

**КАЛИНИНА ОЛЬГА СЕРГЕЕВНА**

**ИССЛЕДОВАНИЕ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРИДОКСИНА В КАЧЕСТВЕ  
ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ АНТАГОНИСТОВ P2-РЕЦЕПТОРОВ**

**14.03.06. Фармакология, клиническая фармакология**

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Научный руководитель:**

Доктор медицинских наук, профессор **Зиганшин Айрат Усманович**

**Научный консультант:**

Доктор химических наук, доцент **Штырлин Юрий Григорьевич**

**Официальные оппоненты:**

**Дутова Светлана Вячеславовна**, доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фундаментальной медицины и гигиены, ФГБОУ ВО "Хакасский государственный университет им. Н.Ф. Катанова"

**Оковитый Сергей Владимирович**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО "Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова"

Защита состоится « \_\_ » \_\_\_\_\_ 2018г. в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 208.008.02 при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (400131, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (400131, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1) и на сайте [www.volgmed.ru](http://www.volgmed.ru).

Автореферат разослан « \_\_ » \_\_\_\_\_ 2018 г.

Ученый секретарь  
диссертационного Совета,  
доктор биологических наук

**Любовь Ивановна Бугаева**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность темы исследования**

Общеизвестно, что аденозинтрифосфорная кислота (АТФ) и другие нуклеотиды являются важными внутриклеточными веществами, непосредственно вовлеченными во все аспекты функционирования клетки и действующими как ко-факторы ферментов и источники энергии. Вместе с тем, установлено, что пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды являются внеклеточными регуляторами и модуляторами деятельности клетки, влияя на специфические P2-рецепторы [Burnstock, 2017]. P2-рецепторы широко представлены в различных органах и тканях, поэтому многими исследователями эти рецепторы рассматриваются как перспективные мишени действия потенциальных лекарств.

Важнейшим достижением фармакологии в этой области стало внедрение в клиническую практику антагонистов P2Y<sub>12</sub>-рецепторов тромбоцитов в качестве эффективных антиагрегантов (тиклопидин, клопидогрел). В настоящее время несколько агонистов и антагонистов различных P2-рецепторов находятся на разных этапах клинических исследований. Однако, прогресс в исследовании P2-рецепторов до сих пор в значительной мере сдерживается недостатком эффективных и селективных антагонистов этих рецепторов. Несмотря на то, что большое число соединений были описаны как антагонисты различных подтипов P2-рецепторов, большинство из них не могут в полной мере соответствовать требованиям исследователей [Ziganshin, 2011].

### **Степень разработанности проблемы**

Одним из наиболее широко используемых антагонистов P2-рецепторов в настоящее время является пиридоксальфосфат-6-азофенил-2',4'-дисульфоновая кислота (PPADS). Впервые антагонизм этого соединения в отношении P2-рецепторов был описан Lambrecht et al. (1992), а затем Ziganshin et al. (1993, 1994) подробно описали его эффективность на различных тканях в отношении P2X- и P2Y-рецепторов. К настоящему времени имеется большое число публикаций, посвященных эффективности PPADS [Lämmer, 2011; Li, 2014; Matsuda, 2015; Cansev, 2015; Wakizoe, 2015]. Несмотря на широкое использование PPADS в экспериментальной практике, уже практически сразу было очевидно, что он не является идеальным антагонистом P2-рецепторов, поскольку селективность его действия либо проявляется лишь в определенном интервале концентраций [Windscheif et al., 1995], либо не проявляется вовсе [Lambrecht, 1996]. Кроме того, наряду с другими антагонистами P2-рецепторов, PPADS угнетает активность экто-нуклеотидаз [Chen et al., 1996; Grobben et al., 2000].

В связи с этим не прекращаются исследования по поиску новых эффективных антагонистов P2-рецепторов в группе соединений, родственных по химической структуре к PPADS. В частности, в нашей лаборатории были проведены исследования по оценке арилазосоединений пиридоксальфосфата, и были установлены определенные закономерности структуры и действия этих веществ на различные P2-рецепторы (Зиганшин и др., 1998, 2000). Следует отметить, что большая часть исследований, касающихся активности аналогов PPADS, была проведена с азотсодержащими гетероциклами, модифицированными по азофенилсульфонию фрагменту [De Man et al., 2003, Jackobson K.A., Knutsen L.J.S., 2001]. Влияние модификации в пиридоксиновом фрагменте молекулы PPADS на проявления антагонистического действия были оценены явно недостаточно.

**Цель** – провести комплексное исследование антагонистической активности новых аналогов PPADS – производных пиридоксина для выявления эффективных и селективных антагонистов P2-рецепторов.

#### **Задачи исследования**

1. Провести прогноз в системе PASS новых производных пиридоксина на наличие фармакологической активности.
2. Провести первичную экспериментальную оценку антагонистической активности новых производных пиридоксина – азофенилсульфоновых и азофенилдисульфоновых кислот по отношению к эффектам, опосредуемым P2X-рецепторами, на тканях мочевого пузыря и семявыносящего протока крысы.
3. Исследовать антагонистическое влияние наиболее активных соединений – А3 и А9 в отношении сократительных ответов изолированных гладкомышечных препаратов мочевого пузыря и семявыносящего протока крысы, вызванных агонистом P2X-рецепторов  $\alpha,\beta$ -метилена-АТФ, а также антагонизм в отношении расслабления изолированных гладкомышечных препаратов двенадцатиперстной кишки крысы, вызванных стимуляцией P2Y<sub>1</sub>-рецепторов.
4. Оценить влияние новых производных пиридоксина – азофенилсульфоновых и азофенилдисульфоновых кислот на активность экто-нуклеотидаз в гладкомышечных тканях мочевого пузыря и семявыносящего протока крысы.
5. Изучить в экспериментах *in vivo* влияние соединения А3 и PPADS на отрицательное хронотропное действие АТФ.
6. Изучить влияние соединений А3 и PPADS на поведенческие реакции в тестах «открытое поле-круг», «темная/светлая камера», «приподнятый крестообразный лабиринт» и в тесте принудительного плавания по Porsolt.

7. Изучить антитромботическую и антиагрегантную активность соединения АЗ.
8. Изучить анальгетическую активность соединения АЗ в тестах электрической стимуляции корня хвоста, «Отдергивания хвоста» и «Горячая пластина».

### **Научная новизна**

Впервые проведена оценка антагонистической активности новых производных пиридоксина – азофенилсульфоновых и азофенилдисульфоновых кислот по отношению к P2-рецепторам. Впервые установлено, что натриевая соль п-(1,5-дигидро-3,3,8-триметил-9-гидрокси-[1,3]диоксепино[5,6-с]пиридинил-азо)-фенилсульфо-кислоты (соединение АЗ) проявляет сопоставимый с PPADS антагонизм в отношении P2X-рецепторов в мочевом пузыре и семявыносящем протоке крысы, и, в отличие от PPADS, не проявляет антагонизма по отношению к P2Y<sub>1</sub>-рецепторам двенадцатиперстной кишки крысы и не влияет на активность экто-нуклеотидаз. На основании анализа «структура-действие» установлено, что наличие диметилкетала в молекуле азофенилсульфонового производного приводит к антагонизму в отношении P2-рецепторов.

