± 8.6	94.7 ± 8.0	92.3 ± 6.5	95.2 ± 9.4	95.4 ± 8.2

Wyniki przedstawiają średnie ± SEM z 5 - 6 zwierząt w grupie. Różnica statystycznie znamienna w porównaniu z ciśnieniem przed podaniem związku (test ANOVA): *$p<0.05$, **$p<0.02$, ***$p<0.01$

1.5 Wpływ na prawidłowy elektrokardiogram szczura „in vivo"

Związek **CH-1,** podany dożylnie w dawce 1/5 LD_{50} zwiększał częstotliwość pracy serca (o 100-45 uderzeń/minutę) oraz skracał istotnie czas trwania odcinka P-Q (o ok. 42-50%) i Q-T (o ok. 33-34%). Obserwowany efekt był aminofilino-podobny (Tab. 8a).

Związek **CH-9** , w sposób statystycznie nieistotny, bezpośrednio po podaniu (1-5 minut) zmniejszał częstotliwość pracy serca (o ok.52-45 uderzeń/min) z równoczesnym bardzo nieznacznym wydłużeniem czasu trwania odcinka P-Q (o ok. 3 msek) i Q-T (o ok. 7 msek), nie zmieniając czasu trwania zespołu QRS (Tab. 8a).

Związek **CH-10**, bezpośrednio po podaniu, nieznacznie (o 41 uderzeń/min) zmniejszał częstotliwość pracy serca, a następnie ją zwiększał (o 35-12 uderzeń/min). Przejściowemu zwolnieniu akcji serca towarzyszyło najpierw wydłużenie czasu trwania odcinka P-Q i Q-T, a następnie nieznaczne skrócenie czasu trwania tych odcinków (Tab.8a).

Związek **CH-11**, podany w analogicznej dawce, bezpośrednio po podaniu, statystycznie znamiennie zwalniał czynność akcji serca (o 88 uderzeń/min), wydłużał czas trwania odcinka P-Q (o 13 msek), Q-T (o 26 msek) i zespołu QRS (o ok. 2 msek), a następnie zwiększał częstotliwość pracy serca o ok. 55-12 uderzeń/min) oraz skracał czas trwania odcinka P-Q (o 8 msek), Q-T (o 7 msek) i zespołu QRS (o 0,8 msek), (Tab. 8a).

Związek **CH-12**, bezpośrednio po podaniu, zmniejszał statystycznie nieznamiennie (o 24 uderzeń/min) częstotliwość pracy serca z równoczesnym bardzo nieznacznym wydłużeniem czasu trwania odcinka P-Q (o 3 msek) i Q-T (o ok. 7 msek.). Następnie obserwowano zwiększenie częstotliwości pracy serca (o ok. 14-10 uderzeń/min.), (Tab. 8a).

Związek **CH-13**, podany w analogicznej dawce, nieznacznie (o ok. 17-21 skurczów/min) zmniejszał częstotliwość pracy serca, czemu towarzyszyło statystycznie nieistotne wydłużenie czasu trwania odcinka P-Q (o ok. 7-8 msek.) i Q-T (o ok. 4-6 msek.). Czas trwania zespołu QRS nie ulegał zmianie (Tab. 8a).

Związek **CH-14**, podany w dawce 1/5 LD_{50} bezpośrednio po podaniu (1-5 min) zwalniał statystycznie nieistotnie czynność akcji serca (o ok. 24-22 skurczów/min), wydłużał czas trwania odcinka P-Q (o ok. 6 msek.) oraz Q-T (o ok. 6-7 msek.). Istotne wydłużenie czasu trwania odcinka P-Q oraz Q-T (o ok. 10 msek.) wystąpiło w 15 min. obserwacji (Tab. 8a).

Związek **CH-15** w sposób statystycznie znamienny zmniejszał częstotliwość pracy serca o około 50 uderz./min w piątej minucie i o około 70 uderz./min w 15 minucie oraz wydłużał czas trwania odcinka P-Q (o ok. 4 msek.) i Q-T (o ok. 9-10 msek.), nie zmieniając czasu trwania zespołu QRS (Tab. 89b).

Związek **CH-16**, podany w dawce 1/5 LD_{50}, również zwalniał akcję serca. Bezpośrednio po podaniu (w pierwszej minucie) spadek częstotliwości był nieznamienny (ok. 50 uderz./min), jednak w 5 i 15 minucie nasilał się i nabrał znamienności statystycznej (odpowiednio o 95 uderz./min. w piątej minucie i o 70 uderz./min w piętnastej minucie). Jednocześnie ze spadkiem częstotliwości obserwowano wydłużenie czasu trwania odcinków P-Q (o ok. 10 msek) i Q-T (o ok. 7 msek.) oraz bardzo nieznacznie czasu trwania zespołu QRS (o ok. 1,5 msek.), (Tab. 8b).

Związek **CH-17**, podany w analogicznej dawce, znamiennie zwiększał częstotliwość pracy serca począwszy od pierwszej do piętnastej minuty (o ok. 90 uderz./min.) oraz skracał się czas trwania odcinków P-Q o ok. 3-5 msek. i Q-T o ok. 7 msek., a także czas trwania zespołu QRS (o ok. 1,5-2 msek), (Tab. 8b).

Związek **CH-18**, podany dożylnie w dawce odpowiadającej 1/5 LD_{50}, nie wpływał znamiennie ani na częstotliwość pracy serca, ani na czas trwania poszczególnych odcinków EKG, (Tab.8b).

Związek **CH-19**, bezpośrednio po podaniu (1-5 minut), zmniejszał w sposób statystycznie nieistotny (o ok. 16-37 uderzeń/min.) częstotliwość pracy serca z równoczesnym nieznacznym wydłużeniem czasu trwania odcinka P-Q (o ok. 5-7.5

msek.), Q-T (o ok. 2.5-9 msek.). W 15 minucie obserwowano dalsze, istotne statystycznie, zmniejszenie częstotliwości pracy serca (o ok. 44 skurczów/min.) oraz znamienne wydłużenie czasu trwania odcinka P-Q (o ok. 10 msek.), (Tab. 8b).

- Związek **CH-20** zwalniał statystycznie nieistotnie czynność akcji serca (o ok. 19.6-35.5 skurczów/min.), wydłużał czas trwania odcinka P-Q (o ok. 5.1-6.7 msek.), Q-T (o ok. 4-6 msek.), (Tab. 8b).

- Związek **CH-21** zwalniał statystycznie nieistotnie czynność akcji serca (o ok. 18-30 skurczów/min.), wydłużał czas trwania odcinka P-Q (o ok. 3-6 msek.), Q-T (o ok. 3-4 msek.), (Tab.8b).

Tabela 8a. Wpływ badanych związków na elektrokardiogram szczura

Droga podania: *i.v.*
Znieczulenie ogólne: tiopental (60 mg/kg *i.p.*)

Związek	Dawka **(mg/kg)** 1/5 LD $_{i.v.}$	Parametr	**Czas obserwacji (min)**			
			0	1	5	15
CH-1	38,4	P-Q(msek) QRS(msek) Q-T(msek) Częstotliwość (uderz./min.)	40 ± 0 20 ± 0 70 ± 6 435 ± 15	27 ± 2*** 20 ± 0 42 ± 2 465 ± 15	25 ± 3*** 20 ± 0 40 ± 0 510 ± 17	20 ± 0*** 20 ± 0 40 ± 0*** 480 ± 24
CH-9	15	P-Q(msek) QRS(msek) Q-T(msek) Częstotliwość (uderz./min.)	49.3 ± 1.5 18.3 ± 0.4 72.3 ± 3.6 400.6 ±18.6	52.3 ± 1.7 19.0 ± 0.4 79.5 ± 3.6 348.7 ±18.1	52.2 ± 2.0 18.5 ± 0.6 77.3 ± 2.8 355.6 ±25.5	52.0 ± 2.7 18.7 ± 0.6 72.3 ± 3.9 388.9 ± 30.8
CH-10	18,0	P-Q(msek) QRS(msek) Q-T(msek) Częstotliwość (uderz./min.)	49.3 ± 1.2 19.6 ± 0,2 68.0 ± 1.4 405.0 ±15.3	55.0 ± 2.4* 19.3 ± 0.3 76.6 ± 2.5** 363.6 ±21.7	43.6 ± 1.4* 19.0 ± 0.3 63.3 ± 1.4 440.0 ±30.9	48.0 ± 2.1 19.1 ± 0.4 64.6 ± 3.8 417.2 ±22.8
CH-11	41,0	P-Q(msek) QRS(msek) Q-T(msek) Częstotliwość (uderz./min.)	48.6 ± 0.8 18.3 ± 0.2 67.6 ± 2.0 394.4 ±10.2	61.6±2.9**** 20.5±0.8*** 94.1±4.1**** 306.1±6.0****	41.0±0.5*** 17.4 ± 0.2 60.0 ± 0.7* 449.2±12.1***	52.5 ± 1.2 18.3 ± 0.4 68.0 ± 2.5 406.9 ±14.5
CH-12	17,4	P-Q(msek) QRS(msek) Q-T(msek) Częstotliwość (uderz./min.)	46.7 ± 2.1 19.0 ± 0.4 70.0 ± 3.6 430.5 ±13.6	50.0 ± 2.6 19.3 ± 0.4 77.5 ± 1.7 406.7 ± 13.8	45.0 ± 2.2 19.0 ± 0.4 67.5 ± 2.5 440.3 ± 23.8	44.8 ± 3.7 19.0 ± 0.4 66.2 ± 3.3 445.0 ± 22.6
CH-13	9,6	P-Q(msek) QRS(msek) Q-T(msek) Częstotliwość (uderz./min.)	50.2 ± 0.2 18.4 ± 0.5 62.0 ± 0.2 374.4 ±19.2	54.0 ± 8.9 18.4 ± 0.5 63.0 ± 5.8 357.0 ± 20.2	58.0 ± 4.5 18.8 ± 0.7 64.0 ± 5.0 358.8 ±23.7	58.0 ± 8.4 18.8 ± 0.7 68.0 ± 4.3 353.8 ±20.0
CH-14	13,6	P-Q(msek) QRS(msek) Q-T(msek) Częstotliwość (uderz./min.)	48.3 ± 3.0 19.0 ± 0.4 61.7 ± 1.7 394.0 ±15.2	54.2 ± 2.6 19.3 ± 0.4 68.7 ± 3.0 369.8 ± 12.9	54.0 ± 1.7 19.3 ± 0.4 68.7 ± 2.1 371.8 ±7.1	58.3 ± 4.3** 19.7 ± 0.3 71.7 ± 1.7** 348.0±10.9**

Wyniki przedstawiają średnie ± SEM z 6 zwierząt w grupie. Różnica statystycznie znamienna w porównaniu z odpowiednimi wartościami przed podaniem związku (test ANOVA):
*p<0.05; **p<0.02, ***p<0.01, ****p<0.001.

Tabela 8b. Wpływ badanych związków na elektrokardiogram szczura

Droga podania: *i.v.* Znieczulenie ogólne: tiopental (60 mg/kg *i.p.*)

Związek	Dawka (mg/kg) 1/5 LD i.v.	Parametr	Czas obserwacji (min)			
			0	1	5	15
CH-15	8,6	P-Q(msek) QRS(msek) Q-T(msek) Częstotliwość (uderz./min)	50,0 ± 0 19,3 ± 0,7 76,6 ± 3,3 361,0 ± 14	52,7 ± 1,4 19,5 ± 0,5 83,3 ± 0,9 342,0 ± 9	53,3 ± 2,9 20,3 ± 0,3 85,6 ± 0,7* 312,0±20,3*	54,3 ± 1,7* 20,5 ± 0,3 87,0 ± 1,5* 290,79,3***
CH-16	21,2	P-Q(msek) QRS(msek) Q-T(msek) Częstotliwość (uderz./min)	46.6 ± 3.3 20.3 ± 0.3 61.0 ± 1 361.0 ± 14	51,7 ± 1.7 21,3 ± 0.9 63,3 ± 3.3 311,0 ± 11	56.7 ± 3.3* 22.7 ± 1.4 68.3 ± 4.4 267.0±16.7***	55.0 ± 2.9* 21.7 ± 0.9 67.6 ± 1.4 292.3 ± 20.3**
CH-17	39,6	P-Q(msek) QRS(msek) Q-T(msek) Częstotliwość (uderz./min)	50.7 ± 1.5 20.2 ± 0.2 62.5 ± 1.4 377.7 ± 19.4	43.0 ± 1.2 17.7 ± 0.2 56.2 ± 2.4 464.0±20.8***	45.0 ± 2* 18.5 ± 0.8 55.0 ± 2.9 464.0±20.8***	47.5 ± 1.4 19.0 ± 1.0 54.5 ± 1.6 * 453.0 ± 17.5**
CH-18	46,6	P-Q(msek) QRS(msek) Q-T(msek) Częstotliwość (uderz./min.)	55.0 ± 5.0 17.6 ± 0.3 71.7 ± 4.4 339.3 ± 6.3	55.0 ± 2.9 18.3 ± 1.6 71.7 ± 4.4 347.0 ± 14	57.6 ± 2.3 20.3 ± 0.3 75.0 ± 2.9 325.0 ± 25	57.3 ± 3.5 19.3 ± 0.7 75.0 ± 2.9 325.0 ± 25
CH-19	12,4	P-Q(msek) QRS(msek) Q-T(msek) Częstotliwość (uderz./min.)	54.0 ± 2.7 19.6 ± 1.3 73.1 ± 4.8 331.5 ±13.5	59.2 ± 3.6 19.8 ± 0.9 75.6 ± 5.2 315.8 ± 18.0	61.5 ± 6.2 20.2 ± 1.1 82.0 ± 7.5 295.1 ±13.1	63.8 ± 8.2 * 20.8 ± 0.7 84.3 ± 6.2 287.4 ±9.6 *
CH-20	13,1	P-Q(msek) QRS(msek) Q-T(msek) Częstotliwość (uderz./min.)	55.0 ± 6.9 18.2 ± 1.3 76.0 ± 3.2 378.0 ± 21.3	61.7 ± 8.3 19.5 ± 0.9 82.0 ± 6.3 342.5 ± 18.2	9.5 ± 7.2 18.9 ± 1.3 78.4 ± 2.9 350.8 ± 19.1	60.1 ± 5.2 19.3 ± 0.9 80.0 ± 7.5 358.4 ± 22.3
CH-21	10,0	P-Q(msek) QRS(msek) Q-T(msek) Częstotliwość (uderz./min.)	50.1 ±5.2 19.0 ±1.6 80.7 ±4.3 365.2 ± 8.6	55.7 ±3.1 20.0 ±0.9 85.0 ±5.6 335.0 ± 13.9	53.4 ±4.8 19.8 ±1.3 83.3 ±2.2 347.6 ± 17.1	55.6 ±2.5 20.5 ±0.9 85.2 ±3.8 335.2 ± 11.4

Wyniki przedstawiają średnie ± SEM z 6 zwierząt w grupie. Różnica statystycznie znamienna w porównaniu z odpowiednimi wartościami przed podaniem związku (test ANOVA): *p<0.05;**p<0.02,***p<0.01

1.6 Wpływ na pracę wyosobnionego serca szczura

Badane 7,8- dipodstawione analogi teofiliny podane w zakresie stężeń 10^{-9} do 10^{-5}M, za wyjątkiem **CH-1** oraz **CH-17**, zmniejszały częstotliwość pracy izolowanego serca szczura, wypływ wieńcowy oraz wydłużały czas trwania odcinka P-Q, Q-T i zespołu QRS.

♦ Związek **CH-1** w zakresie stężeń 10^{-9} do 10^{-5} zwiększał częstotliwość pracy serca w granicach 5.3-38.1%. W krzywych EKG obserwowano, statystycznie istotne skrócenie odcinka P-Q (24.4-37.5%) i Q-T (16.1-25.0%) w zakresie stężeń $3x10^{-9}$ do $3x10^{-8}$, oraz brak znaczącego wpływu na zespół QRS. Równocześnie obserwowano nieznaczne zmniejszenie wypływu wieńcowego z 5.0 do 4.7 ml/min (6%), (Tab.9).

♦ Związek **CH-9**, w zakresie stężeń 10^{-9}-10^{-7} M zmniejszał częstotliwość o 22-29% oraz wydłużał czas trwania odcinka Q-T, nie zmieniając istotnie wypływu wieńcowego. W zakresie stężeń $3x\ 10^{-7}$ - 10^{-5} statystycznie znamiennie zmniejszał akcję serca o ok. 36-52%. W elektrokardiogramie obserwowano statystycznie istotne wydłużenie czasu trwania odcinka P-Q i Q-T oraz począwszy od stężenia 10^{-6} M zespołu QRS, (Tab. 10).

♦ Związek **CH-10**, począwszy od stężenia 10^{-8} M wydłużał znamiennie czas trwania odcinka P-Q i Q-T, a od stężenia 10^{-6} M zespołu QRS. Wydłużeniu odcinków P-Q, Q-T i zespołu QRS towarzyszyło zwolnienie czynności serca o 30%, (Tab. 11).

♦ Związek **CH-11**, podany w stężeniach 10^{-9}-$3x10^{-5}$ M, począwszy już od stężenia 10^{-8} M wydłużał czas trwania odcinka P-Q, a od 10^{-7} M czas trwania odcinka Q-T, natomiast od stężenia 10^{-6} -$3x10^{-6}$M również czas trwania zespołu QRS. Zmianom w elektrokardiogramie towarzyszyło narastające zwolnienie czynności serca (o 30-37%) oraz znamienne zmniejszenie wypływu wieńcowego (o17-29%,), które w stężeniu 10^{-5} M prowadziło do wystąpienia zaburzeń rytmu serca. (Tab. 12).

♦ Związek **CH-12** począwszy od stężenia 10^{-7} do $3x10^{-6}$ M statystycznie znamiennie zmniejszał liczbę uderzeń serca na minutę o 23.9-36.1%, wydłużał znamiennie czas trwania odcinka P-Q (18.9-37.0%), Q-T (23.6-49.4%) oraz

nieznacznie wydłużał czas trwania zespołu QRS (8.4%). Zwolnieniu rytmu serca towarzyszyło statystycznie znamienne zmniejszenie wypływu wieńcowego o 23.5%. Związek ten w najwyższym stężeniu 10^{-5} M wywoływał zaburzenia rytmu serca, (Tab. 13).

♦ Związek **CH-13,** podany w zakresie stężeń 10^{-9} do 10^{-5}M, dopiero w stężeniu 10^{-5} M powodował znamienne zmniejszenie częstotliwości pracy serca o 20.1%, z równoczesnym statystycznie istotnym wydłużeniem czasu trwania odcinka P-Q (18.6-21.4%), Q-T (19.9-24.9%) oraz bardzo nieznacznym poszerzeniem zespołu QRS ($3x10^{-6}$-10^{-5}M). Równocześnie obserwowano zmniejszenie wypływu wieńcowego o 3.8-17.3%, (Tab. 14).

♦ Związek **CH-14** w zakresie stężeń $3x10^{-6}$-10^{-5}M wydłużał znamiennie czas trwania odcinka P-Q (31.0-35.1%) i Q-T (20.8-26.1%), bez statystycznie istotnego wpływu na zespół QRS. Ponadto w zakresie stężeń $3x10^{-6}$-10^{-5} M zwalniał znamiennie ilość uderzeń serca na minutę w granicach 24.5-26.1% oraz nieznacznie zmniejszał wypływ wieńcowy z 5,1 do 4,5 ml/min, tj. o 1,9 do 11,7%, (Tab. 15).

♦ Związek **CH-15** w zapisie EKG nie wykazywał istotnego wpływu na czas trwania zespołu QRS, natomiast w przedziale stężeń $3x10^{-7}$ do 10^{-5} M wydłużał znamiennie odcinek P-Q (35.9-53.2%) oraz od stężenia 10^{-7} M także odcinek Q-T (20.3-35.8%). Zmianom tym towarzyszyło statystycznie istotne zmniejszenie częstotliwości pracy serca, w granicach 35.9-47.0 % oraz zmniejszenie wypływu wieńcowego z 5,0 do 4,1 ml/min (18%), (Tab. 16).

♦ Związek **CH-16** przy stężeniu $3x10^{-6}$ i 10^{-5} M powodował statystycznie istotne zwolnienie pracy wyizolowanego serca szczura o 19.6-22.8%, bez istotnego wpływu na wypływ wieńcowy. Ponadto, w zakresie stężeń 10^{-6}-10^{-5} M wydłużał czas trwania odcinka P-Q (21.9-35.7%) oraz odcinka Q-T (16.5-20.2%), nie wpływając istotnie na zespół QRS (Tab. 17).

♦ Związek **CH-17** w zakresie stężeń: $3x10^{-8}$ - 10^{-5} M wykazywał statystycznie istotny wzrost częstotliwości pracy serca o 21.4% - 16.1%, skrócenie odcinków P-Q o 16.6% - 12.4% oraz Q-T o 21.7% - 18.4%, bez znaczącego wpływu na zespół QRS oraz wypływ wieńcowy, (Tab. 18).

♦ Związek **CH-18**, począwszy od stężenia 10^{-7} M, wydłużał znamiennie czas trwania odcinka P-Q (23.0-77.7%) oraz Q-T (23.0-52.8%) przy równoczesnym statystycznie istotnym zwolnieniu pracy serca o 15.2-30.6% oraz wydłużeniu zespołu QRS (20.8-23%). Zmianom w EKG towarzyszyło znaczące obniżenie wypływu wieńcowego o 34% (z 5,0 do 3,3 ml/min), (Tab. 19).

♦ Związek **CH-19** od stężenia $3x10^{-6}$ M wydłużał istotnie statystycznie czas trwania zespołu QRS o 21.7-25.7%, od stężenia $3x10^{-7}$M czas trwania odcinka P-Q o 30.8-60.3%, a od stężenia 10^{-7}M taże odcinka Q-T o 20.8-49.2%. Obserwowanym zmianom od stężenia $3x10^{-7}$M towarzyszył znamienny spadek częstotliwości o 19.4-28.9% oraz zmniejszenie wypływu wieńcowego o 17%, (Tab. 20).

♦ Związek **CH-20** począwszy od stężenia 10^{-6} M, powodował istotne statystycznie zwolnienie częstotliwości pracy serca o 22.7-27.1% . Równocześnie ze zmniejszeniem liczby uderzeń serca na minutę w zakresie stężeń $3x10^{-7}$ do 10^{-5}M obserwowano znamienne wydłużenie odcinków P-Q i Q-T odpowiednio o 30.8-60.3% i 33.1-49.4% oraz wydłużenie zespołu QRS o 14.7-17.3%. Badany związek znamiennie zmniejszył wypływ wieńcowy z 4.8-3.6 ml/min (25%), (Tab. 21).

