

В.А. Сукач, А.З. Бута, О. П. Максимюк, Д.Б. Ковальський,
М.В. Вовк, О.О. Кришталь

Новітні блокатори рН-чутливих іонних каналів (3-карбоксамідино-2-оксо-2H-хромен-7-ІЛ)-4-гуанідино- бензоати

Ішемічний інсульт – одна з найбільш тяжких патологій головного мозку, що вкрай важко піддається терапії. Нещодавно було встановлено, що при ішемічному інсульті відбувається патологічна активація рН-чутливих іонних каналів (ASIC) підтипу, котра є однією з ключових причин загибелі нейронів головного мозку. Синтезовані нами похідні 3-карбоксамідинокумаринів ефективно та концентраційнозалежно інгібують активність ASIC-каналів типу 1a та 3. Найбільш активна сполука пригнічує ASIC-струми з концентраціями половинного пригнічення 7,3 та 13,2 мкмоль/л для ASIC1a- та ASIC3-струму відповідно. Наші результати вказують на те, що 3-карбоксамідинокумарини можуть бути використані як структурна основа для генерації нового покоління високоефективних антиішемічних препаратів.

Ключові слова: 3-амідино-7-гідроксикумарини, (3-карбоксамідино-2-оксо-2H-хромен-7-іл)-4-гуанідинобензоати, блокатори рН-чутливих іонних каналів, антиішемічні препарати.

ВСТУП

Ішемічний інсульт – одна з найбільш тяжких патологій мозку, котра вкрай важко піддається лікуванню. Відомо, що саме нейрони центральної нервової системи (ЦНС) є одними з найчутливіших до ішемічного ураження клітин організму. Найбільшою проблемою цієї хвороби є незворотна інвалідизація пацієнта, котра суттєво погіршує якість життя, аж до повної неспроможності самостійно задовольняти найелементарніші побутові потреби.

Встановлено, що активація рН-чутливих іонних каналів (ASIC від англ. acid-sensing ion channel), а саме підтипу 1a, внаслідок розвитку ішемічного ацидозу, є однією з ключових причин загибелі нейронів головного мозку [11]. Показано, що нейротоксичний ефект в основному досягається внаслідок надмірного підвищення внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію, що проникають через ASIC1a-провідності

внаслідок їх патологічної активації ацидозом.

Раніше вважалося, що основним джерелом патологічного нагромадження внутрішньоклітинних іонів кальцію у таких процесах є N-метил-D-аспартат (NMDA) рецептори та потенціалкеровані кальцієві канали [8]. Однак часове терапевтичне вікно їх антагоністів становить лише 30 хв, що практично унеможлиблює ефективну терапію, у зв'язку з чим виявлена авторами дослідження роль ASIC1a-каналів, як джерела патологічного накопичення внутрішньоклітинного кальцію набула важливого значення у патофізіології ішемічних уражень. Для підтвердження запропонованої теорії згаданими авторами було успішно реалізовано *in vivo* модель ішемічного інсульту головного мозку та продемонстровано нейропротекторну дію як молекулярно-генетичного видалення ASIC1a-рецептора, так і застосування його антагоністів [8].

© В.А. Сукач, А.З. Бута, О. П. Максимюк, Д.Б. Ковальський, М.В. Вовк, О.О. Кришталь

Зважаючи на вагому роль ASIC у фізіологічних та патологічних процесах, пошук їх модуляторів – актуальна проблема як фундаментальної фізіології, так і медицини. Однак нині відомі лише декілька природних пептидів і синтетичних сполук, які є вираженими антагоністами цих рецепторів [10]. Найбільш вивченим серед них є амілорид – відомий діуретик з широким спектром блокувальної дії на епітеліальні натрієві іонні канали [4]. Природний токсин PsTX1, виділений з отрути павука-птахоїда *Psalmoroeus Cambridgei*, є сильним селективним блокатором ASIC1a, але має складну будову та обмежену доступність [2]. В останні роки [6] запропоновано використовувати 7-алкініл-2-нафтиламідин у ролі інгібітора ASIC-рецепторів із концентрацією половинного пригнічення (IC_{50}) до 0,4 мкмоль/л. Як наслідок побічної дії антикоагулянта нафамостату, Угава та співавт. [9] виявили здатність цього препарату блокувати ASIC1a і ASIC3 (рис. 1). Слід зазначити, що селективні антагоністи серед перерахованих сполук невідомі.