Впервые установлено, что соединение АЗ в экспериментах *in vivo* не влияет на проявление отрицательного хронотропного эффекта АТФ и на поведение и психоэмоциональное состояние животных, при этом проявляет антитромботическое действие на модели тромбоза сонной артерии и анальгетический эффект в тесте отдергивания хвоста. В экспериментах *in vitro* выявлено антагонистическое действие соединения АЗ в отношении тромбоцитарных P2Y<sub>12</sub>-рецепторов.

### **Теоретическое и практическое значение**

Выявлены и исследованы соединения, перспективные для последующего синтеза новых потенциально эффективных антагонистов P2-рецепторов. Соединение (1,5-дигидро-3,3,8-триметил-9-гидрокси-[1,3]диоксепино[5,6-с]пиридинил-азо)фенилсульфо-кислоты натриевая соль рекомендовано для дальнейшего и более углубленного исследования в качестве антагониста P2X-рецепторов и может быть рекомендовано в качестве анализатора, используемого в экспериментальной фармакологии. Препараты родственной структуры могут служить основой для создания новых эффективных и селективных антагонистов P2-рецепторов.

### **Реализация результатов**

Результаты работы внедрены в учебный процесс студентов фармацевтического факультета Казанского государственного медицинского университета (дисциплина – фармакология, тема – методы поиска и внедрения новых лекарственных средств) и студентов фармацевтического отделения Медико-фармацевтического колледжа Казанского

государственного медицинского университета (профессиональный модуль «Реализация лекарственных средств и товаров аптечного ассортимента», раздел «Лекарствоведение»).

### **Методология исследования**

Характер работы – экспериментальный, использованы два вида лабораторных животных (крысы и мыши). На всех этапах исследования сформированы две группы (опытная – исследуемые вещества и контрольная – без воздействия или воздействие веществом сравнения). Использованное в работе оборудование Казанского ГМУ, К(П)ФУ и ВолгГМУ позволяло выполнить задачи исследования в полном объеме. Методы статистического анализа полученных результатов соответствовали рекомендованным. Все исследования были одобрены Локальным этическим комитетом Казанского ГМУ, протокол №1 от 23 января 2012 года.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Модификация структуры в пиридоксиновом фрагменте азофенилсульфоновых кислот приводит к появлению антагонистической активности в отношении P2-рецепторов в случае диметилкетала.
2. п-(1,5-дигидро-3,3,8-триметил-9-гидрокси-[1,3]-диоксепино[5,6-с]-пиридинил-азо)-фенилсульфо кислоты натриевая соль (соединение А3) проявляет антагонизм по отношению к P2X-рецепторам гладкомышечных тканей и P2Y<sub>1</sub>- и P2Y<sub>12</sub>-рецепторам тромбоцитов, но не влияет на эффекты, опосредуемые P2Y<sub>1</sub>-рецепторами гладкомышечных тканей, не изменяет активность экто-нуклеотидаз.
3. Соединение А3 обладает антитромботической активностью, оказывает антиноцицептивное действие, не влияет на поведение и психоэмоциональное состояние животных.

### **Степень достоверности результатов**

Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом проведенных исследований с использованием современного оборудования и методов, соответствующих поставленным задачам. Анализ результатов экспериментов проведен с использованием непараметрических критериев статистической обработки данных. Результаты экспериментов анализировали, используя непараметрические статистические методы: T-критерий Вилкоксона и U-критерий Манна-Уитни, ранговый однофакторный анализ Крускала-Уоллиса, критерий Данна для множественных сравнений.

### **Личный вклад автора**

Автором самостоятельно проведен поиск и анализ литературных источников по теме диссертационной работы, освоены цели и задачи, методы исследования. Весь объем исследования проведен автором лично или при активном его участии. Статистическая

обработка и описание полученных результатов проведены непосредственно автором. Вклад автора является определяющим при подготовке публикаций по основным положениям диссертационной работы и оформлении рукописи диссертации и автореферата.

### **Апробация результатов**

Материалы диссертации доложены и обсуждены на конференции студентов и молодых ученых Казанского ГМУ (Казань, 2013), конференции «Прикладная электродинамика, фотоника и живые системы» (Казань, 2013), на XVII Всемирном съезде фармакологов (Кейптаун, Южная Африка, 2014), на международной конференции по фармацевтическим наукам ICPS-2015 (Дубай, ОАЭ, 2015), на заседании научно-проблемной комиссии по фундаментальным медицинским и биологическим наукам Казанского ГМУ (Казань, 2015, 2017), на третьей российской конференции по медицинской химии (Казань, 2017).

### **Публикации**

По теме диссертации имеется 9 публикаций, в том числе три статьи в журналах, рекомендуемых ВАК для публикации материалов диссертаций, получено два патента на изобретение РФ.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 171 странице машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы, посвященной результатам собственных исследований, обсуждения результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего в себя 253 источника (32 отечественных, 221 зарубежный), списка иллюстраций. Работа проиллюстрирована 63 таблицами и 20 рисунками.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

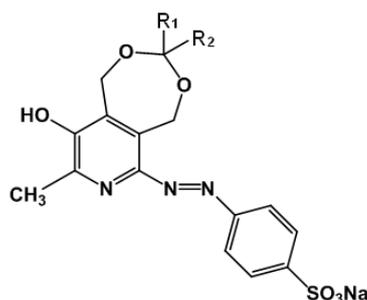
**В первой главе** представлен анализ отечественной и зарубежной литературы, классификация и характеристика пуринорецепторов, приведены данные исследований современных агонистов и антагонистов P<sub>2</sub>-рецепторов, а также перспективы и клиническое значение их исследования.

**Во второй главе** диссертации приведено описание материалов и методов исследования.

Материалом исследования являлись 2 класса новых химических соединений – азофенилсульфонаты и азофенилдисульффонаты натрия на основе семичленных ацеталей пиридоксина. Всего исследовано 15 веществ (Таблицы 1 и 2, Рисунки 1 и 2). Соединения были синтезированы в Научно-образовательном центре фармацевтики Казанского

(Приволжского) федерального университета под руководством д.х.н., доцента Ю.Г. Штырлина<sup>1</sup>. Методы синтеза соединений и их свойства описаны в патентах на изобретение №РФ2554883, №РФ2554885.

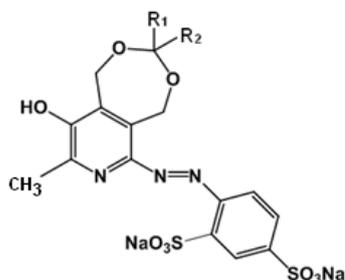
Таблица 1 Химическая структура исследованных аналогов PPADS (азофенилсульфонаты натрия)



Номер соединения	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Химическое название
A1	H	H	п-(1,5-Дигидро-8-метил-9-гидрокси-[1,3]диоксепино [5,6-с]пиридинил-6-азо)фенилсульфонат натрия
A2	H	CH <sub>3</sub>	п-(1,5-Дигидро-3,8-диметил-9-гидрокси-[1,3]диоксепино [5,6-с]пиридинил-6-азо)фенилсульфонат натрия
A3	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	п-(1,5-Дигидро-3,3,8-триметил-9-гидрокси-[1,3]диоксепино[5,6-с]пиридинил-6-азо)фенилсульфонат натрия
A4	H	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	п-(1,5-Дигидро-3-этил-8-метил-9-гидрокси-[1,3]диоксепино [5,6-с]пиридинил-6-азо)фенилсульфонат натрия
A5	H	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	п-(1,5-Дигидро-3-изопропил-8-метил-9-гидрокси-[1,3]диоксепино [5,6-с]пиридинил-6-азо)фенилсульфонат натрия
A6	H	n-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub>	п-(1,5-Дигидро-3-гептил-8-метил-9-гидрокси-[1,3]диоксепино [5,6-с]пиридинил-6-азо)фенилсульфонат натрия
A7	H	n-C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>	п-(1,5-Дигидро-3-октил-8-метил-9-гидрокси-[1,3]диоксепино [5,6-с]пиридинил-6-азо)фенилсульфонат натрия

<sup>1</sup> Выражаем благодарность научному сотруднику НОЦ фармацевтики КФУ Стрельнику А.Д. за синтез соединений и расчет липофильности.