♦ Związek **CH-21** podany w zakresie stężeń 10^{-9} do 10^{-5}M, począwszy od stężenia 10^{-7} M powodował znamienne obniżenie częstotliwości pracy wyizolowanego serca o 15.1-30.6%, wydłużenie odcinka P-Q o 28.1-86.4% oraz odcinka Q-T o 33.1-61.5%, a od stężenia $3x10^{-6}$ M także wydłużenie czasu trwania zespołu QRS o 31.7-34.1%. W przedziale stężenie $3x10^{-7}$M - 10^{-5} M obserwowano również znamienne obniżenie wypływu wieńcowego o 23.6-30.95% (Tab. 22)

Tabela 9. Wpływ związku **CH-1** na wybrane parametry izolowanego serca szczura

Obserwowany parametr	DAWKA (mol/l)									
	0	**10^{-9}**	**$3x10^{-9}$**	**10^{-8}**	**$3x10^{-8}$**	**10^{-7}**	**$3x10^{-7}$**	**10^{-6}**	**$3x10^{-6}$**	**10^{-5}**
Częstotliwość/min	171,2±13,5	180,4 ±15,6	236,5 +12,9**	217,0 +18,1**	217,1 ±16,0**	210,1 +12,9*	210,5 +18,3*	190,6±16,5	185,7 ±17,0	190,3±15,8
Wypływ wieńcowy (ml/min)	5,0±0,8	5,0±0,8	4,9±1,2	4,8±1,1	4,8±1,3	4,8±1,1	4,8±1,4	4,7±1,2	4,8±0,9	4,7±0,9
P-Q (msek)	67,2±8,7	60,1±9,8	42,0 +13,6**	50,1 +12,6*	50,8 ±13,9*	51,9±15,7	52,0 ±16,7	58,3 ±14,4	59,0±12,4	58,5±13,7
QRS (msek)	23,2,±1,2	23,0±1,1	22,0±0,8	22,3±1,7	22,3±1,7	22,5±1,2	22,6±1,7	22,8±1,5	23,1 ±0,9	22,9±1,6
Q-T (msek)	142,0±13,9	134,8±17,8	106,5 ±16,7**	118,3 ±14,5*	119,0 ±11,3*	121,6±18,2	122,3±15,0	126,7 ±11,4	129,1±15,7	125,9 ±16,5

Wyniki przedstawiają średnią ± SEM z 6 zwierząt w grupie.
Różnica statystycznie znamienna w porównaniu z wartościami przed podaniem związku (test ANOVA);
*p<0.05 **p<0.02 ***p<0.001

Tabela 10. Wpływ związku **CH-10** na wybrane parametry izolowanego serca szczura

Obserwowany parametr	DAWKA (mol/l)									
	0	**10^{-9}**	**$3x10^{-9}$**	**10^{-8}**	**$3x10^{-8}$**	**10^{-7}**	**$3x10^{-7}$**	**10^{-6}**	**$3x10^{-6}$**	**10^{-5}**
Częstotliwość/min	211,3±121,5	164,1±25,6	149,6±23,7	148,1±22,8	151,6±2,6	149,1±26,0	136,1 +24,2*	121,8 +19,5***	114,0 +16,3***	100,6 +13,3****
Wypływ wieńcowy (ml/min)	5,3±0,7	5,3±0,7	5,1±0,7	4,9±0,7	4,9±0,7	4,9±0,7	4,9±0,7	4,9±0,7	4,7±0,7	4,5±0,7
P-Q (msek)	63,6±3,2	67,8±6,4	71,1±2,5	73,6±3,9	80,6±8,2	82,0 +8,3*	86,8 +7,7**	92,8 +7,1***	102,5 +5,3****	110,0 +6,1****
QRS (msek)	22,6,±1,6	22,6±1,6	23,0±1,5	23,5±1,5	24,1±1,7	24,1±1,7	25,1±1,7	27,6 +1,1*	28,0 +1,1**	28,1 +1,3**
Q-T (msek)	148,3±5,4	158,3±12,7	175,8 +11,8*	179,8 +13,4**	193,8 +10,6***	199,3 +12,9****	205,0 +12,5****	217,5 +11,5****	225,0 +11,5****	231,6 +13,4****

Wyniki przedstawiają średnią ± SEM z 6 zwierząt w grupie.
Różnica statystycznie znamienna w porównaniu z wartościami przed podaniem związku (test ANOVA);
*p<0.05 **p<0.02 ***p<0.01 ****p<0.001

Tabela 11. Wpływ związku **CH-10** na wybrane parametry izolowanego serca szczura

Obserwowany parametr	DAWKA (mol/l)									
	0	**10^{-9}**	**$3x10^{-9}$**	**10^{-8}**	**$3x10^{-8}$**	**10^{-7}**	**$3x10^{-7}$**	**10^{-6}**	**$3x10^{-6}$**	**10^{-5}**
Częstotliwość/min	188,1±19,1	174,1±15,8	163,8±12,2	161,3±13,0	162,1±10,0	155,6±11,0	148,0 +9,1*	139,8 +9,0***	130,6 +7,4***	131,3 +8,3***
Wypływ wieńcowy (ml/min)	4,8±0,4	4,3±0,4	4,5±0,5	4,5±0,4	4,2±0,4	4,1±0,4	4,1±0,4	4,0±0,4	3,8±0,3	3,6±0,3
P-Q (msek)	59,8±2,1	65,8±4,9	66,1±4,9	71,6 +4,0*	72,1 +3,7**	75,8 +3,5***	79,8 +3,1****	83,5 +3,0****	86,1 +2,0****	89,1 +2,6****
QRS (msek)	23,1,±1,4	23,8±1,4	24,1±1,3	24,3±1,2	24,6±1,2	25,0±1,2	26,3±1,1	26,8 +1,1*	27,6 +0,8**	28,0 +0,6***
Q-T (msek)	135,5±3,5	142,1±4,0	148,3±4,0	153,3 +4,9**	160,0 +5,7***	168,3 +5,4****	168,3 +5,4****	181,6 +6,0****	195,0 +5,0****	195,0 +5,0****

Wyniki przedstawiają średnią + SEM z 6 zwierząt w grupie.
Różnica statystycznie znamienna w porównaniu z wartościami przed podaniem związku (test ANOVA);
*p<0.05 **p<0.02 ***p<0.01 ****p<0.001

Tabela 12. Wpływ związku **CH-11** na wybrane parametry izolowanego serca szczura

Obserwowany parametr	**DAWKA (mol/l)**									
	0	**10^{-9}**	**$3x10^{-9}$**	**10^{-8}**	**$3x10^{-8}$**	**10^{-7}**	**$3x10^{-7}$**	**10^{-6}**	**$3x10^{-6}$**	**10^{-5}**
Częstotliwość/min	174,8 +12,4	169,8 +12,7	160,5 +11,8	152,8 +9,8	146,0 +10,4	145,6 +7,8	137,6 +10,2*	121,6 +13,7***	109,0 +13,8****	Z
Wypływ wieńcowy (ml/min)	4,8 +0,4	4,6 +0,3	4,3 +0,3	4,0 +0,3	3,9 +0,3	3,8 +0,3*	3,6 +0,3*	3,5 +0,3**	3,4 +0,3***	Z
P-Q (msek)	60,3 +2,6	60,6 +2,8	67,6 +3,6	69,3 +3,7	69,8 +3,6	70,8 +3,7*	76,6 +4,3***	77,5 +4,7***	85,5 +3,2****	Z
QRS (msek)	19,3,±1,2	18,8±0,4	19,1±0,4	20,0±0,4	20,0±0,4	20,3±0,6	20,8±0,7	22,5 +1,3**	22,3 +1,3*	Z
Q-T (msek)	118,5±5,4	128,5±4,5	130,8±4,9	141,6 +4,0***	150,8 +4,1****	151,6 +4,0****	155,0 +5,0****	158,3 +6,5****	166,6 +4,2****	Z

Wyniki przedstawiają średnią + SEM z 6 zwierząt w grupie.
Różnica statystycznie znamienna w porównaniu z wartościami przed podaniem związku (test ANOVA);
*p<0.05 **p<0.02 ***p<0.01 ****p<0.001, Z- zaburzenia rytmu

Tabela 13. Wpływ związku **CH-13** na wybrane parametry izolowanego serca szczura

Obserwowany parametr	**DAWKA (mol/l)**									
	0	**10^{-9}**	**$3x10^{-9}$**	**10^{-8}**	**$3x10^{-8}$**	**10^{-7}**	**$3x10^{-7}$**	**10^{-6}**	**$3x10^{-6}$**	**10^{-5}**
Częstotliwość/min	185,1±15,2	180,8±11,6	172,4±10,9	164,6±13,2	152,3±12,4	140,8 +10,1*	124,7 +18,6**	108,9 +15,8***	118,2 +9,7****	Z
Wypływ wieńcowy (ml/min)	5,1±1,2	4,9±0,9	4,5±1,6	4,5±1,6	4,3±1,3	4,1±1,4	4,2±1,8	3,9 +2,1*	3,9 +1,8*	Z
P-Q (msek)	59,1±4,1	59,3±4,5	65,6±8,2	68,0±5,6	68,3±7,2	70,3 +4,9*	70,8 +8,1*	72,4 +6,8**	81,0 +5,6***	Z
QRS (msek)	20,1±2,6	20,5±1,4	20.8±1,3	20,9±1,4	21,2±0,8	21,2±0,8	21,0±1,7	21,8 +0,9*	21,8 +0,9*	Z
Q-T (msek)	117,3±7,2	120,0±9,6	123,1±10,4	132,7±6,9	145,0 +12,2***	149,3 +9,1***	160,8 +11,5****	165,8 +10,3****	175,3 +8,2****	Z

Wyniki przedstawiają średnią ± SEM z 6 zwierząt w grupie.
Różnica statystycznie znamienna w porównaniu z wartościami przed podaniem związku (test ANOVA);
*p<0.05 **p<0.02 ***p<0.01 ****p<0.001, Z- zaburzenia rytmu

Tabela 14. Wpływ związku **CH-13** na wybrane parametry izolowanego serca szczura

Obserwowany parametr	DAWKA (mol/l)									
	0	**10^{-9}**	**$3x10^{-9}$**	**10^{-8}**	**$3x10^{-8}$**	**10^{-7}**	**$3x10^{-7}$**	**10^{-6}**	**$3x10^{-6}$**	**10^{-5}**
Częstotliwość/min	198,2±16,7	196,4±9,1	196,8±12,6	188,3±8,5	183,4±11,2	183,1±8,0	176,1±6,9	169,8±10,5	165,2±11,4	158,3 +16,7*
Wypływ wieńcowowy (ml/min)	5,2±1,3	5,3±0,9	5,2±1,7	5,2±1,7	5,0±1,6	4,6±1,2	4,4±0,7	4,6±1,5	4,4±1,4	4,3±0,8
P-Q (msek)	60,2±5,6	60,8±7,0	60,4±8,3	62,7±9,6	62,9±6,7	65,0±6,8	69,2±3,4	69±8,9	71,4 +7,5*	73,1 +5,8**
QRS (msek)	21,2±2,3	21,2±2,3	21,6±1,9	21,0±2,5	21,7±1,6	22,3±2,2	22,1±0,8	22,0±1,4	22,4±1,9	22,4±1,9
Q-T (msek)	143,7±11,2	143,7±11,2	144,0±17,3	159,3±12,7	162,0±13,8	160,8±9,3	165,6±9,6	164,8±10,1	172,3 +11,0*	179,5 +13,4*

Wyniki przedstawiają średnią ± SEM z 6 zwierząt w grupie.
Różnica statystycznie znamienna w porównaniu z wartościami przed podaniem związku (test ANOVA);
*$p<0.05$ **$p<0.02$

Tabela 15. Wpływ związku **CH-15** na wybrane parametry izolowanego serca szczura

Obserwowany parametr	DAWKA (mol/l)									
	0	**10^{-9}**	**$3x10^{-9}$**	**10^{-8}**	**$3x10^{-8}$**	**10^{-7}**	**$3x10^{-7}$**	**10^{-6}**	**$3x10^{-6}$**	**10^{-5}**
Częstotliwość/min	208,2±19,3	203,8±12,2	195,0±18,1	195,4±18,9	179,8±15,4	178,6±20,7	167,2±13,6	168,0±16,2	157,0 +17,5*	153,7 +12,1**
Wypływ wieńcowowy (ml/min)	5,1±1,2	5,1±1,2	5,1±0,9	5,0±1,6	5,1±1,2	4,9±0,8	4,7±1,5	4,7±1,2	4,7±1,8	4,5±1,6
P-Q (msek)	62,9±7,6	63,6±8,5	67,8±11,2	67,2±10,7	71,9±9,4	72,0±8,1	75,8±12,5	80,7±9,6	82,4 +11,7*	85,0 +8,7**
QRS (msek)	20,4±1,2	20,4±1,2	21,0±2,6	21,1±2,3	21,5±0,9	21,9±1,6	22,7±2,0	22,7±2,0	23,6±1,7	23,5±2,8
Q-T (msek)	145,1±11,3	147,8±15,7	156,0±9,8	167,9±14,0	170,1±18,2	172,5±13,6	171,6±15,2	175,4 +13,9*	182,0 +19,6**	183,1 +17,2**

Wyniki przedstawiają średnią ± SEM z 6 zwierząt w grupie.
Różnica statystycznie znamienna w porównaniu z wartościami przed podaniem związku (test ANOVA);
*$p<0.05$ **$p<0.02$

Tabela 16. Wpływ związku **CH-15** na wybrane parametry izolowanego serca szczura

Obserwowany parametr	DAWKA (mol/l)									
	0	**10^{-9}**	**$3x10^{-9}$**	**10^{-8}**	**$3x10^{-8}$**	**10^{-7}**	**$3x10^{-7}$**	**10^{-6}**	**$3x10^{-6}$**	**10^{-5}**
Częstotliwość/min	215,3±19,2	173,1±14,6	164,8±13,3	166,5±18,2	157,2±12,1	159,4±21,2	137,8 +15,2*	125,1 +17,1**	118,7 +13,0***	113,9 +11,6***
Wypływ wieńcowowy (ml/min)	5,0±0,9	5,0±,8	4,9±1,6	4,8±1,0	4,5±1,2	4,4±1,7	4,3±1,9	4,3±1,3	4,1±1,2	4,1±1,2
P-Q (msek)	62,0±8,1	66,1±10,4	73,8±5,2	73,0±7,6	75,9±10,1	80,6±9,2	84,3 +11,3*	89,3 +8,5**	92,7 +6,9***	95,0 +9,2***
QRS (msek)	20,8±2,1	20,8±2,1	21,0±1,8	21,0±1,8	21,2±0,9	21,2±1,6	21,2±1,6	21,4±1,6	21,5±2,3	21,4±1,7
Q-T (msek)	145,8±15,2	162,0±12,6	168,1±21,6	170,3±11,8	172,9±10,2	175,4 +14,8*	182,6 +12,0**	185,1 +11,9**	193,7 +13,5***	198,0 +17,6***

Wyniki przedstawiają średnią ± SEM z 6 zwierząt w grupie.
Różnica statystycznie znamienna w porównaniu z wartościami przed podaniem związku (test ANOVA);
*p<0.05 **p<0.02 ***p<0.01

Tabela 17. Wpływ związku **CH-16** na wybrane parametry izolowanego serca szczura

Obserwowany parametr	DAWKA (mol/l)									
	0	**10^{-9}**	**$3x10^{-9}$**	**10^{-8}**	**$3x10^{-8}$**	**10^{-7}**	**$3x10^{-7}$**	**10^{-6}**	**$3x10^{-6}$**	**10^{-5}**
Częstotliwość/min	184,3±21,2	176,5±11,7	172,8±13,7	168,0±15,2	165,1±14,6	160,9±17,4	161,2±19,0	153,2±19,6	148,0 +11,2*	142,1 +13,6**
Wypływ wieńcowowy (ml/min)	4,9±1,3	4,9±1,3	5,0±0,9	4,8±1,0	4,8±1,5	4,8±1,9	4,6±1,4	4,7±1,7	4,5±1,5	4,5±1,7
P-Q (msek)	58,7±8,5	59,8±11,2	59,0±7,6	65,8±9,5	69,2±12,0	69,8±7,5	69,8±7,5	71,6 +11,5*	79,8 +5,6**	79,7 +8,9**
QRS (msek)	19,8±1,7	19,8±2,7	19,9±2,5	21,0±2,2	21,0±2,2	21,1±0,9	21,4±2,3	21,6±1,5	22,3±2,7	22,8±2,1
Q-T (msek)	139,8±14,1	139,1±18,5	142,6±17,0	154,1±19,2	158,7±13,1	161,8±12,3	161,6±12,0	162,9 +16,5*	165,2 +17,2*	168,1 +19,3**

Wyniki przedstawiają średnią ± SEM z 6 zwierząt w grupie.
Różnica statystycznie znamienna w porównaniu z wartościami przed podaniem związku (test ANOVA);
*$p<0.05$ **$p<0.02$

Tabela 18. Wpływ związku **CH-17** na wybrane parametry izolowanego serca szczura

Obserwowany parametr	DAWKA (mol/l)									
	0	**10^{-9}**	**$3x10^{-9}$**	**10^{-8}**	**$3x10^{-8}$**	**10^{-7}**	**$3x10^{-7}$**	**10^{-6}**	**$3x10^{-6}$**	**10^{-5}**
Częstotliwość/min	165,3±13,5	166,1±15,6	165,5±12,9	186,3±18,1	200,7 +16,0**	192,8 +12,9*	186,7±18,3	192,2 +16,5*	180,6±17,0	192,0 +15,8*
Wypływ wieńcowy (ml/min)	4,7±0,9	4,8±1,1	4,8±1,1	4,6±1,2	4,7±0,9	4,5±1,0	4,4±1,2	4,4±1,2	4,5±0,9	4,5±0,8
P-Q (msek)	75,3±9,2	74,0±13,5	75,7±11,6	67,2±11,8	62,8 +16,7**	65,0 +12,7*	66,9±12,1	65,0 +13,4*	68,2±10,5	65,9 +16,0*
QRS (msek)	24,4±1,2	24,6±1,1	24,5±0,9	24,2±1,3	23,1±2,0	23,2±1,1	24,2±1,8	23,2±1,6	24,5±0,8	23,1±1,7
Q-T (msek)	152,0±17,4	153,4±15,8	152,9±12,6	128,3±14,5	119,0 +12,9**	123,8 +14,0*	129,0±16,1	123,7 +17,2*	136,0±18,0	123,9 +14,8*

Wyniki przedstawiają średnią ± SEM z 6 zwierząt w grupie.
Różnica statystycznie znamienna w porównaniu z wartościami przed podaniem związku (test ANOVA);
*$p<0.05$ **$p<0.02$

Tabela 19. Wpływ związku **CH-18** na wybrane parametry izolowanego serca szczura

Obserwowany parametr	DAWKA (mol/l)									
	0	**10^{-9}**	**$3x10^{-9}$**	**10^{-8}**	**$3x10^{-8}$**	**10^{-7}**	**$3x10^{-7}$**	**10^{-6}**	**$3x10^{-6}$**	**10^{-5}**
Częstotliwość/min	175,1±14,3	164,0±13,8	163,0±15,6	161,1±12,3	152,0±17,5	148,4 +12,9*	142,5 +14,7**	135,1 +18,0***	126,4 +10,8****	121,5 +17,2****
Wypływ wieńcowowy (ml/min)	5,0±1,4	4,8±1,5	4,4±0,8	4,4±1,6	4,0±0,9	3,8 +1,2*	3,7 +1,5*	3,5 +1,9**	3,5 +1,3**	3,3 +1,1***
P-Q (msek)	60,2±7,6	64,1±13,6	65,7±9,4	67,0±11,2	70,8±16,3	74,2 +12,8**	78,0 +14,6***	83,5 +12,1***	95,7 +10,6****	107,0 +16,3****
QRS (msek)	22,1,±2,3	22,3±1,8	22,9±2,5	25,2±1,1	25,7±2,8	26,0±1,5	26,0±1,5	26,7 +2,9*	26,8 +2,5*	27, 2+1,8**
Q-T (msek)	128,0±16,2	140,4±16,3	140,7±15,1	145,0±21,3	151,5±14,7	157,5 +16,0**	167,5 +13,7***	182,6 +19,3****	195,0 +16,5****	195,6 +18,2****

Wyniki przedstawiają średnią ± SEM z 6 zwierząt w grupie.
Różnica statystycznie znamienna w porównaniu z wartościami przed podaniem związku (test ANOVA);
*p<0.05 **p<0.02 ***p<0.01 ****p<0.001

Tabela 20. Wpływ związku **CH-19** na wybrane parametry izolowanego serca szczura

Obserwowany parametr	DAWKA (mol/l)									
	0	**10^{-9}**	**$3x10^{-9}$**	**10^{-8}**	**$3x10^{-8}$**	**10^{-7}**	**$3x10^{-7}$**	**10^{-6}**	**$3x10^{-6}$**	**10^{-5}**
Częstotliwość/min	183,0±11,2	175,2±9,7	169,0±11,7	165,3±12,0	159,3±10,6	152,0±9,8	147,4 +11,5*	139,1 +13,2**	136,5 +12,1**	130,0 +15,8***
Wypływ wieńcowy (ml/min)	4,7±1,2	4,8±1,0	4,1±0,9	4,5±1,3	4,5±1,5	4,5±1,5	4,5±1,5	4,1±1,2	3,9 +1,1*	3,9 +1,1*
P-Q (msek)	60,3±8,4	65,0±12,3	65,6±9,8	67,2±11,9	72,8±13,7	74,0±12,8	78,9 +12,1*	83,0 +11,8**	90,5 +10,5***	96,7 +14,2***
QRS (msek)	22,1,±1,9	22,1±1,9	22,7±2,0	24,2±1,5	25,2±2,1	26,0±1,5	26,0±1,5	26,4±1,3	26,9 +2,6*	27,8 +1,9**
Q-T (msek)	131,2±14,0	140,0±15,1	140,3±16,1	145,7±17,1	151,0±14,2	158,6 +15,0*	163,1 +14,7**	182,6 +18,3***	190,0 +16,5****	195,8 +17,1****

Wyniki przedstawiają średnią ± SEM z 6 zwierząt w grupie.
Różnica statystycznie znamienna w porównaniu z wartościami przed podaniem związku (test ANOVA);
*p<0.05 **p<0.02 ***p<0.01 ****p<0.001

Tabela 21. Wpływ związku **CH-20** na wybrane parametry izolowanego serca szczura

Obserwowany parametr	DAWKA (mol/l)									
	0	**10^{-9}**	**$3x10^{-9}$**	**10^{-8}**	**$3x10^{-8}$**	**10^{-7}**	**$3x10^{-7}$**	**10^{-6}**	**$3x10^{-6}$**	**10^{-5}**
Częstotliwość/min	188,0±18,3	177,2±11,7	170,5±15,6	163,9±17,0	162,1±12,6	155,0±13,2	153,6±17,3	145,2 +14,6*	139,4 +16,0**	137,0 +16,5**
Wypływ wieńcowy (ml/min)	4,8±0,8	4,8±0,8	4,7±1,2	4,5±1,1	4,4±1,3	4,2±1,2	4,2±1,2	4,1±0,8	4,0±1,4	3,6 +1,1*
P-Q (msek)	60,3±8,4	65,0±12,3	65,6±9,8	67,2±11,9	72,8±13,7	74,0±12,8	78,9 +12,1*	83,0 +11,8**	90,5 +10,5***	96,7 +14,2***
QRS (msek)	23,1,±1,5	23,8±1,4	24,0±1,9	24,3±1,2	24,7±2,3	25,2±1,1	25,2±1,1	26,0±1,5	26,5 +2,1*	27,1 +1,6**
Q-T (msek)	120,3±16,2	128,5±17,1	135,6±15,2	139,3±18,6	142,0±16,7	151,6±14,9	160,2 +17,5*	168,7 ±15,3**	172,0 +18,1**	179,8 +18,2***

Wyniki przedstawiają średnią ± SEM z 6 zwierząt w grupie.
Różnica statystycznie znamienna w porównaniu z wartościami przed podaniem związku (test ANOVA);
*p<0.05 **p<0.02 ***p<0.01

Tabela 22. Wpływ związku **CH-21** na wybrane parametry izolowanego serca szczura

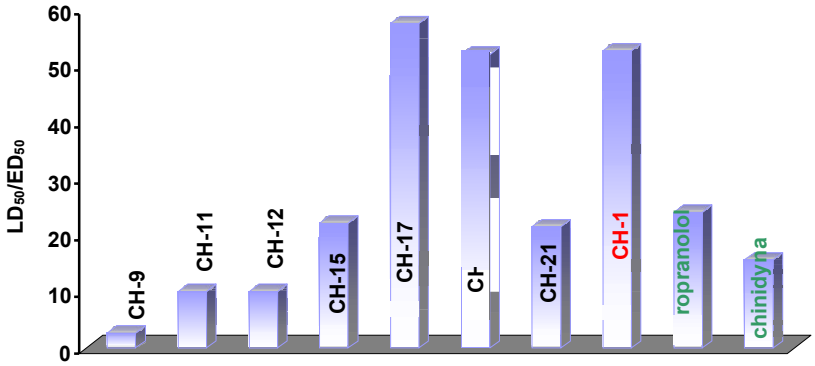
Obserwowany parametr	**DAWKA (mol/l)**									
	0	**10^{-9}**	**$3x10^{-9}$**	**10^{-8}**	**$3x10^{-8}$**	**10^{-7}**	**$3x10^{-7}$**	**10^{-6}**	**$3x10^{-6}$**	**10^{-5}**
Częstotliwość/min	186,0±15,0	173,2±17,6	173,9±11,5	169,1±13,0	163,2±10,1	157,9 +17,1*	151,4 +13,2**	146,7 +10,8***	132,5 +12,3****	129,0 +13,7****
Wypływ wieńcowowy (ml/min)	5,5±1,4	5,2±2,3	4,9±0,9	4,9±1,6	4,5±1,7	4,3±0,8	4,2 +1,6*	4,0 +1,3**	4,0 +1,7**	3,8 +1,1***
P-Q (msek)	59,0±8,2	65,7±11,4	65,7±11,4	68,5±13,0	72,8±10,1	75,6 +9,6**	79,1 +11,3***	84,8 +13,0***	97,0 +14,2****	110,2 +12,6****
QRS (msek)	20,5,±2,9	22,1±2,3	22,1±2,3	24,0±1,6	24,3±1,6	26,0±2,8	26,2±1,7	26,2±1,7	27,0 +2,1*	27,5 +2,0**
Q-T (msek)	117,3±12,1	128,0±13,8	127,5±16,0	142,8±15,7	151,3±16,0	156,2 +21,7**	169,4 +19,5***	180,0 +15,2****	189,5 +16,4****	189,5 +16,4****

Wyniki przedstawiają średnią + SEM z 6 zwierząt w grupie.
Różnica statystycznie znamienna w porównaniu z wartościami przed podaniem związku (test ANOVA);
*p<0.05 **p<0.02 ***p<0.01 ****p<0.001

2. Badania poszerzone dla wyselekcjonowanych związków

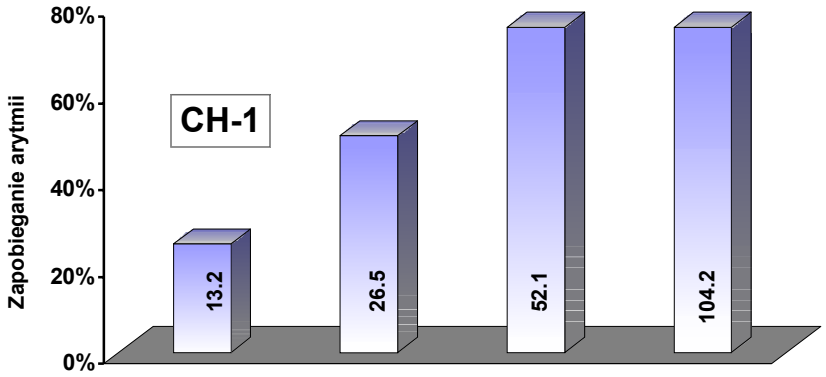
2.1. Profilaktyczna aktywność przeciwarytmiczna w modelu arytmii adrenalinowej po podaniu dożołądkowym

Aktywność przeciwarytmiczną w modelu arytmii adrenalinowej po podaniu dożołądkowym oznaczono tylko dla związków, które wykazały działanie po podaniu dożylnym. Wszystkie badane związki podane dożołądkowo na 1 godzinę przed arytmogenem zapobiegały zaburzeniom poadrenalinowym (Ryc. 19, Tab. 23).



