

ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ СКРИНИНГА НА ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ 5(S)-МЕНТИЛОКСИПРОИЗВОДНЫХ 2(5H)-ФУРАНОНА

Хонг Хань Конг^{1*}, Регина Рифатовна Сибгатуллина², Алсу Мунавировна Хабибрахманова²,
Альмира Рафаэловна Курбангадиева², Лилия Евгеньевна Зиганшина¹

¹Научно-образовательный центр доказательной медицины «Кокрейн Россия» и кафедра фундаментальной и клинической фармакологии Института фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия;

²Химический институт им. А.М. Бутлерова, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия

Поступила 05.12.2016; принята в печать 31.01.2017.

Реферат

DOI: 10.17750/KMJ2017-211

Цель. Изучение возможности использования клеточных модельных экспериментов (гемолиз эритроцитов и агрегация тромбоцитов) для скрининга на противовоспалительную активность новых синтезированных 5(S)-ментилоксипроизводных 2(5H)-фуранона (соединения R₁–R₆).

Методы. Изучение мембраностабилизирующей активности исследуемых соединений проводили с помощью моделей гемолиза эритроцитов, вызванного гипотоничностью среды (осмотический гемолиз) и свободными радикалами. Антиагрегантное действие веществ изучали путём индукции агрегации тромбоцитов 1 мМ арахидоновой кислотой. Изучение противовоспалительной активности новых потенциальных противовоспалительных молекул проводили на модели каррагенинового отёка лап мышей.

Результаты. Соединения R₁, R₂, R₃ и R₄ усиливают степень осмотического гемолиза. Соединения R₅, R₆ снижают интенсивность гемолиза в различных концентрациях. Соединения R₁, R₂, R₄ и R₆ способствуют свободнорадикальному повреждению мембран эритроцитов во всех исследуемых концентрациях. Соединение R₃ защищает эритроциты в низких концентрациях, с увеличением концентрации — способствует повреждению эритроцитов. Соединение R₅ защищает эритроциты в концентрациях 3×10⁻⁹ и 3×10⁻⁵ М. Соединения R₁, R₂, R₄ усиливают агрегацию тромбоцитов в различных концентрациях. Соединение R₃ снижает степень агрегации тромбоцитов в концентрации 10⁻⁶ М, в концентрациях 10⁻⁸ и 10⁻⁵ М оно усиливает агрегацию тромбоцитов. Соединение R₅ не влияет на агрегацию тромбоцитов. Соединение R₆ ингибирует агрегацию тромбоцитов во всех исследуемых концентрациях. По полученным результатам *in vitro* тест-систем было выбрано соединение R₆ для дальнейшего изучения противовоспалительной активности, поскольку по двум из трёх критериев оценки оно проявило максимальный эффект. Соединение R₆ обладает противовоспалительной активностью на модели воспаления.

Вывод. Новое производное 2(5H)-фуранона, содержащее фрагмент *l*-ментола (соединение R₆), защищает мембраны эритроцитов от повреждающего действия гипотоничности среды, ингибирует агрегацию тромбоцитов и обладает противовоспалительной активностью; клеточные модельные эксперименты могут быть использованы для первого этапа скрининга новых химических соединений на предмет противовоспалительной активности.

Ключевые слова: гемолиз эритроцитов, агрегация тромбоцитов, каррагениновый отёк лап, противовоспалительные средства, 2(5H)-фураноны, (*l*)-ментол.

THE POSSIBILITY OF USING CELL TEST-SYSTEMS FOR SCREENING FOR ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF NOVEL 5(S)-MENTHYLOXY DERIVATIVES OF 2(5H)-FURANONE

H.H. Cong¹, R.R. Sibgatullina², A.M. Khabibrakhmanova², A.R. Kurbangaliev², L.E. Ziganshina¹

¹Scientific educational center of evidence-based medicine «Cochrane Russia» and the department of fundamental and clinical pharmacology of the Institute of fundamental medicine and biology, Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia;

²Institute of Chemistry named after A.M. Butlerov, Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia

Aim. Study of the possibility of using cell experimental models (erythrocytes hemolysis and platelet aggregation) for screening for anti-inflammatory activity of novel synthesized 5(S)-menthyloxy derivatives of 2(5H)-furanone (compounds R₁–R₆).

