

АНТИТРОМБОЦИТАРНОЕ ДЕЙСТВИЕ И ХИМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ N6-ХЛОРАДЕНОЗИНФОСФАТА

© 2021 г. М.А. Мурина*, Д.И. Рощупкин*, **, В.И. Сергиенко*

*Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА РФ,
Россия, 119435, Москва, ул. Малая Пироговская, 1а

**Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ,
Россия, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1а

E-mail: marina_murina@mail.ru

Поступила в редакцию 14.05.2021 г.

После доработки 14.05.2021 г.

Принята к публикации 17.05.2021 г.

Создана технология получения новых хлораминовых соединений, относящихся к производным аденозина. Выявлены абсорбционные оптические характеристики N6-хлораденозин-5'-фосфата (хлораминового производного АМФ). В частности, показано, что его спектр поглощения света занимает диапазон длин волн 220–340 нм с максимумом и минимумом при 265 и 233 нм. Исследована химическая модифицирующая способность N6-хлораденозинфосфата по отношению к биологически значимым соединениям, имеющим сульфгидрильные (например, сывороточный альбумин) или сульфидные (например, остатки метионина в фибриногене) функциональные группы. Количественным показателем этой способности служила константа скорости реакций. Спектрофотометрическим методом зарегистрированы кинетические кривые убыли хлорамина АМФ после быстрого смешивания с серосодержащими субстратами и затем рассчитаны константы скорости с использованием теоретического уравнения кинетики бимолекулярных реакций. N6-хлораденозинфосфат очень быстро реагирует с тиольными соединениями; его константы скорости с сывороточным альбумином, N-ацетилцистеином, восстановленным глутатионом и цистеином (рН 7.4) достигают соответственно 24000, 58000, 240000, 1200000 М⁻¹ с⁻¹. Такое отличие в величинах констант обусловлено в основном разницей в степени диссоциации сульфгидрильных групп. Константа скорости реакции N6-хлораденозинфосфата с метионином составляет 1.40 ± 0.09 М–1с–1, с фибриногеном – 28.0 ± 1.6 М⁻¹ с⁻¹, с окисленным глутатионом – 0.230 ± 0.066 М⁻¹ с⁻¹. Таким образом, хлораминовое производное АМФ характеризуется повышенной реакционной способностью по отношению к сульфгидрильной группе. Установлено, что N6-хлораденозинфосфат эффективно угнетает АДФ-индуцированную агрегацию изолированных тромбоцитов и тромбоцитов в составе обогащенной тромбоцитами плазмы крови.

Ключевые слова: хлораминовое производное АМФ, спектрофотометрия, серосодержащие соединения, константа скорости, тромбоцит, антиагрегант.

DOI: 10.31857/S0006302921040025

В крови в результате активации фагоцитирующих клеток их миелопероксидаза синтезирует хлорноватистую кислоту (гипохлорит), а при реакции гипохлорита с аминокислотами образуются хлораминовые производные белков, пептидов, аминокислот и других соединений [1]. Некоторые специально синтезированные устойчивые хлораминовые соединения, прежде всего N-хлортаурин, N,N-дихлортаурин и их структурные аналоги, представляют биомедицинский интерес: они оказывают выраженные противомикробный [2] и противотромботический [3, 4] эффекты. Противотромботическое действие в значитель-

ной степени обусловлено ингибированием агрегационной функции тромбоцитов. Это ингибирование характеризуется избирательностью в сравнении с другими клетками крови [5]. Обсуждаемые эффекты – результат ковалентной (химической) модификации сульфгидрильных и сульфидных групп в молекулярных мишенях [6, 7]. Активность созданных до сих пор хлораминовых соединений как антиагрегантов, вероятно, определяется соотношением скорости их взаимодействия с плазматической мембраной тромбоцитов и скорости побочных реакций, прежде всего, реакции с сывороточным альбумином.

Можно полагать, что эффективность действия хлораминового антиагреганта резко увеличится,

Сокращение: ОТП – обогащенная тромбоцитами плазма.

если он вначале специфически связывается с мембраной и уже в этом состоянии необратимо модифицирует тромбоцит. В связи с этим предположением мы обратились к аденозиновым соединениям. Известно, что тромбоциты имеют на внешней поверхности специфические рецепторы к аденозину, АМФ, АДФ, АТФ [8]. В некоторых работах приводятся данные о том, что при взаимодействии аденозинмонофосфата с гипохлоритом образуется хлораминовое производное [9]. Однако его свойства и основные аспекты способа получения не изучены.