МЕТОДИКА

Інфрачервоні (ІЧ)-спектри синтезованих сполук записані на спектрофотометрі UR-20 в таблетках KBr. Спектри ЯМР 1H отримані в розчинах $DMCO-d_6$ на приладі Bruker Avance DRX-500 (500,13 МГц), внутрішній стандарт – тетраметилсилан (с – синглет, д – дублет, т – триплет, кв – кuartет, м – мультиплет).

*Синтез гідрохлоридів 7-гідрокси-2-оксо-6-*R*-2*H*-хромен-3-карбоксамідинів (4–6).*

До розчину 5,46 ммоль 2,4-дигідрокси-5-*R*-бензальдегіду (1–3) в 15 мл етанолу послідовно додають 1,0 г (5,46 ммоль) етилціаноацетату та 1,26 г (16,38 ммоль) ацетату амонію, кип'яють протягом 10 хв і охолоджують до кімнатної температури. Отриманий осад відфільтровують, промивають етанолом, суспендують в 10 мл

води, додають 20 мл 1 М розчину соляної кислоти і суміш перемішують 1 год при кімнатній температурі. Осад відфільтровують, промивають 10 мл води та висушують у вакуумі водноструменевого насоса при 90 °С (рис. 2).

*Гідрохлорид 7-гідрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-карбоксамідину (4).*

Вихід 72 %, т. топл. 291–295 °С. ІЧ-спектр, ν , cm^{-1} : 1735 (C=O), 3330–3355 (N-H), 3440 (OH). Спектр ЯМР 1H , δ , м.ч.: 7,50 с (1H), 7,56 с (1H), 8,02 с (1H), 8,88 с (1H), 9,50 м (4H), 11,20 с (1H). Знайдено, %: C 50,07; H 3,63; N 11,40. $C_{10}H_9ClN_2O_3$. Вирахувано, %: C 49,89; H 3,77; N 11,65.

*Гідрохлорид 7-гідрокси-2-оксо-6-хлоро-2*H*-хромен-3-карбоксамідину (5).*

Вихід 75 %, т. топл. >300 °С. ІЧ-спектр, ν , cm^{-1} : 1730 (C=O), 3320–3350 (N-H), 3450 (OH). Спектр ЯМР 1H , δ , м.ч.: 7,53 с (1H), 8,14 с (1H), 8,95 с (1H), 9,44 м (4H), 11,25 с (1H). Знайдено, %: C 43,70; H 3,11; N 11,42. $C_{10}H_8Cl_2N_2O_3$. Вирахувано, %: C 43,63; H 2,93; N 11,65.

*Гідрохлорид 7-гідрокси-2-оксо-6-етил-2*H*-хромен-3-карбоксамідину (6).*

Вихід 75 %, т. топл. 285–290 °С. ІЧ-спектр KBr, ν , cm^{-1} : 1730 (C=O), 3320–3340 (N-H), 3460 (OH). Спектр ЯМР 1H , δ , м.ч.: 1.02 т (3H, $J = 6,8$ Гц), 2,48 кв (2H, $J = 6,8$ Гц), 7,53 с (1H), 8,14 с (1H), 8,95 с (1H), 9,44 м (4H), 11,25 с (1H). Знайдено, %: C 53,88; H 4,75; N 10,55. $C_{12}H_{13}ClN_2O_3$. Вирахувано, %: C 53,64; H 4,88; N 10,43.

*Синтез дигідрохлоридів (3-карбоксамідино-2-оксо-6*R*-2*H*-хромен-7-іл)-4-гуанідинбензоатів (7–9).*

До розчину 2,08 ммоль гідрохлориду 7-гідрокси-2-оксо-2*H*-хромен-3-карбоксамідину (4–6) в 5 мл сухого диметилформаміду (ДМФА) при перемішуванні при 40 °С додають розчин 0,45 г (2,08 ммоль) 4-гуанідинбензойної кислоти в 5 мл сухого ДМФА, а потім 1,1 мл диізопропілкарбодіміду. Суміш перемішують 24 год при кімнатній температурі, розбавляють 2 мл сухого ацетонітрилу та перемішують до-

датково 6 год. Утворений осад відфільтровують, промивають сухим ДМФА, ацетонітрилом і висушують при 70 °С.

