Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт проблем химической физики Российской академии наук

на правах рукописи

ПОКИДОВА Олеся Викторовна

Особенности распада нитрозильных комплексов железа структурного “μ-S” и “μ-N-C-S” типа в различных растворителях. Их взаимодействие с глутатионом и гемопротеидами

02.00.04 – физическая химия, химические науки

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени

кандидата химических наук

Научный руководитель

профессор, доктор физ.-мат. наук

А. И. Котельников

Черноголовка 2017

Содержание

ВВЕДЕНИЕ **4**

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР **10**

1.1 Радикал оксид азота: физико-химические и биологические свойства 10

1.1.1 Физические и химические особенности NO, лежащие в основе его биологических функций *10*

1.1.2 Биосинтез NO *13*

1.1.3 Доноры NO *14*

1.2 Нитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами: физико-химические характеристики и противоопухолевая активность 18

1.2.1 Биологическая активность НКЖ *29*

1.3 Гемопротеиды как депо NO в организме 32

1.3.1 Гемоглобин и его железо-нитрозильный комплекс. Их структура, свойства и биологическая роль *32*

1.3.2 Цитохром С и его железо-нитрозильный комплекс. Их структура, свойства и биологическая роль *39*

1.4 О роли GSH 45

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ **47**

ГЛАВА 3. РАСПАД КАТИОННЫХ НКЖ СТРУКТУРНОГО "μ-S" ТИПА В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ И В ДМСО. МОНОЯДЕРНАЯ И БИЯДЕРНАЯ ФОРМЫ НКЖ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕДОКС-ПОТЕНЦИАЛА НКЖ **58**

3.1 Распад катионных НКЖ в водных растворах 59

3.1.1 Анализ количества NO, выделяющегося при распаде катионных НКЖ, с помощью сенсорного электрода *59*

3.1.2 Исследование распада НКЖ методом спектрофотометрии *61*

3.2 Зависимость пути распада НКЖ от его редокс-потенциала 65

3.3 Влияние ДМСО на распад катионных НКЖ 68

ГЛАВА 4. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КАТИОННЫХ НКЖ СТРУКТУРНОГО "μ-S" ТИПА С БИОЛОГИЧЕСКИМИ ОБЪЕКТАМИ **74**

4.1 Взаимодействие НКЖ с Hb и Cyt C как метод исследования NO-донорной активности состава и концентрации реакционной системы 74

4.1.1 Взаимодействие НКЖ с Hb *74*

4.1.2 Взаимодействие НКЖ с Cyt C *84*

4.2 Взаимодействие НКЖ с GSH 92

ГЛАВА 5. РАСПАД НЕЙТРАЛЬНЫХ НКЖ СТРУКТУРНОГО “μ-S” И “μ-N-C-S” ТИПА В РАЗЛИЧНЫХ РАСТВОРИТЕЛЯХ. ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С GSH 100

5.1 Особенности распада Ph и AmPh в ДМСО и Трис-HCl буфере. Обмен тиолатных лигандов на GSH 101

5.2 Распад BTz в различных растворителях и влияние GSH на этот процесс 109

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 113

ВЫВОДЫ 114

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ 116

ПРЕДСТАВЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ 117

БЛАГОДАРНОСТИ 121

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ 122

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Многочисленными исследованиями последних 20 лет установлено, что монооксид азота (NO) является важным полифункциональным агентом биорегуляции разнообразных физиологических процессов *in vivo* [1, 2], включая регуляцию кровяного давления, ингибирование агрегации тромбоцитов, нейротрансмиссию и цитотоксическое действие макрофагов. Использование в клинике препаратов, представляющих собой экзогенные доноры NO, например, органических нитратов и нитритов, имеет существенные недостатки, связанные с развитием толерантности, необходимостью дополнительной активации и т.д. [3]. В связи с этим современное развитие биохимии и медицины направлено на поиск и изучение соединений, являющихся основой для лекарственных препаратов нового поколения, которые будут иметь минимум отмеченных недостатков и эффективно доставлять NO к биологическим мишеням при физиологических значениях pH [4].

Синтезированные в Институте проблем химической физики РАН модели активных центров негемовых железосерных белков - нитрозильные комплексы железа (НКЖ) с функциональными серосодержащими лигандами - генерируют NO в водном растворе самопроизвольно и являются перспективными пролекарствами нового поколения [5, 6]. НКЖ являются веществами с двойственным лекарственным действием, обусловленным, с одной стороны, биологически активными тиолами, с другой стороны – выделяющимся монооксидом азота. Они показали хорошую противоопухолевую и кардиологическую активность в предклинических испытаниях [7–11]. Актуальными задачами, во многом определяющими дальнейшее применение НКЖ в качестве лекарств, являются: исследование механизмов их трансформации в растворе, а также изучение их взаимодействия с биологическими субстратами *in vitro* и *in vivo*.

В работах, выполненных в ИПХФ РАН [12, 13], было установлено, что НКЖ нитрозилируют гемоглобин (Hb). Это обеспечивает не только форму хранения NO, но и определяет пролонгированность действия данных НКЖ как доноров NO. Кроме Hb, образовывать достаточно прочные нитрозильные комплексы может цитохром с (Cyt C). Реакции NO с Cyt C имеют большое значение для функционирования дыхательной цепи митохондрий и регуляции процесса апоптоза [14]. На основании вышеизложенного следует, что образование нитрозильных комплексов Cyt C и Hb может влиять в широких пределах на процессы метаболизма и в результате определять различные свойства НКЖ как лекарств.

В качестве объекта исследования взаимодействия с НКЖ, помимо Hb и Cyt C, представлялось интересным рассмотреть глутатион (GSH), который является самым распространенным небелковым тиолом в клетках. Глутатионилирование белка p53, предположительно, препятствует тетрамеризации p53 и поэтому подавляет его ДНК-связывающую активность [15]. Новейшие подходы к лечению рака базируются на необходимости уменьшения концентрации GSH в злокачественных опухолевых клетках. Поэтому для дизайна новых соединений этого перспективного класса доноров NO представляется важным исследование способности НКЖ к взаимодействию с GSH, в том числе к обмену своих функциональных тиолатных лигандов на GSH, то есть способности НКЖ «убирать» GSH из среды.

Цель и задачи исследования.

Целью работы является исследование процесса распада нитрозильных комплексов железа (НКЖ) структурного “μ-S” и “μ-N-C-S” типа в различных растворителях, а также изучение их взаимодействия с глутатионом и гемопротеидами (Hb и Cyt C).

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Исследовать процесс распада НКЖ структурного “μ-S” и “μ-N-C-S” типа в различных растворителях с помощью современных физико-химических методов.

2. Исследовать влияние редокс-потенциала НКЖ на путь распада НКЖ.

3. Изучить кинетику выделения NO при взаимодействии катионных НКЖ с Hb.

4. Изучить кинетику реакции нитрозилирования Cyt C^{2+} и Cyt C^{3+} катионными НКЖ структурного “μ-S” типа.

5. Исследовать реакцию обмена тиолатных лигандов на GSH в НКЖ структурного “μ-S” типа и изучить влияние GSH на процесс распада НКЖ структурного “μ-N-C-S” типа.

Научная новизна работы

- Впервые доказано, что в водном растворе при распаде катионных НКЖ структурного “μ-S” типа обратимо выделяются не только NO, но и оба тиолатных лиганда.
- Установлено, что в ДМСО процесс распада катионных НКЖ структурного “μ-S” типа сопровождается образованием моноядерной формы.
- Показано, что в присутствии GSH в комплексах НКЖ структурного “μ-S” типа происходит замещение тиолатных лигандов на GSH: в катионных НКЖ замещаются оба лигадна, в нейтральных - один; в то же время в нейтральных НКЖ структурного “μ-N-C-S” типа обмена лигадами не происходит.
- Обнаружен ранее неизвестный эффект стабилизации катионных НКЖ структурного “μ-S” типа гемоглобином.
- На примере катионных НКЖ изучена реакция нитрозилирования Cyt C^{2+} в кислой среде и Cyt C^{3+} в нейтральной среде в присутствии $K_3[Fe(CN)_6]$.

Теоретическая и практическая значимость работы.

В работе изучены особенности процесса распада катионных НКЖ структурного “μ-S” типа и нейтральных НКЖ “μ-S” и “μ-N-C-S” типа в водных растворах и взаимодействие данных НКЖ с отдельными компонентами биологической среды (Hb, Cyt C и GSH), что имеет большое практическое значение при дальнейшем исследовании комплексов *in vivo*. Предположено, что противоопухолевая активность НКЖ структурного “μ-S” типа обусловлена не только их NO-донорной активностью, но также и их способностью обменивать тиолатные лиганды на GSH, то есть «убирать» GSH из среды. Также на примере катионных НКЖ показано, что их NO-донорная способность зависит не только от строения, но и от присутствия биологических объектов (Hb стабилизирует данные НКЖ). Поэтому в дальнейшем для дизайна новых соединений этого перспективного класса доноров NO представляется важным изучить способность НКЖ к обмену функциональных тиолатных лигандов на GSH и исследовать их NO-донорную активность в присутствии различных биологических объектов.

Методология и методы исследования.

Работа была выполнена с использованием современных физико-химических методов анализа (абсорбционная UV-VIS спектроскопия, масс-спектрометрия, ЭПР-спектроскопия, ЯМР-спектроскопия, сенсорные электроды amiNO-700 и amiNO -2000 системы «inNO Nitric Oxide Measuring System»). Спектры поглощения раскладывали на составляющие с помощью программы MathCad. Для кинетического моделирования рассматривали предполагаемые схемы реакций и на основе численного решения соответствующих систем дифференциальных уравнений, используя метод наименьших квадратов, находили значения констант их скорости. Для квантово-химических расчетов использовали программу Gaussian 09 (версия D). Анализ зарядового состояния поверхности Hb проводили с помощью программы PyMOL.

Положения, выносимые на защиту.

1. Процесс распада биядерных НКЖ структурного “μ-S” типа зависит от их редокс-потенциала и типа растворителя. В водном растворе буфера биядерные катионные НКЖ, в отличие от нейтральных, не претерпевают стадию окисления (так как их E_0>-0.8 В) и обратимо выделяют как NO, так и тиолатные лиганды. В ДМСО их распад сопровождается образованием моноядерных НКЖ.

2. В НКЖ структурного “μ-S” типа тиолатные лиганды обмениваются на GSH. В НКЖ структурного “μ-N-C-S” типа такого обмена не происходит.

3. Гемоглобин стабилизирует катионные НКЖ структурного “μ-S” типа. В его присутствии они становятся более пролонгированными донорами NO.

4. Изучена кинетика реакции нитрозилирования обеих форм Cyt C катионными НКЖ.

Апробация результатов работы. Основные результаты работы были представлены на XVIII, XXI, XXII Международных конференциях и дискуссионных научных клубах «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии экологии» (Украина-Россия, Ялта-Гурзуф, 31 мая -10 июня 2010 г., 5-15 июня 2013 г., 2-12 июня 2014 г.), XXVIII, XXXI, XXXII, XXXIV Всероссийских школах-симпозиумах молодых учёных по химической кинетике (пансионат Березки, 15-18 октября 2010 г., 18-21 ноября 2013 г., 17-20 ноября 2014 г., 14-17 ноября 2016 г.), Первой Российской конференции по медицинской химии (MedChem Russia-2013) с международным участием (Москва, 8-12 сентября 2013 г.), VIII Всероссийской конференции с международным участием молодых ученых по химии "Менделеев-2014" (Санкт-Петербург, 1-4 апреля 2014 г.), IX Международной конференции молодых ученых по химии "Менделеев-2015" (Санкт-Петербург, 7-10 апреля 2015 г.), 21-ой международной Пущинской школе-конференции молодых учёных "биология - наука 21 века" (Пущино, 17-21 апреля 2017 г.)

Личный вклад автора.

Автор принимал непосредственное участие в выборе темы, формулировании целей и задач, планировании экспериментов и обсуждении результатов исследований. Представленные в работе результаты получены лично автором или при его участии. Написание диссертации и анализ литературы выполнены автором лично. Исследование оптических свойств НКЖ с использованием спектроскопии в УФ-видимой области и обработка экспериментальных данных проведены лично автором. Анализ процессов распада НКЖ методом кинетического моделирования и расчет констант скоростей реакций выполнены д.х.н. Психой Б.Л., электрохимическое определение концентрации NO проведено совместно с к.х.н. Рудневой Т.Н., ЭПР-спектры были получены д.ф.-м.н. Куликовым А.В., масс-спектры – инж. Кабачковым Е.Н., ЯМР-спектры - к.х.н. Черняком А.В., квантово-химический анализ продуктов распада НКЖ и обмена лигандами – к.х.н. Емельяновой Н.С., анализ электростатических зарядов на поверхности Hb проведен Тухватуллиным И.А.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 17 научных работ. Из них 5 - в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК, 1 - в других журналах, 11 - в сборниках тезисов и трудах конференций.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы (глава 1), описания материалов и методов исследования (глава 2), изложения исследований автора (главы 3-5), заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 141 страницах машинописного текста, содержит 46 рисунков, 5 схем и 11 таблиц.

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Института проблем химической физики РАН при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (Грант № 13-03-00549).

ГЛАВА 1.
ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Радикал оксид азота: физико-химические и биологические свойства

Первое упоминание об оксиде азота (NO) датируется 1772 годом. Действуя разбавленной азотной кислотой на медь, Джозеф Пристли получил NO и назвал его «селитярным воздухом» [16]. NO считался токсичным газом вплоть до конца XX, когда было показано, что он образуется естественным путем в организме и участвует в реализации многих важных физиологических функций, таких как вазодилатация, регуляция тонуса гладких мышц, и др., а также некоторых патологических процессов [17–19].

Одним из важных научных достижений, повлиявших на современное представление о роли оксида азота в организме, является открытие Ферчготтом и Завадски фактора, который образуется в эндотелии и вызывает расслабление гладкой мускулатуры сосудов - эндотелиальный фактор расслабления сосудов («endothelium-derived relaxing factor», EDRF) [20]. Уже к началу 90-х годов после тщательного изучения свойств данного фактора были высказаны предположения о том, что в его состав входит молекула NO [21]. В 1992 году благодаря огромной роли в различных биологических процессах в организме молекула NO была названа Молекулой Года. А в 1998 году Роберту Ферчготту, Фериду Мьюрэду и Луису Игнарро за открытие сигнальной регуляторной роли NO в функционировании сердечнососудистой системы была присуждена Нобелевская премия в области физиологии и медицины.

1.1.1 Физические и химические особенности NO, лежащие в основе его биологических функций

NO представляет собой бесцветный газ, умеренно растворимый в воде (1.9 мкМ при 25 ^{o}C) [22]. NO имеет неспаренный электрон на высшей занятой π^*-разрыхляющей молекулярной орбитали (рисунок 1), за счет чего

является крайне реакционноспособной короткоживущей молекулой, среднее время жизни которой в биологических тканях составляет 3-6 с [23].

В водной среде NO легко окисляется растворенным в воде кислородом, в результате чего превращается в нитрит-анион [24]. В различных биологических системах NO окисляется/ восстанавливается с последующим превращением во множество реактивных форм азота (RNS) [25]. NO может вступать в реакцию с молекулярным кислородом (O_2), супероксид анионом ($O_2^{-\bullet}$) или переходными металлами (M) с образованием RNS, таких как N_2O_3, NO_2, NO_2^-, NO_3^-, пероксинитрита ($OONO^-$) и металл-нитрозильных производных (схема 1, путь A). NO также может быстро окисляться кислородом, супероксидом или переходными металлами до нитрозония (NO^+), который далее вступает в реакцию с нуклеофильными центрами, такими как ROH, RSH и RR'NH с образованием RO-NO, RS-NO или RR'N-NO, соответственно (схема 1, путь B). Кроме того, NO может восстанавливаться до нитроксильного аниона (NO^-) (схема 1, путь C). Редокс-потенциал данной реакции -0.8 (±0.2) В [26]. В физиологических условиях NO^- быстро превращается в N_2O. Другие конкурирующие реакции NO^-: образование NH_2OH при взаимодействии с тиоловыми группами (синглетный NO^-) и образование $OONO^-$ в реакции с кислородом (триплетный NO^-).

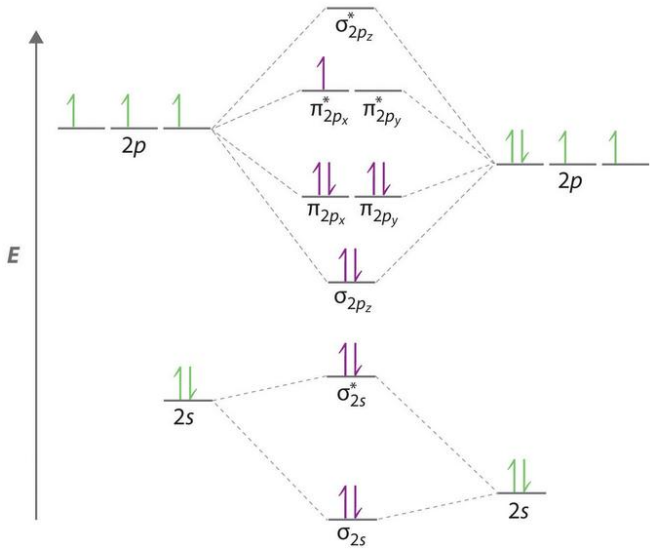


Рисунок 1 - Диаграмма молекулярных орбиталей NO

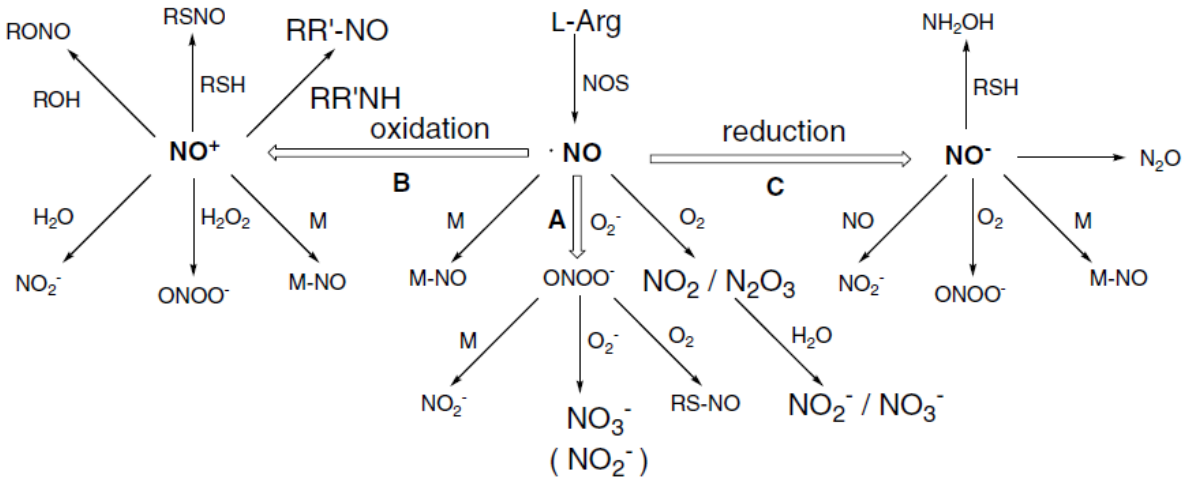


Схема 1 - Реакции, ведущие к образованию реактивных форм NO.

Благодаря высокой липофильности и низкой молекулярной массе NO обладает высокой диффузионной способностью. Он легко проникает в клетки, находящиеся на расстоянии не более 200 мкм от места его образования [27]. Таким образом, за счет высокой диффузионной и реакционной способности, NO выполняет функцию сигнальной молекулы и через каскад биологических реакций обеспечивает регуляцию различных физиологических процессов. Все многообразие биологических эффектов NO можно разделить на три типа: регуляторное, защитное и повреждающее действие. Так, например, NO обеспечивает выделение нейромедиаторов в центральной нервной системе, регулирует тонус сосудов, тормозит агрегацию тромбоцитов и адгезию нейтрофилов, вызывает бронходилатацию, снимает бронхоспазм и способствует улучшению газообмена при физической нагрузке, гипоксии и т.д. [28].

Но NO может оказывать также и существенное отрицательное действие, приводящее к различным патологиям. Главным фактором, который определяет его биологические эффекты, является его концентрация [29]. Положительное действие NO оказывает при концентрациях в несколько микромолей на 1 кг ткани, а при больших концентрациях проявляется цитотоксическое или цитостатическое действие за счет образования пероксинитрита [29].

1.1.2 Биосинтез NO

Существует два пути синтеза NO в организме человека: ферментативный и неферментативный [14, 30].

При ферментативном синтезе NO образуется в реакции окисления аминогруппы L-аргинина (Arg) (рисунок 2) с помощью фермента нитрооксидсинтазы (NO-синтазы, или NOS) [31]. Arg после окисления превращается в цитруллин [32], который затем вновь восстанавливается в цикле мочевины до Arg [33]. Эта реакция катализируется гем-содержащим ферментом - NO-синтазой (NOS) и протекает в присутствии NADPH, тетрагидробиоптерина (BH_4), FAD и FMN в качестве кофакторов. NOS представлена в организме несколькими изоформами: эндотелиальной (eNOS) – локализуется в эндотелии сосудов; нейрональной (nNOS) – присутствует в мозговых нейронах; индуцибельной (iNOS) – встречается в клетках иммунной системы [34].

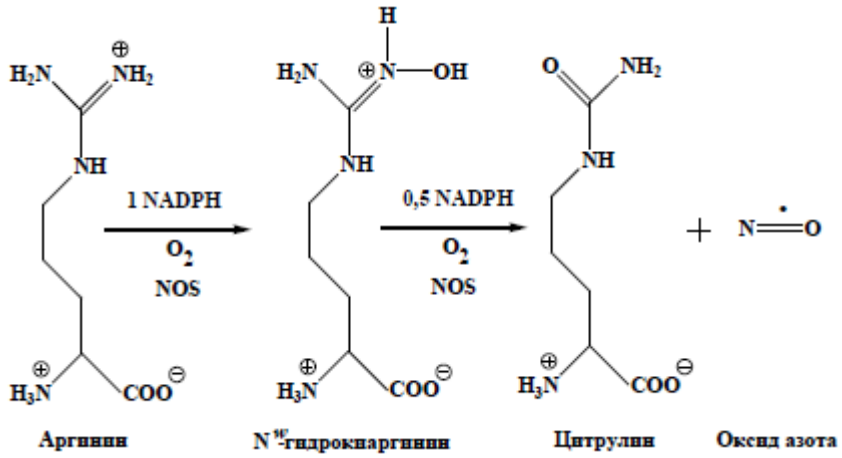


Рисунок 2 - Схема синтеза NO в организме из Arg.

eNOS и nNOS – конститутивные формы, они находятся в клетках постоянно. Уровень активности данных форм зависит от внутриклеточной концентрации кальция и белка кальмодулина, который транспортирует кальций, поэтому такие формы NOS являются кальций-кальмодулинзависимыми [32, 35, 36]. Индуцибельная форма (iNOS)

синтезируется во многих тканях только в ответ на бактериальные и вирусные инфекции и при физических нагрузках [31]. Эта форма фермента не является кальций-кальмодулинзависимой.

При неферментативном синтезе NO образуется восстановлением из нитритов [14, 37]. Данная реакция протекает либо как диспропорционирование HNO_2 или нитрита при закислении среды (при pH<6, в состоянии ишемии или при воспалении [38]), либо как прямое восстановление нитрита (например, ионами железа). Также следует указать реакции восстановления нитритов в NO под действием гемсодержащих белков, таких как Hb, миоглобин, цитохромоксидаза [39], по схеме, предложенной в работе [40]:

$Hb + NO_2^- + 2H^+ \rightarrow metHb + NO + H_2O$.

Кроме того, образование NO возможно за счет реакции Arg с H_2O_2 [41].

Неферментативный синтез NO протекает, в большей мере, в условиях острого дефицита кислорода при сниженной активности NO-синтаз. Реализация этих механизмов имеет место при развитии патологических процессов в их острой фазе (например, при ишемии сердца и мозга), а также при гипоксии или функциональной нагрузке.

1.1.3 Доноры NO

В настоящее время множество исследований направлено на поиск и разработку новых экзогенных доноров NO, действие которых заключается в высвобождении этой молекулы в результате химической трансформации донора. По механизму действия NO-доноры делятся на спонтанно (неферментативно) высвобождающие NO и на доноры, которым для выделения оксида азота необходимо взаимодействие с ферментами. Некоторые соединения используются в клинических условиях уже на протяжении десятилетий (например, нитроглицерин и нитропруссид). В настоящее время в медицинскую практику внедряются новые разнообразные доноры NO, которые имеют ряд преимуществ [42], таких как, например,

свободное образование NO, целенаправленная доставка NO в определенные ткани и т.д. [25].

Существует три типа механизма высвобождения NO из донора [25]:

1. высвобождение NO за счет фотохимического и термического разложения или за счет саморазложения (например, S-нитрозотиолы, диазениумдиолаты, оксимы);

2. высвобождение NO за счет химических реакций с щелочами, кислотами, металлами и тиолами (органические нитраты, нитриты и сиднонимины);

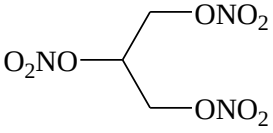
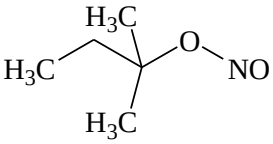
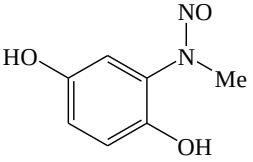
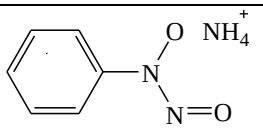
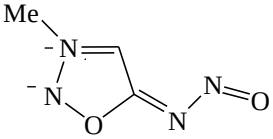
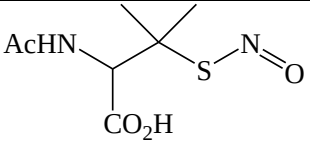
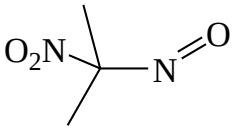
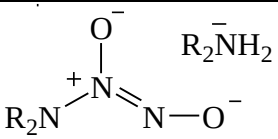
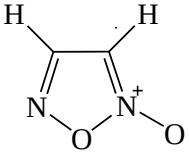
3. ферментативное окисление, где высвобождение NO из донора происходит благодаря метаболической активации NO-синтазой или оксидазой (N-гидроксигуанидины).

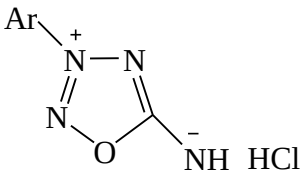
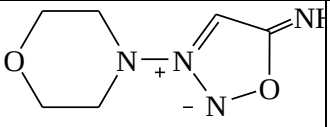
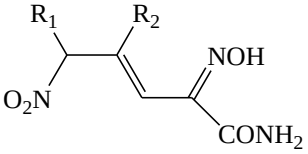
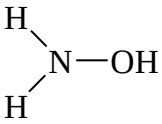
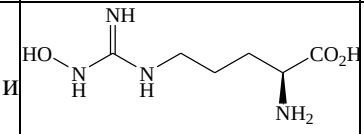
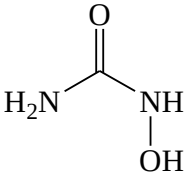
Некоторые доноры NO могут высвобождать NO сразу несколькими способами, например, органические нитраты могут генерировать NO также с помощью ферментативного катализа [25]. В таблице 1 приведена классификация основной массы доноров NO и основные пути его генерирования для данных классов [25, 43].

Самым распространенным классом доноров NO являются органические нитраты, среди которых наиболее известным является нитроглицерин. Также следует отметить нитропруссид натрия, который давно используется на практике. Его применяют при острой и хронической сердечной недостаточности, гипертоническом кризе, управляемой гипотензии во время хирургических операций. Превышение дозы и продолжительности приема может иметь неблагоприятные последствия, так как препарат содержит CN^-—группы, из-за чего может оказывать токсический эффект [44]. Органические нитраты широко используются для лечения стенокардии, но их также можно применять при лечении сахарного диабета, атеросклероза, сосудистого спазма. Наиболее важная проблема применения нитратов – развитие эффекта толерантности, который связывают с различными

механизмами блокады или метаболизма нитроглицерина и/или с действиями его метаболита – NO.

