

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Казанский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

На правах рукописи

Калинина Ольга Сергеевна

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

14.03.06. Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Зиганшин Айрат Усманович

Научный консультант:
доктор химических наук, доцент
Штырлин Юрий Григорьевич

Казань, 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1. История и современное состояние проблемы.....	13
1.2. Классификация и характеристика пуринорецепторов.....	14
1.2.1 Классификация пуринорецепторов.....	14
1.2.2 Характеристика аденозиновых рецепторов.....	14
1.2.3 Характеристика P2-рецепторов.....	16
1.3. Агонисты P2-рецепторов.....	21
1.4. Антагонисты P2-рецепторов.....	23
1.5. Антагонистическое действие PPADS в отношении P2-рецепторов...	29
1.6. Метаболизм внеклеточных нуклеотидов.....	31
1.7. Перспективы и клиническое значение исследования P2-рецепторов.....	32
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	37
2.1. Общая характеристика новых исследуемых соединений.....	37
2.2. Прогноз спектра фармакологической активности новых соединений в системе PASS.....	40
2.3. Изучение липофильности новых производных пиридоксина.....	41
2.4. Фармакологические методы исследования на изолированных тканях.....	42
2.5. Изучение активности экто-нуклеотидаз тканей крысы.....	45
2.6. Изучение токсичности соединения А3 для мышей при внутрибрюшинном введении.....	46
2.7. Оценка влияния соединения А3 на частоту сердечных сокращений мыши.....	47
2.8. Оценка влияния соединения А3 на поведение и психоэмоциональное состояние животных	48

2.8.1.	Оценка влияния соединения АЗ на поведение животных на установке «открытое поле-круг».....	49
2.8.2.	Оценка влияния соединения АЗ на поведение животных на установке «темная/светлая камера».....	50
2.8.3.	Оценка влияния соединения АЗ на поведение животных на установке «приподнятый крестообразный лабиринт».....	51
2.8.4.	Оценка влияния соединения АЗ на психоэмоциональное состояние животных в тесте принудительного плавания по Porsolt.....	52
2.9.	Изучение антитромботической активности соединения АЗ.....	53
2.10.	Изучение влияния соединения АЗ на P2Y-рецепторы тромбоцитов.....	55
2.11.	Изучение анальгетической активности соединения АЗ.....	57
2.11.1	Тест электрической стимуляции корня хвоста крыс с определением порога ноцицептивных реакций.....	57
2.11.2	Тест отдергивания хвоста (tail-flick).....	58
2.11.3	Тест «Горячая пластина» (hot plate).....	58
2.12.	Использованные вещества.....	59
2.13.	Обоснование выбора концентраций исследуемых соединений в экспериментах <i>in vitro</i> , путей введения и доз в экспериментах <i>in vivo</i>	59
2.14.	Анализ результатов.....	61
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....		62
3.1.	Прогноз фармакологической активности новых производных пиридоксина с помощью системы PASS.....	62
3.2.	Влияние исследуемых соединений на P2X-рецептор-опосредованные сокращения изолированных мышечных препаратов мочевого пузыря крысы, вызванные стимуляцией электрическим полем.....	64
3.3.	Влияние исследуемых соединений на P2X-рецептор-	

опосредованные сокращения изолированных мышечных препаратов семявыносящего протока крысы, вызванные стимуляцией электрическим полем.....	68
3.4. Изучение влияния исследуемых соединений на активность экто-нуклеотидаз мышечных препаратов мочевого пузыря и семявыносящего протока крысы.....	72
3.5. Анализ зависимости структура-активность для исследуемых соединений.....	74
3.6. Изучение влияния соединений А3 и А9 на P2X-рецептор-опосредованные сокращения мышечных препаратов мочевого пузыря и семявыносящего протока крысы, вызванные α,β -метилена-АТФ.....	79
3.7. Изучение влияния соединений А3 и А9 на P2Y-рецептор-опосредованные расслабления двенадцатиперстной кишки крысы...	82
3.8. Изучение токсичности соединения А3 на мышах при внутрибрюшинном введении	85
3.9. Изучение влияния соединения А3 на отрицательное хронотропное действие АТФ	86
3.10. Изучение влияния соединения А3 на поведение и психоэмоциональное состояние животных	88
3.10.1 Изучение влияния соединения А3 на поведение животных на установке открытое поле-круг.....	88
3.10.2 Изучение влияния соединения А3 на поведение животных на установке «темная/светлая камера».....	90
3.10.3 Изучение влияния соединения А3 на поведение животных на установке приподнятый крестообразный лабиринт.....	92
3.10.4 Изучение влияния соединения А3 на психоэмоциональное состояние животных в тесте принудительного плавания по Porsolt.....	94

3.11. Изучение антитромботической активности соединения АЗ на крысах.....	95
3.12. Изучение антагонистической активности соединения АЗ в отношении $P2Y_{12}$ и $P2Y_1$ -рецепторов тромбоцитов кролика.....	96
3.13. Изучение антиноцицептивной активности соединения АЗ на крысах.....	98
3.13.1 Влияние соединения АЗ на антиноцицептивные эффекты в тесте электрической стимуляции корня хвоста.....	98
3.13.2 Влияние соединения АЗ на антиноцицептивные эффекты в тесте «tail-flick».....	100
3.13.3 Влияние соединения АЗ на антиноцицептивные эффекты в тесте «hot plate».....	101
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	102
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	110
ВЫВОДЫ.....	113
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	115
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	116
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	117
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА.....	144
ПРИЛОЖЕНИЕ. Детализация экспериментального исследования.....	149

ВВЕДЕНИЕ

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 [71]. 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 P2Y₁₂-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 [251].

Степень научной разработанности

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. В частности, это соединение используется в качестве антагониста P2-рецепторов при изучении влияния АТФ на механическую чувствительность мышечных афферентных волокон крысы [178], в экспериментах, доказывающих наличие пиримидинергической трансмиссии в мозге крысы [73], при изучении влияния внеклеточной АТФ и антагонистов на созревании ооцитов свиньи *in vitro* [228]. Показано локализованное антиноцицептивное действие PPADS в экспериментах по изучению роли периферических пуринорецепторов в развитии ноцицепции, вызванной пчелиным ядом [166]. Показано, что ингибирующее влияние PPADS на P2-рецепторы при интрацеребровентрикулярном введении способствует восстановлению моторной функции при ишемии у крыс [161].

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, либо не проявляется вовсе, кроме того, наряду с другими антагонистами P2-рецепторов, PPADS угнетает активность экто-нуклеотидазы [249, 250]. В связи с этим не прекращаются исследования по поиску новых 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 установлена определенная взаимосвязь структуры и действия этих веществ на различные P2-рецепторы [8,10, 149]. Следует отметить, что большая часть исследований, касающихся активности аналогов PPADS, была проведена с азотсодержащими гетероциклами, модифицированными по азофенилсульфониевому фрагменту [86, 149]. Влияние модификации в пиридоксиновом фрагменте молекулы PPADS на проявления антагонистического действия в настоящий момент оценено 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 α,β -метилтен-АТФ, а также антагонизм в отношении расслабления изолированных гладкомышечных препаратов двенадцатиперстной кишки крысы, вызванных стимуляцией P2Y₁-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 А3.
8. Изучить анальгетическую активность соединения А3 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 А3) 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 P2Y₁-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 А3 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 А3 в отношении тромбоцитарных P2Y₁₂-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.

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.

Реализация результатов исследования

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»).

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)-фенилсульфокислоты натриевая соль (соединение А3) проявляет антагонизм по отношению к P2X-рецепторам гладкомышечных тканей и P2Y₁- и P2Y₁₂-рецепторам тромбоцитов, но не влияет на эффекты, опосредуемые P2Y₁-рецепторами гладкомышечных тканей, не изменяет активность экто-нуклеотидаз.

3. Соединение АЗ обладает антитромботической активностью, оказывает антиноцицептивное действие, не влияет на поведение и психоэмоциональное состояние животных.

Степень достоверности и апробация 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.

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), на третьей российской конференции медицинской химии (Казань, 2017).

Публикации

По теме диссертации имеется 9 публикаций, в том числе три статьи в журналах, рекомендуемых ВАК для публикации материалов диссертаций, 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.

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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. История и современное состояние проблемы

Известно, что основными нейромедиаторами периферической нервной системы являются ацетилхолин и норадреналин. Но с начала 60-х годов XX века начали появляться сведения о том, что АТФ также является одним из нейромедиаторов периферической и центральной нервной системы, и в настоящее время данный факт не вызывает сомнений [9, 72].

В 1972 году была выдвинута гипотеза пуринергической нейротрансмиссии, ставшая началом изучения биологической активности и физиологической роли внеклеточных пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Следующим шагом разработки концепции стала идентификация в различных тканях специфических рецепторов для пуринов, которые позже клонировали и охарактеризовали [191]. Нервы, выделяющие АТФ в качестве основного трансммиттера, назвали «пуринергическими», а рецепторы – «пуринорецепторами» [35, 36]. Установлено, что пурины и пиримидины участвуют не только в процессах нейротрансмиссии, нейромодуляции, хемоаттракции, агрегации тромбоцитов, но также задействованы в пролиферации, дифференциации, регенерации и гибели клеток [62]. Также известно, что АТФ высвобождается из различных типов клеток, в том числе астроцитов, макрофагов, остеобластов в ответ на механическое повреждение или в результате гипоксии [162, 163].

В настоящее время опубликовано множество работ, подтверждающих полноценность пуринергической теории [6, 7, 12]. Наиболее важным доказательством огромного значения данного открытия является внедрение в клиническую практику лекарственных средств, воздействующих на P2-рецепторы и успешно применяемых для лечения патологий сердечно-сосудистой системы [70, 72].

Таким образом, очевидно значение пуриновых нуклеотидов и нуклеозидов не только во внутриклеточных, но и во внеклеточных процессах.

1.2. Классификация и характеристика пуринорецепторов

1.2.1. Классификация пуринорецепторов

Основополагающим моментом всеобщего признания пуринергической нейротрансмиссии являются события 1990х годов, когда были клонированы и охарактеризованы рецепторы для пуринов и пиримидинов. Идентифицированы четыре подтипа P1-рецепторов (аденозиновых): A_1 , A_{2A} , A_{2B} и A_3 . P2-рецепторы разделили на два семейства: P2X и P2Y. P2X-рецепторы являются лиганд-оперирующими ионными каналами, регулируют вход в клетку ионов натрия, калия и кальция [36]. P2Y-рецепторы представляют собой метаботропные G-протеин-опосредованные рецепторы [35]. В семействе P2X выделяют семь подтипов рецепторов (P2X1-P2X7), в семействе P2Y – восемь подтипов (P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14}) [67].

1.2.2. Характеристика аденозиновых рецепторов

Аденозиновые рецепторы преимущественно связаны с активностью аденилациклазы. Стимуляция A_1 и A_3 рецепторов угнетает активность аденилатциклазы через α субъединицы Gi/o белка, стимуляция A_{2A} и A_{2B} – стимулирует активность через G_s [55]. Характеристика подтипов аденозиновых рецепторов представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Фармакологическая характеристика подтипов аденозиновых рецепторов (адаптировано из Burnstock, 2009)

Подтип рецептора	Локализация	Наиболее селективные	
		агонисты	антагонисты
A ₁	ЦНС, семенники, сердце, автономные нервные окончания	ССРА	DPCPX
A _{2A}	Головной мозг, сердце, легкие, селезенка, лейкоциты, тромбоциты	CGS21680	SCH58261
A _{2B}	Толстый кишечник, мочевого пузырь, гладкомышечные клетки сосудов	NECA (неселективный)	MRS1754
A ₃	Головной мозг, сердце, легкие, печень, семенники	2-CI-IB-MECA	MRE3008-F20

Различные фармакологические эффекты обусловлены разными подтипами аденозиновых рецепторов. В частности, стимуляция A₁-рецепторов вызывает седативный и противосудорожный эффект, отрицательный хронотропный, дромотропный и батмотропный эффекты. A₁-рецепторами также опосредуется расширение периферических сосудов, угнетение моторики ЖКТ и влияние на обмен веществ [108].

Агонисты A_{2A}-рецепторов являются потенциальными противовоспалительными средствами, также не исключается возможность их использования в лечении некоторых заболеваний ЦНС [115].

Агонисты A_{2B}-рецепторов являются потенциальными антиангинальными средствами, агонисты A₃-рецепторов возможными средствами для лечения онкологических и аутоиммунных заболеваний [80, 101].

Что касается антагонистов аденозиновых рецепторов, существует вероятность их использования для лечения заболеваний легких, а также создания новых анальгетических средств и средств для лечения болезни Паркинсона [55, 105, 137, 214].

Таким образом, аденозиновые рецепторы, наряду с P2-рецепторами, могут оказаться потенциальной мишенью воздействия лекарственных средств, но в настоящее время ни одно вещество, кроме аденозина, не имеет разрешения на клиническое применение.

1.2.3. Характеристика P2-рецепторов

P2X-рецепторы

P2X-рецепторы являются лиганд-оперирующими ионными каналами. Все подтипы P2X-рецепторов имеют сходную структуру, состоящую из двух трансмембранных доменов (TM1 и TM2): внеклеточной петли и внутриклеточных N- и C-концов. Различные подтипы рецепторов отличаются по проводимости кальция, чувствительности к агонистам, антагонистам и степени десенситизации [63, 70].

P2X-рецепторы образуют гомо- и гетеромультимеры, то есть ионный канал может быть образован как одним подтипом рецепторов, так и разными подтипами. Например, P2X_{1/2}, P2X_{2/3}, P2X_{4/6} и т.д. [156]. Разнообразие эффектов агонистов и антагонистов объясняется тем, что P2X-рецепторы могут контактировать с другими рецепторами и ионными каналами [89].

Фармакологическая характеристика рекомбинантных подтипов P2X рецепторов, экспрессированных на ооцитах или других типах клеток, обычно отличается от таковой нативных рецепторов по той причине, что как гетеромультимеры, так и гомомультимеры, так и сплайсированные варианты подтипов P2X рецепторов участвуют в образовании ионного канала [71]. Характеристика подтипов P2X-рецепторов представлена в таблице 2.

Таблица 2 – Фармакологическая характеристика подтипов P2X-рецепторов
(адаптировано из Burnstock, 2013)

Подтип рецептора	Локализация	Агонисты	Антагонисты
P2X1	Гладкие мышцы, тромбоциты, мозжечок, нейроны задних корешков спинного мозга	L- $\beta\gamma$ -meATФ $\geq\alpha,\beta$ -meATФ = ATФ = 2-MeSATФ	ТНФ-АТФ, ИФ ₅ И, NF023, NF449 RO 0437626, NF279, MRS2159
P2X2	Гладкие мышцы, ЦНС, хромаффинные клетки, сетчатка, вегетативные и чувствительные ганглии	ATФ \geq ATФ γ S \geq 2-MeSATФ $\gg\alpha,\beta$ -meATФ	Сурамин, RB2 NF770, изо-PPADS, NF778
P2X3	Сенсорные нейроны, некоторые симпатические нейроны	2-MeSATФ \geq ATФ $\geq\alpha,\beta$ -meATФ = Ar ₄ A	ТНФ-АТФ, изо-PPADS A317491, NF110, спинорфин, AF353
P2X4	ЦНС, семенники, толстый кишечник	ATФ $>\alpha,\beta$ -meATФ, ЦТФ	BBG, пароксетин, 5-BDBD, CORM 2
P2X5	Пролиферирующие клетки кожи, кишечника, мочевого пузыря, тимуса, спинного мозга	ATФ γ S Ar ₄ A ГТФ	Сурамин, PPADS, BBG
P2X6	ЦНС, двигательные нейроны спинного мозга	Не функционирует как гомомультимер	-
P2X7	Апоптотические клетки иммунной системы, поджелудочной железы, кожи и др.	BzATФ $>$ ATФ \geq 2-MeSATФ $>\alpha,\beta$ -meATФ	KN62, BBG, o-ATФ, декаванадат, A-804598, AZD-9056, AZ10606120, A740003, A-438079

Основные эффекты и особенности P2X-рецепторов

P2X1 рецепторы – сокращение гладкомышечных тканей при стимуляции и активирование тромбоцитов, угнетение сократительной активности при их блокаде; быстрая десенситизация [199].

P2X2 рецепторы – передача афферентных импульсов, модуляция синаптической передачи, выраженная чувствительность к рН и ионам Zn^{2+} . Установлено, что этот вид рецепторов взаимосвязан с серотониновыми и Н-холинорецепторами, что имеет значение в модуляции выхода нейромедиаторов в ЦНС [196].

P2X3 рецепторы – также передача афферентных импульсов, увеличение выделения глутамата в ЦНС, участие в системе восприятия боли; быстрая десенситизация [88, 168, 174, 252].

P2X4 рецепторы наиболее широко представлены в ЦНС. Участвуют в обеспечении быстрой синаптической передачи и модуляции воспалительной и нейропатической боли [102, 213].

P2X5 рецепторы участвуют в ингибировании процесса пролиферации и повышения дифференцировки клеток, в частности активации Т-клеток и иммунорегуляции [33].

P2X6 рецепторы функционируют только в виде гетеромультимеров с другими подтипами рецепторов [227].

P2X7 рецепторы – стимуляция апоптоза, пролиферации клеток, противовоспалительного высвобождения цитокинов [45, 46, 47, 171].

P2Y-рецепторы

P2Y-рецепторы представляют собой G-протеин-опосредуемые рецепторы, содержащие 7 трансмембранных доменов. P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, и P2Y₁₁ формируют кластер G_q-опосредованных рецепторов. P2Y₁₂, P2Y₁₃ и P2Y₁₄ формируют кластер G_i-опосредованных рецепторов [53]. P2Y-рецепторы могут формировать гомодимеры или гетеродимеры с другими P2Y рецепторами или с другими видами рецепторов [96].

Отсутствие последовательности в нумерации подтипов P2Y рецепторов объясняется тем, что некоторые подтипы были исключены из классификации в виду их недостаточной функциональной активности или аналогичности уже существующим [68]. Характеристика подтипов P2Y рецепторов представлена в таблице 3.

Таблица 3 – Фармакологическая характеристика подтипов P2Y-рецепторов (адаптировано из Burnstock, 2013)

Подтип рецептора	Локализация	Агонисты	Антагонисты
P2Y ₁	Эпителиальные и эндотелиальные клетки, тромбоциты, иммунные клетки, остеокласты, мозг	MRS2365>2-MeSADФ >> АДФβS>АТФ>2-MeSATФ=АДФ	MRS2500>MRS2279 > MRS2179, PIT, АЗР5Р
P2Y ₂	Иммунные клетки, эпителиальные и эндотелиальные клетки, почечные каналы, остеобласты	2-тио-УТФ>УТФ, MRS2698≥АТФ, INS 365> INS 37217, УТФγS>Ap ₄ A>MRS 2768	AR-C126313> сурамин>RB2, PSB-716
P2Y ₄	Эндотелиальные клетки, плацента, селезенка, тимус	2'-азидо-dУТФ>УТФγS, УТФ≥АТФ≥ Ap ₄ A Up ₄ U	АТФ>реактив синий 2>сурамин, PPADS

Продолжение таблицы 3

P2Y ₆	Дыхательные пути, эпителиальные клетки кишечника, плацента, Т-клетки, тимус	MRS2693>УДФβS , PSB0474> INS48823, 3-фенацил-УДФ>>УДФ>УТФ>>АТФ, α,β-meУДФ	MRS2578>реактивсиний 2, PPADS, MRS2567, MRS2575
P2Y ₁₁	Селезенка, кишечник, гранулоциты	АТФγS>AR-C67085MX>BzАТФ≥ АТФ, NF546, NAD ⁺ , NAADP ⁺	NF157>сурамин>RB 2, 5'-AMФS, NF340, AMФ-α-5
P2Y ₁₂	Тромбоциты, глиальные клетки	2-MeSADФ≥АДФ>АТФ, АДФ-β-S	AR-C69931MX> AZD6140, INS50589>RB2>2-MeSAMФ, AR-C66096, MRS2395, AR-C67085
P2Y ₁₃	Селезенка, головной мозг, лимфатические узлы, костный мозг, эритроциты	АДФ=2-MeSADФ>2-MeSATФ, АТФ	AR-C69931MX>AR-C67085>MRS2211, 2-MeSAMФ
P2Y ₁₄	Плацента, жировая ткань, желудок, кишечник, определенные отделы головного мозга, тучные клетки	MRS2690>УДФ>УДФ - глюкоза≥ УДФ-галактоза, УДФ-глюкозамин	

Основные эффекты и особенности P2Y-рецепторов

P2Y₁-рецепторы участвуют в регуляции сосудистого тонуса, при этом возможно как развитие вазоконстрикции, так и вазодилатации. Также данные рецепторы, локализованные на мембране тромбоцитов, принимают участие в процессе агрегации, что связано с увеличением концентрации внутриклеточного кальция [27, 76, 77]. Кроме того, P2Y-рецепторы принимают участие в

аутокринной регуляции β -клеток [219], расслаблении гладких мышц, регуляции температурной чувствительности кожи [186].

$P2Y_2$ – уменьшение хемотаксиса нейтрофилов, уменьшение инфильтрации эозинофилов в дыхательные пути при астме [223], увеличение реабсорбции ионов натрия почками, участие в процессе минерализации костей [200, 239].

$P2Y_4$ – секреция ионов хлора эпителием [103, 209].

$P2Y_6$ – уменьшение микроглиального фагоцитоза, уменьшение воспалительных явлений в сосудах и легких [118, 201, 208], участие в процессах костной резорбции [198].

$P2Y_{11}$ – становление и миграция дендритных клеток, дифференцировка гранулоцитов [194].

$P2Y_{12}$ – агрегация тромбоцитов, дегрануляция гранулоцитов [14, 85, 210].

$P2Y_{13}$ – ремоделирование костей, регулирование обмена глюкозы и холестерина [203, 230].

$P2Y_{14}$ – хемоаттракция рецепторов гемопоэтических стволовых клеток, активация дендритных клеток [61].

1.3. Агонисты P2-рецепторов

Практически для всех подтипов P2-рецепторов основным эндогенным агонистом является АТФ (для некоторых подтипов P2Y-рецепторов – АДФ). Другие эндогенные нуклеотиды, такие как УТФ, УДФ, УДФ-глюкоза, УДФ-галактоза и УДФ-глюкозамин – эффективные агонисты для некоторых подтипов P2Y-рецепторов, но не проявляют активности для P2X [133].

Неселективные агонисты P2-рецепторов

Аденозин-5'-О-(3-тиотрифосфат) (АТФ γ S) относительно более устойчив к ферментативному распаду эндонуклеотидазами благодаря наличию тиофосфатных групп, активирует как P2X, так и P2Y-рецепторы.

3'-О-(4-бензоил)бензоил АТФ (BzATP) является агонистом как P2X, так и P2Y рецепторов. В астроцитах мозжечка BzATP не только стимулирует выход

ионов кальция из внеклеточного пространства, но также мобилизует Ca^{2+} из внутриклеточного депо [220].

2-метилтио-АТФ (2-MeSATФ) также является сильным агонистом как для P2X, так и для P2Y рецепторов [227].

Агонисты P2X-рецепторов

Разработка специфичных к подтипам агонистов P2X-рецепторов вызывает определенные сложности. Существующие в настоящее время агонисты являются аналогами АТФ с различной эффективностью и селективностью действия.

α,β -метилен АТФ и *$\beta\gamma$ -метилен АТФ* – аналоги АТФ, где связующий атом кислорода замещен метиленовой группой. Эти аналоги более стабильны, чем АТФ, не активируют P2Y-рецепторы, селективны по отношению к P2X1 и P2X3 гомомерным и гетеромерным рецепторам и служат в качестве радиолигандов для них [79].

Агонисты P2Y-рецепторов

Модификация фосфатных групп среди лигандов P2Y рецепторов привела к разработке энзиматически устойчивых агонистов. В частности, *АТФ βS* является эффективным агонистом для P2Y₁ и P2Y₁₂ рецепторов, тем не менее, тиофосфаты подвергаются реакциям окисления, что уменьшает их стабильность [137].

В настоящее время наиболее эффективным и селективным агонистом P2Y₁ - рецептора является производное 2-MeSADP – *MRS2365* [154]. Кроме того, проведены исследования соединения *2-Cl-ADP(α -BH3)*, проявившего свойства сильного агониста P2Y₁-рецепторов со стабильной концентрацией в сыворотке ($T_{1/2} = 7\text{ч}$) [40].

Для P2Y₂-рецептора одними из самых эффективных и селективных агонистов являются *2-тио-УТФ* и *4-тио- β,γ -дифторметиленУТФ* [98, 99]. *2'-амино-2'-деокси-2-тиоуридин 5'-трифосфат (MRS 2698)* – высокоэффективный и селективный агонист P2Y₂ рецепторов, имеющий важное значение для изучения их активности [127]. Среди 5'-тетрафосфатов умеренной эффективностью и достаточной стабильностью в отношении P2Y₂-рецепторов обладает *уридин-5'-тетрафосфат δ -фенил эфира тетранатриевая соль (MRS 2768)* и *Up(4)a* [122,

138, 153]. Агонисты P2Y₂-рецептора *INS 365* (диквафозол) и *INS 37217* (денуфозол) обладают оптимальной длиной фосфатной цепочки и большей устойчивостью к нуклеотидазам [97, 155].

Показано, что *УТФγS* и *УДФβS* являются селективными агонистами для P2Y₂/P2Y₄ и P2Y₆-рецепторов, соответственно [50]. *2'-азидо-2'-деоксиуридин-5'-трифосфат* обладает высокой агонистической активностью в отношении P2Y₄-рецепторов [137]. Имеются данные о селективном антагонисте P2Y₄-рецепторов – N(4)-(феноксипропокси)-ЦТФ – *MRS4062* [126, 176].

MRS 2693, 5-йодопроизводное пиримидина, обладает наиболее высокой эффективностью и селективностью в отношении P2Y₆-индуцированного апоптоза [118]. Новое нуклеотидное производное, *Rp-5-OMe-UDPaB*, высокоэффективно в отношении P2Y₆-рецепторов человека, и может рассматриваться как основа для лекарственных средств с нейропротективными свойствами [117].

В отношении P2Y₁₁-рецепторов человека выраженной эффективностью обладают вещества *NAD⁺* и, особенно, *AR-C67085MX*, аналог 2-пропилтио-βγ-дихлорометилен-D-АТФ [193, 227], но *AR-C67085MX* обладает антагонистической активностью в отношении P2Y₁₂. Относительной эффективностью обладает ненуклеотидный агонист *NF 546*, стимулирующий высвобождение интерлейкина-8 из дендритных клеток человека моноцитарного происхождения [181].

Для P2Y₁, P2Y₁₂ и P2Y₁₃ более активным является *2-метилтио-АДФ* (*2-MeSADP*) [134].

Для P2Y₁₄-рецепторов наибольшей активностью и стабильностью обладает аналог УДФ-глюкозы, *MRS 2690* [37, 111, 112].

1.4. Антагонисты P2-рецепторов

Несмотря на значительное количество синтезированных и исследованных антагонистов P2-рецепторов, каждый из них обладает определенными недостатками, в частности недостаточной селективностью или эффективностью

антагонизма, или же оказывает значительное влияние на активность эктонуклеотидаз.

Неселективные антагонисты P2-рецепторов

Один из наиболее распространенных антагонистов P2 рецепторов – *сурамин* является сложной полисульфонирующей молекулой с широким спектром биологической активности. Но ни он, ни его аналог *NF023* не проявляют специфичности по отношению к подтипам P2-рецепторов [78]. Существуют другие укороченные формы сурамина. Например, *NF279*, наиболее активен в отношении P2X1 рецепторов, но незначительно воздействует на P2Y рецепторы и эктонуклеотидазы. *NF 157* проявляет антагонистическое действие по отношению к P2X1 и P2Y₁₁ рецепторам [222]. *NF449* обладает антагонистической активностью по отношению как к P2X, так и к P2Y рецепторам, а также к рецепторам фактора роста фибробласта [92, 157].

Реактив синий -2 (RB2), производное антрахинонсульфаниловой кислоты, является неселективным антагонистом P2-рецепторов. На проявление его антагонистического эффекта значительное влияние оказывают концентрация препарата и время его использования [137].

Антагонисты P2X-рецепторов

Тринитрофенил-АТФ (ТНФ-АТФ) и его ди- и монофосфатные производные конкурентно ингибируют P2X1, P2X3 и P2X2/3 в наномолярных концентрациях, быстро разлагаются эктонуклеотидазами [121]. *Диинозин полифосфат (Ip5I)* блокирует P2X1 при наномолярных концентрациях [160, 236]. Соединение *Ro-0437626* приблизительно в 30 раз селективнее в отношении P2X1 рецепторов по сравнению с другими подтипами [128].

MRS 2159, аналог PPADS, высокоселективен по отношению к P2X1 рецепторам и устойчив к эктонуклеотидазе, но он проявляет антагонизм и в отношении P2X7 рецепторов [92].

NF770 и *NF778* являются антагонистами P2X2 рецепторов также в наномолярных концентрациях [237]. Антрахиноновое производное *PSB-1011* является селективным антагонистом P2X2 рецепторов [42].

Ненуклеотидный антагонист P2X3 рецепторов, *NF 110*, использовался при изучении нейрональных P2X3 рецепторов. Показано, что он не обладает высокой селективностью, так как способен блокировать P2X1 рецепторы [120].

Диаминопиримидин *AF353* является высокоэффективным антагонистом рекомбинантных P2X3 рецепторов крысы и человека и P2X2/3 рецепторов человека. Фармакокинетические и фармакодинамические свойства данного соединения позволяют использовать его в исследованиях *in vivo* [113].

A-317491 – ненуклеотидный эффективный и высокоселективный антагонист P2X3 и P2X2/3 рекомбинантных и нативных рецепторов. По данным существующих исследований установлено, что данное соединение уменьшает боль, вызванную повреждением нерва и хроническую воспалительную реакцию, но неэффективен при острой боли [246]. Тем не менее, *A-317491* обладает высокой степенью связывания с белками (>99,9%) и незначительную биодоступность *per os*, что ограничивает возможность его использования в экспериментах *in vivo* [238].

Спинорфин, эндогенный антиноцицептивный пептид, является эффективным неконкурентным антагонистом рекомбинантных P2X3 рецепторов человека, экспрессированных на ооцитах *Xenopus* [143].

Бриллиантовый синий G (BBG) является слабым антагонистом P2X4 рецепторов, большую активность проявляет по отношению к P2X7 рецепторам, но его эффект зависит от концентрации и медленно обратим. К тому же, эффективность на рецепторах человека намного меньше, чем на рецепторах крысы [140].

5-(3-бромфенил)-1,3-дигидро-2H-бензофуоро[3,2-е]-1,4-дiazепин-2-он (5BDBD) блокирует P2X4 рецепторы, экспрессированные на клетках яичника хомячка ($IC_{50} = 0.5 \mu M$), что дает надежду на проявление анальгетического эффекта антагонистов P2X4 рецепторов при нейропатической боли и воспалительной реакции [91].

Недавние исследования также предположили возможную роль некоторых серотонинергических антидепрессантов в качестве антагонистов P2X4

рецепторов. В частности, пароксетин проявляет антагонистический эффект при $IC_{50}=2,5\mu M$ на рецепторах крысы и $IC_{50}=1,9\mu M$ на рецепторах человека [188].

Трикарбонилдихлорорутений (II) димер (CORM-2) является эффективным, обратимым, неконкурентным антагонистом рекомбинантных P2X4 рецепторов человека и имеет значение для их изучения и разработки нового класса антагонистов [235]. Оксидазная форма АТФ (*o*-АТФ) предложена в качестве селективного блокатора P2X7 рецептора [131].

Антагонизмом в отношении P2X7 рецепторов человека обладает производное изохинолина, *KN 62*, ингибитор Ca^{2+} /кальмодулин зависимой протеинкиназы II [151]. Также антагонистический эффект в субмикромольных концентрациях проявляют соединения *A438079* на рецепторах человека, мыши и крысы, селективный и конкурентный *A740003*, и *AZ10606120*, у которого предполагается аллостерический механизм действия. В низких наномольных концентрациях сходным эффектом обладает *A-804598* [92, 93, 183, 190, 241]. *GW791343* является неконкурентным антагонистом P2X7-рецепторов человека [184]. Также новыми селективными антагонистами P2X7 являются соединения *JNJ-42253432*, увеличивающее уровень серотонина в мозге крысы и снижающее гиперактивность, вызванную амфетамином [170] и соединение *JNJ-47965567*, использование которого возможно в патофизиологии ЦНС на модели грызунов [52].

Активность эффективного, селективного перорально биодоступного антагониста P2X7-рецепторов, *AZD9056* оценивалась в ряде рандомизированных двойных слепых плацебо-контролируемых клинических исследований фазы IIa и IIb у пациентов с ревматоидным артритом, получавших метотрексат или сульфасалазин. Но значительная эффективность данного соединения в лечении заболевания не была выявлена [100, 146].

Декаванадат в большей степени блокирует P2X7 рецепторы, но также активен в отношении P2X2 и P2X4. Являясь обратимым конкурентным антагонистом, декаванадат широко используется при изучении механизмов взаимодействия лигандов с P2X7 рецепторами [182].

Лидокаин ингибирует функцию P2X7 рецепторов, экспрессированных на ооцитах *Xenopus*. Этот эффект может быть обусловлен действием на поры ионных каналов как вне- так и внутриклеточно [195].

Антагонисты P2Y-рецепторов

Одним из первых антагонистов P2Y₁ рецепторов был *A3P5P*, но вскоре появились более эффективные и селективные антагонисты, оказавшиеся стабильнее фосфатов в условиях биологической системы – бисфосфатные соединения: *MRS2500*, *MRS2179* [207] и *MRS2279* [57]. Дальнейшие исследования показали, что эффективность этих соединений увеличивается при модификации аденинового остатка в положении 2 [148, 177]. А *MRS 2500* проявляет наиболее сильный антагонизм в отношении P2Y₁-рецепторов на тромбоцитах человека – ингибирует АДФ-индуцированную агрегацию [74].

Интересно действие тозилата 2-(2-пиридинил)-(3h)-индол-3-он-1-оксида (*PIT*) – избирательный, неконкурентный, зависимый от концентрации антагонизм в отношении P2Y₁-рецепторов, не затрагивающий нуклеотидную связь [110].

Значительный интерес представляет новый антагонист P2Y₁-рецепторов, соединение *Sbt-119*, проявляющее выраженное антиагрегантное действие, по некоторым показателям превосходящее тиклопидин и клопидогрел. В частности, в сравнении с тиклопидином, данное вещество достоверно увеличивало время наступления окклюзии на 7,8-8,8% [2, 21].

Имеются некоторые данные о селективном гетероциклическом антагонисте P2Y₂ рецепторов – *AR-C126313*, содержащем тиюрацильный остаток [179]. Комбинаторный синтез анилинантрахиноновых производных привел к открытию *PSB-716*, производного реактива синего-2, сильного антагониста P2Y₂ рецепторов в микромолярных концентрациях [233].

Соединения *MRS2567*, *MRS2578* являются антагонистами P2Y₆ рецепторов крысы и человека, а *MRS2575* селективен только для P2Y₆ рецепторов человека. По всей вероятности, в антагонистическом эффекте трех данных соединений играет роль изотиоцианатная группа [167, 172].

Конкурентный антагонист *NF340* в четыре раза более активен, чем *NF157* в отношении $P2Y_{11}$ нативных и рекомбинантных рецепторов.

Соединения *PY-722* и *PY-286* обладают выраженными антиагрегантными свойствами, по влиянию на агрегацию превосходят тиклопидин, но уступают клопидогрелю, оба соединения увеличивают выживаемость животных на модели генерализованного адреналин-коллагенового тромбоза. Соединение *PY-286* в концентрации 10^{-6} – 10^{-4} М достоверно ингибировало агрегацию тромбоцитов, индуцированную 200 нМ АДФ. В условиях *in vitro* соединение *PY-286* эффективно подавляет функциональную активность тромбоцитов путем блокирования $P2Y_{11}$ - и $P2Y_{12}$ -подтипов рецепторов [25]. Выраженные антиагрегантные и антитромботические свойства позволяют рассматривать данные соединения в качестве основы для создания новых лекарственных средств [29, 32].