Задачами настоящей работы было следующее: (1) выяснение оптимальных условий получения хлорамина АМФ в растворе и определение его оптических абсорбционных характеристик; (2) исследование химической модифицирующей способности по отношению к биологически значимым соединениям, имеющим сульфгидрильные (альбумин, восстановленный глутатион, цистеин и др.) или сульфидные (свободный метионин и остатки метионина в фибриногене) функциональные группы, и оценка антиагрегантной эффективности. Работа преследовала цель выяснить возможность создания хлораминового ингибитора тромбоцитов повышенной эффективности, обусловленной первичным связыванием с клетками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использовали коммерческие препараты АМФ, восстановленного и окисленного глутатиона, цистеина, N-ацетилцистеина, метионина, бычьего сывороточного альбумина, фибриногена, HEPES, неорганических солей и гипохлорита натрия (все реактивы — фирмы Sigma-Aldrich, США). В опытах соединения растворяли в 50 мМ фосфатном буферном растворе, содержащем гидрофосфат и дигидрофосфат натрия, значения pH которого доводили до 7.4 или 5.4.

Спектры поглощения исследуемых соединений и кинетические кривые изменения величины абсорбции в ходе реакций хлорамина АМФ с тиольными и сульфидными соединениями регистрировали на спектрофотометре Cary 50 Bio UV-Visible фирмы Varian (Австралия).

Эксперименты по изучению антиагрегационного действия исследуемых соединений проводены на изолированных тромбоцитах и тромбоцитах в составе обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП) крови, которую получали из краевой вены уха кролика.

Кровь стабилизировали 3.8%-м раствором трехзамещенного цитрата натрия в соотношении 9:1 по объему и центрифугировали 15 мин при 460 g. Супернатант, представляющий собой ОТП, хранили не более 3 ч. Для получения суспензии

изолированных тромбоцитов кровь кролика стабилизировали раствором кислого цитрата натрия (85 мМ трехзамещенного цитрата натрия, 71 мМ лимонной кислоты, 11 мМ D-глюкозы, pH 4.5) в соотношении 5:1 по объему. После центрифугирования к ОТП добавляли ЭДТА (1 мМ) и центрифугировали 7 мин при 1850 g [10, 11]. Для дальнейшей работы осадок тромбоцитов ресуспендировали в фосфатном буфере (10 мМ HEPES, 134 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1.0 мМ MgSO₄, 0.5 мМ Na₂HPO₄, 0.5 мМ D-глюкозы, pH 7.4) и хранили при комнатной температуре.

Агрегацию тромбоцитов исследовали кинетическим турбидиметрическим методом Борна на анализаторе агрегации фирмы «Биола» (Россия). В образцы клеток (в объеме 270 мкл) при интенсивном перемешивании вводили исследуемое соединение (30 мкл), смесь инкубировали 3 мин при комнатной температуре. Перед введением агониста в образец изолированных тромбоцитов добавляли аутологичную плазму крови в объемной конечной концентрации 2% и хлорид кальция (0.2 мМ). Путем добавления агониста АДФ (10 мкМ) запускали процесс агрегации тромбоцитов, приводящий к постепенному увеличению светопропускания образца. Известно, что максимальное увеличение светопропускания характеризует приближенно количество клеток, вошедших в состав агрегатов. Агрегационную способность тромбоцитов оценивали следующими турбидиметрическими количественными показателями. Один из них — отношение максимального изменения светопропускания в опытных образцах к изменению в контроле, этот показатель именуют относительной максимальной степенью агрегации. Второй показатель — размерный угловой коэффициент кривой светопропускания на начальном отрезке его увеличения, этот показатель называют начальной скоростью агрегации.