Таблица 1 - Классификация доноров NO.

Класс соединений	**Представитель**	**Пути генерирования NO**	
		Неферментативный	Ферментативный
Органические нитраты		Тиолы	митохондриальная альдегиддегидрогеназа, цитохром Р450, глутатион-S-трансфераза, и т.д.
Органические нитриты		Гидролиз, транснитрозилирование, тиолы, свет, температура	Ксантиноксидаза
Металл-NO комплексы	$Na_2[Fe(CN)_5(NO)]$ $2H_2O$	Свет, тиолы, восстановители, нуклеофилы	Мембраносвязанные ферменты
N-нитрозамины		Гидроксид-ионы, свет	цитохром Р450, родственные ферменты
N-гидроксил Нитрозамины		Свет, температура	Пероксидазы
Нитрозимины		Тиолы, свет	_____
S-нитрозотиолы		Самопроизвольно, свет, тиолы, ионы металлов	Неизвестные ферменты
C-нитрозо-соединения		Свет, температура	_____
Диазениумдиолаты или NONOаты		Самопроизвольно, тиолы	_____
Фуроксаны и бензофуроксаны		Тиолы	Неизвестные ферменты

Оксатиразол-5-имины		Тиолы	_____
Сиднонимины		Самопроизвольно, свет, окислители, pH>5	Гидролазы
Оксимы		Самопроизвольно, O_2/Fe (III) порферин	цитохром Р450
Гидроксиламины		Автоокисление, ионы металлов	Каталаза/H_2O_2
N-гидрокси-гуанидины и гуанидины		Оксиданты	NOS, цитохром Р450
Гидроксимочевина		H_2O_2/CuZn-супероксиддисмутаза, церулоплазмин, H_2O_2/Cu^{2+}, гем-содержащие белки	Пероксидаза

Из новых доноров NO следует выделить S-нитрозотиолы (тионитриты), которые являются эфирами, образованными тиолами и азотистой кислотой, и представляют собой самую обширную и наиболее изученную группу. Это обусловлено простотой синтеза и получением их в чистом виде, а также их способностью к быстрому выделению NO в водных растворах при физиологических pH без дополнительной активации и побочных токсичных продуктов [45].

В работах [45, 46] показано, что NO в S-нитрозотиолах образуется при гомолитическом разрыве связи S-N и сопровождается возникновением нестабильного радикала RS•, который димеризуется с образованием дисульфида:

$2RSNO \rightarrow 2RS\bullet + 2NO,$

$2RS\bullet \rightarrow RSSR$

В работе [47] указывается, что данные реакционоспособные радикалы могут нести опасность, так как способны вступать в другие реакции, помимо димеризации. Также следует отметить, что реакция транснитрозилирования (реакция переноса NO от S-нитрозотиолов к другим эндогенным тиолам) меркаптогрупп белков может привести к необратимым изменениям SH-групп ферментов и, следовательно, к образованию смешанных дисульфидов с частичной или полной потерей энзиматической активности [47].

Отдельно нужно выделить комплексы NO с нуклеофилами (NONOаты), в которых димер ON-NO формально связан с нуклеофилом через атом азота [48, 49]. Они легко гидролизуются с высвобождением NO, не требуя при этом дополнительной активации. Скорость распада зависит от структуры соединения и может изменяться в широких пределах. NONOаты ингибируют агрегацию тромбоцитов, участвуют в регуляции активности белка Р-450 и проявили себя как хорошие сосудорасширяющие соединения [50–52].

1.2 Нитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами: физико-химические характеристики и противоопухолевая активность

За последние годы надежно установлено, что нитрозильные комплексы железа считаются относительно стабильной формой существования NO в организме [53]. В образовании НКЖ участвуют негемовое железо и тиоловые группы белков или низкомолекулярных тиолов [54, 55], конкурирующие между собой. Авторы работы [56] полагают, что низкомолекулярные НКЖ являются переносчиками NO в организме, в то время как НКЖ, связанные с белком – стабильным депо NO. Данные формы находятся в равновесии друг с другом: группировка $Fe(NO)_2$ от низкомолекулярного НКЖ переходит на белок, который выступает донором серы аминокислотного остатка (такого как цистеин или ацетилцистеин) для образования белок связанных НКЖ. НКЖ, наряду с S-нитрозотиолами обладают EDRF-подобной активностью, но с более длительным временем жизни [53, 57, 58]. Таким образом, синтетические НКЖ как аналоги активных центров [1Fe-2S] и [2Fe-2S]

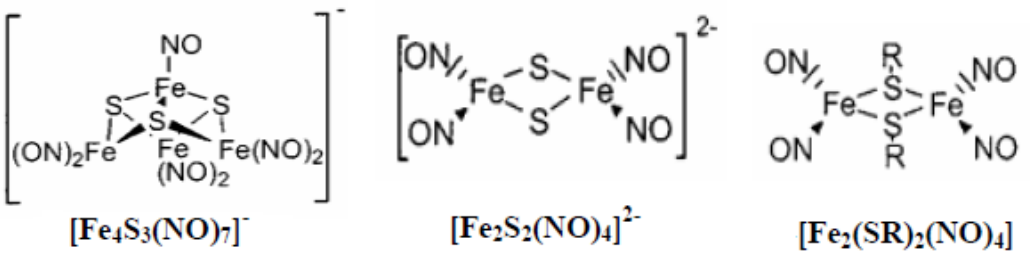
белков представляют огромный интерес для дизайна новейших лекарственных препаратов в качестве потенциальных доноров NO.

Впервые НКЖ с тиол-содержащими лигандами были обнаружены А.Ф. Ваниным и соавторами в 1963-1964 гг в дрожжевых клетках с использованием метода ЭПР по характерному для данных НКЖ сигналу ЭПР с $g_{ср}$=2.03 [59]. В состав данных НКЖ входят: один атом железа, два тиол-содержащих (SR) и два нитрозильных лиганда (общий состав: $[Fe(SR)_2(NO)_2]$), то есть эти соединения представляют собой моноядерные комплексы железа (М-НКЖ). Также НКЖ могут существовать в биядерной, диамагнитной форме. В этой форме комплексы имеют состав $[Fe_2(SR)_2(NO)_4]$ и представляют собой тиоэфиры "красной соли" Руссена, в которых два атома железа связаны между собой двумя мостиковыми атомами серы тиоловой группы [60]. Для моноядерной формы характерен зеленый цвет раствора, для биядерной – коричневый [61]. Причем обе формы НКЖ обратимо переходят друг в друга: моноядерная образуется при избытке тиолов, а биядерная - при их недостатке [62]:

$$[Fe_2(SR)_2(NO)_4] \xleftrightarrow{+RS;-RS} 2[Fe(SR)_2(NO)_2] \qquad (1.2.1)$$

Также следует отметить, что, помимо избытка тиолов, для перехода биядерной формы в моноядерную необходима щелочная среда [63]. При нейтральных значениях pH даже при избытке свободных тиолов подавляющая часть НКЖ находится в биядерной форме.

Впервые аналоги нитрозильных железо-серных белков - «черную» $[Fe_4S_3(NO)_7]^-$ и «красную» $[Fe_2S_2(NO)_4]^{2-}$ соли синтезировал З. Руссен [64] (рисунок 3). «Черная» соль цитотоксична, а «красная» неустойчива, поэтому их использование в качестве доноров NO не представляет практического интереса. В отличие от солей, «красные эфиры Руссена» более устойчивы, поэтому в последние годы широкое развитие получили работы по синтезу нитрозильных комплексов, в которых в качестве лигандов используются различные тиолы.



$[Fe_4S_3(NO)_7]^-$ $[Fe_2S_2(NO)_4]^{2-}$ $[Fe_2(SR)_2(NO)_4]$

Рисунок 3 - «Черная», «красная» соли и эфиры «красной соли» Руссена.

Самый обычный способ синтеза НКЖ - это обработка водного раствора Fe (II) и тиола газообразным NO при нейтральных pH [60, 65, 66]. Также следует отметить еще один часто встречаемый способ синтеза - с использованием S-нитрозотиолов в качестве донора NO. В работах [56, 67] показано, что при смешивании тиолов, S-нитрозотиолов и Fe (II) при нейтральных pH быстро образуются НКЖ.

В общей сложности в настоящее время было синтезировано большое количество НКЖ с различными тиоловыми лигандами: алифатическими тиоаминами и гетероциклическими тиолами ряда триазола, тетразола, пиридина, пиримидина, имидазола и бензимидазола. Например, описан синтез биядерных НКЖ с R = AIk, которые относятся к структурному “μ-S” типу, и генерируют NO только при термо- или фотоактивации [68], или биядерные парамагнитные НКЖ с ароматическими лигандами “μ-N-C-S” типа [66, 69–71], которые самопроизвольно выделяют NO в протонных средах, но плохо растворяются в воде и физиологическом растворе.

Электронное строение фрагмента Fe-NO в НКЖ

Для определения состояния NO в нитрозильных комплексах металлов, как правило, используют метод ИК-спектроскопии. Частота валентных колебаний (ν_{NO}) для некоординированной молекулы NO составляет 1870 $см^{-1}$ [72]. После комплексообразования ν_{NO} может увеличиваться или уменьшаться, в зависимости от природы солигандов в комплексе, электронной конфигурации и общего заряда комплекса, а также его геометрии. В целом, величина ν_{NO} уменьшается с увеличением

отрицательного заряда: для NO^+ - 2377 $см^{-1}$, а для NO^- - 1470 $см^{-1}$. С точки зрения геометрии M-N-O фрагмента, для комплексов, содержащих линейные связи M-N-O (sp-гибридизация атома азота), величина ν_{NO} находится в диапазоне от 1950 до 1450 $см^{-1}$, для комплексов с угловыми связями M-N-O (sp^2-гибридизация) - в диапазоне 1720-1400 $см^{-1}$, и, для комплексов двух и более металлов (мостиковая геометрия, sp^2- или sp^3-гибридизация) ν_{NO} находится в диапазоне от 1650 до 1300 $см^{-1}$ [72]. Недостатком метода ИК-спектроскопии является значительное перекрывание интервалов ν_{NO} для комплексов различной структуры.

В настоящее время, для описания формальной степени окисления NO и Fe в нитрозильных комплексах используется классификация Энемарка-Фелтема [73]. Согласно этой классификации, основным структурным фрагментом НКЖ является узел $\{Fe(NO)_2\}^9$ с 9 электронами на d орбитали Fe и π* орбитали NO [74, 75]. Электронная плотность связи Fe-NO может быть удовлетворительно описана тремя формами $\{Fe^{3+}(NO^-)_2\}^9$, $\{Fe^+(NO^\cdot)_2\}^9$ или $\{Fe^-(NO^+)_2\}^9$ (Схема 2).

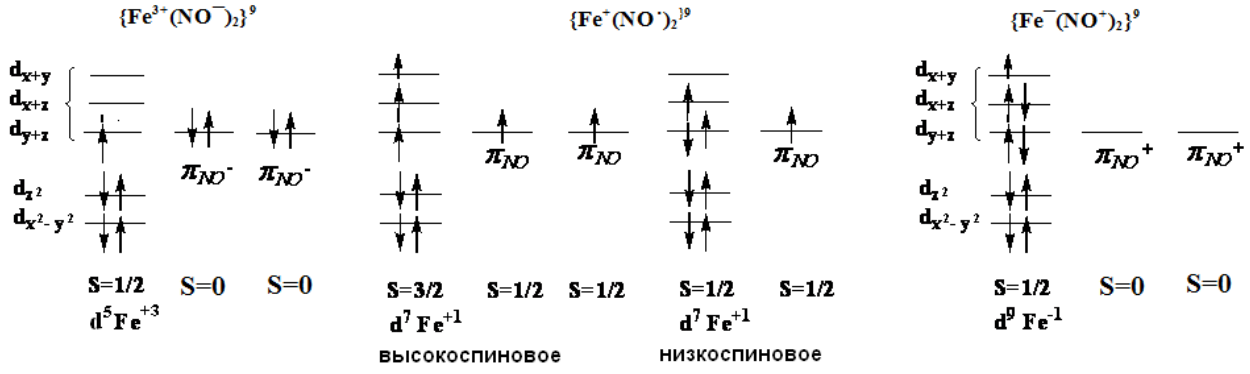


Схема 2 - Строение динитрозильного узла $\{Fe(NO)_2\}^9$.

По данным [66, 74], в НКЖ [2Fe-2S] и [1Fe-2S] значения ν_{NO} лежат в области 1657-1807 $см^{-1}$, то есть заряд на NO-группе можно формально считать нейтральным, тогда $Fe^{+1}(d^7, S=1/2)$. Варьирование функциональных лигандов в нитрозильных комплексах железа дает возможность для расширения фундаментальных представлений о $\{Fe(SR)_2(NO)_2\}$ узле,

электронное строение которого до настоящего времени является предметом активного обсуждения.

НКЖ в водных растворах: основные характеристики

Для изучения нитрозильных комплексов переходных металлов, помимо ИК-спектроскопии, широко используются методы ЭПР и UV-Vis спектроскопии. Благодаря наличию неспаренного электрона в координационной сфере, моноядерные НКЖ дают узкие и отчетливые сигналы ЭПР с величинами g между 2.012 и 2.04, которые обычно обнаруживаются при комнатной температуре [76]. В случае высокомолекулярных (например, белковых) НКЖ, наблюдается осевая симметрия g- тензора, например $g_{\perp}=2.04$, $g_{\parallel}=2.014$ [77], а в случае НКЖ с низкомолекулярными лигандами - ромбический сигнал [78]. Величины g немного отличаются в зависимости от природы лиганда, интенсивность сигнала ЭПР НКЖ сильно зависит от pH раствора [78].

Экспериментальные спектры UV-Vis спектроскопии моноядерных тиолатных НКЖ можно измерить только в присутствии большого избытка лиганда. В противном случае мономер легко подвергается обратимому превращению в биядерную форму $[Fe_2(SR)_2(NO)_4]$, для которой характерно гораздо более сильное поглощение [79, 80]. Типичный спектр для тиолатных НКЖ состоит из сильной полосы около 400 нм и двух умеренных полос при~ 600 и 770 нм (Таблица 2) [72, 79, 81–83].

На рисунке 4 представлены спектры поглощения обеих форм НКЖ с глутатионовыми тиолатными лигандами [60]. Для биядерной формы характерны две интенсивные полосы при 310 нм (ε=9200 $M^{-1}см^{-1}$) и 360 нм (ε=7400 $M^{-1}см^{-1}$), а также слабая полоса при 768 нм (ε=100 $M^{-1}см^{-1}$) (рисунок 4a). Моноядерная форма характеризуется одной интенсивной полосой поглощения при 390 нм (ε=4700 $M^{-1}см^{-1}$) и двумя слабыми при 610 нм (ε= 300 $M^{-1}см^{-1}$) и при 770 нм (ε=310 $M^{-1}см^{-1}$) (рисунок 4b).

Таблица 2 -Характерные особенности UV-Vis спектров для некоторых НКЖ

Type of the complex	Complex formula	UV–Vis band(nm)/ε (M^{-1} cm^{-1})[a]
Mononitrosyl	$[Fe(H_2O)_5NO]^{2+}$	336/440, 451/265, 585/85 (water)
	$[Ru(NH_3)_5NO]^{3+}$	300/67.2 M^{-1} cm^{-1}, 460/ 14.4 M^{-1} cm^{-1}
	$[(NO)Fe(SC_9H_6N)_2]$	432/3,571, 512/2,967, 800/428 (THF)
	$[Fe(NO)(SPh)_3]^-$	500[b] (THF)
	$[Fe(NO)(SEt)_3]^-$	459[b] (THF)
	$[Et4N][Fe(StBu)_3(NO)]^-$	370, 475 (THF)
Dinitrosyl	$[Fe(CS)_2(NO)_2]^-$	392/3,580, 603/299, 772/312 (water)
	$[(PhS)_2Fe(NO)_2]^-$	479, 798 (THF)
	$[(EtS)_2Fe(NO)_2]^-$	436, 802 (THF)
	$[PPN][(S(CH_2)_3S)$ $Fe(NO)_2]$	430, 578, 807 (THF)
Dinitrosyl, dimer	$[Fe_2(CS)_2(NO)_4]$	305, 362, 440 (sh), 755 (water)
Pseudo-heme	[Fe(L)(NO)]	303/17,000, 403/4,000, 613/600
Heme, 6C	[Fe(OEP)(SR)(NO)]	430, 536, 567
Heme, 5C	[Fe(T*o*-F_2PP)(NO)]	403, 475, 550

OEP octaethylporphyrin, T*o* *F_2PP tetrakis*-5,10,15,20-(*o*-difluorophenyl)porphyrin, *PPN* bistriphenylphosphineiminium cation, *CS* cysteamine, *L* Schiff-base tetradentate macrocyclic ligands

[a]Коэффициенты экстинкции приведены в тех случаях, когда они указаны в работе

[b]Спектры регистрировали в диапазоне 390–1200 нм

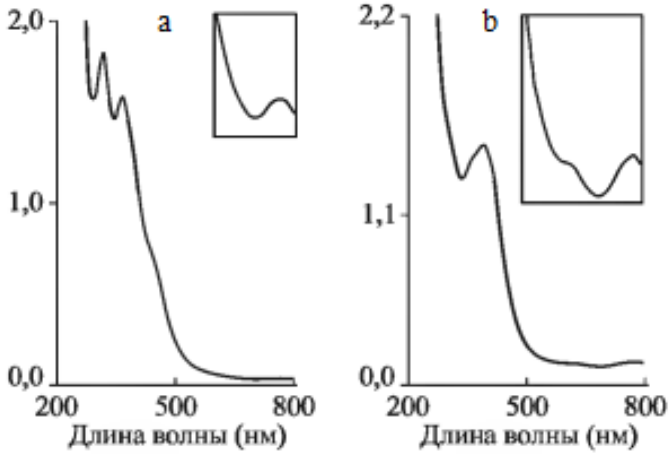


Рисунок 4 - Спектры поглощения биядерной (**a**) и моноядерной (**b**) форм НКЖ с глутатионовыми лигандами [60].

Для спектров поглощения НКЖ с другими тиол-содержащими лигандами характерна аналогичная форма, но при этом наблюдаются небольшие вариации в положении и интенсивности основных полос поглощения [60].

Ваниным с соавтарами [75, 84, 85] был предложен следующий механизм процесса образования парамагниного моноядерного НКЖ с низкоспиновой конфигурацией S=1/2 (схема 3):

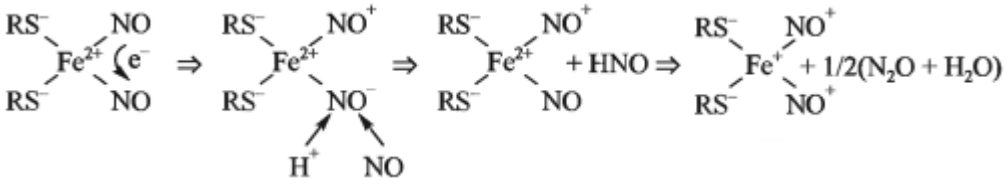


Схема 3 - Механизм образования моноядерного НКЖ.

На первоначальной стадии при связывании 2 молекул NO с Fe (II) происходит их диспропорционирование, в результате чего одна молекула NO переходит в ион нитрозония (NO^+), а другая – в ион нитроксила (NO^-). Протонирование NO^- приводит к образованию HNO, которая выходит из комплекса. При дальнейшей рекомбинации образуется закись азота (N_2O) и вода. На свободное координационное место встраивается третья молекула NO, что и приводит к образованию парамагнитных НКЖ с электронной нонфигурацией железа d^7 (Fe^{1+}). Последующая димеризация двух моноядерных комплексов в соответствии с уравнением (1.2.1) приводит к образованию биядерного НКЖ. В работах [86, 87] было подтверждено, что в реакции образования моноядерного НКЖ участвуют 3 молекулы и этот процесс сопровождается выделением N_2O.

В схеме 3 распределение спиновой электронной плотности в $Fe(NO)_2$ фрагменте, соответствующее $Fe^+(NO^+)_2$, определяется взаимодействием парамагнитных компонентов без учета диамагнитных тиолсодержащих лиганов. Их включение в МО НКЖ приводит к повышению электронной плотности в $Fe(NO)_2$ фрагментах, в частности на NO лигандах, тем самым предотвращая их гидролиз и стабилизируя НКЖ. Соответственно при выходе этих лигандов, например, при распаде данных НКЖ, происходит изменение электронной плотности в $Fe(NO)_2$, оно становится идентичным распределению в них неспаренной электронной плотности. При

установлении равновесия в реакции распада НКЖ (схема 4), согласно [84], имеет место такого рода изменение электронной плотности:

$$(RS^-)_2Fe^+(NO^+)_2 \longleftrightarrow Fe^{2+} + NO + \underline{RS^- + NO^+}_{RS\text{-}NO} + RS^-$$

Схема 4 - Реакция распада НКЖ.

Аналогичный процесс наблюдается для биядерных форм [84]. Согласно авторам один неспаренный e^- переходит с Fe^+ на NO^+, следовательно, Fe^+ становится Fe^{2+}, а NO^+ - NO. Второй NO^+ при высвобождении связывается с тиоловым лигандом с образованием S-нитрозотиола. Авторы исследовали распад НКЖ в разных условиях: анаэробных и аэробных, варьируя pH среды, при нагреве и добавляя избыток тиолов. Например, в работе [63], проводя реакции с НКЖ с глутатионовыми лигандами в анаэробных условиях, при четырехкратном избытке свободного GSH при нейтральных pH основная часть НКЖ находилась в биядерной форме. Резкое подкисление не повлияло на стабильность этих НКЖ. Данный факт авторы объяснили следующим образом [62]: благодаря высокой π-донорной активности атомов тиоловой серы и высокой π и d-акцепторной активности NO^+ и Fe^+ происходит перенос значительной электронной плотности с атомов серы тиловых лигандов. Поэтому на них происходит существенное снижение отрицательного заряда, что уменьшает возможность их протонирования, при этом обеспечивая стабилизацию биядерных НКЖ в кислой среде.

На рисунке 5 приведены спектры поглощения аналогичного опыта распада биядерного НКЖ с глутатионовыми лигандами при нагревании до 60-70 ^oC (чем обеспечили увеличение скорости протонирования) [63]. В анаэробных условиях эти НКЖ распадались за 6 ч (кривые 1, 2 на рисунке 5А), в аэробных- за 45 минут (кривые 1,2 на рисунке 5Б). Причем в первом случае раствор полностью обесцвечивался, а во втором - из всех нитрозильных лигандов исходного НКЖ образовывался GSNO (максимум при 334 нм).

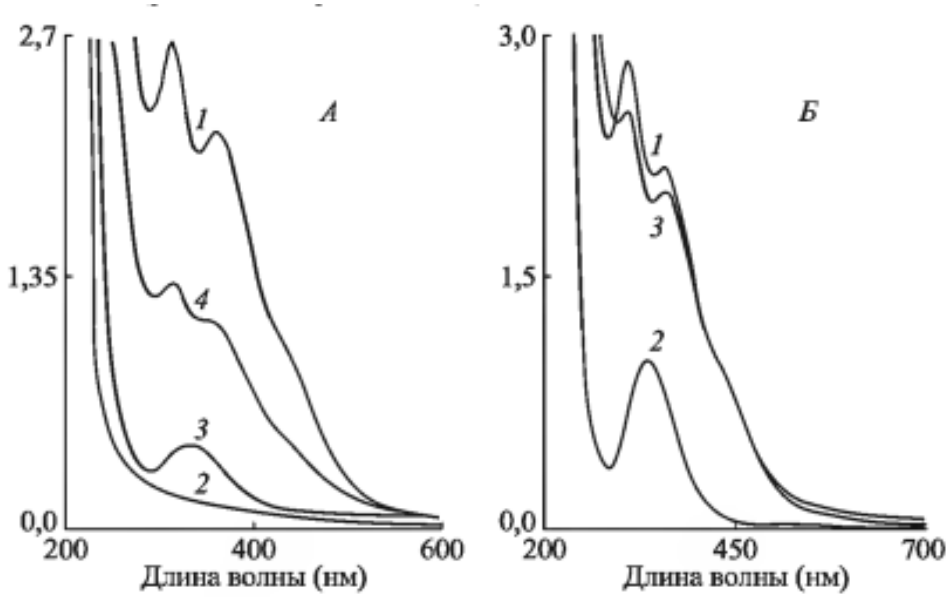


Рисунок 5 - Изменение спектров оптического полгощения 0.3 мМ раствора биядерного НКЖ с глутатионовыми лигандами (pH=1.0) при 70 ^{o}C 6 ч в анаэробных условиях (**А**, кривые 1,2) или 45 мин в аэробных условиях (**Б**, кривые 1,2). **А** - кривая 3 – в аппарат напущен воздух, что привело к образованию GSNO; кривая 4 – pH раствора (3) повышен до 7.4. **Б** - кривая 3- pH раствора (2) поднят до pH 7.4. [63].

Следует отметить, что устойчивость НКЖ в кислом растворе при прогревании, согласно [63], повышалась с увеличением концентрации свободного GSH. При четырехкратном избытке GSH, как уже было описано выше, процесс распада занимал 6 ч, тогда как в его отсутствии НКЖ распадался за 1-2 ч.

На следующем этапе данной работы авторы записали оптический спектр поглощения NO в газовой фазе (рисунок 6).

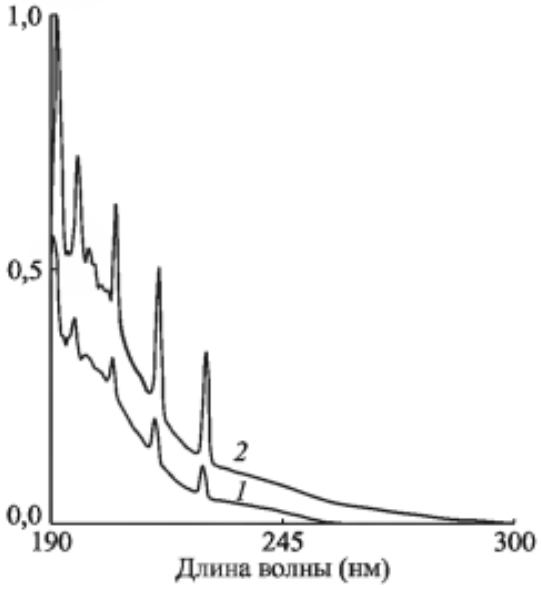


Рисунок 6 - Спектр оптического поглощения газообразного NO, высвободившегося из 3 мМ (4 мл) и 5 мМ (20 мл) растворов биядерных НКЖ с глутатионовыми лигандами (pH=1.0), прогреваемых 6 ч при 70 ^{o}C [63].

В анаэробных условиях концентрация накопившегося газообразного NO соответствовала количеству нитрозильных лигандов в исходном НКЖ. В то время как в аэробных условиях NO не было обнаружено.

Авторами были предложены схемы реакций, описывающие процесс распада НКЖ в кислой среде в аэробных условиях:

$$Fe^{+}(NO^{+})_2 + 2RSH + O_2 \rightarrow H_2O_2 + 2RSNO + Fe^{3+}$$

И в анаэробных: $$2Fe^{+}(NO^{+})_2 \rightarrow 4NO + Fe^{3+}$$

Следует отметить, что авторы другой работы [88] предполагают, что при распаде низкомолекулярных НКЖ при нейтральных pH образуются NO и нитриты, а не S-нитрозотиолы (схема 5):

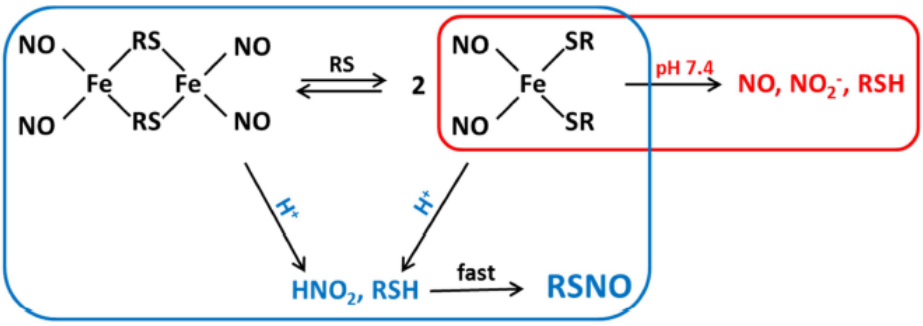


Схема 5 - Распад НКЖ.