Аналоги АДФ, AR-C соединения были разработаны как потенциальные антитромботические средства. В частности, *AR-C69931MX* (*кангрелор*) проявляет антагонистическое действие в отношении $P2Y_{12}$ и $P2Y_{13}$ рецепторов [109, 175]. Кангрелор принадлежит к семейству аналогов АДФ, относительно устойчив к эндонуклеотидазам. Является мощным ингибитором АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов человека. Не требует превращения в активный метаболит, активен непосредственно после внутривенного введения, имеет период полужизни от 3 до 6 минут.

Тикагрелор (*AZD6140*) принадлежит к новому классу химических соединений циклопентилтриазолопиримидины и является селективным и обратимым антагонистом $P2Y_{12}$ -рецептора к АДФ и может предотвращать АДФ-опосредованную активацию и агрегацию тромбоцитов [75].

Элиногрел (*PRT060128*) является прямым и обратимым антагонистом $P2Y_{12}$ рецепторов. Отличается возможностью внутривенного и перорального введения [54, 218].

Ациклический аналог аденозина бисфосфата, *MRS 2395*, является достаточно слабым антагонистом $P2Y_{12}$ рецепторов [226]. 2-хлоро-5-нитро аналог

PPADS, *MRS 2211*, также является конкурентным антагонистом P2Y₁₃ рецепторов, в 45 раз активнее PPADS [150]. Производное АМФ *INS50589* также является эффективным конкурентным антагонистом P2Y₁₂ рецепторов [94].

В отношении P2Y₁₄-рецепторов избирательные антагонистические свойства проявляет соединение *PPTN*, производное нафтенной кислоты [44].

Несмотря на различия в строении молекул P2-антагонистов, для нашего исследования мы выбрали PPADS и его производные, так как значительная часть веществ, обладающих антагонистической активностью, имеет в своей структуре азотсодержащий гетероцикл.

1.5. Антагонистическое действие PPADS в отношении P2-рецепторов

Несмотря на достаточное большое количество исследований, проведенных с целью изучения антагонистических свойств различных веществ в отношении P2-рецепторов, одной из самых сложных задач является разработка вещества, которое бы полностью соответствовало всем необходимым фармакологическим критериям. К настоящему моменту наиболее широко используемым, эталонным антагонистом является пиридоксальфосфат-6-азофенил-2',4'-дисульфоновой кислоты (PPADS).

Впервые антагонистическую активность PPADS по отношению к P2-рецепторам установил Lambrecht в 1992 году. Cookson впервые занялся коммерческим синтезом этого вещества [106].

Установлено, что на изолированных тканях мочевого пузыря кролика PPADS (1-30 мМ) угнетает сократительные ответы, вызванные агонистом P2X-рецепторов α,β -метилен-АТФ и стимуляцией электрическим полем в присутствии холино- и адреноблокаторов. PPADS вызывает концентрационно-зависимое угнетение P2X-рецептор-опосредованных сокращений, сдвигая кривые концентрация-ответ и частота-ответ вправо [247].

Аналогичные результаты получены на центральной артерии уха и бедренной артерии кролика, где PPADS также концентрационно-зависимо угнетает P2X-рецептор-опосредованные сокращения, как при введении экзогенного агониста, так и при пуринергической нервной стимуляции. Немаловажен тот факт, что PPADS существенно не влияет на сократительные ответы изолированных артерий кролика, вызванные норадреналином или гистамином.

В концентрации 30 μ M PPADS влияет на P2Y-рецептор-опосредованное расслабление аорты кролика, ненамного, но достоверно угнетает эти ответы [248].

В последующем было показано, что высокие концентрации PPADS угнетают расслабления продольного тяжа слепой кишки морской свинки, вызванные АТФ и опосредуемые P2Y-рецепторами [15].

В настоящее время PPADS широко используется в различных исследованиях. В частности, данное соединение используется в качестве антагониста P2-рецепторов при изучении влияния АТФ на механическую чувствительность мышечных афферентных волокон крысы [178], в экспериментах, доказывающих наличие пиримидинергической трансмиссии в мозге крысы [73], при изучении влияния внеклеточной АТФ и антагонистов на созревание ооцитов свиньи *in vitro* [228]. Показано локализованное антиноцицептивное действие PPADS в экспериментах по изучению роли периферических пуринорецепторов в развитии ноцицепции, вызванной пчелиным ядом [166]. Показано, что ингибирующее влияние PPADS на P2-рецепторы при интрацеребровентрикулярном введении способствует восстановлению моторной функции при ишемии у крыс [161].

Таким образом, известно, что PPADS является активным антагонистом P2-рецепторов, проявляющим селективность по отношению к P2X-рецепторам в концентрациях до 10 μ M, что, однако, является недостаточным и стимулирует поиск лучшего соединения среди его производных.

Тем не менее, молекулярная структура PPADS может рассматриваться в качестве основы для синтеза новых, структурно аналогичных веществ, некоторые

из которых способны стать эффективными и высокоселективными антагонистами P2-рецепторов.

В настоящее время соединение широко используется как высокоактивный неселективный антагонист P2-рецепторов и производится в коммерческих масштабах в Великобритании и США такими крупными химическими компаниями как Sigma-Aldrich, RBI, Tocris Cookson.

1.6. Метаболизм внеклеточных нуклеотидов

Известно, что АТФ не способна проникать через мембрану клетки путем простой диффузии. Ее разрушение обеспечивается ферментной системой, находящейся на поверхности клетки. В метаболизме внеклеточных нуклеотидов принимает участие большое количество ферментов, объединенных общим названием экто-нуклеотидазы, куда относятся семейства нуклеотид-трифосфат-дифосфогидралаз (НТДФаз), нуклеотид-пирофосфатаз/фосфодиэстераз (НПФаз), 5'-нуклеотидаза и щелочная фосфотаза [243].

К НТДФазам относится восемь ферментов, из которых четыре типа являются экзо-ферментами, а другие четыре – экто-ферментами. Экто-НТДФазы участвуют в превращении трифосфата в монофосфат, при этом для проявления активности необходимым условием является присутствие ионов Ca^{2+} или Mg^{2+} . Разные подтипы экто-энзимов имеют различную эффективность в отношении нуклеотидов [242].

К НПФазам относится семь подтипов ферментов, но только три экто-энзима принимают непосредственное участие в процессе пуринергической нейротрансмиссии. Ферменты этого семейства не обладают высокой специфичностью и участвуют в расщеплении пирофосфатных и фосфодиэстеразных связей у большого количества различных соединений, таких как три- и дифосфонуклеотиды, нуклеиновые кислоты и др. [187].

Снижение активности экто-нуклеотидаз приводит к уменьшению скорости распада АТФ, а сила и продолжительность действия АТФ на рецептор увеличивается. Увеличение активности фермента уменьшает влияние АТФ на рецептор [43]. Многие вещества, влияющие на P2-рецепторы, уменьшают активность этого фермента, что уменьшает их значимость, и наиболее желательным является отсутствие влияния на экто-нуклеотидазы.

Учитывая этот факт, важно исследовать новые соединения, потенциальные агонисты и антагонисты P2-рецепторов, в отношении их влияния на активность экто-нуклеотидаз, что обеспечит корректность интерпретации результатов исследования.

1.7. Перспективы и клиническое значение исследования P2-рецепторов

За последние десятилетия, безусловно, наметился прогресс в исследовании агонистов и антагонистов P2-рецепторов. Наблюдается всевозрастающий интерес к патофизиологии и терапевтическому потенциалу пуринергической нейротрансмиссии. Тем не менее, все еще существует необходимость разработки новых веществ, избирательно активных в отношении этих рецепторов как *in vivo*, так и *in vitro*. В настоящий момент не имеется достаточного количества соединений, избирательно активных в отношении определенных видов P2-рецепторов и пригодных для широкого использования в экспериментальной фармакологии.

Достижением в фармакологии P2-рецепторов является разработка и внедрение в клиническую практику препарата *клопидогрел*, антагониста P2Y₁₂ тромбоцитарных рецепторов, эффективность и безопасность которого подтверждена множеством клинических исследований [51, 180, 231]. Клопидогрел является пролекарством, один из активных метаболитов которого ингибирует агрегацию тромбоцитов – замедляет связывание АДФ с P2Y₁₂-рецептором и последующую АДФ-опосредованную активацию комплекса GPIIb/IIIa, приводя к подавлению агрегации тромбоцитов. Клиническими

областями применения препарата являются: профилактика атеротромботических нарушений у больных, перенесших инфаркт миокарда и ишемический инсульт, у больных с заболеваниями периферических артерий и атеротромбозом магистральных сосудов; острый коронарный синдром с подъемом и без подъема сегмента ST в комбинации с ацетилсалициловой кислотой; состояния после стентирования и баллонной дилатации. Препарат не лишен недостатков, в частности, имеются данные о наличии резистентности у 20-45% пациентов, в зависимости от категории больных и метода лечения. Наличие резистентности чаще встречается у пациентов, страдающих ожирением и гиперлептинемией [90]. Преодолеть устойчивость к препарату возможно при использовании более высоких доз, от 150мг/сут [30].

Еще один представитель тиенопиридинов, препарат *празугрел*, обладает улучшенной фармакокинетикой и фармакодинамикой. Существенным преимуществом препарата является более быстрая метаболическая активация – процесс угнетения агрегации тромбоцитов начинается уже через 30 минут после приема [13]. По данным проведенных недавно исследований установлено, что празугрел обладает большей эффективностью по сравнению с клопидогрелом у пациентов, перенесших инфаркт миокарда и у пациентов с острым коронарным синдромом с подъемом сегмента ST, перенесших чрескожное коронарное вмешательство [107, 116, 197].

Кроме того, внедрен в клиническую практику препарат *тикагрелор*, активный при приеме внутрь и обратимо взаимодействующий с P2Y₁₂-АДФ-рецептором тромбоцитов [39]. Тикагрелор назначается два раза в сутки, что связано с относительно коротким периодом полувыведения (12 ч). По сравнению с клопидогрелом, тикагрелор обладает более быстрым началом действия, а также более выражено ингибирует агрегацию тромбоцитов. По данным крупного исследования PLATO (Platelet inhibition and patient outcomes), в котором сравнивались эффективность и безопасность применения тикагрелора по сравнению с клопидогрелом у больных с ОКС, выявлено, что тикагрелор эффективнее клопидогрела у пациентов с острым коронарным синдромом и не

увеличивает риск кровотечения, так как восстановление функции тромбоцитов происходит быстрее [229]. Уникальные плеоморфные свойства препарата вполне привлекательны для будущих исследований подобных веществ [82]. В настоящее время празугрел и тикагрелор рекомендованы в качестве препаратов первой линии при лечении острого коронарного синдрома с подъемом сегмента ST или без него [212].

Кроме того, проводятся углубленные исследования *кангрелора* – сильного, обратимого ингибитора агрегации тромбоцитов. Действие кангрелора быстрое, но непродолжительное, что имеет важное значение в экстренных ситуациях. По сравнению с абциксимабом препарат существенно реже вызывает тромбоцитопению [205].

Получено новое соединение тиенопиридинового ряда – *викагрель*, и, по данным последних исследований, он имеет серьезные перспективы как более мощный и более безопасный антитромбоцитарный агент, который может иметь следующие преимущества по сравнению с клопидогрелом: быстрое преобразование эстеразами вместо цитохрома P450 (CYPs), что позволит преодолеть устойчивость; меньшая дозозависимая токсичность, что связано с намного более низкой терапевтической дозой, и более быстрое начало действия [206, 216].

Одно из последних исследований ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов проводилось в Китае. Целью исследования было изучение влияния ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов на реактивность тромбоцитов у пациентов с острым коронарным синдромом, перенесших чрескожное коронарное вмешательство, а также предоставление клинических данных о пероральных ингибиторах P2Y₁₂-рецепторов у китайских пациентов. Степень ингибирования тромбоцитарной реактивности существенно отличалась у пациентов, получавших клопидогрел, празугрел и тикагрелор. Процент ингибирования, проанализированный с помощью системы VerifyNow, составил 28.2%±23,5%, 61.4%±26,7% и 81,3%±19,8% соответственно (p <0,05). Агрегация тромбоцитов значительно

снизилась у пациентов, перешедших с клопидогреля на празугрел или тикагрелор ($p < 0,05$) [83].

Среди агонистов P2Y-рецепторов следует обратить внимание на препарат диквафосол – агонист P2Y₂-рецепторов, способствующий выработке внутриглазной жидкости и муцина. В настоящее время диквафосол одобрен для применения в Японии при лечении синдрома сухого глаза. Эффект 3% раствора препарата сохраняется длительно. В целом препарат хорошо переносится, практически не вызывая побочных эффектов [145]. Кроме того, по результатам недавних исследований установлено, что диквафосол также способствует устранению сухости глаза после оперативного лечения катаракты, а также может успешно применяться в комплексной терапии глаукомы [41, 141]. В недавних исследованиях оценивалась эффективность диквафозола по сравнению с циклоспорином А у пациентов, перенесших хирургическое лечение катаракты, страдающих синдромом сухого глаза. Установлено, что диквафосол проявляет большую эффективность в отношении увеличения секреции слезной жидкости [165]. Также известно, что применение 0,1% раствора гиалуроновой кислоты совместно с диквафосолом увеличивает эффективность последнего [125].

Наличие P2-рецепторов, потенциальной мишени фармакологического воздействия, установлено во множестве тканей и органов. В частности, пуринергический компонент парасимпатической котрансмиссии во время интерстициального цистита увеличивается на 40% [64]. Исследуется возможность применения пуринергической нейротрансмиссии в процессах клеточной пролиферации, миграции и апоптоза [104], разрабатываются пуринергические соединения для лечения диабета [68]. Сообщалось об участии пуринергической сигнализации в развитии костей и регенерации. Проводится исследование антагонистов P2X₇ рецепторов для лечения остеопороза [34]; антагонистов P2X₃ рецепторов для лечения воспалительных заболеваний кишечника [245]. Появились исследования, в которых аналоги АТФ применяются для терапии ВИЧ-инфекции [189]. Обсуждается и исследуется возможность применения антагонистов P2-рецепторов для облегчения нейропатической боли и артрита

[221, 224], лечения заболеваний легких [185], лечения нарушений ЦНС, таких как болезнь Альцгеймера, Паркинсона, эпилепсии и других заболеваний [65]. Также сообщалось о возможности разработки средств – антагонистов P2Y₁ и P2Y₂ рецепторов для лечения онкологических заболеваний [60, 234]. Агонисты и антагонисты P2-рецепторов влияют на заживление ран роговицы, образование слезной жидкости, уровень внутриглазного давления, а также на физиологические и патологические процессы в других органах чувств [16, 59, 66].

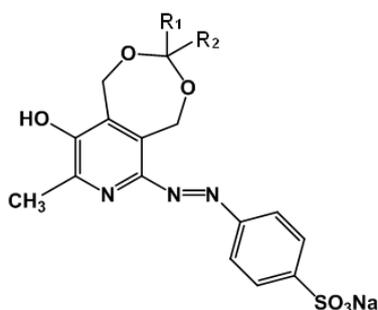
Таким образом, исследование P2-рецепторов имеет непосредственное клиническое значение. Очевидно, что исследование агонистов и антагонистов P2-рецепторов особенно перспективно.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Общая характеристика новых исследуемых соединений

Материалом исследования являлись 2 класса новых химических соединений – азофенилсульфонаты и азофенилдисульффонаты натрия на основе семичленных ацеталей пиридоксина. Всего исследовано 15 веществ. Соединения были синтезированы в Научно-образовательном центре фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета под руководством д.х.н., доцента Ю.Г. Штырлина¹. Структура соединений представлена в Таблицах 4 и 5 и Рисунках 1 и 2. Методы синтеза соединений и их свойства описаны в патентах на изобретение №РФ2554883 и №РФ2554885.

Таблица 4 – Химическая структура исследованных аналогов PPADS (азофенилсульфонаты натрия)



Номер соединения	R ₁	R ₂	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 ₃	п-(1,5-Дигидро-3,8-диметил-9-гидрокси-[1,3]диоксепино [5,6-с]пиридинил-6-азо)фенилсульфонат натрия

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

Продолжение таблицы 4

A3	CH ₃	CH ₃	п-(1,5-Дигидро-3,3,8-триметил-9-гидрокси-[1,3]диоксепино[5,6-с]пиридинил-6-азо)фенилсульфонат натрия
A4	H	C ₂ H ₅	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 ₃) ₂	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 ₇ H ₁₅	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 ₈ H ₁₇	п-(1,5-Дигидро-3-октил-8-метил-9-гидрокси-[1,3]диоксепино [5,6-с]пиридинил-6-азо)фенилсульфонат натрия

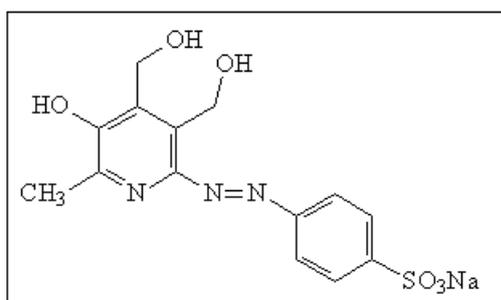


Рисунок 1 – Соединение А8– п-[3,4-дигидроксиметил-5-гидрокси-6-метилпиридил-2-азо]фенилсульфонат натрия

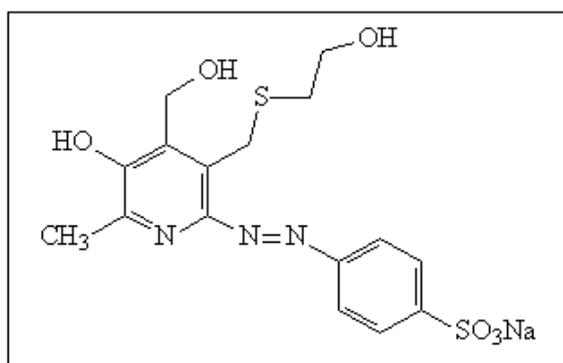
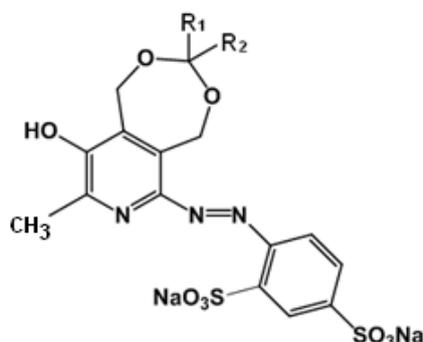


Рисунок 2 – Соединение А9– n-[3-(((2-гидроксиэтил)тио)метил)-4-гидроксиметил-5-гидрокси-6-метилпиридил-2-азо]фенилсульфонат натрия

Таблица 5 – Химическая структура исследованных аналогов PPADS (азофенилдисульфонаты натрия)



Номер соединения	R ₁	R ₂	Химическое название
B1	H	CH ₃	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 ₃	CH ₃	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 ₃ H ₇	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 ₅ H ₁₁	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 ₇ H ₁₅	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 ₈ H ₁₇	4-(9-гидрокси-8-метил-3-октил-1,5-дигидро-[1,3]диоксепино[5,6-с]пиридинил-6-азо)фенил-1,3-дисульфонат натрия

Объем работы:

- оценка механической активности изолированных тканей – 108 гладкомышечных препаратов мочевого пузыря и 108 гладкомышечных препаратов семявыносящего протока (48 крыс); 18 гладкомышечных препаратов двенадцатиперстной кишки (18 крыс);

- оценка активности экто-нуклеотидаз – 112 образцов гладкомышечных тканей мочевого пузыря и 112 образцов гладкомышечных тканей семявыносящего протока (14 крыс);
- изучение токсичности – 15 мышей;
- оценка сердечной деятельности – 28 мышей;
- изучение поведенческих реакций – 120 мышей;
- изучение антитромботической активности – 42 крысы;
- изучение влияния на рецепторы тромбоцитов – 6 кроликов.

2.2. Прогноз спектра фармакологической активности новых соединений в системе PASS

В настоящее время поиск новых биологически активных соединений зачастую основан на скрининге *in vitro* большого количества химических веществ. Требуется тщательный отбор потенциально перспективных веществ уже на ранних стадиях исследования. Такой отбор может быть осуществлен на основе компьютерного прогноза спектра биологической активности химических соединений с помощью системы PASS – Prediction of Activity Spectra for Substances (<http://pharmaexpert.ru/PASSOnline/>), прогнозирующей более 700 видов биологической активности по структурной формуле химического вещества, включая основные и побочные фармакологические эффекты, механизмы действия, мутагенность, канцерогенность, тератогенность и эмбриотоксичность.

Химическая структура представлена в PASS в виде MNA дескрипторов, имеющих универсальный характер и с достаточной точностью описывающих разнообразные зависимости «структура-свойство». Используемый в PASS математический алгоритм обеспечивает получение устойчивых в статистическом

смысле зависимостей «структура-активность» и, соответственно, результатов прогноза.

Результаты прогноза представлены в виде списка названий вероятных видов активности с расчетными оценками вероятностей наличия (P_a) и отсутствия каждого вида активности (P_i), которые имеют значения от 0 до 1. P_a и P_i интерпретируются как оценки меры принадлежности вещества к классам активных и неактивных соединений, соответственно. Чем больше для конкретной активности величина P_a и чем меньше величина P_i , тем больше шанс обнаружить данную активность в эксперименте. Чем ближе значение P_a к единице, тем более вероятно, что вещество является близким аналогом известного препарата [31].

Рассчитывали среднее отношение правдоподобий, P_a/P_i и определяли индекс перспективности соединений следующим образом:

$$P_a/P_i \geq 100 \text{ Ind} = 3;$$

$$100 < P_a/P_i \leq 10 \text{ Ind} = 2;$$

$$10 < P_a/P_i \leq 1 \text{ Ind} = 1$$

Чем больше значение индекса перспективности, тем больше вероятность проявления заданной активности у исследуемого соединения [3].

2.3. Изучение липофильности новых производных пиридоксина

Один из важных параметров, оцениваемых у веществ с потенциальной биологической активностью – липофильность. Этот параметр обуславливает фармакокинетику вещества и его поведение в организме, проходимость через билипидный слой мембраны биологических клеток.

Липофильность обычно описывается процессами распределения между двумя фазами – неполярной (органическая фаза) и полярной (в основном, водная). Количественная характеристика липофильности – коэффициент распределения P

– определяется как отношение концентраций нейтрального соединения в органическом (Сорг) и водном (Сводн) растворах в равновесных условиях.

Как правило, коэффициент распределения выражается в логарифмическом виде ($\log P$). Коэффициент $\log P$ является одним из основных параметров для оценки липофильности химических соединений и фармакокинетических свойств. Этот параметр измеряется с помощью трудозатратных экспериментальных методов, но в настоящее время $\log P$ возможно определить с использованием вычислительных методов. Число публикаций о прогнозах липофильности постепенно увеличивалось за последние годы, но количество программ, доступных для онлайн-прогнозирования этого важного параметра, по-прежнему ограничено. Представлен интересный инструмент для расчета коэффициентов логарифма P : пакет виртуальной вычислительной химии (VCCLAB). Данная программа позволяет рассчитывать растворимость в воде нейтральных соединений при 25°C, коэффициент распределения P незаряженных форм субстрата в системе *n*-октанол/вода и его логарифмическую величину $\log P$, которая принимается за основной параметр липофильности химических соединений.

Электронный ресурс ALogPS 2.1. (<http://www.vcclab.org/lab/alogps/>), использованный в данной работе, предоставляет возможность рассчитывать свойства и предсказывать биологическую активность соединений [158, 173].

2.4. Фармакологические методы исследования на изолированных тканях

Метод оценки механической активности изолированных тканей использован с целью выявления способности исследуемых соединений угнетать сократительные ответы, вызванные агонистом P2X-рецепторов α, β -метилтен-АТФ и стимуляцией электрическим полем в присутствии холино- и адrenoблокаторов, а также с целью выявления способности исследуемых соединений угнетать P2Y₁-

рецептор-опосредованные расслабления, вызванные СЭП или агонистом АТФ [123, 124, 225, 247].

Самцов белых крыс линии Wistar массой 180-220г оглушали, декапитировали и обескровливали.

Семявыносящий проток и мочевой пузырь выделяли и готовили продольные гладкомышечные препараты размером приблизительно 2x10 мм. Мышечные препараты помещали в термостатируемый сосуд с раствором Кребса-Хенселейта ($37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$) объемом 10 мл для регистрации механической активности. Один конец гладкомышечного препарата жестко фиксировали шелковой нитью. Другой конец препарата с помощью шелковой нити прикрепляли к изометрическому датчику механической активности FSG-01 (Linton, Великобритания). Запись проводили с использованием компьютера с помощью программы MP100WSW Data Acquisition System. Интерфейс программы разработан компанией Biopack, Великобритания. К препарату прилагали начальную нагрузку в 1 г, затем оставляли в покое на 1 час для стабилизации, меняя раствор Кребса-Хенселейта в сосуде каждые 15 минут. Раствор Кребса-Хенселейта имел следующий состав (в мМ): NaCl 118, KCl 4.7, NaHCO_3 25, KH_2PO_4 1.2, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2, $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1М 2.5, глюкоза 7.8 и в течение всего эксперимента аэрировался газовой смесью 95% кислорода и 5% углекислого газа (pH 7,4).

Стимуляцию электрическим полем (СЭП) проводили с использованием стимулятора Digitimer Multistim D330 (Великобритания) при помощи двух платиновых колец диаметром 2,5 мм, через которые был пропущен гладкомышечный препарат, расстояние между кольцами – 15 мм.

Стимуляцию проводили до тех пор, пока сокращение после достижения своего максимума не уменьшится на одну треть. Частота сокращений 0,5-32 имп/с, ширина 0,5 мс, напряжение 100В, импульс прямоугольный. Между каждой последующей стимуляцией выдерживали интервал 60с.

При проведении экспериментов с электрической стимуляцией в раствор Кребса-Хенселейта добавляли атропин (1 мкМ) и фентоламин (10 мкМ), чтобы исключить влияние α -адрено- и М-холинорецепторов на ответ ткани.

α, β -метилен АТФ (0,3-3 μ М), агонист P2X-рецепторов, вносили в сосуд и несколько раз отмывали препарат раствором Кребса-Хенселейта после достижения максимума сокращения. Во избежание десенситизации P2X-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 и PPADS в концентрации 10 мкМ. Использование данной концентрации обусловлено тем, что в меньшей концентрации PPADS не проявляет антагонистической активности, а в большей – не проявляет достаточную селективность действия [124, 225]. Инкубация с каждым веществом длилась 20 мин. На каждом из мышечных препаратов оценивалось только одно вещество в одной концентрации. В ходе контрольной серии экспериментов было установлено, что сократительные ответы гладкомышечных препаратов мочевого пузыря и семявыносящего протока крысы, вызванные СЭП и α, β -метилен АТФ, достоверно не изменяются в течение 3-4 часов (обычная длительность эксперимента).

Отрезок двенадцатиперстной кишки крысы выделяли и осторожно, при помощи влажного ватного тампона, отделяли наружный продольный слой мышцы, из которого готовили препарат длиной 15 мм. После фиксации в сосуде и приложения начальной нагрузки в 1 г, препарат оставляли для стабилизации на 1 час, меняя раствор Кребса-Хенселейта каждые 15 мин. Затем в сосуд добавляли 0,3 μ М раствор карбахолина для тонического сокращения мышцы [142]. В предварительных контрольных экспериментах было установлено, что эта концентрация карбахолина вызывает стабильные, воспроизводимые тонические сокращения в течение 3-4 часов.

Расслабительные ответы АТФ (1μМ-3 мМ) оценивали на фоне тонического действия карбахолина. Растворы АТФ добавляли непосредственно в сосуд, затем отмывали несколько раз раствором Кребса-Хенселейта после достижения максимума расслабляющего ответа. Между каждым последующим добавлением раствора карбахолина и АТФ делали интервал не менее 10 мин.

Расслабительный ответ препарата ткани на СЭП (0,5-8 Гц, 0,5мс, 100В) также оценивали на фоне действия карбахолина. 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 и PPADS в концентрации 10 мкМ. Расчет производили как процент от максимального расслабления.

По результатам контрольных экспериментов было установлено, что эффекты карбахолина (0,3μМ), АТФ(1μМ-3мМ) и СЭП (0,5-8 Гц) на препарат двенадцатиперстной кишки не изменяются во времени.

2.5. Изучение активности экто-нуклеотидаз тканей крысы

Активность экто-нуклеотидаз определяли путем инкубирования кусочков гладкомышечных тканей крысы с АТФ (субстрат реакции) в течение определенного времени, с дальнейшей оценкой содержания субстрата и продуктов реакции (АДФ, АМФ) в инкубате методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [84, 87, 119, 232].

Эксперименты проводили при $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ в буфере следующего состава (в мМ): HEPES 10, NaCl 135, KCl 5, CaCl₂ 2, MgCl₂ 2, глюкоза 10 (pH 7,4). Препараты мочевого пузыря и семявыносящих протоков готовили, как описано выше.

Кусочки ткани (2-4 мг) помещали в 24-ячеистую пластину в 300 мкл буфера, промывали в течение 10 мин при постоянном встряхивании для удаления частей поврежденных клеток и следов нуклеотидов. После чего буфер удаляли,

добавляли 300 мкл буфера, содержащего АТФ (300 мкМ) и испытуемое вещество (10 мМ), затем инкубировали в течение 15 мин при постоянном встряхивании. В серии контрольных экспериментов использовали буфер, содержащий только АТФ (300 мкМ). Реакцию останавливали добавлением 300 мкл 3% хлорной кислоты. Инкубационную жидкость центрифугировали, центрифугат замораживали для последующего хроматографического анализа.

Эксперименты проводились на хроматографе производства Perkin Elmer Series 200 (США) с использованием колонки Waters Spherisorb и программы Total Chrom Navigator. Мобильная фаза состояла из KH_2PO_4 0,2 М и метанола 3% (рН 6,0), скорость тока 1,5 мл/мин, длина волны 260 нм, скорость записи 1 см/мин, объем образца 20 мкл. Нуклеотиды на хроматограмме появлялись в следующем порядке: АТФ, АДФ и АМФ; полное разделение проходило в течение 6 мин.

Определение концентрации АТФ проводили путем сравнения площади под пиком с соответствующей площадью у контрольного образца. Активность эктонуклеотидаз выражали в пмоль АТФ, разрушенных 1 мг ткани за 1 мин. Результаты представлены как $M \pm m$ четырех независимых экспериментов в четырех независимых пробах.

2.6. Изучение токсичности соединения АЗ для мышей при внутрибрюшинном введении

В этой серии экспериментов использовано 15 мышей обоего пола массой $20,0 \pm 2,0$ г. Мыши были разделены на три группы по 5 мышей, каждой группе мышей вводили водные растворы соединения АЗ 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.

2.7. Оценка влияния соединения АЗ на частоту сердечных сокращений мышц²

В этой серии экспериментов использовано 28 белых беспородных мышей обоего пола массой $20,0 \pm 2,0$ г.

Мышей наркотизировали изофлураном с использованием аппарата для ингаляционной анестезии Eickemeyer IsoFlo и кислородного концентратора LF-N-10A Армед. После наступления наркоза мышь помещали на обогреваемую 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 [23, 240].

По результатам предварительного исследования обнаружено, что АТФ в дозах 1-10 мг/кг вызывает кратковременное снижение частоты сердечных сокращений в среднем на 35%. В наших экспериментах мы использовали минимальную дозу АТФ (1 мг/кг). 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.

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

2.8. Оценка влияния соединения АЗ на поведение и психоэмоциональное состояние животных

В проведенных исследованиях использовались этиологические методы, основанные на исследовательской активности животных при наличии природных стимулов, вызывающих чувство страха или тревоги. Исследовательский ответ животного состоит в осмотре, обнюхивании, подъемах на задние лапы, выглядывании. Тревожный ответ состоит в замирании, поиске убежища, активной дефекации и уринации [1].

Целью проведенных исследований являлась предварительная оценка влияния исследуемого соединения АЗ и вещества сравнения PPADS на поведенческие реакции животных.

Исследования проводились на 120 интактных беспородных белых мышам-самцах массой 25-35 грамм, по 30 животных на каждый вид эксперимента, разделенных на группы по 6 животных в каждой. Животные были получены из ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, филиал «Столбовая» (Московская область). Животные содержались в условиях вивария с соблюдением всех правил лабораторных исследований при проведении доклинических испытаний в РФ (Межгосударственный стандарт ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами») и приказа Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 г. N 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

За 24 часа всех животных опытных и контрольных групп переносили помещение, где проводили эксперимент, и взвешивали.

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.

Для статистической обработки данных результатов всех экспериментов применяли ранговый однофакторный анализ Крускала-Уоллиса, критерий Данна для множественных сравнений.

Все использованные в экспериментах установки произведены НПК Открытая Наука, Россия. Исследования проводились на базе Регионального научно-испытательного центра «Фармэксперт» ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава РФ.

2.8.1. Оценка влияния соединения А3 на поведение животных на установке «открытое поле-круг»

Метод был предложен С.S. Hall (1936) для регистрации поведения животных в ответ на «новые, потенциально опасные стимулы» и является одним из самых распространенных при изучении поведенческих реакций. Новизна среды активизирует сложный набор интегрированных поведенческих реакций, отражающих тревожность и стремление исследовать новую территорию. Баланс оборонительных и исследовательских тенденций определяет текущее поведение животного в ОП, изменяющееся по времени тестирования. По мнению ряда авторов, проведение теста «Открытое поле» предпочтительнее в установке типа «ринг», так как позволяет создать более изоморфные условия эксперимента, чем в установке типа «бюкс», имеющей углы, которые могут использоваться животным в качестве точек ориентирования и мест для «затаивания».

Метод предназначен для исследования поведения грызунов в новых (стрессогенных) условиях, позволяя оценить: выраженность и динамику отдельных поведенческих элементов; уровень эмоционально-поведенческой реактивности животного и исследовательского/оборонительного поведения [4, 215].

Установка представляет собой круглую арену с высоким бортом, расчерченную на сектора. Диаметр арены составляет 63см, высота стенок – 32см,

диаметр отверстий в полу – 1 см. Освещенность открытого поля составляла 100 лк.

За 60 минут до тестирования животных помещают в тихое, слабо освещенное место, исключают активные манипуляции.

Тестируемое животное помещали в центр круглой белой арены хвостом к экспериментатору. Визуальный контроль за поведением животного проводили в течение 3-х минут, фиксировались следующие показатели: число пересеченных секторов (спонтанная двигательная активность), количество стоек и количество обследованных отверстий (ориентировочно-исследовательская активность). Количество пересечений отмечалось за каждую минуту отдельно.

Пол арены расчерчен на три ряда секторов одинаковой площади, поэтому за единицу перемещения при визуальной регистрации поведения принимали один пересеченный сектор. За обследование отверстий, находящихся в полу арены, принимали засовывание головы внутрь отверстий.

2.8.2. Оценка влияния соединения АЗ на поведение животных на установке «темная/светлая камера»

Метод основан на естественном предпочтении грызунами темных нор, а также на страхе нахождения на открытых площадках [4, 56].

Установка «Темная/светлая камера» предназначена для изучения поведения грызунов в условиях переменной стрессогенности (при свободном выборе комфортных условий) и позволяет оценить: предпочтение темноты/света; выраженность и динамику поведения «выглядывания»; привыкание.

Интервал времени, проведенного в тёмном отсеке, коррелирует с уровнем тревожности, тогда как число выходов и время обследования освещённого отсека являются показателями склонности к исследовательской активности.

Установка состоит из двух частей – темная и светлая камера с размерами 20х20 см, камеры разделены перегородкой, высота стенок равна 20 см.

Освещенность светлого отсека составляла 400лк (люксметр Testo 540, Германия). Животных помещали в светлый отсек. В течение трех минут регистрировали следующие параметры: латентный период первого захода в темный отсек (сек), число перемещений в обоих направлениях, общее время, проведенное в светлом и темном отсеках (сек), количество выглядываний в светлый отсек, число вставаний на задние лапы.

Вещества, снижающие уровень тревоги, увеличивают число переходов между темным и светлым отсеками камеры и другие параметры.

2.8.3. Оценка влияния соединения АЗ на поведение животных на установке «приподнятый крестообразный лабиринт»

Метод основан на навыке предпочтения грызунами темных нор, естественного страха нахождения на открытых площадках и падения с высоты [215].

Приподнятый крестообразный лабиринт представляет собой установку, состоящую из расходящихся от центральной площадки под прямым углом двух открытых и двух закрытых светонепроницаемыми стенками рукавов размерами 5×30 см. Высота стенок закрытых рукавов составляет 15см, высота борта открытых рукавов 0,25см. Установка зафиксирована на высоте 50см.