Дигідрохлорид (3-карбоксамідино-2-оксо-2Н-хромен-7-іл)-4-гуанідинбензоату (7).

Вихід 67 %, т. топл. 235–237 °С. ІЧ-спектр, ν , см^{-1} : 1730–1740 (C=O), 3350–3380 (N-H). Спектр ЯМР ^1H , δ , м.ч. : 7,45–7,51 м (3H), 7,67 с (1H), 7,94–8,05 м (5H), 8,19 д (2H, J = 8,0 Гц), 8,90 с (1H), 9,50 м (4H), 10,80 с (1H). Знайдено, %: С 49,62; Н 4,05; N 16,23. $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{Cl}_2\text{N}_5\text{O}_4$. Вирахувано, %: С 49,33; Н 3,91; N 15,98.

Дигідрохлорид (3-карбоксамідино-2-оксо-6-хлоро-2Н-хромен-7-іл)-4-гуанідинбензоату (8).

Вихід 69 %, т. топл. 249–253 °С. ІЧ-спектр, ν , см^{-1} : 1735–1740 (C=O), 3350–3390 (N-H). Спектр ЯМР ^1H , δ , м.ч. : 7,50–7,58 м (3H), 7,90–8,17 м (5H), 8,15–8,18 м (2H), 8,90 с (1H), 9,45–9,53 м (4H), 10,73 с (1H). Знайдено, %: С 45,92; Н 3,33; N 17,61. $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{Cl}_3\text{N}_5\text{O}_4$. Вирахувано, %: С 45,74; Н 3,41; N 14,82.

Синтез дигідрохлориду (3-карбоксамідино-2-оксо-6-етил-2Н-хромен-7-іл)-4-гуанідин-бензоату (9).

Вихід 65 %, т. топл. 218–220 °С. ІЧ-спектр, ν , см^{-1} : 1740–1745 (C=O), 3345–3385 (N-H). Спектр ЯМР ^1H , δ , м.ч.: 1,11 т (3H, J= 7,0 Гц), 2,55 кв (2H, J=7,0 Гц), 7,51–8,17 м (10H), 8,90 с (1H), 9,56 м (4H), 10,64 с (1H). Знайдено, %: С 51,77; Н 4,40; N 14,83. $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{Cl}_2\text{N}_5\text{O}_4$. Вирахувано, %: С 51,49; Н 4,54; N 15,02.

Дослідження впливу дигідрохлоридів (3-карбоксамідино-2-оксо-2Н-хромен-7-іл)-4-гуанідинбензоатів (7–9) на рН-чутливі іонні канали.

Дію речовин досліджували на гомомерних ASIC1a-іонних каналах лінії людських ембріональних ниркових клітин (НЕК-293) і на ASIC3-іонних каналах нейронів дорсально-корінцевих гангліїв шурів (ДКГ). Для вивчення впливу речовин на рН-чутливі іонні канали було використано метод фіксації потенціалу у конфігурації відве-