Используя метод ВЖХ при исследовании НКЖ с глутатионовыми тиолатными лигандами, авторы этой работы пришли к выводу, что распад НКЖ сопровождается образованием нитритов. В отличие от предыдущей работы [63], в данном исследовании не наблюдали существенного образования GSNO при нейтральных pH значениях (уровень GSNO -2% от исходной концентрации НКЖ). При физиологических значениях pH, биядерный НКЖ оставался довольно стабилен, а присутствие избытка тиолов приводило к медленному накоплению нитритов в качестве основного продукта (рисунок 7): при соотношении 1:2 Fe:GSH биядерный НКЖ оставался стабильным в течение 17 ч, а при соотношении 1:20 и моноядерный, и биядерный НКЖ полностью распадались за 12 ч. По мнению

авторов данного исследования, при кислых значениях pH S-нитрозотиолы могут являться продуктами распада НКЖ, но не первичными.

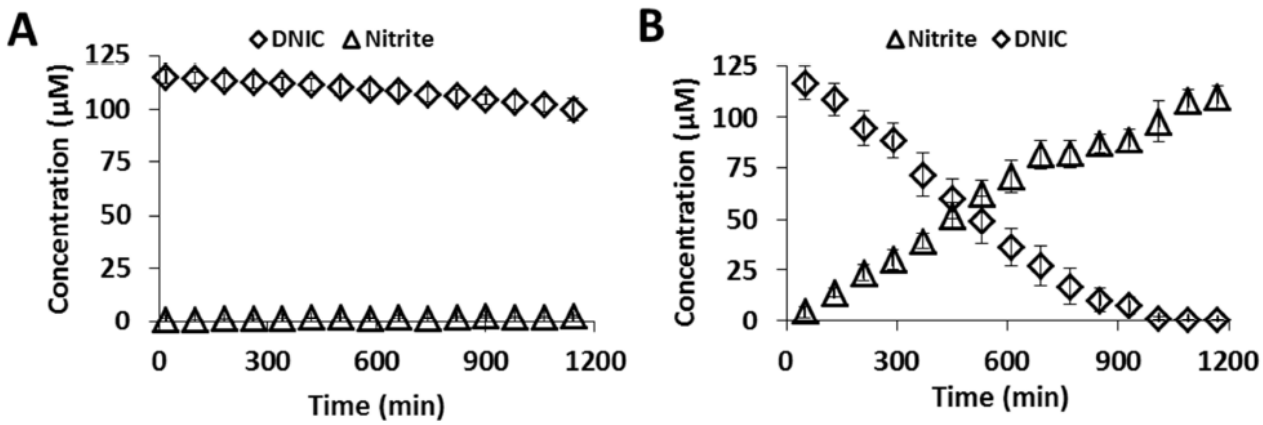


Рисунок 7 - Распад НКЖ при нейтральных и кислых значениях pH. НКЖ синтезирован из 100 μM $FeSO_4$, и 100 μm Proli/NO с GSH в 15 mM Hepes pH 7.4 и был проанализирован с помощью обращённо-фазовой ВЭЖХ детектором УФ-видимого излучения. Fe:тиол=1:2 (**A**) и 1:20 (**B**). (**A, B**): Распад НКЖ и накопление нитритов при pH 7.4.

Также интересно отметить работу [89], в которой авторы показали, что трансформация НКЖ в RSNO может осуществляться только под действием стабильных бренстодовских кислот из НКЖ $\{Fe(NO)_2\}^9$, содержащих один тиолатный лиганд $[(NO)_2Fe(\mathbf{L})(SR)]$. Протонирование же бренстодовской кислотой ($[Lu\text{-}H]\text{-}[BF_4]$) комплексов с двумя тиолатными лигандами $[(NO)_2Fe(SR)_2]^-$ (R-алкил, арил) приводит к образованию биядерного комплекса $[Fe_2(\mu\text{-}SR)_2(NO)_4]$.

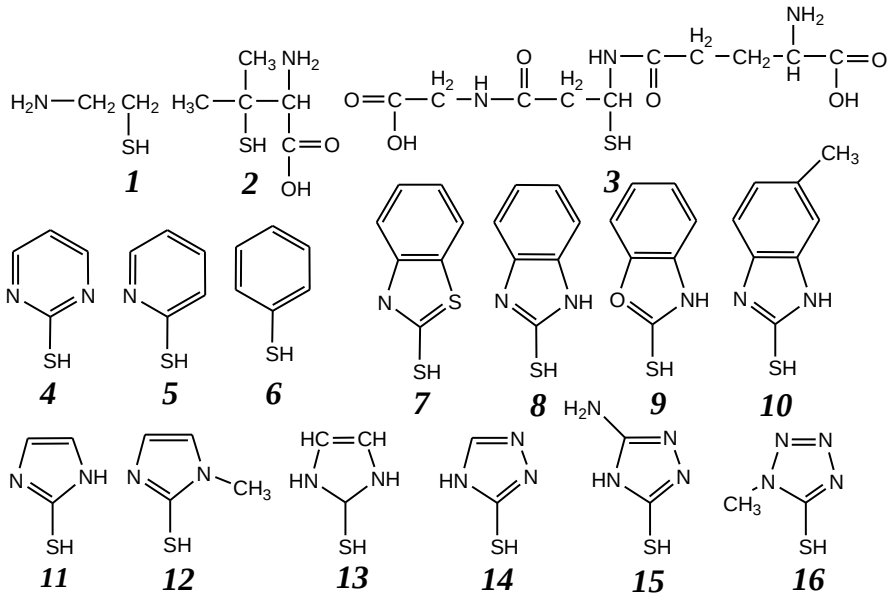
В этой же статье [89] установлено, что при растворении в ДМСО комплекса $[Fe_2(\mu\text{-}SR)_2(NO)_4]$, где R - это N-ацетил-D-пеницилламин, устанавливается динамическое равновесие между этой исходной биядерной формой и образующимся продуктом – моноядерной формой $[Fe(SR)(ДМСО)(NO)_2]$.

1.2.1 Биологическая активность НКЖ

Имея в виду дальнейшее использование НКЖ в качестве лекарственных средств, к ним можно предъявить широкий набор специфических требований: они должны выделять NO в раствор без дополнительной термо-, фото- и ферментативной активации; должны быть синтезированы в чистом виде и твердом состоянии; после разложения НКЖ NO должен генерироваться с количественным выходом [90]. Из таких соединений, во-первых, нужно отметить стабильный порошкообразный препарат моноядреного НКЖ с глутатионовыми лигандами («Оксакам»), созданный в 2009 г. А.Ф. Ваниным с соавторами в Институте химической физики им. Н.Н. Семенова [91]. Препарат вызывает длительную гипотензию, подавляет агрегацию тромбоцитов, снижает инфарктную зону при экспериментальном инфаркте миокарда. Оксакам успешно прошел фармакологические испытания и испытания на 14 здоровых добровольцах в возрасте 21-45 лет, не имеющих хронических заболеваний и с нормальным артериальным давлением [92]. В настоящее время уже проведены первые клинические испытания при снятии гипертонического криза у больных в Российском Кардиологическом Научно-Производственном Комплексе (РКНПК), которые показали обнадеживающий результат [93].

Также к соединениям, удовлетворяющим вышеперечисленным требованиям и представляющим значительный интерес в дальнейшем изучении и применении, относятся биядерные НКЖ, синтезированные в Институте проблем химической физики РАН: катионные и анионные водорастворимые НКЖ структурного “μ-S” типа с алифатическими лигандами природного происхождения (цистеамином, пеницилламином, цистеином, глутатионом, метионином, сульфоксидом, метионинсульфоном и др.) [94]; нейтральные неводорастворимые НКЖ структурного “μ-S” типа с ароматическими тиоловыми лигандами (пиримидиновыми, пиридиновыми, фенильными, аминофенильными и др.) [94]; а также нейтральные

неводорастворимые НКЖ, относящиеся к структурному “μ-N-C-S” типу с бензазагетероциклическими производными [95] (рисунок 8).



l) цистеамин, **2)** пеницилламин, **3)** глутатион, **4)** 2-меркаптопиримидин,
5) 2-меркаптопиридин, **6)** тиофенол, **7)** 2-меркаптобензотиазол,
8) 2- меркаптобензимидазол, **9)** 2- меркаптобензоксозол,
l0) 5-метил-2-меркаптобензимидазол, **ll)** 2-меркаптоимидазол,
l2) l-метил-2-меркаптоимидазол, **l3)** 2-меркаптоимидазолидин,
l4) 2-меркаптотриазол, **l5)** 2-меркапто-5-аминотриазол,
l6) 5-меркапто-l-метилтетразол

Рисунок 8 - Структуры биологически активных серосодержащих лигандов.

Для всех комплексов, имеющих в качестве лигандов соединения 1 - 16 (рисунок 8), было проведено исследование их биологической активности. Изучение *кардиотропной активности* выполнено на моделях ишемического и реперфузионного повреждения миокарда *in vitro* и *in vivo*. Изучено действие комплексов ТНКЖ-Na ($Na_2[Fe_2(S_2O_3)_2(NO)_4]\cdot 4H_2O$) и Pen ($[Fe_2(SC_4H_3N_2)_2(NO)_4]SO_4\cdot 5H_2O$) в сопоставлении с действием нитропруссида натрия и нитроглицерина на изолированном сердце крыс Вистар, перфузируемом раствором Кребса при постоянном коронарном потоке [7]. Для исследуемых НКЖ выявлено дозозависимое влияние на снижение аортального давления. Вазодилататорная способность для этих соединений при сопоставлении близких действующих концентраций (~ 3мкМ) уменьшается в ряду: ТНКЖ-Na < Pen < нитропруссид натрия. У

наркотизированных крыс Pen *in vivo* вызывает дозозависимое снижение артериального давления [7].

Все соединения прошли исследования *противоопухолевой активности in vitro* и *in vivo* [8]. 4 соединения (Im ($[Fe_2(SC_3H_3N_2)_2(NO)_4]$); BTz ($[Fe_2(S_2C_7H_4N)_2(NO)_4]$); RSR-Na ($Cs_2[Fe_2S_2(NO_4]\cdot 2H_2O$) и CysAm ($[Fe_2(S(CH_2)_2NH_3)_2(NO)_4]SO_4\cdot 2.5H_2O$)) показали наибольшую активность (ингибирование роста опухолевых клеток на 75-92%) из всех, тестируемых на четырех линиях опухолевых клеток человека (рак яичника линии SKOV-3, молочной железы линии MCF-7, немелкоклеточный рак легкого линии A549, миелобластный лейкоз линии K562) [9]. Так как комплекс CysAm устойчив при хранении, хорошо растворим в воде, не имеет цитотоксических компонентов и пролонгировано выделяет NO в растворах, его исследовали на 9 линиях клеток различного гистогенеза. Наиболее высокие уровни цитотоксической активности для CysAm выявлены на четырех клеточных линиях (GI_{50}: SKOV-3 = 43 мкМ; K562 = 17 мкМ, A549 = 90 мкМ, MCF-7=20 мкМ) [10]. Максимальную чувствительность к этому комплексу показали линии клеток рака молочной железы. Также обнаружено, что он является индуктором апоптоза в клетках миелолейкоза K562 и клеток рака толстой кишки LS174T. Его действие на распределение клеток K562 по фазам клеточного цикла показало, что данный НКЖ вызывает увеличение содержания клеток в S-фазе на 16%, уменьшение в G1-фазе на 8% и на 8% - в G2/M-фазе. CysAm также оказывал противоопухолевое действие на аденокарциноме молочной железы Ca-755 в течение девяти дней (Торможение роста опухоли (ТРО)=71-76-63-64%; увеличение продолжительности жизни (УПЖ) = 66%); на карциноме легкого (LLC) в течение десяти дней (ТРО = 86-67-61%; УПЖ=7%). В настоящее время предклинические исследования CysAm продолжаются.

Комплексы BTz и Ph ($[Fe_2(SC_6H_5)_2(NO)_4]$) также активировали активность каспаз 3, 7 K562 [11]. Для НКЖ BTz выявлена зависимость количества клеток в апоптозе от концентрации. Способность комплекса Ph в

той же концентрации вызывать апоптоз ниже (23%) по сравнению с комплексами CysAm и BTz. Далее, соединения, показавшие наибольшую активность *in vitro* (Im, BTz, RSR-Na, CysAm) изучали *in vivo* на четырех моделях опухолей мышей: эпидермоидной карциноме легкого Льюис, меланоме B-16, лимфоцитарной лейкемии P-388 и аденокарциноме молочной железы Ca-755. Соединения BTz и Im показали кратковременный противоопухолевый эффект после ежедневного внутрибрюшинного введения в течение пяти дней. НКЖ RSR – Na оказывал противоопухолевое действие: на карциноме легкого LLC в течение пятнадцати дней (ТРО = 83-63-69-65; УПЖ=27%) и на меланоме B-16 в течение десяти дней (ТРО = 70-66-74; УПЖ=28%) [9].

1.3 Гемопротеиды как депо NO в организме

Гемопротеиды (гемопротеины) - это сложные окрашенные белки, которые содержат гем в качестве простетической группы. К ним относятся гемоглобин и его производные, миоглобин, цитохромы, пероксидаза и др. Гемсодержащие белки являются чрезвычайно важными элементами живых организмов и выполняют множество функций: участвуют в процессах связывания и транспорта кислорода, осуществляют перенос электронов в дыхательной цепи, катализируют окисление органических соединений и разложение пероксида водорода и т.д.

1.3.1 Гемоглобин и его железо-нитрозильный комплекс. Их структура, свойства и биологическая роль

Гемоглобин (от греч. haima - кровь и лат. globus - шар) представляет собой сложный железосодержащий белок животных и человека, который способен обратимо связывать кислород, обеспечивая его перенос от органов дыхания к тканям, а в обратном направлении - углекислый газ [96]. Основной вклад в изучение гемоглобина внес М. Перутц. Он определял молекулярные структуры белков с помощью метода рентгеноструктурного анализа, за что и был удостоен Нобелевской премии [97]. У большинства позвоночных

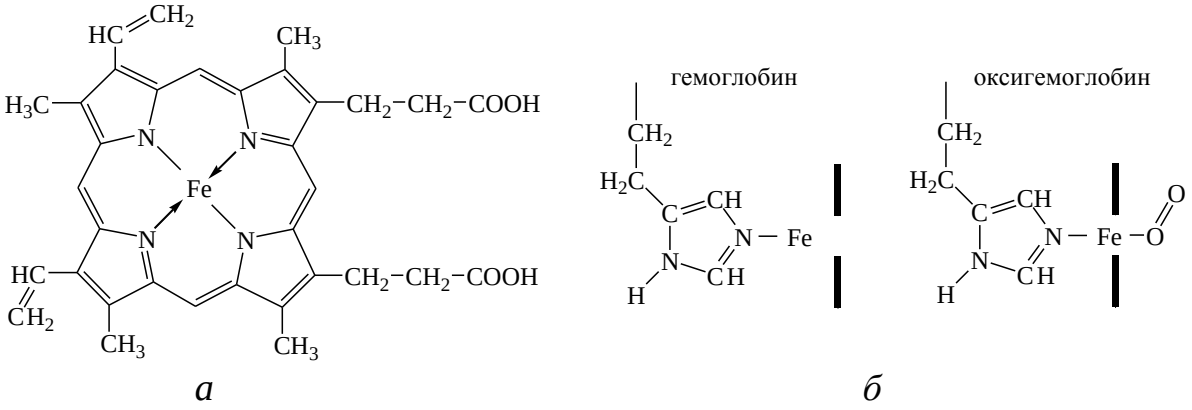
животных Hb содержится в эритроцитах, у большинства беспозвоночных растворен в плазме крови (называется эритрокруорин) и может присутствовать в других тканях. Молекулярная масса Hb для взрослого человека составляет $6.49 \cdot 10^4$, его форма близка к эллипсоиду; изоэлектрическая точка 6.9.

Структура, физико-химические свойства, формы и спектральные характеристики Hb

Hb состоит из двух частей: гема (железосодержащая часть) и глобин (белковая). В состав Hb позвоночных входят две пары неидентичных субъединиц: две α- и две β-цепи. Цепи в структуре Hb соединены нековалентно, образуя глобулярную нативную молекулу. С каждой цепью связана одна гем-группа. В состав каждой α-цепи входит 141, а β-цепи — 146 аминокислотных остатков. Таким образом, вся молекула Hb состоит из 574 аминокислот. Несмотря на то, что аминокислотные последовательности цепей различны, у них практически одинаковые третичные пространственные структуры. Благодаря Ван-дер-Ваальсовым взаимодействиям и водородным связям субъединицы прочно удерживаются между собой [98].

Гем является комплексом Fe(II) с протопорфирином. Структура гема представлена на рисунке 9 а. Атом железа шестикоординационный, четыре связи направлены к атомам азота пиррольных колец, оставшиеся 2 - перпендикулярно кольцу по обе его стороны. Из складок полипептидных цепей образуются специальные «карманы», в которых и располагаются гемы [99]. Из двух перпендикулярных связей одна (пятая) координирована имидазольным кольцом аминокислоты гистидина, входящей в полипептидную цепь субъединицы, а по оставшейся шестой связи могут координироваться кислород или другие двухатомные молекулы (NO, CN^-, CO). В организме Hb может находиться в трех формах: дезоксигемоглобин (не связанный с O_2, 6-ое координационное положение свободно),

оксигемоглобин (связанный с O_2) и метгемоглобин (Fe^{2+} в геме окислено до Fe^{3+}, не способен переносить O_2). Расположение железа в плоскости гема в зависимости от формы Hb показано на рисунке 9 б.



а *б*

Рисунок 9 - Структура гема Hb (**а**), структура активного центра дезоксигемоглобина и оксигемоглобина (**б**).

Гемоглобин обладает характерным спектром поглощения. В видимой области спектр поглощение белка обусловлен поглощением гемов и характеризуется тремя полосами поглощения - α-полосой, β-полосой и наиболее интенсивной полосой Соре. Спектры поглощения различных форм гемоглобина заметно отличаются, что позволяет их уверенно идентифицировать. Параметры спектров поглощения окси-, дезокси- и карбоксигемоглобина приведены в таблице 3 [96, 97].

Таблица 3 - Основные спектральные характеристики различных форм Hb.

	α-полоса		β-полоса		Полоса Соре	
	λ, нм	ε_λ, $M^{-1}см^{-1}$	λ, нм	ε_λ, $M^{-1}см^{-1}$	λ, нм	ε_λ, $M^{-1}см^{-1}$
Оксигемоглобин	577	14600	542	13800	412	135000
Дезоксигемоглобин	555	13500			430	119000
Карбоксигемоглобин	569	13400	539	13400	419	191000

Оксигенирование, конформации Hb и его биологическая роль

Основной функцией Hb является перенос O_2. Во время этого процесса молекула O_2 присоединяется по вакантному шестому координационному положению. Образуется стабильный оксигенированный комплекс - HbO_2, при

этом железо не окисляется, и связывание происходит обратимо. Сродство Hb к O_2 является основным физико-химическим показателем функциональных свойств Hb. Этот белок может находиться в двух различных состояниях: R-состояние (англ. relaxed), характеризующееся высоким сродством к кислороду и T (англ. tense), в котором кислород слабо связывается с молекулой белка (рисунок 10) [98, 100].

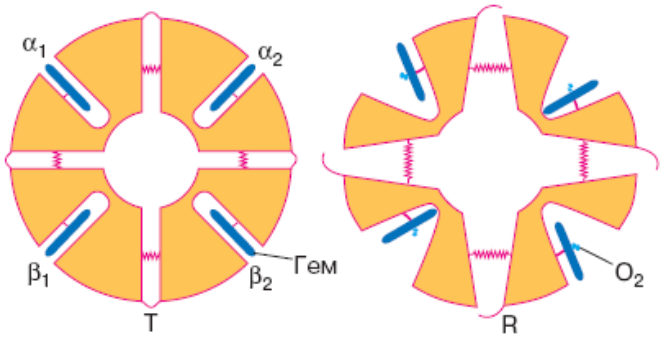


Рисунок 10 - Конформационные T- и R- состояния Hb.

В R-форме сродство Hb к O_2 в 500 раз больше, чем в T-форме. Во время оксигенации происходит переход от T- к R-форме и некоторые аминокислотные остатки смещаются до 7 Å относительно исходного состояния [98]. Также во время конформационного перехода один димер смещается относительно другого на 12—15 Å, что в конце приводит к расширению гемовых карманов. Данные структурные изменения происходят после присоединения первой молекулы кислорода к одному из гемов и далее распространяются по всей глобуле. Таким образом, присоединение O_2 к молекуле Hb сопровождается значительными конформационными перестройками пространственной структуры субъединиц и тетрамера в целом. Такой эффект был назван аллостерическим [101]. Причем каждое последующие присоединение кислорода облегчается по мере присоединения к тетрамеру молекул O_2, а перестройка белковой глобулы носит кооперативный характер. Это свойство белка увеличивает эффективность переноса O_2 при физиологических условиях. Помимо O_2, гемоглобин может эффективно связывать и другие двухатомные молекулы – CO и NO.

Железо-нитрозильные комплексы гемоглобина.

Их физико-химические свойства и биологическая роль

NO с гемсодержащими белками может взаимодействовать двумя способами:

1 - с образованием нитрозильного комплекса железа (константа скорости взаимодействия обычно изменяется в пределах 10^3–10^7 $M^{-1}\cdot c^{-1}$;

2 - взаимодействуя со свободной SH-группой белка с образованием нитрозотиолов [14].

Нитрозильные комплексы $NO\text{-}Fe^{2+}$ являются парамагнитными, а комплексы $NO\text{-}Fe^{3+}$-диамагнитными.

Как восстановленная форма гемоглобина (Hb, Fe^{2+}), так и окисленная – метгемоглобин (metHb, Fe^{3+}) могут присоединять NO. Реакция NO с metHb обратима, а константы скорости прямой и обратной реакций небольшие по сравнению с таковыми для восстановленного гемоглобина (таблица 4):

NO + metHb ↔ metHb-NO

NO + Hb ↔ Hb-NO

Таблица 4 - Константы скорости реакции взаимодействия NO с metHb и Hb [102–104].

Форма Hb	$k_{асс}$, $M^{-1}c^{-1}$	$k_{дисс}$, c^{-1}
metHb, α-цепь	$1.7\cdot10^3$	0.65
metHb, β-цепь	$6.4\cdot10^3$	1.5
Hb,R-конформация	$1.4\cdot10^7$	$1.8\cdot10^{-5}$
Hb,T-конформация	$1.4\cdot10^7$	$3.0\cdot10^{-3}$
Hb, α-цепь	$2.4\cdot10^7$	$4.6\cdot10^{-5}$
Hb, β-цепь	$2.4\cdot10^7$	$2.2\cdot10^{-5}$

Образование нитрозилированных комплексов Hb удобно наблюдать по изменению оптических спектров поглощения в видимой области. В работах [12, 96] подробно описаны спектры Hb с максимумом поглощения при 556

нм и спектры HbNO с максимумами поглощения при 545 нм и 575 нм (рисунок 11).

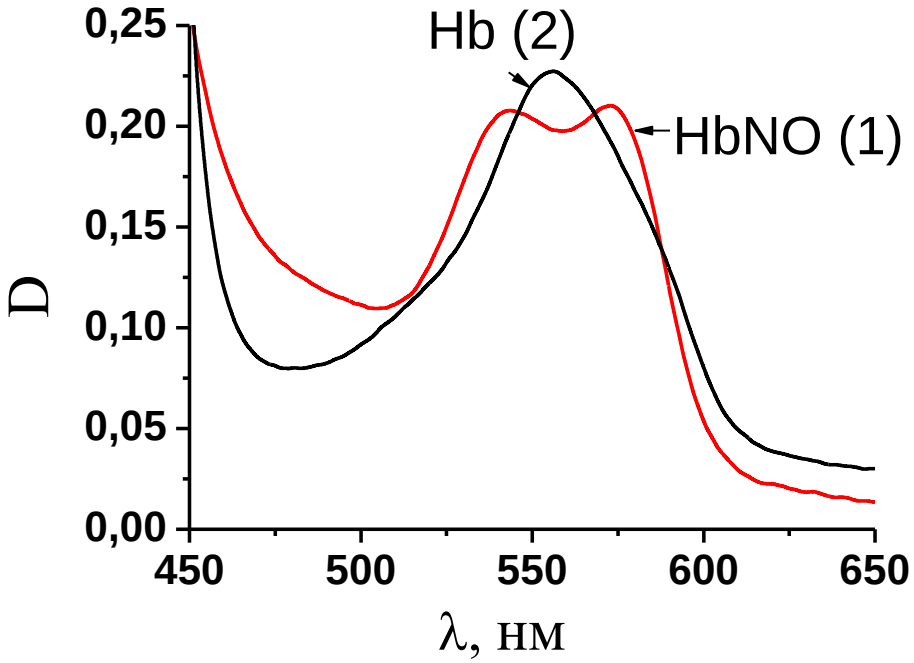


Рисунок 11 - Спектры поглощения раствора HbNO (1), полученного при уравновешивании раствора $4.7 \cdot 10^{-6}$ М Hb в 0.05 М фосфатного буфера и этого раствора Hb (2) (pH 7.0; 1 атм. NO; 25 °C).

Связывание Hb с NO ограничено только скоростью диффузии и практически необратимо (по данным работы [96] константа связывания $3 \cdot 10^{10}$ M^{-1}, а по данным [105] - 10^{12} M^{-1}). Оно не имеет кооперативного характера и при этом существенных изменений в структуре Hb не происходит.

Сродство Hb к NO на три порядка больше, чем к CO [105]. Вследствие этого NO вытесняет CO из HbCO:

$HbCO + NO \rightarrow CO + HbNO$

Связывание с NO, в отличие от CO, не вызывает каких-либо негативных последствий, и успешно применяется для лечения некоторых заболеваний [106]. Это связано с тем, что молекула CO при связывании переводит Hb в T-форму, которая обладает низким сродством к кислороду. Следует отметить, что взаимодействие одной молекулы NO с белком тоже приводит к изменению сродства к кислороду, но это зависит от кислотности

среды: чем ниже pH, тем меньше сродство Hb к O_2. В работе [107] было показано, что при pH 7.4 сродство частично нитрозилированного белка к O_2 выше, чем сродство нативного белка, а при pH 5.8 авторы наблюдали обратное соотношение. Следовательно, ограниченное нитрозилирование способствует улучшению транспорта кислорода к тканям.

По данным работы [108], если белок полностью насыщен O_2, то при его взаимодействии с NO будет образовываться metHb и нитрат (константа скорости данной реакции равна $3 \cdot 10^7$ $M^{-1}c^{-1}$). Но в физиологических условиях белок не полностью насыщен O_2, и концентрация NO гораздо меньше числа свободных мест для его связывания. Поэтому в данных условиях, помимо реакции окисления Hb, проходит реакция образования нитрозильных комплексов [109]. Также интересно отметить, что образование HbNO может происходить не только в растворах Hb, но также и при обработке NO цельных эритроцитов [110].

В организме человека, как показано авторами работы [14], происходят следующие процессы. При взаимодействии NO с оксигемоглобином (HbO_2) в артериальной крови образуется нитрат и метгемоглобин: $HbO_2 + NO \rightarrow metHb + NO_3^-$. Нитрозилгемоглобин получается в венозной крови: Hb + NO $\rightleftharpoons$ HbNO. Когда HbNO попадает в артериальную кровь, с более высоким pO_2, он распадается и высвобождает молекулу NO, которая в образующемся HbO_2 нитрозилирует SH-группу: $HbNO + O_2 \rightarrow SNO{-}HbO_2$

В T-форме SH-группа “спрятана” и поэтому не взаимодействует с NO. А нитрозотиол SNO-Hb образуется при реакции белка с R-формой, так как в данной форме SH-группа находится на поверхности белка. Выше отмечалось, что нитрозотиолы, в том числе и SNO-Hb являются одной из основных форм хранения оксида азота в организме [14, 111]. Предполагается, что нитрозотиолы Hb действуют как “аллостерически контролируемый буфер монооксида азота” и обменивают свою NO-группу с тиолами среды, и этим они изменяют кровоток, выполняя роль критического фактора, определяющего доставку O_2 [112].