Непосредственно перед тестированием животных контрольной и опытной групп, в установку помещают животное «нулевой» группы и дают ему свободно исследовать установку в течение 5 минут. Это необходимо для уравнивания условий тестирования между первым и последующими животными, оказавшимися в условиях лабиринта.

Животных помещали в центр установки, носом к открытому рукаву. В течение 5 минут регистрировали следующие показатели: латентный период времени до выхода в открытый рукав (сек), суммарное время, проведенное в открытых рукавах лабиринта (сек), латентный период до выхода в закрытый рукав (сек), суммарное время, проведенное в закрытых рукавах лабиринта (сек).

При проведении экспериментов использовался видеотрекинг (камера Canon, программное обеспечение ICSapture 2.4). Для подсчета результатов использована программа (EthoVisionXT 1.1.5., Noldus).

2.8.4. Оценка влияния соединения АЗ на психоэмоциональное состояние животных в тесте принудительного плавания по Porsolt

Тест был предложен как модель некоторых аспектов человеческой депрессии, а именно чувства безысходности. Животное, вынужденное плавать в ограниченном пространстве, быстро прекращает активные попытки выбраться и принимает состояние относительной неподвижности.

Тест предназначен для выявления соединений с антидепрессантной и психостимулирующей активностью [17, 204].

Оборудование представляет собой прозрачный цилиндр диаметром 10 см и высотой 30 см. Цилиндры располагались по три в один ряд, производилась видеозапись. Наблюдение производили в течение 6 минут.

Животное помещалось в цилиндр, наполненный водой так, чтобы хвост животного не касался дна. Температура воды 25-26°C.

При проведении теста оценивалось время, когда животное от активных попыток найти выход из неприятного положения (погружение в воду и невозможности покинуть установку), переходит к неподвижности, ассоциирующейся с поведением отчаяния.

Регистрировали время активного плавания (любого движения животного, в попытке выбраться или держаться на воде) и время полного отсутствия движений – состояние безысходности.

2.9. Изучение антитромботической активности соединения АЗ³

Модель артериального тромбоза, индуцированного аппликацией 50 % раствора хлорида железа (III), выполнена согласно методике Kurz, 1990 на сонной артерии крыс [159]. Данная модель была выбрана потому, что действие хлорида железа индуцирует сразу несколько составляющих тромботического процесса: агрегацию тромбоцитов, образование фибрина и агрегацию эритроцитов и по биологии сосудистого поражения подразумевает развитие в очаге поражения реакции Хабера—Вейса (взаимодействие железа с пероксидом водорода, в результате которого образуются гидроксильные радикалы). Это приводит к изменению фосфолипидного состава мембраны тромбоцитов и повышению их функциональной активности. При активации свободнорадикальных процессов окисленный фибриноген накапливается в крови и активирует тромбообразование [28].

Эксперименты были выполнены на 42 белых беспородных крысах самцах массой 200-250 г.

Животные содержались в стандартных условиях в соответствии с постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 29.08.2014 №51 «Об утверждении СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» на специальном гигиеническом наполнителе древесном (ООО «Производственный комплекс «ГлавРезерв». Температурный режим помещения вивария поддерживается от +18 до +22°C. Освещение вивария совмещенное (естественное и люминисцентное). Еженедельно в помещении вивария проводилась бактерицидная обработка стационарным настенным бактерицидным облучателем «Armed» в течение 20 мин. Крысы содержались в лабораторных клетках для мелких грызунов. В состав корма входит: кормовая смесь для содержания лабораторных животных (мышей, крыс, хомяков) (ООО

³ Выражаем глубокую признательность за совместное проведение серии экспериментов ассистенту кафедры фармакологии Волгоградского ГМУ Сиротенко В.С.

«ТПК Альянс», Россия; состав: отруби, ячмень, пшеница, жмых подсолнечный, мел кормовой, соль), зернопродукты и сочные корма (овощи и травы). Замена воды в поилках производилась ежедневно.

Животные имели круглосуточный свободный доступ к поилкам. Животные получали воду, соответствующую ГОСТ «Вода питьевая» 2874–82 и СанПиН 2.1.4.1074-01 «Питьевая вода, отстоянная в течение 1 суток, вода из централизованных систем питьевого водоснабжения». Замена воды в поилках производилась ежедневно.

В течение 24 часов до начала экспериментов все животные находились в условиях полной пищевой депривации со свободным доступом к воде. На момент выполнения исследований животные были здоровыми, без изменений поведения, режима сна и бодрствования, аппетита.

Исследуемое соединение и препарат сравнения (ацетилсалициловая кислота) вводились внутривентрикулярно, с помощью металлического атравматического зонда, за 2 часа до начала эксперимента. Исследуемое соединение вводилось в дозах 23, 46 и 92 мг/кг, вещества сравнения – ацетилсалициловая кислота – в дозах 20, 100 и 150 мг/кг, клопидогрел – 44, 88 и 122 мг/кг. Группе контрольных животных вводили дистиллированную воду в эквивалентном количестве. Крыс интраперитонеально наркотизировали нембуталом (50 мг/кг), отпрепаровывали сонную артерию на 4 см в длину, на участок длиной около 1 см укладывали ватный диск размером 2 мм×8 мм, смоченный 50% раствором хлорида железа (0,025 мл), и пленку Parafilm для изоляции окружающих тканей. На расстоянии 1 см от данного участка устанавливали ультразвуковой датчик аппарата Дуплера. Доплерографические исследования проводили на ультразвуковом компьютеризированном приборе «Минимакс-Дуплер-К» (Санкт-Петербург) для исследования кровотока как в крупных кровеносных сосудах (артериальных и венозных диаметром 1-7 мм), так и в микрососудах (диаметром менее 1 мм) неинвазивным способом. Регистрацию кровотока вели до полной окклюзии сосуда (характеризуется отсутствием

пульсации сонной артерии выше участка наложения тромбообразующего агента и характерного артериального звукового сигнала).

Статистическая обработка экспериментальных данных проводилась с использованием критерия Манна-Уитни при помощи пакета статистических программ GraphPad 5.0 и Microsoft Excel 2007.

2.10. Изучение влияния соединения АЗ на P2Y₁₂-рецепторы тромбоцитов⁴

Исследование влияния соединения АЗ на P2Y₁₂-рецепторы тромбоцитов проводили на 6 кроликах самцах массой 3-3,5 кг.

Животные содержались в стандартных условиях в соответствии с постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 29.08.2014 №51 «Об утверждении СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» на специальном гигиеническом наполнителе древесном (ООО «Производственный комплекс «ГлавРезерв». Температурный режим помещения вивария поддерживается от +18 до +22 С. Освещение вивария совмещенное (естественное и люминисцентное). Еженедельно в помещении вивария проводилась бактерицидная обработка стационарным настенным бактерицидным облучателем «Armed» в течение 20 мин. Кролики содержались в лабораторных клетках для грызунов. В состав корма входит: кормовая смесь для содержания лабораторных животных (мышей, крыс, хомяков) (ООО «ТПК Альянс», Россия; состав: отруби, ячмень, пшеница, жмых подсолнечный, мел кормовой, соль), зернопродукты и сочные корма (овощи и травы). Замена воды в поилках производилась ежедневно.

Животные имели круглосуточный свободный доступ к поилкам. Животные получали воду, соответствующую ГОСТ «Вода питьевая» 2874–82 и СанПиН 2.1.4.1074-01 «Питьевая вода, отстоянная в течение 1 суток, вода из

⁴ Выражаем глубокую признательность за совместное проведение серии экспериментов ассистенту кафедры фармакологии Волгоградского ГМУ Сиротенко В.С.

централизованных систем питьевого водоснабжения». Замена воды в поилках производилась ежедневно.

В течение 24 часов до начала экспериментов все животные находились в условиях полной пищевой депривации со свободным доступом к воде. На момент выполнения исследований животные должны быть здоровыми, без изменений поведения, режима сна и бодрствования, аппетита.

Влияние исследуемого соединения на пуриновые P2Y₁₂-рецепторы тромбоцитов было изучено методом малоуглового светорассеяния *in vitro* [24]. Регистрация проводилась на приборе «Лайт-Скан» (НПФ «Люмекс», Россия). Исследования выполнялись на богатой тромбоцитами плазме кроликов. Активация тромбоцитарных P2Y₁₂-рецепторов проводилась в кальциевой среде, с добавлением 5 мМ ЭДТА. В качестве индуктора активации данных рецепторов использовали АДФ в концентрации 200 нМ.

Для получения контрольной пробы в кювету агрегометра вносили 7 мл буфера (0,472 г. трис-НСl, 2,456 г. натрия хлорида (х.ч.), 0,504 г. ЭДТА), 1 мМ кальция хлорида и проводили запись в течение 5 минут, а затем вносили 100 мкл богатой тромбоцитами плазмы. Через 2 минуты в кювету добавляли индуктор агрегации тромбоцитов АДФ, в конечной концентрации 20 нМ.

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 А3 в отношении P2Y₁-рецепторов. В качестве вещества сравнения использовали MRS 2179, селективный антагонист P2Y₁-рецепторов, мощный ингибитор АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов *in vitro* [48].

2.11. Изучение анальгетической активности соединения АЗ⁵

Изучение анальгетической активности исследуемого вещества проводили в соответствии с «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» на моделях ноцицептивной боли в тестах электрического и термического раздражения [5].

Исследования выполнены 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 («ОАО «Московская фармацевтическая фабрика», Россия), которое вводили в дозе 1 мг/кг внутривентриально. Контрольным животным инъецировался эквивалентный объем дистиллированной воды. Регистрацию ноцицептивных ответов проводили через 60 и 120 минут после введения веществ. Статистическую обработку данных проводили с использованием программы «GraphPad Prism 5.0» с использованием непараметрического метода сравнения независимых групп Манна-Уитни.

2.11.1. Тест электрической стимуляции корня хвоста крыс с определением порога ноцицептивных реакций

Метод основан на измерении порогового напряжения, при котором появляются рефлексы «Отдергивание хвоста», «Вокализация», «Пролонгированная вокализация» (голосовая ноцицептивная реакция после разряда), в реализацию которых вовлекаются структуры спинного мозга, ствола мозга, таламуса соответственно [164]. Болевое раздражение проводили электрической стимуляцией корня хвоста крыс биполярными электродами с использованием электростимулятора лабораторного (ЭСЛ-2, Россия),

⁵ Выражаем глубокую признательность за совместное проведение серии экспериментов к.м.н. Елисейевой Н.А.

прямоугольными импульсами длительностью 10 мсек, частотой стимуляции 100 Гц, продолжительностью 1 сек. Регистрировали пороговые величины напряжения, соответствующие появлению ноцицептивных реакций. Критерием анальгетического эффекта считали статистически значимое увеличение пороговых величин напряжения после введения веществ относительно контрольных значений для каждой точки измерения.

2.11.2. Тест отдергивания хвоста (tail-flick)

Метод основан на спинальном флексорном рефлексе в ответ на прогрессивно увеличивающееся воздействие теплового излучения на кожную поверхность. Болевое раздражение наносили на хвост локально, воздействуя постепенно увеличивающимся тепловым излучением, с помощью анальгезиметра «Tail flick analgesia meter» (Ugo Basile, Италия). Регистрировали латентный период реакции отдергивания хвоста (время избавления от болевого раздражителя). Максимальное время экспозиции – 15 сек расценивали как 100% анальгезию. Критерием анальгетического эффекта считали достоверное увеличение латентного периода реакции после введения вещества.

2.11.3. Тест «Горячая пластина»

Тест горячей пластины основан на поведенческих реакциях, контролируемых супраспинальными структурами, в ответ на болевое воздействие. При помещении животного на горячую поверхность (55°C) с достижением порога болевой реакции наблюдаются двигательные реакции беспокойства: отдергивание лап, облизывание подушечек лап, подпрыгивание [152]. Крыс помещали на термостатически контролируемую, электронагревательную поверхность, окруженную цилиндром диаметром 15 см с установленным температурным режимом («Hot/Cold Plate» Ugo Basile, Италия). Регистрировали латентный период (ЛП) болевой реакции в виде облизывания

задних лап. При отсутствии активности в течение 30-секундного интервала (максимальное время экспозиции) за латентный период принимались 30 секунд. Критерием анальгетического эффекта считали статистически значимое увеличение латентного периода реакции после введения исследуемого вещества.

2.12. Используемые вещества

Аденозин 5'-трифосфорной кислоты динатриевая соль (АТФ), α,β -метилен АТФ литиевая соль, карбамилхолина хлорид (карбахолин), 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазин-этансульфоновой кислоты (HEPES), атропина сульфат и фентоламина сульфат получены от компании Sigma (Великобритания), пиридоксальфосфат-6-азофенил-2',4'-дисульфоновая кислота (PPADS) получен от компании Tocris (Великобритания), изофлуран производства Baxter Healthcare (США), буторфанол тартрат («ОАО «Московская фармацевтическая фабрика», Россия)

2.13. Обоснование выбора концентраций исследуемых соединений в экспериментах *in vitro*, путей введения и доз в экспериментах *in vivo*

Выбор концентраций и доз новых исследованных соединений в проведенных экспериментах основывался на следующих обстоятельствах.

Во всех экспериментах по первичной оценке антагонистической активности по отношению к мышечным P2X- и P2Y-рецепторам все новые исследуемые аналоги PPADS использовали в концентрации 10 мкМ (10^{-5} М) для сопоставимости результатов с ранее проведенными исследованиями, в которых мы оценивали другие аналоги PPADS [8, 10, 149]. Считается, что именно эта концентрация является оптимальной для оценки антагонистической активности новых соединений в отношении P2-рецепторов – в меньших концентрациях может не проявиться эффекта в достаточной степени, а большие концентрации могут вызывать неспецифические эффекты [129]. В этой же концентрации – 10

мкМ – оценивали активность соединений АЗ и А9 в экспериментах *in vitro*, где мы проводили сравнение действия этих соединений с активностью PPADS, который проявляет антагонизм в отношении P2-рецепторов в наилучшей степени именно в этой концентрации [130, 247, 248]. Влияние новых исследуемых соединений на активность экто-нуклеотидаз мышечных тканей мы оценивали также в концентрации 10 мкМ с целью сопоставления наших результатов с ранее проведенными исследованиями подобных соединений [10, 249].

В экспериментах *in vitro* по оценке антагонистической активности соединения по отношению к тромбоцитарным P2Y₁-рецепторам соединение АЗ исследовалось в концентрации 1 мкМ для сравнения его эффективности в эквимольных концентрациях с известным антагонистом этих рецепторов MRS 2179 [48, 166]. В этой же концентрации исследовали влияние соединения АЗ на тромбоцитарные P2Y₁₂-рецепторы.

Известно, что АТФ обладает отрицательным хронотропным действием [49], однако это действие кратковременно, поэтому он для этого теста используется внутривенно. Для оценки эффективности соединения АЗ на этой модели мы также использовали внутривенное введение этого соединения.

В экспериментах по оценке влияния соединения АЗ на психоэмоциональное поведение животных сопоставляли его действие с таковым PPADS, который в силу высокой гидрофильности плохо всасывается при внутрижелудочном применении. Поэтому и соединение АЗ и PPADS вводили внутривенно. Во всех остальных экспериментах *in vivo* (оценка антитромботической и анальгетической активности) соединение АЗ вводили внутрижелудочно, также, как и препараты сравнения.

При выборе доз соединения АЗ для проведения экспериментов *in vivo* мы столкнулись с определенными трудностями, поскольку нам не удалось установить летальную дозу соединения, чтобы вводить дозы, которые были бы кратны летальной или максимально-переносимой дозе этого соединения. Поэтому мы выбрали дозы в пределах 10-100 мг/кг, в которых, исходя из молекулярной массы

соединения АЗ, оно может создавать в тканях концентрации около 10 мкМ. В этих дозах оно показало свою эффективность в экспериментах *in vitro*.

В экспериментах по оценке антитромботической активности, соединение АЗ оценивалось в нескольких концентрациях, и была установлена его среднеэффективная концентрация (66 мг/кг), которая и использовалась в последующем при оценке анальгетической активности соединения.

2.14. Анализ результатов

Результаты экспериментов анализировали, используя непараметрические статистические методы: Т-критерий Вилкоксона и U-критерий Манна-Уитни, ранговый однофакторный анализ Крускала-Уоллиса, критерий Данна для множественных сравнений. Если вероятность (P) составляла не более 0,05, разница считалась достоверной. Результаты представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое значение, а m – стандартная ошибка среднего арифметического.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Эксперименты проводились в несколько этапов. На первом этапе проводилось прогнозирование активности исследуемых соединений с помощью системы PASS.

На следующем этапе все исследованные соединения оценивались на изолированных тканях крысы с целью выявления антагонистической активности в отношении P2X-рецепторов, после чего изучались наиболее активные из исследуемых соединений.

Известно, что сократительные ответы гладкомышечных препаратов мочевого пузыря крысы частично опосредуются M-холинорецепторами, тогда как в сокращениях семявыносящего протока крыс значительную роль играют α -адренорецепторы. Для исключения влияния этих рецепторов на оцениваемые сокращения в течение эксперимента в среде постоянно присутствовали M-холиноблокатор атропин (1 мкМ) или α -адреноблокатор фентоламин (10 мкМ).

3.1. Прогноз фармакологической активности новых производных пиридоксина с помощью системы PASS

На первом этапе представленные соединения исследовали на наличие фармакологической активности *in silico*, с целью прогнозирования спектра фармакологической активности в тест-системе PASS.

В системе PASS более 300 тысяч испытанных соединений, описывается 76 тыс. фрагментных дескрипторов, с помощью которых можно спрогнозировать более 7 тыс. видов биологической активности.

Для каждого соединения рассчитывается два значения: наличие (Pa) и отсутствие (Pi) заданной активности. Их отношение Pa/Pi является отношением

правдоподобий и характеризует, насколько вероятна вероятность наличия активности выше, чем ее отсутствие. Были выбраны условные пороги отношений правдоподобий и присвоен индекс перспективности.

Система PASS не прогнозирует уровень активности, но можно считать, что чем выше индекс перспективности, тем выше вероятность проявления у соединения определенной активности.

Из широкого спектра активностей, имеющих в базе, были выбраны те виды активности, которые проявлялись у соединений, имеющих в химической структуре фрагменты, аналогичные исследуемым, а именно активность в отношении P2X-рецепторов.

В результате анализа производных пиридоксина в тест-системе PASS обнаружено, что все исследуемые соединения проявляют определенную антагонистическую активность в отношении P2-рецепторов, в большей степени в отношении подтипов P2X1 и P2X3 (Таблица 6, Приложение, Таблица 1 и 2).

Таблица 6 – Активность производных пиридоксина в отношении P2X-рецепторов в целом, и некоторых их подвидов по данным прогноза PASS.

Шифр соединения	Среднее отношение правдоподобий, (Pa/Pi)				
	P2X	P2X1	P2X3	P2X4	P2Y ₁₂
A1	57	249	365	53	
A2	41	245	361	51	
A3	42	249	365	53	1,5
A4	42	231	350	30	
A5	40	230	353	30	
A6	32	218	219	27	
A7	32	218	219	27	
A8	950		883	850	
A9	250	126	827	224	

<i>Продолжение таблицы 6</i>					
B1	76		783	180	3,8
B2	103		787	188	8,2
B3	71	279	383	147	3,1
B4	67	271	377	69	2,9
B5	67	271	377	69	2,9
B6	67	271	377	69	2,9

На следующем этапе проводились эксперименты представленных соединений *in vitro*, с целью подтверждения наличия обнаруженной активности в отношении P2-рецепторов.

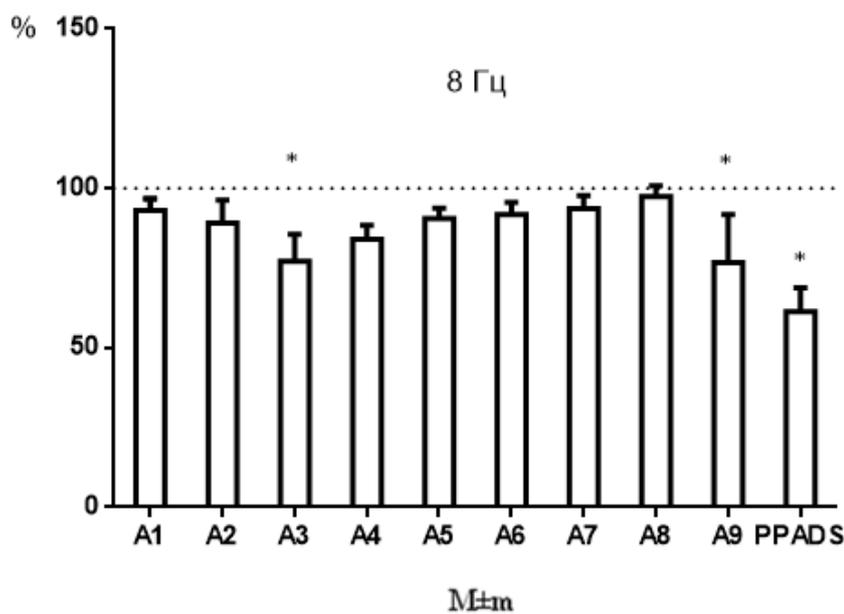
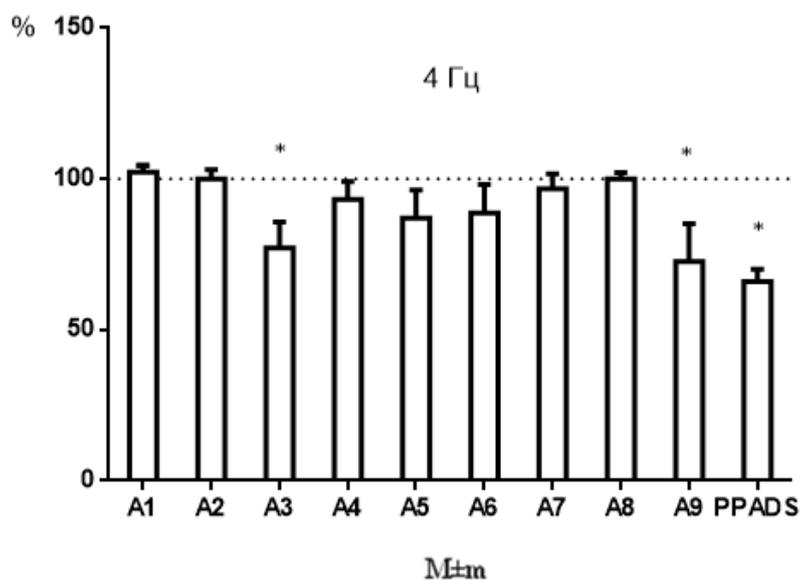
3.2. Влияние исследуемых соединений на P2X-рецептор-опосредованные сокращения изолированных мышечных препаратов мочевого пузыря крысы, вызванные стимуляцией электрическим полем

СЭП гладкомышечных препаратов мочевого пузыря крысы приводит к зависимым от частоты сократительным ответам, максимальным при частоте 32 Гц (Таблицы 3-18 в Приложении). Результаты экспериментов, полученные при стимуляции частотой 4, 8 и 16 Гц, представлены на Рисунках 3 и 4.

Из представленных на рисунках результатов видно, что большинство соединений группы А не оказало достоверного влияния на сократительные ответы мочевого пузыря, вызванные СЭП в присутствии атропина. Достоверное угнетение сократительных ответов на представленных частотах было выявлено лишь при использовании соединений п-(1,5-Дигидро-3,3,8-триметил-9-гидрокси-[1,3]диоксепино[5,6-с]пиридинил-6-азо)фенилсульфо кислоты натриевая соль (А3) и п-[3-(((2-гидроксиэтил)тио)метил)-4-гидроксиметил-5-гидрокси-6-метилпиридил-2-азо]фенилсульфо кислоты натриевая соль (А9). Соединение А3 вызывает угнетение сократительного ответа мочевого пузыря более чем на 22% на всех частотах, а соединение А9 – более чем на 20% на частотах 4 и 8 Гц, и

более чем на 40% на частоте 16 Гц по сравнению с исходным. PPADS также вызывало достоверное угнетение сократительных ответов при частоте 4, 8 и 16 Гц (на 34; 38,6 и 54,6%, соответственно).

Ни один из препаратов группы В не оказал достоверного влияния на угнетение сократительных ответов мочевого пузыря крысы.



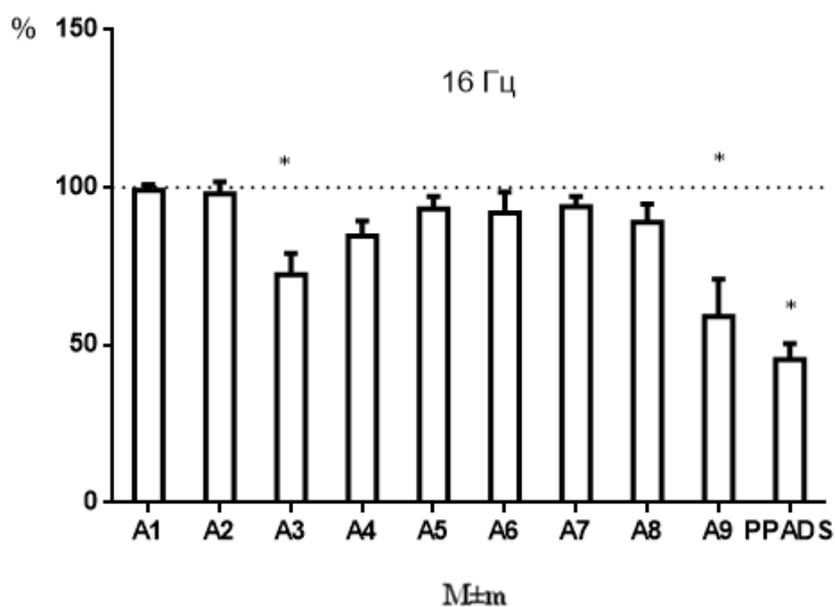
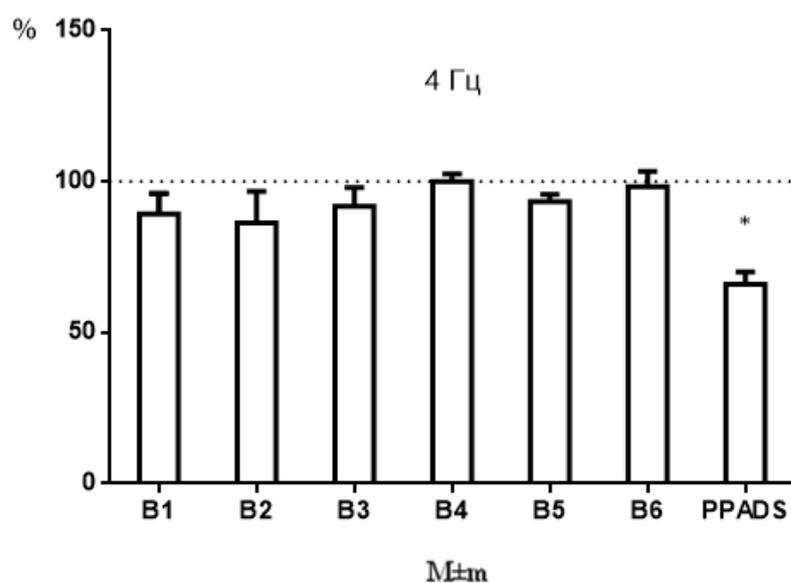


Рисунок 3 – Влияние соединений A1-A9 и PPADS в концентрации 10 мкМ на сокращения изолированного мочевого пузыря крысы, вызванные электрической стимуляцией полем частотой 4,8 и 16 Гц в присутствии атропина (10μМ). Результаты приведены в процентах от исходных сокращений, принятых за 100%. * - $p \leq 0,05$ от исходных (n=6), Т-критерий Вилкоксона



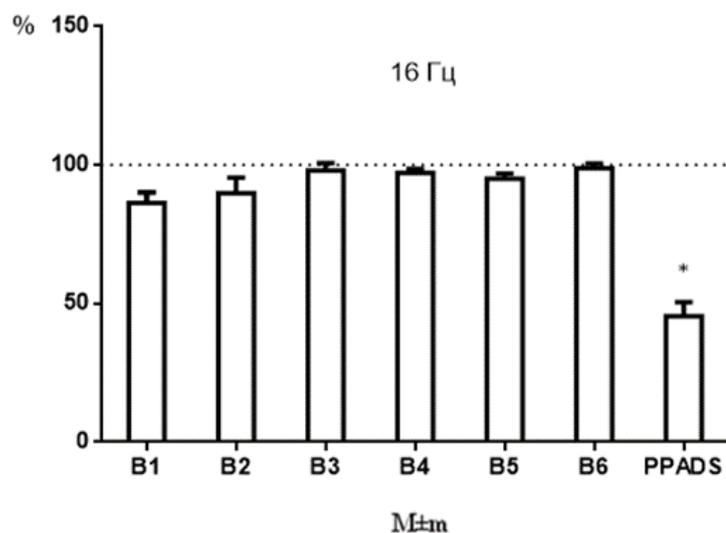
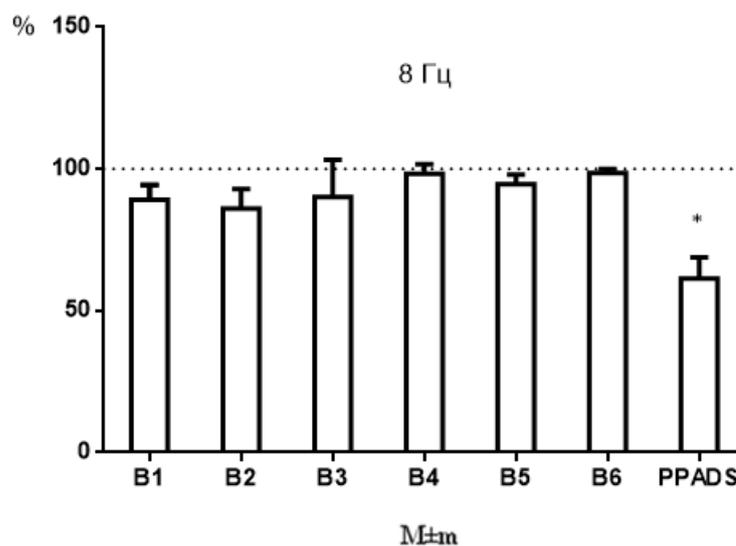


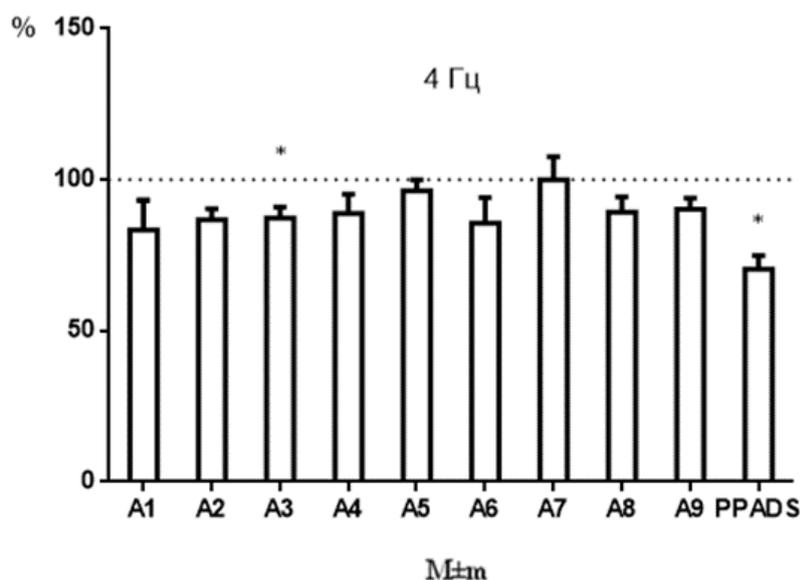
Рисунок 4 – Влияние соединений B1-B6 и PPADS в концентрации 10 мкМ на сокращения изолированного мочевого пузыря крысы, вызванные электрической стимуляцией полем частотой 4,8 и 16 Гц в присутствии атропина (10μМ). Результаты приведены в процентах от исходных сокращений, принятых за 100%. * - $p \leq 0,05$ от исходных (n=6), T-критерий Вилкоксона

3.3. Влияние исследуемых соединений на P2X-рецептор-опосредованные сокращения изолированных мышечных препаратов семявыносящего протока крысы, вызванные стимуляцией электрическим полем

СЭП препаратов семявыносящего протока крысы также приводит к зависимым от частоты сократительным ответам, максимальным при частоте 32 Гц (Таблицы 19-34 в Приложении). Результаты экспериментов, полученные при стимуляции частотой 4, 8 и 16 Гц, представлены на Рисунках 5 и 6.

Из представленных на рисунках результатов видно, что в целом здесь проявляется та же закономерность, что и в серии экспериментов на препаратах мочевого пузыря. Большинство соединений группы А не оказало достоверного влияния на сократительные ответы семявыносящего протока, вызванные СЭП в присутствии фентоламина. Соединение А3 вызывает достоверное угнетение сократительных ответов на всех частотах более чем на 10%. Соединение А9 вызывает достоверное угнетение сократительного ответа только на частоте 8 Гц, более чем на 23% по сравнению с исходным.

PPADS также вызывало достоверное угнетение сократительных ответов на всех представленных частотах (на 29,6; 37,2 и 35,6% соответственно).



