

УДК 612.111.7:547.512

ИНГИБИТОРЫ АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ НА ОСНОВЕ ДИФТОРЗАМЕЩЕННЫХ 3-АРИЛ-5-КАРБОКСАМИД-2-ИЗОКАЗОЛИНОВ

Пархач М.Е., Ковганко Н.Н., Борисевич С.Н., Глинник С.В.,
Латушко Т.В., Галюк Е.Н., Сперанская Е.Ч., Прохорович К.Н.

УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Беларусь

Осуществлен синтез и изучена способность дифторзамещенных 3-арил-5-карбоксамид-2-изоказолинов ингибировать АТФ-зависимую агрегацию тромбоцитов. Установлено, что производные 3-арил-5-карбоксамид-2-изоказолинов, содержащие два атома фтора в бензольном кольце, проявили способность к более активному ингибированию тромбоцитарных рецепторов GPIIa/IIIb, чем аналогичные соединения, содержащие всего один атом фтора в ароматическом фрагменте.

Ключевые слова: тромбоциты; активация; ингибитор; 2-зоксазолин; фтор.

Тромбоциты, помимо своей известной роли в образовании тромбов, обладают удивительно широким спектром функций, оказывающих влияние на многие области физиологии [1]. Так, α -гранулы тромбоцитов содержат рецепторы, которые способствуют их адгезии к другим клеткам сосудистой системы. Кроме того, они выделяют широкий набор медиаторов, играющих ключевую роль в различных процессах, таких как хемотаксис, рекрутирование стволовых клеток, миграция, пролиферация и дифференцировка клеток, воспалительные реакции, ангио- и лимфангиогенез, поддержание функционирования лимфатической и кровеносной систем, депонирование белков, защита организма, репликация вирусов, транспорт сигнальных молекул, вазомоторная активность и многие другие. Благодаря своей многофункциональности α -гранулы тромбоцитов участвуют в большом количестве физиологических и патологических процессов. Активированные тромбоциты выделяют разнообразные факторы роста, ангиогенные факторы, цитокины и хемокины. Освободившись, эти молекулы оказывают влияние на хемотаксис, воспаление и вазомоторную активность, что играет ключевую роль в восстановлении целостности поврежденных сосудов, стимулирует ангиогенез и рост новых кровеносных сосудов в зонах тканевых повреждений.

Благодаря этим свойствам тромбоциты обладают значительным терапевтическим эффектом в процессах заживления ран и восстановления тканей, что подтверждается опытом лечения таких патологий, как диабетическая стопа, повреждения костей и сухожилий, хирургические вмешательства в области лица и зубов, заболевания роговицы [2]. Существует

мнение, что тромбоциты могут играть роль в замедлении процессов старения и даже обращении вспять некоторые возрастные изменения, выступая как фактор, стимулирующий регенерацию, хотя многие из этих возможностей пока не получили поддержки в клинических исследованиях [3]. Вместе с тем активация тромбоцитов провоцирует изменения в эндотелиальных клетках и лейкоцитах, высвобождает вещества, вызывающие воспаление, что может приводить к развитию атеросклероза и тромбоза, росту сосудистой интимы после ангиопластики, прогрессированию опухолей, метастазированию, подавлению иммунного ответа, а также усугублению воспалительных и инфекционных процессов [2].

В исследованиях установлено, что тромбоциты выделяют биоактивные антимикробные пептиды, проявляя защитные свойства против инфекций и обладая характеристиками, сходными с иммунными клетками [1]. Таким образом, тромбоциты выполняют ключевую функцию в составе врожденной иммунной системы сосудистого русла, координируя адаптивную антимикробную защиту организма и объединяя противоинфекционные механизмы врожденного и адаптивного иммунитета. Имеются сведения о вовлечении тромбоцитов в патогенез малярии, лихорадки, сепсиса и ревматических заболеваний, снижение количества или качества тромбоцитов все чаще рассматривается как фактор, повышающий риск и тяжесть инфекции [4]. Кроме того, выявлено, что существует не менее трех сложных видов взаимосвязи между воспалительными и гемостатическими функциями тромбоцитов. Протромботический фенотип, характеризующийся активацией и снижением количества тромбоцитов, может