1.3.2 Цитохром С и его железо-нитрозильный комплекс. Их структура, свойства и биологическая роль

Цитохром С представляет собой небольшой железосодержащий белок растений, животных и некоторых простейших. С одной стороны, этот белок является одноэлектронным переносчиком и необходимой компонентой дыхательной цепи. С другой стороны, при определенных условиях он активирует апоптоз.

Структура, физико-химические свойства, спектральные характеристики и биологическая роль Cyt C

Впервые название “цитохром” для группы внутриклеточных гемопротеидов предложил Кейлин [113]. Трехмерная структура цитохрома С из сердца лошади была установлена Дикерсеном с сотрудниками [114]. Существует четыре типа цитохромов, которые различаются боковыми цепями порфириновых структур. Цитохромы, как и Hb, имеют активный центр - группу гема. В Cyt C 6-координационный гем, относящийся к типу c, расположен во внутреннем кармане, образованном свернутой полипептидной цепью, и связан с белком через атомы цистеина Cys-14 и Cys-17. Строение гема приведено на рисунке 12 [115]. Cyt C имеет небольшую для белков молекулярную массу, равную 12.3 кДа.

В состав Cyt C входит 104 аминокислотных остатка. Атом железа в структуре гема Cyt C может быть в восстановленном (Fe^{2+}) и в окисленном (Fe^{3+}) состоянии. В ферро- (Cyt C^{2+}) и феррицитохроме (Cyt C^{3+}) 5-ое и 6-ое координационные положения атома железа заняты

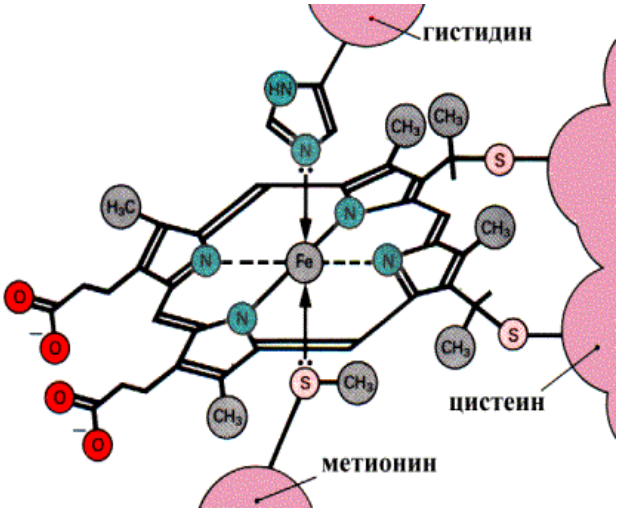


Рисунок 12 - Гем Cyt C.

метионином-80 и гистидином-18, в отличие от гема Hb, в котором 6-ое положение свободно. В обеих формах цитохрома группа гема располагается во впадине молекулы; она практически полностью окружена полипептидной цепью, за исключением одного края порфиринового кольца, локализованного у поверхности молекулы.

Редокс-потенциал Cyt C равен + 0.254 В [116].

Cyt C при нейтральных значениях pH не взаимодействует с O_2. Тиолы, аскорбаты, хиноны и восстановленные Cyt b и Cyt c_1 восстанавливают Cyt C. Феррицианид, некоторые красители и Cyt a окисляют Cyt C.

В спектре поглощения Cyt C^{2+} имеются три выраженные полосы поглощения в видимой области: максимумы при 416 нм ($129.1 \cdot 10^3$ $M^{-1} \cdot см^{-1}$), 520 нм ($15.9 \cdot 10^3$ $M^{-1} \cdot см^{-1}$) и 550 нм ($\varepsilon = 27.7 \cdot 10^3$ $M^{-1} \cdot см^{-1}$); в порядке уменьшения длин волн они обозначаются как α-, β- и γ-полосы [117, 118]. Cyt C^{3+} имеет две полосы поглощения: максимумы поглощения при 410 нм ($\varepsilon = 106.1 \cdot 10^3$ $M^{-1} \cdot см^{-1}$) и при 525 нм ($\varepsilon = 11.2 \cdot 10^3$ $M^{-1} \cdot см^{-1}$) [119] (рисунок 13).

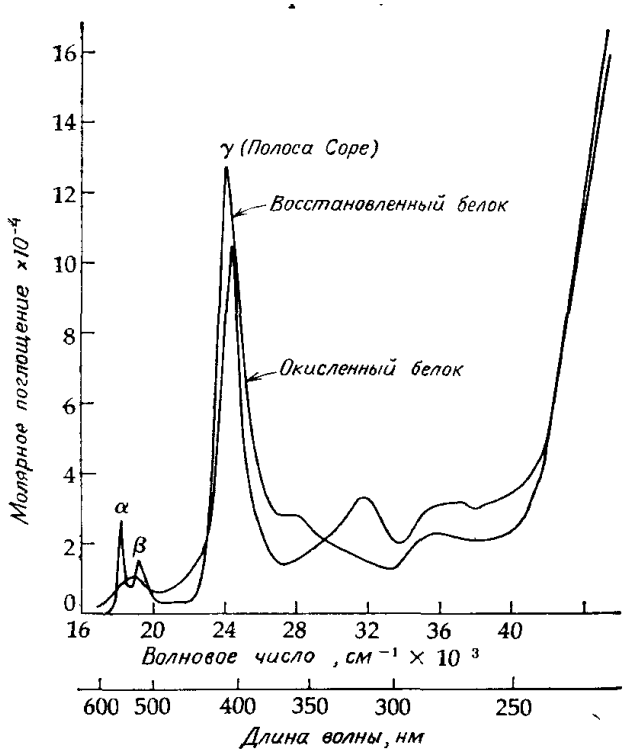


Рисунок 13 - Спектр поглощения Cyt C.

Cyt C в первую очередь известен своей функцией в митохондриях в качестве ключевого участника процесса жизнеобеспечения клетки - синтеза АТФ [120]. Он является переносчиком электронов в процессе окислительного фосфорилирования. В окисленном состоянии Cyt C образует комплекс с комплексом III (убихинон-цитохром с-оксидоредуктаза), принимает от него электрон и далее диффундирует по поверхности мембраны к комплексу IV (цитохром с-оксидаза) [121, 122]. Также Cyt C может служить регулятором распределения потоков электронов между системами свободного и фосфорилирующего окисления [123].

Другая важная функция Cyt C заключается в его участии в апоптозе [124, 125]. Как только в ходе определённых биохимических процессов высвобождаются белки межмембранного пространства митохондрий, включая Cyt C, клетка приговаривается к смерти. Выходу Cyt C, как правило, предшествует «митохондриальный стресс», который по большей части обусловлен усиленным образованием свободных радикалов [126, 127].

Железо-нитрозильные комплексы цитохрома С.
Их физико-химические свойства и биологическая роль

У Hb, миоглобина, пероксидазы свободна 6-ая координационная связь железа гема, и поэтому реакция с NO проходит быстрее, чем у белков, в которых все координационные связи заполнены (например, Cyt C), так как последним необходима дополнительная энергия, чтобы вытеснить 6-ой лиганд (рисунок 12). При взаимодействии NO с железом гема в структуре цитохрома С сначала происходит разрыв связи между железом и метионином, а затем присоединяется NO. Из-за этих дополнительных энергозатрат скорость реакции и константы равновесия ниже, чем для Hb (Таблица 5) [117, 128, 129].

$$\text{Cyt C}^{3+}\ (\text{Cyt C}^{2+}) + \text{NO} \rightleftharpoons \text{NO—Cyt C}^{3+}\ (\text{NO—Cyt C}^{2+})$$

Таблица 5 - Константы скорости реакций взаимодействия NO с Cyt C.

Форма цитохрома	$k_{асс}$, моль$^{-1}$·л·с$^{-1}$	$k_{дисс}$, с$^{-1}$
Cyt C^{2+}	8.3	$2.9\cdot10^{-5}$
Cyt C^{3+}	$7.2\cdot10^{2}$	$4.4\cdot10^{-2}$
Cyt C^{3+}	$1.3\cdot10^{3}$	$8.7\cdot10^{-2}$

Константа равновесия для реакции образования NO—Cyt C^{2+} составляет $3\cdot10^{5}$ моль$^{-1}$·л, а для NO—Cyt C^{3+} - $1.63\cdot10^{4}$ моль$^{-1}$·л.

При взаимодействии Cyt C^{3+} с NO в спектре поглощения белка происходят изменения, которые дают изобестическую точку (рисунок 14). Максимумы спектра поглощения наблюдаются при 415 нм (ε = $1.45\cdot10^{5}$ M^{-1}·см$^{-1}$), 527 нм (ε = $1.0\cdot10^{4}$ M^{-1}·см$^{-1}$) и 560 нм.

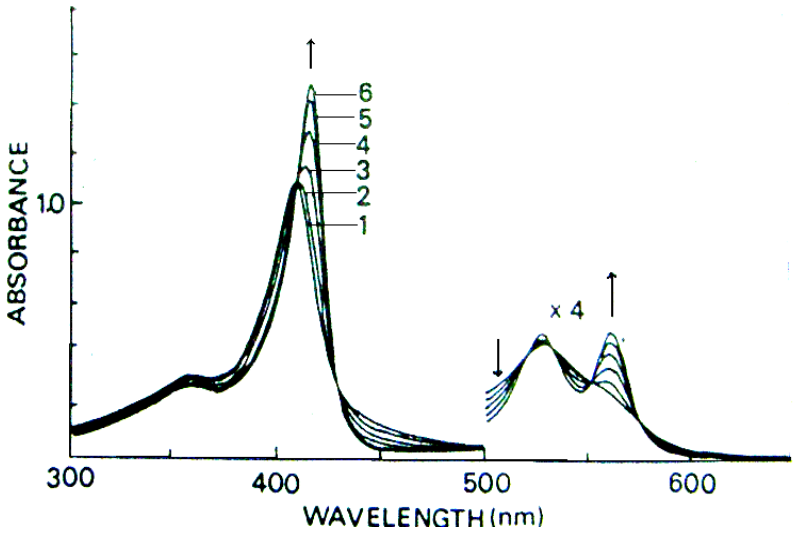


Рисунок 14 - Изменения спектров поглощения $1.1\cdot10^{-5}$ M Cyt C^{3+} в водном растворе в присутствии NO: 1, [NO] = 0 M; 2, [NO] = $1.01\cdot10^{-5}$ M; 3, [NO]=$3.04\cdot10^{-5}$ M; 4, [NO] = $8.86\cdot10^{-5}$ M; 5, [NO] = $2.56\cdot10^{-4}$ M; 6, [NO] = $1.01\cdot10^{-3}$ M [117].

Cyt C^{2+} реагирует с NO при pH 7.0 медленно. Скорость образования аддукта NO—Cyt C^{2+} увеличивается с увеличением концентрации NO. Авторами исследования [117] было установлено, что Cyt C^{2+} в присутствии

NO при 300 Торр полностью превращается в NO—Cyt C^{2+} только за 12 часов. При удалении избытка NO из раствора вакуумированием комплекс NO—Cyt C^{2+} медленно распадается на Cyt C^{2+} и NO.

В работе [130] было показано, что скорость взаимодействия Cyt C^{2+} с NO сильно зависит от pH. При pH 3.05 NO—Cyt C^{2+} образуется быстро (рисунок 15 А). Спектр поглощения не изменялся в течение, по крайней мере, 4 часов. Скорость образования NO—Cyt C^{2+} становилась меньше при увеличении pH. При pH 6.10 на установление равновесия было необходимо 4 часа. А при pH 10.70 образование NO-Cyt C^{2+} происходило даже после 15 часов. Однако, следует отметить, что даже при нейтральных pH NO-Cyt C^{2+} образуется, хотя скорость образования очень медленная. При pH 12.85 в 0.2 Н NaOH, NO—Cyt C^{2+} образуется очень быстро, максимумы при 538 и 567 нм (рисунок 15 В).

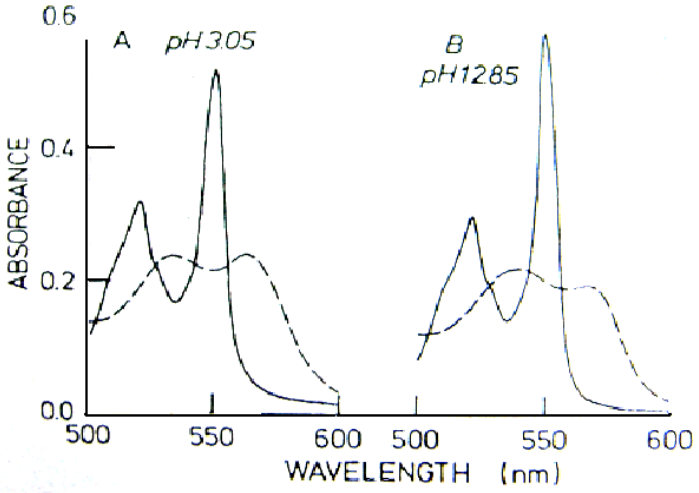


Рисунок 15 - Влияние NO на Cyt C $^{2+}$. Сплошная линия - спектр Cyt C^{2+}, штриховая линия - спектр NO—Cyt C^{2+}, полученный через 2 минуты после пропускания NO через раствор Cyt C^{2+} [130].

Также следует отметить окислительно-восстановительные реакции Cyt C^{3+} и Cyt C^{2+} с NO. В работе [130] описана реакция восстановления Cyt C^{3+} NO в анаэробных условиях. NO-Cyt C^{3+} существует в равновесии со своей резонансной формой NO^{+}-Cyt C^{2+}:

$NO + Cyt\ C^{3+} \rightleftharpoons [NO\text{-}Cyt\ C^{3+}] \rightleftharpoons NO^{+}\text{-}Cyt\ C^{2+}$,

при гидратации которой образуются нитриты:

$NO^{+}\text{-}Cyt\ C^{2+} \rightleftharpoons Cyt\ C^{2+} + NO^{-}_{2} + 2H^{+}$,

причем равновесие реакции сильно зависит от pH среды (рисунок 16).

Авторы работы [130] установили, что при pH ниже 6 моментально образуется NO-Cyt C^{3+}, который стабилен, по крайней мере, несколько часов (рисунок 16 A). Между значениями pH 6 и 10 спектры поглощения менялись во времени. При pH = 7.24 через 2 минуты от начала реакции авторы наблюдали образование NO-Cyt C^{3+}, а через несколько часов уже регистрировали сложный спектр, состоящий из Cyt C^{2+}, NO-Cyt C^{3+} и NO-Cyt C^{2+} (рисунок 16 B). При pH 8.88 при записи начального спектра поглощения авторы сразу наблюдали образование Cyt C^{2+} и NO-Cyt C^{2+}, хотя небольшое количество NO-Cyt C^{3+} также присутствовало, на что указывал маленький пик при 530 нм. Выше pH 10 продукт NO-Cyt C^{2+} преобладал. При pH 12.85 при записи начального спектра авторы убеждались, что моментально образовался комплекс NO-Cyt C^{2+} (рисунок 16 D).

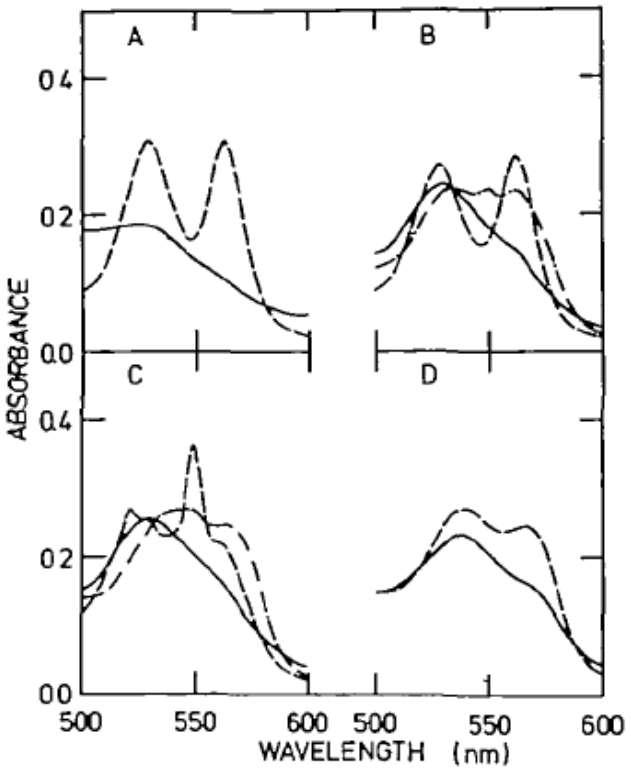


Рисунок 16 - Влияние NO на Cyt C^{3+}. Сплошная линия относится к спектру Cyt C^{3+}; ---- спектр записан через 2 мин после введения NO; -·-·-· стабильный спектр, записанный несколько часов спустя [130].

В работе [129] было показано, что в присутствии кислорода, происходит окисление Cyt C^{2+} с константой скорости 200 $M^{-1}c^{-1}$:

$Cyt\ C^{2+} + NO \rightleftharpoons NO\text{—}Cyt\ C^{3+} + NO^{-}$

По данным работ [131, 132] комплекс NO—Cyt C^{2+} является парамагнитным с сигналом ЭПР g ~ 2.0. А комплекс NO—Cyt C^{3+} - диамагнитен [133].

Реакции NO с Cyt C в обеих формах имеют большое значение для дыхательной цепи митохондрий. Так, образование нитрозильных комплексов Cyt C может привести к ингибированию цепи переноса электронов. Если 6-координационная связь оказывается занятой у NO—Cyt C, то это в свою очередь затруднит доступ H_2O_2 к атому железа и резко снизит пероксидазную активность Cyt C [134], что можно использовать для регуляции апоптоза.

1.4 О роли GSH

Глутатион является ключевой молекулой окислительно-восстановительных процессов, связанных с тиол-дисульфидным обменом [135]. Отношение восстановленного глутатиона (GSH) к окисленному (GSSG) составляет основу окислительно-восстановительного гомеостаза [136, 137]. GSH представляет собой водорастворимый трипептид, состоящий из аминокислот – глутаминовой кислоты, цистеина и глицина. GSH является наиболее распространённым небелковым тиолом в клетках животных: его концентрации в тканях человека составляют от 0.1 до 10 мМ, причем находится он в основном в своей восстановленной форме, а концентрация окисленной формы, как правило, не превышает 1% от его общего внутриклеточного содержания [138]. Наибольшей концентрации GSH достигает в печени, селезёнке, почках, хрусталике глаза, эритроцитах и лейкоцитах. Функции GSH чрезвычайно важны и разнообразны. Он участвует в репарации ДНК, апоптозе, антиоксидантной защите, фолдиге белка, образовании энергии, пролиферации и тд. [135, 139].

Нарушение соотношения GSH/GSSG оказывает существенное влияние с точки зрения редокс-регуляции функционирования белков на процессы сигнальной трансдукции, контроля экспрессии генов, клеточной пролиферации, дифференцировки, состояние клеточного метаболизма и

жизнедеятельности клетки в целом [140, 141]. Установлена взаимосвязь между метаболизмом GSH и такими болезнями, как рак, нейродегенеративные болезни, кистозный фиброз, HIV, а также старение [139]. Кроме того, GSH может осуществлять S-глутатионилирование существенных ферментов, рецепторов, структурных белков, факторов транскрипции и транспортных белков. Эти изменения, естественно, имеют далеко идущие последствия для нормальной биологии клетки. Например, обнаружена связь окислительного стресса и онкогенеза, которая основана на глутатионилировании опухолевого супрессора p53 [142]. Эта посттрансляционная модификация характерна для многих редокс-чувствительных белков в условиях окислительного и нитрозативного стресса [143]. Глутатионилирование белка p53, предположительно, препятствует тетрамеризации p53 и поэтому подавляет его ДНК-связывающую активность [15]. Отмечено, что в опухолях, для которых характерны повышенные уровни активных форм кислорода, обнаруживается глутатионилированный белок p53 [144].

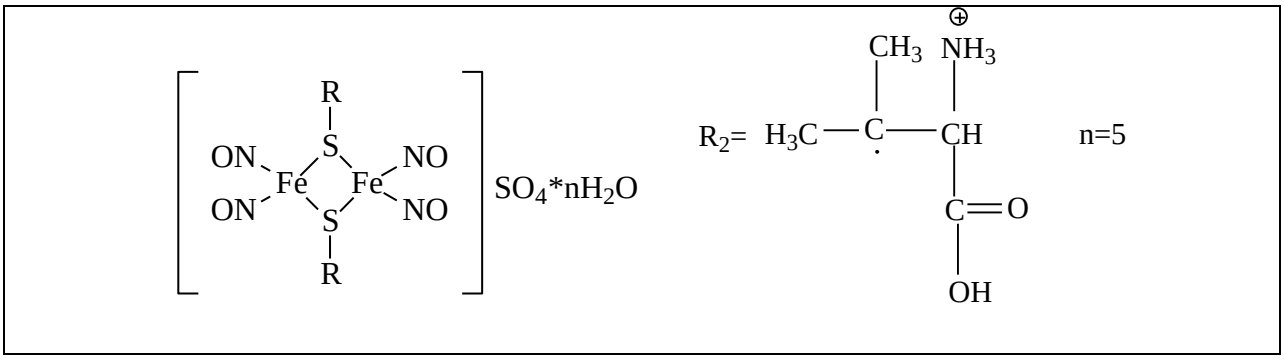
Новейшие подходы к лечению рака базируются на модуляции GSH − уменьшении его высокой локальной концентрации в злокачественных опухолях, и направлены на контроль роста возникающих в этой связи ассоциированных изменений. Несмотря на потенциальные выгоды такой селективной стратегии уменьшения содержания GSH, такая методология остается недостижимой до сих пор [145].

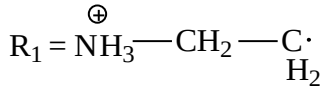
ГЛАВА 2.
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

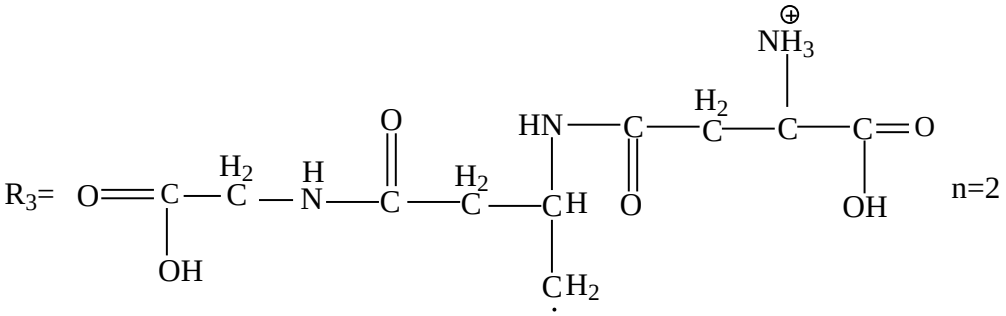
В работе использован Sephadex G-25 («Pharmacia», Швеция), $Na_2S_2O_4$ дитионит натрия («Merck», Германия), Tris (Serva, Германия), Cyt C из сердца лошади («Serva» Германия), Hb бычий («MP Biomedicals») $Na_2HPO_4 \cdot 6H_2O$ и $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, сафранин Т, метиленовая синь (MP Biomedicals, Германия), метилвиологен («Serva», Германия), сульфат железа (II), L-аскорбиновая кислота и лимонная кислота («Serva», Германия), D-пеницилламин и цитохром С из сердца лошади (SIGMA, США), пластинки для TCX Silica gel 60 F_{254} («Merck», Германия), ацетонитрил LC-MS grade («Panreac», Испания), L-глутатион, восстановленная форма (ALDRICH, США). х.ч. ДМСО («Химмед», Россия) дополнительно очищали перегонкой при 10 Торр, собирая фракцию с т. кип. 73-75 °С по описанной методике [69]. Воду очищали последовательной перегонкой в дистилляторе Д-4 и в аппарате из пирекса для двойной перегонки воды – пураторе Bi/Duplex (Германия).

Биядерные нитрозильные комплексы железа (рисунок 17) были синтезированы по описанным методикам [11, 94, 95, 146, 147] в лаборатории С.М. Алдошина (ИПХФ РАН) д.х.н. Н.А. Саниной с сотрудниками и любезно предоставлены для исследований. Данные для CysAm, Pen, Ph, AmPh внесены в Кембриджский банк структурных данных органических соединений под номерами CCDC 663194, 680286, 719845, 932314, соответственно.

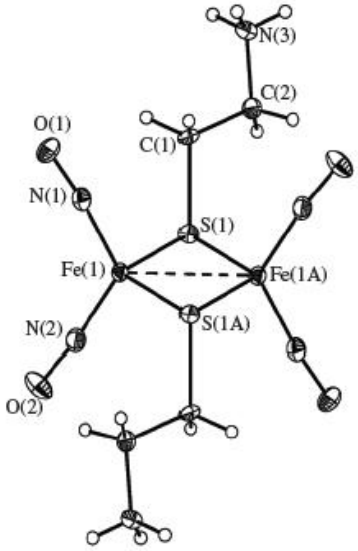




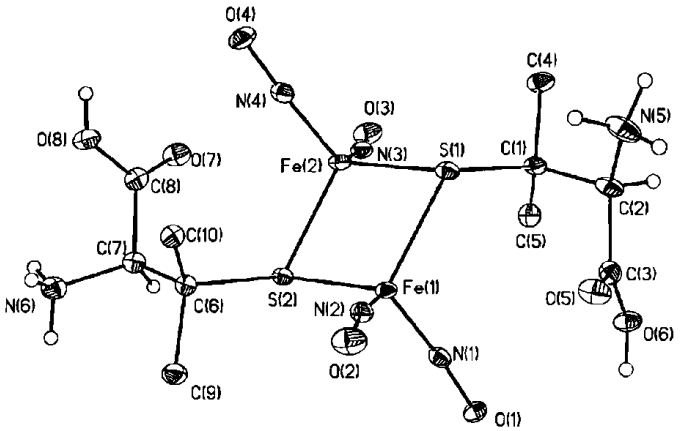
n=2.5



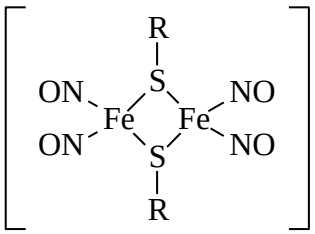
n=2

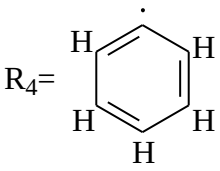


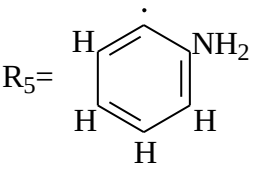
CysAm

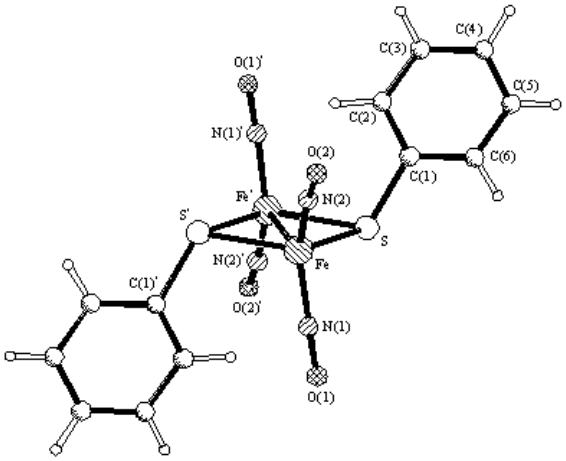


Pen

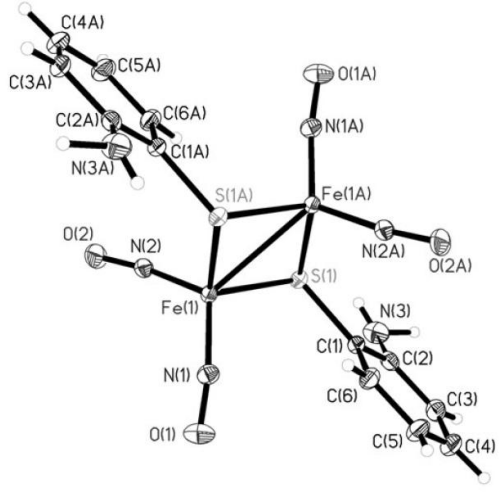




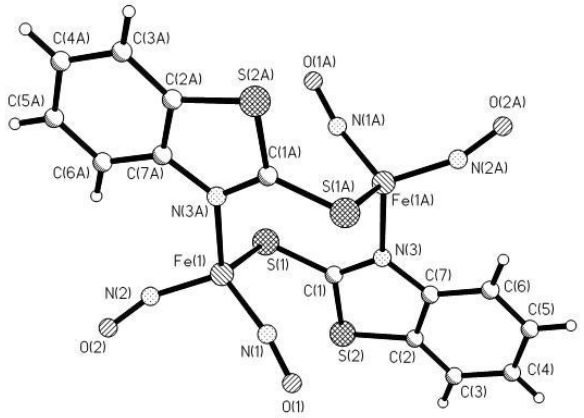




Ph



AmPh



BTz

Комплекс $[Fe_2(S(CH_2)_2NH_3)_2(NO)_4]SO_4 \cdot 2.5H_2O$ (лиганд R_1) **CysAm**

Комплекс $[Fe_2(SC_4H_3N_2)_2(NO)_4]SO_4 \cdot 5H_2O$ (лиганд R_2) **Pen**

Комплекс $[Fe_2(SC_{10}H_{17}N_3O_6)_2(NO)_4]SO_4 \cdot 2H_2O$ (лиганд R_3) **Glut**

Комплекс $[Fe_2(SC_6H_5)_2(NO)_4]$ (лиганд R_4) **Ph**

Комплекс $[Fe_2(SC_6H_6N)_2(NO)_4]$ (лиганд R_5) **AmPh**

Комплекс $[Fe_2(S_2C_7H_4N)_2(NO)_4]$ **BTz**

Рисунок 17 - Строение НКЖ структурного «μ-S» и «μ-N-C-S» типа.