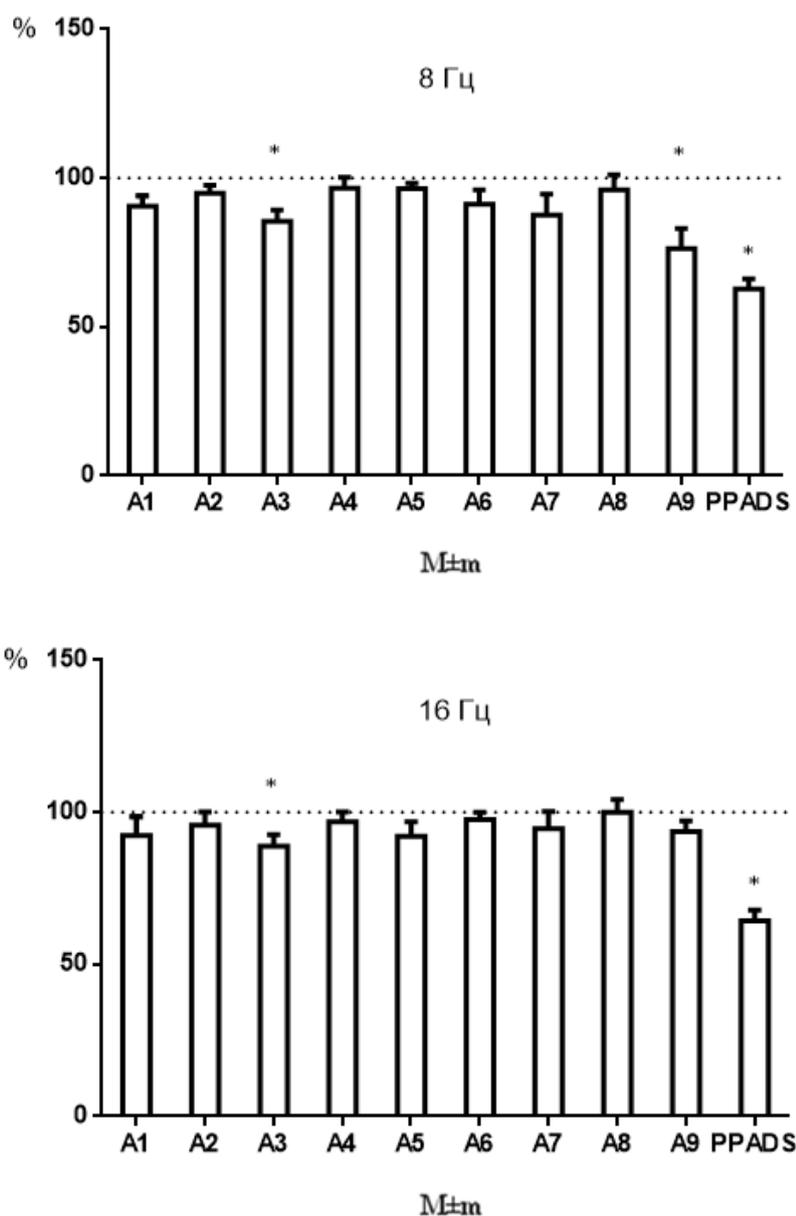
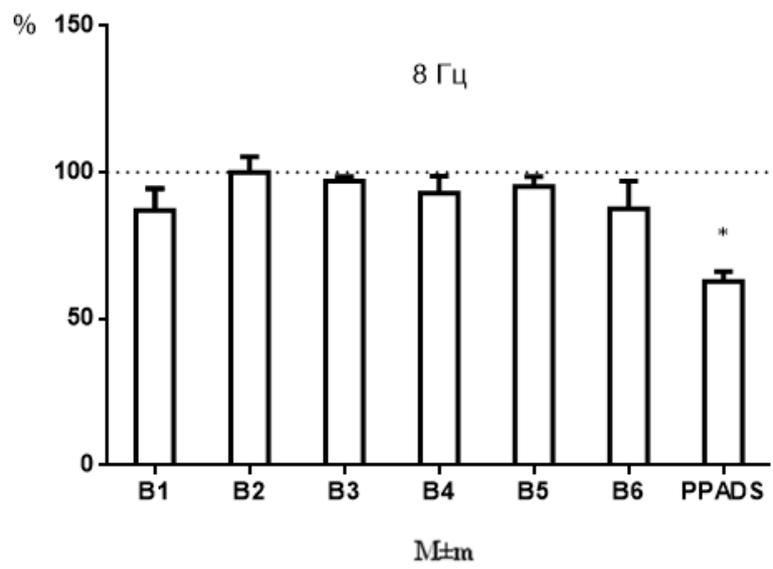
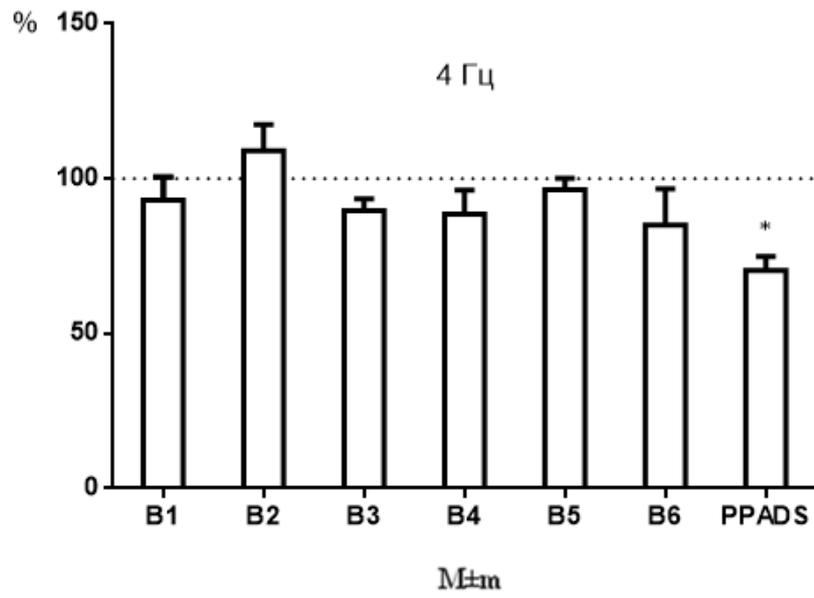


Рисунок 5 – Влияние соединений A1-A9 и PPADS в концентрации 10 мкМ на сокращения изолированного семявыносящего протока крысы, вызванные электрической стимуляцией полем частотой 4,8 и 16 Гц в присутствии фентоламина (10μМ). Результаты приведены в процентах от исходных сокращений, принятых за 100%. * - $p \leq 0,05$ от исходных (n=6), Т-критерий Вилкоксона



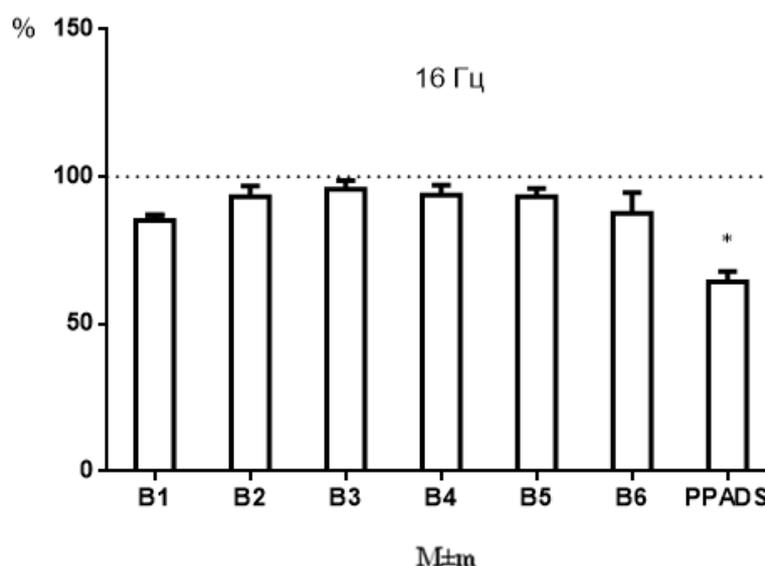


Рисунок 6 – Влияние соединений B1-B6 и PPADS в концентрации 10 мкМ на сокращения изолированного семявыносящего протока крысы, вызванные электрической стимуляцией полем частотой 4,8 и 16 Гц в присутствии фентоламина (10μМ). Результаты приведены в процентах от исходных сокращений, принятых за 100%. * - $p \leq 0,05$ от исходных (n=6), Т-критерий Вилкоксона

Таким образом, в данной серии экспериментов выявлены два соединения – А3 и А9, достоверно оказывающие угнетающее влияние на сокращения, вызванные СЭП, как и вещество сравнения – PPADS. На основании полученных данных эти соединения были отобраны для дальнейшего исследования.

3.4. Изучение влияния исследуемых соединений на активность экто-нуклеотидаз мышечных препаратов мочевого пузыря и семявыносящего протока крысы

Было оценено влияние соединений A1-A9, B1-B6 и PPADS на активность экто-нуклеотидаз. Результаты представлены в Приложении в Таблице 35 и на Рисунках 9 и 10.

Соединение A4 достоверно повышало активность экто-нуклеотидаз мочевого пузыря крысы более, чем на 40%, A9 – на 25%; соединение A8 снижало активность на 15%.

Соединение B5 также достоверно повышало активность почти на 25%, B6 – на 14%; соединение B3 достоверно снижало активность экто-нуклеотидаз более, чем на 25%, B1 – на 17%. PPADS снижает активность почти на 18% (Рисунок 7).

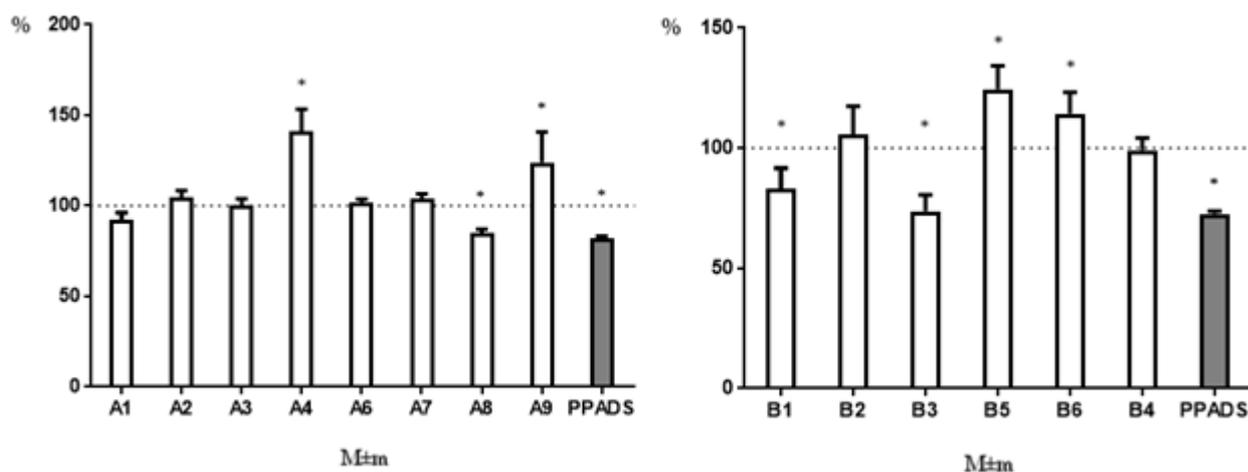


Рисунок 7 – Влияние соединений A1-A9, B1-B6 и PPADS в концентрации 10 мкМ на активность экто-нуклеотидаз изолированного мочевого пузыря крысы. Результаты представлены как % от исходной активности ферментов, принятой за 100%. n=8. * - $p \leq 0,05$ по сравнению с исходной активностью, U-критерий Манна-Уитни

Соединение A2 достоверно повышало активность экто-нуклеотидаз семявыносящего протока крысы почти на 35%, A8 – почти на 40%, A9 увеличивает активность ферментов на 15%. Соединение B1 достоверно снижало активность на 24%, B5 – более чем на 25%. Соединение B3 увеличивает активность на 12%. PPADS снижает активность ферментов более чем на 27% (Рисунок 8).

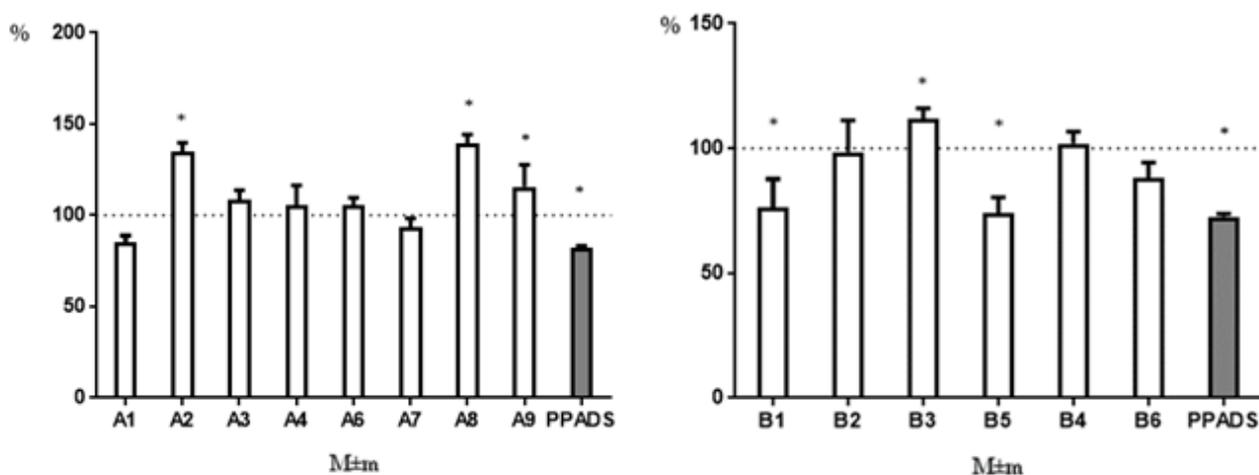


Рисунок 8 – Влияние соединений A1-A9, B1-B6 и PPADS в концентрации 10 мкМ на активность экто-нуклеотидаз изолированного семявыносящего протока крысы. Результаты представлены как % от исходной активности ферментов, принятой за 100%. n=8. * - $p \leq 0,05$ по сравнению с исходной активностью, U-критерий Манна-Уитни.

Остальные соединения не оказали достоверного влияния на активность экто-нуклеотидаз в этих тканях.

3.5. Анализ зависимости структура-активность для исследуемых соединений

При исследовании фармакологических свойств новых веществ одними из важных характеристик, которые необходимо учитывать для препаратов, являются их гидрофильность и липофильность. Это связано с тем, что, попадая в живой организм, вещества распределяются в различные органы и ткани, а характер распределения, в свою очередь, во многом определяется их способностью растворяться в воде и липидах. В Таблицах 7 и 8 представлены результаты расчета коэффициента липофильности для соединений азофенилсульфоновых и азофенилдисульфоновых производных пиридоксина.

Таблица 7 – Значения коэффициента липофильности (LogP) для азофенилсульфоновых производных пиридоксина (соединения А1-А9).

Шифр соединения	Значение LogP
А1	-1,33
А2	-0,81
А3	-0,29
А4	-0,28
А5	0,12
А6	2,36
А7	2,89
А8	-1,8
А9	-1,19

Таким образом, соединения А1-А4, А8 и А9 являются более гидрофильными, в то время как соединения А5-А7 – более липофильными.

Таблица 8 – Значения коэффициента липофильности (LogP) для азофенилдисульфоновых производных пиридоксина (соединения В1-В6).

Шифр соединения	Значение LogP
В1	-4,57
В2	-4,07
В3	-3,53
В4	-2,47
В5	-1,41
В6	-0,88

Все соединения серии В являются в большей степени гидрофильными.

Из сопоставления данных по липофильности соединений с результатами исследования их антагонистических свойств, представленными в главах 3.2 и 3.3 (Рисунок 9 и 10), следует, что взаимосвязь между этими параметрами отсутствует. Вещества, вызывающие достоверное угнетение сократительных ответов, имеют средние, в рассматриваемом ряду, значения Log P, при этом ряд соединений, не проявивших достоверной активности, имеют близкую липофильность.

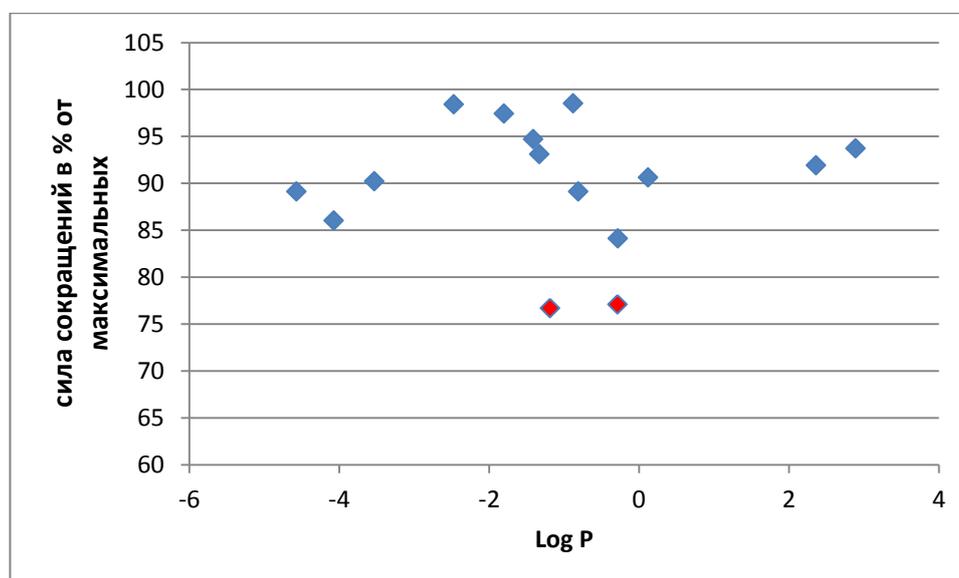


Рисунок 9. Зависимость силы сокращений изолированной ткани мочевого пузыря крысы от липофильности исследуемых соединений при 8 Гц (красным обозначены вещества, вызывающие достоверное угнетение сократительных ответов).

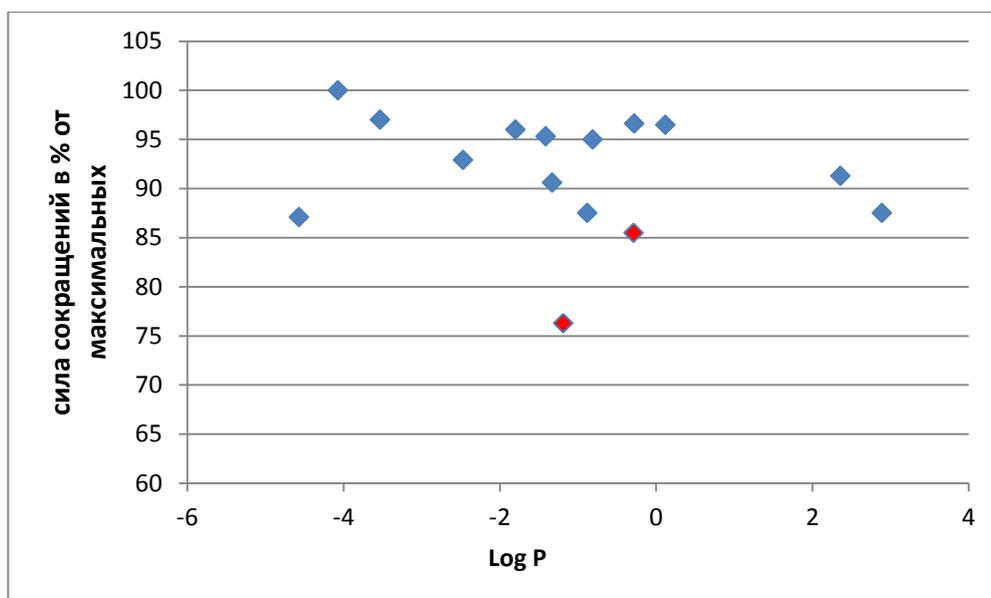


Рисунок 10. Зависимость силы сокращений изолированного семявыносящего протока от липофильности исследуемых соединений при 8 Гц (Красным обозначены вещества, вызывающие достоверное угнетение сократительных ответов).

На основании проведенных исследований, описанных выше в главах 3.1. – 3.4, нами был проведен анализ зависимости активности новых соединений от их химической структуры.

Мы установили, что в ряду циклических производных п-(1,5-дигидро-8-метил-9-гидрокси-[1,3]диоксепино[5,6-с]пиридинил-6-азо)фенилсульфоната натрия (соединения А1-А7) влияние вещества на сократительную активность изолированного мочевого пузыря и семявыносящего протока крысы, вызванную электрическим полем в присутствии атропина или фентоламина, зависит от наличия и количества радикалов у третьего углеродного атома. Отсутствие радикала (соединение А1) или присоединение лишь одного какого-либо радикала (метильного, этильного, изопропильного, гептильного или октильного) к атому углерода в положении 3 (соединения А2, А4, А5, А6 и А7) не приводит к какому-либо существенному влиянию соединений на сокращение указанных гладкомышечных органов. Однако, присоединение двух метильных радикалов в положении 3 (соединение А3) существенно изменяло активность вещества в

нашей тест-системе – как на ткани мочевого пузыря, так и семявыносящего протока соединение А3 угнетало сокращения, вызванные электрическим полем, что сопоставимо с аналогичной эффективностью эталонного вещества – PPADS.

Соединения А8 и А9 отличаются от соединений А1-А7 отсутствием конденсированного цикла. Соединение А8– *p*-[3,4-дигидроксиметил-5-гидрокси-6-метилпиридил-2-азо]фенилсульфонат натрия – не проявило какого-либо влияния на сокращения как мочевого пузыря, так и семявыносящего протока крысы, вызванные электрическим полем. Соединение А9– *n*-[3-(((2-гидроксиэтил)тио)метил)-4-гидроксиметил-5-гидрокси-6-метилпиридил-2-азо]-фенилсульфонат натрия – показало выраженное угнетающее влияние на сокращения мочевого пузыря, и лишь незначительно – на сокращения семявыносящего протока крысы, вызванные электрической стимуляцией.

Интересно отметить, что и в ряду циклических производных *p*-(1,5-дигидро-8-метил-9-гидрокси-[1,3]диоксепино[5,6-*c*]пиридинил-6-азо)фенилдисульфоната натрия (соединения В1-В6) наличие какого-либо радикала у третьего углеродного атома также никаким образом не сказалось на активности вещества по отношению к сокращениям изолированных гладкомышечных тканей крысы. Особенностью этой группы соединений стало то, что и диметильное производное фенилдисульфоната натрия (соединение В2) в отличие от диметильного производного фенилсульфоната (соединение А3) также было неактивно в наших экспериментах.

Аналогичный анализ зависимости эффекта от химической структуры был нами проведен и в отношении влияния соединений на активность экто-нуклеотидаз в ткани мочевого пузыря и семявыносящего протока крыс.

Соединение без радикала в третьем углеродном положении А1, диметильное производное А3, а также соединения А6 и А7 с гептильным и октильным заместителями не оказали существенного влияния на активность экто-нуклеотидаз в ткани мочевого пузыря и семявыносящего протока крыс. Соединение А9 – *n*-[3-(((2-гидроксиэтил)тио)метил)-4-гидроксиметил-5-гидрокси-6-метилпиридил-2-азо]-фенилсульфонат натрия – достоверно увеличивает

активность экто-нуклеотидаз в обеих исследованных тканях. Аналогичный эффект проявило соединение А4 на активность ферментов в ткани мочевого пузыря, а соединение А2 – в ткани семявыносящего протока. Соединение А8 оказало разнонаправленное действие на активность экто-нуклеотидаз в двух тканях.

В ряду циклических производных п-(1,5-дигидро-8-метил-9-гидрокси-[1,3]диоксепино[5,6-с]пиридинил-6-азо)фенилдисульфата натрия (соединения В1-В6) только диметильное производное (соединение В2) и пентильное производное (соединение В4) не оказали достоверного влияния на активность экто-нуклеотидаз как в ткани мочевого пузыря, так и в ткани семявыносящего протока крысы. Метильное производное (соединение В1) достоверно угнетало активность исследованных ферментов в обеих тканях, тогда как соединения В3, В5 и В6 проявили разносторонние эффекты на активность экто-нуклеотидаз в двух исследованных тканях.

Таким образом, на основании представленных результатов экспериментов и анализа зависимости структура-активность нами было установлено, что наиболее интересными соединениями для последующего изучения могут быть два соединения – А3 и А9.

Соединение А3 (п-(1,5-Дигидро-3,3,8-триметил-9-гидрокси-[1,3]диоксепино[5,6-с]пиридинил-6-азо)фенилсульфонат натрия) оказывает достоверное угнетающее влияние на сокращения изолированных мочевого пузыря и семявыносящего протока крысы, вызванные СЭП, которое можно сравнить с таковым эталонного вещества – PPADS. Однако, достоинством соединения А3, в отличие от PPADS, является то, что оно не угнетает активности экто-нуклеотидаз в обеих исследованных тканях.

Соединение А9 (п-[3-(((2-гидроксиэтил)тио)метил)-4-гидроксиметил-5-гидрокси-6-метилпиридил-2-азо]фенилсульфонат натрия) угнетает сокращения изолированного мочевого пузыря крысы, вызванные СЭП, даже более сильно, чем соединение А3, однако, его эффект не выражен в ткани семявыносящего протока

крысы. Кроме того, соединение А9 вызывает достоверное повышение активности экто-нуклеотидаз в обеих тканях.

Соединения А3 и А9 были признаны нами наиболее интересными по проведенным исследованиям и были отобраны нами для дальнейшего исследования.

3.6. Изучение влияния соединений А3 и А9 на P2X-рецептор-опосредованные сокращения мышечных препаратов мочевого пузыря и семявыносящего протока крысы, вызванные α,β -метилен-АТФ

На следующем этапе проводились эксперименты с использованием α,β -метиленАТФ – агониста P2X-рецепторов. Стимуляция этих рецепторов вызывает концентрационно-зависимые сокращения при концентрации агониста 0,3-3 мкМ.

Соединение А3 имело тенденцию к угнетению сокращений, вызванных α,β -метиленАТФ, при всех используемых концентрациях на препаратах обеих тканей. Достоверное угнетение сокращений наблюдалось на препаратах мочевого пузыря и семявыносящего протока при концентрации α,β -метиленАТФ 1 мкМ (Рисунок 11).

Вычисление логарифма средней эффективной концентрации агониста ($\log EC_{50}$) по нормализованным показателям сократительного ответа показало, что в мочевом пузыре эти цифры составляют -6.36 ± 0.14 в контроле и -5.90 ± 0.07 в присутствии соединения А3, что имеет достоверные различия ($p < 0.05$, Т-критерий Вилкоксона). Значения $\log EC_{50}$ в семявыносящем протоке составили -5.76 ± 0.15 и -5.55 ± 0.15 в контроле и в присутствии соединения А3, соответственно ($p > 0.05$).

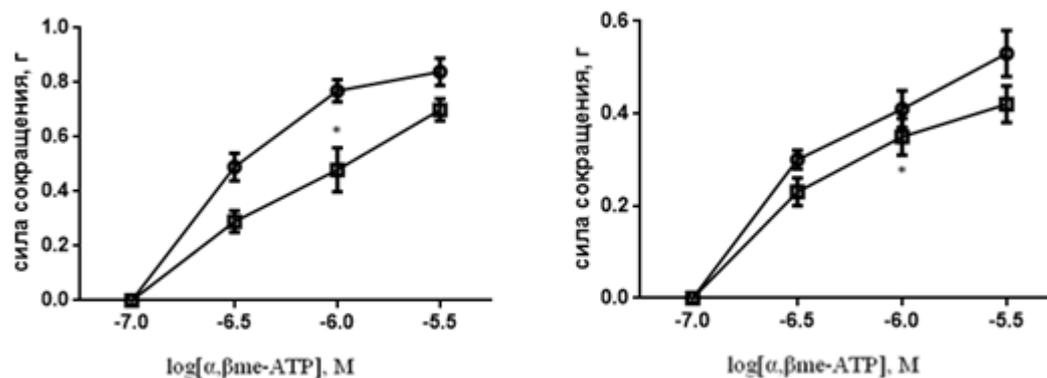


Рисунок 11 – Сокращения изолированного мочевого пузыря (слева) и семявыносящего протока (справа) крысы, вызванные α,β -метиленаТФ до (круглые символы) и после инкубации с соединением А3 (квадратные символы) в концентрации 10 мкМ. По оси ординат – сила сокращений в граммах, по оси абсцисс – десятичный логарифм концентрации агониста (n=6), Т-критерий Вилкоксона

Соединение А9 также имело тенденцию к угнетению сокращений, вызванных α,β -метиленаТФ, при всех используемых концентрациях на препаратах обеих тканей. Аналогично наблюдалось достоверное угнетение сокращений на препарате мочевого пузыря при концентрации агониста 1 мкМ и не наблюдалось достоверного угнетения сокращений семявыносящего протока крысы (Рисунок 12).

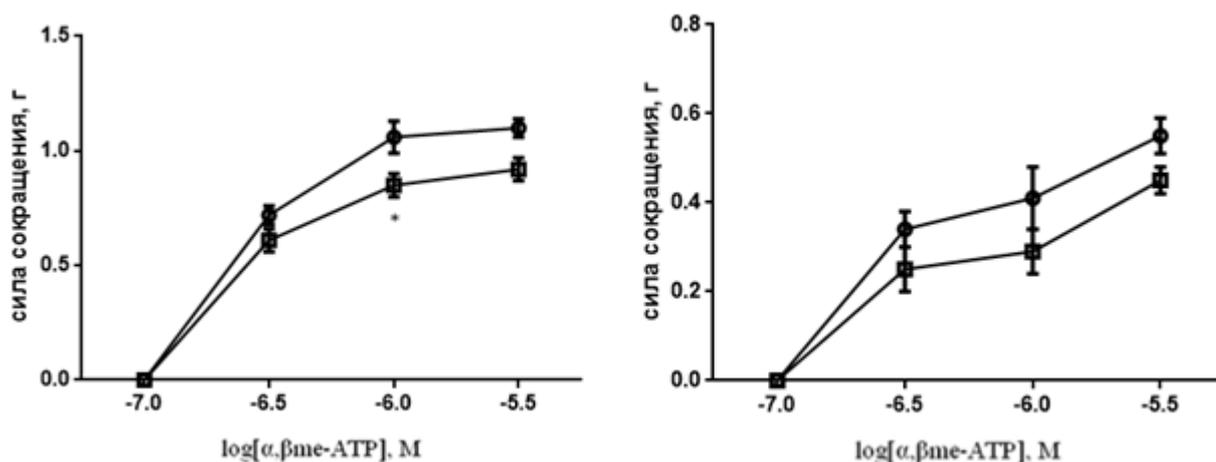


Рисунок 12 – Сокращения изолированного мочевого пузыря (слева) и семявыносящего протока (справа) крысы, вызванные α,β -метиленаТФ до (круглые символы) и после (квадратные символы) инкубации с соединением А9 в концентрации 10 мкМ. По оси ординат – сила сокращений в граммах, по оси абсцисс – десятичный логарифм концентрации агониста (n=6), Т-критерий Вилкоксона

Вычисление логарифма средней эффективной концентрации α,β -метиленаТФ показало, что в присутствии в среде соединения А9 $\log EC_{50}$ достоверно не изменялся ни в препаратах мочевого пузыря (-6.68 ± 0.31 и -6.50 ± 0.19 в контроле и опыте, соответственно), ни в препаратах семявыносящего протока (-5.80 ± 0.15 и -5.54 ± 0.13).

На препарате мочевого пузыря РРАДС вызывало достоверное угнетение сократительных ответов, вызванных α,β -метиленаТФ, в концентрациях 0,3 и 1 мкМ. На препарате семявыносящего протока крысы достоверное угнетение сокращений наблюдалось в концентрациях 1 и 3 мкМ (Рисунок 13).

Вычисление $\log EC_{50}$ показало, что в обеих тканях РРАДС вызывает достоверное увеличение этого показателя, которое было в мочевом пузыре -6.14 ± 0.14 и -5.72 ± 0.06 в контроле и в присутствии РРАДС, соответственно, в в

семьявыносящем протоке – -6.33 ± 0.12 и -5.98 ± 0.11 (в обоих случаях $p < 0.05$, T-критерий Вилкоксона).

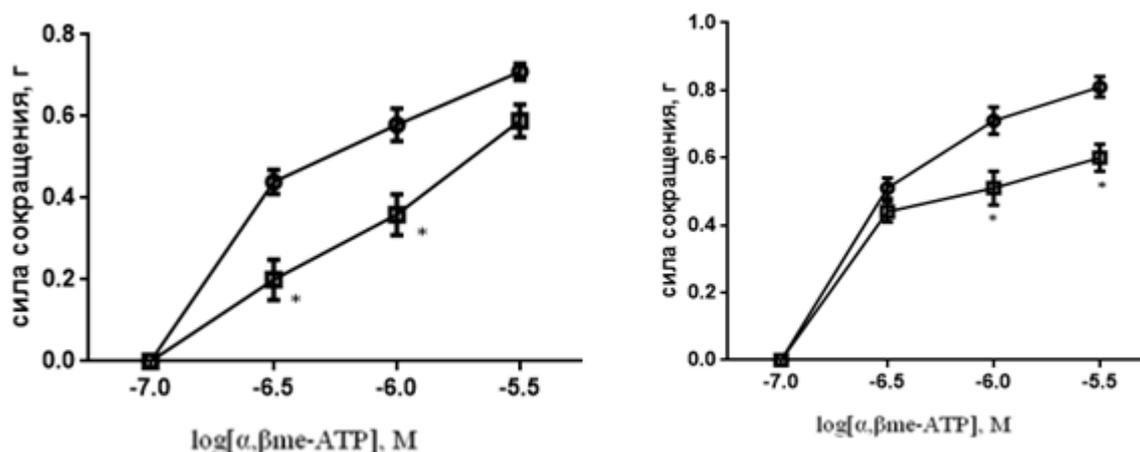


Рисунок 13 – Сокращения изолированного мочевого пузыря (слева) и семьявыносящего протока (справа) крысы, вызванные α,β -метиленаТФ до (круглые символы) и после инкубации с PPADS (ромбовидные символы) в концентрации 10 мкМ. По оси ординат – сила сокращений в граммах, по оси абсцисс – десятичный логарифм концентрации агониста ($n=6$), T-критерий Вилкоксона

Также результаты этого исследования представлены в Приложении, Таблицы 36-41.

3.7. Изучение влияния соединений А3 и А9 на P2Y-рецептор-опосредованные расслабления двенадцатиперстной кишки крысы

Стимуляция P2Y₁-рецепторов двенадцатиперстной кишки приводит к расслаблению гладких мышц и снижению тонуса ткани. С целью оценки функционирования P2Y₁-рецепторов подготовленный гладкомышечный препарат ткани предварительно тонизируют карбахолином [142].

На фоне повышения тонуса препарата двенадцатиперстной кишки карбахолином в концентрации $0,3\mu\text{M}$, стимуляция P2Y_1 -рецепторов электрическим полем или добавлением АТФ в концентрациях $1\text{-}30\mu\text{M}$ приводила к кратковременному понижению тонуса препарата ткани. Исследуемые соединения, АЗ и А9, достоверно не изменяли P2Y_1 -рецептор-опосредованные расслабления, вызванные СЭП или агонистом АТФ. PPADS достоверно угнетало P2Y_1 -опосредованные расслабления. Результаты представлены на Рисунках 14-16 и в Приложении, Таблицы 42-44.

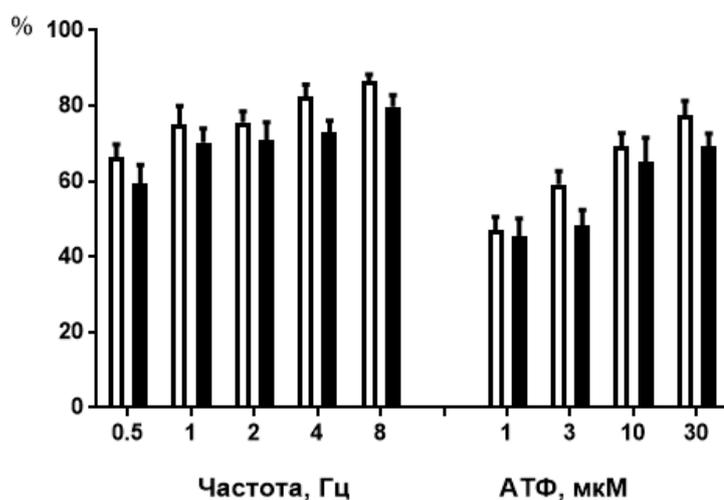


Рисунок 14 – Расслабления препарата двенадцатиперстной кишки крысы, вызванные СЭП частотой $0,5\text{-}8$ Гц и АТФ в концентрациях $1\text{-}30\mu\text{M}$, до (светлые столбики) и после инкубации с соединением АЗ (темные столбики) в концентрации $10\mu\text{M}$. Результаты приведены в процентах от максимального возможного расслабления, принятого за 100% . $p \leq 0,05$ от исходных ($n=6$), Т-критерий Вилкоксона

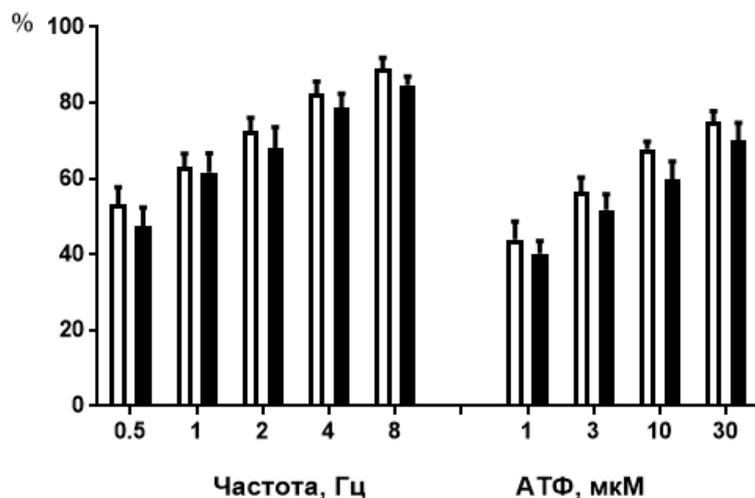


Рисунок 15 – Расслабления препарата двенадцатиперстной кишки крысы, вызванные СЭП частотой 0,5-8 Гц и АТФ в концентрациях 1-30мкМ, до (светлые столбики) и после (темные столбики) инкубации с соединением А9 в концентрации 10 мкМ. Результаты приведены в процентах от максимального возможного расслабления, принятого за 100%. $p \leq 0,05$ от исходных ($n=6$), Т-критерий Вилкоксона

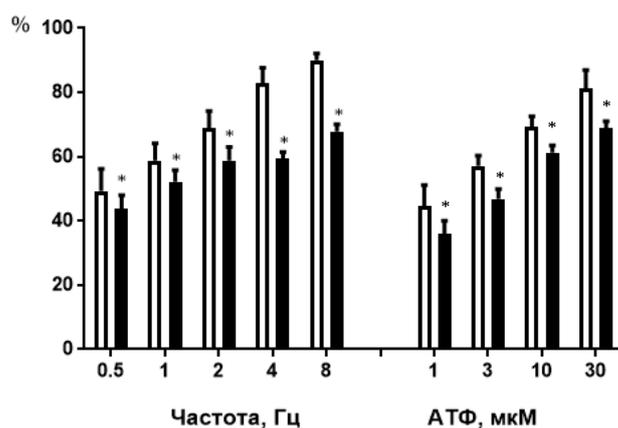


Рисунок 16 – Расслабления препарата двенадцатиперстной кишки крысы, вызванные СЭП частотой 0,5-8 Гц и АТФ в концентрациях 1-30мкМ, до (светлые столбики) и после (темные столбики) инкубации с РРАDС в концентрации 10 мкМ. Результаты приведены в процентах от максимального возможного

расслабления, принятого за 100%. * - $p \leq 0,05$ от исходных ($n=6$), Т-критерий Вилкоксона

Расчет значений $\log EC_{50}$ для АТФ показал, что эта величина была в контроле и в присутствии исследуемого вещества -5.68 ± 0.18 и -5.49 ± 0.17 для соединения А3, -5.62 ± 0.18 и -5.44 ± 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 ± 0.11 в присутствии PPADS, что достоверно отличалось от такового в контроле -5.65 ± 0.13 ($p < 0.05$, Т-критерий Вилкоксона).