наблюдаться при генетических дефектах регуляции комплемента, таких как атипичный гемолитико-уремический синдром или пароксизмальная ночная гемоглобинурия [5]. Таким образом, тромбоциты демонстрируют широкий спектр разнообразных функций, хотя их основная роль заключается в поддержании нормального гемостаза в тесной взаимосвязи с системой свертывания крови. Традиционная теория гемостаза описывает трехэтапный механизм: после повреждения сосуда происходит вазоконстрикция для уменьшения кровопотери, затем тромбоциты адгезируют к стенке сосуда, активируются и образуют агрегаты, формируя тромбоцитарную пробку, которая впоследствии стабилизируется плотной фибриновой сеткой, образованной в результате каскада коагуляции. Однако в реальности этот процесс значительно сложнее, поскольку фазы гемостаза не являются независимыми и их активация не происходит строго последовательно. Скорее, три основных процесса, которые влекут за собой нормальный гемостаз, активируются одновременно и непрерывно потенцируют друг друга на протяжении всего процесса гемостаза. В частности, вклад тромбоцитов в гемостаз намного превышает их простое участие в «первичном гемостазе», множественные взаимодействия между тромбоцитами, стенкой сосуда и системой коагуляции усложняют фундаментальный процесс гемостаза. Кроме того, было показано, что существуют сложные взаимодействия между воспалительными и гемостатическими функциями тромбоцитов. Протромботический фенотип тромбоцитов (включая активацию тромбоцитов и потребление тромбоцитов, приводящее к тромбоцитопении) может наблюдаться при состояниях с генетическим дефицитом регуляции комплемента, таких как атипичный гемолитический уремический синдром или пароксизмальная ночная гемоглобинурия. Таким образом, тромбоциты демонстрируют множество многогранных функций.

Несмотря на активные исследования в фармацевтической индустрии, направленные на разработку действенных препаратов против тромбозов, проблемы, обусловленные этими состояниями, остаются острыми и значимыми. Тромбы, формирующиеся в сосудах, способны отрываться и мигрировать с кровотоком, вызывая серьезные и потенциально смертель-

ные осложнения. Обструкция сосудов этими сгустками крови приводит к прекращению доставки кислорода и питательных веществ к тканям. Это может вызвать повреждение тканей, в крайних случаях – их некроз и отмирание. В связи с этим, ранняя и правильная профилактика, а также квалифицированное и результативное лечение тромбозов, играют решающую роль в увеличении продолжительности и улучшении качества жизни пациентов, подверженных этому заболеванию. Кроме того, действенные терапевтические подходы к лечению тромбозов вносят существенный вклад в экономию ресурсов системы здравоохранения, что также важный фактор.

Несмотря на достижения, потребность в инновационных и эффективных лекарственных средствах не теряет актуальности. Применяемые антиагреганты нередко связаны с серьезными побочными эффектами, что снижает результативность терапии. Следовательно, разработка новых, более безопасных и действенных медикаментов приоритетная задача для современной фармацевтической науки.

Одним из многообещающих направлений в этом поиске является изучение производных изоксазола [5; 6]. Эти соединения привлекают внимание исследователей благодаря способности блокировать рецепторы G_{PIIa}/III_b, расположенные на поверхности тромбоцитов. Эти рецепторы играют ключевую роль в процессе агрегации тромбоцитов, что делает их важной мишенью для разработки новых антиагрегантов. Кроме того, изоксазолиновый цикл, структурный аналог изоксазольного, также демонстрирует потенциал в создании новых ингибиторов агрегации тромбоцитов. В предыдущих исследованиях показано, что метиловые эфиры производных 2-изоксазин-5-карбоновой кислоты обладают более выраженной способностью подавлять активность рецепторов G_{PIIa}/III_b по сравнению с соединениями, содержащими свободную карбоксильную группу [7]. Это открытие имеет важное значение, так как может привести к созданию более эффективных и безопасных антиагрегантов, которые значительно улучшат терапевтические результаты у пациентов с тромбозами. Таким образом, продолжается активный поиск и разработка новых фармацевтических препаратов, альтернативы существующим антиагрегантам. Важно, чтобы исследования в этой