Техника работы в атмосфере азота (аргона)

Все эксперименты проводили в атмосфере азота или аргона. Азот высокой чистоты дополнительно очищали пропусканием через колонку с хромоникелевым катализатором при 20 °С. Из рабочих растворов (буфер, ДМСО, растворы реагентов) удаляли воздух вакуумированием и пропусканием азота (аргона) при перемешивании на магнитной мешалке в течение 30-120 минут (в зависимости от объема раствора). Далее эти растворы будут называться анаэробными. Все сосуды и кварцевые кюветы, используемые в опытах, герметизировали с помощью резиновых затворов (Rubber Septa, «Sigma», США), которые позволяют вводить газ или нужные компоненты через иглу. Для перенесения раствора из одного сосуда в другой использовали шприцы с припаянными иглами, либо переводили раствор под

избыточным давлением аргона или азота посредством двух игл, соединенных тефлоновыми капиллярами. Избыточное давление сбрасывали через другую иглу, на которую был надет тефлоновый капилляр, погруженный в воду (запорную жидкость). Кюветы из кварца, сосуды объемом 5-15 мл с навесками исследуемых соединений или с растворами других реагентов продували через иглы азотом (аргоном) по 30 минут.

Распад CysAm, Ph, AmPh, BTz в ДМСО. К навеске комплексов в сосуде, заполненном аргоном или азотом, прибавляли абсолютный ДМСО и растворяли при перемешивании на магнитной мешалке при 25 ^{o}C. Далее под током аргона (азота) отбирали 3 мл раствора НКЖ и вводили в анаэробную опытную кювету. Регистрировали спектры поглощения для Ph, AmPh и BTz. Кювета сравнения содержала 3 мл абсолютного ДМСО. Конечные концентрации НКЖ в опытных кюветах приведены в подписях к рисункам.

Распад CysAm, Pen, Glut, Ph, AmPh, BTz в фосфатном буфере pH=7.0, Трис-HCl буфере pH=7.0, цитрат-фосфатном буфере pH=3.0 или воде. К навеске комплексов (CysAm, Pen, Glut) в сосуде, заполненном аргоном (азотом), прибавляли Трис-HCl буфер (фосфатный буфер, воду или цитрат-фосфатный буфер) и растворяли при перемешивании на магнитной мешалке при 25 ^{o}C. Далее под током аргона отбирали исходный раствор в шприц и вводили в анаэробную опытную кювету, уже содержащую растворитель. Для экспериментов с CysAm, Ph, AmPh и BTz использовали растворы данных НКЖ, которые готовили в абсолютном ДМСО, как описано выше. Под током аргона отбирали растворы комплексов в ДМСО в шприц и переносили в анаэробную опытную кювету, содержащую анаэробный Трис-HCl буфер pH 7.0 (в случае CysAm- фосфатный буфер pH 7.0). Во всех опытах кювета сравнения содержала 3 мл Трис-HCl (фосфатного буфера, воды). Конечные концентрации НКЖ в опытных кюветах приведены в подписях к рисункам.

Оксиление комплексов CysAm, Pen с помощью $K_3[Fe(CN)_6]$ проводили со свежеприготовленным раствором в воде (Трис-HCl буфере pH 7.0), как описано выше. Далее под током аргона отбирали раствор в шприц и вводили

в анаэробную опытную кювету, уже содержащую воду (Трис-HCl буфер pH 7.0). Реакцию начинали введением в опытную кювету анаэробного раствора $K_3[Fe(CN)_6]$. Спектры поглощения были записаны сразу после введения $K_3[Fe(CN)_6]$. Конечные концентрации реагентов в опытных кюветах приведены в подписях к рисункам.

Взаимодействие Pen и CysAm с редокс-индикаторами (метилвиологеном, сафранином Т и метиленовым синим). В анаэробную опытную кювету, содержащую водный раствор редокс-индикатора, вводили раствор НКЖ, который готовили в воде, как описано выше. Кювета сравнения содержала раствор НКЖ. Спектр поглощения был записан сразу после введения НКЖ. Конечные концентрации НКЖ и редокс-индикаторов приведены в подписях к рисункам.

Кинетика взаимодействия НКЖ с GSH. Для экспериментов использовали растворы НКЖ в Трис-HCl буфере pH 7.0, которые готовили, как описано выше. Под током аргона отбирали раствор НКЖ (CysAm и Pen) в шприц и вводили в анаэробную опытную и контрольную кюветы, уже содержащие Трис-HCl буфер. В случае Ph, AmPh и BTz раствор НКЖ вводили только в опытную кювету. Реакцию начинали введением в опытную кювету анаэробного раствора GSH, приготовленного в 0.1 М Трис-HCl буфере. Кювета сравнения содержала Трис-HCl буфер pH 7.0 и НКЖ (в случае CysAm и Pen) или только Трис-HCl буфер pH 7.0 (в случае Ph, AmPh и BTz). Конечные концентрации реагентов в опытных кюветах приведены в подписях к рисункам.

Получение раствора Hb. Гомогенный препарат бычьего Hb получали из бычьего Hb фирмы «MP Biomedicals», представляющего собой смесь metHb и HbO_2. На всех стадиях получения Hb использовали 0.05 М фосфатный буфер pH 7.0. Для превращения смеси metHb с HbO_2 в Hb предварительно готовили колонку 2·15 см с сефадексом G-25 и переводили ее в анаэробное состояние. Для этого пропускали 1 колоночный объем (50 мл) анаэробного буфера, затем 40 мл буфера, содержащего 5 мл дитионита Na с

концентрацией 100 мг/мл. Оставляли колонку на 30 мин. Затем отмывали колонку от дитионита, пропуская 50 мл анаэробного буфера до появления отрицательной реакции на дитионит с метилвиологеном. 0.5 г коммерческого Hb растворяли при перемешивании в 5 мл буфера, продували 30 мин азотом при перемешивании, прибавляли 2 мл дитионита с концентрацией 100 мг/мл. Записывали спектр поглощения аликвоты раствора и убеждались, что metHb с HbO_2 превратились в Hb. После этого удаляли избыток дитионита и продуктов его распада на колонке с сефадексом G-25. На выходе из колонки собирали 5 мл Hb с концентрацией $6 \cdot 10^{-4}$ М. Хранили Hb замороженным в виде шариков в жидком азоте. Перед использованием Hb размораживали в сосудах объёмом 5 мл в токе аргона или азота. Показателем нативности и гомогенности Hb служило совпадающее с литературными данными отношение экстинкций всех максимумов поглощения.

Кинетика взаимодействия Hb с НКЖ. Исходные растворы НКЖ готовили, как описано выше. Hb размораживали, переносили в опытную кювету, содержащую фосфатный буфер pH 7.0, Трис-HCl буфер pH 7.0 или воду и записывали спектры поглощения, чтобы убедиться, что имеем дезоксигемоглобин. Реакцию начинали введением в контрольную и опытную кюветы раствора НКЖ. Регистрацию спектров поглощения проводили сразу после введения НКЖ с интервалами, указанными в работе. Конечные концентрации реагентов в опытных кюветах приведены в подписях к рисункам.

Кинетика взаимодействия НКЖ с Hb в присутствии GSH.

Аналогичным образом изучали взаимодействие Hb с НКЖ в присутствии GSH в анаэробном Трис-HCl буфере pH 7.0. В анаэробные кюветы вводили буфер, НКЖ и раствор GSH в 0.1 М Трис-HCl буфере pH 7.0. Реакцию начинали введением в опытную кювету раствора НКЖ. Далее записывали разностные спектры поглощения через определенные интервалы времени, приведённые на рисунках. Конечные концентрации реагентов в опытных кюветах приведены в подписях к рисункам.

Получение раствора Cyt C^{3+}. Cyt C^{3+} получали из коммерческого препарата Cyt C^{3+}, который содержит 10 % Cyt C^{2+}. На всех этапах получения Cyt C^{3+} использовали 0.05 М фосфатный буфер pH 7.0. Окисление исходного коммерческого Cyt C^{3+} проводили $K_3[Fe(CN)_6]$ с концентрацией $2 \cdot 10^{-2}$ М в 0.05 М фосфатном буфере, pH 6.5. Для освобождения от феррицианида калия предварительно готовили колонку 2·15 см с сефадексом G-25, пропустив 3 колоночных объема (150 мл) фосфатного буфера pH 7.0. 9 мг коммерческого Cyt C^{3+} растворяли при перемешивании в 3 мл 0.05 М фосфатного буфера pH 6.5, затем прибавляли 0.1 мл раствора $K_3[Fe(CN)_6]$. Окисление белка проводили в течение 10 мин при + 10 °С при постоянном перемешивании раствора. Записывали спектр поглощения аликвоты раствора и убеждались, что получили Cyt C^{3+}. После этого удаляли избыток $K_3[Fe(CN)_6]$ на колонке с сефадексом G-25. На выходе из колонки собирали 5.8 мл Cyt C^{3+} с концентрацией $9.9 \cdot 10^{-5}$ М. Хранили замороженный раствор Cyt C^{3+} в виде шариков в жидком азоте. Перед использованием белок размораживали в сосудах (V=5 мл) в токе аргона или азота. Показателем нативности и гомогенности раствора Cyt C^{3+} служило совпадающее с литературными данными отношение экстинкций всех максимумов поглощения. В тех случаях, когда проводили исследование реакционной смеси в присутствии $K_3[Fe(CN)_6]$, предварительного доокисления раствора коммерческого Cyt C^{3+} не проводили. В этом случае раствор $K_3[Fe(CN)_6]$ вводили в опытную кювету с Cyt C^{3+} и записывали спектр поглощения для проверки полноты окисления.

Получение раствора Cyt C^{2+} при pH 7.0. Препарат Cyt C^{2+} получали из Cyt C^{3+} с концентрацией $6.5 \cdot 10^{-5}$ М pH 7.0. В кювету, имеющую объем 4 мл и длину оптического пути 1 см, вводили 2.7 мл раствора Cyt C^{3+} и 0.3 мл раствора аскорбата с концентрацией $1.3 \cdot 10^{-3}$ М в 0.05 М фосфатном буфере, pH 7.0. Записывали спектр поглощения аликвоты раствора и убеждались, что получили Cyt C^{2+}.

Получение раствора Cyt C^{2+} при pH 3.0. К коммерческому препарату Cyt C^{3+} с концентрацией $6.5 \cdot 10^{-5}$ М pH 7.0 прибавляли 0.15 М раствор лимонной

кислоты до pH 3. Восстановление коммерческого Cyt C^{3+} проводили прибавлением 5 мг сухого аскорбата на воздухе, записывали спектр поглощения аликвоты раствора и убеждались, что получили Cyt C^{2+}. Хранили замороженный Cyt C^{2+} в виде шариков в жидком азоте. Перед использованием Cyt C^{2+} размораживали в сосудах (V=5 мл) в токе аргона или азота. Показателем нативности и гомогенности раствора Cyt C^{2+} служило совпадающее с литературными данными отношение экстинкций всех максимумов поглощения.

Взаимодействие NO с Cyt C^{3+} и Cyt C^{2+}. В анаэробную опытную кювету (V = 4 мл, длина оптического пути l см), вводили 2.5 мл Cyt C^{3+} приготовленного, как описано выше. Записывали спектр поглощения Cyt C^{3+}. Затем в кювету в течение 3 мин, при постоянном встряхивании раствора Cyt C^{3+}, из газометра подавали NO. Записывали спектр поглощения раствора и убеждались, что получили именно NO—Cyt C^{3+}.

Аналогично получали NO—Cyt C^{2+} из предварительно приготовленного Cyt C^{2+} при pH 3.0. Записывали спектр поглощения раствора и убеждались, что получили именно NO—Cyt C^{2+}.

Кинетика взаимодействия Cyt C^{3+} с CysAm или Pen в присутствии $K_3[Fe(CN)_6]$. В опытную кювету вводили раствор коммерческого Cyt C^{3+} в фосфатном буфере pH 7.0 (воде), раствор $K_3[Fe(CN)_6]$ и фосфатный буфер (воду). Записывали спектр поглощения раствора и убеждались, что получили Cyt C^{3+}. Кювета сравнения содержала раствор $K_3[Fe(CN)_6]$. Реакцию начинали прибавлением одновременно в опытную кювету и кювету сравнения раствора НКЖ. Далее записывали разностные спектры поглощения через определённые интервалы времени. Конечные концентрации реагентов в опытных кюветах приведены в подписях к рисункам.

Определение количества Cyt C^{3+}, NO-Cyt C^{3+} и Hb, HbNO.

Для того, чтобы определить концентрацию нитрозилированного белка, спектры поглощения реакционной системы, которая содержит Cyt C^{3+} и NO-

Cyt C^{3+}, либо Hb и HbNO, разлагали на составляющие компоненты с помощью компьютерной программы MathCad, как описано в статье [12].

Масс-спектрометрический анализ проводили на приборе LCMS-2020 Shimadzu, включающем в себя жидкостной хроматограф LC-20 Prominence с матричным фотодетектором SPD-M20A (200-800 нм) и масс-селективный квадрупольный детектор LCMS-2020 (m/z диапазон сканируемых масс: 50-2000; режимы ионизации: DUIS/ESI/APCI). Условия съёмки: метод ионизации – электрораспыление (electrospray ionization, ESI-MS), метод ввода образца – прямой ввод (direct input), растворитель – ацетонитрил, термостатирование (25 ^{o}C), режим съёмки – положительные ионы (positive mode) или отрицательные ионы (negative mode). Образцы для анализа готовили в атмосфере азота (аргона) в 0.05 М Трис-HCl буфере pH 7.0. Сосуды объёмом 2 мл, снабжённые крышкой с уплотнением из PTFE/Silicone/PTFE, позволяющим вводить образцы шприцем, продували азотом или аргоном 10 мин, затем вводили образец.

Электрохимическое определение концентрации NO, выделяемого CysAm и Pen в исследуемых растворах.

Для измерения концентрации NO, генерируемого НКЖ, использовали амперометрический сенсорный электрод ‘‘amiNO-700’’, либо ‘‘amiNO-2000’’ системы ‘‘inNO Nitric Oxide Measuring System’’ (Innovative Instruments, Inc., USA). Концентрация NO в водном растворе фиксировалась в течение около 500 секунд (для Pen) или 1.5 ч (для CysAm) (с шагом 0.2 секунды). Для калибровки сенсорного электрода использовали стандартный водный раствор 100 мкМ $NaNO_2$, который добавляли в смесь водных растворов 0.12 М KI (18 мл) и 1 М H_2SO_4 (2 мл) [148]. В работе использовался фосфатный буфер pH=7.0. Удаление кислорода из буфера для экспериментов в анаэробных условиях осуществлялось трёхкратным вымораживанием и откачкой в вакууме с использованием стандартной вакуумной линии и технологии Шленка, после чего буфер хранился не больше суток в закрытых колбах с притертыми шлифами. Навеску комплекса с расчётом, чтобы получить в

ячейке концентрацию Pen $4 \cdot 10^{-6}$ М или CysAm $6 \cdot 10^{-4}$ М, помещали в небольшой сосуд с затвором и пропускали через этот сосуд инертный газ в течение 10 минут. Затем подготовленный фосфатный буфер через продутый инертным газом шприц помещали в сосуд с навеской Pen и перемешивали в течение 10-15 минут до полного растворения навески. В это же время через подключенную к термостату измерительную электрохимическую ячейку, снабженную затворами Rubber Septa (“Sigma”, США), содержащую 49.5 мл подготовленного фосфатного буфера (в случае Pen) и 13.4 мл (в случае CysAm) и погруженными в него термодатчиком и электродом, пропускали инертный газ в течение 30-40 минут. Затем из сосуда с раствором НКЖ шприцом отбирали 0.5 мл (Pen) или 6.6 мл (CysAm) раствора и через резиновый затвор вводили в измерительную ячейку; в этот же самый момент начинали регистрацию NO в системе.

Спектры поглощения регистрировали при 25 °С (23 °С) на спектрофотометре «Specord M-40», снабженном интерфейсом для компьютерной регистрации спектров и термостатируемым кюветным отделением.

Для кинетического моделирования была рассмотрена предполагаемая схема реакций, которая описывает исследуемые процессы. Значения констант скорости определены методом наименьших квадратов на основе численного решения соответствующей системы дифференциальных уравнений. В качестве экспериментальных данных использованы текущие концентрации NO и НКЖ, определённые при гидролизе с помощью сенсорного электрода и по спектрам поглощения.

Спектры ЭПР регистрировали при комнатной температуре на радиоспектрометре SE/X 2544 (Radiopan, Poznan). Амплитуда модуляции магнитного поля 0.125 мТл, СВЧ мощность около 5 мВт. Концентрацию парамагнитных частиц определяли сравнением вторых интегралов спектров ЭПР исследуемых образцов и стандарта. В качестве стандарта использовали 1 мМ раствор стабильного нитроксильного радикала в воде. Точность

определения концентрации около 20%. Исследовали спектры порошка CysAm и растворов CysAm в ДМСО и воде. Растворы с концентрацией 1 мМ готовили непосредственно перед регистрацией спектров ЭПР. Спектры регистрировали через различное время после приготовления растворов, чтобы оценить стабильность комплексов в растворе.

Спектры ЯМР ^{1}H записывали на спектрометре высокого разрешения Bruker AVANCE III 500 с рабочей частотой 500 MHz при комнатной температуре (23 °C). Свежеприготовленные образцы для исследования растворенные в дейтерированном D_2O (99.8 ат. % D) или ДМСО-d6 (ALDRICH, дейтерированный на 99.5 %) помещали в стандартные ампулы для высокого разрешения с внешним диаметром 5 мм. Спектры ЯМР ^{1}H регистрировали с использованием стандартной импульсной последовательности 90^0 импульсов с задержкой между ними 3 с и числом накоплений 32. Частоты сдвигов ЯМР были откалиброваны по остаточным сигналам протонов дейтерированных растворителей.

Квантово-химические расчеты проводили с полной оптимизацией геометрий исходных, образующихся и промежуточных комплексов по программе Gaussian 09 (версия D) [149] с помощью локального функционала BP86 и базисного набора 6-311++G**/6-31G* с учетом сольватации в водном растворе в рамках модели поляризуемого континуума (PCM).

Анализ поверхности Hb проводили с помощью программы PyMOL [150]**.** Для просмотра и анализа поверхности Hb использовали данные рентгено-структурного анализа бычьего дезоксигемоглобина [151], извлеченные из базы данных PDB, код доступа 1HDA [152].

ГЛАВА 3.
РАСПАД КАТИОННЫХ НКЖ СТРУКТУРНОГО "μ-S" ТИПА В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ И В ДМСО. МОНОЯДЕРНАЯ И БИЯДЕРНАЯ ФОРМЫ НКЖ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕДОКС-ПОТЕНЦИАЛА НКЖ

Биомиметики нитрозильных клеточных интермедиатов, в частности, синтетические модели активных центров нитрозильных железо-серных белков, как уже было описано в литературном обзоре, являются перспективными соединениями для NO-терапии [5]. В данной главе рассмотрены катионные НКЖ структурного "μ-S" типа с цистеаминовыми $[Fe_2(\mu\text{-}S(CH_2)_2NH_3)_2(NO)_4]^{2+}SO_4\cdot 2.5H_2O$ (CysAm) и пеницилламиновыми $[Fe_2(\mu\text{-}SC_5H_{11}NO_2)_2(NO)_4]^{2+}SO_4\cdot 5H_2O$ (Pen) тиолатными лигандами природного происхождения. Они представляют большой интерес в качестве пролекарств, так как являются водорастворимыми, выделяют NO в раствор в результате распада без дополнительной активации и обладают пониженной токсичностью [9, 153]. Кроме того, как показали исследования, CysAm и Pen обладают хорошей противоопухолевой [10] и вазодилататорной [7] активностями.

Молекулярные структуры комплексов CysAm и Pen представлены на рисунке 17. Согласно данным РСА в комплексе CysAm одна молекула сульфатной соли дикатиона $[Fe_2(S(CH_2)_2NH_3)_2(NO)_4]^{2+}$ кристаллизуется с 2.5 молекулами воды, а в комплексе Pen – с 5 молекулами. Каждый дикатион имеет центросимметричную димерную биядерную структуру, где два тетраэдрически координированных атома железа связаны с двумя NO-группами и двумя тиолатными лигандами. Принимая во внимание тот факт, что данные комплексы являются диамагнитными, довольно малое расстояние Fe···Fe может указывать на наличие связи между атомами железа.

Для практического применения НКЖ важно знать строение образующихся в растворах нитрозильных интермедиатов и влияние природы растворителя на их NO-донорную активность.

3.1 Распад катионных НКЖ в водных растворах

В настоящей работе был изучен распад НКЖ в водных буферных растворах и в ДМСО с помощью различных физико-химических методов: по непосредственному определению количества выделившегося NO электрохимически с помощью сенсорного электрода, спектрофотометрически и с помощью методов ЭПР и ЯМР ^{1}H. На основании полученных данных был предложен механизм распада НКЖ в буферных растворах, который отличается от механизма распада нейтрального НКЖ с пиримидиновыми лигандами [13], и установлена причина их различия, связанная с их редокс-потенциалами.

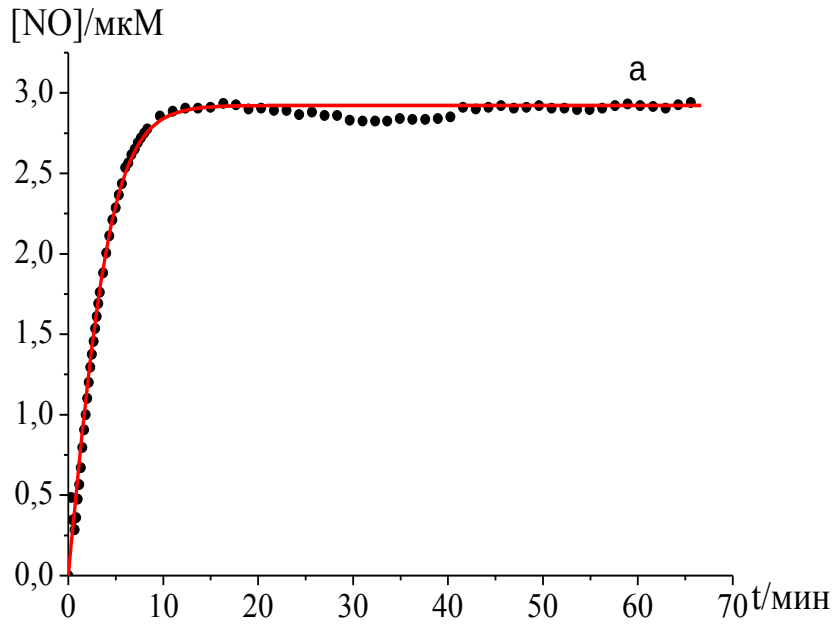
3.1.1 Анализ количества NO, выделяющегося при распаде катионных НКЖ, с помощью сенсорного электрода

На рисунке 18 a, b представлены кинетические кривые накопления NO в ячейке, регистрируемые с помощью сенсорного электрода для комплексов CysAm и Pen. Видно, что в случае комплекса CysAm процесс идет с большой скоростью в течение ~10 минут, после чего выделение NO прекращается. В случае с Pen кривая выходит на плато через ~ 2 мин. Количество выделившегося NO составляет 1.4 % от исходной концентрации комплекса $[CysAm]_0$, равной $2\cdot10^{-4}$ моль·л$^{-1}$ и 1.5 % от исходной концентрации комплекса $[Pen]_0$, равной $4\cdot10^{-6}$ моль·л$^{-1}$. Это позволяет предположить, что процесс выделения NO протекает обратимо, и через некоторое время в системе устанавливается динамическое равновесие, которое и наблюдается экспериментально. Кинетическая схема, соответствующая такому протеканию процесса, включает в себя следующие реакции:

$$\text{НКЖ} \xleftrightarrow{k_1, k_{-1}} \text{NO} + \text{P}$$

Связывание NO с электродом также является обратимой реакцией:

$$NO \xleftrightarrow{k_s, k_{-s}} NO_s$$



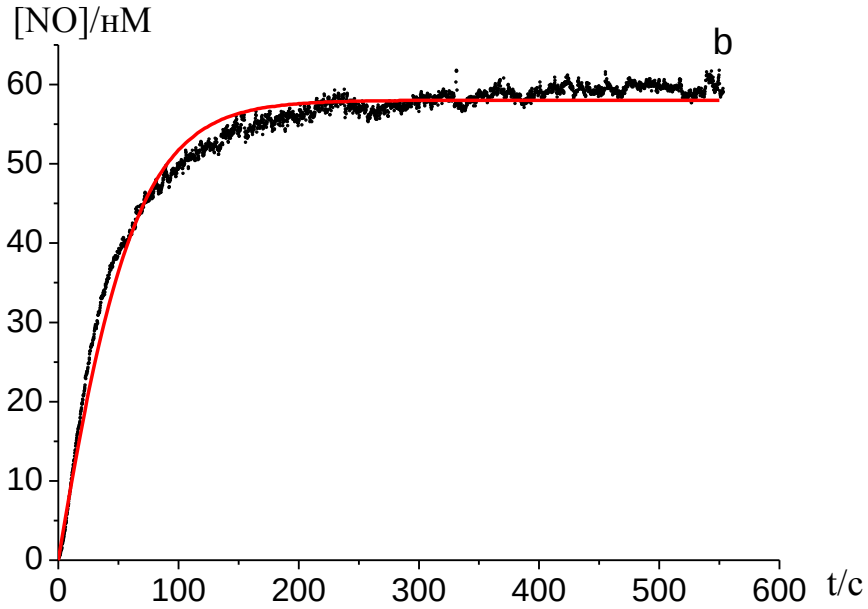


Рисунок 18 - Кинетика выделения NO из $2 \cdot 10^{-4}$ M CysAm (**a**) и $4 \cdot 10^{-6}$ M Pen (**b**), регистрируемая сенсорным электродом в атмосфере азота [154]. Аппроксимация показана в виде красной линии. Условия реакции: 25 °C, 0.05 M фосфатный буфер, pH 7.0.

Искомыми параметрами являются k_1 и $k_n = k_{-1}/(1+K_s)$, где $K_s = k_s/k_{-s}$ – константа равновесия реакции связывания NO с электродом. Экспериментально измеряемая величина (концентрация NO): x(t) = [NO] +

NO_s/V. V - объем реакционного раствора в электрохимической ячейке, который равен 20 мл для CysAm и 50 мл для Pen.

