

РАЗНЫЕ АСПЕКТЫ

ЭФФЕКТИВНОСТЬ РЯДА ПРОИЗВОДНЫХ ХИНОКСАЛИНА И АЗОЛО[а и b]ХИНОКСАЛИНА КАК АНТАГОНИСТОВ P2X-РЕЦЕПТОРОВ

А. У. Зиганшин¹, Ж. Ю. Фалу¹, А. А. Калинин², В. А. Мамедов²

В экспериментах *in vitro* изучено влияние 14 производных хиноксалина и азолохиноксалина на ответы изолированных тканей крыс и морских свинок, опосредуемые P2X- и P2Y-рецепторами. Установлено, что большинство испытанных соединений не влияет на исследованные ответы, однако, одно вещество (паратоллилгидразон-3-бензил-1,2-дигидро-2-оксохиноксалин) проявляет антагонизм по отношению к P2X-рецептор-опосредованным сокращениям, не влияя на P2Y-рецептор-опосредованные расслабления. Это соединение может быть использовано в качестве прототипа для синтеза новых эффективных антагонистов P2-рецепторов.

Ключевые слова: хиноксалины, азолохиноксалины, P2X-рецепторы, антагонисты

ВВЕДЕНИЕ

P2-рецепторы, основным эндогенным лигандом которых является аденозинтрифосфорная кислота (АТФ), найдены во многих органах и тканях млекопитающих, в том числе человека. P2-рецепторы участвуют в регуляции сосудистого тонуса, гемостаза, функций многих внутренних органов [1]. По механизму реализации эффекта P2-рецепторы делят на два семейства — P2X и P2Y, первое из которых объединяет подтипы рецепторов, являющихся лиганд-оперирующими ионными каналами, в то время как во второе семейство включаются G-протеин-опосредующие рецепторы [13].

Отсутствие эффективных селективных антагонистов P2-рецепторов остается одним из основных барьеров для прогресса в этой области исследований. Сурамин, который до недавнего времени широко использовался в качестве антагониста P2-рецепторов, имеет очень низкую селективность [15]. Реактив синий-2 имеет слабую активность и узкий диапазон эффективных концентраций [12]. Пиридоксальфосфат-6-азофенил-2',4'-дисульфоновая кислота (PPADS) является в настоящее время наиболее избирательным антагонистом P2X-рецепторов [1, 18], но и у этого вещества выявлена определенная тропность к P2Y-рецепторам [11].

Анализ химической структуры антагонистов P2-рецепторов, описанных к настоящему времени, свидетельствует о том, что многие из них являются гетероциклическими азотсодержащими соединениями [16]. В связи с этим цель настоящего исследования оценка эф-

фективности антагонистического действия по отношению к P2X-рецепторам новых производных хиноксалина и азолохиноксалина, являющихся азотсодержащими гетероциклами, которые проявляют различную биологическую активность, в частности, антагонизм по отношению к аденозиновым A_{2B} рецепторам [17].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на изолированных тканях самцов крыс и морских свинок. Животных забивали обескровливанием после предварительного оглушения. У крыс выделяли и изолировали семявыносящие протоки, у морских свинок — семявыносящие протоки, мочевой пузырь и вентральный продольный тяж слепой кишки. Далее исследования вели по методике, подробно описанной ранее [2].

Атропина сульфат (0,3 мкМ) и фентоламин (1 мкМ) постоянно присутствовали в растворе Кребса при проведении экспериментов на мочевом пузыре и семявыносящем протоке. Стимуляцию электрическим полем (СЭП) проводили частотой 1 – 64 Гц до того, как сокращение достигало максимума и снижалось примерно на треть. Интервал в 60 с выдерживали между последующими стимуляциями.

α , β -Метилен-АТФ (0,1; 1 и 10 мкМ) вносили непосредственно в стаканчик и отмывали препарат несколько раз свежим раствором Кребса сразу после прохождения пика сократительного ответа. Для предупреждения десенситизации, которую может вызвать α , β - метилен-АТФ, выдерживали интервал как минимум в 30 мин между последующими концентрациями агониста со сменой раствора Кребса в стаканчике на свежий каждые 10 мин. Все сократительные ответы рассчитывали как процент от сокращения мышечной

¹ Кафедра фармакологии (зав. — проф. Р. С. Гараев) Казанского государственного медицинского университета, Казань, 420012, ул. Бутлерова, 49.