Таблица 2 Химическая структура исследованных аналогов PPADS (азофенилдисульфонаты натрия)



Номер соединения	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Химическое название
B1	H	CH <sub>3</sub>	4-(9-гидрокси-3,8-диметил-1,5-дигидро-[1,3]диоксепино[5,6-с]пиридинил-6-азо)фенил-1,3-дисульфонат натрия
B2	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	4-(9-гидрокси-3,3,8-триметил-1,5-дигидро-[1,3]диоксепино[5,6-с]пиридинил-6-азо)фенил-1,3-дисульфонат натрия
B3	H	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	4-(9-гидрокси-8-метил-3-пропил-1,5-дигидро-[1,3]диоксепино[5,6-с]пиридинил-6-азо)фенил-1,3-дисульфонат натрия
B4	H	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	4-(9-гидрокси-8-метил-3-пентил-1,5-дигидро-[1,3]диоксепино[5,6-с]пиридинил-6-азо)фенил-1,3-дисульфонат натрия
B5	H	C <sub>7</sub> H <sub>15</sub>	4-(9-гидрокси-8-метил-3-гептил-1,5-дигидро-[1,3]диоксепино[5,6-с]пиридинил-6-азо)фенил-1,3-дисульфонат натрия
B6	H	C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>	4-(9-гидрокси-8-метил-3-октил-1,5-дигидро-[1,3]диоксепино[5,6-с]пиридинил-6-азо)фенил-1,3-дисульфонат натрия

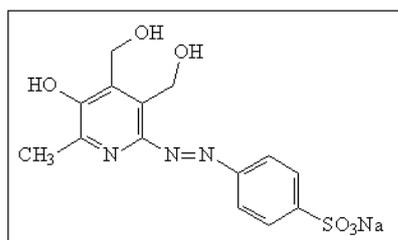


Рисунок 1 Соединение А8 – п-[3,4-дигидроксиметил-5-гидрокси-6-метилпиридинил-2-азо]фенилсульфонат натрия

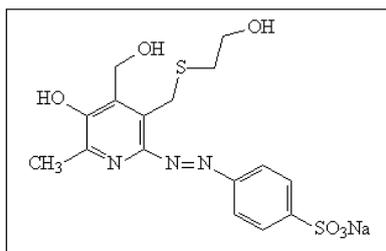


Рисунок 2 Соединение А9 – п-[3-(((2-гидроксиэтил)тио)метил)-4-гидроксиметил-5-гидрокси-6-метилпиридил-2-азо]фенилсульфонат натрия

Все соединения использовались в виде водных растворов с исходной концентрацией  $10^{-2}$  моль.

Прогноз спектра фармакологической активности проведен с использованием системы PASS – Prediction of Activity Spectra for Substances (<http://pharmaexpert.ru/PASSOnline/>). Результаты прогноза представлены в виде списка названий вероятных видов активности с расчетными оценками вероятностей наличия (Pa) и отсутствия каждого вида активности (Pi). Рассчитывали среднее отношение правдоподобий, Pa/Pi и определяли индекс перспективности. Чем больше значение индекса перспективности, тем больше вероятность проявления заданной активности у исследуемого соединения [Васильев, 2014].

Изучение липофильности исследуемых соединений проводилось с использованием электронного ресурса ALogPS 2.1, представляющего результаты в виде коэффициента logP [Mannholg, 2009, Kujawski, 2012].

Метод оценки механической активности изолированных тканей использован с целью выявления способности исследуемых соединений угнетать сократительные ответы, вызванные агонистом P2X-рецепторов  $\alpha, \beta$ -метилтен-АТФ и стимуляцией электрическим полем в присутствии холино- и адреноблокаторов, а также с целью выявления способности исследуемых соединений угнетать P2Y<sub>1</sub>-рецептор-опосредованные расслабления гладкомышечной ткани, вызванные СЭП или агонистом АТФ [Hoyle, 1989; Hoyle, 1990; Ventura, 1998; Ziganshin et al, 1993].

Самцов белых крыс линии Wistar массой 180-220г оглушали, декапитировали и обескровливали. Использовано 216 тканей (48 животных). Выделяли семявыносящий проток и мочевой пузырь и готовили продольные мышечные препараты, затем помещали их в термостатируемый сосуд с раствором Кребса для регистрации механической активности. Гладкомышечные препараты стимулировали электрическим полем (100 V, 0.5 ms, 0.5-64 Hz) в присутствии фентоламина (10  $\mu$ M) и атропина (1  $\mu$ M) для исключения вовлечения  $\alpha$ -адрено- и M-холинорецепторов на ответ ткани.

$\alpha,\beta$ -метилтен АТФ (0,1 -3  $\mu\text{M}$ ), агонист P2X рецепторов, вносили в сосуд и несколько раз отмывали препарат раствором Кребса после достижения максимального сокращения. Во избежание десенситизации рецепторов перед каждым последующим внесением агониста делали интервал в 20 мин и меняли раствор в сосуде каждые 10 минут.

Зависимость «частота-сокращение», «концентрация-сокращение» оценивали до и после инкубации препарата ткани с исследуемыми веществами в концентрации 10  $\mu\text{M}$ . Инкубация длилась 15 мин с каждым веществом. На каждом из мышечных препаратов оценивалось только одно вещество в одной концентрации.

К препарату двенадцатиперстной кишки (18 тканей) добавляли карбахолин (0,3  $\mu\text{M}$ ) для тонического сокращения мышц для получения стабильного сократительного ответа. Расслабительные ответы на АТФ (1  $\mu\text{M}$  – 3 мМ) и стимуляцию электрическим полем (100 V, 0.5 ms, 0.5-64 Hz) оценивали на фоне тонического действия карбахолина. Растворы АТФ добавляли непосредственно в сосуд, затем отмывали несколько раз раствором Кребса после достижения максимума расслабляющего ответа. Частоту стимуляции повышали с интервалом 30 с, за это время тонус мышцы возвращался к исходному плато.

Зависимость «концентрация-эффект» и «частота-эффект» оценивали до и после инкубирования в течение 20 минут с исследуемыми веществами. Расчет производили как процент от максимального расслабления.

Активность экто-нуклеотидаз определяли путем инкубирования кусочков ткани (2-4 мг) с АТФ и исследуемым веществом, с дальнейшей оценкой содержания субстрата и его метаболитов в инкубате методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [Harris, 1972; Cunha, 1989; Webster, 1985]. Использовано 224 ткани (14 животных). Определение концентрации АТФ проводили путем сравнения площади под пиком с соответствующей площадью контрольного образца. Активность фермента выражали в пмоль АТФ, разрушенных 1 мг ткани за 1 мин. Результаты представлены как  $M \pm m$  четырех независимых экспериментов в четырех независимых пробах.