дення струму від цілої клітини. Зовнішньоклітинний розчин (кондиціонувальний) містив (ммоль/л): NaCl – 130; CaCl_2 – 2; KCl – 5; MgCl_2 – 2; HEPES – 20; рН 7,5 доведений NaOH. Склад активаційного розчину був аналогічний кондиціонуальному, за винятком буфера (HEPES було замінено на MES (10 ммоль/л, рН 5,0 доведений NaOH). Скляні мікропіпетки (опір 3–4 МОм) заповнювали внутрішньоклітинним розчином такого складу (ммоль/л): KF – 120, тріс-Cl – 20; рН 7,3 доведений KOH. При переході з кондиціонувального до активаційного розчину (швидкість зміни розчину близько 50 мс) при підтримуваному потенціалі -60 мВ спостерігалась активація рН-чутливих іонних каналів амплітудою струму 400–800 та 1000–5000 пА для ASIC1a та ASIC3 відповідно. Ці струми швидко десенситизувалися протягом 3–5 с та були чутливими до 3 мкм/л амілориду. Це вказує на те, що вони були викликані активацією рН-чутливих іонних каналів. Експерименти проводили при кімнатній температурі (20 ± 2) °С. Усі хімічні використані реагенти вироблені фірмою «Sigma» (США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Нами розроблено дизайн нових аналогів нафамостату, в яких замість нафталенової системи міститься кумариновий фрагмент. Зазначимо, що введення кумаринового циклу в структуру нових потенційних антагоністів рН-чутливих іонних каналів зумовлено його фармакофорними властивостями в різноманітних типах біоактивних сполук, поширеністю в природі та доступністю [1, 3, 7].

Ключовою стадією в запропонованому підході до отримання цільових 3-амідинокумаринів (2-оксо-2Н-хромен-3-карбоксамідинів) є реакція 2,4-дигідроксибензальдегідів (1–3) з етилціаноацетатом та ацетатом амонію. При нагріванні реагентів упродовж 10 хв у розчині етанолу відбувається формування кумаринового циклу та

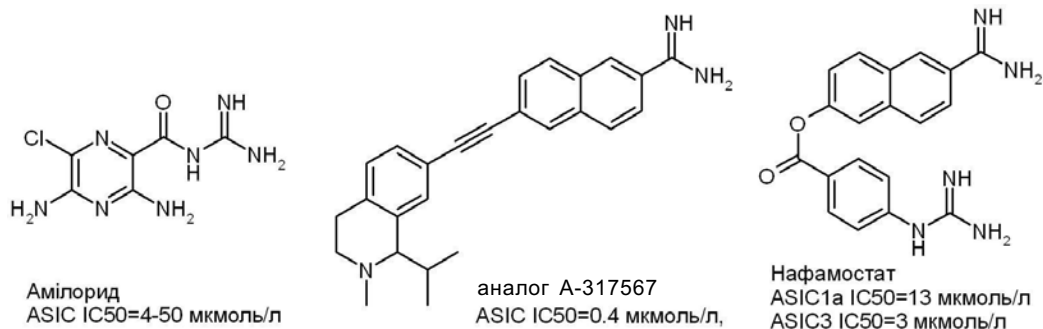


Рис. 1. Відомі синтетичні антагоністи рН-чутливих іонних каналів

його функціоналізація в положенні 3 амідиною групою, в результаті чого з виходом 72–75 % утворюються 7-гідрокси-2-оксо-2Н-хромен-3-карбоксамідини (4–6). Конденсація останніх з гідрохлоридом 4-гуанідинобензойної кислоти за наявності диізопропілкарбодіміду в безводному ДМФА призводить до утворення дигідрохлоридів (3-карбоксамідино-2-оксо-2Н-хромен-7-іл)-4-гуанідинобензоатів (7–9) з виходом 6–69 % (рис. 2).

Структура синтезованих сполук 7–9 узгоджується з результатами вимірів їх спектральних параметрів. Зокрема, ІЧ-спектри характеризуються інтенсивними смугами поглинання груп C=O (1730–1745

см⁻¹) та N-H (3350–3390 см⁻¹). У спектрах ЯМР ¹H поряд із типовими сигналами протонів ароматичних ядер та екзоциклічних амідинових та гуанідинових фрагментів наявні синглети C⁴-H-протонів кумаринової системи при 8,90 м.ч.