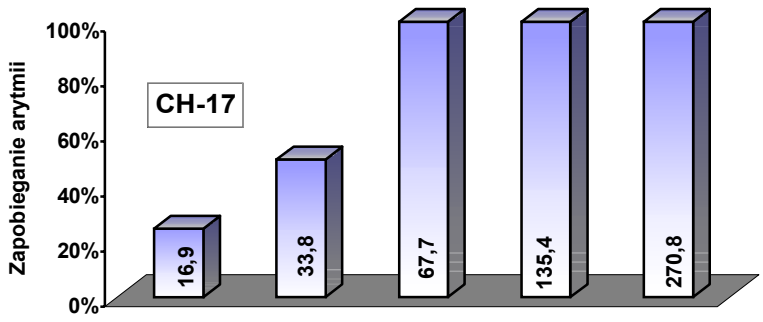
Ryc.19. Porównanie indeksów terapeutycznych badanych związków i związków odniesienia w modelu arytmii adrenalinowej u szczura po podaniu dożołądkowym

Związek **CH-1** podany w dawce 104.2 mg/kg (1/10 $LD_{50p.o.}$) w 100% chronił zwierzęta przed blokami oraz bigeminią, natomiast 75% zwierząt zabezpieczał przed wystąpieniem ekstrasystoli. W dawkach 52.1 i 26.5 mg/kg (1/20 i 1/40 $LD_{50p.o.}$) zapobiegał ekstraystolom odpowiednio u 75% i 50% zwierząt. Po podaniu dawki najniższej (13.2 mg/kg) obserwowano osłabienie aktywności przeciwarytmicznej. Związek ten w zakresie dawek 26.5-104.2 mg/kg całkowicie zapobiegał śmierci na skutek zaburzeń poadrenalinowych. ED_{50} = 19.8 mg/kg, IT = 52.5 (Ryc. 20, Tab. 23).



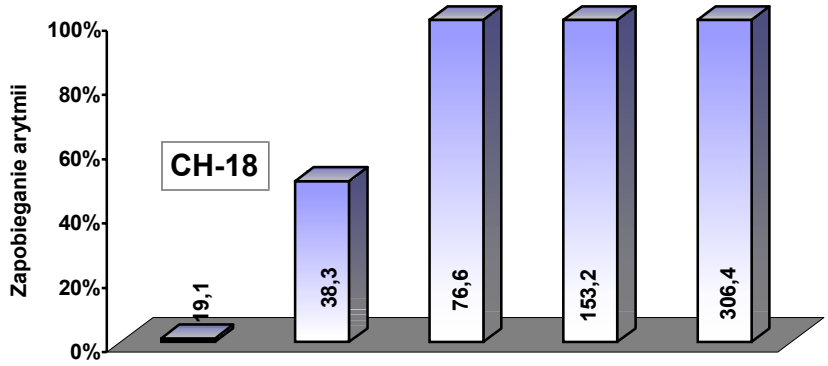
Ryc.20. Aktywność przeciwarytmiczna związku **CH-1** (13.2, 26.5, 52.1, 104.2 mg/kg) w modelu arytmii adrenalinowej u szczura po podaniu dożołądkowym

CH-17 podany na 60 minut przed arytmogenem, w dawkach odpowiadających 1/5, 1/10 i 1/20 LD_{50} *p.o*, całkowicie zapobiegał zaburzeniom poadrenalinowym i chronił zwierzęta przed śmiercią. W dawce 1/40 LD_{50} zapobiegał blokom i ekstrasystolom u około 50% zwierząt oraz całkowicie chronił je przed śmiercią. Dopiero w dawce 1/80 LD_{50} obserwowano osłabienie aktywności przeciwarytmicznej. Obliczona wartość ED_{50} dla związku **CH-17** w tym modelu arytmii wynosi: 23.6 mg/kg , indeks terapeutyczny= 57.4 (Ryc. 21, Tab.23).



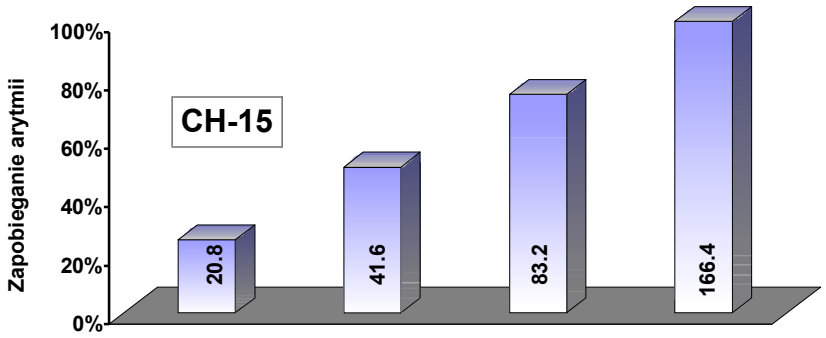
Ryc.21. Aktywność przeciwarytmiczna związku **CH-17** (16.9, 33.8, 67.7, 135.4, 270.8 mg/kg) w modelu arytmii adrenalinowej u szczura po podaniu dożołądkowym

Związek **CH-18** w dawkach 1/5, 1/10, 1/20 LD_{50} *p.o.* całkowicie chronił badane zwierzęta przed zaburzeniami poadrenalinowymi i śmiercią. W dawce 1/40 LD_{50} zabezpieczał 50% zwierząt przed bradykardią, blokami i ekstrasystolami oraz całkowicie chronił zwierzęta przed śmiercią. Dopiero podanie dawki 1/80 LD_{50} prowadziło do zaniku działania przeciwarytmicznego związku. Obliczona wartość ED_{50} dla związku **CH-18** w tym modelu arytmii wynosi: 21.8 mg/kg, indeks terapeutyczny = 51.9 (Ryc. 22, Tab. 23).



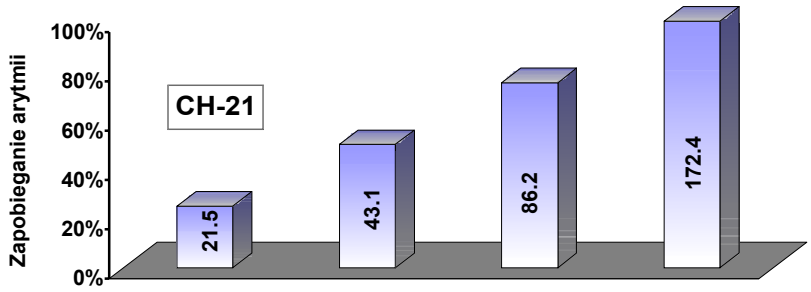
Ryc.22. Aktywność przeciwarytmiczna związku **CH-18** (19.1, 38.3, 76.6, 153.2, 306.4 mg/kg) w modelu arytmii adrenalinowej u szczura po podaniu dożołądkowym

Związek **CH-15** podany dożołądkowo w dawce 1/5 LD_{50} zapobiegał zaburzeniom poadrenalinowym oraz śmierci. Podanie dawki 1/10 LD_{50} chroniło całkowicie badane zwierzęta przed śmiercią oraz zmniejszało występowanie bradykardii, bloków i ekstrasystoli w 75%. W dawce 1/20 LD_{50} związek CH-15 zmniejszał bradykardię, bloki i ekstrasystole u 50% zwierząt, ale nadal całkowicie chronił je przed śmiercią. Dopiero podanie dawki 1/40 LD_{50} spowodowało osłabienie aktywności przeciwarytmicznej badanego związku. Obliczona wartość ED_{50} dla związku **CH-15** w tym modelu arytmi wynosi: 37.6 mg/kg, indeks terapeutyczny = 22.1 (Ryc. 23, Tab. 23).



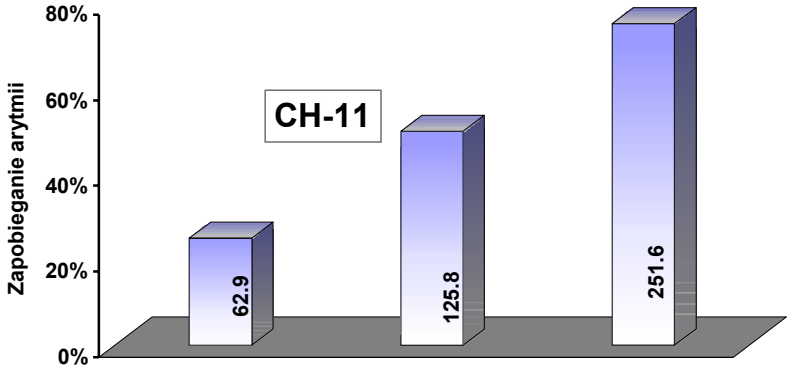
Ryc.23. Aktywność przeciwarytmiczna związku **CH-15** (20.8, 41.6, 83.2, 166.4, mg/kg) w modelu arytmii adrenalinowej u szczura po podaniu dożołądkowym

Związek **CH-21** w dawce 1/5 LD_{50} *p.o.* całkowicie chronił badane zwierzęta przed wszystkimi rodzajami zaburzeń poadrenalinowych i śmiercią. W dawce 1/10 LD_{50} u 75% zwierząt zapobiegał bradykardii i ekstrasystolom oraz całkowicie chronił je przed śmiercią. Natomiast podanie dawki 1/20 LD_{50} zmniejszało wystąpienie bradykardii i bloków o 25%, ekstrasystoli o 50% oraz tylko częściowo chroniło zwierzęta przed śmiercią. Dopiero dawka 1/40 LD_{50} spowodowała zanik aktywności przeciwarytmicznej badanego związku. Obliczona wartość ED_{50} dla związku **CH-21** w tym modelu arytmii wynosi: 40.1 mg/kg, IT = 21.5 (Ryc. 24, Tab. 23).



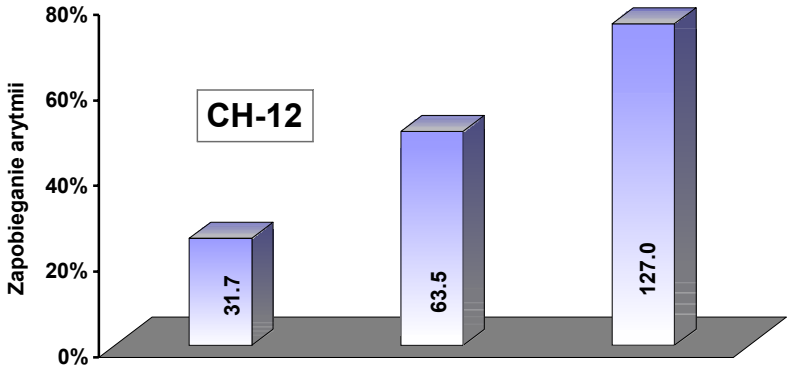
Ryc.24. Aktywność przeciwarytmiczna związku **CH-21** (21.5, 43.1, 86.2, 172.4 mg/kg) w modelu arytmii adrenalinowej u szczura po podaniu dożołądkowym

Związek **CH-11** w dawce 1/5 LD_{50} zabezpieczał 75% badanych zwierzętąt przed bradykardią, blokami i ekstrasystolami oraz całkowicie chronił przed śmiercią. W dawce 1/10 LD_{50} zmniejszał wystąpienie bradykardii, bloków oraz ekstrasystoli u 50% zwierząt, ale nadal chronił je przed śmiercią. Podanie dawki odpowiadającej 1/20 $LD_{50\ p.o.}$ prowadziło do osłabienia aktywności przeciwarytmicznej badanego związku. ED_{50} dla związku **CH-11** w tym modelu arytmii wynosi: 125.8 mg/kg, a indeks terapeutyczny = 10 (Ryc. 25, Tab. 23).



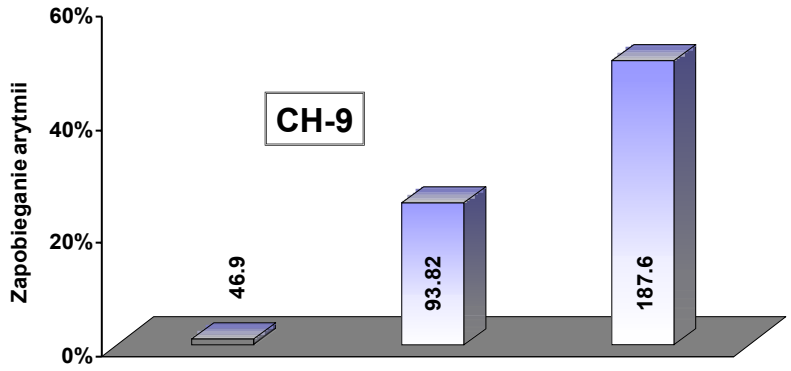
Ryc.25. Aktywność przeciwarytmiczna związku **CH-11** (62.9, 125.8, 251.6 mg/kg) w modelu arytmii adrenalinowej u szczura po podaniu dożołądkowym

Związek **CH-12** w dawce 1/5 LD_{50} zabezpieczał 75% zwierząt przed wystąpieniem bradykardii i ekstrasystoli, natomiast całkowicie zapobiegał blokom, bigeminii oraz chronił zwierzęta przed śmiercią. Dawka 1/10 $LD_{50p.o.}$ zapobiegała zaburzeniom poadrenalinowowym u 50% zwierząt, oraz zapobiegała śmierci w wyniku tych zaburzeń. Podanie dawki 1/20 $LD_{50p.o}$ prowadziło do osłabienia aktywności przeciwarytmicznej. Obliczona wartość ED_{50} dla związku **CH-12** w tym modelu arytmii wynosi: 63.4 mg/kg, indeks terapeutyczny = 10 (Ryc. 26, Tab. 23).



Ryc.26. Aktywność przeciwarytmiczna związku **CH-12** (31.7, 63.5, 127.0 mg/kg) w modelu arytmii adrenalinowej u szczura po podaniu dożołądkowym

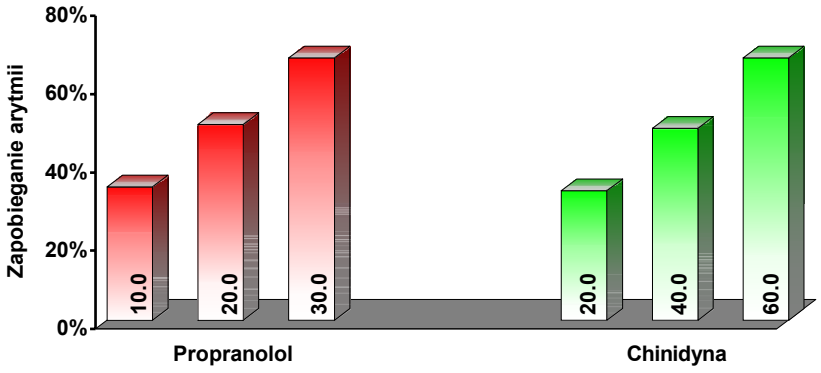
Związek **CH-9** w dawce 2/5 $LD_{50p.o.}$ zabezpieczał 50% zwierząt przed bradykardią, blokami i ekstrasystolami, ale całkowicie chronił je przed śmiercią. W dawce 1/5 LD_{50} obserwowano zmniejszenie aktywności przeciwarytmicznej, a po podaniu dawki odpowiadającej 1/10 $LD_{50p.o.}$ zanik aktywności przeciwarytmicznej. Wartość ED_{50} dla tego związku wynosi: 170.24 mg/kg, a indeks terapeutyczny = 2.75 (Ryc. 27, Tab. 23).



Ryc.27. Aktywność przeciwarytmiczna związku **CH-9** (46.9, 93.8, 187.6 mg/kg) w modelu arytmii adrenalinowej u szczura po podaniu dożołądkowym

Reasumując – największą aktywność przeciwarytmiczną, podobnie jak przy podaniu dożylnym, wykazały związki **CH-1**, **CH-17** oraz **CH-18**. Nieznacznie mniejszy efekt przeciwarytmiczny wykazały związki **CH-15**, **CH-21**. Natomiast pozostałe związki tj. **CH-11**, **CH-12** oraz **CH-9** w mniejszym stopniu zabezpieczały zwierzęta, przed zaburzeniami indukowanymi podaniem adrenaliny.

Propranolol w dawkach: 10.0, 20.0 i 30.0 mg/kg *p.o.* zapobiegał arytmii u 34.0, 50.0 i 67.0% zwierząt. **Chinidyna** podana w dawkach 20.0, 40.0 i 60.0 mg/kg zmniejszała zaburzenia rytmu serca odpowiednio o 33.0, 49.0 i 67.0% (Ryc. 28). Wartości ED_{50} oraz IT zamieszczono w Tabeli 23.



Ryc.28. Aktywność przeciwarytmiczna propranololu (10.0, 20.0, 30.0 mg/kg) i chinidyny (20.0, 40.0, 60.0 mg/kg) w modelu arytmii adrenalinowej u szczura po podaniu dożołądkowym

Tabela 23. Profilaktyczna aktywność przeciwarytmiczna badanych związków i związków odniesienia

Droga podania związków: *p.o.*

Arytmogen: adrenalina (20 μg/kg *i.v.*)

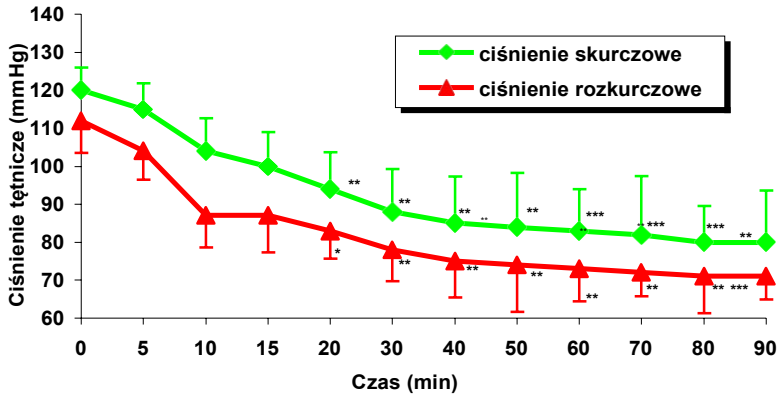
Znieczulenie ogólne: tiopental (60 mg/kg *i.p.*)

Związek	**ED_{50} (mg/kg)**	**Indeks terapeutyczny (LD_{50}/ED_{50})**
CH-1	19.8 (16.8-22.7)	52.5
CH-9	170.2 (154.7-195.3)	2.7
CH-11	125.8 (92.1-146.7)	10.0
CH-12	63.4 (47.8-79.0)	10.0
CH-15	37.6 (24.1-45.7)	22.1
CH-17	23.6 (18.5-37.3)	57.4
CH-18	21.8 (16.9-29.8)	51.9
CH-21	40.1 (32.4-51.6)	21.5
Propranolol	19.5 (14.5 - 26.1)	24.0
Chinidyna	38.0 (33.6 - 42.9)	15.6

2.2. Aktywność hipotensyjna u normotensyjnego szczura po podaniu dożołądkowym

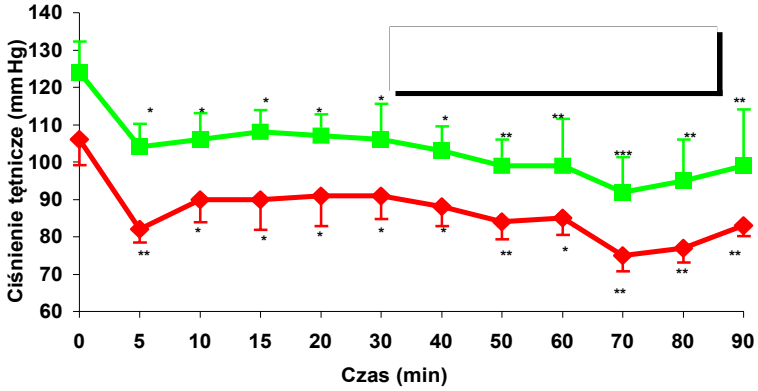
We wcześniejszych badaniach farmakologicznych związki **CH-1**, **CH-9**, **CH-11**, **CH-12**, podane dożylnie, wykazały aktywność hipotensyjną. Stąd oznaczono również ich wpływ na ciśnienie tętnicze krwi przy podaniu dożołądkowym. Wszystkie badane związki podane dożołądkowo obniżały ciśnienie tętnicze krwi u normotensyjnego szczura. I tak :

- Związek **CH-1** w dawce 104.2 mg/kg (1/10 $LD_{50 p.o.}$) wykazywał znamienne działanie hipotensyjne, obniżając ciśnienie skurczowe o 26.0 - 40.0 mmHg (21.6 - 33.3 0%) i ciśnienie rozkurczowe o 30.0 - 41.0 mmHg (26.7 - 36.6%), począwszy od 20 minuty do końca pomiaru tj. do 90 minuty (Ryc. 29).