При изучении токсичности соединения А3 использовано 15 мышей обоего пола массой  $20 \pm 2$  г. Мыши были разделены на три группы по 5 мышей, каждой группе мышей вводили водные растворы соединения А3 внутрибрюшинно: первой группе в дозе 1000 мг/кг, второй – 1500 мг/кг, третьей – 2000 мг/кг. Оценивали общее состояние животных, регистрировали гибель, наблюдение вели в течение 5 суток.

В экспериментах по оценке активности соединения А3 *in vivo* использовано 28 белых беспородных мышей массой  $20 \pm 2$  г<sup>2</sup>. Мышей наркотизировали и помещали на обогреваемую

---

<sup>2</sup> Выражаем благодарность за совместное проведение серии экспериментов сотрудникам НОЦ фармацевтики КФУ Софроновой С.А. и Конг Хонг Хань.

до 37°C металлическую площадку, в конечности мыши вводили игольчатые электроды для записи электрокардиограммы. Эксперименты проводили с использованием системы ADInstruments PowerLab 4/35, в состав которой входит аналогово-цифровой блок регистрации данных и программное обеспечение. Запись данных регистрировали на персональном компьютере при помощи программного обеспечения LabChart 8.0 [Xu et al., 2005]. Эксперимент состоял из серии последовательных внутривенных введений АТФ до и после внутривенного введения соединения АЗ или PPADS в дозе 10 и 100 мг/кг. Первое введение АТФ производили после стабилизации частоты сердечных сокращений мыши в наркозе. Затем через 5 минут вводили PPADS или АЗ, а затем с интервалом в 1, 3 и 10 минут повторно вводили АТФ. Оценивали изменение числа сердечных сокращений мыши после каждого введения АТФ на фоне исследуемых веществ по сравнению с исходным влиянием АТФ.

В экспериментах по оценке влияния исследуемых веществ АЗ и PPADS на поведение и психоэмоциональное состояние были использованы следующие методы: «открытое поле-круг», «темная/светлая камера», «приподнятый крестообразный лабиринт», «принудительное плавание по Porsolt». Исследования проводились на 120 интактных беспородных белых мышах-самцах массой 25-35 грамм. Во всех экспериментах исследуемые вещества вводили за 30 минут до начала эксперимента. Животным опытных групп внутрибрюшинно вводили вещества АЗ и PPADS в дозах 10 и 100 мг/кг. Животным контрольных групп вводили растворитель – воду очищенную. Сразу после инъекций животных рассаживали в индивидуальные камеры.

Исследования на моделях артериальных тромбозов, индуцированных аппликацией 50% раствора хлорида железа (III) на сонную артерию крыс, осуществляли на наркотизированных нембуталом (50 мг/кг) животных спустя 2 часа после перорального введения препаратов согласно методу Kurz (1990). В качестве препаратов сравнения использовалась ацетилсалициловая кислота и клопидогрел. Для исследования влияния соединений на время образования тромба использовали ультразвуковой компьютеризированный аппарат «Минимакс-Доплер-К» (Санкт-Петербург) [Спасов, 2013]<sup>3</sup>.

Влияние исследуемого соединения в концентрации 1 мкМ на P2Y<sub>12</sub>-рецепторы тромбоцитов было изучено методом малоуглового светорассеяния [Сакаев, 2000]. Регистрация проводилась на приборе «Лайт-Скан» (НПФ «Люмекс», Россия). Исследования выполнялись на богатой тромбоцитами плазме кроликов. Активация тромбоцитарных P2Y<sub>12</sub>-рецепторов проводилась в кальциевой среде, с добавлением 5 мМ ЭДТА. В качестве

---

<sup>3</sup> Выражаем глубокую признательность за совместное проведение этой серии экспериментов ассистенту кафедры фармакологии Волгоградского ГМУ Сиротенко В.С.

индуктора активации данных рецепторов использовали АДФ в концентрации 200 нМ<sup>3</sup>. При изучении антиагрегантной активности веществ в кювету с 7 мл буфера и 100 мкл богатой тромбоцитами плазмы добавляется 100 мкл раствора исследуемого соединения в концентрации 1 мкМ. Кювету помещали в ячейку и начинали запись агрегатограммы. Пробу прописывали в течение 5 минут, после чего в кювету добавляли индуктор агрегации АДФ в концентрации 20 нМ. Запись агрегатограммы производили в течение 5 минут, при перемешивании пробы магнитной мешалкой (800 об/мин). Аналогичным способом в другой кювете исследовали антиагрегантную активность остальных тестируемых образцов.

Аналогичным образом в безкальциевой среде исследовали активность соединения АЗ в отношении P2Y<sub>1</sub>-рецепторов. В качестве вещества сравнения использовали MRS 2179, селективный антагонист P2Y<sub>1</sub>-рецепторов, мощный ингибитор АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов *in vitro* [Baurand, 2003].

Для изучения анальгетической активности выполнены тест электрической стимуляции корня хвоста крыс с определением порога ноцицептивных реакций, тест отдергивания хвоста («tail-flick») и тест «горячая пластина» («hot-plate»)⁴. Исследования проводились на самцах белых крыс массой 200-250 г. Исследуемое вещество АЗ вводили в дозах 66 мг/кг и 132 мг/кг однократно перорально (из расчета 1 мл водного раствора на 100 г массы тела). В качестве препарата сравнения использовали буторфанола тартрат, который вводили в дозе 1 мг/кг внутривенно. Контрольным животным инъецировался эквивалентный объем дистиллированной воды. Регистрацию ноцицептивных ответов проводили через 60 и 120 минут после введения веществ.

**В третьей главе** приведены результаты собственных исследований.

В результате анализа производных пиридоксина в тест-системе PASS обнаружено, что все исследуемые соединения проявляют антагонистическую активность в отношении P2-рецепторов, в большей степени в отношении подтипов P2X<sub>1</sub> и P2X<sub>3</sub> и P2Y<sub>12</sub>.

По результатам изучения влияния исследуемых соединений на сокращения тканей крысы, вызванные стимуляцией электрическим полем, выявлено, что достоверное угнетение сократительных ответов, опосредованных P2X-рецепторами, на большинстве исследованных частот стимуляции было выявлено лишь при использовании соединений АЗ и А9.

При анализе влияния липофильности на силу сокращения изолированных мышечных волокон крысы не установлено зависимости силы сокращения от значения коэффициента липофильности ни для одной из частот, как для изолированной ткани мочевого пузыря, так и для ткани семявыносящего протока для всех исследуемых соединений.

---

<sup>4</sup> Выражаем глубокую признательность за совместное проведение серии экспериментов к.м.н. Елисеевой Н.А.

Было оценено влияние соединений А1-А9 и В1-В6 на активность экто-нуклеотидаз. Установлено, что соединения А3 и А9 не оказывают достоверного влияния на активность экто-нуклеотидазы в этих тканях (Рисунок 3).