области продолжались, так как только через научные открытия можно надеяться на улучшение методов лечения тромбозов и на повышение качества жизни пациентов, страдающих от этого заболевания. В конечном итоге успехи в этой области могут не только спасти жизни, но и снизить финансовую нагрузку на системы здравоохранения, что делает эту задачу особенно актуальной в современном мире.

Цель работы – изучить способность дифторзамещенных амидов 3-арил-2-изоксазолин-5-карбоновой кислоты ингибировать АДФ-зависимую агрегацию тромбоцитов.

Материалы и методы. В качестве потенциальных ингибиторов агрегации тромбоцитов исследованы соответствующие производные 3-арил-2-изоксазолин-5-амида (табл. 1), общая формула которых представлена ниже (см. рис.). Расшифровка заместителей представлена в табл. 1. Получение указанных соединений включало формирование 2-изоксазолинового цикла с использованием реакции 1,3-диполярного циклоприсоединения нитрилоксида к амиду акриловой кислоты. Нитрилоксиды получались из соответствующих оксимов реакцией с N-хлорсукцинимидом и последующим взаимодействием с триэтиламином.

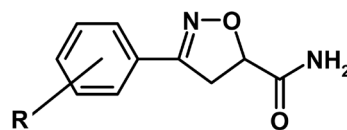


Рис. Общая формула исследуемых соединений

агрегации тромбоцитов, которую измеряли в течение шести минут. Все измерения проводили в трех повторах. Ингибирование агрегации тромбоцитов выражалось в процентах по отношению к контролю (физиологический раствор). В качестве контроля использовали клопидогрел (конечная концентрация 5 и 10 мкмоль/л).

Результаты и обсуждение

Все соединения проявили способность к подавлению агрегационной способности тромбоцитов (табл. 2). Увеличение концентрации вещества с 5 до 10 мкмоль/л привело к возрастанию ингибирующей силы эффекторов.

Следует отметить, что соединения **1–3**, содержащие два атома фтора в ароматическом кольце, в сравнении с веществами, содержащих один атом фтора в указанном фрагменте, проявили более сильную способность к связыванию с тромбоцитарными рецепторами GPIIa/IIIb.

Таблица 1 – Название и структура веществ

Номер	Название	Заместители R
1	Амид 3-(2,3-дифторфенил)-2-изоксазолин карбоновой кислоты	2,3-FF
2	Амид 3-(2,4-дифторфенил)-2-изоксазолин карбоновой кислоты	2,4-FF
3	Амид 3-(3,4-дифторфенил)-2-изоксазолин карбоновой кислоты	3,4-FF

Таблица 2 – Ингибирующая активность полученных соединений

Вещество	Ингибирующая активность, %	
	При 5 мкмоль/л	При 10 мкмоль/л
1	39	46
2	42	49
3	37	43
контроль	67	77

Агрегацию тромбоцитов контролировали по пропусканию света [2], используя агрегометр Solar 2111 (Solar, Belarus). Для этого 480 мкл плазмы, богатой тромбоцитами (содержание 200×10^9 тромбоцитов/л) в реакционном сосуде предварительно инкубировали с 20 мкл физиологического раствора (контроль) или исследуемым веществом. Через три минуты инкубации добавляли 20 мкл раствора аденозиндифосфорной кислоты (8 мкМ) для инициирования

Это свидетельствует о том, что блокировка этих центров ухудшает способность тромбоцитов связываться с фибриногеном и, соответственно, подвергаться агрегации.