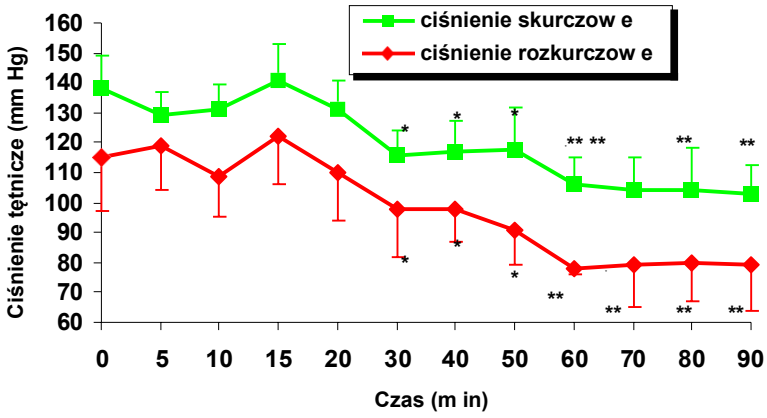
Ryc.29. Wpływ związku **CH-1** (104.2 mg/kg) na ciśnienie tętnicze krwi u normotensyjnego, znieczulonego tiopentalem szczura (60 mg/kg *i.p.*); *p<0.05, **p<0.02, ***p<0.01 (test ANOVA)

- Związek **CH-9,** podany w dawce 1/10 $LD_{5 p.o.}$, obniżał znamienne ciśnienie skurczowe o 16-32 mmHg (12.9-25.8%), a rozkurczowe o 15-31 mmHg (14.1-29.2%) począwszy od 5 minuty do końca obserwacji (Ryc.30).



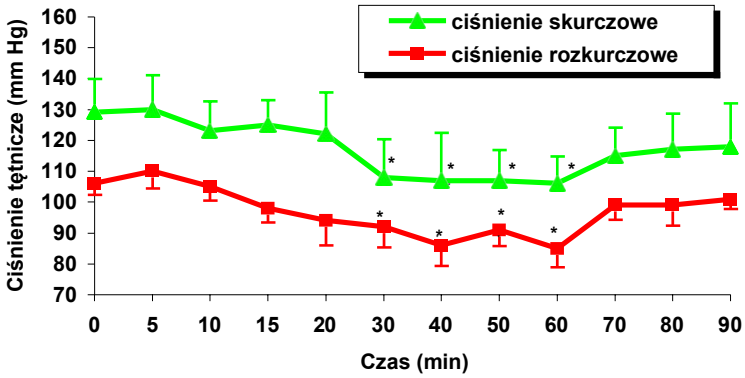
Ryc.30. Wpływ związku **CH-9** (46.9 mg/kg) na ciśnienie tętnicze krwi u normotensyjnego, znieczulonego tiopentalem szczura (60 mg/kg *i.p.*); *p<0.05, **p<0.02, ***p<0.01 (test ANOVA).

Natomiast związek **CH-11** podany w tej samej dawce, obniżał znamiennie ciśnienie skurczowe o 22-35 mmHg (15.9-25.3%), a ciśnienie rozkurczowe o ok. 17-36 mmHg (14.7-31.3%) między 30 a 90 minutą pomiaru (Ryc. 31).



Ryc.31. Wpływ związku **CH-11** (125.8 mg/kg) na ciśnienie tętnicze krwi u normotensyjnego, znieczulonego tiopentalem szczura (60 mg/kg *i.p.*); *p<0.05, **p<0.02 (test ANOVA).

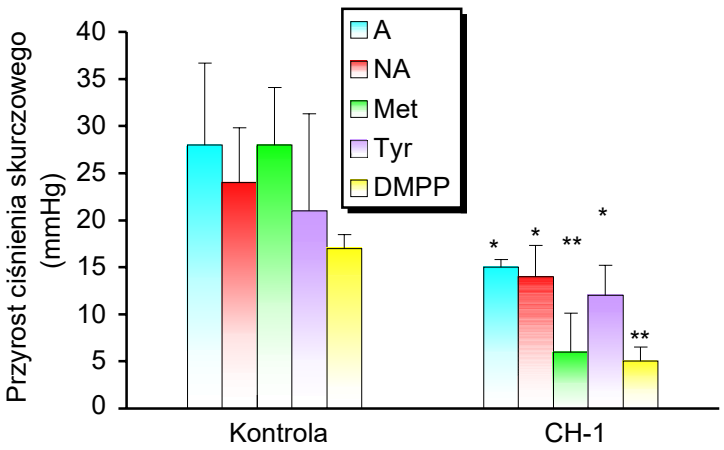
Związek **CH-12** w dawce 1/10 LD_{50} powodował znamienny spadek ciśnienia skurczowego oraz rozkurczowego począwszy od 30 minuty obserwacji, który utrzymywał się do 60 minuty i wynosił odpowiednio dla ciśnienia skurczowego 21-23 mmHg (16.2-17.8%) oraz rozkurczowego 14-21 mmHg (13.2-19.8%), (Ryc. 32).



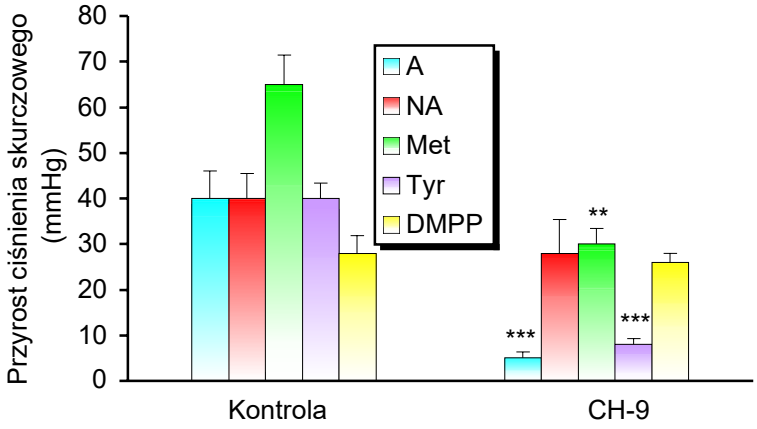
Ryc.32. Wpływ związku **CH-12** (63.5 mg/kg) na ciśnienie tętnicze krwi u normotensyjnego, znieczulonego tiopentalem szczura 60 mg/kg *i.p.*) *p<0.05 (test ANOVA).

2.3. Wpływ na presyjne działanie adrenaliny, noradrenaliny, metoksaminy, tyraminy i DMPP

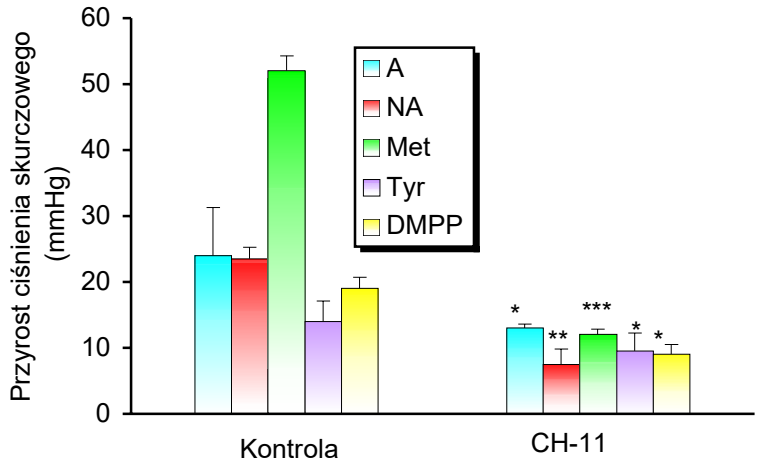
Badane 7,8-dipodstawione analogi teofiliny takie jak: **CH-1, CH-11, CH-12**, **CH-15**, **CH-17**, **CH-18** oraz **CH-21** podane w dawce odpowiadającej 1/10 $LD_{50 i.v.}$, statystycznie istotnie zmniejszały presyjne działanie po podaniu adrenaliny, noradrenaliny, metoksaminy, tyraminy i DMPP (Ryc. 33, 35-40). Natomiast związek **CH-9** podany w tej samej dawce, znamiennie zapobiegał wzrostom ciśnienia krwi indukowanym podaniem adrenaliny, metoksaminy, tyraminy oraz nieznamiennie redukowały wzrost ciśnienia wywołany podaniem noradrenaliny, nie wpływając na DMPP (Ryc. 34).



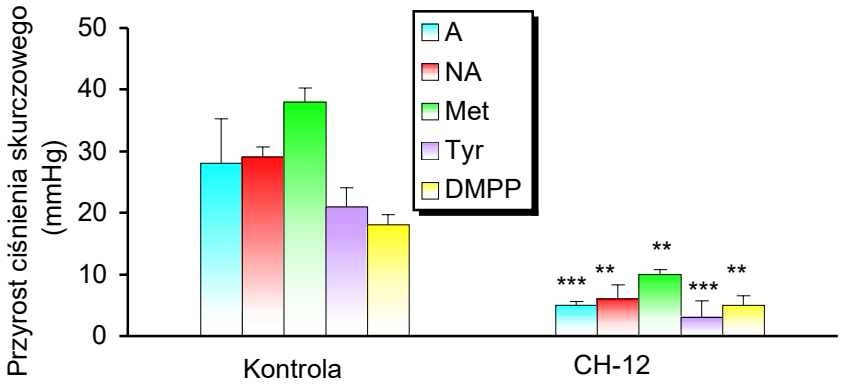
Ryc.33. Wpływ związku **CH-1** (19.2 mg/kg) na presyjne działanie: adrenaliny (A-2 μg/kg), noradrenaliny (NA-2 μg/kg), metoksaminy (Met-150 μg/kg), tyraminy (Tyr-200 μg/kg) i DMPP (100 μg/kg); *$p<0.05$, **$p<0.02$



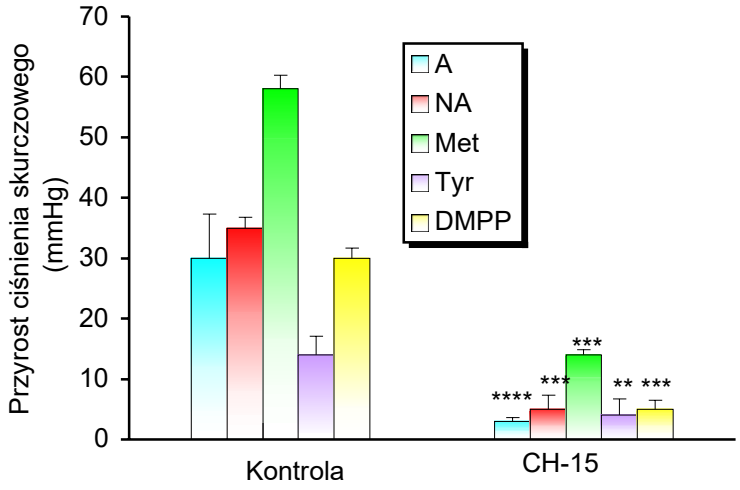
Ryc.34. Wpływ związku **CH-9** (7.5 mg/kg) na presyjne działanie:
adrenaliny (A-2 μg/kg), noradrenaliny (NA-2 μg/kg), metoksaminy (Met-150 μg/kg), tyraminy (Tyr-200 μg/kg) i DMPP (100 μg/kg); **p<0.02, ***p<0.01



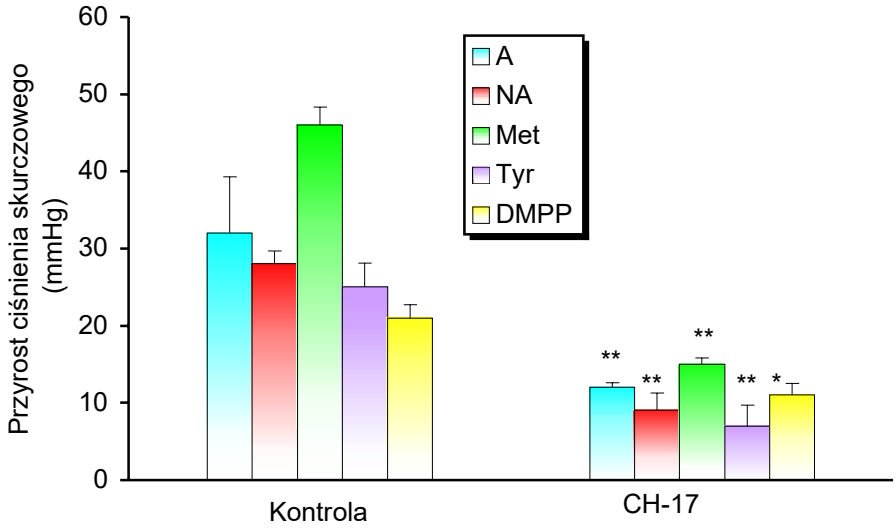
Ryc.35. Wpływ związku **CH-11** (20.5 mg/kg) na presyjne działanie:
adrenaliny (A-2 μg/kg), noradrenaliny (NA-2 μg/kg), metoksaminy (Met-150 μg/kg), tyraminy (Tyr-200 μg/kg) i DMPP (100 μg/kg); *p<0.05, **p<0.02, ***p<0.01



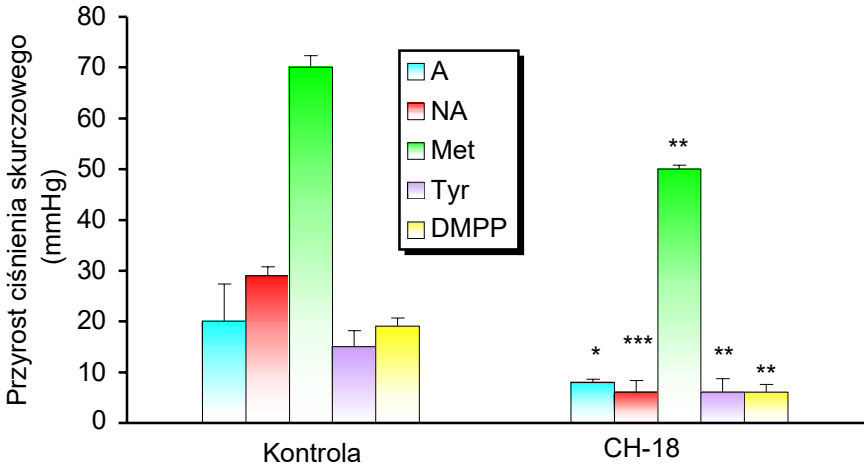
Ryc.36. Wpływ związku **CH-12** (8.7 mg/kg) na presyjne działanie: adrenaliny (A-2 µg/kg), noradrenaliny (NA-2 µg/kg), metoksaminy (Met-150 µg/kg), tyraminy (Tyr-200 µg/kg), i DMPP (100 µg/kg); **p<0.02, ***p<0.01



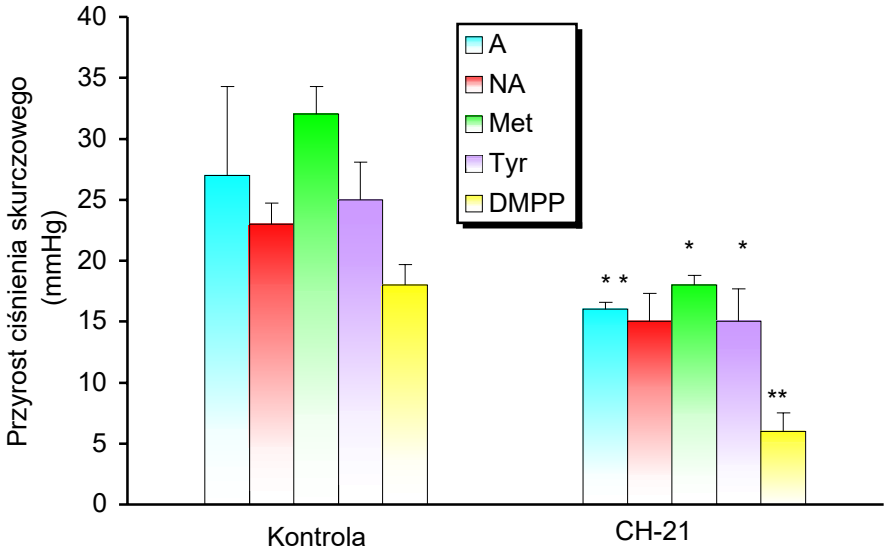
Ryc.37. Wpływ związku **CH-15** (4.3 mg/kg) na presyjne działanie: adrenaliny (A-2 µg/kg), noradrenaliny (NA-2 µg/kg), metoksaminy (Met-150 µg/kg), tyraminy (Tyr-200 µg/kg), i DMPP (100 µg/kg); **p<0.02, ***p<0.01 ,p<0.001



Ryc.38. Wpływ związku **CH-17** (19.8 mg/kg) na presyjne działanie: adrenaliny (A-2 µg/kg), noradrenaliny (NA-2 µg/kg), metoksaminy (Met-150 µg/kg), tyraminy (Tyr-200 µg/kg), i DMPP (100 µg/kg) *p<0.05, **p<0.02



Ryc.39. Wpływ związku **CH-18** (23.3 mg/kg) na presyjne działanie: adrenaliny (A-2 µg/kg), noradrenaliny (NA-2 µg/kg), metoksaminy (Met-150 µg/kg), tyraminy (Tyr-200 µg/kg), i DMPP (100 µg/kg); *p<0.05, **p<0.02, ***p<0.01



Ryc.40. Wpływ związku **CH-21** (5.0 mg/kg) na presyjne działanie:
adrenaliny (A-2 μg/kg), noradrenaliny (NA-2 μg/kg), metoksaminy (Met-150 μg/kg), tyraminy (Tyr-200 μg/kg), i DMPP (100 μg/kg); **p<0.02, ***p<0.01

2.4 Aktywność przeciwarytmiczna w arytmii wywołanej okluzją i reperfuzją naczynia wieńcowego „in vitro"

Podwiązanie lewej tętnicy wieńcowej izolowanego serca szczura w grupie kontrolnej prowadziło do redukcji wypływu wieńcowego o 19.2-20.2%. Usunięcie zacisku po 15 minutach powodowało powrót wypływu wieńcowego do wartości zbliżonych do wyjściowych (przed okluzją). W grupach badanych podczas okluzji również obserwowano statystycznie znamienne spadki wypływu wieńcowego, średnio o 20% oraz jego powroty do wartości wyjściowych w czasie reperfuzji (Tab. 24).

Tabela 24a. Zmiany wypływu wieńcowego w czasie okluzji i reperfuzji lewej tętnicy wieńcowej izolowanego serca szczura

Związek	Stężenie [M]	Wypływ wieńcowy (ml/min)		
		Przed okluzją	Okluzja	Reperfuzja
Kontrola	–	5.0 ± 0.32	4.04 ± 0.21***	5.12 ± 0.40
CH-1	10^{-5}	5.27 ± 0.68	4.15 ± 0.23**	5.24 ± 0.20
CH-9	10^{-5}	5.13 ± 0.56	4.21 ± 0.24**	5.08 ± 0.45
CH-11	10^{-6}	4.98 ± 0.57	3.80 ± 0.23***	5.02 ± 0.71
CH-12	10^{-6}	5.28 ± 0.29	4.15 ± 0.65**	5.17 ± 0.92

Wyniki przedstawiają średnie z 5 - 6 eksperymentów ± SEM. Różnice statystycznie znamienne w stosunku do kontroli przed okluzją (test ANOVA); *p<0.05, **p<0.02, ***p<0.01

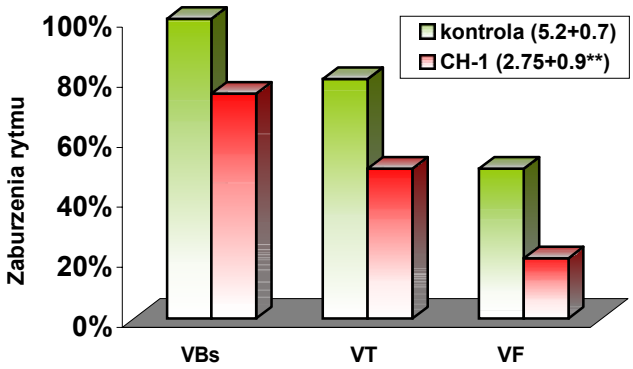
Tabela 24b. Zmiany wypływu wieńcowego w czasie okluzji i reperfuzji lewej tętnicy wieńcowej izolowanego serca szczura

Związek	Stężenie [M]	Wypływ wieńcowy (ml/min)		
		Przed okluzją	Okluzja	Reperfuzja
Kontrola	–	5.12 ± 0.25	4.07 ± 0.34***	5.10 ± 0.42
CH-15	10^{-5}	5.26 ± 0.56	4.32 ± 0.28*	4.87 ± 0.64
CH-17	10^{-5}	5.35 ± 0.78	4.12 ± 0.52**	5.17 ± 0.28
CH-18	10^{-5}	4.92 ± 0.27	3.89 ± 0.35**	5.06 ± 0.49
CH-21	10^{-5}	4.87 ± 0.56	4.06 ± 0.71*	4.69 ± 0.37
chinidyna	10^{-5}	6.60 ± 0.29	5.40 ± 0.32***	7.10 ± 0.45

Wyniki przedstawiają średnie z 5 - 6 eksperymentów ± SEM. Różnice statystycznie znamienne w stosunku do kontroli przed okluzją (test ANOVA); *$p<0.05$, **$p<0.02$, ***$p<0.01$

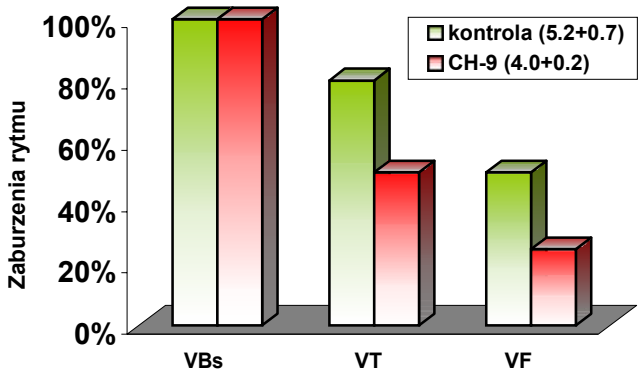
Przywrócenie wypływu wieńcowego podczas reperfuzji prowadziło do wystąpienia przedwczesnych pobudzeń nadkomorowych i komorowych (ES) u 100%, bigeminii u 50%, salw u około 33%, tachykardii komorowej (VT) u około 67% oraz migotania komór (VF) u 50% kontrolnych serc. Obliczony dla kontroli nr 1 indeks punktowy wg. Bernauera wynosi 5.2 ± 0.7 a dla kontroli nr 2 wynosi 5.6± 1.2 (Ryc. 41 - 48).

Związek **CH-1**, dodany na 15 minut przed okluzją do płynu perfundującego serce w stężeniu 10^{-5} M zmniejszał występowanie częstoskurczu komorowego i fibrylacji o 30% oraz zmniejszał przedwczesne pobudzenia nadkomorowe i komorowe o 25% w stosunku do kontroli (indeks punktowy = 2.75 $\pm$ 0.9), (Ryc. 41).



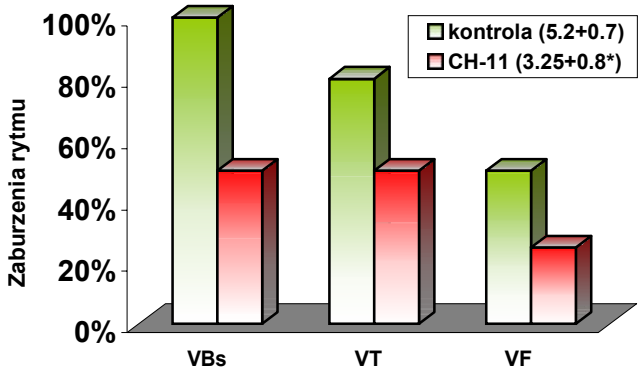
Ryc. 41. Wpływ związku **CH-1** (10^{-5}M) na niemiarowość izolowanego serca szczura (VBs-przedwczesne pobudzenia komorowe, VT-tachykardia komorowa, VF-fibrylacja); **p<0.02

Związek **CH-9**, podany w stężeniu 10^{-5} M częściowo, statystycznie nieznamiennie, zmniejszał zaburzenia rytmu serca w tym modelu arytmii, redukując tachykardię komorową o około 30%, fibrylację o 25% (indeks punktowy = 4.0 $\pm$ 0.2), (Ryc. 42).