Данные измерения спектров поглощения, кинетических кривых абсорбции обрабатывали с помощью программы Microsoft Excel. В этой же программе проводили статистическую обработку данных, результаты представлены в виде средних значений со стандартными отклонениями.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Способ получения N6-хлораденозинфосфата в растворе. Хлораминовые производные биологически значимых соединений чаще всего получают в реакции с гипохлоритом натрия [11] или при взаимодействии с *трет*-бутилгипохлоритом [12]. Активный хлор этих соединений с высокими константами скорости замещает атом водорода в свободной функциональной аминогруппе (R₁—NH₂) или замещенной группе (R₁—NH—R₂). В случае *трет*-бутилгипохлорита в реакционной

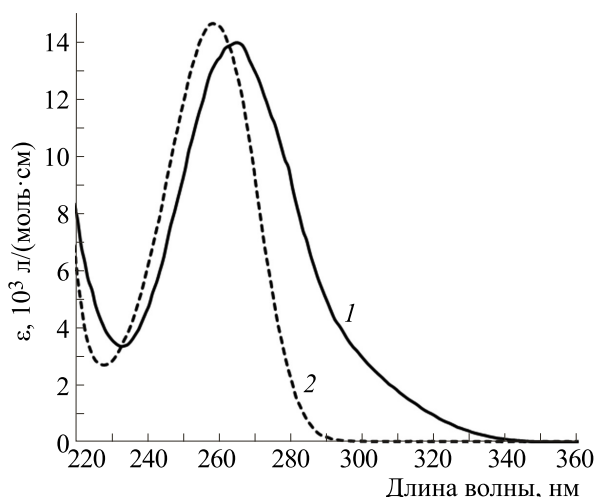


Рис. 1. Спектры поглощения N6-хлораденозинмонофосфата (1) и АМФ (2); ϵ — молярный коэффициент поглощения.

системе образуется продукт терт-бутанол [12]. Во избежание процедуры очистки от этого продукта в качестве источника активного хлора мы использовали гипохлорит натрия.

Известно, что атом хлора способен присоединяться, кроме аминогруппы, к атому углерода в положении 8 пуриновой части АМФ [13]. Протекание такой побочной реакции мы наблюдали в опытах при использовании АМФ и соответственно гипохлорита натрия в высоких концентрациях. Также было установлено, что выход синтеза хлорамина АМФ существенно зависит от pH реакционной смеси. В итоге была разработана следующая процедура синтеза N6-хлораденозинфосфата. АМФ растворяли в бидистиллированной воде и доводили pH раствора до 4.3. К 5 мл раствора АМФ в концентрации 3 мМ добавляли по каплям равный объем водного раствора гипохлорита натрия. Смесь непрерывно энергично перемешивали на магнитной мешалке. Конечная молярная концентрация гипохлорита была на 3–5% меньше концентрации АМФ. Поэтому в конечном образце присутствовал небольшой остаток АМФ. При этом свободный (непрореагировавший) гипохлорит отсутствовал. Это следует из того, что при добавлении в образец N6-хлораденозинфосфата иодида калия реакция его окисления происходила медленно (при pH 7.4 константа скорости реакции составляла $4.6 \pm 0.48 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$), в отличие от реакции с гипохлоритом натрия. Выход N6-хлораденозинфосфата, определяемый по концентрации активного хлора, составлял 98–99%. Анализ активного хлора проводили йодометрическим методом с применением спектрофотометрии. Регистрируя абсорбцию при 352 нм, определяли молекулярный йод — продукт реак-

ции N6-хлораденозинфосфата с иодидом калия. Поглощение света при указанной длине волны непосредственно обусловлено анионом триодида (J_3)[–] [14].

Оптический абсорбционный спектр хлорамина АМФ получали как разницу величин абсорбции конечной смеси и абсорбции остаточного АМФ. Спектры хлорамина АМФ и самого АМФ в ультрафиолетовой области длин волн сильно различаются. Спектр N6-хлораденозинфосфата сдвинут в длинноволновую область, его максимум приходится на 265 нм, а минимум — на 233 нм. Кроме того, для абсорбционного спектра хлорамина АМФ характерен «затянутый» длинноволновый спад (рис. 1). Важно, что на этом спаде молярные коэффициенты поглощения достигают больших значений в диапазоне длин волн 290–315 нм. Здесь поглощение ультрафиолетового света аминокислотами, пептидами и белками слабое. Поэтому, измеряя абсорбцию в этом диапазоне длин волн, исследовали кинетические превращения N6-хлораденозинфосфата в присутствии исследуемых серосодержащих соединений.