Methods. Evaluation of membrane-stabilizing activity of the test compounds was performed by means of models of erythrocyte hemolysis induced by hypotonic environment (osmotic hemolysis) and free radicals. Antiplatelet effect of the compounds was studied by inducing platelet aggregation by 1 mM arachidonic acid. Study of anti-inflammatory activity of novel potential anti-inflammatory molecules was performed with the use of the model of carrageenan-induced paw edema in mice.

Results. Compounds R₁, R₂, R₃, and R₄ increase the degree of osmotic hemolysis. Compounds R₅, R₆ decrease the intensity of hemolysis at different concentrations. Compounds R₁, R₂, R₄ and R₆ promote free-radical erythrocyte membrane damage at all tested concentrations. Compound R₃ protects erythrocytes at low concentrations and promotes erythrocyte damage with increasing concentration. Compound R₅ protects erythrocytes at concentrations 3×10⁻⁹ и 3×10⁻⁵ M. Compounds R₁, R₂, R₄ enhance platelet aggregation at different concentrations. Compound R₃ inhibits platelet aggregation at concentration 10⁻⁶ M, and at concentrations 10⁻⁸ and 10⁻⁵ M it induces platelet aggregation. Compound R₅ does not affect platelet aggregation. Compound R₆ inhibits platelet aggregation at all tested concentrations. On the basis of

the results obtained from *in vitro* test systems compound R₆ was selected for further studies of anti-inflammatory activity as it demonstrated maximum effect based on two out of three evaluation criteria. Compound R₆ possesses anti-inflammatory activity in the model of inflammation.

Conclusion. The novel derivative of 2(5*H*)-furanone bearing 1-menthol moiety (compound R₆) protects erythrocyte membrane from damaging action of hypotonic environment, inhibits platelet aggregation and demonstrates anti-inflammatory activity; cell experimental models can be used for the first phase of screening of novel chemical compounds for anti-inflammatory activity.

Keywords: erythrocyte hemolysis, platelet aggregation, carrageenan-induced paw edema, anti-inflammatory drugs, 2(5*H*)-furanones, (1)-menthol.

В настоящее время нестероидные противовоспалительные средства (НПВС) широко применяют для подавления воспалительного процесса при хронических воспалительных заболеваниях, таких как ревматоидный артрит, воспалительное заболевание кишечника, аутоиммунные заболевания и др. [1]. Кроме того, НПВС считают препаратами выбора при боли и воспалении. НПВС — наиболее широко используемые лекарства в мире [2], однако применение этих лекарственных средств сопровождается многочисленными серьёзными нежелательными реакциями, особенно при их длительном применении.

В связи с этим необходим поиск альтернативных подходов к фармакологической регуляции воспаления. Однако в настоящее время основные методы изучения противовоспалительного действия какого-либо соединения проводят *in vivo*, на лабораторных животных моделированием асептического экссудативного воспаления [3]. Эти методы сложные, трудоёмкие и дорогостоящие. Кроме того, существующие на сегодняшний день методы оценки противовоспалительной активности *in vivo* сложны в интерпретации результатов. Так, например, модели каррагенинового и формалинового отёка лап лабораторных животных являются взаимодополняющими, но не взаимозаменяемыми моделями воспаления, что требует правильного их использования [4]. В связи с этим важен выбор простого скринингового теста, который мог бы непосредственно свидетельствовать о потенциальной противовоспалительной активности нового соединения.

Хорошо известно, что свободные радикалы играют важную роль в патогенезе воспаления из-за своих высоких реактогенных свойств. В то время как образование свободных радикалов представляет собой физиологический ответ, их чрезмерное образование и высокие концентрации вызывают повреждения мембран клеток и субклеточных структур, что в свою очередь приводит к активации и поддержанию воспаления [5]. Активацию агрегации тромбоцитов вызывают различные по природе вещества, в том числе и арахидоновая кислота, инициируя

циклооксигеназа-зависимую агрегацию [6], так как она является природным индуктором агрегации.

Представляется целесообразным в условиях *in vitro* использовать модельные клеточные тест-системы: осмотический/свободнорадикальный гемолиз эритроцитов и агрегацию тромбоцитов, стимулированную арахидоновой кислотой, для быстрого и эффективного отбора потенциальных противовоспалительных молекул.