Уравнение реакции распада НКЖ: $dx/dt = k_1 \cdot [НКЖ]_o - k_1 \cdot x - k_n \cdot x^2$ (3.1.1)

Система уравнений, описывающая рассматриваемый процесс, с учетом материальных балансов и детального равновесия во второй реакции имеет вид:

$[НКЖ](t) = [НКЖ]_0 - x(t)$,

$[P](t) = x(t)$

$[NO](t) = x(t)/ (1+K_s)$

$NO_s(t) = x(t) \cdot V \cdot K_s/(1+K_s)$

В результате аппроксимации экспериментальной кривой уравнением (3.1.1) получены следующие значения искомых констант скорости:

CysAm: $k_1 = (5.2 \pm 0.2) \cdot 10^{-5}$ c^{-1}; $k_n = 1200 \pm 50$ $M^{-1} \cdot c^{-1}$ $K_p = k_{-1}/k_1 = 2.3 \cdot 10^7$ M^{-1}

Pen: $k_1 = (4.6 \pm 0.4) \cdot 10^{-3}$ c^{-1}; $k_n = (9.7 \pm 1) \cdot 10^3$ $M^{-1} \cdot c^{-1}$ $K_p = k_{-1}/k_1 = 2.1 \cdot 10^6$ M^{-1}

Найденные значения параметров удовлетворительно описывают экспериментальные кривые (рисунок 18 a,b). Таким образом, процесс выделения NO из комплекса Pen происходит быстрее, и протекает на большую глубину по сравнению с комплексом CysAm.

3.1.2 Исследование распада НКЖ методом спектрофотометрии

Было проведено исследование процесса распада комплексов CysAm и Pen методом спектрофотометрии. Опыты проводили при разных исходных концентрациях НКЖ в 0.05 М Трис-HCl буфере (при pH=7.0), в 0.05 М фосфатном буфере (при pH=7.0) и в воде. Как уже было описано в литературном обзоре, НКЖ с тиолатным лигандами в растворе могут существовать в двух формах (в зависимости от pH и от концентрации свободных тиолов): биядерной и моноядерной [62]. Для моноядерной формы характерен один максимум в спектре поглощения и зеленый цвет раствора, а для биядерной - два максимума и коричневый цвет раствора [61].Спектры поглощения для обоих исследуемых комплексов в водных растворах имеют

два максимума и коричневый цвет раствора, что свидетельствует о том, что процесс распада протекает через биядерную форму НКЖ. Полученные результаты также были подтверждены методом ЭПР. Кристаллы НКЖ не дают спектра ЭПР: из-за короткого расстояния между атомами железа (~ 2.7 Å) биядерная форма НКЖ диамагнитна [94]. При инкубации раствора НКЖ (CysAm) в воде в течение 3-х часов также не было выявлено сигнала ЭПР.

На рисунке 19 a, b приведены изменения спектров поглощения комплексов CysAm и Pen во времени в Трис-HCl буфере с одинаковой исходной концентрацией комплексов - $1.5 \cdot 10^{-4}$ М. Кинетические кривые, описывающие процесс распада этих процессов, построены с использованием уравнения: $y(t) = y_o + A \cdot e^{-kt}$, и определены эффективные константы скорости, которые составляют $5.8 \cdot 10^{-5}$ c^{-1} для CysAm и $1.26 \cdot 10^{-4}$ c^{-1} для Pen. Спектры поглощения данных комплексов имеют близкую форму, с 2 максимумами: λ_1 = 306 нм и λ_2 = 363 нм для CysAm и λ_1 = 311 нм и λ_2 = 353 нм для Pen. Процесс распада в Трис-HCl буфере для Pen протекает быстрее аналогичного процесса для CysAm. Этот результат подтверждается данными, полученными с помощью сенсорного электрода.

Для данных НКЖ формы спектров поглощения в фосфатном буфере и в воде не отличаются от спектров в Трис-HCl буфере. Экспериментальные данные этих опытов также хорошо аппроксимируются эмпирической формулой $y(t) = y_o + A \cdot e^{-kt}$. В таблице 6 приведены эффективные константы скорости реакции распада $1.5 \cdot 10^{-4}$ М Pen и $2 \cdot 10^{-4}$ М CysAm в различных растворителях. Их различие между собой связано, по-видимому, с влиянием среды на этот процесс.

Таблица 6 - Эффективные константы скорости процесса распада НКЖ в различных растворителях.

Растворитель	Трис-HCl буфер	Фосфатный буфер	Вода
k (Pen $1.5 \cdot 10^{-4}$ М)	$1.26 \cdot 10^{-4}$ c^{-1}	$6.4 \cdot 10^{-5}$ c^{-1}	$1.65 \cdot 10^{-5}$ c^{-1}
k (CysAm $2 \cdot 10^{-4}$ М)	_	$6.6 \cdot 10^{-6}$ c^{-1}	$8.2\ 10^{-6}$ c^{-1}

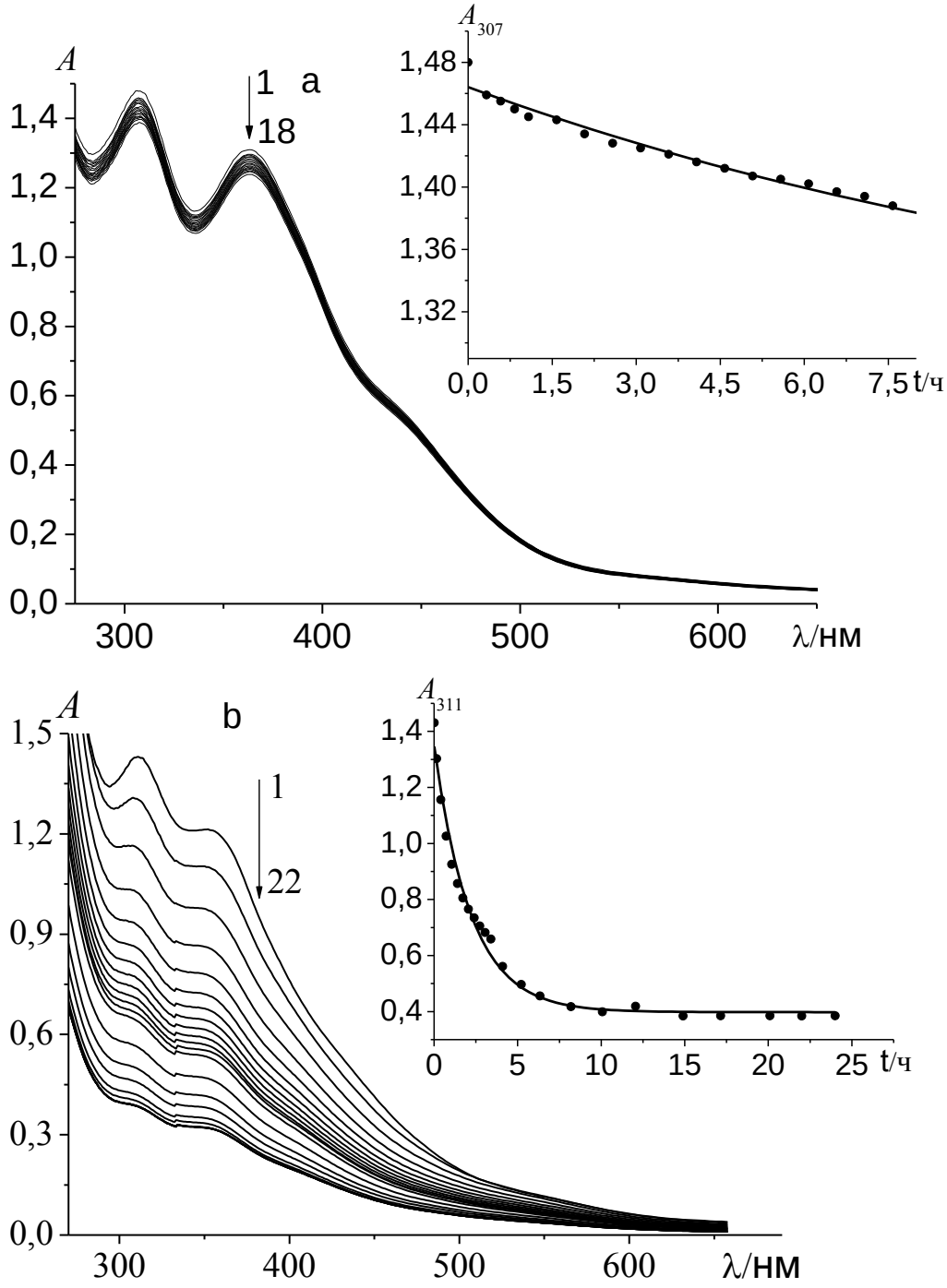


Рисунок 19 - Изменение спектров поглощения $1.5 \cdot 10^{-4}$ М CysAm (**a**) и $1.5 \cdot 10^{-4}$ М Pen (**b**) во времени [155]. (**a**) спектры зарегистрированы через 30 с (1) после начала реакции. Спектры (2)-(5) далее записаны с интервалом 15 мин. Спектр (6)-(18) записаны с интервалом 30 мин, спектр (18) записан через 8 ч после начала реакции. (**b**) спектры зарегистрированы через 30 с (1), 9 мин (2) после начала реакции. Спектры (3)-(12) записаны далее с интервалом 20 мин. Спектры (13)-(22) записаны при временах 4.1 (13), 5.2 (14), 6.3 (15), 8.2 (16), 10 (17), 14.9 (18), 17.1 (19), 20.1 (20), 22 (21) и 24 (22) ч после начала реакции. На вставке показаны кинетики распада CysAm и Pen. Условия реакции: 25 °C, растворитель – 0.05 М Трис-HCl буфер, pH 7.0.

Для более детального анализа процесса распада катионных НКЖ (на примере Pen) в водных растворах была предложена следующая схема реакций, учитывающая процесс отщепления лиганда [147]:

$Pen \xleftrightarrow{k_1, k_{-1}} P_1 + NO, \qquad P_1 \xleftrightarrow{k_2, k_{-2}} P_2 + L, \qquad Pen \xrightarrow{k_3} P_3 + L$

Было предположено, что отщепление лиганда происходит как из НКЖ, так и из продукта P_1, который получается после выделения NO из НКЖ.

Из результатов, полученных с помощью сенсорного электрода, известно: $k_1 = (4.6 \pm 0.1) \cdot 10^{-3}$ с$^{-1}$; $k_n = (9.7 \pm 0.2) \cdot 10^3$ М$^{-1} \cdot$с$^{-1}$. Искомые параметры: k_2, k_{-2}, k_3.

Pen и P_1 спектрофотометрически неразличимы, поэтому экспериментально измеряемая величина: $x(t) = [Pen] + [P_1]$.

Система уравнений, соответствующая предложенной схеме реакций, записывается в следующем виде:

$d[Pen]/dt = -k_1[Pen] + k_{-1}[P_1][NO] - k_3[Pen]$

$d[NO]/dt = k_1[Pen] - k_{-1}[P_1][NO]$

$d[P_1]/dt = k_1[Pen] - k_{-1}[P_1][NO] - k_2[P_1] + k_{-2}[P_2][L]$

$d[P_2]/dt = k_2[P_1] - k_{-2}[P_2][L]$

$d[L]/dt = k_2[P_1] - k_{-2}[P_2][L] + k_3[Pen]$

В результате численного решения системы уравнений методом кинетического моделирования для серии опытов с разной исходной концентрацией Pen были найдены значения искомых констант скорости (Таблица 7).

Таблица 7 - Константы скорости реакции распада комплекса Pen, полученые методом кинетического моделирования.

№	**$[Pen]_0 \cdot 10^4$, М**	**$k_2 \cdot 10^3$, с$^{-1}$**	**k_{-2}, М$^{-1} \cdot$с$^{-1}$**	**$k_3 \cdot 10^5$, с$^{-1}$**
1	1.0	1.9±0.2	0.1±0.01	0.8±0.1
2	1.5	1.7±0.2	0.2±0.02	0.9±0.1
3	2.0	1.8±0.2	0.1±0.01	1.8±0.2

Как следует из таблицы 7, k_2 (константа скорости реакции отщепления пеницилламинового лиганда из Pen) определена с хорошей точностью. Поскольку погрешность экспериментальных данных составляет ± 10 %, то её среднее значение равно $k_2 = (1.8 \pm 0.2) \cdot 10^{-3}$ c^{-1}.

3.2 Зависимость пути распада НКЖ от его редокс-потенциала

В работах [13, 156] описан механизм разложения нейтрального НКЖ с пиримидиновыми тиолатными лигандами (Pym). Кинетические зависимости количества NO, выделившегося в раствор при различных pH в одних и тех же условиях, имеют максимумы, появление которых авторы связывают с дальнейшим превращением NO в N_2O. Восстановление NO до NO^- является первой наиболее вероятной элементарной стадией реакции, которая затем приводит к образованию закиси азота. Для образования NO^- из NO необходим восстановитель: стандартный редокс-потенциал восстановления NO составляет -0.8 (±0.2) В. В качестве такого восстановителя может выступать комплекс Pym после диссоциации связи Fe-NO и координации молекулы растворителя (воды) по свободному координационному месту. Основываясь на этой гипотезе, была предложена следующая схема реакций:

$$LFe(NO) \longrightarrow LFe + NO, \text{ где } L = [Fe(\mu\text{-}SC_4H_3N_2)_2(NO)_3] \qquad (3.2.1)$$

$$LFe + NO \longrightarrow LFe_{окисл} + NO^- \qquad (3.2.2)$$

$$NO + NO^- \longrightarrow ONNO^- \longrightarrow N_2O \qquad (3.2.3)$$

Таким образом, в отличие от CysAm и Pen, которые в водном растворе медленно распадаются, обратимо выделяя в среду NO и тиолатный лиганд, для Pym характерен необратимый распад и быстрое разложение с выделением NO, сопровождающееся образованием продуктов дальнейшего превращения NO. Следовательно, можно предположить, что реакция окисления НКЖ (3.2.2) является той ключевой стадией, которая обуславливает его необратимый распад. На основании вышеизложенного мы пришли к выводу, что если НКЖ может восстановить NO, то есть имеет E_0

меньше, чем -0,8 В, то неизбежно, что НКЖ, переходя в окисленное состояние, подвергается необратимому распаду. В тоже время мы предположили, что комплекс, имеющий E_0 больше, чем -0.8 В, и не способный восстановить NO, не переходит в окисленное состояние, и поэтому претерпевает обратимую диссоциацию.

Чтобы проверить этот вывод, мы провели оценку E_0 комплексов CysAm и Pen по реакции с красителями с известными E_0 (таблица 8).

Таблица 8 - Редокс-потенциалы реагентов.

Редокс - индикатор	Редокс -потенциал при pH 7.0, vHE.	Окраска в восстановленной форме	Окраска в окисленной форме
Метилвиологен	-0.4	Синяя	Бесцветная
Сафранин Т	-0.29	Бесцветная	Фиолетово-красная
Метиленовый синий	+ 0.01	Бесцветная	Синяя
Цитохром С	+0.254	–	–

Было установлено, что комплексы CysAm и Pen восстанавливают Cyt C^{3+}, E_0 которого равен + 0.254 В [116] (рисунок 20). В то же время CysAm и Pen не восстанавливают метилвиологен. Комплекс CysAm не восстанавливает метиленовый синий и сафранин Т (рисунок 21 a, b). Комплекс Pen восстанавливает метиленовый синий, но не восстанавливает сафранин Т (рисунок 22 a, b).

На основании полученных результатов можно сделать заключение, что E_0 комплексов CysAm и Pen находятся в диапазоне:

$$+ 0.01 \text{ В} < E_0 \text{ CysAm} < + 0.24 \text{ В}$$

$$- 0.29 \text{ В} < E_0 \text{ Pen} < +0.01 \text{ В}$$

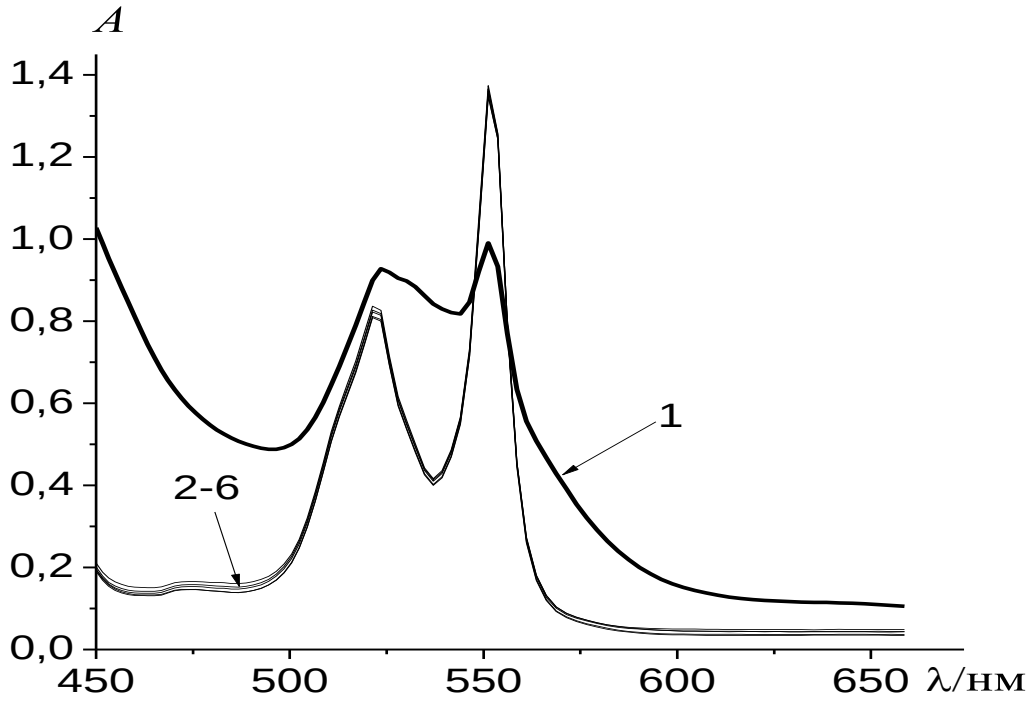


Рисунок 20 - Изменение разностных спектров поглощения при взаимодействии $2 \cdot 10^{-4}$ М Pen с $6 \cdot 10^{-5}$ М Cyt C в отсутствии $K_3[Fe(CN)_6]$: спектры записаны через 1 (2), 9 (3), 24 (4), 54 (5), 69 (6) мин после начала реакции. Спектр (1) – спектр исходного коммерческого Cyt C. Спектры (2)–(6) имеют 2 максимума: λ_1 = 521 нм и λ_2 = 551 нм. Условия реакции: 25 °C, растворитель - 0.05 М фосфатный буфер, pH 7.0.

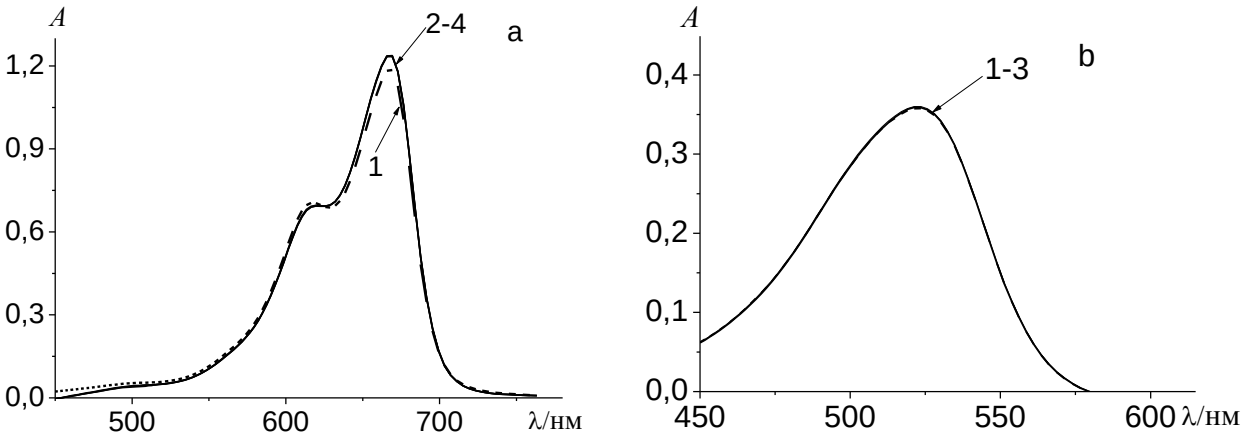


Рисунок 21 - Изменение спектров поглощения при взаимодействии $2 \cdot 10^{-4}$ М CysAm с $2 \cdot 10^{-5}$ М метиленовым синим (**a**) или 10^{-5} М сафранином Т (**b**): спектры записаны через 1 (2), 5 (3) и 10 мин (4) после начала реакции. Спектр (1) – исходный спектр метиленового синего (**a**) или сафранина Т (**b**). Спектры (1)-(4) (**a**) имеют 2 максимума: λ_1 = 616 нм и λ_2 = 669 нм. Спектры (1)-(3) (**b**) имеют 1 максимум: λ_1 = 521 нм. Условия реакции: 25 °C, растворитель – вода.

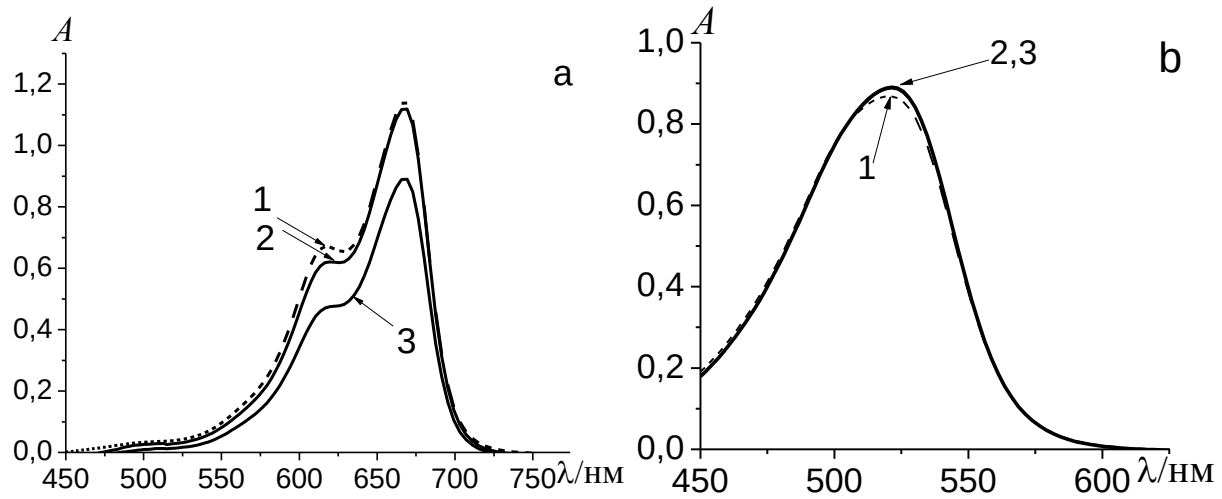


Рисунок 22 - Изменение спектров поглощения при взаимодействии $2 \cdot 10^{-4}$ М Pen с $2 \cdot 10^{-5}$ М метиленовым синим (**a**) или 10^{-5} М сафранином Т (**b**): спектры записаны через 1 (2) и 5 мин (3) после начала реакции. Спектр (1) – исходный спектр метиленового синего (**a**) или сафранина Т (**b**). Спектры (1)-(3) (**a**) имеют 2 максимума: λ_1 = 616 нм и λ_2 = 669 нм. Спектры (1)-(3) **(b)** имеют 1 максимум: λ_1 = 521 нм. Условия реакции: 25 °С, растворитель – вода.

Отсюда следует, что CysAm и Pen не могут восстановить NO. Следовательно, данные НКЖ в водной среде не претерпевают стадию окисления и поэтому не подвергаются необратимому гидролизу. Распад этих комплексов в водной среде с выделением NO и тиолатного лиганда происходит обратимо.

3.3 Влияние ДМСО на распад катионных НКЖ. Моноядерная и биядерная формы катионных НКЖ

Как было установлено ранее, в водном растворе при нейтральных значениях pH при отсутствии свободных тиолов исследуемые катионные НКЖ находятся в биядерной форме и подвержены процессу распада [62]. Экспериментально было обнаружено, что данные комплексы более стабильны в органических апротонных растворителях, в том числе в ДМСО. В связи с этим интересным представлялось исследовать влияние ДМСО на процесс их распада. Было установлено, что если катионные НКЖ растворять сначала в ДМСО, то их распад будет протекать через стадию образования

моноядерной формы. Данный процесс был детально рассмотрен для комплекса CysAm. Для сравнительного изучения его моноядерной и биядерной форм провели исследование раствора CysAm в воде и ДМСО методами ЭПР и ЯМР-^{1}Н (рисунки 23, 24). В водных растворах сигнала ЭПР комплекса CysAm не наблюдается и, следовательно, комплекс находится в биядерной форме. При растворении CysAm в ДМСО получен спектр ЭПР (рисунок 23) с g-фактором 2.030, характерным для железо-нитрозильных комплексов, что указывает на образование моноядерной формы комплекса. На спектре видна слабо-разрешенная СТС, по-видимому, от ядер азота. Концентрация парамагнитных центров 0.35 мМ убывает во времени (рисунок 23 b). Таким образом, диамагнитная биядерная форма CysAm распадается на мономеры, которые и дают сигнал ЭПР; дальнейший распад моноядерных комплексов приводит к уменьшению сигнала ЭПР (рисунок 23 b). Растворы биядерной формы НКЖ в воде не дают сигнала ЭПР, из-за того, что их распад идёт не через мономер, и образующиеся при этом фрагменты диамагнитны. Согласно оценке количества спинов (0.35 мМ) при растворении 10^{-3} М CysAm в ДМСО 17.5 % CysAm находится в моноядерной форме. При нагревании до 50 ^{0}С сигнал ЭПР пропадал, что свидетельствует о том, что нагревание ускоряло распад моноядерной формы CysAm в ДМСО. Таким образом, в используемых условиях (растворение 10^{-3} М CysAm в течение 15 мин при 20 ^{0}С в ДМСО) происходит диссоциация биядерной формы на мономеры, и в результате устанавливается равновесие с образованием 0.35 мМ мономера. Далее называем это смесью димера с мономером.

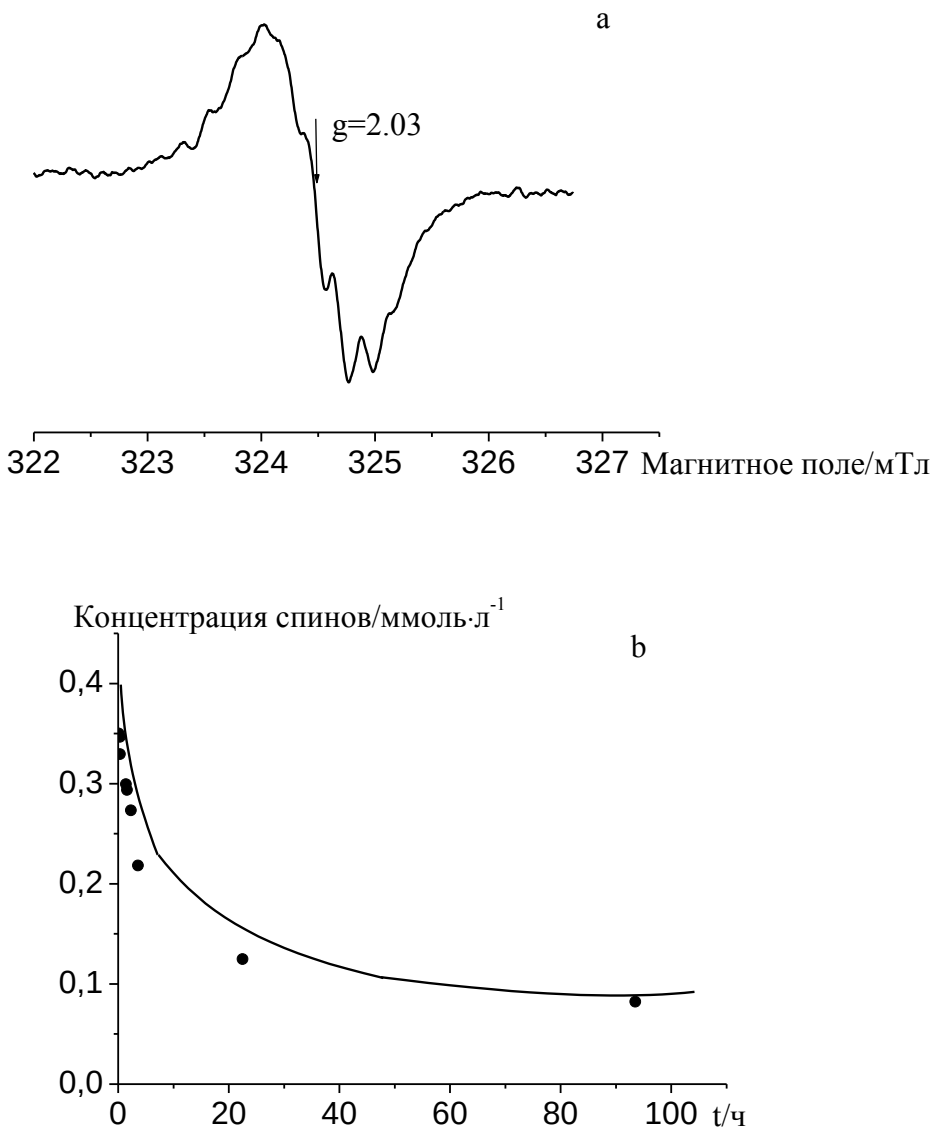


Рисунок 23 - (**a**) Спектр ЭПР раствора 1 мМ CysAm в ДМСО. (**b**) изменение концентрации парамагнитных центров раствора CysAm (в опыте, описанном на рисунке **a**).