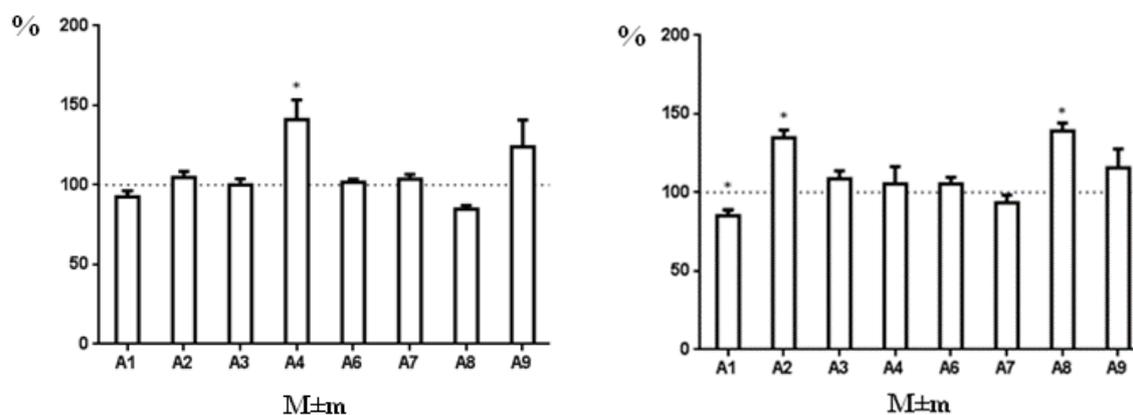


Рисунок 3 Влияние соединений А1-А9 в концентрации 10  $\mu\text{M}$  на активность экто-нуклеотидазы изолированного мочевого пузыря (справа) и семявыносящего протока (слева) крысы. Результаты представлены как % от исходной активности фермента, принятой за 100%.  $n=8$ . \* -  $p \leq 0,05$  по сравнению с исходной активностью.

При изучении влияния исследуемых соединений на сокращения тканей крысы, вызванные агонистом Р2Х-рецепторов  $\alpha, \beta$ -метилена-АТФ, установлено, что оба соединения, А3 и А9, на обеих тканях снижали амплитуду сокращений, вызванных  $\alpha, \beta$ -метилена-АТФ в концентрациях  $10^{-6}\text{M}$  (Рисунок 4).

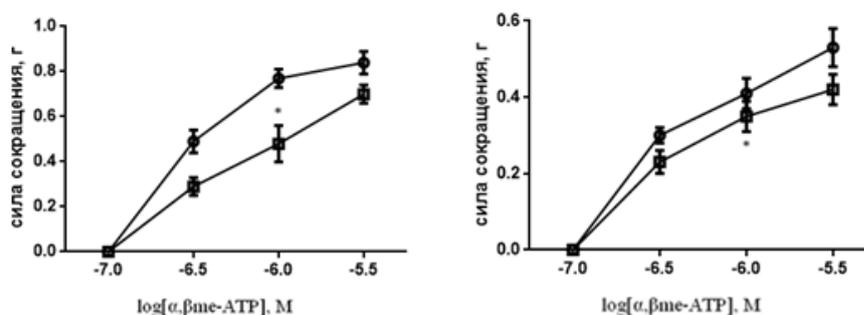


Рисунок 4 Сокращения изолированного мочевого пузыря (слева) и семявыносящего протока (справа) крысы, вызванные  $\alpha, \beta$ -метиленаАТФ до (круглые символы) и после инкубации с соединением А3 (квадратные символы) в концентрации 10  $\mu\text{M}$ . По оси ординат – сила сокращений в граммах, по оси абсцисс – десятичный логарифм концентрации агониста ( $n=6$ ), Т-критерий Вилкоксона

Вычисление логарифма средней эффективной концентрации агониста ( $\log EC_{50}$ ) по нормализованным показателям сократительного ответа показало, что в мочевом пузыре эти цифры составляют  $-6.36 \pm 0.14$  в контроле и  $-5.90 \pm 0.07$  в присутствии соединения АЗ, что имеет достоверные различия ( $p < 0,05$ , Т-критерий Вилкоксона). Значения  $\log EC_{50}$  в семявыносящем протоке составили  $-5.76 \pm 0.15$  и  $-5.55 \pm 0.15$  в контроле и в присутствии соединения АЗ, соответственно ( $p > 0,05$ ).

Влияние соединений групп А и В на  $P2Y_1$ -рецепторы проводилось на препарате двенадцатиперстной кишки. Исследуемые соединения достоверно не изменяли  $P2Y_1$ -рецептор-опосредованные расслабления, вызванные СЭП или агонистом АТФ, однако соединение А9 имело тенденцию к угнетению  $P2Y$ -рецепторов (Рисунок 5).

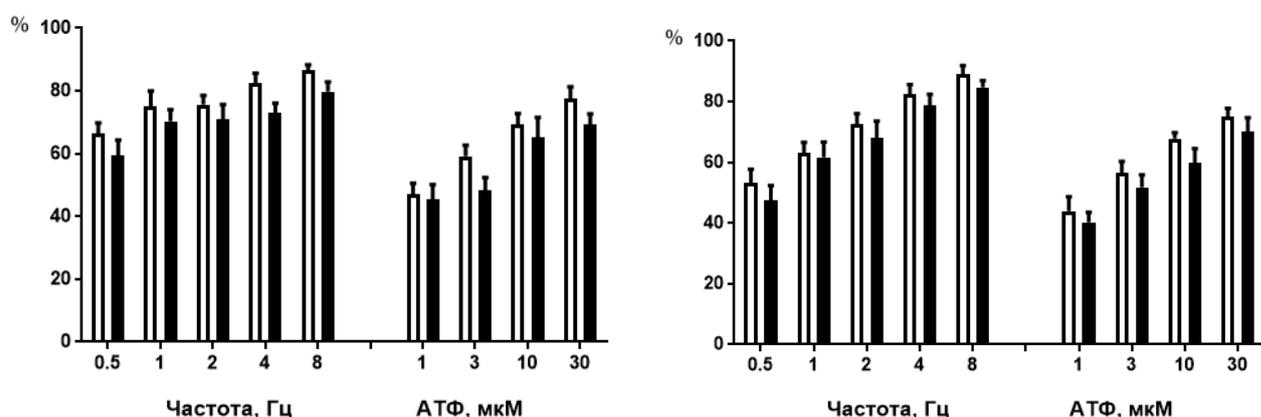


Рисунок 5 Расслабления препарата двенадцатиперстной кишки крысы, вызванные СЭП частотой 0,5-8 Гц и АТФ в концентрациях 1-30 мкМ, до (светлые столбики) и после (темные столбики) инкубации с соединением АЗ (слева) и А9 (справа) в концентрации 10 мкМ. Результаты приведены в процентах от максимального возможного расслабления, принятого за 100%,  $n=6$ .

Расчет значений  $\log EC_{50}$  для АТФ показал, что эта величина была в контроле и в присутствии исследуемого вещества  $-5.68 \pm 0.18$  и  $-5.49 \pm 0.17$  для соединения АЗ,  $-5.62 \pm 0.18$  и  $-5.44 \pm 0.15$  для соединения А9; эти пары значений достоверно не отличались между собой. Вычисление величины  $\log EC_{50}$  для АТФ показало, что это значение равнялось  $-5.35 \pm 0.11$  в присутствии PPADS, что достоверно отличалось от такового в контроле  $-5.65 \pm 0.13$  ( $p < 0,05$ , Т-критерий Вилкоксона).

Оценка токсичности соединения АЗ в дозах 1000, 1500 и 2000 мг/кг показала, что гибель животных не зарегистрирована ни в одной из исследованных групп. Через 2-3 минуты после внутрибрюшинного введения соединения АЗ во всех дозах происходило выраженное торможение двигательной активности мыши, уши, нос и хвост животного окрашивались в желтовато-красноватый цвет на 10-15 минут. Через 20-30 минут после введения соединения

A3 естественный цвет слизистых восстанавливался, мышь вновь становилась активной, однако моча животных приобретала ярко-оранжевый цвет.