Таким образом, исследования 15 новых производных пиридоксина показали, что 13 из них не оказывают достоверного влияния на сократительные ответы изолированного мочевого пузыря и семявыносящего протока крыс. Тем не менее, 2 соединения оказывают достоверное влияние на эти ответы, в особенности соединение А3, ингибирующее ответы как мочевого пузыря, так и семявыносящего протока в экспериментах со стимуляцией тканей электрическим полем. Эти же соединения, в отличие от PPADS, не оказывают достоверного влияния на $P2Y_1$ -рецептор-опосредованные расслабления двенадцатиперстной кишки крысы, что свидетельствует о селективности их действия в отношении $P2$ -рецепторов.

3.8. Изучение токсичности соединения А3 на мышах при внутрибрюшинном введении

Оценка токсичности соединения А3 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 А3 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 А3 естественный цвет

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

3.9. Изучение влияния соединения АЗ на отрицательное хронотропное действие 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 ведение соединения АЗ в дозах 10 или 100 мг/кг достоверно не повлияло на проявление отрицательного хронотропного действия АТФ – ни в одной из исследованных доз соединение АЗ ни на одном из исследованных временных промежутков (через 1, 3 и 10 мин) достоверно не изменило эффект АТФ (Таблица 9 и 10).

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 (Таблица 9 и 10).

Таблица 9 – Влияние внутривенного введения АТФ в дозе 1 мг/кг на частоту сердечных сокращений мышцы в контроле и при предварительном введении соединения АЗ в дозе 10 мг/кг на $M \pm m$ (%)

Контроль (исходная ЧСС, уд/мин)	АТФ 1 мг/кг	АЗ 10мг/кг			
		Без АТФ	АТФ через 1 мин	АТФ через 3 мин	АТФ через 10 мин
474±12 (100)	318±8 (67)	352±14 (74)	305±5 (64)	314±17 (66)	303±24 (64)

Таблица 10 – Влияние внутривенного введения АТФ в дозе 1 мг/кг на частоту сердечных сокращений мышцы в контроле и при предварительном введении соединения АЗ в дозе 100 мг/кг на $M \pm m$ (%)

Контроль (исходная ЧСС, уд/мин)	АТФ 1 мг/кг	АЗ 100мг/кг			
		Без АТФ	АТФ через 1 мин	АТФ через 3 мин	АТФ через 10 мин
495±18 (100)	320±10 (65)	437±39 (88)	307±17 (62)	327±27 (66)	293±30 (59)

Таблица 11 – Влияние внутривенного введения АТФ в дозе 1 мг/кг на частоту сердечных сокращений мышцы в контроле и при предварительном введении РРАДС в дозе 10 мг/кг на $M \pm m$ (%)

Контроль (исходная ЧСС, уд/мин)	АТФ 1 мг/кг	РРАДС 10 мг/кг			
		Без АТФ	АТФ через 1 мин	АТФ через 3 мин	АТФ через 10 мин
485±15 (100)	312±16 (64)	359±20 (74)	311±18 (64)	325±33 (67)	334±14 (69)

Таблица 12 – Влияние внутривенного введения АТФ в дозе 1 мг/кг на частоту сердечных сокращений мышцы в контроле и при предварительном введении PPADS в дозе 100 мг/кг на $M \pm m$ (%)

Контроль (исходная ЧСС, уд/мин)	АТФ 1 мг/кг	PPADS 100мг/кг			
		Без АТФ	АТФ через 1 мин	АТФ через 3 мин	АТФ через 10 мин
494±19 (100)	316±11 (64)	444±28 (90)	308±29 (62)	304±28 (61)	283±25 (57)

3.10. Изучение влияния соединения АЗ на поведение и психоэмоциональное состояние животных

3.10.1. Изучение влияния соединения АЗ на поведение животных на установке открытое поле-круг

У активных животных ориентировочно-исследовательская мотивация превалирует над эмоцией страха перед незнакомой обстановкой. В проведенных нами экспериментах в тесте «открытое поле» была зафиксирована ориентировочно-исследовательская активность животных: вертикальная (с опорой на стенку), горизонтальная двигательная активность, заглядывание в норки. Также зафиксирована спонтанная двигательная активность – число пересеченных квадратов.

Исследование проводили на 30 половозрелых мышах-самцах, массой 25-28 г, которые были разделены случайным образом на 5 групп по 6 особей в каждой.

После внутрибрюшинного введения контроля (растворитель-вода очищенная) и раствора исследуемого соединения АЗ в максимально использованной дозе получены следующие показатели: ориентировочно-двигательная активность животных контрольной группы составила $4,8 \pm 0,6$, спонтанная двигательная активность имела показатель $26,5 \pm 3,5$, показатели соединения АЗ 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 аналогичных экспериментах было оценено действие PPADS. Мы установили, что введение PPADS в дозах 10 и 100 мг/кг также не оказывает достоверного влияния на активность животных.

Результаты теста открытое поле, представленные в Таблице 13 и на Рисунке 17, позволяют сделать выводы об отсутствии влияния указанных соединений на ориентировочно-двигательную и спонтанную двигательную активность животных.

Таблица 13 – Показатели двигательной и ориентировочно-исследовательской активности у крыс на фоне введения исследуемых соединений в тесте ОП (количество двигательных актов, $M \pm m$).

Группы	Ориентировочно-двигательная активность	Спонтанная двигательная активность
АЗ 10мг/кг	$5,5 \pm 1,4$	$24,6 \pm 1,2$
АЗ 100мг/кг	$6,8 \pm 0,7$	$23,8 \pm 1,5$
PPADS 10мг/кг	$4,6 \pm 0,2$	$23,8 \pm 0,3$
PPADS 100мг/кг	$5,5 \pm 0,4$	$22,4 \pm 0,3$
контроль	$4,8 \pm 0,6$	$26,5 \pm 3,5$

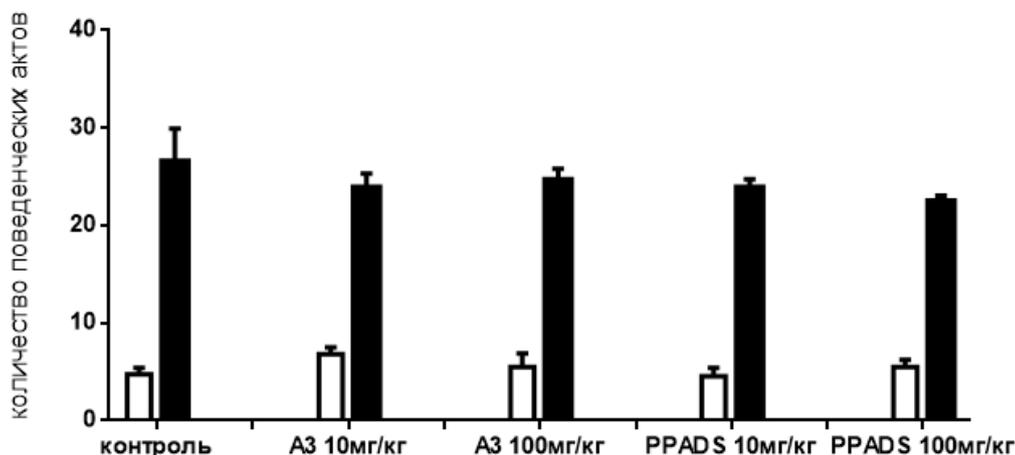


Рисунок 17. Влияние однократного введения соединений АЗ и PPADS на параметры поведения животных в тесте «открытое поле» (светлые столбики – суммарная ориентировочно-исследовательская активность, темные столбики – спонтанная двигательная активность).

3.10.2. Изучение влияния соединения АЗ на поведение животных на установке «темная/светлая камера»

В данной серии экспериментов оценивалось влияние соединений на предпочтение темноты или света; выраженность и динамика поведения «выглядывания».

Исследование проводили на 30 половозрелых мышах-самцах, массой 30-35 г, которые были разделены случайным образом на 5 групп по 6 особей в каждой.

После внутрибрюшинного введения раствора исследуемого соединения АЗ в максимально использованной дозе полученные показатели пребывания животного в светлом отсеке (55 ± 8 сек) достоверно не отличались от такового у

контрольной группы (52 ± 7 сек). Латентный период первого захода в отсек (45 ± 7 сек) также достоверно не отличался от такового у контрольной группы (42 ± 6 сек)

В аналогичных экспериментах установлено, что введение PPADS в дозах 10 и 100 мг/кг также не оказывает достоверного влияния на параметры поведения животных по сравнению с контрольной группой: 58 ± 4 сек, 61 ± 6 сек и 52 ± 7 сек, соответственно.

Результаты теста темная/светлая камера, представленные в Таблице 14 и на Рисунке 18, также подтверждают отсутствие влияния исследованных веществ на поведенческие реакции животных.

Таблица 14 – Влияние исследуемых соединений при однократном внутрибрюшинном введении на двигательную активность в установке «темная/светлая камера», (время, сек, $M \pm m$)

Показатель	контроль	A3 10 мг/кг	A3 100 мг/кг	PPADS 10 мг/кг	PPADS 100мг/кг
латентный период первого захода в темный отсек, сек	42 ± 6	$38,5 \pm 5$	45 ± 7	38 ± 4	$43 \pm 0,3$
число перемещений в обоих направлениях	$3 \pm 0,6$	$2,8 \pm 0,4$	$3 \pm 0,7$	$3 \pm 0,2$	$3 \pm 0,1$
общее время в светлом отсеке, сек	52 ± 7	60 ± 6	55 ± 8	58 ± 4	61 ± 6
общее время в темном отсеке, сек	128 ± 24	120 ± 15	125 ± 15	122 ± 10	119 ± 8

<i>Продолжение таблицы 14</i>					
КОЛ-ВО ВЫГЛЯДЫВАНИЙ В СВЕТЛЫЙ ОТСЕК	6,6±0,5	5±0,3	4,8±0,7	5,2±0,4	6,2±0,3
число вставаний на задние лапы	3,2±0,4	2,8±0,3	2,7±0,4	2,5±0,2	3,3±0,4

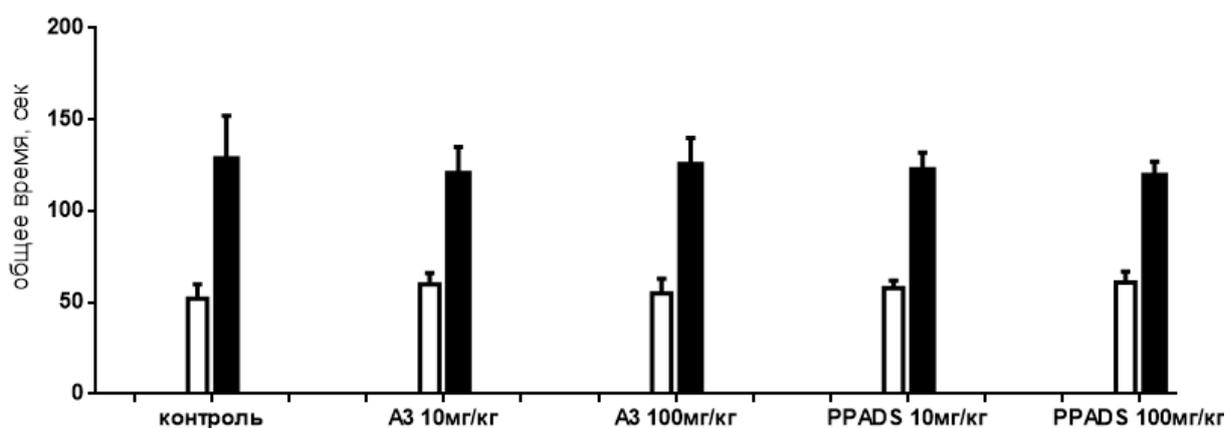


Рисунок 18. Влияние однократного введения соединений АЗ и PPADS на параметры поведения животных в тесте «темная/светлая камера» (светлые столбики – общее время в светлом отсеке, темные столбики – общее время в темном отсеке).

3.10.3. Изучение влияния соединения АЗ на поведение животных на установке приподнятый крестообразный лабиринт

В установке «приподнятый крестообразный лабиринт» изучили влияние указанных доз АЗ и PPADS. В качестве основного показателя использовали время нахождения животных в открытом рукаве, также учитывали латентное время выхода в открытый рукав, количество выходов в открытый рукав, количество свешиваний и стоек.

Исследование проводили на 30 половозрелых мышах самцах массой 25-35 г, которые были разделены случайным образом на 5 групп по 6 особей в каждой.

После внутрибрюшинного введения раствора исследуемого соединения АЗ в максимально использованной дозе полученные показатели пребывания животного в открытом рукаве (153 ± 5 сек) достоверно не отличались от такового у контрольной группы (158 ± 4 сек). Количество выходов в открытый рукав ($2,5 \pm 0,4$) также достоверно не отличался от такового у контрольной группы ($2,2 \pm 0,1$)

После внутрибрюшинного введения PPADS в дозах 10 и 100 мг/кг также не установлено достоверного влияния на параметры поведения животных по сравнению с контрольной группой: 160 ± 3 сек, 168 ± 5 сек и 158 ± 4 сек, соответственно.

Результаты теста приподнятый крестообразный лабиринт, представленные в Таблице 15 и на Рисунке 19, подтверждают выводы об отсутствии влияния исследованных соединений на поведенческие реакции животных.

Таблица 15 – Влияние исследуемых соединений при однократном внутрибрюшинном введении на поведение мышей в условиях методики приподнятого крестообразного лабиринта, (время, сек, $M \pm m$)

Показатель	контроль	АЗ 10 мг/кг	АЗ 100 мг/кг	PPADS 10 мг/кг	PPADS 100мг/кг
время нахождения в открытом рукаве (сек)	158 ± 4	165 ± 7	153 ± 5	168 ± 5	160 ± 3
латентное время выхода в открытый рукав (сек)	$6,02 \pm 0,5$	$5,04 \pm 0,3$	$6,15 \pm 0,4$	$6,8 \pm 0,7$	$5,24 \pm 0,6$
кол-во выходов в открытый рукав	$2,16 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,3$	$2,5 \pm 0,4$	$3,1 \pm 0,8$	$3,5 \pm 0,4$

<i>Продолжение таблицы 15</i>					
кол-во свешиваний	5,1±0,2	3,8±0,4	4,8±0,3	3,2±0,2	5,0±0,3
кол-во стоек	2,4±0,3	3,1±0,2	4,2±0,2	3,5±0,5	4,1±0,2

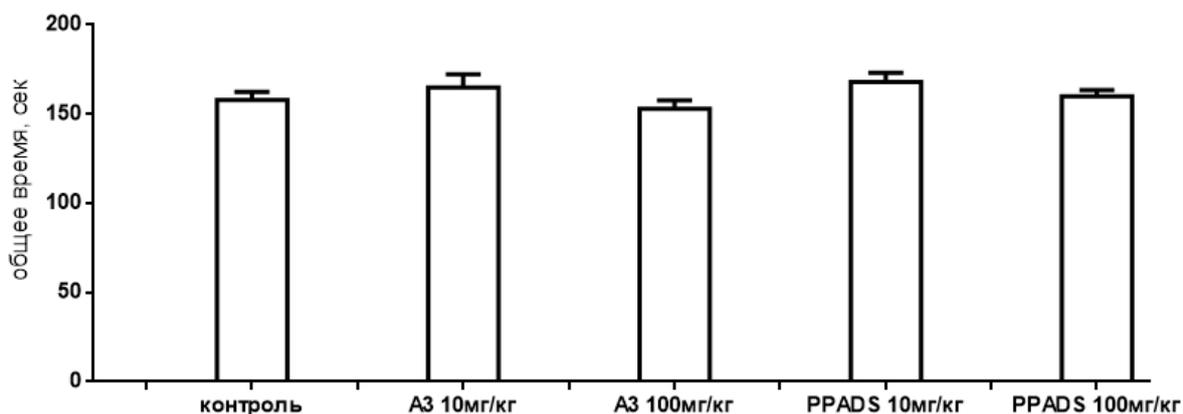


Рисунок 19. Влияние соединений на продолжительность времени, проводимого животными в открытых рукавах в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт»

3.10.4. Изучение влияния соединения АЗ на психоэмоциональное состояние животных в тесте принудительного плавания по Porsolt

В данном тесте регистрировали время активного плавания и иммобилизации, а также количество попыток выбраться.

Исследование проводили на 30 половозрелых мышах самцах массой 29-34 г, которые были разделены случайным образом на 5 групп по 6 особей в каждой.

Принудительное плавание в контрольной группе животных вызывало реакцию иммобилизации продолжительностью 145 ± 8 сек, что было в 1,5 раза меньше времени, затраченного на активное плавание - 215 ± 2 сек. Время иммобилизации в опытной группе после введения дозы АЗ 10мг/кг составило

152±9 сек, дозы 100 мг/кг – 175±6 сек. Время иммобилизации в группе препарата сравнения после введения дозы PPADS 10 мг/кг составило 148±6 сек, дозы 100 мг/кг - 168±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 (Рисунок 20), что свидетельствует об отсутствии влияния исследуемых соединений на психоэмоциональное состояние животных.

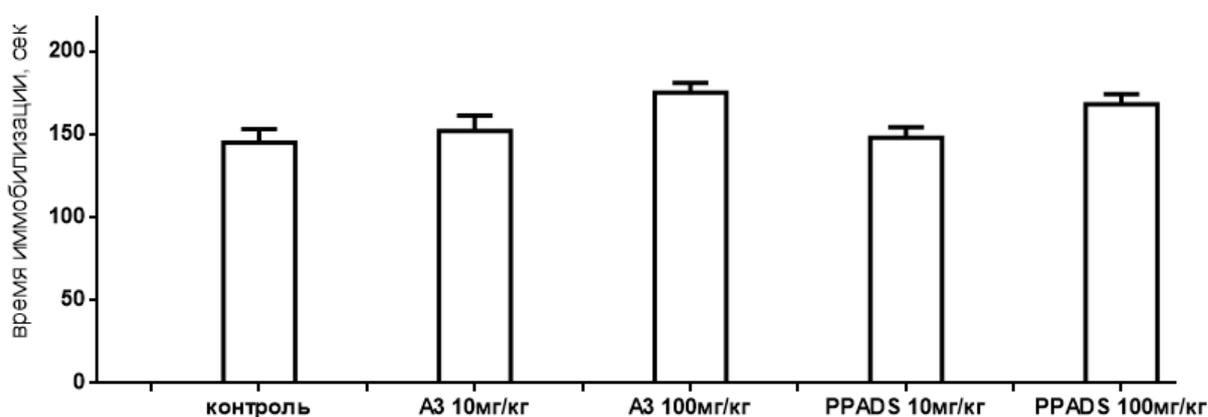


Рисунок 20. Влияние исследуемых соединений на поведение отчаяния в тесте Porsolt

3.11. Изучение антитромботической активности соединения АЗ на крысах

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 ED₅₀ исследуемого соединения составила 66,2 мг, ацетилсалициловой кислоты – 119мг, клопидогреля – 113,9мг (Таблица 16).

Таблица 16 – Антитромботическая активность соединения АЗ (per os) на модели артериального тромбоза, индуцированного 50% раствором FeCl₃

Вещество	Доза, мг/кг	Время образования тромба, мин	Δ% пролонгирования времени образования тромба	ED ₅₀ , 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*	
АСК	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, $p \leq 0,01$)

АСК-ацетилсалициловая кислота

3.12. Изучение антагонистической активности соединения АЗ в отношении P2Y₁₂ и P2Y₁-рецепторов тканей кролика *in vitro*

Поскольку по результатам прогнозирования активности исследуемых соединений с помощью системы PASS установлено, что соединение АЗ может обладать антагонистической активностью в отношении P2Y-рецепторов, были проведены следующие эксперименты.

В ходе проведенных исследований *in vitro* по изучению антагонистической активности соединения АЗ в отношении P2Y₁₂-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 17).

В качестве контроля используется богатая тромбоцитами плазма кролика с добавлением индуктора АДФ.

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

Таблица 17 – 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 P2Y₁-рецепторов тканей кролика установлено, что данное соединение в концентрации 1 мкМ в безкальциевой среде ингибирует агрегацию тромбоцитов, индуцированную 70нМ АДФ. В качестве препарата сравнения использован антагонист P2Y₁-рецепторов MRS 2179. Уровень активации тромбоцитов составил 0,75 ± 0,07, что статистически значимо по отношению к контролю. Подавление активации тромбоцитов в безкальциевой среде составило 60,79±3,62% (Таблица 18).

Таблица 18 – Изучение влияния соединения АЗ 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, Δ% (M±m)
1	Контроль	1,91 ± 0,33	-
2	АЗ	0,75 ± 0,07*	60,79±3,62
3	MRS 2179	0,17 ± 0,04*	91,1 ±2,1

Примечание

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

3.13. Изучение антиноцицептивной активности соединения АЗ на крысах

3.13.1. Влияние соединения АЗ на антиноцицептивные эффекты в тесте электрической стимуляции корня хвоста

При постепенно нарастающем электроболевым раздражении корня хвоста крыс наблюдались соответствующие ноцицептивные реакции: рефлекс «Отдергивания хвоста», голосовые реакции - «Вокализация», «Пролонгированная вокализация», характеризующие эмоциональный компонент боли. В группе контроля данные показатели через 60 минут составляли в среднем 0,66±0,06; 0,94±0,09 и 1,57±0,14 мВ соответственно (Таблица 19).

Таблица 19 – Влияние соединений АЗ, Буторфанола на антиноцицептивные эффекты в тесте электрической стимуляции корня хвоста ($M \pm m$)

Вещество	Напряжение, вызывающее ноцицептивную реакцию, мВ	
	Время после введения тестируемых веществ, мин	
	60	120
Тест «отдергивания хвоста»		
Контроль	0,66±0,06	0,68±0,15
АЗ (66 мг/кг)	0,73±0,08	0,75±0,04
АЗ (132 мг/кг)	0,78±0,16	0,81±0,09
Буторфанол (1 мг/кг)	0,97±0,15*	0,92±0,15*
Тест «вокализация»		
Контроль	0,94±0,09	1,12±0,16
АЗ (66 мг/кг)	0,91±0,11	0,93±0,06
АЗ (132 мг/кг)	1,33±0,11	1,11±0,18
Буторфанол (1 мг/кг)	2,15±0,39*	1,83±0,14*
Тест «пролонгированная вокализация»		
Контроль	1,57±0,14	1,68±0,13
АЗ (66 мг/кг)	1,54±0,38	1,60±0,35
АЗ (132 мг/кг)	1,50±0,21	1,63±0,16
Буторфанол (1 мг/кг)	2,67±0,48*	2,28±0,12*

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

Соединение АЗ в изученном диапазоне доз при внутрижелудочном введении не оказывало достоверного антиноцицептивного действия. Препарат сравнения буторфанол на 60 мин исследования в тесте «Отдергивания хвоста» вызывал статистически значимое увеличение ноцицептивной реакции на 47%, а значения порогового напряжения голосовой реакции животных в тестах «Вокализации» и «Пролонгированной вокализации» статистически значимо повышались на 128 и 70% соответственно. Значения порогового напряжения

голосовой реакции животных в тестах «Отдергивания хвоста», «Вокализации» и «Пролонгированной вокализации» после введения буторфанола к 120 мин исследования достоверно увеличивались на 35, 63 и 36 % соответственно.

3.13.2. Влияние соединения А3 на антиноцицептивные эффекты в тесте «tail-flick»

Латентный период ноцицептивного ответа на термическое раздражение в тесте «tail-flick» в контрольной группе животных составлял $4,2 \pm 0,6$ секунд (Таблица 20).

Таблица 20 – 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)	$6,8 \pm 0,2$	$8,1 \pm 0,35^*$
Буторфанол (1 мг/кг)	$9,8 \pm 1,1^*$	$8,4 \pm 0,6^*$

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

Соединение А3 в дозе 66 мг/кг не вызвало достоверного увеличения латентного периода, в то время как в дозе 132 мг/кг через два часа после введения 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.

3.13.3. Влияние соединения А3 на антиноцицептивные эффекты в тесте «hot plate»

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 (Таблица 21).

Таблица 21 – Влияние соединений А3, Буторфанола на антиноцицептивные эффекты в тесте «hot plate» ($M \pm m$).

Доза, мг/кг	Латентный период облизывания лапы, сек	
	через 60 мин	через 120 мин
Контроль	$9,2 \pm 0,7$	$7,3 \pm 0,5$
А3 (66 мг/кг)	$7,6 \pm 0,3$	$6,3 \pm 0,8$
А3 (132 мг/кг)	$8 \pm 0,1$	$6,4 \pm 0,9$
Буторфанол (1 мг/кг)	$17,1 \pm 1,9^*$	$12,1 \pm 1,1^*$

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

Исследуемое соединение А3 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.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На сегодняшний день проведено и опубликовано значительное количество исследований, посвященных P2-рецепторам (по ключевому слову «P2 receptors» в базе данных Medline-Pubmed выявляется около 8,5 тысяч публикаций). Установлена структура, расположение, значение P2-рецепторов в организме человека и животных [38, 58, 135, 139]. Исследовано множество соединений агонистов и антагонистов этих рецепторов [132, 136, 160]. Несмотря на то, что изучение соединений, активных в отношении пуринорецепторов продолжается, и имеется значительный прогресс в этой области, до сих пор не существует достаточно активного и селективного антагониста P2X-рецепторов. Исходя из анализа литературы установлено, что большинство соединений, активных в отношении пуринорецепторов, по химической структуре являются азотсодержащими гетероциклами, поэтому для настоящего исследования был выбран именно этот класс химических соединений.

Основой для создания целого ряда антагонистов пуринорецепторов послужил PPADS, и модификации соединений затрагивали бензольное кольцо, а в пиридиновом цикле присутствовали фосфатные, фосфонатные, альдегидные и аминогруппы [217]. Известны модификации PPADS и изо-PPADS, в которых фосфорные и сульфоновые фрагменты заменены на карбоксильные, что проявляется в некоторой избирательности антагонистического действия в отношении P2X1 и P2X3 рецепторов [144]. В отношении структурных аналогов PPADS, имеющих различные заместители у атомов углерода фенильного кольца, установлено, что наличие и положение атома хлора не влияет на проявление антагонистической активности. То же касается и карбоксильной группы у атомов углерода фенильного кольца. Известно, что наличие сульфогруппы в фенильном фрагменте является важным для проявления антагонистических свойств. В

частности, одно из наиболее эффективных соединений имело три сульфогруппы в нафтильном фрагменте [12]. Таким образом, в антагонистической активности соединений играет роль наличие сульфогрупп, их количество и положение в цикле.

Исследованные нами соединения представляют собой продукты модификации пиридоксина. В отличие от PPADS, в данных соединениях вместо гидрофильной, отрицательно заряженной фосфатной группы, применяется ацетальный фрагмент с различными алкильными заместителями у ацетального атома углерода, что позволяет варьировать гидрофильно-липофильный баланс молекулы, оказывающий значительное влияние на биологические свойства.

В наших исследованиях PPADS использован в качестве вещества сравнения. Это классический антагонист, доступный для использования в необходимых количествах, и имеющий преимущество перед другими анализаторами по количеству исследований, проведенных ранее. В работе были исследованы 15 новых веществ, структурных аналогов PPADS.

PPADS модифицировали не только путем замены фосфорных и сульфоновых фрагментов на карбоксильные, но и вводили в структуру более стабильную углеродную, эфирную или амидную связь вместо азогруппы. Среди заместителей в положении 2, *m*-феноксипбензильная группа показала оптимальную селективность и эффективность в отношении P2X₃-рецепторов, что выражалось в ингибировании болевых импульсов в спинном мозге крысы [81].

В наших исследованиях установлено, что введение в структуру пиридоксина гидрофобных групп в 4,5 положении увеличивает селективность в отношении P2X-рецепторов, а наличие анионного центра в пиридоксиновой части не является обязательным условием для проявления антагонистической активности.

Ранее было показано, что соединения на основе сульфаниловой кислоты и пиридоксина обладают антибактериальной активностью, но данных об их активности по отношению к пуринорецепторам отсутствовали [22].

В начале работы были получены результаты компьютерного прогнозирования вероятности наличия фармакологической активности в тест-системе PASS, которые позволяют предполагать высокую вероятность наличия у соединений производных пиридоксина активности в отношении P2X1- и P2X3-рецепторов. P2X1-рецепторы преимущественно располагаются в гладкомышечных тканях и опосредуют их сокращение, тогда как P2X3-рецепторы в значительной степени имеются в периферической и центральной нервных системах и опосредуют проведение и восприятие болевых импульсов. Поэтому для оценки действия соединений нами были выбраны модели и тесты, в которых имеется возможность оценить участие именно этих подтипов P2-рецепторов.

В ходе последующих исследований установлено, что только два соединения среди исследуемых, A3 и A9, вызывают достоверное угнетение сократительных ответов мочевого пузыря крысы, и одно соединение, A3, вызывает достоверное угнетение сократительных ответов семявыносящих протоков крысы, опосредуемых P2X рецепторами.

Соединения группы В, как и PPADS, являются производными бензолдисульфоновой кислоты. Тем не менее, не смотря на большее сходство структуры с PPADS по сравнению с веществами серии А, здесь введение второй сульфогруппы не приводит к увеличению антагонистической активности, о чем свидетельствует отсутствие достоверного влияния соединений группы В на P2X-рецепторы в экспериментах по оценке механической активности изолированных тканей крысы.

При изучении липофильности *in silico* выявлено, что соединения A1-A4, A8 и A9 являются более гидрофильными, в то время как соединения A5 и A6 – более липофильными, а все соединения группы В являются в большей степени гидрофильными. При анализе влияния липофильности на силу сокращения изолированных мышечных волокон крысы зависимости силы сокращения от значения коэффициента липофильности не установлено ни для одной из частот, как для изолированной ткани мочевого пузыря, так и для ткани семявыносящего протока.

Несомненным достоинством соединений А3 и А9 является отсутствие влияния на P2Y₁-рецепторы двенадцатиперстной кишки, что следует из результатов экспериментов, проведенных на изолированной ткани двенадцатиперстной кишки крысы.

Немаловажным является тот факт, что отобранные соединения не влияют на активность экто-нуклеотидаз. Экто-нуклеотидазы представляют собой семейство ферментов, разрушающих пуриновые нуклеотиды во внеклеточном пространстве. Роль этих ферментов не до конца выяснена, однако, несомненно, то, что они играют важную роль возле P2-рецепторов для удаления естественного агониста (чаще всего, АТФ) этих рецепторов (аналогично действию ацетилхолинэстеразы в холинергическом синапсе). Известно, что многие антагонисты P2-рецепторов, в том числе такие наиболее широко используемые как сурамин, PPADS, реактив синий-2 и др., угнетают активность экто-нуклеотидаз [11], и это может маскировать реальный эффект этих антагонистов на функционирование рецептора.

Поэтому отсутствие влияния соединения А3 на активность экто-нуклеотидаз в тех тканях, где нами установлен их антагонизм с P2X-рецепторами (мочевой пузырь и семявыносящий проток крысы) свидетельствуют о несомненном преимуществе этого соединения по сравнению с PPADS, с которым он сходен по структуре.

При сравнении эффектов соединений А3 и А9 между собой становится очевидно, что соединение А3 имеет некоторые преимущества. В экспериментах со стимуляцией электрическим полем соединение А3 проявляет антагонизм как в мочевом пузыре, так и семявыносящем протоке крыс, в отличие от соединения А9, которое эффективно в основном в мочевом пузыре. Соединение А3 не влияет, а соединение А9 увеличивает активность экто-нуклеотидаз в тканях мочевого пузыря и семявыносящего протока крыс. Кроме того, в экспериментах с агонистом P2X-рецепторов α,β -метилен-АТФ только соединение А3 проявило достоверный антагонизм на обеих тканях. Поэтому, мы считаем, что именно

соединение АЗ является лидером из исследованной нами группы химических веществ.

Таким образом, на основании результатов фармакологических исследований на изолированных тканях и проведенного анализа влияния соединений на распад внеклеточных нуклеотидов, мы установили, что соединение АЗ не только не уступает по антагонизму с P2X-рецепторами эталонному веществу PPADS, но и превосходит его по селективности действия и отсутствию ингибирующего влияния на активность экто-нуклеотидаз.

Поэтому в следующей серии экспериментов мы решили сравнить эффективность соединения АЗ и PPADS в экспериментах *in vivo*. К сожалению, очень мало моделей, на которых можно оценить на целом организме влияние соединений на эффекты, опосредуемые P2-рецепторами. Одной из таких моделей является хорошо известное свойство АТФ при внутривенном введении резко замедлять частоту сердечных сокращений (отрицательное хронотропное действие) [202]. При этом установленным антагонистическим эффектом обладает аминофиллин [69].

Отрицательное хронотропное действие АТФ было впервые продемонстрировано более 80 лет назад [95], однако лишь сравнительно недавно было показано, что он реализуется вагусом, а запускается влиянием АТФ на P2X_{2/3}-рецепторы, расположенные в левом желудочке [240]. При этом установлено, что ингибировать этот эффект АТФ могут антагонисты этих рецепторов (TNP-АТФ) только при внутрикоронарном введении [240]. Влияние PPADS и каких-либо других антагонистов P2-рецепторов на этот эффект АТФ никем ранее не исследовалось.

Наше исследование показало, что ни PPADS, ни соединение АЗ в исследованных дозах не способны как-либо изменить отрицательный хронотропный эффект АТФ. Мы предполагаем, что это связано с тем, что PPADS, так же, как и в других тканях, не оказывает влияния на P2X_{2/3} рецепторы левого желудочка миокарда, откуда начинаются вагус-зависимый отрицательный хронотропный эффект АТФ. В этом с ним, вероятно, сходно и соединение АЗ.

P2X₃-рецепторы были идентифицированы на сенсорных нейронах и нервных окончаниях, опосредуя как физиологические рефлекторные реакции, так и ноцицепцию [72]. По результатам проведенных ранее исследований установлено, что блокада P2X₃-рецепторов способствует уменьшению хронической боли [114]. Предполагается наличие терапевтической эффективности у антагонистов P2X₃-рецепторов при лечении заболеваний ЦНС, в частности, эпилепсии [253] и сосудистых нарушений (мигрень) [147, 244]. В результате анализа соединения АЗ в тест-системе PASS обнаружено, что оно проявляет антагонистическую активность в отношении P2X₃-рецепторов с индексом отношения правдоподобий 365, поэтому было решено исследовать у него наличие психотропной и анальгетической активности.

Методы изучения психотропной активности, использованные в данной работе, широко применяются в исследованиях новых соединений. При этом в качестве позитивных препаратов сравнения используют антидепрессанты (мелипрамин), ноотропные средства и анксиолитики (пираретам, фенибут, диазепам), что доказывает работоспособность применяемых методик [18, 20].

Для изучения влияния данного соединения на поведение и психоэмоциональное состояние животных этого были проведены следующие виды исследований: тест «открытое поле-круг», «темно-светлая камера», «приподнятый крестообразный лабиринт» и «принудительное плавание по Porsolt». По результатам всех видов перечисленных исследований выявлено отсутствие влияния как PPADS, так и соединения АЗ в исследованных дозах на поведение животных.

