

УДК 615:547.857:616–005.6

# АНТИТРОМБОТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВОГО АНТАГОНИСТА ПУРИНОВЫХ P2Y<sub>1</sub>-РЕЦЕПТОРОВ

А.А. Спасов, А.Ю. Стуковина, М.В. Черников, О.Ю. Гречко, В.А. Анисимова

*Лаборатория экспериментальной фармакологии ВНЦ РАМН и АВО,  
кафедра фармакологии ВолГМУ*

Исследования P2-рецепторов в настоящее время приобрели выраженную клиническую прикладную направленность [1], позволяющую ожидать в ближайшее время создание новых лекарственных средств, избирательно модулирующих различные функции организма. Одним из весьма перспективных направлений изучения P2-рецепторов является поиск веществ, избирательно ингибирующих пуриновые P2Y-рецепторы, в качестве потенциальных корректоров функциональной активности тромбоцитов при нарушениях гемостаза.

На поверхности тромбоцитов имеется 3 подтипа P2-рецепторов: P2X<sub>1</sub>-, P2Y<sub>1</sub>- и P2Y<sub>12</sub>-рецепторы [8]. P2X<sub>1</sub>-рецепторы сопряжены с неспецифическими катионными каналами, и активация этих рецепторов АДФ вызывает быстрый поток ионов кальция из среды в тромбоциты [7]. P2Y<sub>1</sub>-рецепторы являются метаботропными, сопряжены с Gq-белками, при их лигандировании происходит активация фосфолипазы C и последующая мобилизация ионов кальция из внутриклеточных депо [5]. Начальное повышение внутриклеточной концентрации ионов кальция вызывает активацию тромбоцитов ("shape-change"), для прохождения агрегации необходима активация P2Y<sub>12</sub>-рецепторов с угнетением аденилатциклазы через Gi-белки [6]. Последовательность действия АДФ на P2-рецепторы тромбоцитов располагается в следующем порядке:  $EC_{50}P2X_1 < EC_{50}P2Y_1 < EC_{50}P2Y_{12}$  [2].

В ранее проведенных исследованиях [3] конденсированное производное N<sub>9</sub>-имидазобензимидазола – соединение РУ-286, продемонстрировало выраженные P2Y<sub>1</sub>-блокирующие свойства, подавляя активацию тромбоцитов в безкальциевой среде.

## ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить влияние тромбоцитов P2X<sub>1</sub>- и P2Y<sub>12</sub>-подтипов на пуриновые рецепторы в условиях *in vitro* и антитромботических свойств соединения РУ-286 на модели генерализованного тромбоза.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение влияния веществ на пуриновые рецепторы выполнено на образцах плазмы 8 кроликов породы шиншилла массой 4–4,5 кг.

Функциональную активность тромбоцитов исследовали методом малоуглового светорассеяния [2] на приборе "Лайт-Скан" (НПФ "Люмекс", Россия). Особенностью метода является изучение функциональной активности тромбоцитов в солевой среде, с разбавлением плазмы, обогащенной тромбоцитами. Изменяя условия среды, можно отдифференцировать действие соединения на тот или иной тип пуринорецепторов. Активация тромбоцитов в присутствии 1 мМ CaCl<sub>2</sub> отражает эффективность действия исследуемых соединений на P2X<sub>1</sub>- и P2Y<sub>1</sub>-рецепторы, а в безкальциевой среде (5 мМ ЭДТА) – только на P2Y<sub>1</sub>-рецепторы. Эффективность действия на пуриновые P2Y<sub>12</sub>-рецепторы тромбоцитов оценивается по ингибированию агрегации. В качестве индуктора активации и агрегации тромбоцитов использовалась динатриевая соль аденозин-5-дифосфорной кислоты (АДФ) ("Реанал", Венгрия). В качестве препаратов сравнения использовались Reactive blue 2 ("Sigma", США), PPADS ("Sigma", США). Для оценки влияния исследуемых веществ на процессы активации и агрегации тромбоцитов использовались следующие параметры: величина прироста сигнала  $\Delta A$ , начальная скорость агрегации  $V_0$ , характеризующие процессы активации и агрегации соответственно. Статистическая обработка результатов экспериментов проводилась с использованием парного критерия Стьюдента, при этом выборка проверялась на нормальность распределения.

Для моделирования генерализованного тромбоза использовались 45 белых неимбредных мышей-самцов массой 20–26 г. В течение 18 часов до проведения экспериментов животные находились в условиях полной пищевой депривации со свободным доступом к воде. В качестве индуктора агрегации вводили смесь растворов коллагена и адреналина (0,5 и 0,06 мг/кг соответственно) в хвостовую вену животного [4]. В качестве препаратов сравнения использовались тиклопидин и клопидогрель. Соединение РУ-286 (10,24 мг/кг), тиклопидин (6 мг/кг) и клопидогрель (7,32 мг/кг) вводились перорально за 2 часа до моделирования тромбоза. Животным контрольной группы вводилась вода дистиллированная в эквивалентном объеме. В качестве критерия эффективности исследуемых соеди-

нений фиксировалось количество выживших животных по сравнению с контрольной группой и наличие тромбов в сосудах легких. За выжившими животными в течение 4 часов осуществлялось наблюдение, затем проводился забой под эфирным наркозом с последующей морфологической оценкой состояния легких. Обсчет результатов испытаний проводился с помощью точного критерия Фишера.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки влияния на ионотропные P2X<sub>1</sub>-рецепторы проводилось изучение подавления активации тромбоцитов в кальциевой среде. Эффект соединения РУ-286 превышал таковой у Basilen blue, но был значительно меньше, чем у неселективного P2X-антагониста PPADS (табл. 1).