Таким образом, мы установили, что соединение A3 оказывает антагонизм по отношению к P2X-рецепторам, сопоставимый с таковым PPADS как на препаратах мочевого пузыря, так и на препаратах семявыносящего протока, при этом, в отличие от PPADS, не влияет на P2Y<sub>1</sub>-рецепторы двенадцатиперстной кишки и активность экто-нуклеотидазы.

В следующей серии экспериментов *in vivo* на мышах нами было оценено действие соединения A3 и PPADS в отношении отрицательного хронотропного эффекта АТФ. Внутривенное болюсное введение раствора АТФ мышам в дозе 1 мг/кг вызывает резкое кратковременное (1-3 сек) снижение частоты сердечных сокращений (ЧСС) на более чем 30% от исходной ЧСС.

Предварительное введение соединения A3 в дозах 10 или 100 мг/кг достоверно не повлияло на проявление отрицательного хронотропного действия АТФ – ни в одной из исследованных доз соединение A3 ни на одном из исследованных временных промежутков (через 1, 3 и 10 мин) достоверно не изменило эффект АТФ.

В аналогичных экспериментах было оценено действие PPADS. Мы установили, что введение PPADS в дозах 10 и 100 мг/кг также не оказывает достоверного влияния на отрицательный хронотропный эффект АТФ.

Влияние соединений A3 и PPADS на поведенческие реакции животных оценивалось в экспериментах «открытое поле-круг», «темная/светлая камера» и «приподнятый крестообразный лабиринт».

В тесте «открытое поле» была зафиксирована ориентировочно-исследовательская и спонтанная двигательная активность. После внутрибрюшинного введения контроля (растворитель-вода очищенная) и раствора исследуемого соединения A3 в максимально использованной дозе 100мг/кг получены следующие показатели: ориентировочно-двигательная активность животных контрольной группы составила  $4,8 \pm 0,6$ , спонтанная двигательная активность -  $26,5 \pm 3,5$ , показатели соединения A3 составили  $6,8 \pm 0,7$  и  $23,8 \pm 1,5$ , соответственно. Введение препарата не оказало статистически значимого влияния на активность животных по сравнению с контрольной группой.

В тесте «темная/светлая камера» после внутрибрюшинного введения раствора исследуемого соединения A3 в максимально использованной дозе полученные показатели пребывания животного в светлом отсеке ( $55 \pm 8$  сек) достоверно не отличались от такового у контрольной группы ( $52 \pm 7$  сек). Латентный период первого захода в отсек ( $45 \pm 7$  сек) также достоверно не отличался от такового у контрольной группы ( $42 \pm 6$  сек).

В тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» после внутрибрюшинного введения раствора исследуемого соединения АЗ в максимально использованной дозе полученные показатели пребывания животного в открытом рукаве ( $153 \pm 5$  сек) достоверно не отличались от такового у контрольной группы ( $158 \pm 4$  сек). Количество выходов в открытый рукав ( $2,5 \pm 0,4$ ) также достоверно не отличалось от такового у контрольной группы ( $2,2 \pm 0,1$ )

Внутрибрюшинное введение PPADS в дозах 10 и 100 мг/кг во всех проведенных тестах также не оказало достоверного влияния на параметры поведения животных по сравнению с контрольной группой.

Результаты проведенных тестов показывают отсутствие влияния исследованных веществ на поведенческие реакции животных.

Влияние соединений АЗ и PPADS на психоэмоциональное состояние животных оценивалось в тесте принудительного плавания по Porsolt. Принудительное плавание в контрольной группе животных вызывало реакцию иммобилизации продолжительностью  $145 \pm 8$  сек, что было в 1,5 раза меньше времени, затраченного на активное плавание –  $215 \pm 2$  сек. Время иммобилизации в опытной группе после введения дозы АЗ 10 мг/кг составило  $152 \pm 9$  сек, дозы 100 мг/кг –  $175 \pm 6$  сек. Время иммобилизации в группе препарата сравнения после введения дозы PPADS 10 мг/кг составило  $148 \pm 6$  сек, дозы 100 мг/кг –  $168 \pm 6$  сек.

Введение исследуемых соединений, АЗ и PPADS в обеих использованных дозах не влияло на поведение животных в тесте принудительного плавания по Porsolt и значения, полученные в ходе эксперимента, статистически не отличались от группы контрольных животных, что также свидетельствует об отсутствии влияния исследуемых соединений на психоэмоциональное состояние животных.

По данным проведенных исследований по изучению антитромботической активности установлено, что при введении внутрь крысам соединения АЗ и препарата сравнения происходило увеличение среднего времени окклюзии сонной артерии. Для исследуемого соединения полученные данные достоверны в дозах 46 и 92 мг/кг. Величина  $ED_{50}$  исследуемого соединения составила 66,2 мг, ацетилсалициловой кислоты – 119 мг, клопидогреля – 113,9 мг (Таблица 3).

Таблица 3 Антитромботическая активность соединения АЗ (per os) на модели артериального тромбоза, индуцированного 50% раствором FeCl<sub>3</sub>

Вещество	Доза, мг/кг	Время образования тромба, мин	Δ% пролонгирования времени образования тромба	ED <sub>50</sub> , мг
Контроль		19,4±0,4		
АЗ	23	21,0±0,6	8,2±3,0	66,2
	46	28,0±1,1*	44,3±5,6*	
	92	31,0±1,2*	58,1±6,2*	
Ацетилсалициловая кислота	20	20,8±1,3	16,8±7,1	119
	100,0	26,3±0,9*	35,7±4,7*	
	150,0	32,7±2,4*	63,6±16,4*	
Клопидогрел	44	21,8±0,6*	12,5±3,3*	113,9
	88	26,3±0,6*	35,7±3,3*	
	122	30±0,4*	54,6±2,1*	

\*данные достоверны по отношению к контролю (критерий Манна-Уитни,  $p \leq 0,01$ )

Поскольку по результатам прогнозирования активности исследуемых соединений с помощью системы PASS установлено, что соединение АЗ может обладать антагонистической активностью в отношении P2Y<sub>1</sub>- и P2Y<sub>12</sub>-рецепторов тромбоцитов, были проведены следующие эксперименты.

В ходе проведенных исследований *in vitro* по изучению антагонистической активности соединения АЗ в отношении P2Y<sub>12</sub>-рецепторов тканей кролика установлено, что данное соединение в концентрации 1 мкМ в кальциевой среде ингибирует агрегацию тромбоцитов, индуцированную 20нМ АДФ, подавление активации тромбоцитов в кальциевой среде составило 50,88±9,28% (Таблица 4).

Препаратом сравнения по данному исследованию может быть только клопидогрел, но так как он является пролекарством, было нецелесообразно его использовать в опытах *in vitro*.

Таблица 4 Изучение влияния соединения АЗ в концентрации 1мкМ на активацию тромбоцитов в кальциевой среде, индуцированного АДФ в концентрации 20 нМ.