С помощью этих простых клеточных экспериментальных моделей мы проводили исследование по изучению мембранотропной, антиагрегантной и противовоспалительной активности новых производных (*S*)-напроксена и успешно выявили новое синтезированное соединение, обладающее флоготропным действием, — производное (*S*)-напроксена L₃ [7].

Цель работы — изучение возможности использования клеточных модельных экспериментов (гемолиз эритроцитов и агрегация тромбоцитов) для скрининга на противовоспалительную активность новых синтезированных 5(*S*)-ментилоксипроизводных 2(5*H*)-фуранона.

В настоящей работе в качестве объектов исследования выбраны новые производные 2(5*H*)-фуранона — образцы R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆ (рис. 1). Гетероциклический фрагмент

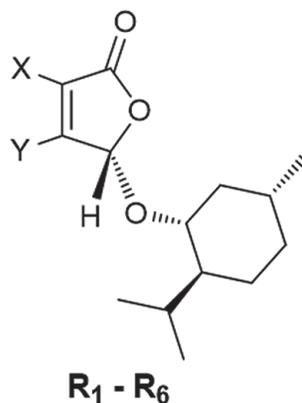


Рис. 1. Общая структура исследуемых соединений ряда 5(*S*)-ментилокси-2(5*H*)-фуранона, условно обозначенных R₁–R₆

2(5H)-фуранона присутствует во многих природных и синтетических биологически активных веществах. Среди соединений, содержащих ненасыщенный γ -лактонный цикл, обнаружены вещества, обладающие противовоспалительной, антибактериальной, противогрибковой, противоопухолевой и другими видами биологической активности [8, 9].

Молекулы исследуемых соединений R_1 – R_6 содержат 2(5H)-фураноновый цикл и фрагмент (*l*)-ментола в 5-м положении лактонного цикла (см. рис. 1). (*l*)-Ментол проявляет выраженную биологическую активность, оказывает местное успокаивающее и обезболивающее действие, стимулирует холодовые рецепторы кожи и слизистых оболочек, обладает слабым антисептическим действием. Кроме того, (*l*)-ментол был использован в синтезе исследуемых соединений в качестве доступного хирального разделяющего реагента.

Все соединения R_1 – R_6 являются оптически активными и представляют собой индивидуальные стереоизомеры 2(5H)-фуранона с *S*-конфигурацией атома углерода C^5 , их строение отличается природой заместителей X и Y в положениях 3 и 4 лактонного цикла.

В качестве препарата сравнения мы использовали (1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-ментол (Sigma-Aldrich) без дополнительной очистки.

Для изучения влияния новых потенциальных противовоспалительных молекул на стойкость мембран эритроцитов к действию гипотонической среды был применён метод Инглота и Вольна [10]. Использовали готовую эритроцитарную массу человеческой крови, полученную из Центра переливания крови Республики Татарстан. Необходимая концентрация эритроцитарной массы — 4×10^8 клеток/мл. Гипотоничность среды создавали солевым раствором, содержащим 55–57 мМ хлорида натрия в 10 мМ натрий-фосфатном буфере (pH=7,0).

После центрифугирования надсадочную жидкость переливали в планшет объёмом 300 мкл и определяли содержание гемоглобина в микропланшетном ридере Тесап при длине волны 543 нм. Контролем служили пробы с гипотоническим солевым раствором, не содержащие исследуемых соединений, интенсивность гемолиза которых принимали за 100%. Параллельные пробы повторяли 3 раза.

Для изучения влияния исследуемых соединений на свободнорадикальный гемолиз и для генерирования свободных радикалов использовали простую экспериментальную

систему — реагент Фентона, представляющий собой смесь сульфата железа (II) и перекиси водорода в соответствующих концентрациях.

Были подобраны минимальные количества компонентов Фентона, вызывающие лизис 1% суспензии эритроцитарной массы человеческой крови. Оптимальными оказались концентрации семиводного сульфата железа (II) — 0,01 мг/мл, перекиси водорода — 0,2 мг/мл (в пересчёте на 100% перекись). Оба компонента по отдельности в указанных концентрациях лизиса не вызывали.

Содержание гемоглобина в надсадочной жидкости в микропланшетном ридере Тесап определяли при длине волны 543 нм. Контролем (100%) служили пробы, не содержащие исследуемых соединений. Одновременно ставили 3 параллельные пробы.