² Институт органической и физической химии им. А. Е. Арбузова РАН, Казань.

полоски на KCl в концентрации 240 мМ, который добавляли в конце эксперимента.

В экспериментах с использованием изолированного продольного тяза слепой кишки расслабляющие эффекты СЭП (1–8 Гц) и экзогенной АТФ (1, 10 и 100 мкМ) оценивали на тканях, предварительно сокращенных карбахолом в концентрации 0,05 мкМ. Ответы рассчитывали как процент от максимально возможного расслабления.

Ответы мышечных полосок на СЭП, α , β -метил-АТФ и АТФ регистрировали до и после инкубации тканей с исследуемыми соединениями в концентрации 10 мкМ в течение минимум 30 мин. Контрольные эксперименты проводили на мышечных полосках, обработанных аналогично опытным, однако, без инкубации с исследуемыми соединениями. Установлено, что в контрольных условиях не происходит достоверного

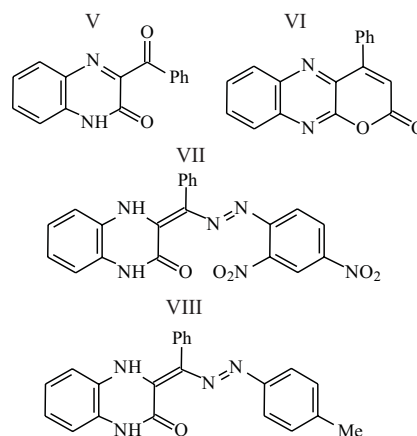


Рис. 1. Химические структуры некоторых исследованных производных хиноксалина.

Таблица 1. Влияние исследованных соединений в концентрации 10 мкМ на сокращения изолированных полосок семявыносящего протока крысы, вызванные СЭП частотой 4 и 8 Гц

Соединение	Частота, Гц	Исходные, $M \pm m$	После инкубации с соединениями	
			$M \pm m$	% от исходного
I	4	23,2 ± 10,2	18,5 ± 6,4	79,7
	8	35,1 ± 15,0	32,4 ± 12,7	92,3
II	4	16,0 ± 5,6	14,2 ± 5,7	88,8
	8	27,7 ± 5,2	26,1 ± 6,0	94,2
III	4	39,6 ± 12,5	33,4 ± 10,1	84,3
	8	46,1 ± 6,3	36,2 ± 11,4	78,5
IV	4	23,3 ± 8,6	26,4 ± 15,1	113,3
	8	35,1 ± 5,7	43,2 ± 15,2	123,0
V	4	25,7 ± 5,3	19,8 ± 3,2	77,0
	8	36,2 ± 7,0	31,4 ± 4,6	86,7
VI	4	29,2 ± 11,4	20,1 ± 9,7	68,8
	8	49,0 ± 15,5	40,2 ± 16,2	82,0
VII	4	23,3 ± 9,2	22,4 ± 6,1	96,1
	8	27,4 ± 8,9	33,3 ± 5,8	121,5
VIII	4	35,4 ± 8,2	19,3 ± 5,5*	54,5
	8	55,6 ± 7,2	30,5 ± 9,2*	54,9
IX	4	19,3 ± 7,4	20,5 ± 11,7	106,2
	8	37,8 ± 11,0	39,6 ± 13,1	104,8
X	4	19,3 ± 2,7	13,3 ± 2,8	68,9
	8	31,5 ± 3,9	23,4 ± 5,7	74,3
XI	4	18,5 ± 4,1	18,8 ± 8,2	101,6
	8	45,3 ± 8,4	29,2 ± 12,1	64,5
XII	4	28,3 ± 7,6	22,2 ± 10,1	78,4
	8	42,6 ± 5,4	38,4 ± 11,2	90,1
XIII	4	27,3 ± 4,1	21,5 ± 3,0	78,8
	8	37,8 ± 6,2	39,7 ± 4,4	105,0
XIV	4	28,4 ± 6,4	21,4 ± 6,7	75,4
	8	38,8 ± 8,1	36,5 ± 8,1	94,1

Примечание. Здесь и в табл. 2 результаты представлены как процент от ответа ткани на KCl в концентрации 240 мМ, $n = 3 - 5$. * — $p < 0,05$ от исходного ответа.