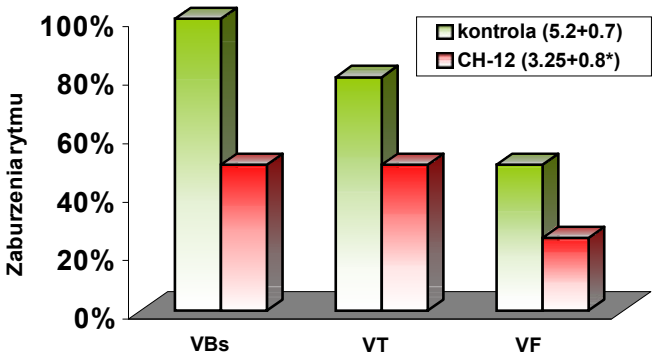
Ryc. 42. Wpływ związku **CH-9** (10^{-5}M) na niemiarowość izolowanego serca szczura (VBs-przedwczesne pobudzenia komorowe, VT-tachykardia komorowa, VF-fibrylacja)

Związek **CH-11,** podany w stężeniu 10^{-6} M zapobiegał w istotny sposób zaburzeniom rytmu serca wywołanych okluzją i reperfuzją naczynia wieńcowego. Zmniejszał występowanie przedwczesnych pobudzeń komorowych o 50%, częstoskurczu komorowego o 30% a fibrylacji o 25%, (indeks punktowy = 3.25 $\pm$ 0.8), (Ryc. 43).



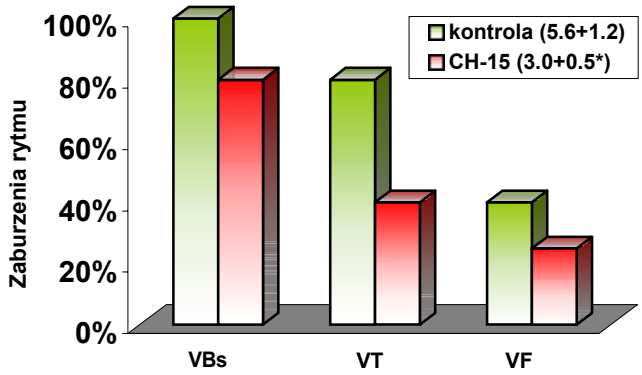
Ryc. 43. Wpływ związku **CH-11** (10^{-6}M) na niemiarowość izolowanego serca szczura (VBs-przedwczesne pobudzenia komorowe, VT-tachykardia komorowa, VF-fibrylacja); *p<0.05

Związek **CH-12,** podany w stężeniu 10^{-6} M, wywierał istotne działanie zapobiegające występowaniu reperfuzyjnych zaburzeń rytmu izolowanego serca szczura, redukując tachykardię komorową o około 30%, fibrylację o 25% a przedwczesne pobudzenia komorowe o 50%, (indeks punktowy = 3.25$\pm$ 0.8), (Ryc. 44).



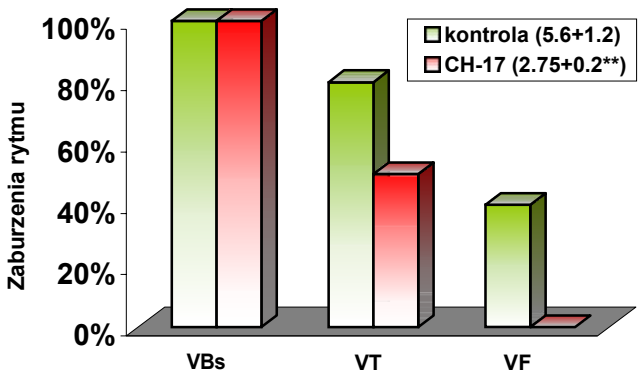
Ryc. 44. Wpływ związku **CH-12** (10^{-6}M) na niemiarowość izolowanego serca szczura (VBs-przedwczesne pobudzenia komorowe, VT-tachykardia komorowa, VF-fibrylacja); *p<0.05

Związek **CH-15,** w stężeniu 10^{-5} M, statystycznie znamiennie, zmniejszał zaburzenia rytmu serca w tym modelu arytmii zmniejszając występowanie przedwczesnych pobudzeń komorowych o 20%, częstoskurczu komorowego o 40% oraz migotania komór o 15% (indeks punktowy = 3.0 $\pm$ 0.5), (Ryc. 45).



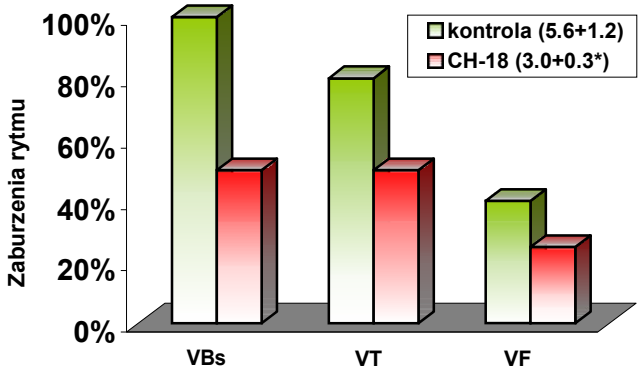
Ryc.45. Wpływ związku **CH-15** (10^{-5}M) na niemiarowość izolowanego serca szczura (VBs-przedwczesne pobudzenia komorowe, VT-tachykardia komorowa, VF-fibrylacja); *p<0.05

Związek **CH-17** w 10^{-5} M, wywierał statystycznie istotne działanie zapobiegające występowaniu reperfuzyjnych zaburzeń rytmu izolowanego serca szczura, redukując tachykardię komorową o około 30%, fibrylację o 40% (indeks punktowy = 2.75$\pm$ 0.2), (Ryc. 46).



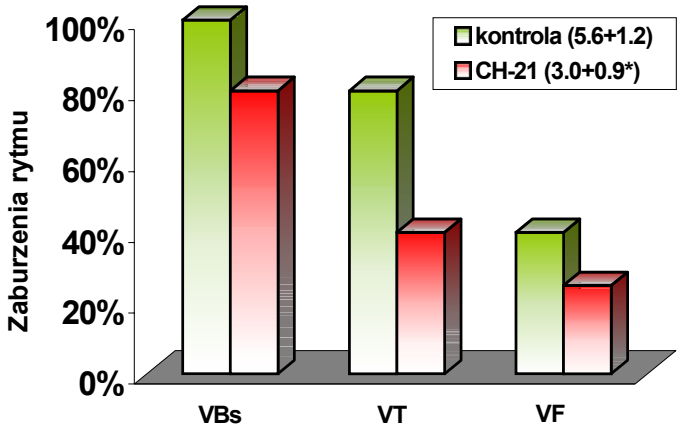
Ryc. 46. Wpływ związku **CH-17** (10^{-5}M) na niemiarowość izolowanego serca szczura (VBs-przedwczesne pobudzenia komorowe, VT-tachykardia komorowa, VF-fibrylacja); **p<0.02

Związek **CH-18,** dodany do płynu perfundującego serce w stężeniu 10^{-5} M zmniejszał występowanie częstoskurczu komorowego o 30% fibrylacji o 15% oraz zmniejszał przedwczesne pobudzenia nadkomorowe i komorowe o 50% w stosunku do kontroli (indeks punktowy = 3.0 $\pm$ 0.3), (Ryc. 47).



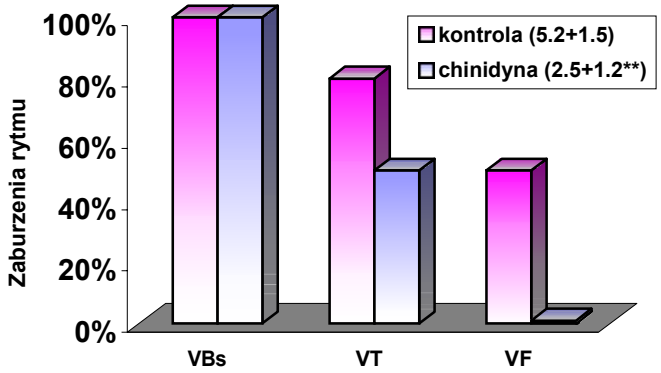
Ryc. 47. Wpływ związku **CH-18** (10^{-5}M) na niemiarowość izolowanego serca szczura (VBs-przedwczesne pobudzenia komorowe, VT-tachykardia komorowa, VF-fibrylacja); *p<0.05

Związek **CH-21,** podany w analogicznym stężeniu, statystycznie znamiennie zmniejszał zaburzenia rytmu serca w tym modelu arytmii, zmniejszając występowanie przedwczesnych pobudzeń komorowych o 20%, częstoskurczu komorowego o 40% a migotania komór o 15% (indeks punktowy = 3.0 $\pm$ 0.9), (Ryc. 48).



Ryc. 48. Wpływ związku **CH-21** (10^{-5}M) na niemiarowość izolowanego serca szczura (VBs-przedwczesne pobudzenia komorowe, VT-tachykardia komorowa, VF-fibrylacja); *p<0.05

Związek odniesienia **chinidyna,** podana w stężeniu 10^{-5} M zapobiegała w istotny sposób zaburzeniom rytmu serca wywołanych okluzją i reperfuzją naczynia wieńcowego. Zmniejszała występowanie częstoskurczu komorowego o 30% a fibrylacji o 50 %, (indeks punktowy = 2.5 $\pm$ 1.2), (Ryc. 49).



Ryc. 49. Wpływ **chinidyny** (10^{-5}M) na niemiarowość izolowanego serca szczura (VBs-przedwczesne pobudzenia komorowe, VT-tachykardia komorowa, VF-fibrylacja); **p<0.02

2.5. Wpływ na mięśniówkę gładką izolowanego jelita cienkiego królika

✓ Związek **CH-1**, w zakresie stężeń 10^{-7} – 10^{-4} M, statystycznie znamienne obniżał amplitudę skurczów jelita w granicach 37.7 – 74.4% (Tab. 25).

✓ Związek **CH-9** znamiennie redukował amplitudę skurczów w zakresie stężeń 10^{-5}–10^{-4} M o 54.3 – 63.1% (Tab. 25).

✓ Związek **CH-11**, w zakresie stężeń 10^{-8} – 10^{-4} M, statystycznie znamienne obniżał amplitudę skurczów jelita w granicach 51.5 – 73.6% (Tab. 25).

✓ Związek **CH-12** znamiennie zmniejszał amplitudę skurczów w granicach 43,7 – 70,0%, w przedziale stężeń od 10^{-6} do 10^{-4} M (Tab. 25).

Związki: **CH-15**, **CH-17** oraz **CH-21**, podane w zakresie stężeń 10^{-8}M–10^{-4}M istotnie statystycznie obniżały amplitudę skurczów jelita dopiero w stężeniu najwyższym tj: 10^{-4} M odpowiednio o: 53.5%, 49.2%, 71.6%, (Tab. 25). Natomiast związek **CH-18,** w całym przedziale podanych stężeń nie wykazywał znamiennego wpływu na amplitudę skurczów jelita cienkiego.

Wszystkie badane związki dodane do płynu odżywczego w zakresie stężeń 10^{-8} – 10^{-4} M nie wywierały znamiennego wpływu na częstotliwość spontanicznych skurczy perystaltycznych wyosobnionego jelita cienkiego królika, (Tab. 26).

Tabela 25. Wpływ badanych związków na mięśniówkę izolowanego jelita cienkiego królika.

Związek	Kontrola	Amplituda skurczów (cm)				
		10^{-8}[M]	10^{-7}[M]	10^{-6}[M]	10^{-5}[M]	10^{-4}[M]
CH-1	9.0±1.7	7.5±2.3	5.6±1.6*	3.2±3.6**	2.3±2.4***	2.3±2.4***
CH-9	5.7±2.9	5.7±2.9	5.7±2.1	4.8±3.6	2.6±2.8*	2.1±2.6**
CH-11	9.5±1.3	4.6±2.5*	4.2±2.3*	4.1±1.9*	3.8±1.7**	2.5±1.8***
CH-12	8.0±2.1	6.8±1.9	5.3±1.8	4.5±3.4*	3.7±4.2*	2.4±2.6**
CH-15	5.6±1.2	5.0±1.7	5.1±1.3	5.3±1.2	3.2±0.9	2.6±1.2*
CH-17	6.5±1.1	6.5±1.7	4.0±0.8	4.5±1.3	5.0±1.1	3.3±0.9*
CH-18	5.2±1.0	5.1±0.8	5.0±1.2	4.5±0.7	4.2±0.6	3.9±0.8
CH-21	5.3±0.9	4.8 ±1.1	4.9±1.6	5.0±1.3	4.5±0.8	1.5±0.5**

Wyniki przedstawiają średnią ± SEM (4 eksperymenty)
Analiza statystyczna: test ANOVA *p<0.05, **p<0.02, ***p<0.01

Tabela 26. Wpływ badanych związków na spontaniczne skurcze izolowanego jelita cienkiego królika.

Związek	Kontrola	Częstotliwość skurczów /min				
		10^{-8}[M]	10^{-7}[M]	10^{-6}[M]	10^{-5}[M]	10^{-4}[M]
CH-1	15.2±1.9	15.2±1.9	15.2±1.9	14.7±1.2	16.3±1.9	14.0±2.1
CH-9	10.2±1.7	11.2±2.5	10.0±1.7	11.5±2.8	10.3±1.9	10.3±1.9
CH-11	10.0±1.9	9.6±2.5	9.6±2.5	10.2±1.3	10.2±1.3	9.6±2.3
CH-12	10.7±3.6	9.0±2.9	9.3±3.1	9.0±2.0	9.0±2.0	8.9±2.6
CH-15	12.2±2.3	12.3±2.0	11.4±2.8	13.0±2.4	10.4±2.5	10.2±2.3
CH-17	13.4±3.4	13.2±2.8	12.4±1.7	11.2±2.5	11.6±1.9	10.0±3.1
CH-18	12.4±3.6	12.0±2.7	12.2±3.1	12.0±2.5	11.3±1.6	10.1±2.2
CH-21	11.2±2.0	11.2±2.0	13.1±1.3	13.2±2.1	13.0±1.2	11.4±1.6

2.6 Wpływ na ośrodkowy układ nerwowy

2.6.1 Wpływ na ruchliwość spontaniczną

- Związek **CH-1** podany dożołądkowo, na 60 minut przed eksperymentem w zakresie dawek 1/40 - 1/10 $LD_{50 p.o.}$, znamiennie zmniejszał ruchliwość zwierząt o
36.8 - 81.1%. Wyliczona wartość ED_{50} wynosi 43.2 (34.7 - 52.9) mg/kg (Tab. 27).
- Związek **CH-9**, podany w zakresie dawek 1/20 - 1/10 $LD_{50 p.o.}$, znamiennie zmniejszał ruchliwość zwierząt o 49.0 - 86.7%. Wyliczona wartość ED_{50} wynosi 24.8 (14.5 - 36.8) mg/kg (Tab. 27).
- Związek **CH-11**, w dawkach 1/20 - 1/10 $LD_{50 p.o.}$, statystycznie istotnie redukował ruchliwość spontaniczną myszy w granicach 45.6 - 77.1%. ED_{50} = 68.3 (51.9 - 82.9) mg/kg (Tab. 27).
- Związek **CH-12**, podany w dawce 1/20 i 1/10 $LD_{50 p.o.}$, jedynie w dawce wyższej istotnie zmniejszał ruchliwość o około 36.9% (Tab. 27).
- Związek **CH-15**, w dawkach 1/20 - 1/10 $LD_{50 p.o.}$, statystycznie istotnie redukował ruchliwość spontaniczną myszy w granicach 54.3 - 75.3%. ED_{50} = 45.6 (31.5 - 58.6) mg/kg (Tab. 27).
- Związek **CH-17**, w dawkach 1/40 - 1/10 $LD_{50 p.o.}$ statystycznie istotnie redukował ruchliwość spontaniczną myszy w granicach 45.8 - 86.9%. ED_{50} = 36.5 (21.5 - 49.8) mg/kg (Tab. 27).
- Związek **CH-18**, w dawkach 1/20 - 1/10 $LD_{50 p.o.}$, statystycznie istotnie redukował ruchliwość spontaniczną myszy w granicach 52.2 - 73.4%. ED_{50} = 48.9 (32.5 - 59.8) mg/kg (Tab. 27).
- Związek **CH-21**, w dawkach 1/20 - 1/10 $LD_{50 p.o.}$, statystycznie istotnie redukował ruchliwość spontaniczną myszy w granicach 43.7 - 74.6%. ED_{50} = 54.9 (37.8 - 68.4) mg/kg (Tab. 27).

Tabela 27. Wpływ badanych związków na ruchliwość spontaniczną myszy

Droga podania : dożołądkowo

Związek	Dawka		Ilość ruchów/30min ± SEM	Zmniejszenie ruchliwości (%)	ED_{50} (mg/kg *p.o.*)
	mg/kg	LD_{50}*p.o.*			
kontrola	0.5% metyloceluloza		374.0 ± 25.6	–	–
CH-1	104.0 52.0 26.0	1/10 1/20 1/40	70.4 ± 25. 4*** 152.6 ± 33.9** 236.0 ± 35.6*	81.1 59.2 36.8	43.2 (34.7-52.9)
CH-9	46.9 23.4 11.7	1/10 1/20 1/40	49.4 ± 12.8*** 190.0 ± 20.8* 296.1 ± 33.2	86.7 49.0 20.8	24.8 (14.5-36.8)
CH-11	125.8 62.9 31.4	1/10 1/20 1/40	85.4 ± 16.2** 203.2 ± 22.5* 311.0 ± 23.8	77.1 45.6 16.8	68.3 (51.9-82.9)
CH-12	63.5 31.7	1/10 1/20	235.8 ± 31.2* 302.5 ± 37.8	36.9 19.1	-
CH-15	83.2 41.6 20.8	1/10 1/20 1/40	92.3 ± 27.4*** 170.8 ± 29.4** 299.3 ± 31.8	75.3 54.3 19.9	45.6 (31.5-58.6)
CH-17	135.4 67.7 33.8	1/10 1/20 1/40	48.9 ± 15.8*** 138.0 ± 20.1** 202.5 ± 24.5*	86.9 63.1 45.8	36.5 (21.5-49.8)
CH-18	113.2 56.6 28.3	1/10 1/20 1/40	99.3 ± 32.6*** 178.5 ± 22.8* 290.6 ± 30.2	73.4 52.2 22.2	48.9 (32.5-59.8)
CH-21	86.2 43.1 21.5	1/10 1/20 1/40	94.8 ± 31.2** 210.3 ± 25.1* 358.2 ± 39.7	74.6 43.7 4.2	54.9 (37.8-68.4)

Wyniki przedstawiają średnie z 6 zwierząt w grupie ± SEM. Różnica statystycznie znamienna w porównaniu z kontrolą (test t-Studenta); *$p<0.05$, *$p<0.02$, ***$p<0.01$

2.6.2 Wpływ na czas trwania snu tiopentalowego

Wszystkie badane związki, podane dożołądkowo na 60 minut przed dootrzewnowym podaniem tiopentalu, statystycznie istotnie, wydłużały czas trwania snu tiopentalowego (Tab. 28). Jak wynika z danych zestawionych w Tabeli 28, najsilniej czas snu tiopentalowego przedłużał związek **CH-17**, a następnie **CH-18**, **CH-9**, **CH-1**, **CH-11**, **CH-21**, **CH-15**, **CH-12**.

- Związek **CH-1** podany w dawce 52.0 i 104.0 mg/kg (1/20 i 1/10 $LD_{50p.o.}$) istotnie przedłużał czas trwania snu tiopentalowego odpowiednio o 102.2 i 190.6%.
- Związek **CH-9** podany w dawce 1/20 i 1/10 $LD_{50p.o.}$ znamiennie przedłużał czas trwania snu w granicach 139.7 - 219.5%.
- Związek **CH-11** podany w dawce 42.6 i 85.2 mg/kg (1/20 i 1/10 $LD_{50p.o.}$) istotnie przedłużał czas trwania snu tiopentalowego odpowiednio o 84.4 i 175.9%.
- Związek **CH-12** tylko w dawce 1/10 $LD_{50p.o.}$ znamiennie przedłużał czas trwania snu o 112.4%.
- Związek **CH-15** podany w zakresie dawek 1/40 - 1/10 $LD_{50p.o.}$, znamiennie przedłużał czas trwania snu w dawce 1/20 i 1/10 $LD_{50p.o.}$, odpowiednio o 112.5 - 161.7%.
- Związek **CH-17** podany w zakresie dawek 1/40 - 1/10 $LD_{50p.o.}$ znamiennie przedłużał czas trwania snu w granicach 99.0 - 254.2%.
- Związek **CH-18** statystycznie istotnie przedłużał czas trwania snu, w zakresie dawek 1/20 - 1/10 $LD_{50p.o.}$ w granicach 145.1 - 231.6%.
- Związek **CH-21** podany w zakresie dawek 1/20 - 1/10 $LD_{50p.o.}$ znamiennie przedłużał czas trwania snu w granicach 103.7 - 174.9%.

Tabela 28. Wpływ badanych związków na czas trwania snu tiopentalowego

Związek	Dawka mg/kg (1/x LD_{50}) *p.o.*	Czas trwania snu (min)	Przedłużenie czasu trwania snu (%)
kontrola	0.5% metyloceluloza	35.3 ± 5.2	–
CH-1	104.0 (1/10) 52.0 (1/20) 26.0 (1/40)	102.6 ± 4.8*** 71.4 ± 7.2** 41.0 ± 5.7	190.6 102.2 16.1
CH-9	46.9 (1/10) 23.4 (1/20) 11.7 (1/40)	112.8 ± 11.0*** 84.5 ± 17.5** 42.3 ± 9.9	219.5 139.7 19.8
CH-11	125.8 (1/10) 62.9 (1/20) 31.4(1/40)	97.6 ± 21.3*** 65.1 ± 17.0* 43.1± 17.0	175.9 84.4 22.0
CH-12	63.5 (1/10) 31.7 (1/20)	75.0 ± 17.3** 42.4 ± 21.0	112.4 20.1
kontrola	0.5% metyloceluloza	31.9 ± 4.7	–
CH-15	83.2 (1/10) 41.6 (1/20) 20.8 (1/40)	83.5 ± 13.5** 67.8 ± 16.7* 35.0 ± 25.2	161.7 112.5 9.7
CH-17	135.4 (1/10) 67.7 (1/20) 33.8 (1/40)	113.0 ± 19.7*** 80.2 ± 22.4** 63.5 ± 19.6*	254.2 151.4 99.0
CH-18	113.2 (1/10) 56.6 (1/20) 28.3 (1/40)	105.8 ± 18.6*** 78.3 ± 14.7** 41.8 ± 12.6	231.6 145.4 31.0
CH-21	86.2 (1/10) 43.1 (1/20) 21.5 (1/40)	87.7 ± 23.8*** 65.0 ± 16.7* 38.2 ± 15.1	174.9 103.7 19.7

Wyniki przedstawiają średnie z 6 zwierząt w grupie ± SEM. Różnica statystycznie znamienna w porównaniu z kontrolą (test t-Studenta); *$p<0.05$, **$p<0.02$,***$p<0.001$

2.7. Działanie diuretyczne

Działanie diuretyczne dla wyselekcjonowanych związków oznaczono po ich dożołądkowym podaniu w dawce 25 mg/kg. Nieznaczny, statystycznie nieistotny, wzrost wydzielania moczu po 24 h obserwowano jedynie w przypadku związku **CH-1** (o 19.0%), **CH-17** (o 11.4%) oraz **CH-18** (o 21.9%). Natomiast pozostałe związki, nie wykazały działania diuretycznego (Tab. 29).