Влияние соединений на агрегацию тромбоцитов, индуцированную 1 мМ арахидоновой кислотой, оценивали в образцах обогащённой тромбоцитами плазмы [11]. Для её получения использовали готовую тромбоцитарную массу доноров, полученную из Центра переливания крови Республики Татарстан. Полученная тромбоцитарная масса содержалась при комнатной температуре (20–24 °С) на шейкере со скоростью перемешивания 50 об./мин. Агрегацию тромбоцитов регистрировали лазерным анализатором агрегации тромбоцитов фирмы «БИОЛА», измеряли агрегацию методом светопропускания по Борну [12].

Для изучения противовоспалительной активности новых потенциальных противовоспалительных молекул на модели каррагенинового отёка лап мышей были проведены эксперименты на 42 белых лабораторных мышках обоего пола с массой тела $18,8 \pm 3,3$ г. Подопытных животных содержали в условиях вивария (с естественным режимом освещения, при температуре 22–24 °С и относительной влажности воздуха 40–50%) с использованием стандартной диеты. Исследования проводили в соответствии с правилами надлежущей лабораторной практики (GLP — от англ. Good Laboratory Practice) при проведении доклинических исследований в Российской Федерации [13], а также в соответствии с правилами и международными рекомендациями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1986) [14]. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом Казанского (Приволжского) федерального университета.

Отёк вызывали субплантарной инъекцией (под подошвенный апоневроз) в заднюю правую лапу мышей по 0,05 мл 1% водного геля λ -каррагинина (22049 SIGMA λ -Carrageenan plant mucopolysaccharide, Sigma-Aldrich), который готовили перед введением [15, 16]. Выраженность отёка оценивали путём измерения объёма лап животных с помощью плетизмометра 37 140 (Ugo Basile, Италия). Объём лапы животного до введения каррагинина считали исходным и принимали за 100%.

Подопытные животные были разделены на группы (по 6 животных в группе). Внутривенно им 1 раз за час до индукции отёка каррагином вводили: крахмальный клейстер (контрольная группа); (*l*)-ментол в дозах 50, 100 и 150 мг/кг; 5(*S*)-ментилокси-2(5*H*)-фуранон R_6 в дозах 68,3; 136,6 и 273,3 мг/кг, соответствующих по содержанию (*l*)-ментола 50, 100 и 150 мг/кг (*l*)-ментола, растворённые в крахмальном клейстере.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Microsoft Office Excel 2010 с вычислением медианы, средней арифметической величины (M), её стандартного отклонения (δ) и стандартной ошибки (m). Использовали критерий Шапиро–Уилка для оценки нормальности распределения. Для оценки достоверности различий выборок, имеющих нормальное распределение, применяли параметрический *t*-критерий Стьюдента. За статистически значимое принимали различие при уровне вероятности 95% и более ($p \leq 0,05$).

(*l*)-Ментол снижал интенсивность осмотического гемолиза в концентрациях 10^{-5} М и 10^{-4} М на 9 и 24% по сравнению с контролем ($p=0,03$ и $p=0,001$) соответственно. В концентрации 10^{-3} М он вызвал повреждение мембран эритроцитов в виде усиления степени гемолиза (на 52% выше показателей контроля; $p < 0,01$). Новые 5(*S*)-ментилоксипроизводные 2(5*H*)-фуранона R_1 , R_2 , R_3 и R_4 способствовали повреждению мембран эритроцитов, усиливая степень гемолиза во многих концентрациях в исследуемом диапазоне (10^{-9} – 10^{-3} М). Соединение R_5 снижало интенсивность гемолиза в концентрациях 10^{-7} М, 10^{-6} М, 10^{-5} М и 3×10^{-5} М максимально на 19% по сравнению с контрольным уровнем ($p < 0,05$). Производное 5(*S*)-ментилокси-2(5*H*)-фуранона R_6 снижало интенсивность гемолиза в концентрациях 3×10^{-8} М, 10^{-5} М

и 3×10^{-5} М максимально на 20% ($p \leq 0,01$).