При изучении анальгетической активности установлено, что через два часа после введения соединения АЗ в дозе 132 мг/кг наблюдалось достоверное увеличение порога болевой реакции относительно контроля на 34,5%. Препарат сравнения Буторфанол статистически значимо повышал анальгетический эффект через 120 мин после введения на 38% соответственно.

В настоящее время имеется несколько классов различных лекарственных препаратов, которые способны угнетать функции тромбоцитов с помощью

различных механизмов действия. В клинической практике подтверждена эффективность лишь ацетилсалициловой кислоты, тиенопириринов (тиклопидина и клопидогрела), дипиридамола в сочетании с ацетилсалициловой кислотой, а также антагонистов GP IIb/IIIa для внутривенного применения. Для проявления веществами антиагрегантной активности необходимо, чтобы в их химической структуре присутствовал ароматический, насыщенный и/или ненасыщенный гетероцикл с одним или несколькими атомами азота. На основании обзора литературных данных [169, 192, 211, 218], а также на основании исследований, проведенных ранее на кафедре фармакологии Волгоградского Государственного Медицинского университета, выявлена способность гетероциклических азотсодержащих соединений блокировать агрегацию тромбоцитов [19, 26]. В проведенных нами экспериментах установлено, что соединение АЗ, производное пиридоксина, имеющее в своей структуре азотсодержащий гетероцикл, оказывает антитромботическое действие *in vivo*, а в условиях *in vitro* подавляет функциональную активность тромбоцитов путем блокирования P2Y₁₂-рецепторов, что делает его перспективным для направленного поиска новых соединений с высокой антиагрегантной активностью.

Результаты проведенных исследований доказывают, что выбранный нами класс химических соединений представляет значительный интерес для поиска новых антагонистов P2-рецепторов, используемых в экспериментальной фармакологии. При этом следует подчеркнуть, что хотя проведенный нами компьютерный прогноз фармакологической эффективности в системе PASS и не оправдался в полной мере, позволил наметить план исследований, который позволил установить наличие или отсутствие 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)-фенилсульфо кислоты 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В проведенном исследовании нами было оценено влияние нескольких новых соединений из группы азофенилсульфонатов и азофенилдисульфонов пиридоксина, являющихся близкими по химической структуре известному антагонисту P2-рецепторов PPADS.

Все исследованные соединения по результатам прогноза спектра фармакологической активности в системе PASS обладают определенной антагонистической активностью в отношении P2X-рецепторов. Проведенные нами в последующем исследования не подтвердили в полной мере полученный нами прогноз, однако позволили наметить план настоящего исследования.

Мы установили, что одно из исследованных соединений, имеющее лабораторный шифр АЗ, в экспериментах на изолированных гладкомышечных препаратах мочевого пузыря и семявыносящего протока крысы проявляет очевидный антагонизм по отношению к сократительным ответам этих тканей, опосредуемым P2X-рецепторами, поскольку они вызываются стимуляцией электрическим полем в присутствии блокаторов М-холино- (в экспериментах с мочевым пузырем) или альфа-адренорецепторов (в экспериментах с семявыносящим протоком).

Аналогичный антагонизм соединение АЗ проявило в отношении сократительных ответов этих же тканей, которые вызывались агонистом P2X-рецепторов – α,β -метиленаТФ, являющимся синтетическим энзиматически стойким аналогом АТФ.

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.

Важно подчеркнуть, что в проведенных экспериментах антагонистический эффект соединения АЗ по отношению к ответам, опосредуемым P2X-рецепторами, был сопоставим с таковым PPADS, что вдохновило нас на проведение дальнейших сравнительных экспериментов влияния этих двух веществ на ответы, опосредуемые P2Y-рецепторами.

Мы установили, что в экспериментах на изолированных препаратах продольных мышц двенадцатиперстной кишки крысы соединение АЗ не изменяет P2Y₁-рецептор-опосредованное расслабление тонизированной карбахолином мышцы, вызванное введением АТФ или электрической стимуляцией полем. При этом, в подтверждение ранее известных фактов, PPADS оказывал небольшое, но достоверное угнетение этих ответов. Таким образом, мы установили, что в наших экспериментах соединение АЗ, в отличие от PPADS, проявило селективность антагонистического действия только по отношению к P2X-рецепторам, не влияя на ответы, опосредуемые P2Y₁-рецепторами.

Еще одно преимущество соединения АЗ по сравнению с PPADS проявилось в том, что в экспериментах с изучением активности экто-нуклеотидаз гладких мышц мочевого пузыря и семявыносящего протока крысы соединение АЗ никак не влияло на ферментативный распад АТФ этими тканями, тогда как PPADS, в соответствии с ранее известными его свойствами, оказывал ингибирующее действие на энзиматическую деградацию АТФ.

Эти результаты стимулировали нас на проведение серии экспериментов, в которой мы предприняли попытку оценить эффективность соединения АЗ в сравнении с таковой PPADS на целом организме (*in vivo*). В качестве модели было использовано хорошо известное свойство АТФ вызывать отрицательное хронотропное действие при внутривенном введении. Этот эффект АТФ мы оценивали на фоне введения в организм животного соединения АЗ и PPADS. К сожалению, в этой серии экспериментов нам не удалось выявить никакого действия по отношению к эффекту АТФ ни соединения АЗ, ни PPADS.

В экспериментах по изучению поведенческих реакций выявлено, что соединение АЗ, также, как и PPADS, не оказывает влияния на поведение и эмоциональное состояние животных.

Установлено, что исследуемое соединение обладает антитромботической активностью, сравнимой с ацетилсалициловой кислотой и клопидогрелом *in vivo*, а в условиях *in vitro* подавляет функциональную активность тромбоцитов путем блокирования P2Y₁₂-рецепторов.

Также установлено, что соединение АЗ *in vivo* достоверно увеличивает порог болевой реакции относительно контроля.

Таким образом, соединение АЗ в экспериментах *in vitro* проявляет антагонизм по отношению к эффектам, опосредуемым P2X-рецепторами, не влияя на активность экто-нуклеотидаз, а в экспериментах *in vivo* установлено наличие антитромботической и антиноцицептивной активности.

Соединение АЗ может быть полезным агентом в экспериментальной фармакологии и физиологии при исследовании функционирования P2-рецепторов в различных тканях. Кроме того, данное соединение может служить прототипом для синтеза новых рядов веществ с потенциальным влиянием на P2-рецепторы.

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 P2Y₁-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 АТФ 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 АЗ в концентрации 1 мкМ подавляет функциональную активность тромбоцитов, индуцированную 20 нМ АДФ.

7. В условиях *in vivo* (тест tail-flick) соединение АЗ в дозе 132 мг/кг через два часа после введения достоверно увеличивает порог болевой реакции относительно контроля на 34,5%.

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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АДФ – аденозин-5'-дифосфат

АМФ – аденозин-5'-монофосфат

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Амикишева, А.В. Поведенческое фенотипирование: современные методы и оборудование/А.В. Амикишева//Вестник ВОГиС. – 2009. – №3. – с. 529-542.
2. Букатина, Т.М. Антитромботическая и тромболитическая активность соединения sbt-119 на модели *in vitro* (Gorogthrombosistest)/ Т.М. Букатина, Д.С. Яковлев, А.А. Спасов //Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2012. – №2. – с.12-14.
3. Васильев, П.М. Планирование *in silico* скрининга и экспериментальное изучение гипогликемических производных циклических гуанидинов/П.М. Васильев, А.А. Спасов, В.А. Анисимова и др.//Кубанский научный медицинский вестник. – 2014. – №6. – с. 11-15.
4. Воронина, Т.А. Методические указания по изучению транквилизирующего (анксиолитического) действия фармакологических веществ / Т.А. Воронина, Т.А. Середин // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М.: Ремедиум, 2000. – С. 126–130.
5. Воронина, Т.А. Методические рекомендации по изучению анальгетической активности лекарственных средств / Т.А. Воронина, Л.С. Гузеватых; под общ. ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – 197–218 с.
6. Гришин, С.Н. Роль пуринов в нервно-мышечной передаче/С.Н. Гришин, А.У. Зиганшин // Биол. мембр. – 2013. – Т. 30. – № 4. – с. 243-252.
7. Гришин, С.Н., Котрансмиттерная модуляция мионевральной передачи в различных типах двигательных единиц: монография /С.Н. Гришин, А.У. Зиганшин// Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2015. – 240 с.
8. Зиганшин, А.У. Влияние ряда производных пиридоксальфосфат-6-азофенила на эффекты, опосредуемые P2-пуринорецепторами/А.У. Зиганшин, А.В. Рычков, Л.Е. Зиганшина и др.// Хим.-фарм. ж. – 1998. – №8. – с. 3-4.

9. Зиганшин, А.У. Фармакология рецепторов АТФ / А.У. Зиганшин, Л.Е. Зиганшина. – Москва: Гэотар-Медицина, 1999. – 210 с.
10. Зиганшин, А.У. Влияние новых арилазосоединений пиридоксальфосфата на активность экто-АТФазы тканей морской свинки/А.У. Зиганшин, А.П. Зайцев, И.П. Зайцева и др.// Хим.-фарм. ж. – 2000. – №34. – с.6-8.
11. Зиганшин, А.У. Роль рецепторов АТФ (P2-рецепторов) в нервной системе/А.У. Зиганшин//Неврологический вестник. – 2005. – Т. 37, №1-2. – с. 45-53.
12. Зиганшин, А.У. P2-рецепторы: перспективная мишень для будущих лекарств/А.У. Зиганшин, Л.Е. Зиганшина// М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 136 с.
13. Зиганшин, А.У. Новые антиагреганты – блокаторы тромбоцитарных P2-рецепторов/А.У. Зиганшин // Казанский медицинский журнал – 2010. – Т. 91. – № 1. – с. 73-79.
14. Зиганшин, А.У. Антагонисты P2-рецепторов тромбоцитов: успехи, проблемы, перспективы/А.У. Зиганшин//Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2010. – Т.73. – № 4. – с.38-43.
15. Зиганшин, А.У. P2-рецепторы как перспективные мишени действия будущих лекарств//А.У. Зиганшин и др.//Казанский медицинский журнал. – 2016. – том 97, №1, - с. 135-141.
16. Зиганшина, А.П. Перспективы использования агонистов и антагонистов P2-рецепторов в офтальмологической практике/А.П. Зиганшина, Б.А. Зиганшин, А.У. Зиганшин и др.//Казанский медицинский журнал. – 2012. – том 93. – №3. – с. 508-512.
17. Ковалева, М. Применение теста принудительное плавание при проведении доклинических исследований/М.А. Ковалева, М.Н. Макарова//Международный вестник ветеринарии. – 2015. – №4. – с. 90-95.
18. Кривицкая, А. Сравнительная характеристика психотропных свойств солей и композиций фенибута с органическими кислотами: Автореф. дис. ... канд. б. наук: 14.03.06 – Волгоград, 2012. – 24 с.

19. Кучерявенко, А.Ф. Антитромбогенная активность антиоксидантных соединений /Кучерявенко А.Ф., Спасов А.А., Косолапов В.А, Анисимова В.А. //Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. –Т.155. с. 740-743.
20. Макарова, Е.А. Изучение психотропной активности производных арил (гидразинокарбонилметил)фосфиновых кислот/Е.А. Макарова, И.И. Семина, Р.И. Мустафин и др.//Фундаментальные исследования. – 2015. – №2. – с. 1407-1411.
21. Митина, Т.М. Антиагрегантная и антитромботическая активности нового P2Y₁₂-антагониста – соединения Sbt-119 ex и in vivo/ Т.М. Митина, Д.С. Яковлев, А.А. Спасов// Вестник ВолгГМУ. – 2011. – №4. – с. 19-21.
22. Пат. 2480471 Россия, МКИ С07D491/052. Антибактериальные соединения на основе сульфаниловой кислоты и пиридоксина/М.Р. Гарипов, Е.В. Никитина, А.С. Петухов, Ю.Г. Штырлин, А.Д. Стрельник; заявитель и патентообладатель ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет». - №2012109973104; заявл. 14.03.2012; опубл.27.04.2013.
23. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ/Под.ред. Р.У. Хабриева – 2-изд., перераб. и доп. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – 832с. ил.
24. Сакаев, М.Р. Оценка эффективности действия пуриновых нуклеотидов на P2-рецепторы тромбоцитов методом малоуглового светорассеяния [Текст]/ М.Р. Сакаев, Е.Е. Лесиовская, И.В. Миндукшев [и др.]// Эксп. клин. фармакол. – 2000. –Т.63. – N3. –С.22-23.
25. Спасов, А.А. Антитромботические свойства нового антагониста пуриновых P2Y₁-рецепторов/А.А. Спасов, А.Ю. Стуковина, М.В. Черников// Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2006. – №4. – с. 9-11.
26. Спасов, А.А. Синтез и биологическая активность 9-диалкиламиноэтил-2окси(диокси)фенилимидазо-[1,2-а]бензимидазола /Спасов А.А., Косолапов В.А., Анисимова В.А. и др. //Химико-фармацевтический журнал. – 2006. – с. 3-10.

27. Спасов, А.А. P2Y₁-рецепторы и их влияние на процессы агрегации тромбоцитов/А.А. Спасов, Д.С. Яковлев, Т.М. Букатина//Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2012. – том 11. – №3. – с. 4-11.
28. Спасов, А.А. Антитромбогенная активность антиоксидантных соединений/А.А. Спасов, А.Ф. Кучерявенко, В.А. Косолапов, В.А. Анисимова//Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – №6. – с. 740-742.
29. Стуковина, А.Ю. Поиск антагонистов пуриновых рецепторов тромбоцитов среди конденсированных производных бензимидазола и изучение их фармакологических свойств: дис. ...канд.мед.наук: 14.00.25/Стуковина Анна Юрьевна. – Пятигорск, 2007 г. – 189с.
30. Сулимов, В.А. Резистентность к антитромбоцитарным препаратам (аспирину, клопидогрелу) у пациентов, подвергающихся elective стентированию коронарных артерий/В.А. Сулимов, Е.В. Мороз// Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2012. – № 1. – с 23-30.
31. Филимонов, Д.А. Предсказание спектров биологической активности органических соединений с помощью веб-ресурса PASSonline/Д.А. Филимонов, А.А. Лагунин, В.В. Поройков и др.//Химия гетероциклических соединений. – 2014. – №3. – с.483-499.
32. Черников, М.В. Производные бензимидазола – модуляторы рецепторов биологически активных веществ: дис. ...д.мед.наук: 14.00.25/Черников Максим Валентинович. – Волгоград, 2008 г. – 267с.
33. Abramowski, P. A truncation variant of the cation channel P2RX5 is upregulated during T cell activation/ P. Abramowski, C. Ogradowczyk, O. Pongs et al//PLOS ONE. – 2014. – Vol. 9: e104692.
34. Agrawal, A. The effects of P2X7 receptor antagonists on the formation and function of human osteoclasts in vitro/ A. Agrawal, K. Buckley, A. Gartland et al. // Purinergic Signal. – 2010. – Vol. 6. – p. 307–315.

35. Alexander, S. The concise guide to pharmacology 2013/14: G protein-coupled receptors / S. Alexander, H. Benson, A. Harmar et al. // Br. J. Pharmacol. – 2013a. – Vol. 170. – p.1459-1581.
36. Alexander, S. The concise guide to pharmacology 2013/14: ligand-gated ion channels / S. Alexander, H. Benson, A. Harmar et al. // Br. J. Pharmacol. – 2013b. – Vol. 170. – p.1582-1606.
37. Alsaqati, M. Identification of novel P2Y₁₄ receptor in porcine isolated pancreatic arteries/ M. Alsaqati M., L. Latif L., V. Ralevic et al.//Purinergic Signal. – 2012. – Vol.8. – p. 781-800.
38. Alves, L. Structural and Molecular Modeling Features of P2X Receptors/L. Alves, J. da Silva, M. de Freitas et al.// Int J Mol Sci.– 2014. – Vol. 15. – p.4531 – 4549.
39. Angiolillo, D. Pharmacology of emerging novel platelet inhibitors/ D. Angiolillo, P. Capranzano //Am Heart J. – 2008. – Vol. 156. – p. 10-15.
40. Azran, S. Highly efficient biocompatible neuroprotectants with dual activity as antioxidants and P2Y receptor agonists/ S. Azran, D. Förster, B. Fischer et al. //J Med Chem. – 2013. – Vol. 56. – p.4938-4952.
41. Baek, J. The effect of topical Diquafosol Tetrasodium 3% on dry eye after cataract surgery/J. Baek, S. Doh, S. Chung // Curr Eye Res. – 2016. – Vol.41. – p.1281 - 1285.
42. Baqi, Y. Discovery of potent competitive antagonists and positive modulators of the P2X₂ Receptor/ Y. Baqi, R. Hausmann, C. Müller et al. //J Med Chem. – 2011. – Vol 54. – p.817-830.
43. Baqi, Y. Ecto-nucleotidase inhibitors: recent developments in drug discovery/Y. Baqi //Mini Rev Med Chem. – 2015. – Vol.15. – p.21-33.
44. Barrett, M.A Selective high-affinity antagonist of the P2Y₁₄ receptor inhibits UDP-glucose-stimulated chemotaxis of human neutrophils/ M. Barrett, J. Sesma, T. Harden et al.//Mol. Pharmacol. – 2013. – Vol. 84. – p. 41-49.
45. Barros-Barbosa, A. P2X₇ receptor activation downmodulates Na^(p)-dependent high-affinity GABA and glutamate transport into rat brain cortex synaptosomes/ A.

- Barros-Barbossa, M. Lobo, J. Cordeiro et al//Neuroscience. – 2015. – Vol. 306. – p.74–90.
46. Bartlett, R. The P2X7 receptor channel: recent developments and the use of P2X7 antagonists in models of disease/R. Bartlett, L. Stokes, R. Sluyter //Pharmacol Rev. – 2014. – Vol.66. – p.638-675.
47. Baudelet, D. Involvement of the P2X7 purinergic receptor in inflammation: an update of antagonists series since 2009 and their promising therapeutic potential/ D. Baudelet, E. Lipka, A. Ghinet et al.//Curr Med Chem. – 2015. – Vol.22. – p. 713-729.
48. Baurand, A. The P2Y(1) receptor as a target for new antithrombotic drugs: a review of the P2Y(1) antagonist MRS-2179/A. Baurand, C. Gachet// Cardiovasc Drug Rev. – 2003. – Vol. 21(1). – p.67-76.
49. Belhassen, B. Electrophysiologic effects of adenosine triphosphate and adenosine on the mammalian heart: clinical and experimental aspects//B. Belhassen, A. Pelleg//JACC. – 1984. – Vol.2. – p. 414-424.
50. Besada, P. Structure-activity relationships of uridine 5'-diphosphate analogues at the human P2Y6 receptor/ P. Besada, D. Shin, K. Jacobson et al.//J Med Chem. – 2006. – Vol.49. –p. 5532-5543.
51. Bhatt, D. CHARISMA Investigators. Patients with prior myocardial infarction, stroke, or symptomatic peripheral arterial disease in the CHARISMA trial/ D. Bhatt, M. Flather, W. Hacke et al.// J Am Coll Cardiol. – 2007. – Vol. 49. – p.1982–1988.
52. Bhattacharya, A. Pharmacological characterization of a novel centrally permeable P2X7 receptor antagonist: JNJ-47965567/ A. Bhattacharya, Q. Wang, Shoblock J. et al//Br J Pharmacol. – 2013. – Vol. 170. – p.624-640.
53. Boeynaems, J-M. Overview of the pharmacology and physiological roles of P2Y receptors/ J-M. Boeynaems, D. Communi, B. Robaye //WIREs Membr Transp Signal. – 2012. – Vol. 1. – p.581–588.

54. Bonadei, I. New frontiers in the management of acute coronary syndromes: cangrelor and elinogrel/ I. Bonadei, E. Sciatti, M. Metra et al.//Recent Pat Cardiovasc Drug Discov. – 2014. – Vol.9. – p. 22-27.
55. Borea, P. Adenosine as a Multi-Signalling Guardian Angel in Human Diseases: When, Where and How Does it Exert its Protective Effects? / P. Borea, S. Gessi, K. Varani et al.// Trends Pharmacol Sci. – 2016. – Vol. 37. – p. 419-434.
56. Bourin, M. The mouse light/dark box test/ M. Bourine, M. Hascoet // Eur J of Pharmacology. – 2003. – Vol. 463. – p. 55–65
57. Boyer, J. 2-chloro-N6-methyl-(N)-methanocarba-2'-deoxyadenosine-3'-5'-bisphosphate is a selective high affinity P2Y1 receptor antagonist/ J. Boyer, M. Adams, T. Harden et al. //Br.J. Pharmacol. – 2002. – Vol.135. – p. 2004-2010.
58. Browne, L. New structure enlivens interest in P2X receptors/ L. Browne, L. Jiang, R. North //Trends Pharmacol Sci. – 2010. – Vol.31. – p. 229-237.
59. Burnstock, G. Potential therapeutic target in the rapidly expanding field of purinergic signaling/G. Burnstock//Clin. Med – 2002. – Vol.2. – p. 45-53.
60. Burnstock, G. Purinergic signalling/G. Burnstock//Br.J.Pharmacol. – 2006. – Vol.147. – p. 172-181.
61. Burnstock, G. Long-term (trophic) purinergic signalling: purinoceptors control cell proliferation, differentiation and death/ G. Burnstock, A. Verkhratsky//Cell Death and Disease. – 2010a. – Vol.1 – p. 1-10
62. Burnstock, G. The birth and postnatal development of purinergic signaling/ G. Burnstock, B. Fredholm, A. Verkhratsky et al. //Acta Physiologica. – 2010. – Vol.199. – p. 93-147.
63. Burnstock, G. Introductory overview of purinergic signaling/G. Burnstock//Front.Biosci. – 2011. – Vol.3. – p. 896-900.
64. Burnstock, G. Therapeutic potential of purinergic signalling for diseases of the urinary tract/G. Burnstock// BJU Int. – 2011. – Vol.107. – p. 192–204.

65. Burnstock, G. Purinergic signalling: from normal behaviour to pathological brain function/ G. Burnstock, U. Krügel, P. Illes et al. //Prog Neurobiol – 2011. – Vol. 95. – p. 229–274
66. Burnstock, G. Purinergic signaling: Its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future/G. Burnstock//BioEssays. – 2012. – Vol.34. – p.218-225.
67. Burnstock, G. The Paton Lecture: Purinergic signalling: from discovery to current developments/G. Burnstock//Exp. Physiol. – 2013. – Epub ahead of print 09/27/13.
68. Burnstock, G. Purinergic signalling and diabetes/ G. Burnstock, I. Novak//Purinergic Signalling. – 2013. – Epub ahead of print 3/4/13.
69. Burnstock, G. Cardiac purinergic signalling in health and disease/ G. Burnstock, A. Pelleg//Purinergic Signalling. – 2015. – Vol. 11. – p. 1-46.
70. Burnstock, G. Purinergic signalling: Pathophysiology and Therapeutic Potential/G. Burnstock//Drug Res. Dev. – 2016. – Vol. 2. – p. 10-16.
71. Burnstock, G. Introduction to the Special Issue on Purinergic Receptors/G. Burnstock//Adv.Exp.Med.Biol. – 2017a. – Vol.1051. – p. 1-6.
72. Burnstock, G. Purinergic Signalling: Therapeutic Developments/G. Burnstock//Front Pharmacol. – 2017b. – Vol.8. – p.661. Published online 2017 Sep 25.
73. Cansev, M. Evidence for the existence of pyrimidinergic transmission in rat brain/ M. Cansev, F. Orhan, E. Isik et al. //Neuropharmacology. – 2015. – Vol.91. – p. 77-86.
74. Cattaneo, M. Antiaggregatory activity in human platelets of potent antagonists of the P2Y1 receptors/ M. Cattaneo, A. Lecchi, K. Jacobson et al.//Biochem. Pharmacol. – 2004. – Vol.68. – p.1995-2002.
75. Cattaneo, M. New P2Y₁₂ inhibitors/M. Cattaneo//Update on Antitrombotic Therapy. Circulation. – 2010. – Vol. 121. – p. 171-179.
76. Cattaneo M. The Platelet P2 Receptors. 3rd ed. /M. Cattaneo//San Diego: Elsevier/Academic Press. – 2013. – p. 261–282.
77. Chang, H. Antiplatelet activity, P2Y₁ and P2Y₁₂ Inhibition, and metabolism in plasma of stereoisomers of Diadenosine5',5''-P¹,P⁴-dithio-P²,P³-

- chloromethylenetetraphosphate/H.Chang, I. Yanachkov, M. Yanachkova et al. //PlosOne. – 2014. – Vol.9. – Issue 4. – e94780.
78. Chi, Y. Suppression of cell membrane permeability by suramin: involvement of its inhibitory actions on connexin 43 hemichannels/ Y. Chi, K. Gao, J. Yao et al// Br J Pharmacol. – 2014. – Vol. 171. – p.3448–3462.
 79. Coddou, C. Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels/ C. Coddou, Z. Yan, S. Stojilkovic// Pharmacol.Rew. – 2011. – Vol.63. – p. 641-683.
 80. Cheong, S.L. The A3 adenosine receptor as multi-faceted therapeutic target: pharmacology, medicinal chemistry, and in silico approaches/ S. Cheong et al//Med. Res. Rev. – 2013. – Vol. 33. – p.235–335
 81. Cho, J. Design and synthesis of potent and selective P2X₃ receptor antagonists derived from PPADS as potential pain modulators/ J. Cho, K. Jung, Y. Jung et al. //Eur J of Med Chem. – 2013. – Vol.70. – p. 811-830.
 82. Chong, A. Ticagrelor for the treatment of peripheral arterial disease/ A. Chong, D. So //Exp Opin Investig Drugs. – 2014. – Vol.23. – p. 1737-1743.
 83. Chong, T. Impact of novel P2Y₁₂ receptor inhibitors on platelet reactivity in acute coronary syndrome patients undergoing percutaneous coronary intervention/T. Chong, P. Liu, W. Wu et al. // Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi. – 2016. – Vol.2. – p.138-143.
 84. Cunha, R. Separation of adenosine triphosphate and its degradation products in innervated muscle of the frog by reverse phase high-performance liquid chromatography/ R. Cunha, A. Sebastigo, J. Ribeiro//Chromatographia. – 1989. – Vol.28. – p.610.
 85. De Luca, L. Switching of platelet P2Y₁₂ receptor inhibitors in patients with acute coronary syndromes undergoing percutaneous coronary intervention: review of the literature and practical considerations/L. De Luca, P. Capranzano, G. Parodi et al// Am. Heart J. – 2016. – Vol. 176. p. 44–52.
 86. De Man, J. Functional evidence that ATP or a related purine is an inhibitory NANC neurotransmitter in the mouse jejunum: study on the identity of P2X and

- P2Y purinoceptors involved/ J. De Man, B. De Winter, P. Pelckmans et al.//Br. J. Pharmacol. – 2003. – Vol. 140. – p. 1108-1116.
87. Dias, D. Characterization of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase; EC 3.6.1.5) activity in mouse peritoneal cavity cells/D. Dias, B. de Barros Penteado, Dos Santos Jaques et al// Cell Biochem Funct. – 2017. – Vol. 35. – p.358-363.
88. Ding, S. P2X3 receptor involvement in endometriosis pain via ERK signaling pathway/S. Ding, L. Zhu, X. Zhang et al// PLoS One. – 2017. – Vol. 12: e0184647
89. Di Virgilio, F. Modulation of innate and adaptive immunity by P2X ion channels/ F. Di Virgilio, A. Sarti, F. Grassi// Curr Opin Immunol. – 2018. – Vol.52. – p. 51-59
90. Doğan, A. Effect of obesity and serum leptin level on clopidogrel resistance/A. Doğan, S. Kahraman, C. Çiftçi // Turk Kardiyol Dern Ars. – 2016. – V.44. – p.548-553.
91. Donnelly-Roberts, D. Painful purinergic receptors/ D. Donnelly-Roberts, S. McGaraughty, M. Jarvis et al. //J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2008. – Vol. 324. – p. 409-415.
92. Donnelly-Roberts, D. Mammalian P2X7 receptor pharmacology: comparison of recombinant mouse, rat and human P2X7 receptors/ D. Donnelly-Roberts, M. Namovic, M. Jarvis et al. //Br. J. Pharmacol. – 2009a. – Vol.157. – p. 1203-1214.
93. Donnelly-Roberts, D.[3H]A-804598 ([3H]2-cyano-1-[(1S)-1-phenylethyl]-3-quinolin-5-ylguanidine) is a novel, potent, and selective antagonist radioligand for P2X7 receptors/ D. Donnelly-Roberts, M. Namovic, M. Jarvis et al. //Neuropharmacology – 2009b. – Vol. 56. – p. 223-229.
94. Douglass, J. Lipophilic modifications to dinucleoside polyphosphates and nucleotides that confer antagonist properties at the P2Y₁₂ platelet receptor/ J. Douglass, R. Patel, J. Boyer et al.// J Med Chem. – 2008. – Vol. 51. – p. 1007–1025.

95. Drury, A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart/ A. Drury, A. Szent-Gyorgyi //J Physiol. – 1929. – Vol.68. – p.213-237.
96. Ecke, D. Hetero-oligomerization of the P2Y₁₁ receptor with the P2Y₁ receptor controls the internalization and ligand selectivity of the P2Y₁₁ receptor/D. Ecke //Biochem. J. – 2008. – Vol. 409. – p. 107-116.
97. Edmondson, K. Current and future treatment options for cystic fibrosis lung disease: latest evidence and clinical implications/K. Edmondson, J. Davies// Ther Adv Chronic Dis. – 2016. – Vol. 7. – p.170–183.
98. El-Tayeb, A. Synthesis and structure-activity relationships of uracil nucleotide derivatives and analogues as agonists at human P2Y₂, P2Y₄, and P2Y₆ receptors/A. El-Tayeb, A. Qi, C. Müller //J. Med. Chem. – 2006. – Vol. 49. – p. 7076-7087.
99. El-Tayeb, A. Structural modifications of UMP, UDP, and UTP leading to subtype-selective agonists for P2Y₂, P2Y₄, and P2Y₆ receptors/A. El-Tayeb, A. Qi, C. Müller//J. Med. Chem. – 2011. – Vol. 54. – p. 2878-2890.
100. Elsby, R. In vivo risk assessment of AZD9056 perpetrating a transporter-mediated drug-drug interaction with methotrexate/ R. Elsby, L. Fox, D. Surry et al. //Eur. J. Pharm. Sci. – 2011. – Vol.43. – p. 41-49.
101. Eltzhig, H. Attenuating myocardial ischemia by targeting A2B adenosine receptors/ H. Eltzhig et al//Trends Mol.Med. – 2013. – Vol.19. – p.345–354.
102. Engel, T. ATPergic signalling during seizures and epilepsy/ T. Engel, M. Alves, D. Henshall et al//Neuropharmacology. – 2016. – Vol. 104. – p.140–153.
103. Erb, L. Coupling of P2Y receptors to G proteins and other signaling pathways/L. Erb, Weisman G// Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal. – 2015. – Vol 1. – p. 789–803.
104. Erlinge, D. P2 receptors in cardiovascular physiology and disease/D. Erlinge, G. Burnstock// Purinergic Signal. – 2008. – Vol.4. – p. 1–20.
105. Essawy, S Effects of adenosine receptor antagonists in MPTP mouse model of Parkinson's disease: mitochondrial DNA integrity/S. Essawy, M. Tawfik, H. Korayem// Arch. Med. Sci. – 2017. – Vol.13. – p. 659–669.

106. Felix, R. Development of the comprehensive set of P2 receptor pharmacological research compounds/R. Felix, S. Martin S, D. Crawford//Purinergic Signal. – 2012. – Vol.8. – p. 101-112.
107. Flierl, U. Efficacy of prasugrel administration immediately after percutaneous coronary intervention in ST-elevation myocardial infarction/ U. Flierl, F. Zauner, A. Schäfer//Thromb Haemost. – 2016. – Vol.117 [Epub ahead of print].
108. Fredholm, B. Pharmacological targeting of adenosine receptor signaling/B. Fredholm, M. Peleli, L. Sobrevia et al// Mol Aspects Med. – 2017. – Vol 55. – p. 4-8
109. Fumagalli, M. Cloning, pharmacological characterization and distribution of the rat G-protein-coupled P2Y(13) receptor/ M. Fumagalli, L. Trincavelli, M. Abbracchio et al.//Biochem Pharmacol. – 2004. – Vol.68. – p. 113–124.
110. Gao, Z.-G. 2'-2-pyridylisatogen tosylate antagonizes P2Y1 receptor signaling without affecting nucleotide binding/ Z.-G. Gao, L. Mamedova L., K. Jacobson et al. //Biochem Pharmacol. – 2004. – Vol.68. – p. 231-237.
111. Gao, Z.-G. UDP-glucose acting at P2Y₁₄ receptors is a mediator of mast cell degranulation/ Z.-G. Gao, Y. Ding, K. Jacobson//Biochem. Pharmacol. – 2010. – Vol.76. – p. 873-879.
112. Gao, Z.-G. The role of P2Y₁₄ and other P2Y receptors in degranulation of human LAD2 mast cells/ Z.-G. Gao, Q. Wei, K. Jacobson //Purinergic Signal. – 2013. – Vol. 9. – p. 31-40.
113. Gever, R. AF353, a novel, potent and orally bioavailable P2X3/P2X2/3 receptor antagonist/ R. Gever, R. Soto, A. Ford et al. //Br.J. Pharmacol. – 2010. – Vol. 60. – p. 1387-1398.
114. Giniatullin, R. Desensitization properties of P2X3 receptors shaping pain signaling/R. Giniatullin, A. Nistri// Front Cell Neurosci. – 2013. – Vol.7. – p.245. Published online 2013 Dec 6.
115. Gomes, C. Activation of microglial cells triggers a release of brain-derived neurotrophic factor including their proliferation in an adenosine A2A receptor-dependent manner: A2A receptor blockade prevents BDNF release and

- proliferation of microglia/C. Gomes et al//J Neuroinflammation. – 2013. – Vol. 10. – p. 16-19.
116. Gunarathne, A. Prasugrel hydrochloride for the treatment of acute coronary syndrome patients/A. Gunarathne, S. Hussain, A. Gershlick//Expert Rev Cardiovasc Ther. – 2016 Oct 4. [Epub ahead of print].
117. Haas, M. 5-OMe-uridine-5'-O-(α -boranodiphosphate), a novel nucleotide derivative highly active at the human P2Y(6) receptor protects against death-receptor mediated glial apoptosis/ M. Haas, T. Ginsburg-Shmuel, G. Reiser et al.// Neurosci. Lett. – 2014. – Vol. 578. – p. 80-84.
118. Hao, Y. P2Y₆ Receptor-Mediated Proinflammatory Signaling in Human Bronchial Epithelia/Y Hao, J Liang, W. Ko et al// PLoS ONE. – 2014. – Vol 9: e106235
119. Harris, G. ATPase activity of pharmacological preparations/G. Harris//Eur J Pharmacol. –1972. – Vol.19. – p.137-139.
120. Hausmann, R. The suramin analog 4,4',4'',4'''-(carbonylbis(imino-5,1,3-benzenetriylbis(carbonylimino)))tetra-kis-benzenesulfonic acid (NF110) potently blocks P2X₃ receptors: subtype selectivity is determined by location of sulfonic acid groups/ R. Hausmann, J. Rettinger, G. Schmalzing et al.//Mol. Pharmacol. – 2006. – Vol. 69. – p. 2058-2067.
121. Helms, N. Agonist antagonist interactions at the rapidly desensitizing P2X₃ receptor/N. Helms, M. Kowalski, T. Riedel et al.//PLoS One. – 2013. – Vol. 8. – e79213.
122. Hochhauser, E. P2Y₂ receptor agonist with enhanced stability protects the heart from ischemic damage in vitro and in vivo/ E. Hochhauser, R. Cohen, A. Shainberg et al.//Purinergic Signal. – 2013. – Epub ahead of print.
123. Hoyle, C. Isolated human bladder: evidence for adenine dinucleotide acting on P2-purinoceptors and for purinergic transmission/ C. Hoyle, C. Chapple, G. Burnstock//Eur J Pharmacol. – 1989. – V.174. – p. 115-119.
124. Hoyle, C. Suramin antagonizes responses to P2-purinoceptor agonists and purinergic nerve stimulation in the urinary bladder and taenia coli/C. Hoyle, G. Knight, G. Burnstock //Br J Pharmacol. – 1990. – V.99. – p. 617-621.