изменения механической активности мышечной полоски в течение всего эксперимента. Статистическую обработку результатов проводили, используя t критерий Стьюдента для связанных величин. Разницу считали достоверной при $p < 0,05$.

Методы синтеза соединений и их физико-химические свойства описаны ранее [3–9]. Структура соединений представлена в табл. 4 и на рис. 1 и 2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эксперименты проведены в двух последовательных сериях. В первой серии экспериментов все новые соединения оценивали на семявыносящих протоках крысы для выявления наиболее перспективных веществ. Во второй серии экспериментов отобранные по результатам первой серии соединения исследовали более широко, используя ткани морской свинки.

Как известно, сократительные ответы изолированных полосок мочевого пузыря млекопитающих на электрическую стимуляцию опосредуются преимущественно двумя типами рецепторов — м-холинорецепторами и P2X-рецепторами, в то время как в семявыносящих протоках такими рецепторами являются α -адренорецепторы и P2X-рецепторы [14]. Поэтому для исключения влияния холино- и адренорецепторов наши эксперименты на этих тканях с использованием СЭП проведены в присутствии м-холиноблокатора атропина и α -адреноблокатора фентоламина.

СЭП мышечных полосок семявыносящих протоков крысы приводит к зависимым от частоты сократительным ответам, которые максимальны при частоте 64 Гц. В табл. 1 приведены результаты экспериментов, полученных при стимуляции частотой 4 и 8 Гц. Как видно, большинство соединений не оказало существенного влияния на сократительные ответы семявыносящего протока, опосредуемые P2X-рецепторами. Достоверное угнетение этих ответов, доходившее до 55 % от исходного ответа ткани на эту частоту стимуляции, было получено лишь при использовании соеди-

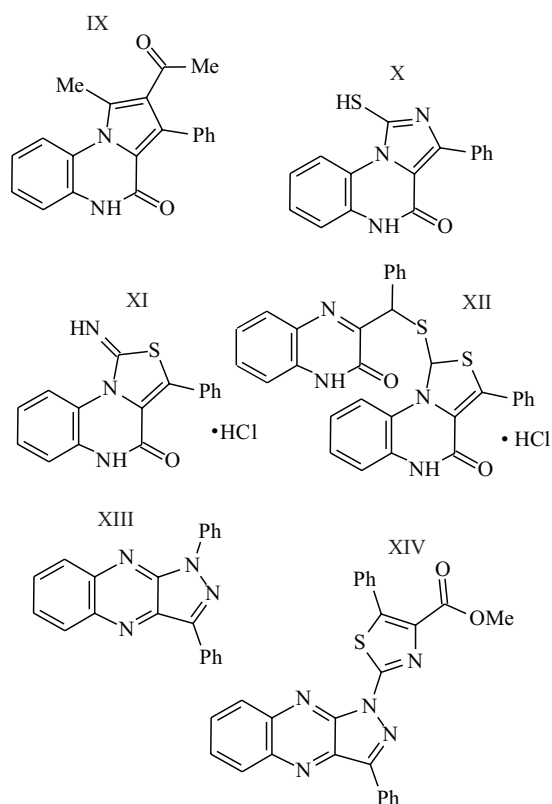


Рис. 2. Химические структуры исследованных производных азоло[а и b]хиноксалинов.

нения VIII при частотах СЭП 4 и 8 Гц. При использовании соединений III, VI, X и XI не выявлено достоверных различий от исходных сокращений, однако при некоторых частотах стимуляции была выявлена тенденция к снижению сократительного ответа изолиро-

ванных полосок семявыносящего протока крыс, вызванного СЭП. Поэтому эти соединения были изучены во второй серии экспериментов на тканях морской свинки — мочевом пузыре и семявыносящих протоках — с использованием агониста P2X-рецепторов α,β -метилтен-АТФ. Кроме того, для оценки селективности действия соединений мы исследовали их влияние на P2Y-рецептор-опосредованное расслабление продольного тяжа слепой кишки морской свинки. Результаты приведены в табл. 2 и 3.