Tabela 29. Wpływ badanych związków na diurezę u szczura

Nazwa związku	Dobowa zbiórka moczu w cm^3 na 1 szczura x ± SEM		Wzrost wydzielania moczu w % po 24 h
	5h	24h	
Kontrola	8.1 ± 1,2	10.5 ± 1.1	-
CH-1	8.6 ± 0.9	12.5 ± 1.3	19.0%
CH-9	7.3 ± 0.7	10.6 ± 0.9	0.93%
CH-11	8.3 ± 0.8	10.7 ± 1.6	1.9%
CH-12	7.9 ± 1.2	10.2 ± 1.3	--
CH-15	8.3 ± 0.8	10.7 ± 1.2	1.9%
CH-17	8.9 ± 0.5	11.7 ± 1.1	11.4%
CH-18	9.1 ± 0.7	12.8± 0.6	21.9%
CH-21	6.8 ± 1.1	9.2 ± 1.3	--

Wyniki przedstawiają średnie z 5 zwierząt w grupie ± SEM

VI. DYSKUSJA

Jedną z metod otrzymywania nowych związków biologicznie aktywnych jest modyfikacja struktur leków już istniejących. Złożony mechanizm działania metyloksantyn sprawia, że ciągle poszukuje się nowych jej analogów, o bardziej selektywnym i ukierunkowanym działaniu farmakologicznym. Przykładem tych poszukiwań mogą być badania prowadzone od lat w Katedrze Chemii Leków Wydziału Farmaceutycznego CM UJ, które polegają na wprowadzaniu różnych podstawników w położenie 7,8-teofiliny [26, 27, 90]. Ich celem jest uzyskanie wybiórczych antagonistów receptorów adenozynowych lub selektywnych inhibitorów fosfodiesteraz, a co za tym idzie nasilenia ich efektu spazmolitycznego z równoczesnym ograniczeniem występujących obecnie np. po teofilinie działań niepożądanych (pobudzenie OUN, zaburzenia rytmu, refleks żołądkowo-przełykowy) będących skutkiem nieselektywnego blokowania receptorów adenozynowych.

Między innymi otrzymano serię nowych 7-β-hydroksy-γ-(N_4-fenoksyetylo-piperazyno)-propylowych pochodnych, zawierających niepodstawiony względnie podstawiony fluorowcem lub resztami eterowymi, pierścień fenylowy. Wstępne badania farmakologiczne pozwoliły wyselekcjonować aktywny związek oznaczony symbolem **CH-1,** czyli dichlorowodorek 7-β-hydroksy-γ-(N_4-fenoksyetylopiperazyno)-propylo-teofiliny [26, 27, 48].

Związek **CH-1** posiada tosyczność zbliżoną do aminofiliny, zwiększa częstotliwość pracy serca szczura *in vivo* i *in vitro*, a tym samym posiada cechy inhibitora fosfodiesterazy. Podany profilaktycznie (dożylnie i dożołądkowo) i leczniczo, w przeciwieństwie do aminofiliny, wykazuje silne działanie ochronne w modelu arytmii adrenalinowej oraz istotne działanie hipotensyjne, które jest najprawdopodobniej wynikiem działania α-adrenolitycznego, ponieważ związek **CH-1** posiada także powinowactwo do receptorów α_{1-} oraz α_{2-}adrenergicznych i zapobiega presyjnemu działaniu adrenaliny, noradrenaliny, metoksaminy, tyraminy oraz DMPP [26, 27, 48, 103].

Silna aktywność przeciwarytmiczna i hipotensyjna związku **CH-1** w pełni uzasadniała próby modyfikacji struktury związku **CH-1** w celu uzyskania jego analogów o jeszcze silniejszym działaniu przeciwarytmicznym i hipotensyjnym, a znacznie większej

selektywności w stosunku do receptora α_1-adrenergicznego. Modyfikacja struktury, polegająca na wprowadzeniu różnych podstawników w położenie 7 i/lub 8 macierzystej struktury, doprowadziła do syntezy serii nowych analogów związku **CH-1,** które stały się przedmiotem badań farmakologicznych stanowiących przedmiot niniejszej rozprawy doktorskiej.

Zgodnie z przedstawionym planem pracy, w pierwszym etapie oznaczono powinowactwo do receptorów α_1-, α_2-, β_1-adrenergicznych, aktywność przeciwarytmiczną w modelu arytmii adrenalinowej i barowej oraz aktywność hipotensyjną po podaniu dożylnym dla 13 analogów **CH-1**.

Badania radioreceptorowe wykazały, że większość związków pochodnych teofiliny wypierała [^{3}H]-prazosynę i [^{3}H]-klonidynę ze specyficznych miejsc wiążących w korze mózgowej szczura, co świadczy o ich powinowactwie do receptorów α_1-, α_2-adrenergicznych. Ich powinowactwo do receptorów α_1-adrenergicznych było silniejsze lub porównywalne z **CH-1**. Najsilniejsze, około 3,5-10 krotnie większe od **CH-1** (K_i = 1400 nM),. powinowactwo do receptorów α_1-adrenergicznych wykazały związki **CH-19, CH-20, CH-15, CH-14, CH-12, CH-18** (K_i = 143-383 nM). Tylko dwa związki tj. **CH-13** i **CH-16,** nie wypierały z miejsc wiążących w korze mózgowej szczura znakowanej [^{3}H]-prazosyny.

Związki **CH-9**, **CH-20**, **CH-19** (K_i = 152-389 nM) wykazały również silniejsze od **CH-1** (K_i = 400 nM) powinowactwo do receptorów α_2-adrenergicznych. Natomiast pozostałe związki wypierały znakowaną [^{3}H]-klonidynę słabiej od **CH-1** (K_i = 575-6058 nM). Związki **CH-13**, **CH-14** oraz **CH-16**, podane w stężeniu do 50 μM, nie wypierały z miejsc wiążących w korze mózgowej szczura znakowanej [^{3}H]-klonidyny.

Przeprowadzone badania pozwalają stwierdzić, iż największe powinowactwo do receptorów α_1-adrenergicznych posiadały związki zawierające w swojej strukturze ugrupowanie fenoksyetylopiperazynowe lub fenylopiperazynowe. Wprowadzenie do związku **CH-1** w pozycji 8 ugrupowania 2-pirydyloetyloaminowego oraz zamiana podstawnika fenoksyetylopiperazynowego ugrupowaniem benzylopiperazynowym (**CH-13**) lub 2-hydroksyetylopiperazynowym (**CH-16**) doprowadziła do zaniku powinowactwa do receptorów α_1-, α_2- adrenergicznych.

Wszystkie badane związki, podane w stężeniu do 100 μM, nie wypierały z miejsc wiążących w korze mózgowej szczura znakowanego [^{3}H]-CGP12177, co świadczy o braku powinowactwo badanych związków do receptorów β_1–adrenergicznych.

Na obecnym etapie badań nie można wykluczyć także powinowactwa badanych związków do receptorów serotoninowych 5-HT_{1A}, czy 5-HT_2 [78, 83, 84, 116]. W dalszych badaniach wskazane byłoby także oznaczenie ich powinowactwa do wyżej wymienionych receptorów oraz do receptorów adenozynowych, do których powinowactwo posiadają naturalne metyloksantyny.

Związki **CH-9**, **CH-10**, **CH-11**, **CH-12**, **CH-13**, **CH-14**, **CH-15**, **CH-17**, **CH-18**, **CH-19**, **CH-20** i **CH-21** oraz związek odniesienia **CH-1**, podane dożylnie na 15 minut przed adrenaliną, istotnie zapobiegały poadrenalinowym zaburzeniom rytmu pracy serca. Jak wynika z porównania wartości IT (indeksów terapeutycznych) najkorzystniejszy profil farmakologiczny w modelu arytmii adrenalinowej wykazały związki **CH-17** i **CH-18**, które podane dożylnie, skutecznie zabezpieczały przed zaburzeniami poadrenalinowymi. Wartości ED_{50} dla tych związków wynoszące odpowiednio 3.6 i 3.9 mg/kg, były wyższe od wartości ED_{50} dla **propranololu** (1.05 mg/kg), niższe od **chinidyny** (8.7 mg/kg), a zbliżone do wartości ED_{50} dla związku odniesienia **CH-1**. Natomiast ich IT były porównywalne do związku odniesienia **CH-1**, a odpowiednio 1.4-krotnie i 1.6-krotnie korzystniejsze od **propranololu** (IT = 37) oraz 9.2-krotnie i 9.9-krotnie od **chinidyny** (IT = 6.0), [27, 50].

Istotną aktywność przeciwarytmiczną w modelu arytmii adrenalinowej wykazały również związki **CH-15** oraz **CH-21**. Ich efekt przeciwarytmiczny (IT dla **CH-15** oraz dla **CH-21**= 40.2) był porównywalny do **propranololu** i silniejszy od **chinidyny**, natomiast słabszy od **CH-1**.

Pozostałe związki tj. **CH-11**, **CH-12** oraz **CH-9** w mniejszym stopniu zabezpieczały zwierzęta przed zaburzeniami poadrenalinowymi. Aktywność przeciwarytmiczna tych związków była niższa od **propranololu** i **CH-1.** Natomiast związki **CH-11** (IT = 12.1) oraz **CH-12** (IT = 9.5) wykazały korzystniejszy indeks terapeutyczny od **chinidyny.**

Mechanizm przypuszczalnego mechanizmu działania przeciwarytmicznego tych związków jest najprawdopodobniej wynikiem ich właściwości α_1- i α_2-adrenolitycznych, bowiem jak wykazano w badaniach radioreceptorowych, badane związki nie posiadają

powinowactwa do receptorów β_1-adrenergicznych. Z piśmiennictwa wiadomo, że leki α-adrenolityczne (prazosyna, fentolamina) zmniejszają lub nawet zapobiegają występowaniu arytmii niedokrwiennych, towarzyszących okluzji i reperfuzji naczynia wieńcowego *in vitro* i *in vivo* [6, 14, 70]. Wiadomo też, że antagoniści receptorów α-adrenergicznych w wyższych stężeniach blokują kanał sodowy i wywierają działanie błonowe „miejscowo-znieczulające", które może objawiać się zmianami elektrofizjologicznymi we włóknach Purkinjego podobnymi do tych, jakie obserwuje się po podaniu leków przeciwarytmicznych klasy I [6].

Istnieje wiele danych mówiących, że prazosyna – klasyczny α_1-adrenolityk skutecznie znosi zaburzenia rytmu serca indukowane niedokrwieniem mięśnia sercowego u zwierząt [32, 33]. Sugeruje się, że aktywacja receptorów α_{1A}, które są obecne w układzie bodźco-przewodzącym serca, może przyczynić się do powstawania zaburzeń rytmu. W badaniach wykazano, że blokada receptora α_{1A} za pomocą związku WB 4101, preferencyjnego antagonisty, prowadzi do hamowania powstawania zaburzeń serca indukowanych fenylefryną [115].

Adrenalina jest nieselektywnym agonistą receptorów α_1- α_2- oraz β_1-, β_2-adrenergicznych. W mięśniu sercowym stymulacja receptorów β-adrenergicznych podwyższa $I_{Ca\text{-}L}$ (prąd wapniowy), I_f (dokomórkowy prąd sodowy i potasowy), I_{Cl} (prąd indukowany jonami chlorkowymi), I_{Kur} (bardzo szybki prąd K^+ opóźniony prostowniczy), I_{ATP} (prąd K^+ zależny od ATP), I_{st}, i te działania mediowane są przez kinazę białkową zależną od cAMP [13, 18].

Z przebadanych związków, tylko trzy z nich oznaczone symbolami: **CH-9**, **CH-10** i **CH-11** podane dożylnie, odznaczały się słabą aktywnością przeciwarytmiczną w modelu arytmii barowej. Jak wynika z porównania wartości ED_{50} oraz IT najkorzystniejszy profil farmakologiczny w modelu arytmii barowej wykazały związki **CH-9** oraz **CH-10**. Wartości ED_{50} wynoszą odpowiednio 11.8 i 13.7 mg/kg i są niższe od wartości ED_{50} dla związku odniesienia **CH-1** (ED50 = 58.7 mg/kg). Podobnie ich IT (dla **CH-9**, IT = 6.3, dla **CH-10**, IT = 6.5) są ok. 2-krotnie korzystniejsze od **CH-1** (IT = 3.2), (Ryc. 1, Tab. 2). Natomiast związek **CH-11** wykazał nieco niższy indeks terapeutyczny (IT = 2.5) od związku odniesienia.

Natomiast pozostałe związki wykazały brak aktywności przeciwarytmicznej w tym modelu arytmii, co sugeruje, iż są raczej pozbawione działania stabilizującego błony komórkowe**.**

Zaburzenia rytmu serca wywołane chlorkiem baru tłumaczy się zwiększonym napływem jonów sodowych do komórek układu bodźcotwórczo-przewodzącego serca, zwłaszcza włókien Purkinjego [104]. Leki stabilizujące błony komórkowehamując napływ jonów Na^+ do komórki mogą zapobiegać zaburzeniom rytmu pracy serca, wywołanym podaniem chlorku baru [19]. Jony barowe spowalniają odkomórkowe prądy potasowe poprzez blokowanie bardzo szybkich opóźnionych prostowniczych kanałów potasowych, dośrodkowych prostowniczych kanałów potasowych (Kir), rozrusznikowych kanałów potasowych (I_k), podstawowych kanałów K^+ (I_K) i prądu K^+ indukowanego acetylocholiną ($I_{K,Ach}$), kanałów K^+ aktywowanych wapniem (I_{Ca}), kanałów K^+ ATP-wrażliwych ($I_{K,ATP}$), kanałów K^+ aktywowanych kwasami tłuszczowymi (I_{AA}), [13, 18, 60].

Wpływ badanych związków na ciśnienie skurczowe i rozkurczowe normotensyjnych, znieczulonych tiopentalem szczurów, mierzono metodą krwawą. Z przebadanych związków jedynie związki: **CH-9**, **CH-11**, **CH-12**, podane w dawce 1/10 $LD_{50i.v.}$ wykazały dłużej utrzymującą się, istotną aktywność hipotensyjną.

Najsilniejsze działanie hipotensyjne, zbliżone do struktury wiodącej **CH-1** wykazały związki **CH-9** oraz **CH-11**, które obniżały znamiennie ciśnienie tętnicze krwi do 60 (**CH-9**) lub 50 (**CH-11**) minuty obserwacji. Natomiast związek **CH-12**, wykazał słabszy efekt hipotensyjny, obniżając statystycznie istotnie ciśnienie skurczowe tylko do 20, a rozkurczowe do 5 minut od podania związku.

Obserwowana aktywność hipotensyjna związków **CH-9, CH-11** oraz **CH-12** po jednorazowym podaniu jest znacznie silniejsza i dłuższa od działania hipotensyjnego **propranololu** i **chinidyny**. Jak wynika z wcześniejszych badań przeprowadzonych w Pracowni Wstępnych Badań Farmakologicznych, **propranolol** podany dożylnie w dawce odpowiadającej 1/10 $LD_{50i.v.}$ wywoływał spadki ciśnienia o 30 - 20 mmHg, utrzymujące się przez 1-3 min, a **chinidyna** – podana w analogicznych warunkach – pozbawiona była efektu hipotensyjnego [50].

Przy próbie określenia przypuszczalnego mechanizmu działania badanych związków wzięto pod uwagę także ich wpływ na prawidłowy zapis elektrokardiograficzny serca szczura *in vivo* i *in vitro*.

Prawie wszystkie leki przeciwarytmiczne zmniejszają kurczliwość serca, działają chrono- i dromotropowo ujemnie oraz wywołują charakterystyczne zmiany w zapisie elektrokardiograficznym [40, 74, 113]. Leki klasy I – stabilizujące błonę komórkową, których dominującą cechą elektrofizjologiczną jest zwolnienie maksymalnej szybkości depolaryzacji w mięśniu sercowym, wydłużają odstęp P-Q, Q-T oraz poszerzają zespół QRS. Leki klasy II (β-adrenolityki), mające zdolność hamowania czwartej fazy depolaryzacji, w niskich dawkach nie zmieniają czasu trwania zespołu QRS, ani odcinka P-Q i Q-T, podane w wysokich dawkach mogą poszerzać zespół QRS i wydłużać czas trwania zarówno odcinka P-Q, jak i Q-T. Leki klasy III (sotalol, amiodaron, bretylium), wydłużając czas trwania potencjału czynnościowego, wywołują niewielkie zmiany w elektrokardiogramie w postaci wydłużenia odcinka Q-T, zaś leki klasy IV, charakteryzujące się wybiórczym antagonizmem w stosunku do jonów wapniowych, nie wywołują żadnych istotnych zmian w elektrokardiogramie lub wydłużają odcinek P-Q [69,112].

Związek **CH-17**, podobnie jak związek odniesienia **CH-1**, wywierał działanie chronotropowo-dodatnie, skracał czas trwania odstępu P-Q i Q-T (*in vitro* oraz *in vivo*), co może sugerować, iż związki te posiadają cechy inhibitora fosfodiesterazy. Pozostałe związki wywierały działanie chronotropowo-ujemne.

Analizując wpływ badanych związków na elektrokardiogram izolowanego serca szczura można stwierdzić, iż zmniejszały one częstotliwość pracy serca (**CH-9>CH-15>CH-12>CH-11>CH-18=CH-21>CH-10>CH-19>CH-20>CH-14>CH-16> CH-13).** Równocześnie ze zmniejszeniem częstotliwości pracy izolowanego serca szczura obserwowano wydłużenie odstępu P-Q (**CH-21>CH-18>CH-9>CH-19=CH-20>CH-15>CH-10>CH-11> CH-12>CH-14=CH-16> CH-13)**.

Działaniu chronotropo-ujemnemu towarzyszyło również wydłużenie odstępu Q-T (**CH-21>CH-9>CH-18>CH-12=CH-20>CH-19>CH-10>CH-11>CH-15>C14>CH-13> CH-16)**.

W elektrokardiogramie szczura *in vitro* zaobserwowano również poszerzenie zespołu QRS (**CH-21>CH-19>CH-9>CH-18>CH-10>CH-20>CH-11>CH-14= CH-16>CH-12>CH-15> CH-13)**.

Obniżeniu częstotliwości pracy serca towarzyszyło zmniejszenie wypływu wieńcowego (**CH-18>CH-21>CH-11>CH-20=CH-10>CH-12>CH-15>CH-13>CH-9>CH-19>CH-14>CH-16**).

Analizując wpływ badanych związków na elektrokardiogram izolowanego serca szczura *in vivo* i *in vitro* można stwierdzić, iż wydłużenie odstępu P-Q, Q-T i zespołu QRS zmniany tzw. „chinidynopodobne" nasuwa podobieństwo do leków przeciwarytmicznych klasy I.

Stwierdzona we wstępnym skriningu farmakologicznym wysoka aktywność przeciwarytmiczna i hipotensyjna siedmiu niżej wymienionych związków stała się podstawą do przeprowadzenia dla tych związkow poszerzonych badań, ukierunkowanych na poznanie innych właściwości farmakologicznych wyselekcjonowanych związków oraz na bardziej precyzyjne określenie mechanizmu działania przeciwarytmicznego i hipotensyjnego.

Spośród przebadanych związków do drugiego etapu badań zakwalifikowano siedem z nich, a mianowicie:

- dichlorowodorek 7 - β - hydroksy - γ - (N_4- fenoksyetylopiperazyno) – propylo – 8 – benzyloaminoteofiliny (**CH – 9**),
- trichlorowodorek 7 - β - hydroksy - γ - (N_4 -fenoksyetylopiperazyno) – propylo – 8 – (2 – pikoliloamino) – teofiliny (**CH – 11**),
- trichlorowodorek 7 - β - hydroksy - γ - (N_4 -fenoksyetylopiperazyno) – propylo – 8 – [2 – (2` - pirydyloetylo) – amino] – teofiliny (**CH – 12**),
- dichlorowodorek 7 - β - hydroksy - γ - (N_4 – fenoksyetylopiperazyno) – propylo – 8 – furfuryloaminoteofiliny (**CH – 15**),
- trichlorowodorek 7 - β - hydroksy - γ - (N_4 – fenoksyetylopiperazyno) – propylo – 8 – [2 – (morfolino) etyloamino] – teofiliny (**CH – 17**),
- dichlorowodorek 7 - β - hydroksy - γ - (N_4 – fenoksyetylopiperazyno) – propylo – 8 – [2 – (morfolino) etyloamino] – teofiliny (**CH – 18**),

- trichlorowodorek 7 - β - hydroksy - γ - (N_4 – fenoksyetylopiperazyno) – 8 – aminoteofiliny (**CH – 21**).

Dla wyselekcjonowanych związków oznaczono aktywność przeciwarytmiczną i hipotensyjną po podaniu dożołądkowym. Przeprowadzone badania wykazały, że związki te zachowały aktywność przeciwarytmiczną po podaniu dożołądkowym.

Najsilniejszą aktywność przeciwarytmiczną w modelu arytmii adrenalinowej wykazały związki **CH-17** i **CH-18**, które skutecznie zapobiegały poadrenalinowym zaburzeniom rytmu serca u szczura (ED_{50} dla **CH-17** wynosi: 23,6 mg/kg, IT= 57,4, ED_{50} dla **CH-18** = 21,8 mg/kg, IT = 51,9). Efekt przeciwarytmiczny tych związków był zbliżony do związku odniesienia **CH-1** dla którego ED_{50}=19,8 mg/kg, IT = 52,5, a ich IT są odpowiednio 2.4-krotnie i 2.2-krotnie korzystniejsze od **propranololu** oraz 3.7-krotnie i 3.3-krotnie od **chinidyny** (IT dla propranololu = 24.0, a dla chinidyny = 15.6).

Nieznacznie mniejszy efekt przeciwarytmiczny wykazały związki **CH-15** i **CH-21** (ED_{50} dla **CH-15** = 37,6 mg/kg, IT = 22,1, ED_{50} dla **CH-21**= 40,1 mg/kg, IT = 21,5), których IT są porównywalne do **propranololu,** nieznacznie korzystniejsze od **chinidyny**, natomiast mniej korzystne od związku **CH-1**.

Pozostałe związki tj. **CH-11**, **CH-12** oraz **CH-9** w mniejszym stopniu zabezpieczały zwierzęta przed zaburzeniami indukowanymi podaniem adrenaliny, zarówno w stosunku do związku **CH-1**, **propranololu** jak i **chinidyny**, przy czym najsłabsze działanie osłaniające wykazał związek **CH-9** (ED_{50} dla **CH-11**= 125,8 mg/kg, IT= 10, ED_{50} dla **CH-12** = 63,3 mg/kg, IT = 10, ED_{50} dla **CH-9** = 170,2 mg/kg, IT = 2,7).

Z zestawienia wartości indeksów terapeutycznych w modelu arytmii adrenalinowej, po podaniu dożołądkowym (**CH-17**>**CH-18**>**CH-15**>**CH-21**>**CH-11**>**CH-12**>**CH-9**) oraz po podaniu dożylnym (**CH-17**>**CH-18**>**CH-15**>**CH-21**>**CH-11**>**CH-12**>**CH-9**), wynika, że badane związki wykazały podobne bezpieczeństwo przy obu drogach podania.