Химическая активность N6-хлораденозинфосфата по отношению к серосодержащим соединениям. Важнейшая количественная характеристика активности N6-хлораденозинфосфата как химического модификатора — константа скорости соответствующей реакции. В работе спектрофотометрическим методом измеряли кинетические кривые реакций после быстрого смешивания реагирующих соединений. Метод позволял регистрировать в течение порядка десяти секунд количество оставшихся исходных соединений. В целом процедура определения констант скоростей состояла в следующем. В кювете (толщиной 1 см) спектрофотометра быстро смешивали равные объемы растворов исследуемых соединений и после этого измеряли зависимость величины абсорбции хлорамина от времени. Измерения повторяли не менее пяти раз с изменением начальной концентрации реагирующих соединений. Длины волн также изменяли с расчетом зарегистрировать убыль хлорамина в области минимального поглощения исследуемых серосодержащих соединений, как это показано в качестве примера для реакции N6-хлораденозинфосфата с сывороточным альбумином (рис. 2) и восстановленным глутатионом (рис. 3).

Отсчеты величин абсорбции проводили через 0.0125 с, а в случае медленных процессов — через 1 с. Константу скорости находили путем сравнения экспериментальной кинетической кривой убыли абсорбции с расчетной кривой. Уравнение расчетной кривой убыли хлораминов в своей основе представляет собой кинетическое уравнение

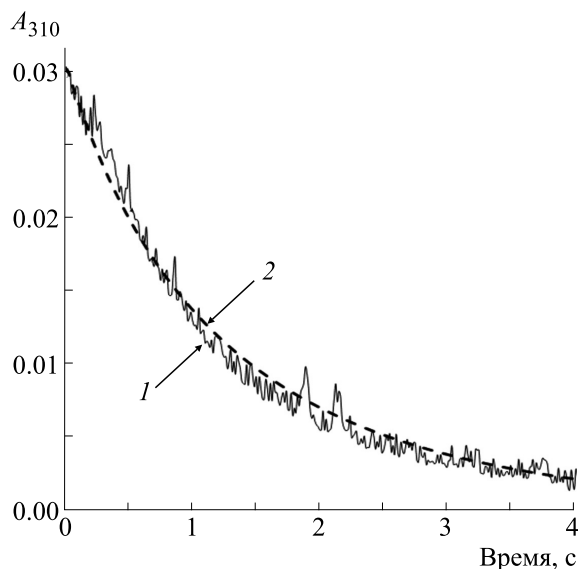


Рис. 2. Экспериментальная (1) и расчетная (пунктирная линия 2) кинетические кривые абсорбции (A_{310}) смеси N6-хлораденозинмонофосфата (14 мкМ) с бычьим сывороточным альбумином (34 мкМ) в фосфатном буфере, pH 7.4.

бимолекулярной реакции второго порядка, в которое введена величина абсорбции (A).

$$A = A_0 - A_0 (\exp(k(C_a - C_s)t) - 1) / ((C_a/C_s) \exp(k(C_a - C_s)t) - 1).$$

В этом уравнении A_0 и A — абсорбция в начальный момент (первый отсчет по окончании смешивания) и в данное время t ; k — константа скорости реакции; C_a и C_s — концентрации хлорамина и серосодержащего соединения в начальный момент.

Концентрации C_a и C_s вследствие протекания взаимодействия в период смешивания несколько меньше тех, которые были до смешивания. Величину C_a находили по значениям молярного коэффициента поглощения и измеряемой величины A_0 в начальный момент. Значение C_s — разность концентрации до смешивания и величины, на которую она уменьшается в период смешивания. Благодаря описанной процедуре и использованию исходно низких концентраций удавалось определять сравнительно высокие константы скорости.

Процедура нахождения реальной константы включала расчет семейства зависимостей абсорбции от времени при разных значениях k . Искомой константой скорости считали то значение, при котором расчетная зависимость была близка к экспериментальной; отличие составляло не более нескольких процентов (рис. 2, кривая 2).