Анализ результатов показал, что в целом здесь проявились те же закономерности, что и в первой серии экспериментов. Соединение VIII достоверно угнетало сократительные ответы обеих тканей, вызванные наибольшей из использованных концентраций α,β -метилтен-АТФ, и имело тенденцию к угнетению сокращений обеих тканей, вызванных α,β -метилтен-АТФ в концентрации 1 мкМ. Соединения III, VI, X и XI не вызывали достоверных изменений сократительных ответов мочевого пузыря и семявыносящего протока морской свинки, вызванные какой-либо из трех использованных концентраций α,β -метилтен-АТФ (табл. 2).

Оценка эффективности отобранных соединений на P2Y-рецептор-опосредуемые расслабления вентрального продольного тяжа слепой кишки морской свинки показала, что ни одно из соединений достоверно не изменило ответы этой ткани, вызываемые СЭП или агонистом P2 рецепторов АТФ (табл. 3).

Таким образом, исследование 14 новых производных хиноксалина и азолохиноксалина показало, что большинство из них существенно не влияет на сократительные ответы изолированные гладкомышечных тканей животных, опосредованных P2X-рецепторами.

Таблица 2. Влияние отобранных соединений в концентрации 10 мкМ на сокращения изолированных тканей морской свинки, вызванные α,β -метилтен-АТФ

Соединение	Концентрация α,β -меАТФ, мкМ	Семявыносящий проток			Мочевой пузырь		
		Исходные	После соединений		Исходные	После соединений	
		$M \pm m$	$M \pm m$	%	$M \pm m$	$M \pm m$	%
III	0,1	8,6 ± 1,1	6,6 ± 2,2	76,7	4,3 ± 2,1	2,1 ± 0,7	48,8
	1	17,5 ± 7,5	12,5 ± 4,7	71,4	12,5 ± 5,6	9,5 ± 1,9	76,0
	10	26,2 ± 1,3	29,0 ± 8,4	110,7	27,1 ± 5,2	25,7 ± 4,8	94,8
VI	0,1	9,6 ± 2,4	11,3 ± 1,5	117,7	3,5 ± 1,2	2,8 ± 1,9	80,0
	1	26,4 ± 3,8	34,5 ± 5,7	130,7	12,6 ± 1,8	9,9 ± 1,4	78,6
	10	41,1 ± 4,0	34,1 ± 3,5	83,0	16,4 ± 2,5	21,4 ± 5,3	130,5
VIII	0,1	8,7 ± 2,5	8,2 ± 2,4	94,3	8,2 ± 2,6	6,1 ± 3,2	74,4
	1	57,8 ± 8,1	42,1 ± 8,2*	72,8	23,6 ± 3,4	13,8 ± 4,4*	58,5
	10	70,9 ± 5,7	43,6 ± 7,5*	61,5	41,5 ± 7,1	11,7 ± 5,9*	28,2
X	0,1	5,5 ± 2,3	6,4 ± 2,6	116,4	8,2 ± 1,2	13,5 ± 7,2	164,6
	1	25,4 ± 3,1	13,5 ± 8,3	53,1	19,4 ± 11,5	20,4 ± 11,6	105,2
	10	32,8 ± 5,9	20,1 ± 3,8	61,3	32,6 ± 11,4	25,9 ± 11,5	79,4
XI	0,1	14,8 ± 9,4	5,5 ± 2,2	37,2	14,4 ± 9,2	5,4 ± 2,2	37,5
	1	20,4 ± 6,5	13,3 ± 6,4	65,2	22,8 ± 6,5	17,3 ± 5,3	75,9
	10	34,5 ± 8,6	33,7 ± 1,8	97,7	38,2 ± 5,4	31,8 ± 1,7	83,2

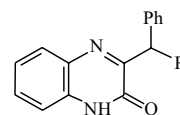
Таблица 3. Влияние отобранных соединений в концентрации 10 мкМ на расслабления изолированного продольного тяжа слепой кишки морской свинки, вызванные АТФ и стимуляцией электрическим полем (СЭП)