рН-Чутливі іонні канали є так званими «рецепторами до протонів», що активуються при зниженні рН середовища та експресуються у багатьох типах клітин, зокрема у нейронах ЦНС та периферичної (ПНС) нервової системи [5]. Активація ASIC-каналів спричиняє транзйентний іонний трансмембранний струм, що спадає протягом декількох секунд навіть за умов підтримання кислого середовища внаслідок процесу

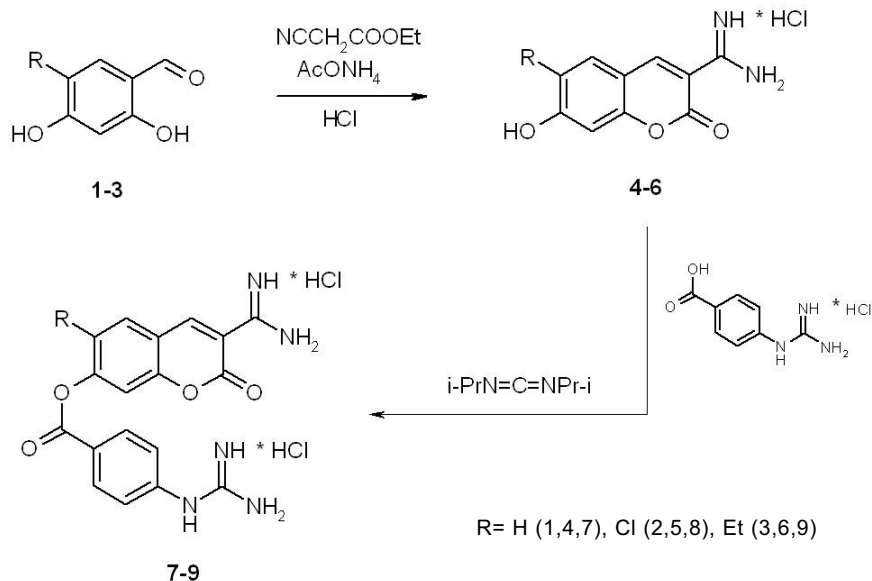


Рис. 2. Спрощена схема синтезу дигідрохлоридів (3-карбоксамідино-2-оксо-2Н-хромен-7-іл)-4-гуанідинобензоатів (7–9)

десенситизації рецептора. Незважаючи на багаторічні дослідження, механізми відкриття рН-чутливого іонного каналу, його переходу в десенситизований і закритий стани наразі залишаються нез'ясованими.

Усього ідентифіковано чотири гени, котрі кодують ASIC-канали, формуючи загалом зі сплайсинговими варіантами шість підтипів їх субодиниць. Залежно від підтипу, ASIC локалізуються як у ПНС, так і в ЦНС і відповідно виконують різну

фізіологічну роль. Найбільш поширеним підтипом в ПНС є ASIC3, тоді як в ЦНС переважно експресується ASIC1a.

При дослідженні пригнічення струмів, викликаних активацією рН-чутливих іонних каналів за наявності 10 мкмоль/л дигідрохлоридів (3-карбоксамідино-2-оксо-2H-хромен-7-іл)-4-гуанідинбензоатів 7–9 знайдено, що сполука 7 викликає найбільш значне зворотне зменшення амплітуди іонного трансмембранного струму (таблиця).

Пригнічення струмів ASIC1a та ASIC3 типів за наявності сполук 7–9 у концентрації 10 мкмоль/л

Сполука	Ступінь пригнічення, %	
	ASIC1a-струму у ембріональних ниркових клітинах людини (HEK-293)	ASIC3-струму у клітинах дорсально корінцевих гангліїв щурів
7	58	45
8	51	42
9	49	39

