

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., Прохоревич 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 GPIa/IIb, 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, защищая 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]. Существу-

ет мнение, что тромбоциты могут играть роль в замедлении процессов старения и даже обретении 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

наблюдаются 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 многофункциональных 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 смертельные

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 GПa/Пb, 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 GПa/Пb 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-изоказолин-5-карбоновой кислоты ингибировать АДФ-зависимую агрегацию тромбоцитов.

Материалы и методы. В качестве потенциальных ингибиторов агрегации тромбоцитов исследованы соответствующие производные 3-арил-2-изоказолин-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.

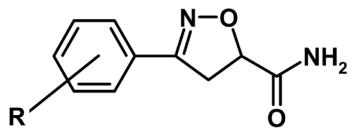


Рис. Общая формула исследуемых соединений

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, содержащими 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 аденоциндинфосфорной 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 ингибиовать агрегацию тромбоцитов. Степень ингибирования полученных нами соединений составила 21–43 % при концентрации 5 мкмоль/л и 29–56 % при концентрации 10 мкмоль/л. Ингибирующая способность полученных ранее соединений находилась в пределах 35–65 % при концентрации 4,4–4,5 мкмоль/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.

Заключение. 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-zoxazoline; fluorine.