(*l*)-Ментол также снижал интенсивность свободнорадикального гемолиза в концентрациях 10^{-8} , 10^{-6} , 10^{-4} М максимально на 20% по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$). Его производные R_1 , R_2 , R_4 и R_6 способствовали свободнорадикальному повреждению мембран эритроцитов в концентрациях 10^{-9} – 10^{-3} М. При этом была зарегистрирована максимальная степень гемолиза, более чем в 6 раз превышающая показатели в контрольных пробах. Соединение R_3 проявляло выраженный мембраностабилизирующий эффект, защищая эритроциты от повреждающего действия свободных радикалов в концентрациях 10^{-9} , 10^{-8} – 10^{-5} М максимально на 39%. С увеличением концентрации (10^{-4} – 10^{-3} М) это вещество способствовало повреждению эритроцитов до 260% по сравнению с контрольным уровнем ($p \leq 0,01$). Соединение R_5 оказывало защитный эффект на мембраны эритроцитов под действием свободнорадикального их повреждения в единичных концентрациях — 3×10^{-9} и 3×10^{-5} М, снижая степень гемолиза на 9 и 10% ($p \leq 0,05$) соответственно.

Кроме того, (*l*)-ментол ингибировал агрегацию человеческих тромбоцитов, индуцированную арахидоновой кислотой, в концентрации 10^{-5} М на 12% по сравнению с контрольными пробами ($p \leq 0,01$). В концентрации 10^{-8} М он достоверно стимулировал агрегацию тромбоцитов (повышение на 6% в сравнении с контролем; $p \leq 0,01$). В остальных концентрациях зафиксировано отсутствие влияния ментола на агрегацию тромбоцитов.

Производные 5(*S*)-ментилокси-2(5*H*)-фуранона R_1 , R_2 , R_4 усиливали агрегацию тромбоцитов, индуцированную арахидоновой кислотой, в различных концентрациях: 10^{-9} – 10^{-5} М; 10^{-7} и 10^{-6} М; 10^{-5} М соответственно. Соединение R_3 снижало степень агрегации тромбоцитов, индуцированной арахидоновой кислотой, в концентрации 10^{-6} М на 21% по отношению к контрольному уровню ($p \leq 0,05$), в концентрациях 10^{-8} и 10^{-5} М это вещество оказало усиливающее действие на агрегацию тромбоцитов, вызванную арахидоновой кислотой, на 16 и 25% ($p \leq 0,05$) соответственно. Соединение R_5 не влияло на агрегацию тромбоцитов. Соединение R_6 оказало ингибирующее действие на агрегацию тромбоцитов, индуцированную арахидоновой кислотой, во всех исследуемых

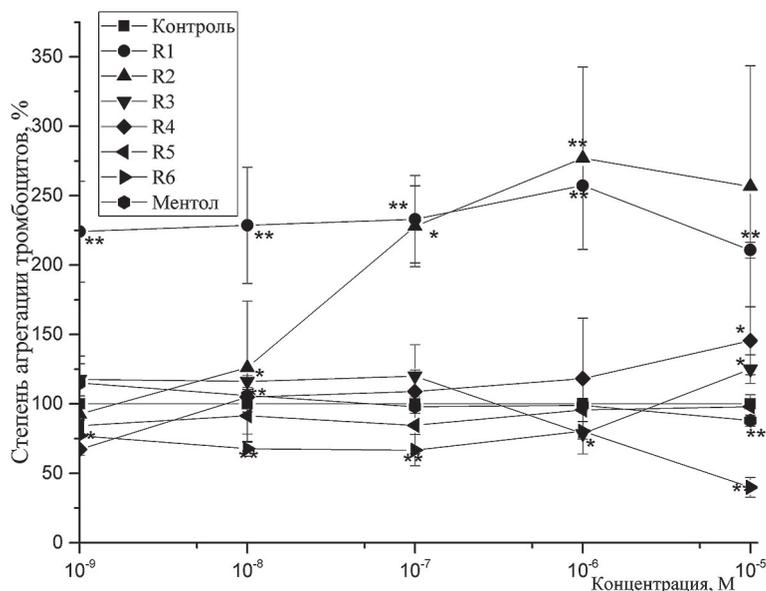


Рис. 2. Влияние новых производных 5(S)-ментилокси-2(5H)-фуранона на степень агрегации тромбоцитов, вызванной 1 мМ арахидоновой кислотой (по Борну); * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ по сравнению с контролем