Jak wykazał Curtis i współ. [36] komorowe zaburzenia rytmu pracy serca szczura towarzyszące okluzji i reperfuzji naczynia wieńcowego, mogą być przydatne w badaniu skriningowym nowych związków o spodziewanym działaniu przeciwarytmicznym. Mechanizm reperfuzyjnych zaburzeń rytmu serca związany jest z przywróceniem przepływu wieńcowego w obszarze uprzednio niedokrwionym. Bezpośrednią przyczyną tych zaburzeń jest nadprodukcja toksycznych, reaktywnych form tlenowych ($O^{-}\bullet$, H_2O_2,

$OH^{\bullet}$), zaburzenie homeostazy jonów wapniowych w komórce, wzmożona stymulacja adrenergiczna, a także utrata lub upośledzenie syntezy ATP [9, 11, 37, 66]. Brooks i współ. [15] udowodnili, że reperfuzyjne zaburzenia rytmu pracy serca szczura, w badaniach *in vivo* (narkotyzowany szczur) oraz *in vitro* (izolowane serce) mogą być znoszone przez leki reprezentujące wszystkie cztery klasy wg podziału Vaughan Williams'a. Stąd model komorowych zaburzeń rytmu pracy izolowanego serca, indukowanych okluzją i reperfuzją naczynia wieńcowego uznano za przydatny do potwierdzenia aktywności przeciwarytmicznej badanych związków.

Przeprowadzone badania *in vitro* wykazały, że związki **CH-17**, **CH-15**, **CH-18** oraz **CH-21** w stężeniu 10^{-5} M, w znacznym stopniu zapobiegają tachykardii komorowej i fibrylacji indukowanej okluzją i reperfuzją naczynia wieńcowego, Wartości indeksu punktowego (IP), wynoszące odpowiednio 2.75, 3.0, 3.0, 3.0, są zbliżone do wartości IP dla związków odniesienia **CH-1** (IP = 2.75) i **chinidyny** (IP = 2.5). Istotne działanie umiarawiające pracę izolowanego serca szczura występowało również, po podaniu związków **CH-11** (IP = 3.25) oraz **CH-12** (IP = 3.25) w stężeniu 10^{-6} M. Natomiast związek **CH-9** w mniejszym, statystycznie nieistotnym stopniu zmniejszał reperfuzyjne zaburzenia rytmu izolowanego serca szczura. Uzyskane wyniki sugerują, że związki te mogą wywierać korzystny wpływ na zaburzenia rytmu pracy wyosobnionego serca, indukowane niedotlenieniem.

W niedokrwionym mięśniu sercowym obserwuje się zewnątrzkomórkowe podwyższenie stężenia jonów K^+. Podwyższony jest także poziom adenozyny, która jest kardioprotekcyjną substancją, chroniącą mięsień sercowy przed uszkodzeniami w czasie niedokrwienia i reperfuzji. W niedokrwionym mięśniu sercowym adenozyna powstaje z AMP na drodze enzymatycznej defosforylacji pod wpływem enzymu 5' nukleotydazy [88]. Ostatnie dane z piśmiennictwa wskazują na powiązanie pomiędzy wyżej wymienionymi czynnikami, które są znacząco podwyższone w niedokrwionym mięśniu sercowym. Podwyższone stężenie jonów K^+ powoduje uwalnienie noradrenaliny z nerwów sympatycznych. Noradrenalina poprzez receptory α_1- adrenergiczne aktywuje kaskadę kinaza białkowa C (PKC)- 5' nukleotydaza, co powoduje podwyższenie stężenia adenozyny [88].

Wszystkie badane związki podane dożołądkowo zachowały znamienną aktywność hipotensyjną, przy czym i w tym przypadku najsilniejsze działanie wykazały związki **CH-9**

oraz **CH-11**, które obniżały znamiennie ciśnienie tętnicze krwi od 5 (**CH-9**) lub 30 (**CH-11**, **CH-12**) minuty od podania do końca obserwacji tj. do 90 minuty. Obserwowany efekt hipotensyjny był porównywalny (**CH-9**, **CH-11**) lub słabszy (**CH-12**) od efektu hipotensyjnego związku odniesienia tj. **CH-1**.

W celu wyjaśnienia hipotensyjnej aktywności tych związków, występującej zarówno przy podaniu dożylnym jak i dożołądkowym, oceniono ich wpływ na: mięśniówkę gładką izolowanego jelita cienkiego królika, presyjne działanie adrenaliny (agonista receptorów α_1- i α_2- oraz β-adrenergicznych), noradrenaliny (agonista receptorów α_1- i α_2-adrenergicznych), metoksaminy (agonista receptorów α_1-adrenergicznych), tyraminy (amina sympatykomimetyczna zwiększająca uwalnianie noradrenaliny) i DMPP (dimetylofenylopiperazyna – agonista receptorów nikotynowych w zwojach wegetatywnych) oraz działanie diuretyczne.

Wszystkie badane związki, podobnie jak związek odniesienia **CH-1**, zmniejszały znamiennie fazę hypertoniczną występującą po podaniu adrenaliny, metoksaminy, tyraminy i DMPP. Osłabiały również statystycznie istotnie, wzrost ciśnienia wywołany podaniem noradrenaliny. Natomiast związek **CH-9**, zmniejszał nieznacznie, statystycznie nieistotnie, presyjne działanie noradrenaliny. Ten słaby efekt może być spowodowany 3-krotnie wyższym powinowactwem tego związku do receptorów α_2- adrenergicznych niż do α_1.

Znoszenie presyjnego działania adrenaliny na ciśnienie tętnicze krwi przyjmowane jest przez wielu autorów jako wynik antagonizmu do receptora α_1-adrenergicznego [1, 77, 84]. Wszystkie stosowane w terapii leki blokujące receptory α_1- znoszą presyjne działanie adrenaliny [33, 77]. Również leki blokujące receptory α_1- i α_2-adrenergiczne zapobiegają presyjnemu działaniu adrenaliny [77, 85]. Leki α_1-adrenolityczne zmniejszają znamiennie fazę hypertoniczną po noradrenalinie, ale także leki blokujące receptory α_1- i α_2-adrenergiczne hamują znamiennie hypertensyjne działanie noradrenaliny. Leki blokujące selektywnie receptory α_1-adrenergiczne (prazosyna) antagonizują działanie metoksaminy oraz zmniejszają presyjne działanie tyraminy, natomiast nieselektywni antagoniści receptorów α-adrenergicznych (tolazolina) nie zmieniają odpowiedzi na tyraminę [77]. Leki blokujące receptory α_1-, zmniejszają hypertensyjną fazę po DMPP,

podczas gdy leki blokujące receptory α_2-adrenergiczne nie wpływają lub ją zwiększają.

Zwykle podanie DMPP prowadzi w pierwszej fazie do spadku ciśnienia tętniczego, spowodowanego pobudzeniem receptorów N w zwojach parasympatycznych i uwolnieniem endogennej acetylocholiny, następnie do wzrostu ciśnienia wywołanego aktywacją zwojów sympatycznych i uwolnieniem endogennej noradrenaliny, a później do kolejnego spadku ciśnienia wywołanego uwolnieniem adrenaliny z rdzenia nadnerczy [77].

Znamienne zapobieganie presyjnemu działaniu adrenaliny, metoksaminy, tyraminy i DMPP oraz częściowe zmniejszenie odpowiedzi na noradrenalinę sugeruje, że badane związki prawdopodobnie posiadają właściwości α_1- i α_2-adrenolityczne.

Działanie spazmolityczne jest charakterystyczne dla metyloksantyn stosowanych w lecznictwie. Jak wykazały przeprowadzone badania, związki **CH-11** i **CH-12** wykazały, porównywalne do związku odniesienia **CH-1**, statystycznie istotne działanie spazmolityczne (począwszy od stężenia 10^{-8} M dla **CH-11**, od 10^{-6} M dla **CH-12**), natomiast związek **CH-9** wykazał słabsze działanie od związku odniesienia. Związki **CH-15**, **CH-17** oraz **CH-21** wykazały działanie spazmolityczne dopiero w najwyższym stężeniu tj. 10^{-4} M, a związek **CH-18** nie wpływał znamiennie na mięśniówkę gładką izolowanego jelita cienkiego królika. Jak wynika z badań, najwyższą aktywność spazmolityczną wykazały związki obniżające ciśnienie tętnicze krwi, co sugeruje, iż działanie spazmolityczne ma wpływ na efekt hipotensyjny. Potwierdzeniem tej sugestii jest fakt, iż pozbawiony aktywności spazmolitycznej związek **CH-18** nie obniża ciśnienia tętniczego krwi, pomimo powinowactwa do receptorów α_1- adrenergicznych.

Tak więc można przypuszczać, że efekt hipotensyjny badanych związków jest najprawdopodobniej wynikiem działania α-adrenolitycznego oraz spazmolitycznego. Jest to tym bardziej prawdopodobne, że związki **CH-1**, **CH-9** posiadaja odpowiednio 3.5-3-krotnie, a związek **CH-11** 1.5-krotnie większe powinowactwo do receptorów α_2-adrenergicznych niż do α_1-adrenergicznych, a spadki ciśnienia są znaczne i długotrwałe. Jak bowiem wiadomo, same leki blokujące receptory α_1- i α_2-adrenergiczne wywołują krótkotrwale, proporcjonalne do dawki, spadki ciśnienia z następową fazą hypertensyjną, będącą wynikiem uwalniania amin katecholowych z ziarnistości presynaptycznych [35]. Jest to tym bardziej prawdopodobne, że związki wykazujące działanie hipotensyjne pozbawione są działania diuretycznego. Jak wykazały bowiem przeprowadzone badania,

nieznaczny, statystycznie nieistotny wzrost wydzielania moczu, obserwowano jedynie po podaniu związku **CH-1**, **CH-17** oraz **CH-18**. Efekt ten jest nieporównywalnie słabszy od efektu diuretycznego aminofiliny i nie może wpływać na działanie hipotensyjne tych związków [52].

Dodatkowo w badaniach poszerzonych oznaczono wpływ wyselekcjonowanych związków na ruchliwość spontaniczną myszy, czas trwania snu tiopentalowego oraz oznaczono ich toksyczność ostrą. Wszystkie badane związki, podobnie jak związek odniesienia **CH-1**, znamiennie zmniejszały ruchliwość spontaniczną myszy oraz przedłużały czas trwania snu tiopentalowego. Zmniejszenie ruchliwości spontanicznej zwierząt oraz przedłużenie czasu ich snu świadczą o depresyjnym wpływie tych związków na ośrodkowy układ nerwowy. Podobne działanie opisano po podaniu propranololu, jak również urapidylu. Urapidyl blokuje bardziej wybiórczo receptory α_1, słabiej α_2, ale posiada także słabo wyrażone właściwości β_1-adrenolityczne. Działa też na ośrodkowe neurony 5-HT [81, 94, 95 98]. Efekt ten odbiega od charakterystycznego dla metyloksantyn, pobudzającego wpływu na OUN [52]. Działanie uspokajające badanych związków, prawdopodobnie może być wynikiem blokowania receptorów α_1-adrenergicznych OUN i spadkiem ciśnienia.

Badania toksyczności ostrej przeprowadzono na myszach, przy dwóch drogach podania. Z porównania wartości LD_{50} wynika że, związki **CH-11**, **CH-17** i **CH-18** wykazały zbliżoną lub nieco niższą toksyczność od związku **CH-1** i aminofiliny przy podaniu dożylnym, natomiast pozostałe związki okazały się bardziej toksyczne od związku odniesienia. Podane dożołądkowo, za wyjątkiem **CH-9**, wykazały mniejszą toksyczność od aminofiliny. W trakcie podawania dawek subtoksycznych obserwowano również zmniejszenie ruchliwości zwierząt, ospałość oraz brak zainteresowania otoczeniem, co potwierdzałoby ich działanie uspokajające na OUN.

Analiza otrzymanych wyników pozwala na ustalenie pewnych zależności pomiędzy strukturą badanych związków a ich aktywnością przeciwarytmiczną, hipotensyjną oraz α-adrenolityczną.

W strukturze aktywnych związków można wyróżnić układ teofiliny oraz ugrupowanie fenoksyetylopiperazynowe lub fenylopiperazynowe (związek **CH-18**).

Ugrupowanie fenylopiperazynowe jest obecne w strukturze wielu związków o działaniu α-adrenolitycznym : naftopidyl, urapidyl, 5-metylourapidil oraz ARC-239 [84, 99, 108]. Już w roku 1948 Bovet opisał N^2- podstawione fenylopiperazyny o aktywności blokującej receptory adrenergiczne [11]. Także badania prowadzone w Pracowni Wstępnych Badań Farmakologicznych wykazały, że związki zawierające w swojej strukturze ugrupowanie fenoksyetylopiperazynowe lub fenylopiperazynowe posiadają powinowactwo do receptorów α-adrenergicznych.

Ugrupowanie fenoksyetylopiperazynowe można rozpatrywać jako ugrupowanie fenoksyetyloaminowe, występujące w α–adrenolitykach (fenoksybenzamina). Ugrupowanie fenoksyetyloaminowe jest obecne również w strukturze nowej generacji β-adrenolityku- karwedilolu. Obecne w badanych związkach ugrupowanie fenoksyetyloaminowe, można również rozpatrywać jako eterową pochodną kolaminy, która stanowi element strukturalny antagonistów receptorów histaminowych H_1.

Najkorzystniejsza dla aktywności hipotensyjnej jest obecność w położeniu 7 teofiliny ugrupowania fenoksyetylopiperazynowego a w pozycji 8 podstawnika 2-benzyloaminowego lub 2-pirydylometyloaminowego.

Zastąpienie ugrupowania fenoksyetylopiperazynowego w pozycji 7 teofiliny, innym fragmentem piperazynowym np. fenylopiperazynowym, benzylopiperazynowym, 2-hydroksyetylopiperazynowym lub metylenodioksy-fenoksyetylopiperazynowym prowadzi do zaniku aktywności przeciwarytmicznej, z wyjątkiem związku **CH-18.** Na aktywność przeciwarytmiczną wpływa również rodzaj podstawnika w położenie 8 teofiliny (benzyloaminowego, 2-[2'-pirydyloetylo]-aminowego, furfuryloaminowego, 2-[morfolino]-etyloaminowego).

Reasumując – przeprowadzone badania farmakologiczne wykazały, że poprzez modyfikacje chemiczne w grupie 7,8-dipodstawionych pochodnych teofiliny uzyskano związki o nowym profiliu farmakologicznym, tj. o działaniu α-adrenolitycznym, przeciwarytmicznym i/lub hipotensyjnym. Określenie zależności struktura-działanie stanowi cenną wskazówkę do syntezy dalszych struktur chemicznych.

VII. WNIOSKI

1. Wcześniejsze badania farmakologiczne w grupie 7-podstawionych teofiliny, pozwoliły wyselekcjonować związek, oznaczony symbolem **CH-1** [dichlorowodorek 7-β-hydroksy-γ-(N_4-fenoksyetylopiperazyno) - propylo-teofiliny], który wykazał istotne działanie przeciwarytmiczne, hipotensyjne oraz słabe powinowactwo do receptorów α_1-, α_2-adrenergicznych.
2. W wyniku modyfikacji związku **CH-1**, polegających na wprowadzeniu różnych podstawników aryloalkiloaminowych lub aminoalkiloaminowych w położenie 8 teofiliny, a także przez zastąpienie ugrupowania fenoksyetylopiperazynowego innym ugrupowaniem piperazynowym, otrzymano siedem aktywnych stuktur, o powinowactwie do receptorów α_1- oraz α_2-adrenergicznych i porównywalnej lub silniejszej od **CH-1** aktywności przeciwarytmicznej i/lub hipotensyjnej.

- dichlorowodorek 7 - β - hydroksy - γ - (N_4 – fenoksyetylopiperazyno) – propylo – 8 – benzyloaminoteofiliny (**CH – 9**),
- trichlorowodorek 7 - β - hydroksy - γ - (N_4 – fenoksyetylopiperazyno) – propylo – 8 – (2 – pikoliloamino) – teofiliny (**CH – 11**),
- trichlorowodorek 7 - β - hydroksy - γ - (N_4 – fenoksyetylopiperazyno) – propylo – 8 – [2 – (2` - pirydyloetylo) – amino] – teofiliny (**CH – 12**),
- dichlorowodorek 7 - β - hydroksy - γ - (N_4 – fenoksyetylopiperazyno) – propylo – 8 – furfuryloaminoteofiliny (**CH – 15**),
- trichlorowodorek 7 - β - hydroksy - γ - (N_4 – fenoksyetylopiperazyno) – propylo – 8 – [2 – (morfolino) etyloamino] – teofiliny (**CH – 17**),
- dichlorowodorek 7 - β - hydroksy - γ - (N_4 – fenoksyetylopiperazyno) – propylo – 8 – [2 – (morfolino) etyloamino] – teofiliny (**CH – 18**),
- trichlorowodorek 7 - β - hydroksy - γ - (N_4 – fenoksyetylopiperazyno) – 8 – aminoteofiliny (**CH – 21**)

3. Badane 7,8-dipodstawione pochodne teofiliny oznaczone symbolami **CH-11**, **CH-17** oraz **CH-18**, przy podaniu dożylnym oraz dożołądkowym okazały się mniej toksyczne od związku odniesienia **CH-1**, a pozostałe związki były bardziej toksyczne od **CH-1**.
4. Związek **CH-17**, podobnie jak związek odniesienia **CH-1**, wywierał działanie chronotropowo-dodatnie, skracał czas trwania odcinka P-Q i Q-T (*in vitro* oraz *in vivo*), co może sugerować, iż związki te posiadają cechy inhibitora fosfodiesterazy. Pozostałe związki wywierały działanie chronotropowo-ujemne.
5. Najsilniejszą aktywność przeciwarytmiczną, porównywalną ze związkiem odniesienia, przy obu drogach podania wykazał związek **CH-17** oraz **CH-18.**
6. Związki **CH-9**, **CH-11,** przy obu drogach podania, wykazały aktywność hipotensyjną zbliżoną do związku macierzystego tj. **CH-1**.
7. Związki **CH-9**, **CH-11** oraz **CH-12**, podobnie jak związek odniesienia **CH-1**, wykazały istotne działanie spazmolityczne.
8. Badane 7,8-dipodstawione pochodne teofiliny wykazały działanie uspokajające.
9. Efekt hipotensyjny badanych związków jest najprawdopodobniej wynikiem działania α-adrenolitycznego oraz spazmolitycznego, natomiast aktywność przeciwarytmiczna w modelu arytmii adrenalinowej wynikiem blokowania receptorów α- adrenergicznych.

10. Wyniki badań farmakologicznych pozwalają na określenie zależności pomiędzy strukturą a działaniem farmakologicznym :

- Najkorzystniejsza dla aktywności przeciwarytmicznej jest obecność w położeniu 7 teofiliny ugrupowania fenoksyetylopiperazynowego (**CH-17**) lub fenylopiperazynowego (**CH-18**), a w pozycji 8 podstawnika 2-morfolinoetyloaminowego.

- Natomiast wprowadzenie do związku **CH-1** w pozycji 8

ugrupowania : 2-pirydyloetyloaminowego (**CH-13**, **CH-14**, **CH-16**), 2-(N,N-dietylo-amino)- etyloaminowego (**CH-19**, **CH-20**) lub 2-benzyloaminowego (**CH-10**) oraz zastąpienie podstawnika fenoksyetylopiperazynowego ugrupowaniem benzylopiperazynowym, fenylopiperazynowym, 2-hydroksyetylo-piperazynowym lub metylenodioksyfenoksyetylopiperazyno-wym prowadzi do osłabienia lub zaniku aktywności przeciwarytmicznej.

- Najkorzystniejsza dla aktywności hipotensyjnej jest obecność w położeniu 7 teofiliny ugrupowania fenoksyetylopiperazynowego, a w pozycji 8 podstawnika 2-benzyloaminowego (**CH-9**) lub 2-pirydylometyloaminowego (**CH-11**).

- Największe powinowactwo do receptorów α_1-adrenergicznych posiadają związki zawierające w swojej strukturze ugrupowanie fenoksyetylopiperazynowe lub fenylopiperazynowe.

- Wprowadzenie do związku **CH-1** w pozycji 8 ugrupowania 2 pirydyloetyloaminowego oraz zamiana podstawnika fenoksyetylo-piperazynowego ugrupowaniem benzylopiperazynowym (**CH-13**) lub 2-hydroksyetylopiperazynowym (**CH-16**) prowadzi do zaniku powinowactwa do receptorów α-adrenergicznych.

VIII. STRESZCZENIE

Poszukując związków o potencjalnym działaniu na układ krążenia w grupie 7,8-dipodstawionych pochodnych teofiliny, w Katedrze Chemii Farmaceutycznej CM UJ, otrzymano jej nowe 7-β-hydroksy-γ-(N_4-fenoksyetylopiperazyno)-propylowe pochodne. Wstępne badania farmakologiczne doprowadziły do wyselekcjonowania dichlorowodorku 7-β-hydroksy-γ -(N_4-fenoksyetylopiperazyno)-propyloteofiliny **(CH-1)**, związku wykazującego działanie przeciwarytmiczne, hipotensyjne oraz powinowactwo do receptorów α_1 oraz α_2-adrenergicznych.

W wyniku modyfikacji związku **CH-1**, polegających na wprowadzeniu różnych podstawników aryloalkiloaminowych lub aminoalkiloaminowych w położenie 8 teofiliny, a także przez zastąpienie ugrupowania fenoksyetylopiperazynowego innym ugrupowaniem piperazynowym, otrzymano siedem aktywnych stuktur, o porównywalnej lub silniejszej od **CH-1** aktywności przeciwarytmicznej i/lub hipotensyjnej i powinowactwie do receptorów α_1- oraz α_2-adrenergicznych.

Analiza otrzymanych wyników pozwoliła na ustalenie pewnych zależności pomiędzy strukturą badanych związków a ich aktywnością przeciwarytmiczną, hipotensyjną oraz α-adrenolityczną, w porównaniu do struktury wiodącej tj. dichlorowodorku 7-β-hydroksy-γ-(N_4-fenoksyetylopiperazyno)-propylo-teofiliny **(CH-1).**

Przeprowadzone badania pozwalają stwierdzić, iż największe powinowactwo do receptorów α_1-adrenergicznych posiadają związki zawierające w swojej strukturze ugrupowanie fenoksyetylopiperazynowe lub fenylopiperazynowe. Najkorzystniejsza dla aktywności przeciwarytmicznej jest obecność w położeniu 7 teofiliny ugrupowania fenoksyetylopiperazynowego lub fenylopiperazynowego, a w pozycji 8 podstawnika 2-morfolinoetyloaminowego.

Natomiast dla aktywności hipotensyjnej najkorzystniejsza jest obecność w położeniu 7 teofiliny ugrupowania fenoksyetylopiperazynowego a w pozycji 8 podstawnika 2-benzyloaminowego lub 2-pirydylometyloaminowego.

Badania farmakologiczne sugerują, iż efekt hipotensyjny badanych związków jest najprawdopodobniej wynikiem działania α-adrenolitycznego oraz spazmolitycznego, natomiast aktywność przeciwarytmiczna w modelu arytmii adrenalinowej jest

wynikiem blokowania receptorów α- adrenergicznych.