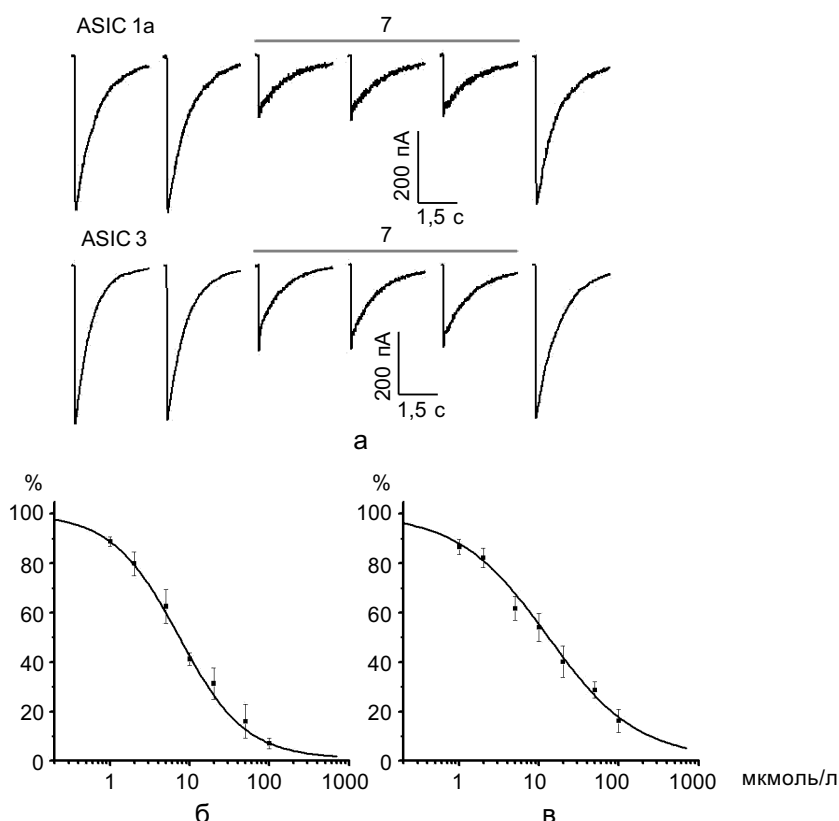


Рис. 3. Дія сполуки 7 (10 мкмоль/л) на активність рН-чутливих іонних каналів підтипів 1a (ASIC1a) та 3 (ASIC3): а – зворотне пригнічення струмів; б, в – криві залежності доза–ефект блокувальної дії сполуки 7 на амплітуду струму ASIC1a у клітинах лінії HEK-293 та ASIC3 у нейронах дорсально-корінцевих гангліїв щурів

Значення концентрації половинного пригнічення (IC_{50}) активованих струмів ASIC1a для неї становить $7,3 \text{ мкмоль/л} \pm 0,2 \text{ мкмоль/л}$ (рис. 3,б), а підтипу ASIC3 – $13,2 \text{ мкмоль/л} \pm 1,3 \text{ мкмоль/л}$ (див. рис. 3,в), для нафамостату – $13,5$ та $3,0 \text{ мкмоль/л}$ відповідно [9].

Таким чином, пригнічення найактивнішою сполукою 7 струмів рН-чутливих іонних каналів перевищує рівень відомого аналога – нафамостату відносно підтипу ASIC1a. Знайдені антагоністи можуть бути прототипами для створення принципово нових високоефективних нейропротекторних лікарських засобів.

**В.А. Сукач, А.З. Бута, А. П. Максимюк,
Д.Б. Ковальський, М.В. Вовк, О.А. Крышталь**

**НОВЫЕ БЛОКАТОРЫ
РН-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ИОННЫХ
КАНАЛОВ – (3-КАРБОКСАМИДИНО-2-
ОКСО-2Н-ХРОМЕН-7-ИЛ)-4-
ГУАНИДИНОБЕНЗОАТЫ**

Ишемический инсульт одна из самых тяжелых патологий головного мозга, крайне трудно поддающаяся терапии. Недавно было установлено, что при ишемическом инсульте происходит патологическая активация рН-чувствительных ионных каналов (ASIC) подтипа 1a (ASIC1a), которая является одной из ключевых причин гибели нейронов головного мозга. Синтезированные нами производные 3-карбоксамидинокумаринив эффективно концентрационнозависимо подавляют активность ASIC-каналов типа 1a и 3. Наиболее активное соединение подавляет ASIC-токи с концентрациями половинного угнетения $7,3$ и $13,2 \text{ мкмоль/л}$ для ASIC1a- и ASIC3-тока соответственно. Наши результаты показывают, что 3-карбоксамидинокумарини могут быть использованы в качестве структурного основания для генерации нового поколения высокоэффективных антиишемических препаратов.

Ключевые слова: 3-амидино-7-гидроксикумарини, блокаторы рН-чувствительных ионных каналов, антиишемические препараты.