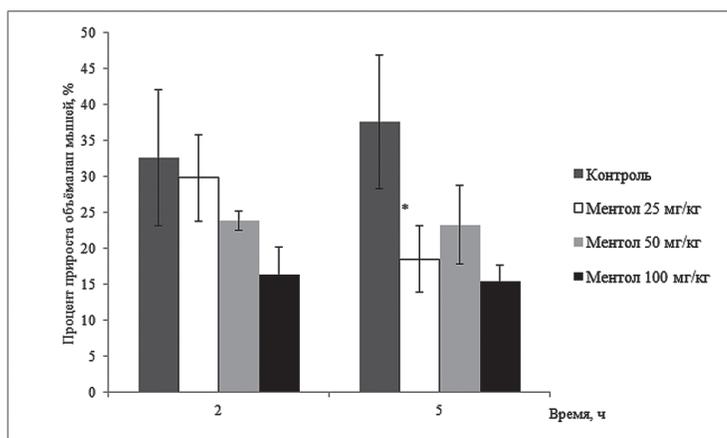


Рис. 3. Процент прироста объёма лап мышей на сроках 2 и 5 ч после моделирования острого каррагенинового отёка на фоне профилактического введения (*l*)-ментола в разных дозах; * $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем

концентрациях 10^{-9} – 10^{-5} М. Максимальное снижение степени агрегации тромбоцитов отмечено в концентрации 10^{-5} М (на 60%; $p \leq 0,01$; рис. 2).

На основании полученных результатов на клеточных моделях из 6 новых производных 2(5H)-фуранона и *l*-ментола для ранжирования их эффективности было отобрано 3 соединения (R_3 , R_5 и R_6), так как у остальных соединений отсутствовали ожидаемые эффекты. Выявлены следующие закономерности:

- по степени снижения интенсивности гемолиза, вызванного воздействием гипотонической среды (осмотический гемолиз), — $R_6 > R_5 > R_3$;
- по степени снижения интенсивнос-

ти свободнорадикального гемолиза — $R_3 > R_5 > R_6$;

– по степени ингибирования агрегации тромбоцитов — $R_6 > R_3 > R_5$.

Таким образом, для дальнейшего изучения противовоспалительной активности на моделях *in vivo* (каррагениновая модель отёка лап мышей) было выбрано соединение R_6 , поскольку по двум из трёх критериев оценки оно проявило максимальный эффект.

При моделировании каррагенинового отёка лап мышей выявлена противовоспалительная активность исследуемых соединений в разных дозах. (*l*)-Ментол в дозе 25 мг/кг проявлял противовоспалительное действие через 5 ч после введения каррагенина с угнетением отёка лап мышей на

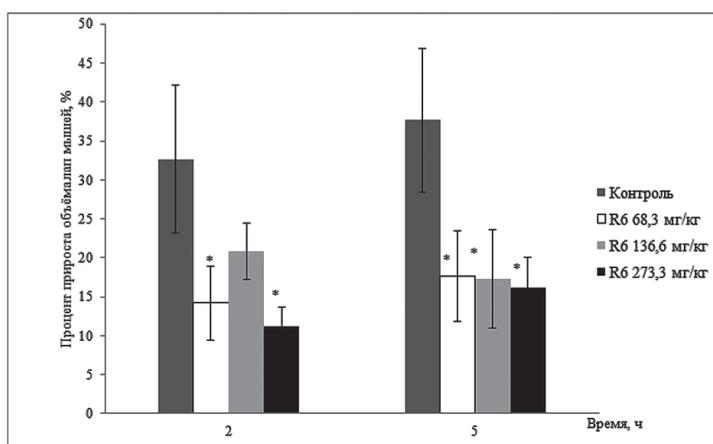


Рис. 4. Процент прироста объёма лап мышей на сроках 2 и 5 ч после моделирования острого каррагенинового отёка на фоне профилактического введения 5(S)-ментилоксипроизводного 2(5H)-фуранона R₆ в разных дозах; *p ≤ 0,05 по сравнению с контролем

51% (p=0,05 при сравнении с контролем). (I)-Ментол в дозе 50 мг/кг угнетал развитие отёка лап мышей на 58% на сроке 4 ч после индукции отёка субплантарным введением каррагенина (p=0,05). Противовоспалительная активность (I)-ментола в дозе 20 мг/кг сохранялась в течение 5 дней после инъекции каррагенина. Через 2 ч после индукции отёка ментол в дозе 100 мг/кг подавлял отёк лап мышей на 50% (p=0,05), на сроке 5 и 24 ч — 59 и 74% (p=0,03 и p=0,02) соответственно (рис. 3). На сроке 96 ч, то есть на 5-й день эксперимента, противовоспалительный эффект (I)-ментола в дозе 100 мг/кг проявлялся в виде угнетения отёка лап мышей на 79% (p=0,02).