К аналогичным выводам пришли при исследовании влияния растворителя - ДМСО на CysAm методом ЯМР ^{1}H. На спектре ЯМР ^{1}H комплекса CysAm, растворенного в D_2O (рисунок 24 а), помимо сигнала от растворителя (синглет 4.71 м.д.) наблюдаются два мультиплета при δ_H 3.27 и 3.37 м.д. Оба эти мультиплета соответствуют -CH_2- группам CysAm. Из формы мультиплетов можно утверждать, что триплет при δ_H 3.26 м.д. соответствует атомам водорода группы -C$\underline{H}_2$-S, а дуплет триплетов

соответствует атомам водорода группы –C<u>H</u>$_2$-NH_4^+. Более сложная форма мультиплета группы –CH_2- рядом с NH_4^+, по сравнению с группой -CH_2- рядом с S, объясняется дальним спин-спиновым взаимодействием с протонами аммонийной группы. Атомы водорода аммонийной группы и молекул кристаллизационной воды из-за быстрого обмена с атомами водорода молекул воды растворителя попадают под сигнал от растворителя.

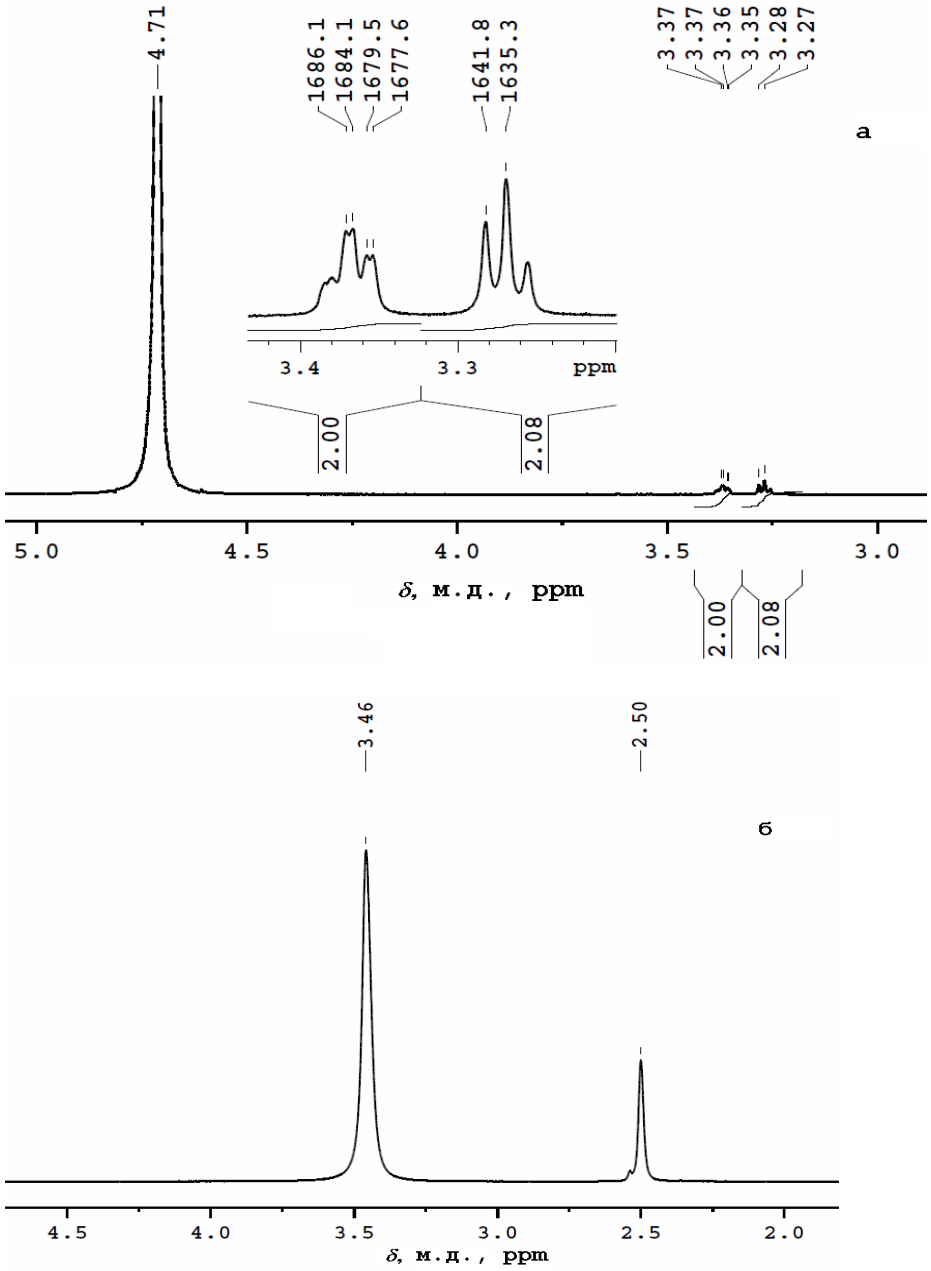


Рисунок 24 - ЯМР ^{1}H CysAm 10^{-3} М в дейтерированном растворителе: (**a**) D_2O; (**b**) ДМСО -d6.

Таким образом, ЯМР спектроскопия подтверждает предложенную ранее [157] структуру CysAm, а достаточно высокое разрешение спектра говорит об отсутствии в растворе примеси парамагнитного железа. ЯМР ^{1}H (рисунок 24 a) CysAm (D_2O, δ, м.д., *J*/Гц): 3,27 (т, 2H, -C<u>H$_2$</u>-S-, *J*=6.7); 3,37 (т.д., 2H, -C<u>H$_2$</u>-NH_4^+, *J*=6.7, *J*=1.9). Иная картина получается при исследовании CysAm, растворенного в ДМСО. В спектре наблюдаются широкие линии (рисунок 24 b). Так, например, полуширина линии сигнала воды в образце CysAm в D_2O составляет ≈1 Гц, а в случае с раствором CysAm в ДМСО сигнал примесной H_2O (3.49 м.д.) ≈17 Гц. Этот факт говорит, скорее всего, о наличии парамагнитного железа в растворе, которое и приводит к уширению линий спектра. Появление парамагнитного железа связано, вероятно, с распадом димера - CysAm до мономера в растворе ДМСО. Напротив, в спектре CysAm в D_2O даже через 30 минут парамагнитная примесь не обнаруживается, что может означать, что при распаде димера в воде мономер не образуется.

Параллельно растворы комплекса CysAm в буфере и ДМСО сравнивали с помощью метода спектрофотометрии. Как было описано ранее, интенсивность спектров поглощения CysAm в водных растворах (рисунок 19 a) с максимумами при 306 и 363 нм медленно уменьшается со временем. В растворе смеси димера с мономером в ДМСО обнаруживается максимум поглощения при 364 нм (рисунок 25). В этом случае, видимо, происходит перекрывание спектров поглощения мономерной и димерной форм и трудно выделить максимумы поглощения мономера. Интенсивность полос поглощения уменьшалась со временем, как и интенсивность в спектре ЭПР (рисунок 23 b). Через 3 суток в спектре поглощения комплекса наблюдается максимум поглощения при 331 нм (кривая 4, рисунок 25). По взаимодействию с Cyt C^{3+} было установлено, что эта форма не содержит NO-групп (подробное описание опытов, проводимых с Cyt C в главе 4.1.2).

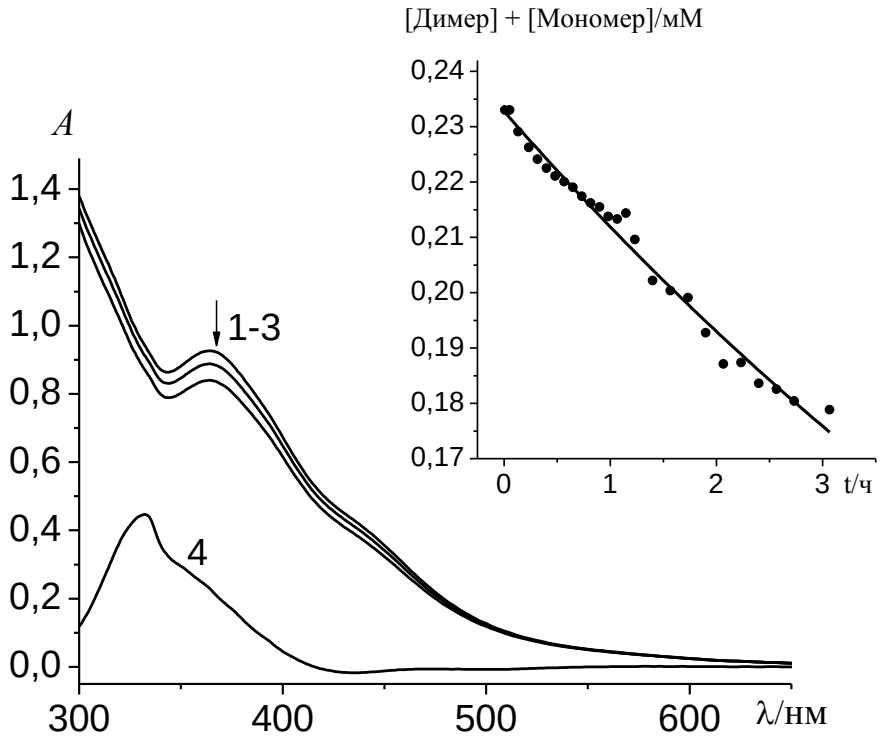


Рисунок 25 - Изменение спектров поглощения во времени 0.1 мМ CysAm. Спектр (1) записан сразу после приготовления CysAm. Спектры (2)-(4) записаны через 25, 60 мин и 3 суток от начала инкубации. Спектры (1)-(3) имеют максимум при 364 нм, спектр (4) - при 331 нм. На вставке показана кинетика распада CysAm. Эффективная константа составляет $2.75 \cdot 10^{-5}$ $с^{-1}$. Условия реакции: 20 °С, растворитель - 0.05 М фосфатный буфер, pH 7.0, ДМСО 20%.

Таким образом, на основании проведенных экспериментов можно сделать вывод, что, как в буферных растворах, так и в ДМСО, CysAm медленно распадается с выделением NO. Причем при распаде CysAm в ДМСО в растворе присутствует как биядерная форма комплекса, так и моноядерная.

ГЛАВА 4.
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КАТИОННЫХ НКЖ СТРУКТУРНОГО "μ-S" ТИПА С БИОЛОГИЧЕСКИМИ ОБЪЕКТАМИ

4.1 Взаимодействие НКЖ с Hb и Cyt C как метод исследования NO-донорной активности состава и концентрации реакционной системы

Следующей задачей диссертационной работы было исследование NO-донорной активности катионных НКЖ в присутствии Hb и Cyt C. Выбор Hb для анализа эффективности данных НКЖ в качестве доноров NO представляет научный интерес, поскольку метаболизм NO в организме в значительной мере связан с образованием нитрозилированного по железу комплекса Hb в эритроцитах [158]. Кроме того, известно, что NO образует стабильные S-нитрозотиолы с SH-группами Hb [14]. Таким образом, этот белок является одним из важнейших элементов системы биологической трансформации доноров NO и его переноса внутри организма.

Образование нитрозильных комплексов Cyt C способно влиять на процессы метаболизма в очень широких границах. Например, их образование может привести к ингибированию цепи переноса электронов. Кроме того, нитрозилированный Cyt C обладает фоточувствительностью и разрушается под действием излучения видимого диапазона, что имеет терапевтический эффект [14]. Следовательно, если НКЖ будут вовлечены в качестве доноров NO в метаболизм Cyt C, то это может обусловить их различиные свойства в качестве лекарственных средств.

4.1.1 Взаимодействие НКЖ с Hb

Как было установлено из анализа литературы, Hb взаимодействует с NO с образованием HbNO (константа связывания $3 \cdot 10^{10}$ M^{-1} [96], скорость связывания близка к диффузионной). NO, также как и Hb в индивидуальном состоянии, быстро реагирует с O_2, давая оксиды азота (константа скорости $2 \cdot 10^{6}$ $M^{-2}c^{-1}$ [159]), поэтому все эксперименты по взаимодействию НКЖ с

препаратами Hb проводили в атмосфере аргона или азота. Образующийся при взаимодействии Hb и NO комплекс HbNO имеет характерный спектр поглощения с двумя максимумами при 545 и 575 нм, резко отличающийся от спектра исходного Hb с одним максимумом при 556 нм, что позволяет по анализу спектров определять количество выделившегося NO из структуры донорных соединений. Так как все НКЖ поглощают в видимой области, в эксперименте регистрировали разностные спектры поглощения контрольного образца и опытной системы с Hb, которые содержат одинаковую концентрацию НКЖ. Реакцию начинали введением раствора НКЖ.

На рисунке 26 a,b приведены изменения разностных спектров поглощения во времени при взаимодействии Hb с CysAm и Pen. В области максимума поглощения (556 нм) наблюдается уменьшение оптической плотности, а при 545 и 575 нм – ее нарастание, которое свидетельствует об образовании HbNO. Регистрацию спектров поглощения заканчивали после того, как они переставали изменяться. В процессе образования HbNO на спектрах поглощения присутствуют три изобестические точки (при 551, 570 и 595 нм), что указывает на то, что в спектры поглощения вносят вклад только Hb и HbNO. В процессе преобразования Hb в HbNO происходит перекрывание спектров. В связи с этим концентрацию HbNO оценивали путем компьютерного разложения экспериментальных спектров поглощения на составляющие (Hb и HbNO) с помощью программы MathCad [12]. Расчет проводился в диапазоне длин волн 450-650 нм по 200 экспериментальным точкам.

Были проведены серии опытов при разных исходных концентрациях НКЖ и Hb. Кинетика образования HbNO (рисунок 27) и кинетические параметры реакции (таблица 9) определены для комплекса Pen. Для комплекса CysAm кинетика образования HbNO и константы реакции были исследованы в работе [154], но в кинетической схеме реакций не была учтена стадия отщепления лиганда.

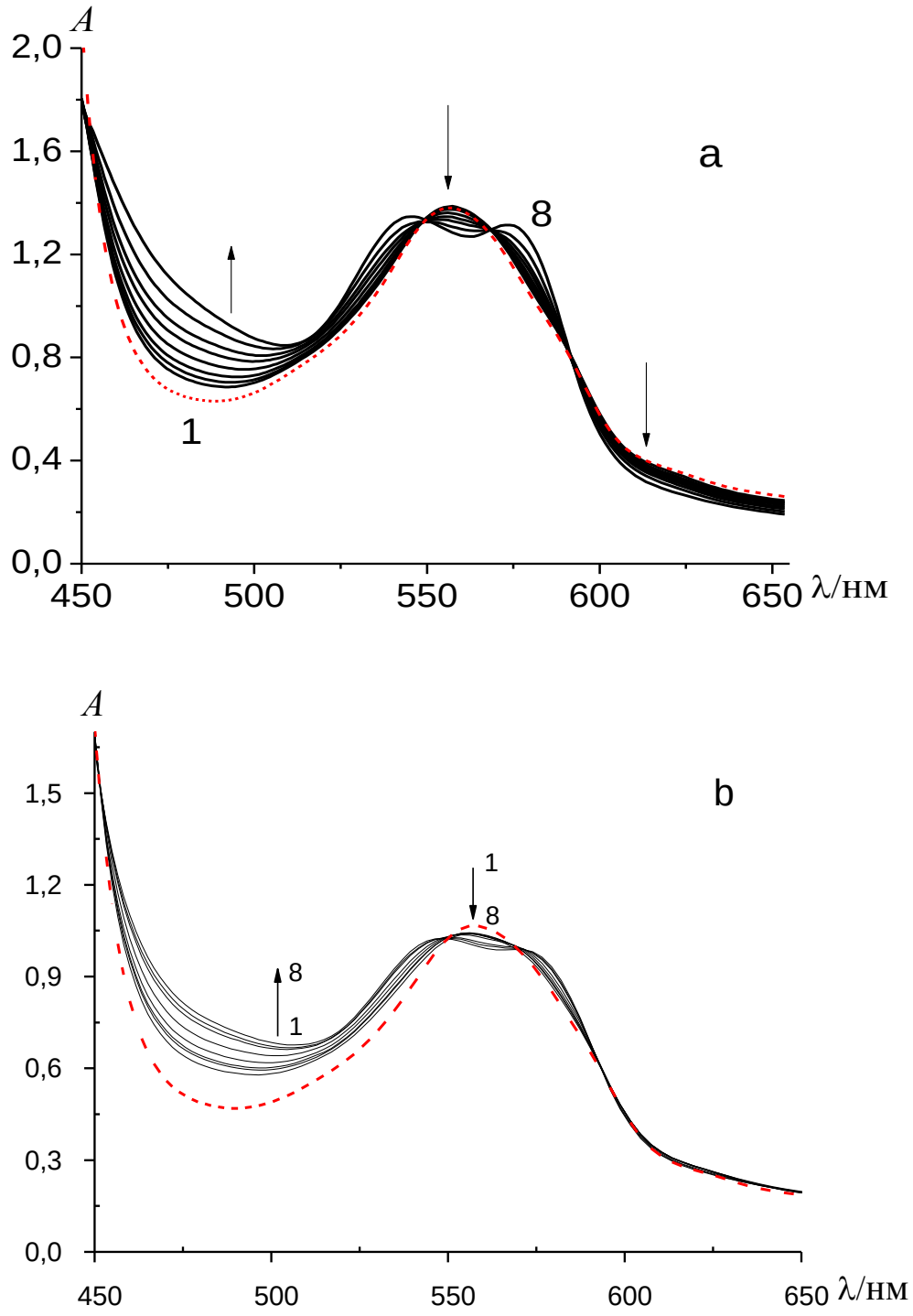


Рисунок 26 - Изменение разностных спектров поглощения при взаимодействии $5.6 \cdot 10^{-4}$ M CysAm с $2.76 \cdot 10^{-5}$ M Hb (**a**) и $2 \cdot 10^{-5}$ M Pen с $2 \cdot 10^{-5}$ M (**b**). Штриховая линия – спектр раствора Hb. Спектры (1)-(8) записаны через 0.2; 0.9; 1.9; 3.4; 5.4; 7.4; 11.4; 19.6 ч (**a**) и 0.16, 0.33, 0.5, 0.66, 0.91, 1.16, 2.16, 3.16 (**b**) после начала реакции. Условия: 25 °C, растворитель – фосфатный буфер 0.05 M, pH 7.0.

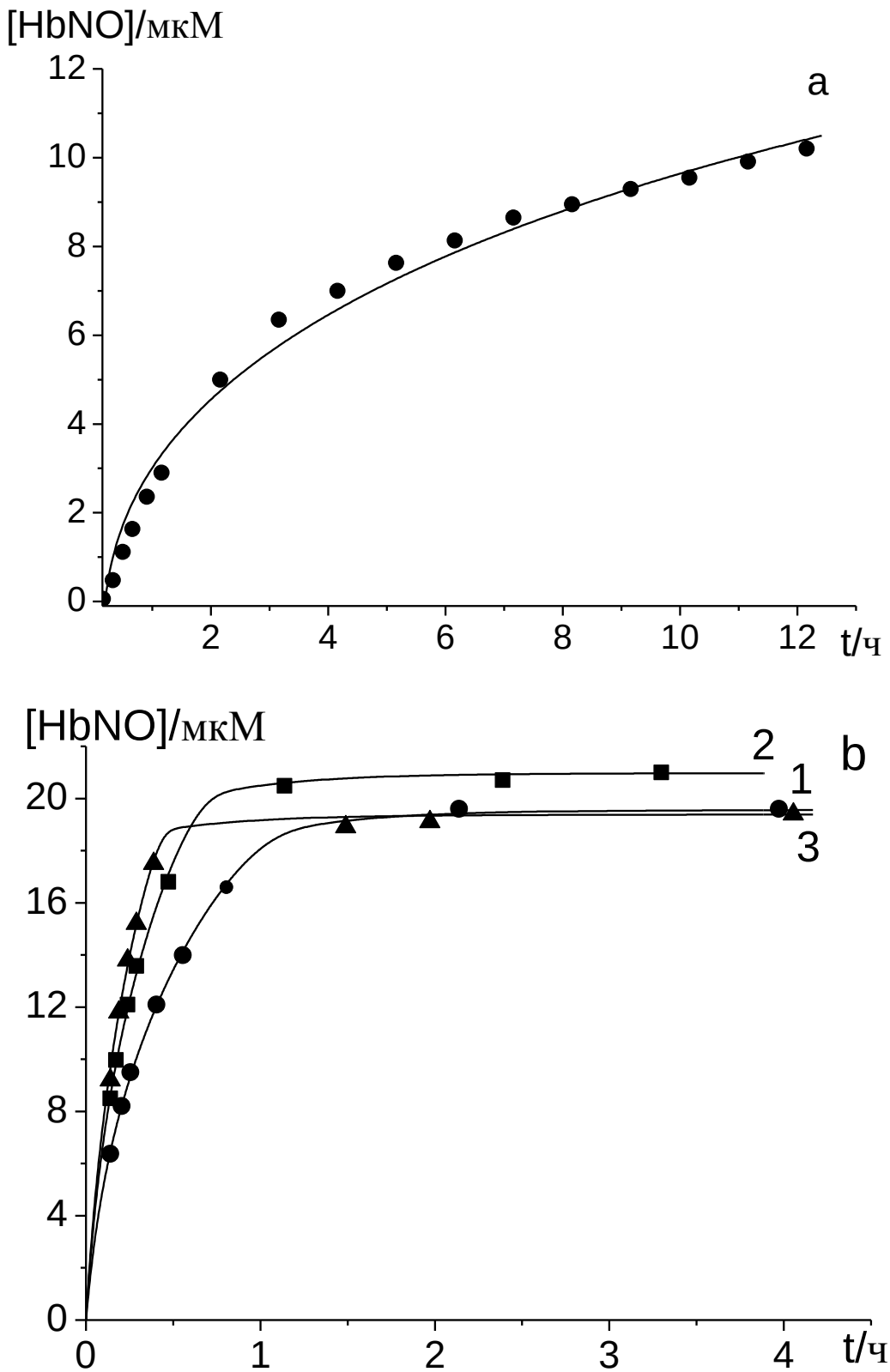


Рисунок 27 - Кинетические кривые выделения NO в водных растворах Pen (по регистрации образования HbNO методом спектрофотометрии). (**a**) $2 \cdot 10^{-5}$ М Pen, (**b**) 1 - 10^{-4} М, 2- $1.5 \cdot 10^{-4}$ М и 3 - $2 \cdot 10^{-4}$ М Pen. Hb в (**a**) и (**b**) $2.0 \cdot 10^{-5}$ М. Линии - расчет по схеме реакций, точки - эксперимент. Условия: 25 °С, растворитель – 0.05 М фосфатный буфер, pH 7.0.

Таблица 9 - Значения кинетических параметров, описывающих процесс взаимодействия комплекса Pen с Hb.

№ п/п	$[Pen]_0 \cdot 10^5$, М	$[Hb]_0 \cdot 10^5$, М	k, $с^{-1}$	$K_s \cdot 10^{-7}$, $М^{-1}$	n_s
1	2	2.0	$8.4 \cdot 10^{-5}$	4.3	1.0
2	10	1.96	$5.9 \cdot 10^{-4}$	0.80	5.0
3	15	2.10	$8.9 \cdot 10^{-4}$	0.71	7.0
4	20	1.94	$1.8 \cdot 10^{-3}$	0.64	10.2

Анализируя конечную концентрацию образовавшегося HbNO (рисунок 27), из полученных данных следует, что процесс распада комплекса проходит на большую глубину, чем в отсутствии Hb (по данным сенсорного электрода в отсутствии Hb выделяется всего 1.5% NO от исходной концентрации Pen). Этот факт объясняется тем, что выделившиеся NO-группы быстро взаимодействуют с железом Hb, в результате чего равновесие в процессе распада НКЖ значительно сдвигается.

Экспериментальные данные этих опытов хорошо аппроксимируются эмпирической формулой $y(t) = y_o + A \cdot (1-e^{-kt})$, рассчитанные эффективные константы скорости (k) приведены в таблице 9. При эквимолярном соотношении компонентов величина k на два порядка меньше, чем величина константы скорости выделения NO из комплекса, полученная с помощью сенсорного электрода ($(4.6 \pm 0.4) \cdot 10^{-3}$ $с^{-1}$). Видно, что при увеличении концентрации НКЖ значение k растет. Таким образом, в присутствии Hb выделение NO из НКЖ идет с заметно меньшей скоростью (таблица 9, [154]). Это согласуется с работами [160, 161], выполненными ранее на других комплексах, где было показано, что Hb, как правило, стабилизирует НКЖ, содержащие свободную неподеленную пару электронов на одном из своих атомов гетероциклических лигандов, поэтому реакция выделения NO из НКЖ в присутствии Hb протекает медленнее, чем без Hb. Следует отметить, что в обоих катионных комплексах две NH_3^+ группы несут положительные

заряды, формируя солевую структуру с анионами SO_4^-. В комплексе Pen также имеются две карбоксильные группы, несущие отрицательный заряд. Таким образом, стабилизация CysAm может осуществляться только за счет связывания с отрицательно заряженными функциональными группами Hb, а в стабилизации комплекса Pen также участвуют положительно заряженные функциональные группы белка.

Кинетическое моделирование реакций взаимодействия Pen с Hb

Как уже было описано выше, если в среде присутствует Hb, то он, по-видимому, благодаря большой величине константы равновесия Hb + NO $\rightleftharpoons$ HbNO, смещает равновесие реакции распада НКЖ в сторону образования HbNO. Уменьшение скорости процесса выделения NO из Pen и CysAm в присутствии Hb объясняется адсорбцией комплекса молекулой Hb, в результате чего существенно уменьшается их способность выделять NO. На примере Pen составлена схема реакций, учитывающая адсорбцию НКЖ молекулой Hb при распаде НКЖ:

$Pen \xleftrightarrow{k_1, k_{-1}} P_1 + NO$

$P_1 \xleftrightarrow{k_2, k_{-2}} P_2 + L$

$Pen \xrightarrow{k_3} P_3 + L$

$Pen + S_{Hb} \xleftrightarrow{K_s} Pen\text{-}S_{Hb}$

$Pen\text{-}S_{Hb} \xrightarrow{k_4} NO$

$Hb + NO \xleftrightarrow{k_5, k_{-5}} HbNO$

Здесь S_{Hb} – активные центры связывания Pen на поверхности Hb.