Сравнивая полученные результаты влияния соединений для кальциевой и безкальциевой сред, можно отметить, что долевое участие взаимодействия соединения РУ-286 с P2X<sub>1</sub>-рецепторами тромбоцитов для активации в кальциевой среде незначительно, подавление активации реализуется преимущественно за счет влияния на пуриновые P2Y<sub>1</sub>-рецепторы.

Соединение РУ-286 в концентрации 10<sup>-6</sup>–10<sup>-4</sup> М достоверно ингибировало агрегацию тромбоцитов, индуцированную 200 нМ АДФ. Для данного вещества было определено EC<sub>20</sub>, которое составило 1,5·10<sup>-6</sup> М.

Таблица 1

**Влияние производного бензимидазола (10<sup>-6</sup>М) и антагонистов P2-рецепторов *Reactive blue 2* и PPADS на АДФ-индуцированное изменение функциональной активности тромбоцитов в средах с различным содержанием кальция (Δ %, M±m)**

Соединение	Подавление активации		Δ %****
	в кальциевой среде**	в безкальциевой среде***	
РУ-286	-32,41±2,80*	-29,43±2,62*	-2,98
<i>Reactive blue 2</i>	-25,02±2,38*	-21,50±2,08*	-3,52
PPADS	-71,83±5,99*	-30,00±2,74*	-41,83

\* – данные достоверны по отношению к контролю, *t*-критерий Стьюдента ( $p \leq 0,05$ );

\*\* – АДФ-индуцированная активация тромбоцитов в кальциевой среде отражает антагонистическую активность соединений по отношению к пуриновым P2X<sub>1</sub>- и P2Y<sub>1</sub>-рецепторам тромбоцитов;

\*\*\* – АДФ-индуцированная активация тромбоцитов в безкальциевой среде отражает антагонистическую активность соединений по отношению к пуриновым P2Y<sub>1</sub>-рецепторам тромбоцитов;

\*\*\*\* – является разницей между эффектами соединений по влиянию на активацию тромбоцитов в кальциевой и безкальциевой средах, отражает антагонистическую активность соединений по отношению к пуриновым P2X<sub>1</sub>-рецепторам.

Таким образом, можно утверждать, что в условиях *in vitro* соединение РУ-286 эффективно подавляет функциональную активность тромбоцитов путем блокирования P2Y<sub>1</sub>- и P2Y<sub>12</sub>-подтипов рецепторов.

Для изучения антитромботической активности в условиях целостного организма использовался метод, основанный на способности коллагена и адреналина при совместном внутривенном введении лабораторным животным вызывать глобальную внутрисосудистую агрегацию тромбоцитов, приводящую к множественному тромбозу паренхиматозных органов [4].

При введении раствора, содержащего 0,5 мг коллагена и 0,06 мг адреналина из расчета на килограмм массы тела, в хвостовую вену животным контрольной группы были отмечены характерные признаки нарушения дыхательной функции легких: увеличение частоты и поверхностный характер дыхания, выраженный экзофтальм и изменение цвета радужной оболочки. Также для этой экспериментальной группы отмечался парез задних конечностей: мыши не двигались даже в ответ на толчки, не были способны отдергивать задние лапки при сильном нажатии. Визуально наблюдались тетанические судороги, животные принимали характерную позу, при которой задние лапы были выпрямлены и отведены назад. В течение 1–3 минут после введения индукторов тромбоза животные погибали. Выживаемость в контрольной группе составила 6,3 % (табл. 2). Извлеченные после гибели мышей легкие были темно-красного цвета, на всей их площади наблюдались множественные тромбы.

В экспериментальной группе, получивших тиклопидин, выживаемость достоверно не отличалась от контрольной группы и составила 30 %. При морфологической оценке отмечалось уменьшение площади легких, подвергшихся тромбозу.

Таблица 2

**Влияние производного бензимидазола, тиклопидина и клопидогреля в эквивалентных дозах (*per os*) на выживаемость белых мышей на модели коллаген-адреналинового генерализованного тромбоза**

Соединение	Количество животных в группе	Выживаемость, %
Контроль	16	6,3
РУ-286	10	70**
Тиклопидин	10	30 <sup>†</sup>
Клопидогрель	10	90** <sup>#</sup>

\* – данные достоверны по отношению к контролю, точный критерий Фишера ( $p \leq 0,05$ );

\*\* – данные достоверны по отношению к контролю, точный критерий Фишера ( $p \leq 0,01$ );

<sup>#</sup> – данные достоверны по отношению к группе крыс, получавших тиклопидин, точный критерий Фишера ( $p \leq 0,05$ ).