Производное 5(S)-ментилокси-2(5H)-фуранона R₆ в нашем исследовании оказало противовоспалительный эффект во всех исследуемых дозах на разных сроках исследования. Противовоспалительная активность R₆ в дозе 68,3 мг/кг проявлялась в виде подавления отёка лап мышей на сроках 2 и 5 ч после инъекции каррагенина на 60 и 53% (p=0,05) соответственно (рис. 4). В дозе 136,6 мг/кг оно угнетало проявление воспалительного процесса, подавляя отёк лап мышей на 66, 54, 58, 58 и 92% на сроках 4, 5, 24, 72 и 96 ч после введения каррагенина (p=0,03, p=0,05, p=0,05, p=0,05 и p=0,02) соответственно. Противовоспалительное действие соединения R₆ в дозе 275,25 мг/кг зарегистрировано почти на всех исследуемых сроках: через 2, 3, 5, 24, 48, 72 и 96 ч после субплантарной инъекции каррагенина с угнетением отёка на 66, 69, 57, 75, 75, 79 и 91% (p=0,04, p=0,05, p=0,04, p=0,02, p=0,02, p=0,01 и p=0,02) соответственно.

При сравнении с ментолом в дозах 25, 50 и 100 мг/кг соединение R₆ в дозе 68,3 мг/кг на сроке 2 ч, в дозе 136,6 мг/кг на сроке 96 ч и в дозе 273,3 мг/кг на сроке 3 ч проявляло более выраженный противовоспалительный эффект (p=0,03, p=0,01 и p=0,01 соответственно). На остальных сроках не было различий между эффектами этих веществ.

ВЫВОДЫ

1. Новое производное 2(5H)-фуранона, содержащее фрагмент (I)-ментола (соединение R₆), снижает интенсивность осмотического гемолиза, ингибирует агрегацию тромбоцитов человека, вызванную арахидоновой кислотой, и проявляет противовоспалительное действие на модели каррагенинового отёк лап мышей, которое превышает эффекты (I)-ментола.

2. Простые недорогие *in vitro* тест-системы — осмотический и свободнорадикальный гемолиз, а также агрегация тромбоцитов человека, — могут быть успешно использованы для предварительного скрининга потенциальных противовоспалительных средств.

Благодарности. Работа выполнена за счёт средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Харкевич Д.А. *Фармакология*. 9-е изд., перераб., доп. и испр. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2006; 736 с.

[Kharkevich D.A. *Farmakologiya*. (Pharmacology) Moscow: GEOTAR-media. 2006; 736 p. (In Russ.)]

2. Fuchs V.R., Sox Jr.H.C. Physicians' views of the relative importance of thirty medical innovations. *Health Aff.* 2001; 20 (5): 30–42. DOI: 10.1377/hlthaff.20.5.30.

3. Ермоленко Т.И. Экспериментальное изучение противовоспалительной активности нового комбинированного препарата уролитолитического действия. *Медичні перспективи*. 2015; 20 (2): 25–29. [Ermolenko T.I. Experimental study of anti-inflammatory activity of the new combined drug with urolytolitic action. *Medichni perspektivi*. 2015; 20 (2): 25–29. (In Russ.)]

4. Конг Х.Х., Хазиахметова В.Н., Зиганшина Л.Е. Моделирование воспалительных отеков: взаимозаменяемы ли модели? *Эксперим. и клин. фармакол.* 2015; 78 (7): 24–31. [Kong Kh.Kh., Khaziakhmetova V.N., Ziganshina L.E. Modeling inflammatory edema: are the models interchangeable? *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2015; 78 (7): 24–31. (In Russ.)]