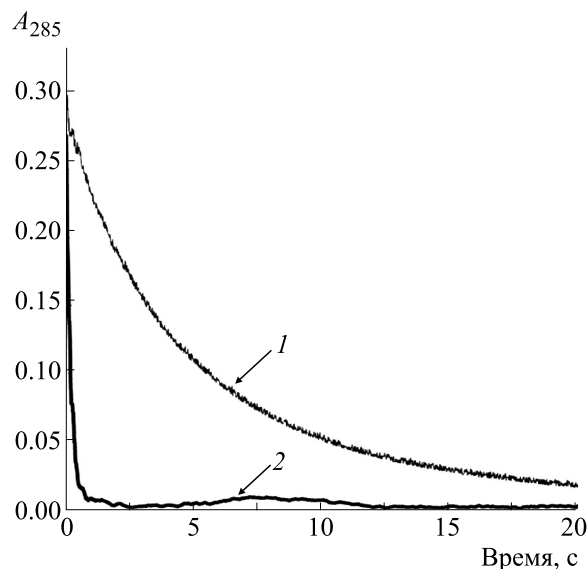


Рис. 3. Кинетические кривые абсорбции (A_{285}) смеси N6-хлораденозинмонофосфата (37 мкМ) с восстановленным глутатионом (87 мкМ) в фосфатном буфере при pH 7.4 (1) и pH 5.4 (2).

Реакция между N6-хлораденозинфосфатом и большинством изучаемых тиолов протекает с высокой скоростью, так что измерить кинетику его превращения при физиологических значениях pH не удавалось. Однако она резко замедляется в кислой среде (рис. 3). Известно, что взаимодействие хлораминовых соединений непосредственно происходит с анионом сульфгидрильной группы тиолов ($R-S^-$) [15, 16]. Поэтому вначале экспериментально измеряли константу скорости в кислой среде (pH 5.4) и затем ее умножали на отношение концентрации формы $R-S^-$ при pH 7.4 к ее концентрации в кислой среде. Расчет этого отношения проводили на основе уравнения Гендерсона—Хассельбаха и литературных данных о pK_a сульфгидрильных групп [17, 18]. Полученные данные приведены в таблице. Интересно, что при значении pH 7.4 константа скорости реакции N6-хлораденозинфосфата с цистеином по сравнению с восстановленным глутатионом, N-ацетилцистеином и сывороточным альбумином выше соответственно в 5, 24 и 50 раз (таблица). Такое отличие в величинах констант обусловлено в основном разницей в степени диссоциации сульфгидрильной группы этих соединений.

При изучении реакций с метионином, остатками метионина в фибриногене, дисульфидным мостиком в окисленном глутатионе константу скорости находили по начальной скорости убыли N6-хлораденозинфосфата. Начальный участок снижения абсорбции (в пределах не более 5%) имеет линейную зависимость от времени. Угло-

Константы скорости реакции N6-хлораденозинмонофосфата с тиольными соединениями

Константа скорости реакции второго порядка ($M^{-1} s^{-1}$)			
N-Ацетилцистеин	Глутатион восстановленный	Цистеин	*Сывороточный альбумин быка
$(5.80 \pm 0.66) \times 10^4$	$(2.40 \pm 0.19) \times 10^5$	$(1.20 \pm 0.23) \times 10^6$	$(2.04 \pm 0.52) \times 10^4$

Примечание. Константы получены для значения pH 7.4 (с использованием pK_a тиолов, см. текст). При пересчете использованы значения pK_a тиолов (в порядке слева направо): 9.52 [17], 8.66 [18], 8.33 [17]. * — Измерения проведены в фосфатном буфере, pH 7.4.

вой коэффициент этой зависимости равен $k\epsilon C_a C_s$. Отсюда, зная исходные концентрации хлорамина (C_a), субстрата (C_s) и молярный коэффициент поглощения (ϵ), получали значение константы скорости.

Установлено, что N6-хлораденозинфосфат модифицирует дисульфид- и сульфидсодержащие соединения гораздо медленнее, чем тиольные. Константа скорости реакции с окисленным глутатионом, метионином и фибриногеном составляет соответственно 0.23 ± 0.066 , 1.4 ± 0.09 и $27.7 \pm 1.60 M^{-1} s^{-1}$. Таким образом, хлораминовое производное АМФ характеризуется повышенной реакционной способностью по отношению к сульфгидрильной группе в биологически значимых серосодержащих соединениях.