Выживаемость в группе, получавшей клопидогрель, составила 90 %, данные достоверны как по отношению к контролю ( $p \leq 0,01$ ), так и по отношению к группе мышей, получавшей тиклопидин ( $p \leq 0,05$ ). Легкие животных, которым вводили клопидогрель, имели нормальную окраску с минимальными точечными потемнениями.

При пероральном введении соединения РУ-286 гибель животных уменьшалась в 11,2 раза по сравнению с контролем ( $p \leq 0,01$ ) и в 2,3 раза по сравнению с группой, получавших тиклопидин. По сравнению с клопидогрелем смертность в группе крыс, получивших соединение РУ-286, была выше на 20 %, однако различия не были статистически достоверны. Животные были более активны, наблюдалось уменьшение выраженности двигательных нарушений. Можно также отметить, что внешние проявления генерализованного тромбоза развивались постепенно в отличие от контрольной группы. Макроскопическая оценка при морфологическом исследовании легких показала сокращение площади массивного тромбоза, легкие в целом имели нормальную светло-розовую окраску.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о наличии антитромботических свойств у антагонистов пуриновых Р2Y1-

рецепторов, что позволяет рассматривать их как потенциальный класс новых антитромботических средств.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Зиганшин А. У., Зиганшина Л. Е., Бернсток Дж. // Бюлл. эксперимент. биол. и медицины. – 2002. – Т. 134, № 10. – С. 364–370.
2. Сакаев М. Р., Миндукшеев И. В., Лесиовская Е. Е. и др. // Эксперим. и клинич. фармакол. – 2000. – № 3. – С. 65–69.
3. Стуковина А. Ю., Черников М. В., Гречко О. Ю. // Тез. докл. VIII Регион. конф. молодых исследователей Волгоградской области. – Волгоград, 2003. – С. 40–41.
4. Di Minno G., et al. // J. Clin. Invest. – 1985. – Vol. 75. – P. 328–338.
5. Hallam T. J., Rink T. J. // J. Physiol. (Lond). – 1985. – Vol. 368. – P. 131–146.
6. Hourani S. M. O., Hall D. A. // Trends Pharmacol. Sci. – 1994. – Vol. 15. – P. 103–108.
7. MacKenzie A. B., Mahaut-Smith M. P. // Biochim. Biophys. Acta. – 1996. – Vol. 1278, № 1. – P. 131–136.
8. Ralevic V., Burnstock J. // Pharmacol. Rev. – 1998. – Vol. 50, №3. – P. 415–492.

*Выражаем благодарность фирме "Sanofi-syntelabo", Франция, за любезно предоставленную субстанцию вещества клопидогрель.*

© Коллектив авторов, 2006

УДК 615:547.854.4:616.98–097–022

## СИНТЕЗ И АНТИ-ВИЧ-1 АКТИВНОСТЬ 1-[2-(2-БЕНЗИЛ-4-МЕТИЛФЕНОКСИ)ЭТИЛ]ПРОИЗВОДНЫХ УРАЦИЛА

М. С. Новиков, Ю. А. Орлова, А. А. Озеров, Т. Хартман, Р. У. Букхайт

*Лаборатория фармацевтической химии ВНЦ РАМН и ABO,  
ImQuest BioScience Inc. (США)*

Ингибиторы обратной транскриптазы (ОТ) явились первым классом анти-ВИЧ препаратов, применяемым в клинике для лечения СПИДа. Они блокируют ранние стадии жизненного цикла вируса. В настоящее время известны две группы ингибиторов ОТ: нуклеозидные аналоги (зидовудин, ламивудин) и ненуклеозидные ингибиторы ОТ ВИЧ (невирапин, далавердин, эфавиренц). С теоретической точки зрения ингибиторы ОТ ВИЧ необходимо применять как для терапии, так и с профилактическими целями, поскольку они могут предотвращать интеграцию провирусной ДНК в клеточную ДНК.

С середины 1990-х годов в комбинированной терапии ВИЧ-инфекции и СПИДа стали применяться ингибиторы протеазы. Это дало заметное понижение заболеваемости и смертности от

оппортунистических инфекций. Использование в терапии СПИДа комбинации ингибиторов ОТ и ингибиторов протеазы способно обеспечить длительную супрессию репликации вируса и предупредить лекарственную резистентность вируса, что приводит к долговременной клинической пользе [6, 7].

Однако применение в клинике ингибиторов ОТ и протеазы ограничено их специфическими недостатками: нуклеозидные ингибиторы ОТ имеют относительно невысокий терапевтический индекс и обычно вызывают у людей серьезные побочные эффекты; ненуклеозидные ингибиторы ОТ обладают меньшей токсичностью и более высокой специфичностью, однако к ним быстро развивается устойчивость вируса [10]; использование ингибиторов протеазы сопро-