125. Hwang, H. Additive Effect of preservative-free sodium hyaluronate 0.1% in treatment of dry eye syndrome with diquafosol 3% eye drops/ H. Hwang, Y. Sung, E. Kim// *Cornea*. – 2014. – Vol.33. – p.935-941.
126. Ilatovskaya, D. Characterization of the P2 receptors profile in the podocytes of the freshly isolated rat glomeruli/ D. Ilatovskaya, O. Palygin, A. Staruschenko et al// *Am J Physiol Cell Physiol*. – 2013. – Vol. 305. – p.1050 – 1059.
127. Ivanov, A. Molecular modeling of the human P2Y₂ receptor and design of a selective agonist, 2'-amino-2'-deoxy-2-thiouridine 5'-triphosphate/ A. Ivanov A., H. Ko, K. Jacobson et al.//*J. Med. Chem.* – 2007. – Vol. 50. – p. 1166-76.
128. Jaime-Figueroa, S. Discovery and synthesis of a novel and selective drug-like P2X(1) antagonist/ S. Jaime-Figueroa, R. Greenhouse, A. Ford et al // *Bioorg.Med.Chem Lett*. – 2005. – Vol.15. – p. 3292-3295.
129. Jacobson, K. Development of selective purinoceptor agonists and antagonists Purinergic approaches in experimental therapeutics/K. Jackobson, M. Van Rhee// *New York: Wiley-Liss*. – 1997. – p. 101–128
130. Jacobson, K. P1 and P2 purine and pyrimidine receptor ligands//*Handbook of Pharmacology: Purinergic and Pyrimidinergic signaling*/Eds. M.P. Abbrachio, M. Williams. – Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2001. – Vol. 151. – p. 129-175.
131. Jacobson, K. Purine and pyrimidine (P2) receptors as drug targets/K. Jacobson, M. Jarvis, M. Williams // *J. Med. Chem.* – 2002. – Vol. 45. – p. 4057-4093.
132. Jacobson, K. Structure activity and molecular modeling analyses of ribose- and base-modified uridine 5'-triphosphate analogues at the human P2Y₂ and P2Y₄ receptors/ K. Jacobson, S. Costanzi, T. Harden et al. // *Biochem Pharmacol*. – 2006. – Vol. 4. – p.540-549.
133. Jacobson, K. Agonists and antagonists for P2 receptors/K. Jacobson, S. Costanzi, L. Mamedova et al // *Novartis Found Symp*. – 2006. – Vol. 276. – p.58-68.
134. Jacobson, K. Development of selective agonists and antagonists of P2Y receptors/ K. Jacobson, A. Ivanov et al. // *Purinergic signaling* – 2009. – Vol.5. – p. 75-89.

135. Jacobson, K. Medicinal chemistry of adenosine, P2Y and P2X receptors/K. Jacobson, C. Müller//Neuropharmacology. – 2015. – doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.12.001. [Epub ahead of print]
136. Jacobson, K. Nucleotides Acting at P2Y Receptors: connecting structure and function/ K. Jacobson, S. Paoletta, E. Kiselev et al. //Mol Pharmacol. – 2015. – Vol. 88. – p.220-230.
137. Jacobson, K. Medicinal chemistry of adenosine, P2Y and P2X receptors/K. Jacobson, C. Müller// Neuropharmacology. – 2016. – Vol. 104. – p. 31–49.
138. Jankowski, V. Uridine adenosine tetraphosphate: a novel endothelium-derived vasoconstrictive factor/V. Jankowski, M. Tölle, J. Jankowski et al //Nat. Med. – 2005. – Vol.11. – p. 223-227.
139. Jarvis, M. ATP-gated P2X cation-channels/M. Jarvis, B. Khakh//Neuropharmacology. – 2009. – Vol. 56. – p. 208-215.
140. Jiang, L. Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X(7) receptors/ L. Jiang, A. Mackenzie, A. Surprenant //Mol. Pharmacol. – 2000. – Vol.58. – p. 82-88.
141. Jin, S. Clinical evaluation of the effect of diquafosol ophthalmic solution in glaucoma patients with dry eye syndrome/S. Jin, J. Min// Jpn J Ophthalmol. – 2016. – Vol.60. – p.150-155
142. Johnson, C. Responses of the longitudinal muscle and the muscularis mucosae of the rat duodenum to adenine and uracil nucleotides/ C. Johnson, S. Charlton, S. Hourani//Br.J.Pharmacol. – 1996. – Vol.117. – p. 823-830.
143. Jung, K. Structure-activity relationship studies of spinorphin as a potent and selective human P2X(3) receptor antagonist/K. Jung, H. Moon, Y. Kim et al. //J. Med. Chem. – 2007. – Vol.50. – p. 4543-4547.
144. Jung, K. Synthesis and structure–activity relationships of carboxylic acid derivatives of pyridoxal as P2X receptor antagonists/ K. Jung, J. Cho, J. Lee et al.//Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 2013. – Vol.21. – p. 2643–2650.
145. Keating, G. Diquafosol ophthalmic solution 3 %: a review of its use in dry eye/G. Keating// Drugs. 2015. – Vol.75. – p.911-922.

146. Keystone, E. D1520C00001 Study Team. Clinical evaluation of the efficacy of the P2X7 purinergic receptor antagonist AZD9056 on the signs and symptoms of rheumatoid arthritis in patients with active disease despite treatment with methotrexate or sulphasalazine/ E. Keystone, M. Wang, I. McInnes et al. // *Ann Rheum Dis.* – 2012. – Vol. 10. – p.1630-1635.
147. Kilinc, E. The role of adenosine triphosphate and its receptors in migraine pathophysiology/E. Kilinc, K. Koroleva, R. Giniatullin et al// *Acta Physiol.* – 2015. – Vol. 215. – p. 44.
148. Kim, H. 2-Substitution of adenine nucleotide analogues containing a bicyclo[3.1.0]hexane ring system locked in a northern conformation: enhanced potency as P2Y1 receptor antagonists/ H. Kim, M. Ohno, K. Jacobson et al. // *J Med Chem.* – 2003. – Vol. 46. – p.4974-4987.
149. Kim, Y. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Pyridoxal-6-arylazo-5'-phosphate and Phosphonate Derivatives as P2 Receptor Antagonists/ Y. Kim, E. Camaioni, A. Ziganshin et al.// *Drug Dev Res.* – 1998. – Vol.45. – p.52-66.
150. Kim, Y. Synthesis of pyridoxal phosphate derivatives with antagonist activity at the P2Y13 receptor/Y. Kim, J. Lee, K. Jacobson et al. // *Biochem Pharmacol.* – 2005. – Vol. 70. – p. 266-274.
151. King, B. Novel P2X7 receptor antagonists ease the pain/B. King// *Br. J. Pharmacol.* – 2007. – Vol.151. – p.565-567.
152. Kitchen, I. Assessment of the hot-plate antinociceptive test in mice. A new method for the statistical treatment of graded data. / I. Kitchen, M. Crowder. // *J. Pharmacol. Methods.* – 1985. – 13(1). – P. 1-7.
153. Ko, H. Synthesis and potency of novel uracil nucleotides and derivatives as P2Y2 and P2Y6 receptor agonists/ H. Ko, R. Carter, K. Jacobson et al // *Bioorg Med Chem.* – 2008. – Vol. 16. – p. 6319-6332.
154. Koch, H. Impaired Cognition after Stimulation of P2Y1 Receptors in the Rat Medial Prefrontal Cortex/H. Koch, A. Bernalov, Krugel U. et al// *Neuropsychopharmacology.* – 2015. – Vol .40. – p.305–314.

155. Kojima, T. The effects of 3% diquafosol sodium application on the tear functions and ocular surface of the Cu, Zn-superoxide dismutase-1 (Sod1)–knockout mice/T. Kojima, M. Dogru, K. Tsubota et al.// *Mol Vis.* – 2014. – Vol.20. – p.929–938.
156. Köles, L. Purine ionotropic (P2X) receptors/L. Köles, S. Fürst, P. Illes//*Curr. Pharm. Des.* – 2007. – Vol.377. – p. 1-33.
157. Krejci, P. NF449 Is a Novel Inhibitor of Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3) Signaling Active in Chondrocytes and Multiple Myeloma Cells/ P. Krejci, S. Murakami, W. Wilcox et al. // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285. – p. 20644-20653.
158. Kujawski, J. Prediction of log P: ALOGPS Application in Medicinal Chemistry Education/ J. Kujawski, M. K. Bernard, A. Janusz, and W. Kuźma// *J. Chem. Educ.* – 2012. – № 89. – p 64–67.
159. Kurz, K. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride/K.D. Kurz, B.W. Main, G.E. Sandusky // *Thromb. Res.* – 1990. – V.15. – p.269-280.
160. Lambertucci, C. Medicinal chemistry of P2X receptors: agonists and orthosteric antagonists/ C. Lambertucci, D. Dal Ben, R. Volpini et al.//*Curr Med Chem.* – 2015. – Vol.22. – p. 915-928.
161. Lämmer, A. The P2 receptor antagonist PPADS supports recovery from experimental stroke in vivo/A. Lämmer, A. Beck, B. Grummich et al. // *PlosOne.* – 2011. – Vol.6. – e19983.
162. Lazarowski, E. Molecular mechanisms of purine and pyrimidine nucleotide release/ E. Lazarowski, J. Sesma, S. Kroda// *Adv. Pharmacol.* –2011. – Vol. 61. – p. 221-261.
163. Lazarowski, E. Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release/E. Lazarowski//*Purinergic signal.* – 2012. – Vol.8. – p. 359-373.
164. Le Bars, D. Animal models of nociception / D. Le Bars, M. Gozariu, S.W. Cadden // *Pharmacol. Rev.* – 2001. – Vol.53. – p.597-652.
165. Lee, J. Effectiveness and optical quality of topical 3.0% Diquafosol versus 0.05% Cyclosporine A in dry eye patients following cataract surgery/J. Lee, I. Song, S. Yoon et al. // *J Ophthalmol.* – 2016. Published online 2016 Feb 16.

166. Li, L. Role of peripheral purinoceptors in the development of bee venom-induced nociception: a behavioural and electrophysiological study in rats/ L. Li, R. Luo, Y. Guo et al. //Clin Exp Pharmacol Physiol.– 2014. – Vol. 41. – p.902-910.
167. Liaman, K. Diisothiocyanate derivatives as potent, insurmountable antagonists of P2_{Y6} nucleotide receptors/K.Liaman, L. Mamedova, A. Kenneth et al. //Biochem Pharmacol. – 2004. – Vol. 67. – p. 1763–1770.
168. Linan-Rico, A. Purinergic autocrine regulation of mechanosensitivity and serotonin release in a human EC model: ATP-gated P2X3 channels in EC are downregulated in ulcerative colitis/A. Linan-Rico, J Wunderlich, F. Christofi et al// In flamm Bowel Dis. – 2013. – Vol. 19. – p. 2366–2379.
169. Liu, F. P2Y₁₂ receptor inhibitors for secondary prevention of ischemic stroke/F. Liu, U. Tantry, P. Gurbel// Expert Opin. Pharmacother. – 2015. – Vol. 16. – p.1149–1165.
170. Lord, B. Pharmacology of a novel central nervous system-penetrant P2X7 antagonist JNJ-42253432/ B. Lord, L. Aluisio, A. Bhattacharya et al.//J Pharmacol Exp Ther. – 2014. – Vol. 351. – p.628-641.
171. Lucattelli, M. P2X(7) Receptor Signaling in the Pathogenesis of Smoke-Induced Lung Inflammation and Emphysema/Lucacetti M. et al//Am J Respir Cell Mol Biol. – 2011. – Vol. 44. – p.423–429.
172. Mamedova, L. Diisothiocyanate derivatives as potent, insurmountable antagonists of P2Y₆ nucleotide receptors/ L. Mamedova, B. Joshi, K. Jacobson et al. //Biochem. Pharmacol. – 2004. – Vol.67. – p.1763-1770.
173. Mannhold, R. Calculation of molecular lipophilicity: State-of-the-art and comparison of log P methods on more than 96,000 compounds / R. Mannhold, G.I. Poda, C. Ostermann, I.V. Tetko // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2009. – Vol. 98. – p. 861-893.
174. Marchenkova, A. Brain natriuretic peptide constitutively downregulates P2X3 receptors by controlling their phosphorylation state and membrane localization/ A. Marchenkova, S. Viotti, A. Nistri et al// Mol Pain. – 2015. – Vol. 11. – p.71-75.

175. Marteau, F. Pharmacological Characterization of the Human P2Y₁₃ Receptor/ F. Marteau, E. Le Poul, N. Gonzalez et al. //Mol Pharmacol. – 2003. – Vol. 64. – p. 104-112.
176. Maruoka, H. Pyrimidine nucleotides with 4-alkoxyimino and terminal tetraphosphate δ -ester modifications as selective agonists of the P2Y(4) receptor. H. Maruoka, M. Jayasekara, K. Jacobson et al. //J. Med. Chem.– 2011. – Vol.54. – p. 4018-4033.
177. Mathieu, R. Synthesis and biological activity of 2-alkylated deoxyadenosine bisphosphate derivatives as P2Y(1) receptor antagonists/ R. Mathieu, A. Baurand, J. Bourguignon et al.//Bioorg Med Chem. – 2004. – Vol. 12. – p. 1769-1779.
178. Matsuda, T. ATP decreases mechanical sensitivity of muscle thin-fiber afferents in rats/T. Matsuda, A. Kubo, K. Mizumura//Neurosci Res. – 2015. – Vol.97. – p. 36-44.
179. Meghani, P. The design of P2Y₂ antagonists for the treatment of inflammatory disease/P. Meghani// Proceeding of the 224th ACS National Meeting and exposition, Boston – 2002.
180. Mehta, S. Design and rationale of CURRENT–OASIS 7: a randomized, 2 x 2 factorial trial evaluating optimal dosing strategies for clopidogrel and aspirin in patients with ST and non–ST–elevation acute coronary syndromes managed with an early invasive strategy/ S. Mehta, J. Bassand, S. Chrolavicius et al.// Am Heart J. – 2008. – Vol.156. – p.1080–1088.
181. Meis, S. NF546 [4,4'-(carbonylbis(imino-3,1-phenylene-carbonylimino-3,1-(4-methyl-phenylene)-carbonylimino))-bis(1,3-xylene-alpha,alpha'-diphosphonic acid) tetrasodium salt] is a non-nucleotide P2Y₁₁ agonist and stimulates release of interleukin-8 from human monocyte-derived dendritic cells/ S. Meis, A. Hamacher, M. Kassack et al. //J Pharmacol Exp Ther. – 2010. – Vol. 332. – p.238-247.
182. Michel, A. Decavanadate, a P2X receptor antagonist, and its use to study ligand interactions with P2X₇ receptors/ A. Michel, M. Xing, P. Humphrey et al.//Eur J Pharmacol. – 2006. – Vol. 534. – p. 19-29.

183. Michel, A. Agonist potency at P2X7 receptors is modulated by structurally diverse lipids/A. Michel, E. Fonfria// *Br. J. Pharmacol.* – 2007. – Vol. 152. – p. 523-537.
184. Michel, A. Negative and positive allosteric modulations of the P2X7 receptor/ A. Michel, L. Chambers, D. Walter//*Br. J. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 153. – p. 737-750.
185. Mishra, A. New insights of P2X7 receptor signaling pathway in alveolar functions/A. Mishra// *Journal of Biomedical Science.* – 2013. – Vol.20. – p. 20-26.
186. Molliver, D. The ADP receptor P2Y1 is necessary for normal thermal sensitivity in cutaneous polymodal nociceptors/ D. Molliver, K. Rau, H. Koerber et al. // *Molecular pain.* – 2011. – Vol.7. – p.1-13.
187. Morandini, A. The role of P2X7 receptor in infectious inflammatory diseases and the influence of ectonucleotidases/A. Morandini, L. Savio, R. Coutinho-Silva//*Biomed J.* – 2014. – Vol. 37. – p.169-177.
188. Nagata, K. Antidepressants inhibit P2X4 receptor function: a possible involvement in neuropathic pain relief/K. Nagata, T. Imai, K. Inoue et al. // *Mol Pain.* – 2009. – Vol. 5. – p.20.
189. Narayanan, A. Use of ATP analogs to inhibit HIV-1 transcription/A. Narayanan, G. Sampey, F. Kashanchi et al. // *Virology.* – 2012. – Vol. 432. – p. 219–231.
190. Nelson, D. Structure-activity relationship studies on a series of novel, substituted 1-benzyl-5-phenyltetrazole P2X7 antagonists/D. Nelson, R. Gregg, W. Carroll et al.//*J Med Chem.* – 2006. – Vol. 49. – p. 3659-3966.
191. North, R. Molecular physiology of P2X receptors/R. North//*Physiol Rev.* – 2002. – Vol.82. – p.1013-1067.
192. Nylander, S. Effects of P2Y₁₂ receptor antagonists beyond platelet inhibition - comparison of ticagrelor with thienopyridines/S. Nylander, R. Schulz// *Br. J. Pharmacol.* – 2016. – Vol. 173. – p.1163–1178.
193. Ohlmann, P. The platelet P2Y₁₂ receptor under normal and pathological conditions. Assessment with the radiolabeled selective antagonist [3H]PSB-0413/P. Ohlmann, A. Lecchi, A. El-Tayeb et al.// *Purinergic Signal.* – 2013. – Vol.9. – p. 59–66.

194. Ohsaki, A. A novel mechanism of γ -irradiation-induced IL-6 production mediated by P2Y₁₁ receptor in epidermal keratinocytes/A. Ohsaki, Y. Miyano, M. Tsukimoto et al//*Biol Pharm Bull.* – 2018. – Mar 16. doi: 10.1248/bpb. b18-00075. [Epub ahead of print]
195. Okura, D. Lidocaine preferentially inhibits the function of purinergic P2X₇ receptors expressed in *Xenopus* oocytes/ D. Okura, T. Horishita, N. Yanagihara et al.//*Anesth Analg.* – 2015. – Vol. 120. – p. 597-605.
196. Oliveira, Á. Purinergic receptors in embryonic and adult neurogenesis/ A. Oliveira, P. Illes, H. Ulrich// *Neuropharmacology.* – 2015. – Vol. 104. – p. 272–281
197. Olivier, C. Third generation P2Y₁₂ antagonists inhibit platelet aggregation more effectively than clopidogrel in a myocardial infarction registry/C. Olivier, P. Diehl, K. Schnabel// *Thromb Haemost.* – 2014. – Vol.111. – p.266-272.
198. Orriss, I. The P2Y₆ receptor stimulates bone resorption by osteoclasts/I. Orriss, N. Wang, JM. Boeynaems et al. // *Endocrinology.* – 2011. – Vol. 152. – p.3706 – 3716.
199. Oury, C. Purinergic control of inflammation and thrombosis: Role of P2X₁ receptors/ C. Oury, C. Lecut, C. Delierneux et al. // *Comput Struct Biotechnol J.* – 2015. – Vol.13. – p.106-110.
200. Önnheim, K. A novel receptor cross-talk between the ATP receptor P2Y₂ and formyl peptide receptors reactivates desensitized neutrophils to produce superoxide/K. Önnheim, K. Christenson, H. Forsman et al// *Exp Cell Res.* – 2014. – Vol. 323. – p.209–217.
201. Paula Vieira, R. The purinergic receptor P2Y₆ contributes to airway inflammation and remodeling in asthma/ R. Paula Vieira, T. Muller, B. Robaye et al.//*Am J Resp Crit Care Med.* – 2011. – Vol. 184. – p. 215 – 223.
202. Pelleg, A. The mechanism of the negative chronotropic and dromotropic actions of adenosine 5'-triphosphate in the heart: an update/ A. Pelleg, B. Belhassen//*J Cardiovasc Pharmacol.* – 2010. – Vol. 56. – p.106-109.

203. Pérez-Sen, R. An Update on P2Y₁₃ Receptor Signalling and Function. R. Perez-Sen, R. Gómez-Villafuertes, M. Miras-Portugal // *Adv Exp Med Biol.* – 2017. – Vol.105. – p.139-168
204. Porsolt, R. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatment. / M.R. Porsolt, M.Le. Pichon, M. Jalfre//*Nature.* – 1977. – V. 266. – p 730-732.
205. Qamar, A. Current Status of Data on Cangrelor/A. Qamar A., D. Bhatt // *Pharmacol. Ther.* – 2016. – Epub ahead of print.
206. Qiu, Z. Pharmacokinetics of vicagrel, a promising analog of clopidogrel, in rats and beagle dogs/Z. Qiu, N. Li, X. Chen et al. // *J Pharm Sci.* – 2013. – Vol. 102. – p.741-749.
207. Raboisson, P. A general approach toward the synthesis of C-nucleoside pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazines and their 3',5'-bisphosphate C-nucleotide analogues as the first reported in vivo stable P2Y₁-receptor antagonists/P. Raboisson, A. Baurand, J. Bourguignon// *J Org Chem.* – 2002. – Vol.67. – p.8063–8071
208. Riegel, A. Selective induction of vascular P2Y₆ nucleotide receptor promotes vascular inflammation in human cell lines and mice/A. Riegel, M. Faigle, H. Eltzschig et al. // *Blood.* – 2011. – Vol. 117. – p. 2548 – 2555.
209. Robaye, B. Loss of nucleotide regulation of epithelial chloride transport in the jejunum of P2Y₄-null mice/B. Robaye, E. Ghanem, R. Beauwens et al. // *Mol Pharmacol.* – 2003. – Vol. 63. – p.777 – 783.
210. Rollini, F. Switching P2Y₁₂-receptor inhibitors in patients with coronary artery disease/ F. Rollini, F. Franchi, D. Angiolillo// *Nat. Rev. Cardiol.* – 2016. – Vol. 13. – p.11–27.
211. Rollini, F. Drug-drug interactions when switching between intravenous and oral P2Y₁₂ receptor inhibitors: how real is it? / F. Rollini, F. Franchi, D. Angiolillo// *JACC Cardiovasc. Interv.* – 2017. – Vol. 10. – p.130–132.
212. Sabouret, P. New antiplatelet agents in the treatment of acute coronary syndromes/P. Sabouret, M. Taiel-Sartral// *Arch Cardiovasc Dis.* – 2014. – Vol. 107. – p. 178-187.

213. Sathanoori, R. The ATP Receptors P2X7 and P2X4 Modulate High Glucose and Palmitate-Induced Inflammatory Responses in Endothelial Cells/R. Sathanoori, K. Swärd, D. Erlinge//PLoS ONE. – 2015. – Vol. 10. – e0125111.
214. Sawynok, J. Adenosine receptor targets for pain/J. Sawynok// Neuroscience. – 2016. – Vol. 338. – p. 1–18.
215. Sestakova, N. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide/N. Sestakova, A. Puzserova, I. Bernatova et al// Interdiscip Toxicol. – 2013. – Vol. 6. – p.126–135.
216. Shan, J. Overcoming clopidogrel resistance: discovery of vicagrel as a highly potent and orally bioavailable antiplatelet agent/ J. Shan, B. Zhang, H. Sun et al.// J Med Chem. – 2012. – Vol.55. – p.3342-3352.
217. Syed, N. Pharmacology of P2X receptors/ N. Syed, C. Kennedy//WIREs Membr Trans Signal. – 2012. – Vol.1. – p. 16-30.
218. Tang, J. Platelet Inhibition Agents: Current and Future P2Y12 Receptor Antagonists/ J. Tang, M. Li, X. Chen//Curr Vasc Pharmacol. – 2015. – Vol.13. – p.566-577.
219. Tengholm, A. Purinergic P2Y1 receptors take centre stage in autocrine stimulation of human beta cells/A. Tengholm//Diabetologia. – 2014. – Vol.57. – p.2436-2439.
220. Torigoe, G. PYK2 mediates BzATP-induced extracellular matrix proteins synthesis/G. Torigoe, M. Nagao, N. Shimizu et al// Biochem Biophys Res Commun. – 2017. – Vol 494. – p.663-667.
221. Trang, T. P2X4 purinoceptor signaling in chronic pain/T. Trang, M. Salter// Purinergic Signal. – 2012. – Vol. 8. – p. 621–628.
222. Ullmann, H. Synthesis and structure-activity relationships of suramin-derived P2Y11 receptor antagonists with nanomolar potency/ H. Ullmann H., S. Meis, M. Kassack et al.//J Med Chem. – 2005. – Vol.48. – p.7040-7048.
223. Vanderstocken, G. P2Y₂ receptor regulates vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) membrane and soluble forms and eosinophil accumulation during lung inflammation/G. Vanderstocken, B. Bondue, D. Communi et al. //J Immunol. – 2010. – Vol. 185. – p. 3702 – 3707.

224. Varani, K. P2X1 and P2X3 purinergic receptors differentially modulate the inflammatory response in human osteoarthritic synovial fibroblasts/K. Varani, M. De Mattei, P. Borea et al. // *Cell Physiol Biochem.* – 2010. – Vol. 25. – p. 325–336.
225. Ventura, S. Sodium nitroprusside enhances contractions of the guinea-pig isolated vas deferens/S. Ventura, C. Hoyle, G. Burnstock// *J Pharm Pharmacol.* – 1998. – V.50. – p.205-209.
226. von Kügelgen, I. Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes/I. von Kügelgen // *Pharmacol Ther.* – 2006. – Vol. 110. – p.415–432.
227. von Kügelgen, I. Pharmacology of mammalian P2X- and P2Y-receptors/I. von Kügelgen // *Biotrend Rew.* – 2008. – Vol.3. – p.1-11.
228. Wakizoe, E. The effects of extracellular ATP and its receptor antagonists on pig oocytes during in vitro maturation/E. Wakizoe, K. Ashizawa, K. Hemmi et al. // *Zygote.* – 2015. – Vol.23. – p.885-892.
229. Wallentin, L. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes /L. Wallentin L, R. Becker, A. Budaj et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2009. – Vol. 361. – p. 1045–1057.
230. Wang, N. Reduced bone turnover in mice lacking the P2Y 13 receptor/N. Wang, B. Robaye, A. Gartland et al. // *Mol Endocrinol.* – 2012. – Vol. 26. – p.142 – 152.
231. Wang, T. CHARISMA Investigators. An analysis of mortality rates with dual-antiplatelet therapy in the primary prevention population of the CHARISMA trial/T. Wang, D. Bhatt, K. Fox et al. // *Eur Heart J.* – 2007. – Vol.28. – p.2200–2207.
232. Webster, D. The measurement of adenosine and adenine nucleotides in tissues and body fluids/D. Webster// *Methods in pharmacology.* – 1985. – Vol.6. – p. 21-42.
233. Weyler, S. Combinatorial synthesis of anilinoanthraquinone derivatives and evaluation as non-nucleotide-derived P2Y2 receptor antagonists/S. Weyler, Y. Baqi, C. Müller et al. // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2008. – Vol.18. – p.223-227.
234. White, N. P2 receptors and cancer/N. White, G. Burnstock// *Trends Pharmacol Sci.* – 2006. – Vol. 27. – p. 211–217.

235. Wilkinson, W. The carbon monoxide donor, CORM-2, is an antagonist of ATP-gated, human P2X₄ receptors/W. Wilkinson, P. Kemp// *Purinergic Signal.* – 2011. – Vol.7. – p. 57-64.
236. Williams, M. Purinergic neurotransmission/M. Williams//*Neuropharmacology. The fifth Generation of progress.* – 2002. – Vol.15. – p.191-206.
237. Wolf, C. Molecular determinants of potent P2X₂ antagonism identified by functional analysis, mutagenesis, and homology docking/C. Wolf, C. Rosefort, R. Hausmann et al. //*Mol Pharmacol.* – 2011. – Vol. 79. – p.649-661.
238. Wu, G.A-317491, a selective P2X₃/P2X_{2/3} receptor antagonist, reverses inflammatory mechanical hyperalgesia through action at peripheral receptors in rats/ G. Wu, G. Whiteside, V. Ilyin et al.//*Eur J Pharmacol.* – 2004. – Vol. 504. – p.45-53.
239. Xie, R. The P2Y₂ nucleotide receptor mediates the proliferation and migration of human hepatocellular carcinoma cells induced by ATP/R. Xie, J. Xu, Y. Yang et al// *J Biol Chem.* – 2014. – Vol. 289. – p.19137–19149.
240. Xu J. Electrophysiological-anatomic correlates of ATP-triggered vagal reflex in the dog V. Role of purinergic receptors / Xu J., Kussmaul W., Kurnik P. et al. // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physl.* – 2005. – Vol. 288. – p.651-655.
241. Yan, Z. Experimental characterization and mathematical modeling of P2X₇ receptor channel gating/Z. Yan, A. Khadra, S. Stojilkovic et al.//*J Neurosci.* – 2010. – Vol. 30. – p.14213-14224.
242. Yegutkin, G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade/G. Yegutkin//*Biochim Biophys Acta.* – 2008. – Vol.1783. – p.673-694.
243. Yegutkin, G. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: functional implications and measurement of activities/G. Yegutkin//*Crit Rev Biochem Mol Biol.* – 2014. – Vol. 49. – p.473-497.

244. Yegutkin, G. Nucleotide homeostasis and purinergic nociceptive signaling in rat meninges in migraine-like conditions/G. Yegutkin, C. Guerrero-Toro, P. Abushik et al// Purinergic Signal. – 2016. – Vol. 12. – p.561–574.
245. Yiangou, Y. ATP-gated ion channel P2X3 is increased in human inflammatory bowel disease/Y. Yiangou, P. Facer, P. Anand et al. //Neurogastroenterol Motil. – 2001. – Vol. 13. – p. 365–369.
246. Yuan, M. Effect of A-317491 delivered by glycolipid-like polymer micelles on endometriosis pain/M. Yuan, S. Ding, F. Hu et al// Int J Nanomedicine. – 2017. – Vol.12. – p. 8171–8183.
247. Ziganshin, A.U. PPADS selectively antagonizes P_{2X}-purinoceptor-mediated responses in the rabbit urinary bladder/ A.U. Ziganshin, C. Hoyle, G. Burnstock et al. //Br. J. Pharmacol. – 1993. – Vol.110. – p.1491-1495.
248. Ziganshin, A.U. Selective antagonism by PPADS at P_{2X}-purinoceptors in rabbit isolated blood vessels/A.U. Ziganshin, C. Hoyle, G. Burnstock et al.// Br. J. Pharmacol. – 1994. – Vol.111. – p.923-929.
249. Ziganshin, A.U. Effects of P2-purinoceptor antagonists on ecto-nucleotidase activity of guinea-pig vas deferens cultured smooth muscle cells/ A.U. Ziganshin, L.E. Ziganshina, G. Burnstock et al.// Biochem Mol Biol Int. – 1995. – Vol. 36. – p.863-869.
250. Ziganshin, A.U. Differential degradation of extracellular adenine nucleotides by folliculated oocytes of *Xenopus laevis*/ A.U. Ziganshin, L.E. Ziganshina, G. Burnstock et al.// Comp Biochem Physiol A Physiol. – 1996. – Vol.114. – p.335-340.
251. Ziganshin, A.U. Purinergic P2-receptors as potential targets of new pharmaceutical products/ A.U. Ziganshin// Vestn Ross Akad Med Nauk. – 2011.- Vol.11. – p.32-38.
252. Zhang, H. Promoted interaction of nuclear factor-kappa B with demethylated purinergic P2X3 receptor gene contributes to neuropathic pain in rats with diabetes/H. Zhang, J. Hu, G. Xu et al// Diabetes. – 2015. – Vol. 64. – p. 4272–4284.