5. Казайшвили Ю.Г., Попов Н.С. Исследование противовоспалительной активности новых производных тиадиазола при формалиновом отеке лапы у крыс. *Современные проблемы науки и образования*. 2013; (3): 370. [Kazaishvili Yu.G., Popov N.S. Study of anti-inflammatory activity of derivatives thiazole at formalin paw edema in rats. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2013; (3): 370. (In Russ.)]

6. Козловский В.И., Ковтун О.М., Сероухова О.П. и др. Методы исследования и клиническое значение агрегации тромбоцитов. Фокус на спонтанную агрегацию. *Вестник ВГМУ*. 2013; 12 (4): 79–91. [Kozlovskiy V.I., Kovtun O.M., Seroukhova O.P. et al. Research methods and clinical significance of platelet aggregation. Focus on the spontaneous aggregation. *Vestnik VGMU*. 2013; 12 (4): 79–91. (In Russ.)]

7. Cong H., Sibgatullina R., Latypova L. et al. Anti-inflammatory activity of novel (S)-naproxen derivatives. *BioNanoSci.* 2016. https://www.researchgate.net/publication/309162514_Anti-Inflammatory_Activity_of_Novel_S-Naproxen_Derivatives (access date: 26.11.2016). DOI: 10.1007/s12668-016-0329-3.

8. Латыпова Л.З., Сайгитбатовалова Е.Ш., Чулакова Д.Р. и др. Тиоэфир, сульфоны и сульфоксиды 2(5H)-фуранонового ряда: синтез и строение. *Ж. орган. хим.* 2014; 50 (4): 532–545. [Latypova L.Z., Saygitbatalova E.Sh., Chulakova D.R. et al. Sulfides, sulfones, and sulfoxides of the furan-2(5H)-one series. Synthesis and structure. *Zhurnal organicheskoi khimii*. 2014; 50 (4): 532–545. (In Russ.)] DOI: 10.1134/S1070428014040149.

9. Kumar S., Garg R., Kabra A. Review on butenolides. *WJPRT*. 2013; 1 (2): 83–94.

10. Inglot A.D., Wolna E. Reactions of non-steroidal anti-inflammatory drugs with the erythrocyte membrane. *Biochem. Pharmac.* 1968; (17): 269–279.

11. Самаль А.Б., Черенкевич С.Н., Хмара Н.Ф. *Агрегация тромбоцитов: метод изучения и механизмы*. Минск: Университетское. 1990; 104 с. [Samal' A.B., Cherenkevich S.N., Khmara N.F. *Agregatsiya trombositov: metod izucheniya i mehanizmy*. (Platelet aggregation: the research method and mechanisms.) Minsk: Universitetskoe. 1990; 104 p. (In Russ.)]

12. Born G.V.R., Cross M.J. The aggregation of blood platelets. *J. Physiol.* 1963; 168 (1): 178–195. DOI: 10.1113/jphysiol.1963.sp007185.

13. Об утверждении Правил лабораторной практики: приказ Минздрава России от 23 августа 2010 г. №708н. Зарегистр. в Минюсте РФ 13 октября 2010 г. Рег. №18 713. *Российская газета*. 22 октября 2010 г.; №5319. [On approval of the Rules of laboratory practice: the order of the Ministry of Health and social development of the Russian Federation issued at 23.08.2010 №708n. Registered in the Ministry of justice of the Russian Federation on 13.10.2010. Reg. No. 18 713. *Rossiyskaya gazeta*. October 22, 2010; №5319. (In Russ.)]

14. Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей. *Вопр. реконструктив. и пласт. хирургии*. 2003; 4 (7): 34–36; 2004; 1 (8): 20–36; 2004; 2 (9): 29–31. [European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. *Voprosy rekonstruktivnoi i plasticheskoi khirurgii*. 2003; 4 (7): 34–36; 2004; 1 (8): 20–36; 2004; 2 (9): 29–31. (In Russ.)]

15. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К. 2012; 1: 944 с. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. (Guidelines for preclinical studies of pharmaceuticals.) Ed. by A.N. Mironov. Moscow: Grif i K. 2012; 1; 944 p. (In Russ.)]

16. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*. Под общей ред. Р.У. Хабриева. М.: Медицина. 2005; 832 с. [Rukovodstvo po experimentalnomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veschestv. (Guidelines for the experimental (preclinical) study of new pharmacological substances.) Ed. by R.U. Khabriev. Moscow: Meditsina. 2005; 832 p. (In Russ.)]