Антиагрегантное действие на тромбоциты N6-хлораденозинфосфата. Известно, что внутриарте-

риальное тромбообразование начинается с активации тромбоцитов, которая в большинстве случаев заключается во взаимодействии молекул коллагена поврежденной атеросклеротической бляшки со специфическими рецепторами. В дальнейшем процесс активации усиливается за счет агониста АДФ, действующего на поверхностные пуриновые рецепторы $P2Y_1$ и $P2Y_{12}$ тромбоцита. Пуриновые рецепторы — перспективные мишени при разработке новых антиагрегантных препаратов, блокирующих их активность. Мы исследовали антиагрегантное действие на тромбоциты N6-хлораденозинфосфата в сравнении с АМФ. В работе других авторов [19] показано, что АМФ сам по себе (без активного хлора) в высоких концентрациях (0.1–3.0 мМ) за счет активации аденозинового рецептора A_{2a} ингибирует аллостерически функции тромбоцитов человека, в том числе агрегацию. На модели тромбоза у животных также показано, что АМФ ингибирует образование тромбов *in vivo*. В наших экспериментах N6-хлораденозинфосфат в сравнительно низкой концентрации, начиная с 50 мкМ, значительно ослабляет агрегацию тромбоцитов в ОТП: уменьшаются начальная скорость агрегации и максимальная степень агрегации. На рис. 4 представлены типичные кинетические кривые АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов в ОТП в контроле (кривая 1) и после введения АМФ и его N-хлорпроизводного (кривые 2 и 3).

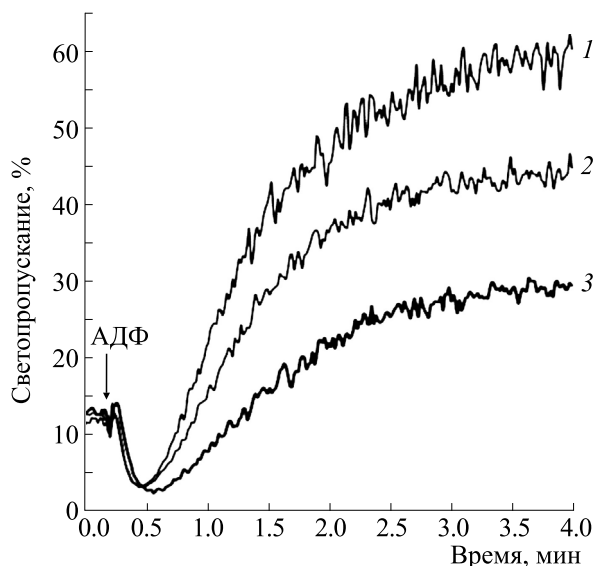


Рис. 4. Типичные кинетические кривые агрегации тромбоцитов в составе обогащенной тромбоцитами плазмы в контроле (1), при действии 100 мкМ АМФ (2) и N6-хлораденозинмонофосфата (3). Стрелкой указан момент введения агониста АДФ (10 мкМ).

Мы сравнили эффективность влияния на тромбоциты N6-хлораденозинфосфата и АМФ, во-первых, измеряя уменьшение начальной скорости агрегации. N6-Хлораденозинфосфат в концентрациях 50, 150 и 250 мкМ снижал начальную скорость с $35.0 \pm 3.1 s^{-1}$ (в контроле) соответственно до 30.0 ± 1.5 , 22.0 ± 3.6 и $18.0 \pm 0.2 s^{-1}$. В случае действия АМФ начальная скорость при указанных концентрациях составляла соответственно 35.0 ± 3.1 , 27.0 ± 3.2 , $24.0 \pm 1.5 s^{-1}$. Вся совокупность данных свидетельствует, что хлораминовое производное АМФ определенно проявляет более высокую ингибирующую способность

($p < 0.009$, парный двух выборочного t -теста для средних значений).

Во-вторых, мы определяли ингибирование максимальной агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ. Под действием N6-хлораденозинфосфата в концентрации 50, 100, 150 и 300 мкМ степень агрегации снижалась соответственно на 25 ± 6 , 48 ± 7 , 51 ± 14 и $70 \pm 8\%$ от контроля; концентрация полумаксимального снижения степени агрегации (IC_{50}) составляла приблизительно 100 мкМ. АМФ в такой концентрации (100 мкМ) вызывал снижение агрегации тромбоцитов лишь на 25–30%, а величина IC_{50} , согласно концентрационным зависимостям (данные не приведены), достигает приблизительно 300 мкМ. Этот результат хорошо согласуется с литературными данными о действии АМФ на тромбоциты человека: величина IC_{50} для АДФ-индуцированной агрегации составляет 280 мкМ [19].