Соединение	Концентрация АТФ, мкМ	Частота СЭП, Гц	Исходные, $M \pm m$	После инкубации		
				$M \pm m$	%	
III	1	2	15,5 ± 8,5	23,3 ± 12,5	150,3	
			10	31,2 ± 11,8	34,8 ± 18,4	111,5
			100	63,0 ± 12,6	73,4 ± 14,8	116,5
	4	8	47,5 ± 3,8	55,2 ± 6,7	116,2	
			52,2 ± 2,4	69,9 ± 8,3	133,9	
			64,8 ± 4,9	70,7 ± 8,2	109,1	
VI	1	2	4,2 ± 1,4	7,2 ± 2,7	150,0	
			10	21,2 ± 15,0	28,4 ± 14,8	134,0
			100	40,0 ± 12,3	34,9 ± 13,2	87,3
	4	8	53,6 ± 16,1	66,2 ± 19,6	123,5	
			55,4 ± 12,0	74,6 ± 16,4	134,7	
			59,2 ± 12,6	73,7 ± 15,2	124,5	
VIII	1	2	9,3 ± 3,8	13,5 ± 4,3	145,2	
			10	29,7 ± 10,4	36,1 ± 10,5	121,5
			100	66,5 ± 12,6	50,4 ± 14,6	75,8
	4	8	63,3 ± 14,6	71,2 ± 4,8	112,5	
			64,2 ± 14,4	73,4 ± 3,7	114,3	
			73,7 ± 12,5	74,8 ± 2,9	101,5	
X	1	2	22,5 ± 5,2	29,5 ± 10,0	131,1	
			10	48,6 ± 14,5	46,2 ± 11,4	95,1
			100	80,4 ± 14,2	81,2 ± 8,8	101,0
	4	8	58,5 ± 12,3	63,8 ± 16,2	109,1	
			64,2 ± 14,5	68,4 ± 12,4	106,5	
			63,3 ± 14,4	70,6 ± 7,2	111,5	
XI	1	2	7,1 ± 0,7	3,8 ± 2,3	53,5	
			10	14,9 ± 3,5	14,3 ± 6,8	96,0
			100	30,8 ± 2,5	40,2 ± 13,0	130,5
	4	8	12,2 ± 5,1	11,2 ± 2,4	91,8	
			40,4 ± 6,2	43,1 ± 9,3	106,7	
			43,6 ± 3,5	50,8 ± 6,8	116,5	

Примечание. Результаты представлены как % от максимально-возможного расслабления, $n = 3 - 5$.

При этом соединение VIII (паратоллилгидразон-3-бензоил-1,2-дигидро-2-оксохиноксалин) на всех использованных тканях проявило антагонизм по отношению к сокращениям, опосредуемым P2X-рецепторами. Это вещество значительно угнетало сокращения изолированных семявыносящих протоков крыс, вызванные возбуждением P2X-рецепторов, а также сокращения изолированных семявыносящих протоков и мочевого пузыря морских свинок, вызванные селективным агонистом P2X-рецепторов — α, β -метилена-АТФ. Важно отметить, что это соединение никак не влияло на эффекты, опосредуемые P2Y-рецепторами, т.е. соединение VIII проявило не только эффективность, но и определенную селективность антагонизма. По нашему

Таблица 4. Химическая структура некоторых исследованных производных хиноксалина



Соединение	R
I	$-\text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$
II	$-\text{SCN}$
III	$-\text{Cl}$
IV	$-\text{SC}(=\text{NH})\text{NH}_2$

мнению, это соединение заслуживает более пристального внимания с целью детального изучения установленного антагонизма.

Ранее для других производных хиноксалина был выявлен антагонизм с аденозиновыми A_{2B} рецепторами, причем одно из соединений проявляло антагонизм в субмикромольных концентрациях [17]. Наши исследования позволили установить, что хиноксалиновые производные могут обладать антагонизмом и к P2-рецепторам. Соединение VIII может служить исходным веществом для направленного синтеза новых более эффективных антагонистов P2-рецепторов в ряду производных хиноксалина. Интересно отметить, что в структуре соединения VIII имеется арилаза-фрагмент, который имеется и в структуре описанных ранее P2-антагонистов (PPADS, PPNDS, сурамин). Это свидетельствует о том, что эта группировка атомов, вероятно, является важной для распознавания лиганда P2X-рецептором.

ВЫВОД

Паратоллилгидразон-3-бензоил-1,2-дигидро-2-оксохиноксалин (соединение VIII) проявляет антагонизм по отношению к P2X-рецептор-опосредуемым ответам, не влияя на P2Y-рецептор-опосредуемые ответы. Это соединение может быть прототипом для синтеза новых более эффективных антагонистов P2X-рецепторов.