VIII. PIŚMIENNICTWO

1. Allen J.D., Deering A.H., Kelly J.G., Shanks R.G.: Antiarrhythmic and cardiovascular effects of MP 115. J. Cardiovasc. Pharmacol., 1983, 5, 937-944

2. Barnes P.J., Pauwels R.A.,: Theophylline in the management of asthma: time for reappraisal ?. Eur Respir J., 1994, 7(3), 579-91

3. Bastia E., Varani K., Monopoli A., Bertorelli R.: Effects of A_1 and A_2 adenosine receptor ligands in mouse acute models of pain. Neurosci. Lett., 2002, 328,241-244

4. Beavo J.A., Reifsnyder D.H.: Primary sequence of cyclic nucleotide phopshodiesterase isozymes and the design of selective inhibitors. TiPS, 1990, 11, 150-155

5. Bergstrand H: Phosphodiesterase inhibition and theophylline. Eur. J. Respir. Dis., 1980, 61 Suppl. 109, 37

6. Bernauer M., Ernenputsch I.: Antagonistic effects of α-adrenoceptor blocking agents on arrhythmias, enzyme release, and myocardial necrosis in isolated rat hearts with coronary occlusion and reperfusion. Naunyn – Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 1988, 338, 88-95

7. Bla**c**kburn M.R. : Too much of a good thing : adenosine overload in adenosine-deaminase-deficient mice. TiPS, 2003, 24(2), 66-70

8. Boznański A., Willak-Janc E.: Niepożądane interakcje farmakokinetyczne teofiliny. Pol. Merk. Lek., 2000, 9, 621-622

9. Bolli R.: Oxygen-derived free radicals and myocardial reperfusion injury: An overview. Cardiovasc. Drug Ther., 1991, 5, 249-268

10. Bongroni S., Razzetti R., Papotti M., Pastore F., Bergamaschi M.: Lack of cardiostimulant effects of bamifylline *in vitro* and *in vivo* models. Arzneimittelforschung, 1990, 40, 169-174

11. Bovet D., Bovet-Nitti F.: In: Médicaments du systéme nerveux végétatif: adrenaline, acétylcholine, histamine et leurs antagonistes. S. Karger, Basel-New York, 1948,247

12. Bovy P.R., Collins J.T., Chamberlain T.S., Gheng B.K. : (tetrazolylbiphenylalkyl) xanthines, e.g., alkyl-3, 7-dihydro-7-[[2'-(1H-tetrazol-5-yl)[[1,1'-biphenyl]-4-yl] methyl]-1H-purine-2,6-diones, a method for their preparation and their use for the treatment of cardiovascular discorders. PCT Int. Appl. WO 9207, 852; C.A., 1992, 117, 750

13. Boyett M. R., Harrison S. M., Janvier N C., McMorn S. O., Owen J. M., Shui Z.: A list of vertebrate cardiac ionic currents. Nomenclature, properties , function and cloned equivalents. Cardiovascular Research, 1996, 32, 455-481.

14. Bralet J., Dirier J. P., Moreau D., Opie L. H., Rochette L.: Effect of α-adrenoreceptor antagonists (phentolamine, nicergoline and prazosin) on reperfusion arrhythmias and noradrenaline relese in perfused rat heart. Br. J. Pharmac., 1985, 84, 9-18

15. Brooks R.R., Miller K.E., Carpenter J.K., Jones S.M.: Broad sensitivity of rodent arrhythmia models to class I, II, III, and IV antiarrhythmic agents. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1989, 191, 201-209

16. Caramori G., Adcock I.: Pharmacology of airway inflammation in asthma and COPD. Pulm. Pharmacol. Ther. , 2003, 16, 247-277

17. Carley D. W., Radulovacki M.: Role of peripheral adenosine A_1 receptors in the regulation of sleep apneas in rats. Exp. Neurol., 1999, 159, 545-550

18. Carmeliet E.: Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias. Physiol. Rev., 1999, 79, 917-1017.

19. Catterall W. A.: Common modes of drug action on Na^+ channels: local anaesthetics, antiarrhythmics and anticonvulsants. Trends Pharmacol. Sci., 1987, 8, 57-65

20. Chazan R.: Miejsce teofiliny i inhibitorów PDE-4 w leczeniu chorych na POCHP. Med. po Dypl., 2003, 464 (1), 33-38

21. Chazan R.: Miejsce inhibitorów fosfodiesterazy (PDE) w chorobach obturacyjnych. Terapia, marzec 2002

22. Chazan R.: Zastosowanie teofiliny u chorych na astmę i przewlekłe zapalenie oskrzeli. Terapia i Leki, 1995, 45 (7/8), 205-212

23. Chazan R.: Teofilina – lek przeciwzapalny. Alergologia, 1998, 5(4), 423-428

24. Cheng J. T., Chi T. C., Liu I. M.: Activation of adenosine A_1 receptors by drugs to lower plasma glucose in streptozotocin-induced diabetic rats. Auton Neurosci., 2000, 83 (3), 127-133

25. Cheng Y.C., Prusoff W.H.: Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50% inhibition (IC_{50}) of an enzymatic reaction. Biochem. Pharmacol., 1973, 22, 3099-3108

26. Chłoń G.: Synteza i właściwości farmakologiczne piperazynowych i pirydynowych pochodnych teofiliny. Praca doktorska, 1996, Kraków

27. Chłoń-Rzepa G., Pawłowski M., Zygmunt M., Filipek B., Maciąg D.: Synthesis and cardiovascular activity of new 8-alkylamino-1,3-dimethyl-7-(2-hydroxy-3-piperazinopropyl)-3,7-dihydro-1H-purine-2,6-diones., J. Pharmacol., 2004, 56, 755-766

28. Chorostowska-Wynimko J.: Teofilina a układ odpornościowy w astmie oskrzelowej. Post. Nauk Med., 2001, 1, 1-6

29. Chorostowska-Wynimko J.: Teofilina – współczesne poglądy na komórkowy mechanizm działania. Post. Hig. Med. Dośw., 2000, 54(6), 867-878

30. Chorostowska-Wynimko J.: Teofilina – mechanizm działania w układzie oddechowym. Pneumonol. i Alerg. Pol., 2000, 9, 463-469

31. Cirillo R., Grossi E., Franzone J. S.: Doxofylline, an adenosine- nonblocking xanthine, does not induce cardiostimulant effects. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 1989, 65 (1), 21-34

32. Corr B.B., Heathers G.P., Yamada K. A.: Mechanism contributing to the arrhythmogenic influences of alpha 1-adrenergic simulation in the ischemic heart. Am. J. Med., 1989, 87(2A), 19-25

33. Colucci W. S.: Alpha-adrenergic receptor blockade with Prazosin. Ann. Inter. Med., 1982, 97, 67-77

34. Cortijo J., Naline E., Ortiz J. L., Berto L., Girard V., Malbezin M., Advenier C., Morcillo E. J.: Effects of fenspiride on human bronchial cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes: Functional and biochemical study. Eur. J. Pharmacol., 1998, 341, 79-86

35. Cross F.: Pharmacology of classical α-adrenoreceptor blocking agents: phentolamine and phenoxybenzamine. In :Les alpha-bloquants. Pharmacologie expérimentale et clinique. Masson. Paris New York, 1981, 2-6

36. Curtis M.J., Macleod B.A., Walker M.J.A.: Models for the study of arrhythmias in myocardial ischaemia and infarction: the use of the rat. J. Mol. Cell. Cardiol., 1987, 19, 399-419

37. Czubek U.C.: Uszkodzenie reperfuzyjne mięśnia sercowego. Pol. Tyg. Lek., 1993, 48, 94-96

38. Dini F. L., Cogo R.: Doxofylline: A new generation xanthine bronchodilator devoid of major cardiovascular adverse effects. Curr. Med. Res. Opin., 2001, 16 (4), 258-268

39. Dini F. L., Pasini G., Cortellini G., Cani E., Bettini R., Garangnani A., Gobbi G., Greco A., Onorato G., Pasini P.: Methylxanthine drug therapy in chronic heart failure associated with hypoxaemia: double- blind placebo- cotrolled clinical trial of doxofylline versus theophylline and bamifylline. Int. J. Clin. Pharmacol. Res., 1993, 13 (6), 305-316

40. DiPalma J.R.: Basic pharmacology in medicine. Antiarrhythmic Drugs. Ed. DiPalma J.R., Mc Graw-Hill Book Company, New York, 1982, 257-278

41. Djukanovic R., Finnerty J.P., Lee C., Wilson S., Madden J., Holgate S.T. : The effects of theophylline on mucosal inflammation in asthmatic airways: biopsy results**.** Eur. Respir. J. 1995,8(5), 831-3

42. Droszcz W.: Rola teofiliny w astmie. Pneumonol. i Alerg. Pol., 1999, supl. 1,57- 61

43. Essayan D. M.: Cyclic nucleotide phosphodiesterases. J. Allergy Clin. Immunol., 2001, 108 (5), 671-680

44. Evans D.J., Taylor D.A., Zetterstrom O., Chung K.F., O'Connor B.J., Barnes P.J.: A comparison of low-dose inhaled budesonide plus theophylline and high-dose inhaled budesonide for moderate asthma. N. Engl. J. Med. 1997, 337(20), 1412-8

45. Fan M., Mustafa S.J.: Adenosine-mediated bronchoconstriction and lung inflammation in an allergic mouse model. Pulm. Pharmacol. Ther., 2002, 15(2),147-55

46. Fearon I. M., Palmer A. C. V., Balmforth A. J., Ball S. G., Mikala G., Peers C.: Inhibition of recombinant human cardiac L-type Ca^{2+} channel α_{1C} subunits by 3-isobutyl-1-methylxantine. Eur. J. Pharmacol., 1998, 342, 353-358

47. Feoktistov I., Garland E. M., Goldstein A. E., Zeng D., Belardinelli L., Wells J. N., Biaggioni I.: Inhibition of human mast cell activation with the novel selective adenosine A_{2B} receptor antagonist 3-isobutyl-8-pyrrolidinoxanthine (IPDX). Biochem. Pharmacol., 2001, 62 (9), 1163-1173

48. Filipek B., Sapa J., Zejc A., Chłoń G.: Synteza i właściwości przeciwarytmiczne i hipotensyjne dichlorowodorku 7-β-hydroksy-γ-(N_4-fenoksyetylopiperazyno)-propyloteofiliny (CH-1). XVI Naukowy Zjazd P. T. Farm. Warszawa 1995, B-13,127

49. Fiebich BL., Biber K., Lieb K., van Calker D., Berger M., Bauer J., Gebicke-Haerter P.J: Cyclooxygenase-2-expression in rat microglia is induced by adenosine A_{2a}-receptors. Glia., 1996, 18(2), 152-160

50. Filipek B.: Właściwości elektrofizjologiczne, przeciwarytmiczne i hipotensyjne nowych pochodnych pirolidynonu-2. Praca habilitacyjna, Kraków 1994

51. Forsythe P., Ennis M.: Adenosine, mast cells and asthma. Inflamm.Res., 1999, 48, 301-307

52. Franzone J.S., Cirillo R., Barone D.: Doxofylline and theophylline are xanthines with partly different mechanism of action in animals. Drugs Exp. Clin. Res., 1988, 14(7), 479-489

53. Gaspardone A., Crea F., Iamele M., Tomai F., Versaci F., Pellegrino A., Chiariello L., Gioffre P. A.: Bamiphylline improves exercise- induced myocardial ischemia through a novel mechanism of action. Circulation, 1993, 88 (2), 1993, 502-508

54. Gellai M., Schreiner G.F., Ruffolo R.R., Fletcher T., De Wolf R., Brooks D.P.: CVT-124, a novel adenosine A_1 receptor antagonist with unique diuretic activity. J. Pharmacol. Exp. Ther. , 1998, 286(3), 1191-1196

55. Goadsby P. J., Hoskin K. L., Storer R. J., Edvinsson L., Connor H. E.: Adenosine A_1 receptor agonists inhibit trigeminovascular nociceptive transmission. Eur. J. Pharmacol., 2003, 464(1), 33-38

56. Gotz J., Sauter R., Steinijans V.W., Jonkman J.H. : Steady-state pharmacokinetics of a once-daily theophylline formulation (Euphylong) when given twice daily**.** Int. J. Clin. Pharmacol. Ther., 1994, 32(4), 168-73

57. Hasko G., Sitkovsky M. V., Szabo C.: Immunomodulatory and neuroprotective effects of inosine. TiPS, 2004, 25(3), 152-157

58. Hirsh L., Dantes A., Suh B-S., Yoshida Y., Hosokawa K., Tajima K., Kotsuji F., Merimsky O., Amsterdam A.: Phosphodiesterase inhibitors as anti-cancer drugs. Biochem. Phamacol., 2004, 68(6), 981-988

59. Indeks leków medycyny praktycznej. Mp, 2004, 455

60. Ino M., Fishbein M., Mandel W., Chen P.S., Karagueuzian H.S.: Cellular Mechanisms of Ventricular Bipolar Electrograms Showing Double and Fractionated Potentials. J. Am. Coll. Cardiol., 1995, 26, 1080-1089.

61. Kaiser S. M., Quinn R. J.: Adenosine receptors as potential therapeutic agents. J.Med. Chem., 1999, 12, 542-550

62. Kaniuk W., Buczyłko K.: Przesłanki zastosowania teofiliny w leczeniu alergicznych nieżytów nosa. Otolar. Pol., 1998, 2(4), 401-404

63. Kazimierczak A.: Leki stosowane w farmakoterapii astmy oskrzelowej. Nowa Med. 109 (1/2001)

64. Khaliullin F.A., Strokin Yu.V., Nasyrov Kh.M., Farzainov K.M.: Synthesis and inflammatory activity of 8-substituted 7-(thietanyl-3) theophyllines. Khim. Farm. Zh., 1992, 26(9-10), 68

65. Kitatani T., Watanabe Y., Shibuya T.: Different effects of methylxanthines on central serotonergic postsynaptic neurons in a mouse behavioral model. Pharmacol. Biochem. Behav., 1993, 44(2), 457-461

66. Kolowca J.: Rola wolnych rodników tlenowych w niedokrwienno-reperfuzyjnym uszkodzeniu mięśnia sercowego. Pol. Tyg. Lek., 1993, 48, 299-302

67. Kostowski W.: Leki spazmolityczne; W: Farmakologia. Red. Kostowski W.: Wydawnictwo Lekarskie PZWL Warszawa, 2001, 445

68. Kraus-Filarska M., Barg W.: Przeciwzapalne i immunomodulujące działanie teofiliny. Pneumonol. i Alerg. Pol., 1997, 65, supl I, 77-83

69. Kühl U.G., Buschmann G., Budden R.: Development of ECG and Blood Pressure Changes in Anaesthetized Rats during the Infusion of Antiarrhythmic Compounds. In: The Rat Electrocardiogram in Pharmacology and Toxicology. Ed. Budden R., Detweiler D.K., Zbinden G., Pergamon Press, Oxford, 1981, 197-207

70. Lamontagne D., Yamaguchi N., Nadeau R., De Champlain J., Godin D., Campeau N.: Effects of sotalol, (-)-propranolol and prazosin on reperfusion-induced arrhythmias and increased cardiac norepinephrine release. Eur. J. Pharmacol., 1986, 123, 1-10

71. Landells L.J., Jensen M.W., Orr E.M., Spina D., O'Connor B.J., Page C.P.: The role of adenosine receptors in the action of theophylline on human peripheral blood mononuclear cells from healthy and asthmatic subjects. Br. J. Pharmacol, 2000, 129, 1140-1144

72. Langerdorff O. Untersuchungen Am. Überlebenden Saügetierhezer, Pflügers Arch. Ges. Physiol., 1895, 61, 291-332

73. Lazzaroni M., Grossi E., Porro G. B.: The effect of intravenous doxofylline or aminophylline on gastric secretion in duodenal ulcer patients. Aliment. Pharmacol. Ther., 1990, 4 (6), 643-649

74. Lau W., Newman D., Dorian P.: Can antiarrhythmic agents be selected based on mechanism of action? Drugs, 2000, 60, 1315-1328

75. Lithfield J., Wilcoxson F.: A simpliefield method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmacol. Exp. Ther., 1949, 96, 99-113

76. Lipson DA.: Redefining treatment in COPD: new directions in bronchodilator therapy. Treat Respir Med., 2004, 3(2), 89-95

77. Liutkus M.: Travaux practiques de pharmacologie. Ed. Universite de Montpellier, 1988/89, 24-56

78. Lopez-Rodrigues M.L., Morcillo M.J., Fernandes E., Porras E., Orensanz L., Beneytez M.E., Manzanares J., Fuentes A.: Synthesis and Structure-Activity Relationships of a New Model of Arylpiperazines.5. Study of the Physicochemical Influence of the Pharmacophore on 5-HT_{1A}/α_1-Adrenergic Receptor Affinity: Synthesis of a New Derivative with Mixed 5-HT_{1A}/D_2 Antagonist Properties. J. Med. Chem., 2001, 44 (2), 186-197

79. Lubbe W.F., Daries P.S., Opie L.H.: Ventricular arrhythmias associated with coronary artery occlusion and reperfusion in the isolated perfused rat heart: a model for assessment of antifibrillatory action of antiarrhythmic agents. Cardiovasc. Res., 1978, 12, 212-220

80. Magnus R.: Versuche am überlebenden Dünnalarm von Säugetieren. Pflügers Arch., 1904, 102, 12

81. Mandal A.K., Kellar K.J., Friedman E., Pineo S.V., Hamosh P., Gillis R.A.: Importance of central nervous system serotonin-1A receptors for mediating the hypotensive effect of urapidil. J. Pharmacol. Exp. Ther., 1989, 251, 563-570

82. Meurs H., Maarsingh H., Zaagsma J.: Arginase and asthma : novel insights into nitric oxide homeostasis and airway hyperresponsiveness. TiPS, 2003, 24(9), 450-455.

83. Mokrosz J.L., Paluchowska M.H., Kłodzińska A., Charakchieva-Minol S., Chojnacka-Wójcik E.: 4-[2-(Cycloalkanecarboxamido)ethyl]-1-(2-methoxy-phenyl)-piperazines: High-Affinity 5-HT_{1A} Agonists. Arch. Pharm., 1995, 328, 770-774

84. Mouillé P., Huchet A.M., Chelly J., Schmitt H.: AR-C 239 a new and potent α-adrenoceptor blocking drug. In: Les alpha-bloquants. Pharmacologie expérimentale at clinique. Masson. Paris-New York, 1981, 14-20

85. Mouillé P., Dabiré H., Joly G., Schmitt H.: Interactions between α_1, α_2 and β-adrenoceptors on tensional effects of adrenaline and noradrenaline in the dog. J. Pharmacol. (Paris), 1983, 14, 325-332

86. Müller C. E., Sandoval-Ramirez J., Schobert U., Geis U., Frobenius W., Klotz K. N.: 8-(Sulfostyryl)xanthines: Water-soluble A_{2A}-Selective Adenosine Receptor Antagonists. Bioorg. Med. Chem., 1998, 6, 707-719

87. Nagai J., Yano J., Habu Y., Katsura T., Hashimoto Y., Inui K.: Inhibitory effect of KW- 3902, an adenosine A_1 receptor antagonist, on p- aminohippurate transport in OK cells. Biochim. Biophys. Acta., 1999, 1419 (2), 164-172

88. Obata T., Yonemochi H., Arita M.: Norepinephrine evoked by potassium depolarization increases interstitial adenosine concentraion via activation of ecto-5'-nucleotidase in rat hearts. JPET, 2003, 305(2), 719-729

89. Pawłowski M.: Leki o działaniu analeptycznym, W: Chemia leków. Red. Zejc A., Gorczyca M., Wydawnictwo Lekarskie PZWL Warszawa,1999, 122-129

90. Pawłowski M. Badania nad pochodnymi 8-aminoteofiliny. Praca habilitacyjna, Kraków 1992

91. Piaz V.D., Giovannoni : Phosphodiesterase 4 inhibitors, structurally unrelated to rolipram, as promising agents for the treatment of asthma and other pathologies. Eur. J. Med. Chem., 2000, 35, 463-480

92. Podlewski J., Chwalibogowska A.: Leki współczesnej terapii, wyd. Split Trading, Warszawa 1999, 614

93. Raghu P. M., Bahekar R. H., Rao A. R.: Recent perspectives in the design of antiasthmatic agents. Pharmazie , 2000, 55(7), 475-482

94. Ramage A.G.: The mechanism of the sympathoinhibitory action of urapidil. Role of 5-HT(1A) receptor. Br. J. Pharmacol., 1991, 102, 998-1002

95. Rassier M.E., Shebuski R.J., Zimmerman B.G.: Beta1-adrenoceptor antagonism by urapidil prior to and after the alpha 2-antagonist rauwolscine in anaesthetized dogs. Eur. J. Pharmacol., 1986, 122, 37-43

96. Rogala B.: Teofilina w leczeniu chorób bronchoobturacyjnych. Wiad. Lek., 1998, L I(3-4), 117-121

97. Rutkiewicz J. Fizjologiczna rola adenozyny. Pol. Tyg. Lek., 1991, 46, 50-52

98. Sanders K.H., Kilian U., Kolassa N., Schoetensack W.: Influence of urapidil on alpha-adrenoceptor and beta-adrenoceptors in phited rats. J. Auton. Pharmacol., 1985, 5, 307-316

99. Schlittler E.: The chemistry of antihypertensive agents. In: Handbook of Experimental Pharmacology. Ed. Gross F., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1977, 13

100. Segerdahl M., Karelov A.: Experimentally induced ischaemic pain in healthy humans is attenuated by the adenosine receptor antagonist theophylline. Acta Physiol. Scand., 2004, 180(3), 301-306

101. Skopińska-Różewska E., Żukowska M., Gil M.: Immunotropowe działanie teofiliny. Post. Nauk Med., 1995, 8, 121-125

102. Spector W. S.: „Handbook of toxicology". Volume I W.B. Saunders Company, Philadelphia and London, 1956.

103. Szandula K.: Właściwości przeciwarytmiczne i hipotensyjne dichlorowodorku 7-3-(N-4-fenoksyetylopiperazyno)-2-hydroksypropylo-teofiliny, (CH-1). Praca magisterska, Kraków 1994.

104. Szekeres L., Papp. J. G.: Experimental Cardiac Arrhythmias, In: Handbook of experimental Pharmacology. Eds. Schmier J., Eichler O., Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, 1975, 131-182

105. Torphy T.J., Barnette M.S., Underwood D.C. et al.: Ariflo (SB 207499), a second generation phosphodiesterase 4 inhibitor for the treatment of asthma and COPD: from concept to clinic. Pulm. Pharmacol. Ther., 1999, 12(2), 131-135

106. Ukena D., Harnest U., Sakalauskas R., Magyar P., Vetter N., Steffen H., Leichtl S., Rathgeb F., Keller A., Steinijans V.W. : Comparison of addition of theophylline to inhaled steroid with doubling of the dose of inhaled steroid in asthma. Eur. Respir. J. 1997, 10(12), 2754-60

107. Walker M.J., Curtis M.J., Hearse D.J., Campbell R.W., Janse M.J., Yellon D.M., Cobbe S.M., Coker S.J., Harness J.B., Harron D.W., Higgins A.J., Julian D.G., Lab M.J., Manning A.S., Northover B.J., Parratt J.R., Riemersma R.A., Riva E., Russel D.C., Sheridan D.J., Winslow E., Woodward B.: The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia, infarction, and reperfusion. Cardiovasc. Res., 1988, 22, 447-455

108. Werner L.H., Barrett W.E.: Adrenergic blocking agents. In: Antihypertensive Agents. Ed. Schlittler E., Academic Press, New York, London, 1967, 331-92

109. Wiśniewska-Jarosińska M.: Nowe poglądy na mechanizm działania teofiliny. Medycyna 2000, 1997, 61/62, 2-5

110. Wynimko J.: Wpływ teofiliny na układ odpornościowy. Nowa Med., 1997, 4(10), 24-26

111. Zawadzka-Krajewska M.: Teofilina w leczeniu astmy oskrzelowej. Nowa Pediatria, 1999, 3, 22-27

112. Zipes D.P.: Management of cardiac arrhythmias: pharmacological, electrical, and surgical techniques. In: Heart Disease. A Textbook of cardiovascular Medicine, 5th edition. Ed. Braunwald E., W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1997, 593-618

113. Vaughan Williams E.M.: Classification of antidysrrhythmic drugs. In: Pharmacology of Anti-Arrhythmic Agents. Ed. Szekeres L., Pergamon, Oxford, 1981, 125-150

114. Yasui K., Agematsu K., Shinozaki K., Hokibara S., Nagumo H., Nakazawa T., Komiyama A.: Theophylline induces neutrophil apoptosis through adenosine A_{2A} receptor antagonism. J. Leukoc. Biol., 2000, 67(4), 529-535

115. Yasutake M., Avkiran M.: Exacerbation of reperfusion arrhythmias by alpha 1 adrenergic simulation: a potential role for receptor mediated activation of sercolemmal sodium-hydrogen exehange. Cardiovasc.Res., 1995, 29 (2), 222-230

116. Yoshio R., Taniguchi T., Itoh H., Muramatsu I.: Affinity of serotonin receptor antagonists and agonists to recombinant and native α_1-adrenoceptor subtypes. Jpn. J. Pharmacol., 2001, 86, 189-195