**V. A. Sukach, A.Z. Buta, O.P. Maximyuk,
D.B. Kovalsky, M.V. Vovk, O.O. Krishtal**

**(3-CARBOXAMIDINO-2-OXO-2H-CHROMEN-
7-YL)-4-GUANIDINOBENZOATES ARE NOVEL
BLOCKERS OF ACID SENSING ION
CHANNELS**

Ischemic stroke is one of the most severe brain pathologies that is extremely difficult to treat. Recently it has been found

that acidosis accompanying cerebral ischemia induces activation of acid-sensing ion channel ASIC1a which results in its turn in the neuronal death. Here we present novel derivatives of 3-carboxamidinocoumarines that effectively inhibit ASIC1a and ASIC3 channels in concentration-dependent manner. The most active compound inhibits ASIC1a and ASIC3 channels with corresponding IC_{50} of 7.3 and $13.2 \text{ }\mu\text{M}$. Our data suggest that 3-carboxamidinocoumarines can be used as a scaffold for novel type of highly efficient anti-ischemic drugs.

Key words: 3-amidino-7-hydroxycoumarines, 3-carboxamidino-2-oxo-2H-chromene-7-yl)-4-guanidinebenzoates, ASIC blockers, anti-ischemic drugs.

*Institute of Organic Chemistry of NAS of Ukraine, Kyiv;
O.O.Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv;
International Center Molecular Physiology, National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства. – 15-е изд., перераб., испр. и доп. М.: Изд-во Новая Волна. – 2005. – 1200 с.
2. Escoubas P., Bernard C., Lambeau G., Lazdunski M., Darbon H. Recombinant production and solution structure of PcTx1, the specific peptide inhibitor of ASIC1a proton-gated cation channels // *Protein Sci.* – 2003. – **12**. – P. 1332–1343.
3. Farinola N., Piller N. Pharmacogenomics: Its role in re-establishing coumarin as treatment for lymphedema // *Lymphat. Res. and Biol.* – 2005. – **3** (2). – P. 81–86.
4. Korkushko A.O., Kryshthal O.A. Organic-cation-blocking of proton-induced sodium permeability in the membrane of rat trigeminal neurons // *Neurophysiology.* – 1984. – **16**, № 4. – P. 557–561.
5. Krishtal O. The ASICs: Signaling molecules? Modulators? // *Trends in Neurosci.* – 2003. – **26**, № 9. – P. 477–483.
6. Kuduk S.D., Di Marco C.N., Bodmer-Narkevitch V., Cook S.P., Cato M.J., Jovanovska A., Urban M.O., Leitel M., Sain N., Liang A., Spencer R.H., Kane S.A., Hartman G.D., Bilodeau M.T. Synthesis, structure activity relationship, and pharmacological profile of analogs of the ASIC-3 inhibitor A-317567 // *ACS Chem. Neurosci.* – 2010. – **1**, № 1. – P. 19–24.
7. Link K.P. The Discovery of dicumarol and its sequels // *Circulation.* – 1959. – **19**, №1. – P. 97–107.
8. Pignataro G., Simon R.P., Xiong Z.-G. Prolonged activation of ASIC1a and the time window for neuroprotection in cerebral ischaemia // *Brain* – 2007. – **130**. – P.151–158
9. Ugawa S., Ishida Y., Ueda T., Inoue K., Nagao M., Shimada S. Nafamostat mesilate reversibly blocks acid-sensing ion channel currents. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2007. – **363**. – P. 203–208.
10. Xiong Z.-G., Pignataro G., Li M., Chang S.Y., Simon R.P. Acid-sensing ion channels (ASICs) as pharmaco-

logical targets for neurodegenerative diseases // Curr. Opinion in Pharm. – 2008. – 8. – № 1. – P. 25–32.
11. Xiong Z.-G., Zhu X.-M., Chu X.-P., Minami M., Hey

J., Wemmie J.A., Price M., Welsh M.J., Simon R.P. Neuroprotection in ischemia: blocking calcium-permeable acid-sensing ion channels //

Ін-т органічної хімії НАН України, Київ

E-mail: mvovk@i.com.ua

Ін-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ

E-mail: at@biph.kiev.ua

Міжнар. центр молекул. фізіології НАН України, Київ

E-mail: at@biph.kiev.ua

*Матеріал надійшов
до редакції 23.06.2011*