Авторы выражают признательность Российскому фонду фундаментальных исследований и компании The Wellcome Trust (Великобритания) за частичную финансовую поддержку проведенного исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. У. Зиганшин, Л. Е. Зиганшина, *Фармакология рецепторов АТФ*, Гэотар-Медицина, Москва (1999).
2. А. У. Зиганшин, Л. Е. Зиганшина, А. В. Рычков и др., *Экспер. клин. фармакол.*, № 4, 27 – 30 (2001).
3. В. А. Мамедов, И. А. Нуретдинов, Ф. Г. Сибгатуллина, *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, № 6, 1412 – 1414 (1989).
4. В. А. Мамедов, А. А. Калинин, А. Т. Губайдуллин и др., *Хим. гетероциклич. соед.*, № 12, 1664 – 1680 (1999).
5. В. А. Мамедов, А. А. Калинин, А. Т. Губайдуллин и др., *Хим. гетероциклич. соед.*, № 12, 1704 – 1710 (2002).

6. В. А. Мамедов, А. А. Калинин, И. Х. Ризванов и др., *Хим. гетероциклич. соед.*, № 9, 1279 – 1288 (2002).
7. В. А. Мамедов, А. А. Калинин, Н. М. Азанчеев и др., *Ж. орг. химии*, **39**(1), 135 – 140 (2003).
8. В. А. Мамедов, А. А. Калинин, А. Т. Губайдуллин и др., *Хим. гетероциклич. соед.*, № 1, 101 – 107 (2003).
9. В. А. Мамедов, А. А. Калинин, А. Т. Губайдуллин и др., *Ж. орг. химии*, **39**(1), 141 – 150 (2003).
10. М. P. Abbracchio and M. Williams, *Handbook of Experimental Pharmacology*, V. 151 (I), M. P. Abbracchio and M. Williams, (Eds.), Berlin (2001), pp. 1 – 16.
11. J. L. Boyer, I. E. Zohn, K. A. Jacobson, et al., *Br. J. Pharmacol.*, **113**, 614 – 620 (1994).
12. G. Burnstock and J. J. Warland, *Br. J. Pharmacol.*, **90**, 383 – 391 (1987).
13. G. Burnstock, *Trends Pharmacol. Sci.*, **22**, 182 – 188 (2001).
14. C. H. V. Hoyle, *Autonomic Neuroeffector Mechanisms*, Chur (1992), pp. 367 – 407.
15. C. H. V. Hoyle, G. E. Knight, and G. Burnstock, *Br. J. Pharmacol.*, **99**, 617 – 621 (1990).
16. K. A. Jacobson and L. J. S. Knutsen, *Handbook of Experimental Pharmacology*, V. 151 (I), M. P. Abbracchio and M. Williams, (Eds.) Berlin (2001), pp. 73 – 99.
17. T. R. Webb, D. Lvovskiy, S.-A. Kim, et al., *Bioorg. Med. Chem.*, **11**, 77 – 85 (2003).
18. A. U. Ziganshin, C. H. V. Hoyle, G. Lambrecht, et al., *Br. J. Pharmacol.*, **111**, 923 – 929 (1994).

Поступила 01.12.03

STUDYING THE EFFICACY OF A SERIES OF QUINOXALINE AND AZOLO[A(B)]QUINOXALINE DERIVATIVES AS P2X RECEPTOR ANTAGONISTS

A. U. Ziganshin¹, J. Yu. Falu¹, A. A. Kalinin², and V. A. Mamedov²

¹ Department of Pharmacology, Kazan State Medical University, ul. Butlerova 49, Kazan, Tatarstan, 420012 Russia;

² Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, Kazan Research Center, Russian Academy of Sciences, ul. akademika Arbuzova 8, Kazan, Tatarstan, 420083 Russia

The influence of a series of 14 quinoxaline and azoloquinoxaline derivatives on the P2X and P2Y receptor mediated response was studied *in vitro* on isolated rat and guinea pig tissues. Most of the compounds studied did not affect the response, while paratolyldrazone-3-benzoyl-1,2-dihydro-2-oxoquinoxaline exhibited antagonism with respect to the P2X receptor mediated response, while not influencing the P2Y mediated relaxation. It is suggested that this compound can be used for the synthesis of new effective P2 receptor antagonists.