Активность соединений, содержащих изоксазольное кольцо [5], оказалась выше ($\geq 60\%$) ингибирующей способности синтезированных нами соединений. Сравнение наших результатов с другими соединениями, содержащими аналогичный гетероцикл [6], показало отно-

сительно равную способность ингибировать агрегацию тромбоцитов. Степень ингибирования полученных нами соединений составила 21–43 % при концентрации 5 ммоль/л и 29–56 % при концентрации 10 ммоль/л. Ингибирующая способность полученных ранее соединений находилась в пределах 35–65 % при концентрации 4,4–4,5 ммоль/л. Понятно, что простота соединений не позволяет ожидать проявления выдающихся свойств в отношении процесса агрегации тромбоцитов. Однако полученные данные, на наш взгляд, пред-

ставляют определенную ценность, поскольку позволяют пролить свет на установление взаимосвязи «структура-свойства» в полученных соединениях.

Закключение. Производные 3-арил-5-карбоксамид-2-изоказолинов, содержащие два атома фтора в бензольном кольце, проявили способность к более активному ингибированию тромбоцитарных рецепторов GPIIa/IIIb, чем аналогичные соединения, содержащие всего один атом фтора в ароматическом фрагменте.

Список цитируемых источников

1. Rondina, M.T. The Role of Platelets in Inflammation in Platelets / M.T. Rondina, G.A. Zimmerman // Academic Press: Cambridge, MA, USA – 4th ed. – 2019. – P. 505–522.
2. Alsousou, J. Therapeutic Platelet-Rich Plasma in Wound Healing in Platelets / J. Alsousou, P. Harrison // Academic Press : Cambridge, MA, USA, 4th ed. – 2019. – P. 1161–1171.
3. Horowitz, A.M. Therapeutic potential of systemic brain rejuvenation strategies for neurodegenerative disease / A.M. Horowitz, S.A. Villeda, // F1000Research. – 2017. – Vol. 6. – P. 1291–1295.
4. Recent advances in the discovery and function of antimicrobial molecules in platelets / A. S. Aquino-Domínguez, M. L. A. Romero-Tlalolini, H. Torres-Aguilar [et al.] // International J of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22, № 2. – P. 10230–10237.
5. Sysak, A. Isoxazole ring as a useful scaffold in a search for new therapeutic agents / A. Sysak, B. Obmińska-Mrukowicz // European J of Medicinal Chemistry. – 2017. – Vol. 137, № 2. – P. 292–309.
6. Synthetic isoxazole as antiplatelet agent / M. Gutiérrez, J. Amigo, E. Fuentes [et al.] // Platelets. – 2014. – Vol. 25, № 4. – P. 234–238.
7. Ингибиторы агрегации тромбоцитов на основе производных 3-арил-2-изоказолин-5-карбоновой кислоты / Н.Н. Ковганко, М.Е. Пархач, С.Н. Борисевич [и др.] // Актуальные проблемы общей и клинической биохимии – 2024: сб. материалов республиканской научно-практической конференции, г. Гродно, 24 мая 2024 г. / отв. ред. В. В. Лелевич. – Гродно : ГрГМУ, 2024. – С. 185–188.

PLATELET AGGREGATION INHIBITORS BASED ON DIFLUORO-SUBSTITUTED 3-ARYL-5-CARBOXAMIDE-2-ISOCAZOLINES

Parkhach M.E., Kauhanka M.M., Borisevich S.N., Glinnik S.V., Latushko T.V.,
Galyuk E.N., Speranskaya E.Ch., Prakharevich K.M.

Educational Institution «Belarusian State Medical University», Minsk, Belarus

The synthesis and study of difluoro-substituted 3-aryl-5-carboxamide-2-isocazolines to inhibit ATP-dependent platelet aggregation were carried out. It was found that 3-aryl-5-carboxamide-2-isocazolines derivatives containing two fluorine atoms in the benzene ring showed the ability to inhibit platelet GPIIa/IIIb receptors more actively than similar compounds containing only one fluorine atom in the aromatic fragment.

Keywords: platelets; activation; inhibitor; 2-isoxazoline; fluorine.