Интересно, что N6-хлораденозинфосфат гораздо сильнее ингибирует тромбоциты в изолированном состоянии (суспензия клеток в физиологическом растворе), чем в составе ОТП. Степень агрегации изолированных тромбоцитов в присутствии N6-хлораденозинфосфата в концентрации 5, 10 и 25 мкМ снижалась соответственно на 22 ± 12 , 55 ± 9 и $95.0 \pm 0.1\%$. Таким образом, в случае изолированных тромбоцитов концентрация полумаксимального ингибирования агрегации составила приблизительно 10 мкМ. АМФ в диапазоне концентраций 10–50 мкМ не оказывал антиагрегационного действия на тромбоциты. Сильное различие действующих концентраций N6-хлораденозинфосфата в составе ОТП и суспензии изолированных тромбоцитов, скорее всего, обусловлено протеканием в ОТП дополнительной реакции хлорамина АМФ с сывороточным альбумином, конкурирующей с взаимодействием с тромбоцитами.

Для объяснения усиленного ингибирующего действия N6-хлораденозинфосфата на агрегацию тромбоцитов по сравнению с АМФ важны сведения о структурных особенностях аденозинового рецептора A_{2A} . Согласно данным рентгеноструктурного анализа [20], в этом рецепторе вблизи места связывания агониста имеется сульфгидрильная группа. Можно предполагать, что N6-хлораденозинфосфат не только связывается с аденозиновым рецептором подобно АМФ, но и при этом ковалентно (химически) модифицирует его сульфгидрильную группу; в результате происходит структурная перестройка рецептора, стабилизирующая его в определенной конфигурации активного состояния. Все это обеспечивает усиленное аллостерическое подавление экспрессии рецептора АДФ P_2Y_1 .

Таким образом, разработана технология получения устойчивого хлораминового производного АМФ, выяснены его оптические характеристики. Установлено, что спектр поглощения N6-хлораденозинфосфата сдвинут на 5 нм в длинноволновую область по сравнению с исходным соединением – АМФ. Определены молярные коэффициенты поглощения N6-хлораденозинфосфата при длинах волн 285, 290, 300 и 310 нм, которые составили соответственно 6889 ± 155 , 5228 ± 211 , 3185 ± 107 и $2020 \pm 86 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Исследована химическая модифицирующая способность N6-хлораденозинфосфата по отношению к серосодержащим соединениям. Благодаря методическому приему, который предусматривает первоначальное определение константы скорости реакции в кислой среде и последующий пересчет для физиологического значения pH, определены высокие константы скорости реакции с сульфгидрильными группами ряда соединений. Способность N6-хлораденозинфосфата модифицировать тиольные соединения варьирует в широких пределах: разница в величинах констант скоростей окисления сульфгидрильной группы (цистеина, восстановленного глутатиона, N-ацетилцистеина) составляет более одного порядка. Определена, в частности, константа скорости N6-хлораденозинфосфата с сульфгидрильной группой глутатиона, которая составляет $240000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Такая высокая константа может обеспечить эффективную модификацию рецептора в тромбоцитах, содержащего доступный свободный остаток цистеина.

Установлено, что N6-хлораденозинфосфат сильно ослабляет АДФ-индуцированную агрегацию изолированных тромбоцитов и тромбоцитов в составе ОТП. Можно полагать, что это обусловлено не только связыванием и активацией аденозинового рецептора A_{2A} , как это характерно для АМФ, но и дополнительной химической модификацией его серосодержащих групп.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-04-00532).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы

были соблюдены. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. C. C. Winterbourn, A. J. Kettle, and M. B. Hampton, *Annu. Rev. Biochem.* **85**, 765 (2016).
2. M. Gruber, I. Moser, M. Nagl, et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, e02527-16 (2017).
3. M. A. Murina, D. I. Roshchupkin, N. N. Kravchenko, et al., *Biophysics* **42**, 1311 (1997).
4. T. W. Stief, U. Feek, and A. Ramaswamy, *Thromb. Res.* **104**, 361 (2001).
5. Д. И. Рошчупкин, М. А. Мурина, Н. Н. Кравченко и др., *Биофизика* **52** (3), 527 (2007).
6. A. V. Peskin and C. C. Winterbourn, *Free Radic. Biol. Med.* **30**, 572 (2001).
7. D. I. Roshchupkin, K. V. Kondrashova, and M. A. Murina, *Biophysics* **59**, 849 (2014).
8. P. Schmidt, L. Ritscher, E. N. Dong, et al., *Mol. Pharmacol.* **83**, 256 (2013).
9. W. A. Prutz, *Arch. Biochem. Biophys.* **332** (1), 110 (1996).
10. T. K. Bills, J. B. Smith, and M. J. Silver, *J. Clin. Invest.* **60**, 1 (1977).
11. M. A. Murina, E. L. Savel'eva, and D. I. Roshchupkin, *Biophysics* **51** (2), 258 (2006).
12. C. Pastoriza, J. M. Antelo, and J. Crujeiras, *J. Phys. Org. Chem.* **27**, 952 (2014).
13. M. Ikehara, Y. Ogiso, and N. Maruyama, *Chem. Pharm. Bull.* **25**, 575 (1977).
14. P. Calvo, J. Crugerias, A. Rios, et al., *J. Org. Chem.* **72**, 3171 (2007).
15. M.-H. Chau and J. W. Nelson, *FEBS Lett.* **291**, 296 (1991).
16. D. I. Roshchupkin, V. L. Sorokin, G. N. Semenkova, et al., *Biophysics* **64**, 145 (2019).
17. A. Altomare, G. Baron, and M. Brioschi, *Antioxidants (Basel)* **9**, 367 (2020).
18. Y. Samunia, S. Goldstein, and O. M. Dean, *Biochim. Biophys. Acta* **1830**, 4117 (2013).
19. E. Fuentes, L. Badimon, and J. Caballero, *Thromb. Haemost.* **111**, 491 (2014).
20. G. Lebon, T. Warne, P. C. Edwards, et al., *Nature* **474**, 521 (2011).

Antiplatelet Effect and Chemical Nature of N6-Chloroadenosine Phosphate

M.A. Murina*, D.I. Roshchupkin*, **, and V.I. Sergienko*

*Federal Research and Clinical Centre of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency of the Russian Federation, Malaya Pirogovskaya ul. 1a, Moscow, 119435 Russia

** Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, ul. Ostrovityanova 1a, Moscow, 117997 Russia

A technology has been developed for the preparation of novel chloramine compounds related to adenosine derivatives. Optical absorption characteristics of N6-chloroadenosine-5'-phosphate (chloramine derivative of AMP) have been elucidated. In particular, it was shown that this compound absorbs light with wavelengths covering a range from 220 to 340 nm, the absorption maximum wavelength is 265 nm and the minimum absorption is at 233 nm. The ability of N6-chloroadenosine phosphate to modify biologically significant compounds that contain the sulfhydryl (serum albumin) or sulfide (methionine residues in fibrinogen) functional groups has been studied. The quantitative indicator of this ability was the reaction rate constant. Spectrophotometer was used for recording the kinetic curve data on chloramine consumption after rapid mixing with sulfur-containing substrates and the rate constants were then calculated using a theoretical kinetic equation for bimolecular reactions. N6-chloroadenosine phosphate reacts very rapidly with thiol compounds; rate constants for the reactions of N6-chloroadenosine phosphate with serum albumin, N-acetylcysteine, reduced glutathione, cysteine (pH 7.4) reach 24000, 58000, 240000, 1200000 M⁻¹ s⁻¹, respectively. The difference in the rate constant values is mainly due to the difference in the degree of dissociation of sulfhydryl groups. The rate constants for the reactions of N6-chloroadenosine phosphate with methionine, fibrinogen, and oxidized glutathione are 1.4 ± 0.09 M⁻¹ s⁻¹, 28 ± 1.6 M⁻¹ s⁻¹, and 0.230 ± 0.066 M⁻¹ s⁻¹, respectively. Thus, the chloramine derivative of AMP is characterized by increased reactivity towards the sulfhydryl group. It was found that N6-chloroadenosine phosphate effectively inhibits ADP-induced aggregation of isolated platelets and platelets in platelet-rich blood plasma.

Keywords: chloramine derivative of AMP, spectrophotometry, sulfur-containing compounds, rate constant, platelet, antiplatelet agent