№ п/п	Тестируемый образец	Уровень активации тромбоцитов	Подавление активации тромбоцитов в кальциевой среде, Δ% (M±m)
1	Контроль	2,15 ± 0,37	-
2	АЗ	0,93 ± 0,18*	50,88±9,28

*Примечание*

\*-статистически значимо по отношению к контролю ( $p \leq 0,1$ , критерий Манна-Уитни)

В ходе проведенных исследований *in vitro* по изучению антагонистической активности соединения АЗ в отношении P2Y<sub>1</sub>-рецепторов тканей кролика установлено, что

данное соединение в концентрации 1 мкМ в безкальциевой среде ингибирует агрегацию тромбоцитов, индуцированную 70 нМ АДФ. Уровень активации тромбоцитов составил  $0,75 \pm 0,07$ , что статистически значимо по отношению к контролю. Подавление активации тромбоцитов в безкальциевой среде составило  $60,79 \pm 3,62\%$  (Таблица 5).

Таблица 5 Изучение влияния соединения А3 и соединения сравнения MRS 2179 в концентрации 1мкМ на активацию тромбоцитов в безкальциевой среде, индуцированного АДФ в концентрации 70 нМ.

№ п/п	Тестируемый образец	Уровень активации тромбоцитов	Подавление активации тромбоцитов в безкальциевой среде, $\Delta\%$ (M $\pm$ m)
1	Контроль	$1,91 \pm 0,33$	-
2	А3	$0,75 \pm 0,07^*$	$60,79 \pm 3,62$
3	MRS 2179	$0,17 \pm 0,04^*$	$91,1 \pm 2,1$

*Примечание*

\*-статистически значимо по отношению к контролю ( $p \leq 0,03$ , критерий Манна-Уитни)

При изучении антиноцицептивной активности установлено следующее. При постепенно нарастающем электроболевым раздражении корня хвоста крыс наблюдались соответствующие ноцицептивные реакции: рефлекс «Отдергивания хвоста», голосовые реакции – «Вокализация», «Пролонгированная вокализация», характеризующие эмоциональный компонент боли. Соединение А3 в дозах 66 и 132мг/кг при внутрижелудочном введении не оказывало достоверного антиноцицептивного действия.

Латентный период ноцицептивного ответа на термическое раздражение в тесте «tail-flick» в контрольной группе животных составлял  $4,2 \pm 0,6$  секунд (Таблица 6).

Таблица 6 Влияние соединений А3, Буторфанола на антиноцицептивные эффекты в тесте «Tail-flick» (M $\pm$ m).

Доза мг/кг	Латентный период отдергивания хвоста, сек	
	через 60 мин	через 120 мин
Контроль	$4,2 \pm 0,6$	$4,2 \pm 0,6$
А3 (66 мг/кг)	$3,8 \pm 0,5$	$4,1 \pm 0,1$
А3 (132 мг/кг)	$6,8 \pm 0,2$	$8,1 \pm 0,35^*$
Буторфанола (1 мг/кг)	$9,8 \pm 1,1^*$	$8,4 \pm 0,6^*$

Примечание: \*- статистически значимо по отношению к контрольной группе животных ( $p \leq 0,05$ ).

Через два часа после введения соединения АЗ в дозе в дозе 132 мг/кг наблюдалось увеличение порога болевой реакции относительно контроля на 34,5%. Препарат сравнения буторфанол статистически значимо повышал анальгетический эффект как через 60, так и через 120 мин после введения на 52% и 38% соответственно.

В тесте «Горячая пластина» при помещении животного на горячую поверхность и достижении порога болевой чувствительности регистрировали ноцицептивную реакцию в виде облизывания задней лапы. Латентный период ноцицептивного ответа на болевой раздражитель в контрольной группе животных составлял  $9,2 \pm 0,7$  секунд через 60 минут и  $7,3 \pm 0,5$  сек через 120 минут. Исследуемое соединение АЗ не оказывало статистически значимого увеличения ноцицептивного ответа в тесте «Горячая пластина» в изучаемых дозах, тогда как препарат сравнения вызывал достоверное увеличение порога болевой реакции относительно контроля через 60 мин в 1,8 и через 120 минут в 1,6 раз.

**В четвертой главе** представлено обсуждение результатов. Соединения, активность которых мы исследовали, представляют собой продукты модификации пиридоксина. В отличие от PPADS, в данных соединениях применяется ацетальная защита гидроксиметильных групп, что оказывает существенное влияние на процесс синтеза, в значительной мере упрощая и снижая затраты на его осуществление. Ранее было показано, что соединения на основе сульфаниловой кислоты и пиридоксина обладают антибактериальной активностью, но данных об их активности по отношению к пуринорецепторам отсутствовали [Штырлин, 2013].

Результаты проведенных исследований доказывают, что выбранный нами класс химических соединений представляет значительный интерес для поиска новых антагонистов P2-рецепторов, используемых в экспериментальной фармакологии.

Установлена активность соединения АЗ в отношении P2X-рецепторов мочевого пузыря и семявыносящего протока, сравнимая с эталонным фармакологическим анализатором – PPADS.

Несомненным достоинством указанного соединения является отсутствие влияния на P2Y<sub>1</sub>-рецепторы гладкомышечных тканей, что следует из результатов экспериментов, проведенных на изолированной ткани двенадцатиперстной кишки крысы. Немаловажным является тот факт, что соединение АЗ не влияет на активность экто-нуклеотидаз.

Соединение АЗ в исследованных дозах не способно как-либо изменить отрицательный хронотропный эффект АТФ, что, вероятно, связано с отсутствием влияния на P2X<sub>2/3</sub> рецепторы левого желудочка миокарда, откуда начинаются вагус-зависимый отрицательный хронотропный эффект АТФ.

По результатам всех использованных видов исследований поведенческих реакций и психоэмоционального состояния выявлено отсутствие влияния соединения А3 на поведение животных.

В проведенных нами экспериментах установлено, что соединение А3 оказывает антитромботическое действие *in vivo*, а в условиях *in vitro* подавляет функциональную активность тромбоцитов путем блокирования P2Y<sub>12</sub>-рецепторов, что делает его перспективным для направленного поиска новых соединений с высокой антиагрегантной активностью.

При изучении анальгетической активности установлено, что через два часа после введения соединения А3 в дозе 132 мг/кг наблюдалось достоверное увеличение порога болевой реакции относительно контроля на 34,5%.

Результаты проведенных исследований доказывают, что выбранный нами класс химических соединений представляет значительный интерес для поиска нового, более доступного фармакологического анализатора, а также может являться основой для синтеза потенциально эффективных и высокоселективных антагонистов P2-рецепторов. При этом следует подчеркнуть, что хотя проведенный нами компьютерный прогноз фармакологической эффективности в системе PASS и не оправдался в полной мере, но позволил наметить план исследований для установления наличия или отсутствия определенной активности у новых исследуемых соединений.

Таким образом, проведенные исследования и анализ зависимости «структура-активность» позволяют нам рекомендовать натриевую соль п-(1,5-Дигидро-3,3,8-триметил-9-гидрокси-[1,3]диоксепино[5,6-с]пиридинил-азо)-фенилсульфокислоты в качестве нового, более доступного фармакологического анализатора, а также основы для синтеза потенциально эффективных и высокоселективных антагонистов P2-рецепторов. Мы считаем, что азофенилсульфонаты натрия на основе семичленного диметилкетала пиридоксина имеют высокую вероятность проявления селективного антагонизма в отношении P2-рецепторов.