253. Zhou, X. Upregulated P2X3 receptor expression in patients with intractable temporal lobe epilepsy and in a rat model of epilepsy/X. Zhou, L. Ma, R. Li et al// Neurochem. Res. – 2016. – Vol. 41. – p.1263–1273.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

<i>Таблица 1</i> – Фармакологическая характеристика подтипов аденозиновых рецепторов (адаптировано из Fredholm et al., 2001, Burnstock,2009).....	15
<i>Таблица 2</i> – Фармакологическая характеристика подтипов P2X-рецепторов (адаптировано из Burnstock,2013)	17
<i>Таблица 3</i> – Фармакологическая характеристика подтипов P2Y-рецепторов (адаптировано из Burnstock,2013)	19
<i>Таблица 4</i> – Химическая структура исследованных аналогов PPADS (азофенилсульфонаты натрия)	37
<i>Рисунок 1</i> – Соединение А8– п-[3,4-дигидроксиметил-5-гидрокси-6-метилпиридил-2-азо]фенилсульфонат натрия.....	38
<i>Рисунок 2</i> – Соединение А9 – п-[3-(((2-гидроксиэтил)тио)метил)-4-гидроксиметил-5-гидрокси-6-метилпиридил-2-азо]фенилсульфонат натрия.....	38
<i>Таблица 5</i> – Химическая структура исследованных аналогов PPADS (азофенилдисульффонаты натрия).....	39
<i>Таблица 6</i> – Активность производных пиридоксина в отношении P2X-рецепторов в целом и их подвидов по данным прогноза PASS.....	63
<i>Рисунок 3</i> – Влияние соединений А1-А9 и PPADS в концентрации 10 мкМ на сокращения изолированного мочевого пузыря крысы, вызванные электрической стимуляцией полем частотой 4,8 и 16 Гц в присутствии атропина (10μМ).....	65
<i>Рисунок 4</i> – Влияние соединений В1-В6 и PPADS в концентрации 10 мкМ на сокращения изолированного мочевого пузыря крысы, вызванные электрической стимуляцией полем частотой 4,8 и 16 Гц в присутствии атропина (10μМ).....	66
<i>Рисунок 5</i> – Влияние соединений А1-А9 и PPADS в концентрации 10 мкМ	

на сокращения изолированного семявыносящего протока крысы, вызванные электрической стимуляцией полем частотой 4,8 и 16 Гц в присутствии фентоламина (10 μ М)	68
<i>Рисунок 6</i> – Влияние соединений В1-В6 и РРАDСв концентрации 10 мкМ на сокращения изолированного семявыносящего протока крысы, вызванные электрической стимуляцией полем частотой 4,8 и 16 Гц в присутствии фентоламина (10 μ М).....	70
<i>Рисунок 7</i> – Зависимость силы сокращения изолированных тканей мочевого пузыря и семявыносящего протока крысы от липофильности азофенилсульфоновых производных при 8 Гц.....	72
<i>Рисунок 8</i> – Влияние соединений А1-А9, В1-В6 и РРАDС в концентрации 10 мкМ на активность экто-нуклеотидаз изолированного мочевого пузыря крысы.....	73
<i>Таблица 7</i> – Значение коэффициента липофильности (LogP) для азофенилсульфоновых производных пиридоксина	74
<i>Таблица 8</i> – Значение коэффициента липофильности (LogP) для азофенилдисульфоновых производных пиридоксина	75
<i>Рисунок 9</i> – Зависимость силы сокращений изолированной ткани мочевого пузыря крысы от липофильности исследуемого соединения при 8 Гц.....	75
<i>Рисунок 10</i> – Зависимость силы сокращений изолированной ткани семявыносящего протока крысы от липофильности исследуемого соединения при 8 Гц.....	76
<i>Рисунок 11</i> – Сокращения изолированного мочевого пузыря (слева) и семявыносящего протока (справа) крысы, вызванные α,β -метиленаТФ до (круглые символы) и после инкубации с соединением А3(квадратные символы) в концентрации 10 мкМ.....	80
<i>Рисунок 12</i> – Сокращения изолированного мочевого пузыря (слева) и семявыносящего протока (справа) крысы, вызванные α,β -метиленаТФ до	

(круглые символы) и после (квадратные символы) инкубации с соединением А9 в концентрации 10 мкМ.	80
<i>Рисунок 13</i> – Сокращения изолированного мочевого пузыря (слева) и семявыносящего протока (справа) крысы, вызванные α,β -метиленаТФ до (круглые символы) и после инкубации с РРАДС (ромбовидные символы) в концентрации 10 мкМ.	82
<i>Рисунок 14</i> – Расслабления препарата двенадцатиперстной кишки крысы, вызванные СЭП частотой 0,5-8 Гц и АТФ в концентрациях 1-30мкМ, до (светлые столбики) и после инкубации с соединением А3 (темные столбики) в концентрации 10мкМ.....	83
<i>Рисунок 15</i> – Расслабления препарата двенадцатиперстной кишки крысы, вызванные СЭП частотой 0,5-8 Гц и АТФ в концентрациях 1-30мкМ, до (светлые столбики) и после (темные столбики) инкубации с соединением А9 в концентрации 10 мкМ.....	84
<i>Рисунок 16</i> – Расслабления препарата двенадцатиперстной кишки крысы, вызванные СЭП частотой 0,5-8 Гц и АТФ в концентрациях 1-30мкМ, до (светлые столбики) и после (темные столбики) инкубации с РРАДС в концентрации 10 мкМ.	84
<i>Таблица 9</i> – Влияние внутривенного введения АТФ в дозе 1 мг/кг на частоту сердечных сокращений мыши в контроле и при предварительном введении соединения А3 в дозе 10 мг/кг на $M \pm m$ (%).	86
<i>Таблица 10</i> – Влияние внутривенного введения АТФ в дозе 1 мг/кг на частоту сердечных сокращений мыши в контроле и при предварительном введении соединения А3 в дозе 100 мг/кг на $M \pm m$ (%).	87
<i>Таблица 11</i> – Влияние внутривенного введения АТФ в дозе 1 мг/кг на частоту сердечных сокращений мыши в контроле и при предварительном введении РРАДС в дозе 10 мг/кг на $M \pm m$ (%).	87
<i>Таблица 12</i> – Влияние внутривенного введения АТФ в дозе 1 мг/кг на частоту сердечных сокращений мыши в контроле и при предварительном	

введении PPADS в дозе 100 мг/кг на $M \pm m$ (%).....	88
<i>Таблица 13</i> – Показатели двигательной и ориентировочной активности у крыс на фоне введения исследуемых соединений в тесте «открытое поле».....	89
<i>Рисунок 17</i> – Влияние однократного введения соединений А3 и PPADS на параметры поведения животных в тесте «открытое поле».....	90
<i>Таблица 14</i> – Влияние исследуемых соединений при однократном внутрибрюшинном введении на двигательную активность в установке «темная/светлая камера».....	91
<i>Рисунок 18</i> – Влияние однократного введения соединений А3 и PPADS на параметры поведения животных в тесте «темная/светлая камера».....	92
<i>Таблица 15</i> – Влияние однократного введения соединений А3 и PPADS на параметры поведения мышей в условиях методики ПКЛ.....	93
<i>Рисунок 19</i> – Влияние соединений на продолжительность времени, проводимого животными в открытом рукаве в тесте ПКЛ.....	94
<i>Рисунок 20</i> – Влияние исследуемых соединений на поведение отчаяния в тесте Porsolt.....	95
<i>Таблица 16</i> – Антитромботическая активность соединения А3 (per os) на модели артериального тромбоза, индуцированного 50% раствором $FeCl_3$	96
<i>Таблица 17</i> – Изучение влияния соединения А3 в концентрации 1мКм на активацию тромбоцитов в кальциевой среде, индуцированного АДФ в концентрации 20 нМ.....	97
<i>Таблица 18</i> – Изучение влияния соединения А3 и соединения сравнения MRS 2179 в концентрации 1мКм на активацию тромбоцитов в безкальциевой среде, индуцированного АДФ в концентрации 70 нМ.....	98
<i>Таблица 19</i> – Влияние соединений А3, Буторфанола на антиноцицептивные эффекты в тесте электрической стимуляции корня хвоста ($M \pm m$).....	99

<i>Таблица 20</i> – Влияние соединений АЗ, Буторфанола на антиноцицептивные эффекты в тесте «Tail-flick» (M±m).....	100
<i>Таблица 21</i> – Влияние соединений АЗ, Буторфанола на антиноцицептивные эффекты в тесте «hot plate» (M±m).....	101

ПРИЛОЖЕНИЕ

Детализация экспериментального исследования

Таблица 1. Прогнозируемые спектры активности соединений А1-А9 в системе PASS ($P_a \geq 0,5$)

Шифр соединения	Активность	P_a	P_i
А1	Purinergetic P2X3 antagonist	0,730	0,002
	Maillard reaction inhibitor	0,503	0,005
А2	Purinergetic P2X3 antagonist	0,722	0,002
	Xenobiotic-transporting ATPase inhibitor	0,616	0,006
А3	Purinergetic P2X3 antagonist	0,730	0,002
	Maillard reaction inhibitor	0,503	0,005
А4	Purinergetic P2X3 antagonist	0,701	0,002
	Estradiol 17 beta dehydrogenase stimulant	0,503	0,001
А5	Purinergetic P2X3 antagonist	0,707	0,002
А6	Purinergetic P2X3 antagonist	0,659	0,003
	Glycerol-ether monooxygenase inhibitor	0,518	0,053
А7	Purinergetic P2X3 antagonist	0,659	0,003
	Glycerol-ether monooxygenase inhibitor	0,518	0,053
А8	Purinergetic P2X3 antagonist	0,883	0,001
	Purinergetic P2X4 antagonist	0,850	0,001
	Pyridoxal 4-dehydrogenase inhibitor	0,676	0,001
	Phosphatidylserine decarboxylase inhibitor	0,642	0,020
	Maillard reaction inhibitor	0,588	0,004
А9	Purinergetic P2X3 antagonist	0,827	0,001
	Pyridoxal 4-dehydrogenase inhibitor	0,589	0,001
	Purinergetic receptor antagonist	0,546	0,004
	Purinergetic P2 antagonist	0,505	0,004
	Maillard reaction inhibitor	0,504	0,005
	Purinergetic P2X antagonist	0,500	0,002

Таблица 2. Прогнозируемые спектры активности соединений В1-В6 в системе PASS ($P_a \geq 0,5$)

Шифр	Активность	P_a	P_i
В1	Purinergetic P2X3 antagonist	0,783	0,001
	Xenobiotic-transporting ATPase inhibitor	0,548	0,008
В2	Purinergetic P2X3 antagonist	0,787	0,001
В3	Purinergetic P2X3 antagonist	0,766	0,002
В4-В6	Purinergetic P2X3	0,755	0,002

	antagonist		
--	------------	--	--

Таблица 3. Влияние соединения А1 в концентрации 10 мкМ на сократительные ответы изолированного мочевого пузыря крысы, вызванные стимуляцией электрическим полем в присутствии атропина (1 мкМ), n=6

Частота стимуляции, Гц	Исходные сокращения, M±m, грамм	На фоне соединения А1	
		M±m, грамм	% от исходных
0,5	0,45±0,04	0,43±0,02	95,5
1	0,56±0,02	0,61±0,04	108,9
2	0,61±0,03	0,63±0,05	103,2
4	0,87±0,03	0,89±0,02	102,3
8	1,16±0,04	1,08±0,04	93,1
16	1,25±0,01	1,24±0,02	99,2
32	1,32±0,01	1,33±0,01	100,75

Таблица 4. Влияние соединения А2 в концентрации 10 мкМ на сократительные ответы изолированного мочевого пузыря крысы, вызванные стимуляцией электрическим полем в присутствии атропина (1 мкМ), n=6

Частота стимуляции, Гц	Исходные сокращения, M±m, грамм	На фоне соединения А2	
		M±m, грамм	% от исходных
0,5	0,15±0,02	0,17±0,01	113,3
1	0,23±0,01	0,22±0,01	95,6
2	0,23±0,01	0,25±0,01	108,7
4	0,32±0,02	0,32±0,01	100
8	0,46±0,02	0,41±0,03	89,1
16	0,55±0,02	0,54±0,02	98,1
32	0,59±0,01	0,57±0,02	96,6

Таблица 5. Влияние соединения А3 в концентрации 10 мкМ на сократительные ответы изолированного мочевого пузыря крысы, вызванные стимуляцией электрическим полем в присутствии атропина (1 мкМ), n=6

Частота стимуляции, Гц	Исходные сокращения, M±m, грамм	На фоне соединения А3	
		M±m, грамм	% от исходных
0,5	0,68±0,02	0,66±0,03	97
1	1,21±0,04	1,16±0,05	95,9
2	1,32±0,01	1,18±0,07*	88,6
4	1,8±0,15	1,39±0,12*	77,2
8	2,4±0,11	1,85±0,16*	77,1
16	2,6±0,14	1,88±0,13*	72,3
32	3,08±0,25	1,96±0,15*	63,6

Примечание: *p≤0,05 от исходных (Т-критерий Вилкоксона)

Таблица 6. Влияние соединения А4 в концентрации 10 мкМ на сократительные ответы изолированного мочевого пузыря крысы, вызванные стимуляцией электрическим полем в присутствии атропина (1 мкМ), n=6

Частота стимуляции, Гц	Исходные сокращения, M±m, грамм	На фоне соединения А4	
		M±m, грамм	% от исходных
0,5	0,65±0,02	0,58±0,04	89,2
1	0,78±0,04	0,68±0,04	87,2
2	0,8±0,05	0,7±0,04	87,5
4	0,9±0,03	0,84±0,05	93,3
8	1,07±0,05	0,9±0,04	84,1
16	1,23±0,03	1,04±0,05	84,6
32	1,34±0,01	1,38±0,03	103

Таблица 7. Влияние соединения А5 в концентрации 10 мкМ на сократительные ответы изолированного мочевого пузыря крысы, вызванные стимуляцией электрическим полем в присутствии атропина (1 мкМ), n=6

Частота стимуляции, Гц	Исходные сокращения, M±m, грамм	На фоне соединения А5	
		M±m, грамм	% от исходных
0,5	0,58±0,02	0,61±0,04	105,2
1	0,72±0,02	0,69±0,05	95,8
2	1,08±0,05	0,98±0,07	90,7
4	1,24±0,04	1,08±0,01	87,1
8	1,39±0,04	1,26±0,04	90,6
16	1,93±0,08	1,8±0,07	93,3
32	2,06±0,03	1,92±0,05	93,2

Таблица 8. Влияние соединения А6 в концентрации 10 мкМ на сократительные ответы изолированного мочевого пузыря крысы, вызванные стимуляцией электрическим полем в присутствии атропина (1 мкМ), n=6

Частота стимуляции, Гц	Исходные сокращения, M±m, грамм	На фоне соединения А6	
		M±m, грамм	% от исходных
0,5	0,35±0,02	0,31±0,02	88,6
1	0,45±0,06	0,41±0,03	91,1
2	0,52±0,03	0,48±0,03	92,3
4	0,71±0,07	0,63±0,06	88,7
8	0,87±0,04	0,8±0,03	91,9
16	1,00±0,01	0,92±0,06	92
32	1,05±0,02	0,98±0,04	93,3

Таблица 9. Влияние соединения А7 в концентрации 10 мкМ на сократительные ответы изолированного мочевого пузыря крысы, вызванные стимуляцией электрическим полем в присутствии атропина (1 мкМ), n=6

Частота стимуляции, Гц	Исходные сокращения, M±m, грамм	На фоне соединения А7	
		M±m, грамм	% от исходных
0,5	0,34±0,02	0,31±0,02	91,2
1	0,48±0,03	0,41±0,03	85,4
2	0,56±0,02	0,45±0,03	80,4
4	0,63±0,02	0,61±0,03	96,8
8	0,79±0,04	0,74±0,03	93,7
16	0,98±0,03	0,92±0,03	93,9
32	1,06±0,03	0,98±0,02	92,4

Таблица 10. Влияние соединения А8 в концентрации 10 мкМ на сократительные ответы изолированного мочевого пузыря крысы, вызванные стимуляцией электрическим полем в присутствии атропина (1 мкМ), n=6

Частота стимуляции, Гц	Исходные сокращения, M±m, грамм	На фоне соединения А8	
		M±m, грамм	% от исходных
0,5	0,33±0,03	0,3±0,04	90,9
1	0,51±0,03	0,48±0,03	94,1
2	0,6±0,02	0,61±0,04	101,7
4	0,94±0,02	0,94±0,02	100
8	1,18±0,02	1,15±0,04	97,4
16	1,54±0,04	1,37±0,08	89
32	1,83±0,06	1,82±0,06	99,4

Таблица 11. Влияние соединения А9 в концентрации 10 мкМ на сократительные ответы изолированного мочевого пузыря крысы, вызванные стимуляцией электрическим полем в присутствии атропина (1 мкМ), n=6

Частота стимуляции, Гц	Исходные сокращения, M±m, грамм	На фоне соединения А9	
		M±m, грамм	% от исходных
0,5	0,07±0,01	0,08±0,01	114,3
1	0,21±0,01	0,17±0,03	81
2	0,26±0,01	0,24±0,02	92,3
4	0,33±0,02	0,24±0,03*	72,7
8	0,43±0,02	0,33±0,05*	76,7
16	0,93±0,02	0,55±0,11*	59,1
32	1,19±0,12	0,72±0,13*	60,5

Примечание: * $p \leq 0,05$ от исходных (Т-критерий Вилкоксона)

Таблица 12. Влияние соединения В1 в концентрации 10 мкМ на сократительные ответы изолированного мочевого пузыря крысы, вызванные стимуляцией электрическим полем в присутствии атропина (1 мкМ), n=6

Частота стимуляции, Гц	Исходные сокращения, M±m, грамм	На фоне соединения В1	
		M±m, грамм	% от исходных
0,5	0,63±0,04	0,59±0,04	93,7
1	0,88±0,04	0,77±0,03	87,5
2	1,12±0,04	0,95±0,05	84,8
4	1,3±0,03	1,16±0,08	89,2
8	1,48±0,03	1,32±0,07	89,1
16	1,53±0,04	1,32±0,05	86,3
32	1,57±0,04	1,4±0,03	89,2

Таблица 13. Влияние соединения В2 в концентрации 10 мкМ на сократительные ответы изолированного мочевого пузыря крысы, вызванные стимуляцией электрическим полем в присутствии атропина (1 мкМ), n=6

Частота стимуляции, Гц	Исходные сокращения, M±m, грамм	На фоне соединения В2	
		M±m, грамм	% от исходных
0,5	0,23±0,01	0,15±0,03	63
1	0,35±0,02	0,31±0,01	88,6
2	0,36±0,04	0,33±0,03	91,7
4	0,44±0,05	0,38±0,04	86,3
8	0,5±0,05	0,43±0,03	86
16	0,59±0,04	0,53±0,03	89,8
32	0,69±0,02	0,56±0,04	81,2

Таблица 14. Влияние соединения В3 в концентрации 10 мкМ на сократительные ответы изолированного мочевого пузыря крысы, вызванные стимуляцией электрическим полем в присутствии атропина (1 мкМ), n=6

Частота стимуляции, Гц	Исходные сокращения, M±m, грамм	На фоне соединения В3	
		M±m, грамм	% от исходных
0,5	0,56±0,01	0,52±0,04	92,9
1	0,71±0,02	0,64±0,03	90,1
2	1,04±0,02	0,98±0,05	94,2
4	1,24±0,05	1,14±0,07	91,9
8	1,54±0,06	1,39±0,18	90,2
16	1,57±0,02	1,54±0,04	98,1
32	1,65±0,02	1,59±0,03	96,3

Таблица 15. Влияние соединения В4 в концентрации 10 мкМ на сократительные ответы изолированного мочевого пузыря крысы, вызванные стимуляцией электрическим полем в присутствии атропина (1 мкМ), n=6

Частота стимуляции, Гц	Исходные сокращения, M±m, грамм	На фоне соединения В4	
		M±m, грамм	% от исходных
0,5	0,22±0,01	0,19±0,01	86,4
1	0,27±0,03	0,3±0,01	111,1
2	0,33±0,01	0,33±0,01	100
4	0,4±0,02	0,4±0,01	100
8	0,63±0,02	0,62±0,02	98,4
16	0,73±0,01	0,71±0,02	97,2
32	0,82±0,01	0,78±0,02	95,1

Таблица 16. Влияние соединения В5 в концентрации 10 мкМ на сократительные ответы изолированного мочевого пузыря крысы, вызванные стимуляцией электрическим полем в присутствии атропина (1 мкМ), n=6

Частота стимуляции, Гц	Исходные сокращения, M±m, грамм	На фоне соединения В5	
		M±m, грамм	% от исходных
0,5	0,36±0,02	0,32±0,06	88,9
1	0,76±0,02	0,68±0,03	89,5
2	0,8±0,01	0,76±0,02	95
4	0,91±0,03	0,85±0,02	93,4
8	0,95±0,02	0,9±0,03	94,7
16	1,22±0,05	1,16±0,02	95,1
32	1,4±0,01	1,35±0,03	96,4

Таблица 17. Влияние соединения В6 в концентрации 10 мкМ на сократительные ответы изолированного мочевого пузыря крысы, вызванные стимуляцией электрическим полем в присутствии атропина (1 мкМ), n=6

Частота стимуляции, Гц	Исходные сокращения, M±m, грамм	На фоне соединения В6	
		M±m, грамм	% от исходных
0,5	0,52±0,01	0,45±0,03	86,5
1	0,92±0,02	0,88±0,03	95,6
2	1,07±0,02	0,99±0,05	92,5
4	1,24±0,05	1,22±0,06	98,4
8	1,36±0,02	1,34±0,02	98,5
16	1,75±0,02	1,73±0,03	98,9
32	1,84±0,02	1,8±0,02	97,8

Таблица 18. Влияние PPADS в концентрации 10 мкМ на сократительные ответы изолированного мочевого пузыря крысы, вызванные стимуляцией электрическим полем в присутствии атропина (1 мкМ), n=6

Частота стимуляции, Гц	Исходные сокращения, M±m, грамм	На фоне PPADS	
		M±m, грамм	% от исходных
0,5	0,77±0,06	0,74±0,06	96,1
1	0,94±0,02	0,89±0,01*	94,5
2	1,48±0,02	0,98±0,04*	66,2
4	1,72±0,11	1,13±0,06*	66,0
8	2,25±0,04	1,38±0,14*	61,4
16	2,56±0,12	1,16±0,12*	45,4
32	2,92±0,04	2,19±0,07*	75,1

Таблица 19. Влияние соединения А1 в концентрации 10 мкМ на сократительные ответы изолированного семявыносящего протока крысы, вызванные стимуляцией электрическим полем в присутствии фентоламина (1 мкМ), n=6

Частота стимуляции, Гц	Исходные сокращения, M±m, грамм	На фоне соединения А1	
		M±m, грамм	% от исходных
0,5	0,08±0,01	0,06±0,01	75
1	0,13±0,01	0,12±0,01	100
2	0,19±0,01	0,17±0,02	89,4
4	0,24±0,01	0,20±0,01	83,3
8	0,32±0,02	0,29±0,01	90,6
16	0,52±0,03	0,48±0,03	92,3
32	0,61±0,01	0,58±0,02	95,1

Таблица 20. Влияние соединения А2 в концентрации 10 мкМ на сократительные ответы изолированного семявыносящего протока крысы, вызванные стимуляцией электрическим полем в присутствии фентоламина (1 мкМ), n=6

Частота стимуляции, Гц	Исходные сокращения, M±m, грамм	На фоне соединения А2	
		M±m, грамм	% от исходных
0,5	0,14±0,01	0,11±0,01	78,6
1	0,16±0,01	0,14±0,02	87,5
2	0,20±0,01	0,17±0,02	85
4	0,3±0,01	0,26±0,03	86,7
8	0,4±0,02	0,38±0,04	95
16	0,47±0,02	0,45±0,02	95,7
32	0,58±0,02	0,56±0,01	96,6

Таблица 21. Влияние соединения А3 в концентрации 10 мкМ на сократительные ответы изолированного семявыносящего протока крысы, вызванные стимуляцией электрическим полем в присутствии фентоламина (1 мкМ), n=6

Частота стимуляции, Гц	Исходные сокращения, M±m, грамм	На фоне соединения А3	
		M±m, грамм	% от исходных
0,5	0,79±0,08	0,56±0,04	70,9
1	1,37±0,02	1,33±0,03*	97,1
2	1,44±0,02	1,36±0,03*	94,4
4	1,89±0,03	1,65±0,06*	87,3
8	2,14±0,06	1,83±0,07*	85,5
16	2,34±0,12	2,08±0,08*	88,9
32	2,5±0,05	2,19±0,07*	87,6

Примечание: * $p \leq 0,05$ от исходных (Т-критерий Вилкоксона)

Таблица 22. Влияние соединения А4 в концентрации 10 мкМ на сократительные ответы изолированного семявыносящего протока крысы, вызванные стимуляцией электрическим полем в присутствии фентоламина (1 мкМ), n=6

Частота стимуляции, Гц	Исходные сокращения, M±m, грамм	На фоне соединения А4	
		M±m, грамм	% от исходных
0,5	0,07±0,02	0,06±0,01	85,7
1	0,09±0,03	0,08±0,04	88,9
2	0,12±0,01	0,11±0,02	91,7
4	0,18±0,01	0,16±0,01	88,9
8	0,29±0,02	0,28±0,02	96,6
16	0,32±0,02	0,31±0,01	96,9
32	0,43±0,01	0,41±0,02	95,3

Таблица 23. Влияние соединения А5 в концентрации 10 мкМ на сократительные ответы изолированного семявыносящего протока крысы, вызванные стимуляцией электрическим полем в присутствии фентоламина (1 мкМ), n=6

Частота стимуляции, Гц	Исходные сокращения, M±m, грамм	На фоне соединения А4	
		M±m, грамм	% от исходных
0,5	0,23±0,01	0,18±0,02	78,3
1	0,65±0,02	0,60±0,03	92,3
2	0,84±0,02	0,79±0,02	94
4	1,11±0,03	1,07±0,04	96,3
8	1,71±0,01	1,65±0,03	96,5
16	2,28±0,09	2,10±0,01	92,1
32	2,44±0,14	2,32±0,08	95,1

Таблица 24. Влияние соединения А6 в концентрации 10 мкМ на сократительные ответы изолированного семявыносящего протока крысы, вызванные стимуляцией электрическим полем в присутствии фентоламина (1 мкМ), n=6

Частота стимуляции, Гц	Исходные сокращения, M±m, грамм	На фоне соединения А5	
		M±m, грамм	% от исходных
0,5	0,03±0,01	0,03±0,01	100
1	0,05±0,01	0,05±0,01	100
2	0,08±0,02	0,07±0,03	87,5
4	0,14±0,04	0,12±0,02	85,7
8	0,23±0,02	0,21±0,01	91,3
16	0,42±0,01	0,41±0,02	97,6
32	0,55±0,02	0,51±0,02	98,1

Таблица 25. Влияние соединения А7 в концентрации 10 мкМ на сократительные ответы изолированного семявыносящего протока крысы, вызванные стимуляцией электрическим полем в присутствии фентоламина (1 мкМ), n=6

Частота стимуляции, Гц	Исходные сокращения, M±m, грамм	На фоне соединения А6	
		M±m, грамм	% от исходных
0,5	0,05±0,01	0,03±0,01	60
1	0,09±0,01	0,07±0,02	77,8
2	0,11±0,02	0,09±0,03	81,8
4	0,13±0,01	0,13±0,05	100
8	0,16±0,03	0,14±0,01	87,5
16	0,19±0,03	0,18±0,02	94,7
32	0,24±0,01	0,20±0,06	83,3

Таблица 26. Влияние соединения А8 в концентрации 10 мкМ на сократительные ответы изолированного семявыносящего протока крысы, вызванные стимуляцией электрическим полем в присутствии фентоламина (1 мкМ), n=6

Частота стимуляции, Гц	Исходные сокращения, M±m, грамм	На фоне соединения А7	
		M±m, грамм	% от исходных
0,5	0,31±0,02	0,29±0,01	93,5
1	0,49±0,01	0,45±0,02	91,8
2	0,54±0,01	0,52±0,01	96,3
4	0,65±0,02	0,58±0,03	89,2
8	1,00±0,04	0,96±0,05	96
16	1,20±0,06	1,20±0,05	100
32	1,52±0,02	1,41±0,03	92,8

Таблица 27. Влияние соединения А9 в концентрации 10 мкМ на сократительные ответы изолированного семявыносящего протока крысы, вызванные стимуляцией электрическим полем в присутствии фентоламина (1 мкМ), n=6

Частота стимуляции, Гц	Исходные сокращения, M±m, грамм	На фоне соединения А8	
		M±m, грамм	% от исходных
0,5	0,02±0,01	0,03±0,02	150
1	0,04±0,02	0,03±0,03	75
2	0,11±0,01	0,09±0,02	81,8
4	0,31±0,03	0,28±0,04	90,3
8	0,38±0,02	0,29±0,02*	76,3
16	0,63±0,02	0,59±0,02	93,7
32	0,70±0,01	0,64±0,02	91,4

Примечание: * $p \leq 0,05$ от исходных (Т-критерий Вилкоксона)

Таблица 28. Влияние соединения В1 в концентрации 10 мкМ на сократительные ответы изолированного семявыносящего протока крысы, вызванные стимуляцией электрическим полем в присутствии фентоламина (1 мкМ), n=6

Частота стимуляции, Гц	Исходные сокращения, M±m, грамм	На фоне соединения В1	
		M±m, грамм	% от исходных
0,5	0,10±0,01	0,09±0,02	90
1	0,15±0,02	0,13±0,02	86,7
2	0,25±0,01	0,23±0,01	92
4	0,29±0,01	0,27±0,02	93,1
8	0,31±0,01	0,27±0,02	87,1
16	0,61±0,07	0,52±0,01	85,2
32	0,63±0,01	0,62±0,01	98,4

Таблица 29. Влияние соединения В2 в концентрации 10 мкМ на сократительные ответы изолированного семявыносящего протока крысы, вызванные стимуляцией электрическим полем в присутствии фентоламина (1 мкМ), n=6

Частота стимуляции, Гц	Исходные сокращения, M±m, грамм	На фоне соединения В2	
		M±m, грамм	% от исходных
0,5	0,03±0,01	0,03±0,01	100
1	0,05±0,02	0,04±0,02	80
2	0,08±0,03	0,07±0,02	87,5
4	0,11±0,02	0,12±0,01	109,1
8	0,19±0,04	0,19±0,02	100
16	0,30±0,02	0,28±0,01	93,3
32	0,35±0,03	0,33±0,01	94,3

Таблица 30. Влияние соединения В3 в концентрации 10 мкМ на сократительные ответы изолированного семявыносящего протока крысы, вызванные стимуляцией электрическим полем в присутствии фентоламина (1 мкМ), n=6

Частота стимуляции, Гц	Исходные сокращения, M±m, грамм	На фоне соединения В3	
		M±m, грамм	% от исходных
0,5	0,26±0,03	0,24±0,02	92,3
1	0,32±0,01	0,29±0,01	90,6
2	0,42±0,02	0,39±0,01	92,9
4	0,58±0,01	0,52±0,02	89,7
8	0,66±0,01	0,64±0,01	97
16	0,72±0,01	0,69±0,02	95,8
32	0,78±0,02	0,76±0,03	97,4

Таблица 31. Влияние соединения В4 в концентрации 10 мкМ на сократительные ответы изолированного семявыносящего протока крысы, вызванные стимуляцией электрическим полем в присутствии фентоламина (1 мкМ), n=6

Частота стимуляции, Гц	Исходные сокращения, M±m, грамм	На фоне соединения В4	
		M±m, грамм	% от исходных
0,5	0,15±0,02	0,13±0,02	86,7
1	0,26±0,02	0,23±0,03	88,5
2	0,35±0,02	0,32±0,02	91,4
4	0,44±0,01	0,39±0,03	88,6
8	0,56±0,02	0,52±0,03	92,9
16	0,64±0,02	0,60±0,03	93,8
32	0,72±0,02	0,68±0,03	94,4

Таблица 32. Влияние соединения В5 в концентрации 10 мкМ на сократительные ответы изолированного семявыносящего протока крысы, вызванные стимуляцией электрическим полем в присутствии фентоламина (1 мкМ), n=6

Частота стимуляции, Гц	Исходные сокращения, M±m, грамм	На фоне соединения В5	
		M±m, грамм	% от исходных
0,5	0,40±0,01	0,36±0,02	90
1	0,44±0,02	0,39±0,01	88,6
2	0,50±0,01	0,49±0,01	98
4	0,57±0,03	0,55±0,03	96,5
8	0,64±0,01	0,61±0,02	95,3
16	0,74±0,01	0,69±0,04	93,2
32	0,83±0,03	0,79±0,01	95,2

Таблица 33. Влияние соединения В6 в концентрации 10 мкМ на сократительные ответы изолированного семявыносящего протока крысы, вызванные стимуляцией электрическим полем в присутствии фентоламина (1 мкМ), n=6

Частота стимуляции, Гц	Исходные сокращения, M±m, грамм	На фоне соединения В6	
		M±m, грамм	% от исходных
0,5	0,04±0,01	0,04±0,01	100
1	0,09±0,01	0,06±0,02	66,7
2	0,11±0,02	0,10±0,02	90,9
4	0,20±0,01	0,17±0,02	85
8	0,24±0,01	0,21±0,02	87,5
16	0,32±0,01	0,28±0,02	87,5
32	0,43±0,01	0,41±0,01	95,3

Таблица 34. Влияние PPADS в концентрации 10 мкМ на сократительные ответы изолированного семявыносящего протока крысы, вызванные стимуляцией электрическим полем в присутствии фентоламина (1 мкМ), n=6

Частота стимуляции, Гц	Исходные сокращения, M±m, грамм	На фоне PPADS	
		M±m, грамм	% от исходных
0,5	0,05±0,01	0,03±0,01*	60
1	0,08±0,02	0,05±0,02*	62,5
2	0,31±0,01	0,29±0,02*	93,5
4	0,48±0,01	0,34±0,02*	70,4
8	0,65±0,02	0,58±0,02*	62,8
16	1,52±0,01	0,98±0,05*	64,4
32	1,66±0,02	1,6±0,06	96,4

Таблица 35. Влияние исследованных соединений в концентрации 10 мкМ на активность экто-нуклеотидаз изолированных тканей крыс. Результаты представлены как % от исходной активности фермента, принятой за 100%. Результаты являются средними значениями четырех параллельных проб, проведенных в двух повторах, n=8.

Соединение	Мочевой пузырь, M±m, %	Семявыносящие протоки, M±m, %
A1	92,6±3,7	85,1±3,8*
A2	104,7±3,8	134,8±4,8*
A3	100±3,8	108,7±5,2
A4	141±12,4*	105,4±10,9
A6	101,8±1,85	105,5±4,3
A7	103,7±2,96	93,6±4,7
A8	84,8±2,4	139,1±5,2*
A9	124±16,8	115,6±12,2
B1	83±8,7	76,5±11,2
B2	105,8±11,6	98,6±12,6
B3	73,7±6,8*	112±4
B4	99,1±5,1	102±4,8
B5	124,6±9,7*	74±6,4*
B6	114,4±8,9	88±6,4
PPADS	82,3±1,0	72,6±1,2

Примечание: * $p \leq 0,05$ от исходных (U-критерий Манна-Уитни)

Таблица 36. Влияние соединения А3 в концентрации 10мкМ на сократительные ответы изолированного мочевого пузыря крысы, вызванные α,β -метиленаТФ, n=6.

Концентрация агониста, мкМ	Исходные сокращения, М±m, грамм	На фоне соединения А3	
		М±m, грамм	% от исходных
0,1	0	0	0
0,3	0,49±0,05	0,29±0,04	59,2
1	0,77±0,04	0,48±0,08*	62,3
3	0,84±0,05	0,71±0,04	84,5

Таблица 37. Влияние соединения А3 в концентрации 10мкМ на сократительные ответы изолированного семявыносящего протока крысы, вызванные α,β -метиленаТФ, n=6.

Концентрация агониста, мкМ	Исходные сокращения, М±m, грамм	На фоне соединения А3	
		М±m, грамм	% от исходных
0,1	0	0	0
0,3	0,31±0,01	0,23±0,03	74,2
1	0,41±0,01	0,35±0,02*	83,3
3	0,53±0,01	0,42±0,06	79,2

Таблица 38. Влияние соединения А9 в концентрации 10мкМ на сократительные ответы изолированного мочевого пузыря крысы, вызванные α,β -метиленаТФ, n=6

Концентрация агониста, мкМ	Исходные сокращения, М±m, грамм	На фоне соединения А3	
		М±m, грамм	% от исходных
0,1	0	0	0
0,3	0,72±0,02	0,61±0,05	84,7
1	1,06±0,07	0,85±0,05*	80,2

3	1,10±0,03	0,92±0,05	83,6
---	-----------	-----------	------

Таблица 39. Влияние соединения А9 в концентрации 10мкМ на сократительные ответы изолированного семявыносящего протока крысы, вызванные α,β -метиленаТФ, n=6

Концентрация агониста, мкМ	Исходные сокращения, M±m, грамм	На фоне соединения А3	
		M±m, грамм	% от исходных
0,1	0	0	0
0,3	0,34±0,02	0,25±0,03	73,5
1	0,41±0,01	0,29±0,04	70,7
3	0,55±0,02	0,45±0,03	81,8

Таблица 40. Влияние PPADS в концентрации 10мкМ на сократительные ответы изолированного мочевого пузыря крысы, вызванные α,β -метиленаТФ, n=6

Концентрация агониста, мкМ	Исходные сокращения, M±m, грамм	На фоне PPADS	
		M±m, грамм	% от исходных
0,1	0	0	0
0,3	0,44±0,01	0,20±0,06*	45,4
1	0,58±0,01	0,36±0,05*	62,1
3	0,71±0,02	0,59±0,03	83,1

Примечание: * $p \leq 0,05$ от исходных (Т-критерий Вилкоксона)

Таблица 41. Влияние PPADS в концентрации 10мкМ на сократительные ответы изолированного семявыносящего протока крысы, вызванные α,β -метиленаТФ, n=6

Концентрация агониста, мкМ	Исходные сокращения, M±m, грамм	На фоне PPADS	
		M±m, грамм	% от

		грамм	исходных
0,1	0	0	0
0,3	0,51±0,02	0,40±0,02	78,4
1	0,71±0,05	0,51±0,03*	71,8
3	0,81±0,03	0,60±0,04*	74,1

Примечание: * $p \leq 0,05$ от исходных (Т-критерий Вилкоксона)

Таблица 42. Влияние соединения А3 в концентрации 10 мкМ на расслабления тонизированного карбахолоном препарата двенадцатиперстной кишки крысы, вызванные стимуляцией электрическим полем или АТФ, $n=6$

Частота стимуляции, Гц	Концентрация АТФ, мкМ	Исходные ответы, $M \pm m, \%$	На фоне соединения А3	
			$M \pm m, \%$	% от исходных
0,5		66,5±3,3	59,4±7,9	89,3
1		75,0±5,0	70,3±6,7	93,7
2		75,6±2,9	70,9±4,8	93,8
4		82,5±3,1	73,1±3,0	88,6
8		86,5±1,8	79,7±3,1	92,1
	1	47,1±3,4	45,5±4,6	96,6
	3	59,2±3,6	48,4±7	81,8
	10	69,4±3,4	65,2±6,4	93,9
	30	77,6±3,7	69,2±6,5	89,2

Таблица 43. Влияние соединения А9 в концентрации 10 мкМ на расслабления тонизированного карбахолоном препарата двенадцатиперстной кишки крысы, вызванные стимуляцией электрическим полем или АТФ, $n=6$

Частота стимуляции, Гц	Концентрация АТФ, мкМ	Исходные ответы, $M \pm m, \%$	На фоне соединения А3	
			$M \pm m, \%$	% от исходных

0,5		53,1±4,7	47,5±7,9	89,5
1		63,1±3,5	61,6±5,1	97,6
2		72,5±3,5	68,1±5,5	93,9
4		82,5±3,0	78,8±3,6	95,5
8		89,1±2,8	84,7±2,2	95,1
	1	43,9±4,8	40,3±3,3	91,8
	3	56,6±3,7	51,8±7,1	91,5
	10	67,9±1,9	59,7±4,8	87,9
	30	75±2,8	70,2±4,5	93,6

Таблица 44. Влияние PPADS в концентрации 10 мкМ на расслабления тонизированного карбахолом препарата двенадцатиперстной кишки крысы, вызванные стимуляцией электрическим полем или АТФ, n=6

Частота стимуляции, Гц	Концентрация АТФ, мкМ	Исходные ответы, М±m, %	На фоне PPADS	
			М±m, %	% от исходных
0,5		49,3±6,9	43,8±11,4*	88,8
1		58,8±5,3	52,2±9,0*	88,8
2		68,8±5,4	58,8±9,6*	85,5
4		82,8±4,9	59,3±12,1*	71,6
8		90,0±2,1	67,8±10,1*	75,3
	1	44,7±6,5	36±11,7*	80,5
	3	57,1±3,2	46,8±6,2*	82
	10	69,2±3,4	61,3±6,9*	88,6
	30	81,1±5,8	68,9±5,7*	85

Примечание: * $p \leq 0,05$ от исходных (Т-критерий Вилкоксона)