## **ВЫВОДЫ**

1. Модификация структуры в пиридоксиновом фрагменте семичленных ацеталей азофенилсульфоновых кислот приводит к появлению антагонистической активности в отношении P2X-рецепторов в случае диметилкетала и производного пиридоксина, содержащего в третьем положении меркаптоэтанольный фрагмент.
2. Натриевая соль п-(1,5-дигидро-3,3,8-триметил-9-гидрокси[1,3]диоксепино[5,6с]пиридинил-азо)фенилсульфониевой кислоты (соединение А3) в экспериментах на

изолированных гладкомышечных препаратах мочевого пузыря и семявыносящего протока крысы проявляет антагонизм по отношению к эффектам, опосредуемым P2X-рецепторами. Этот эффект соединения А3 сопоставим с эффектом эталонного антагониста P2-рецепторов – пиридоксальфосфат-6-азофенил-2',4'-дисульфоновой кислоты (PPADS).

3. Соединение А3 в экспериментах на изолированных гладкомышечных препаратах двенадцатиперстной кишки крысы, в отличие от PPADS, не проявляет антагонизм по отношению к эффектам, опосредуемым P2Y<sub>1</sub>-рецепторами.
4. Соединение А3 в экспериментах на изолированных гладкомышечных препаратах мочевого пузыря и семявыносящего протока крысы, в отличие от PPADS, не угнетает активность экто-нуклеотидаз в этих тканях.
5. Соединение А3 и PPADS при внутривенном введении мышам в дозах 10 и 100 мг/кг не оказывают влияния на проявление отрицательного хронотропного эффекта АДФ при внутривенном введении. Соединение А3 и PPADS при внутрибрюшинном введении крысам в дозах 10 и 100 мг/кг не оказывают влияния на поведение и психоэмоциональное состояние животных.
6. Соединение А3 в дозах 46 и 92 мг/кг оказывает антитромботическое действие *in vivo* при моделировании артериального тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного поверхностной аппликацией хлорида железа (III). В условиях *in vitro* соединение А3 в концентрации 1 мкМ подавляет функциональную активность тромбоцитов, индуцированную 20 нМ АДФ.
7. В условиях *in vivo* (тест tail-flick) соединение А3 в дозе 132 мг/кг через два часа после введения достоверно увеличивает порог болевой реакции относительно контроля на 34,5%.

## НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Натриевая соль п-(1,5-дигидро-3,3,8-триметил-9-гидрокси[1,3]диоксепино-[5,6с]пиридинил-азо)-фенилсульфониевой кислоты (соединение А3) может быть использована в качестве антагониста P2X-рецепторов в экспериментальной фармакологии и физиологии при оценке функционирования в тканях этих рецепторов.
2. Следует провести дальнейшие исследования соединения А3 в отношении селективности его действия на различные подтипы P2X-рецепторов.

3. Рациональным является продолжение исследования биологической активности новых производных азофенилсульфоновых кислот с модификациями в пиридоксиновом фрагменте в качестве потенциальных антагонистов P2-рецепторов.

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

#### **Работы, опубликованные в изданиях, рекомендуемых ВАК Минобрнауки РФ**

1. Калинина О.С. Перспективы использования агонистов и антагонистов P2-рецепторов в качестве лекарственных средств /О.С. Калинина, А.У. Зиганшин, Ю.Г. Штырлин, А.Д. Стрельник// Казанский медицинский журнал. – Казань. – 2014. – Т. 95. – №1. – с.86-91.
2. Калинина О.С. Агонисты и антагонисты P2Y-рецепторов в современной клинической практике/О.С. Калинина, А.У. Зиганшин, Ю.Г. Штырлин, А.Д. Стрельник //Вестник современной клинической медицины. – 2017. – Т.10, вып.1. – с. 22-28.
3. Kalinina O.S., Ziganshin A.U. Antagonistic properties of new non-phosphorylated derivatives of nitrogen-containing heterocycles towards P2-receptors/O.S. Kalinina, Y. G. Shtyrlin, A.D. Strelnik// Int. J. Pharmacol. – 2015. – Vol. 11(4). – p.400-404.

#### **Работы, опубликованные в других изданиях**

1. Калинина О.С. Изучение антагонистической активности в отношении P2-рецепторов новых аналогов PPADS/О.С. Калинина, Ю.Г. Штырлин, А.Д. Стрельник, А.У. Зиганшин // Материалы Международной научно-технической конференции «Прикладная электродинамика, фотоника и живые системы», Казань, 11-13 апреля 2013 г. – Казань: Новое знание, 2013. - С. 129-130.
2. Патент на изобретение 2554885 мпк С07D491/056 (2006.01), А61К31/4375 (2006.01), А61Р9\00 (2006.01) Антагонисты пуринорецепторов на основе новых производных пиридоксина/ Штырлин Ю.Г., Стрельник А.Д., Калинина О.С., Зиганшин А.У. Опубл. 27.06.2015, Бюл. №18.
3. Патент на изобретение 2554883 мпк С07D491/056 (2006.01), А61К31/4375 (2006.01), А61Р9\00 (2006.01) Применение производных ацеталей пиридоксина в качестве антагонистов пуринорецепторов / Штырлин Ю.Г., Стрельник А.Д., Калинина О.С., Зиганшин А.У. Опубл. 27.06.2015, Бюл. №18.
4. Ziganshin A.U. Antagonistic properties of new non-phosphorylated derivatives of nitrogen-containing heterocycles towards P2-receptors/O.S. Kalinina, Y. G. Shtyrlin, A.D. Strelnik// Int. J. Pharmacol. – 2015. – Vol. 11(4). – p.400-404.
5. Ziganshin A.U. Antagonistic action of several new PPADS analogues on responses mediated by P2X and P2Y receptors/A.U. Ziganshin, O.S. Kalinina, Y.G. Shtyrlin, A.D. Strelnik // Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. – 2014. – V. 115 (Suppl. 1). – P. 97
6. Ziganshin A.U. Synthesis of non-phosphorylated derivatives of pyridoxine and their antagonistic effects on P2 receptors/ A.U. Ziganshin, O.S. Kalinina, Y.G. Shtyrlin, et al. // Int. Conference on Pharmaceutical Sciences, Dubai, 2015.
7. Ziganshin A.U. Prospects for creating new drugs that affect P2 receptors/ A.U. Ziganshin, O.S. Kalinina, A.I. Gabdrakhmanov et al.// 3rd Russian Conference on Medicinal Chemistry, Kazan, 2017.

### Список сокращений

АДФ – аденозин-5'-дифосфат

АМФ – аденозин-5'-монофосфат

АСК – ацетилсалициловая кислота

АТФ – аденозин-5'-трифосфат

НПФаза – нуклеотид-пирофосфатаза/фосфодиэстераза

НТДФаза – нуклеотид-трифосфат-дифосфогидралаза

СЭП – стимуляция электрическим полем

УДФ – уридин-5'-дифосфат

УТФ – уридин-5'-трифосфат

ЧСС – частота сердечных сокращений

PASS – Prediction of Activity Spectra for Substances

PPADS – пиридоксальфосфат-6-азофенил-2',4'-дисульфоновая кислота

**КАЛИНИНА ОЛЬГА СЕРГЕЕВНА**

**ИССЛЕДОВАНИЕ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРИДОКСИНА В КАЧЕСТВЕ  
ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ АНТАГОНИСТОВ P2-РЕЦЕПТОРОВ**

**14.03.06. Фармакология, клиническая фармакология**

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Подписано в печать \_\_. \_\_. 201\_\_ г.

Формат 60x84/16.

Печать офсетная.

Тираж 100 экз. Заказ \_\_\_\_

Отпечатано в типографии