В соответствии с этой схемой свободные молекулы комплекса в растворе обратимо выделяют NO с константами скорости реакции k_1 и k_{-1}. Разложение НКЖ в воде сопровождается отщеплением пеницилламиновых лигандов от исходной молекулы и образованием продукта P_1, который получается после выделения NO из Pen. Параллельно молекулы Pen адсорбируются на макромолекуле Hb. Предполагается, что на поверхности

Hb существуют центры связывания (в количестве n_s на одной молекуле Hb), с которыми молекулы комплекса могут обратимо взаимодействовать с константой равновесия K_S. В связанном состоянии молекулы комплекса выделяют NO с константой скорости k_4, выделившиеся молекулы NO обратимо взаимодействуют с гемовым железом белка с образованием экспериментально измеряемого продукта HbNO.

Значения констант скорости $k_1 = 4.6\cdot10^{-3}$ c^{-1}, $k_{-1} = 9.7\cdot10^{3}$ $M^{-1}\cdot c^{-1}$, $k_2 = 5.3\cdot10^{-4}$ c^{-1}, $k_{-2} = 0.1$ $M^{-1}\cdot c^{-1}$, $k_3 = 6.6\cdot10^{-6}$ c^{-1} были определены в главе 3. В литературе имеются сведения о величине константы $k_5 = 10^{8}$ c^{-1} [159] и константе равновесия $K_5=k_5/k_{-5} =3\cdot10^{10}$ M^{-1} [96]. Неизвестными параметрами являются K_S, n_s и k_4. Анализ обратной задачи показал, что по имеющимся экспериментальным данным эти параметры не могут быть определены однозначно. Поэтому в первом приближении мы ограничились рассмотрением предельного случая, когда выделение NO связанным комплексом Pen-S_{Hb} пренебрежимо мало. Такому режиму соответствует величина $k_4 \sim 10^{-8}$ c^{-1}. Задача сводится к определению по экспериментальным данным [HbNO](t), константы равновесия K_S и количества активных центров на поверхности гемоглобина n_s.

Систему уравнений, соответствующую схеме реакций, с учетом детального равновесия и материальных балансов можно записать в виде:

$d[Pen]/dt = \alpha(-k_1[Pen]+ k_{-1}[P_1][NO] - k_3[Pen])-\beta\cdot k_4[PenS_{Hb}]$

$d[S_{Hb}]/dt = -(1-\alpha)(-k_1[Pen]+ k_{-1}[P_1][NO] - k_3[Pen])-\beta\cdot k_4[PenS_{Hb}]$

$d[P_1]/dt = k_1[Pen] - k_{-1}[P_1][NO] - k_2[P_1]+k_{-2}[P_2][L]$

$d[NO]/dt = k_1[Pen] - k_{-1}[P_1][NO] + k_4[PenS_{Hb}]-k_5[Hb][NO]$

$d[P_2]/dt = k_2[P_1] - k_{-2}[P_2][L]$

$d[L]/dt = k_2[P_1] - k_{-2}[P_2][L]+k_3[Pen]$

$d[P_3]/dt = k_3[Pen]$

$d[Hb]/dt = -k_5[Hb][NO]$

$d[HbNO]/dt = k_5[Hb][NO]- k_{-5}[HbNO]$

$[PenS_{Hb}](t)=K_S[Pen](t)\cdot[S_{Hb}](t)$

Обозначения: $\alpha = (1+ K_S[Pen])/(1+ K_S[Pen]+\cdot K_S[S_{Hb}])$;

$\beta = 1/(1+ K_S[Pen]+\cdot K_S[S_{Hb}])$

Начальные условия с учетом детального равновесия в реакции связывания Pen с S_{Hb}:

$[Pen](0)=(-b+(b^2+4K_S[Pen]_0)^{0.5})/(2K_S)$, где $b=1 – K_S([Pen]_0-[S_{Hb}]_0)$;

$[S_{Hb}](0)=[Pen](0) – [Pen]_0 + [S_{Hb}]_0$.

$[Hb](0)=[Hb]_0$; $[P_1](0)=[NO](0)=[P_2](0)=[L](0)=[P_3](0)=[HbNO](0)=0$;

Здесь $[Pen]_0$, $[Hb]_0$, $[S_{Hb}]_0=n_s\cdot[Hb]_0$ – исходные концентрации комплекса Pen, Hb и активных центров S_{Hb} на поверхности Hb, соответственно.

Неизвестные кинетические параметры K_S и n_s были определены численным решением обратной задачи по кинетической кривой накопления HbNO в четырех опытах взаимодействия Pen с Hb (Таблица 9). Расчеты проведены при значении константы равновесия $K_5 = 0.5\cdot10^9$ M^{-1}, которое обеспечивает лучшее совпадение расчета с экспериментом, чем при $K_5 = 3\cdot10^{10}$ M^{-1}. Это оправдано, учитывая то обстоятельство, что K_5 уменьшается в присутствии солей, причём солевой эффект возрастает в следующем порядке: NaCl, KCl, цитрат натрия, фосфат натрия [162]. Опыты (рисунок 26, рисунок 27) проводились в фосфатном буфере 0.05 М, pH 7.0. Найденные значения параметров (Таблица 9) удовлетворительно описывают экспериментальные данные (рисунок 27).

Как видно из таблицы 9, с увеличением концентрации Pen значение параметра n_s растет, а K_S – уменьшается. Видимо, на поверхности Hb существуют различные области, отличающиеся прочностью связывания катионного комплекса. При малых концентрациях комплекса Pen (№ 1 в таблице 9) его молекулы в первую очередь связываются с областями, обеспечивающими наиболее прочную связь (большое K_S), а при увеличении концентрации Pen в процессе адсорбции начинают участвовать другие области на поверхности Hb с меньшей прочностью связи. При обработке экспериментальных данных это приводит к изменению эффективных значений параметров: увеличению n_s и уменьшению K_S.

Возможное расположение НКЖ на поверхности Hb.

Центры связывания катионов

Для определения возможной локализации центров связывания катионных комплексов на поверхности Hb, зарядовое состояние поверхности белка была проанализировано с помощью программы PyMOL (рисунок 28).

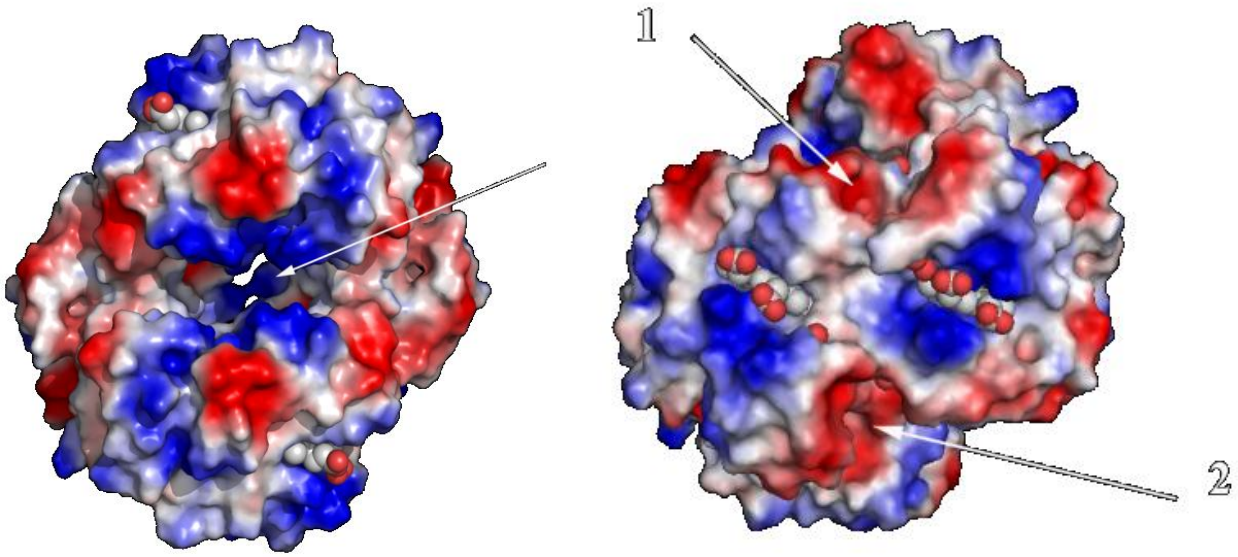


Рисунок 28 - Анализ зарядового состояния поверхности Hb. Области поверхности с отрицательным зарядом выделены красным цветом, с положительным – синим. Использованы данные рентгеноструктурного анализа для бычьего Hb [152]. (**a**) Вид на сквозной канал (показан стрелкой), (**b**) Вид на впадины 1 и 2.

Как было описано в обзоре литературы, Hb состоит из четырёх субъединиц – двух α (A, C) и двух β (B, D) субъединиц. В целом молекула Hb представляет собой симметричную глобулу (ось симметрии второго порядка) с каналом, проходящим сквозь всю структуру (рисунок 28 a). Малое входное устье сквозного канала формируют α-субъединицы, находящиеся в контакте друг с другом, а большое входное устье - β-субъединицы, контактирующие с каждой из α-субъединиц, но не между собой. Параметры сквозного канала: длина всего канала ~ 40-45 Å; большое устье ~ 8 – 11 Å × 30 Å; малое устье ~ 10-14 Å × 16 Å. С помощью программы PyMOL

показано, что на поверхности Hb имеются области с локальной концентрацией отрицательно и положительно заряженных аминокислот, а также более или менее нейтральные части поверхности. В сквозном канале расположены 8 катионных и 3 анионных пары аминокислот, то есть в целом канал заряжен положительно и непосредственно входы в нем заряжены положительно. Поэтому вероятность проникновения в него обоих комплексов мала. Среди множества неровностей поверхности белка выделяются четыре крупные отрицательно заряженные впадины (рисунок 28 b). Две из них (впадина 1 на рисунке 28 b, V каждой ~170 $Å^3$) расположены со стороны большого устья на равном расстоянии (~ по 13 Å) от α- и β-субъединиц в области отрицательно заряженной поверхности. Две другие отрицательно заряженные впадины большего размера (впадина 2 на рисунке 28 b, V ~ 850 $Å^3$), расположены симметрично относительно впадины 1 и на равном расстоянии от гемов α- и β субъединиц (рисунок 28 b). Отрицательно заряженные – -COOH группы аминокислот (для впадины 1 (A,B,D): (A) Glu 23, 27, 30, (A) Asp 47, (B) Glu 5, 6, 120, (B) Asp 128, (D) Glu 89, (D) Asp 93 и концевой (D) His 145; для впадины 1 (C,D,B): (C) Glu 23, 27, 30, (C) Asp 47, (D) Glu 5, 6, 120, (D) Asp 128, (B) Glu 89, (B) Asp 93 и концевой (B) His 145; для впадины 2 (A,C,D): (A) Asp 85, концевой (A) Arg 141, (C) Asp 6, (D) Glu 42, (D) Asp 46, 51; для впадины 2 (C,A,B): (C) Asp 85, концевой (C) Arg 141, (A) Asp 6, (B) Glu 42, (B) Asp 46, 51) формируют отрицательный потенциал 1 и 2 впадин и примыкающих к ним поверхностуй.

С помощью программы PyMOL также были определены размеры дикатионов Pen и CysAm: размер дикатиона Pen равен ~ 375 $Å^3$, в то время как размер дикатиона CysAm равен ~ 265 $Å^3$. Исходя из размера CysAm, можно предположить, что со 2 впадиной может связываться минимум 3 молекулы комплекса, а с 1 – минимум 1 молекула. То есть суммарно с молекулой Hb может связаться минимум 8 молекул CysAm. Поверхности с отрицательным зарядом, примыкающие к впадинам, также могут участвовать в связывании комплекса. В случае Pen мы имеем другую ситуацию. Он имеет

больший объем (~ 375 $Å^3$) и может связываться как с положительными, так и с отрицательными группами поверхности белка. Так, например, в самую большую из отрицательно заряженных впадин (впадина 2) может поместиться только две молекулы Pen.

Также программа PyMOL выявляет неглубокие, неярко выраженные впадины со смешанным зарядом, от небольшого положительного и отрицательного до нейтрального заряда, на поверхности β-субъединицы на расстоянии примерно 10 Å от гема. При увеличении концентрации Pen, видимо, происходит связывание комплекса с этими впадинами, но оно менее прочное. Поэтому K_s падает с увеличением концентрации Pen.

Таким образом, различные впадины и неровности на поверхности Hb являются пулами связывания НКЖ. Связанные с Hb молекулы НКЖ выделяют NO гораздо медленнее ($k \sim 10^{-8}$ $с^{-1}$). В результате Hb может переносить адсорбированные на них НКЖ к другим мишеням. Поскольку НКЖ связаны с Hb обратимо, то по мере уменьшения концентрации НКЖ они теряют с ним связь. Можно также предположить, что центры связывания комплексов могут быть переносчиками других метаболитов, имеющих заряженную функциональную группу.

4.1.2 Взаимодействие НКЖ с Cyt C

Как было установлено из анализа литературы по свойствам Cyt C и комплексов NO—Cyt C, Cyt C^{3+} взаимодействует с NO при pH 7.0 с $k_{асс}=7.2\cdot10^2$ $М^{-1}с^{-1}$, $K_{равн}$ этой реакции равна $1.63\cdot10^4$ $моль^{-1}\cdot л$ (Таблица 5). Это позволяет уверенно регистрировать кинетику реакции образования комплекса методом спектрофотометрии и определять константу скорости реакции взаимодействия НКЖ с Cyt C^{3+} при pH 7.0. Другая ситуация наблюдается в случае Cyt C^{2+}. Он реагирует с NO с большой скоростью только при низких значениях pH. При более высоких pH Cyt C^{2+} не может использоваться как «ловушка» для анализа кинетики реакции выделения NO из НКЖ.

Несмотря на то, что Cyt C^{2+} и Cyt C^{3+} в индивидуальном состоянии не реагируют с кислородом, все исследования проводили в атмосфере азота или аргона, так как NO быстро взаимодействует с O_2, давая оксиды азота, с константой скорости $2 \cdot 10^6$ $M^{-2}c^{-1}$ [159].

Поскольку нужно было проводить работу с НКЖ при различных pH, прежде всего была оценена их устойчивость при pH 7.0 (рисунок 19) и pH 3.0. При pH 3.0 визуально наблюдали образование мутности (нерастворимых продуктов реакции распада) в растворе, что подтверждается равномерным нарастанием оптической плотности в спектральном диапазоне 450 – 650 нм. При кислых значениях pH процесс распада комплекса происходит быстрее.

Далее были записаны спектры поглощения препаратов Cyt C^{2+} и Cyt C^{3+}, и NO—Cyt C^{2+}, NO—Cyt C^{3+}, которые получили продуванием газообразного NO через растворы Cyt C^{2+} и Cyt C^{3+}, соответственно [163, 164]. На рисунке 29 представлены спектры Cyt C^{3+} с одним максимумом поглощения: λ_1=531 нм и NO—Cyt C^{3+} с двумя: λ_1=530 нм и λ_2=562 нм.

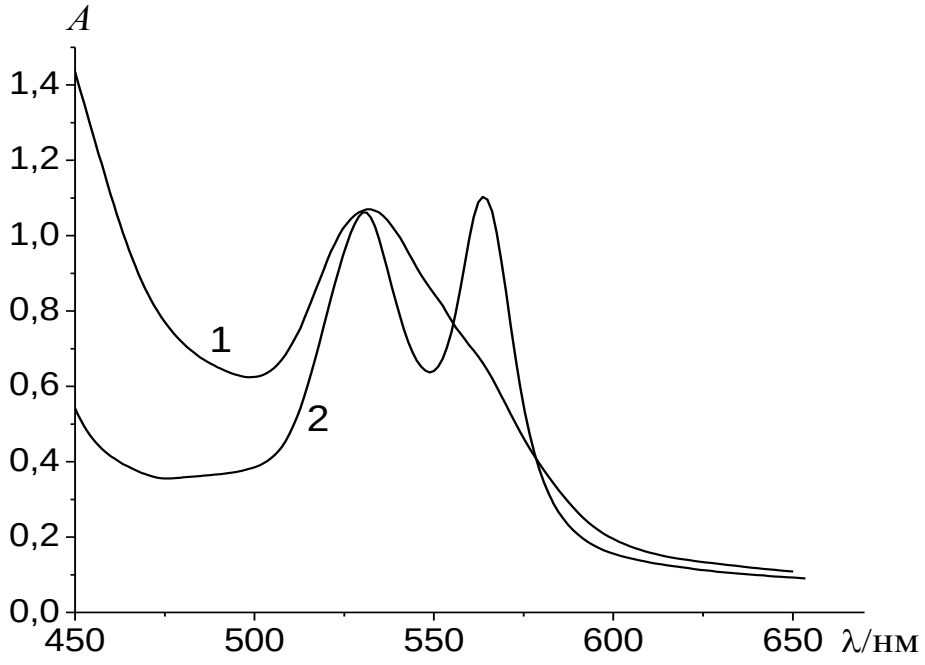


Рисунок 29 - Спектры поглощения 9.7 10^{-5} M Cyt C^{3+} (l) и NO—Cyt C^{3+} (2), который получен после уравновешивания раствора Cyt C^{3+} с газообразным NO [163]. Условия: 23 °C, растворитель - 0.05 M фосфатный буфер, pH 7.0, l атм NO.

На рисунке 30 представлены спектры поглощения Cyt C^{2+} с двумя максимумами поглощения: λ_1=521 нм и λ_2=551 нм и NO—Cyt C^{2+} с двумя максимумами: λ_1=541 нм и λ_2=565 нм. Было установлено, что даже в течение суток спектры поглощения не изменялись. Это объясняется тем, что, хотя эти соединения и диссоциируют в соответствии со своими константами равновесия (Таблица 5), они устойчивы, так как присутствует избыток NO.

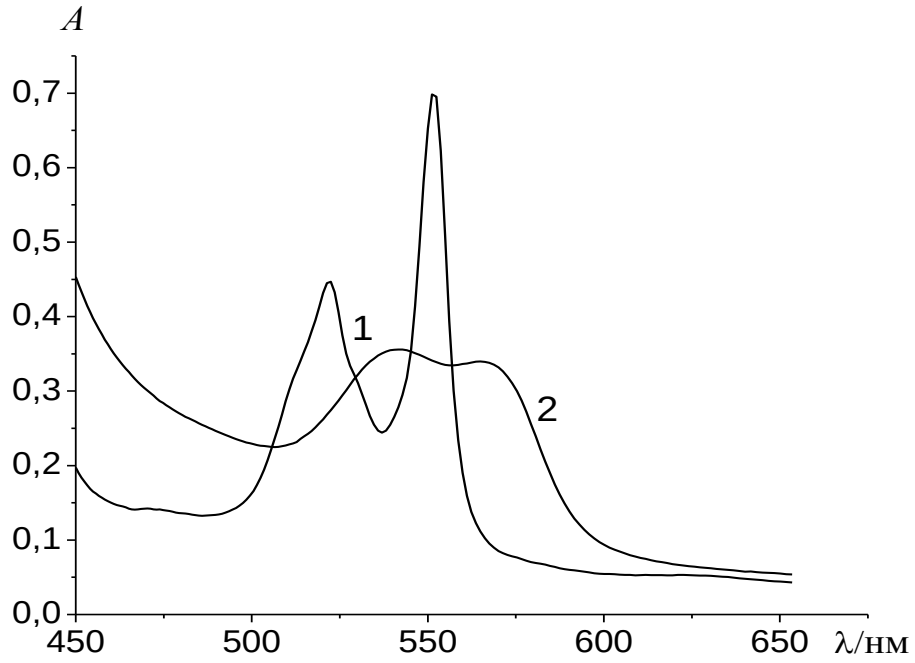


Рисунок 30 - Спектры поглощения 2.3 10^{-5} M Cyt C^{2+} (l) и NO—Cyt C^{2+} (2), который получен после уравновешивания раствора Cyt C^{2+} с газообразным NO [164]. Условия: 23 °C, растворитель - 0.05 M цитрат-фосфатный буфер, pH 3.0, l атм NO.

Нитрозилирование Cyt C^{2+}

На рисунке 31 представлен эксперимент по взаимодействию CysAm с Cyt C^{2+} при pH 3.0 [164]. Спектры поглощения регистрировали во времени, в кювете сравнения из-за неустойчивости раствора CysAm присутствовал только цитрат-фосфатный буфер, pH 3.0. Спектр (1) – исходный спектр Cyt C^{2+}, а спектры (2)-(8) представляют собой суперпозицию спектров Cyt C^{2+} и NO—Cyt C^{2+}. С помощью программы MathCad каждый спектр поглощения раскладывали на составляющие компоненты и определяли степень конверсии и концентрации Cyt C^{2+}, NO—Cyt C^{2+}. На основании рассчитанных значений

концентраций полученного NO—Cyt C^{2+} была построена кинетическая зависимость образования данного комплекса (рисунок 31, вставка).

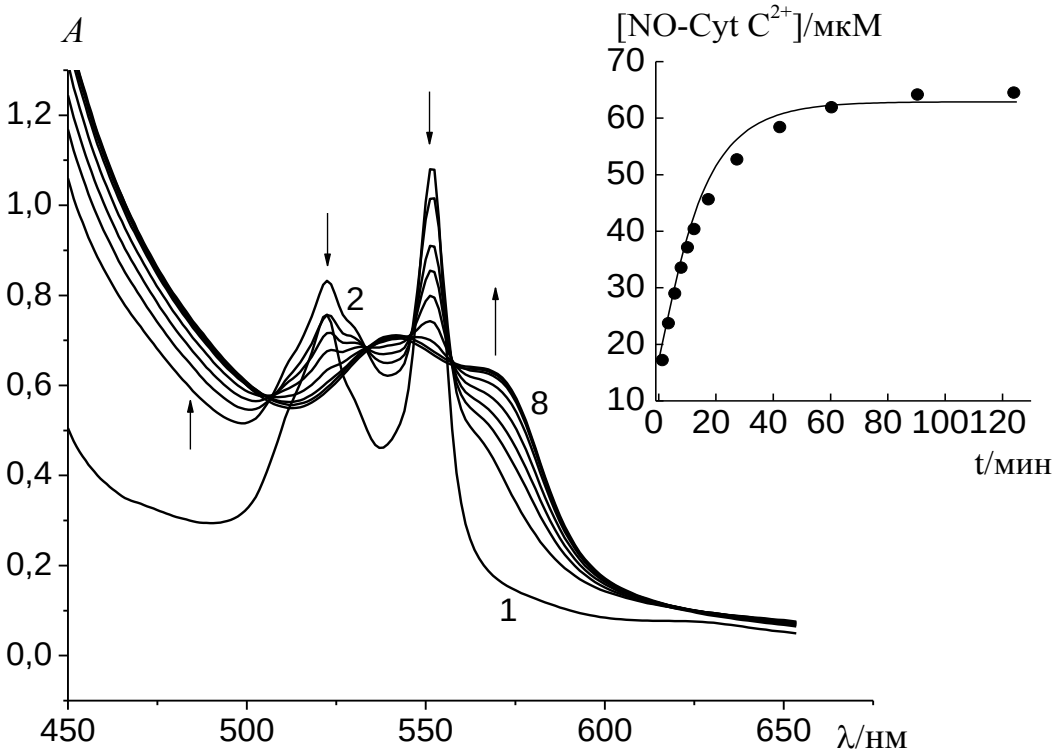


Рисунок 31 - Изменение разностных спектров поглощения во времени при взаимодействии $2 \cdot 10^{-4}$ М CysAm с $6.5 \cdot 10^{-5}$ М Cyt C^{2+} [164]. Спектр (l) – спектр исходного Cyt C^{2+}. Спектры (2) – (8) соответствуют времени регистрации через 1.3; 5.6; 10.1; 17.3; 27.3; 42.3; и 60.3 мин после начала реакции. На вставке представлена кинетическая кривая накопления аддукта NO—Cyt C^{2+} данного опыта. Условия: 23 °С, растворитель – 0.05 М цитрат-фосфатный буфер, pH 3.0.

Для определения механизма взаимодействия CysAm с Cyt C^{2+}, а также для количественного описания исследуемого процесса была предложена следующая последовательность реакций:

$$\text{CysAm} \xrightarrow{k_1} \text{P+NO}$$

$$\text{NO + Cyt C}^{2+} \xleftrightarrow{k_2, k_{-2}} \text{NO-Cyt C}^{2+}$$

Соответствующая система уравнений имеет вид

$$d[\text{CysAm}]/dt = -k_1[\text{CysAm}],$$

$$d[\text{NO}]/dt = k_1[\text{CysAm}] - k_2[\text{NO}][\text{ Cyt C}^{2+}] + k_{-2}[\text{NO-Cyt C}^{2+}],$$

$$d[\text{Cyt C}^{2+}]/dt = -k_2[\text{NO}][\text{ Cyt C}^{2+}] + k_{-2}[\text{NO-Cyt C}^{2+}],$$

$$d[\text{NO- Cyt C}^{2+}]/dt = k_2[\text{NO}][\text{ Cyt C}^{2+}] - k_{-2}[\text{NO-Cyt C}^{2+}]$$

Константы скорости реакции взаимодействия NO с Cyt C $^{2+}$ даны в работе [117]: k_2 = 8.3 $M^{-1}c^{-1}$, k_{-2} = $2.9\cdot10^{-5}$ c^{-1}. Значение константы k_1 нашли путем минимизации функционала $\Phi(k_1)$, который представляет собой сумму квадратов отклонений вычисленных и экспериментальных значений количества нитрозилированного белка в заданные моменты времени t_j:

$$\Phi(k_1) = \sum_{j=1}^{n} \{[\text{NO—Cyt C}^{2+}]_{\text{расч}}(t_j) - [\text{NO—Cyt C}^{2+}]_{\text{эксп}}(t_j)\}^2$$

Также было учтено количество комплекса NO-Cyt C^{2+}, которое образовалось за 5 мин до момента начала регистрации эксперимента. В результате решения задачи было определено занчение константы k_1 = $(2.7\pm0.1)\cdot10^{-3}$ c^{-1}, которое удовлетворительно описывает экспериментальную кривую. Данная константа отличается на два порядка от константы опыта с сенсорным электродом при нейтральных pH ($(5.2 \pm 0.2)\cdot10^{-5}$ c^{-1}), что свидетельствует о более быстром распаде НКЖ в кислых условиях.

Нитрозилирование Cyt C^{3+}

Основное внимание в работе с Cyt C было направлено на изучение взаимодействия НКЖ с Cyt C^{3+}, поскольку это исследование можно было проводить при pH 7.0. На рисунке 20 представлены результаты эксперимента взаимодействия Pen с Cyt C^{3+}. Видно, что при записи первого же спектра поглощения (спектр №2), регистрируется спектр Cyt C^{2+}. Это объясняется тем, что НКЖ восстанавливает Cyt C^{3+} до Cyt C^{2+}. А так как Cyt C^{2+} при pH 7.0 реагирует с NO очень медленно, образования NO—Cyt C^{2+} не наблюдается. Поэтому, для того чтобы исключить возможность восстановления Cyt C^{3+}, реакцию проводили в присутствии $K_3[Fe(CN)_6]$. Такая постановка эксперимента правомерна, так как, если НКЖ в виде лекарств будут вводиться в организм, они попадут в условия, где довольно много метаболитов, имеющих более положительный редокс-потенциал, чем у CysAm и Pen, и, безусловно, будут ими окислены.

Прежде всего, были зарегистрированы спектры поглощения реакции взаимодействия $K_3[Fe(CN)_6]$ и НКЖ в водном растворе (рисунок 32). Для обоих НКЖ наблюдали быстрое образование берлинской лазури (PB). PB представляет собой смесь гексацианоферратов (Fe(III)Fe(II)) от $K_4Fe^{II}[Fe^{II}(CN)_6]$ (полностью восстановленная форма-PW) до $Fe_4^{III}[Fe^{III}(CN)_6]_3Cl_3$ (полностью окисленная форма-PY) [165], интенсивность окраски раствора зависит от соотношения концентраций НКЖ и $K_3[Fe(CN)_6]$. PB существует в двух формах: нерастворимая PB ($Fe_4[Fe(CN)_6]_3$) и растворимая ($KFe[Fe(CN)_6]$). Реакция образования PB является качественной реакцией на ионы Fe^{2+} и Fe^{3+}.

Таким образом, НКЖ под действием $K_3[Fe(CN)_6]$ быстро распадаются с высвобождением железа, которое далее участвует в реакции образования PB:

$$K^+ + Fe^{2+} + [Fe(CN)_6]^{3-} \rightarrow KFe^{III}[Fe^{II}(CN)_6] \qquad (4.1.2.1)$$

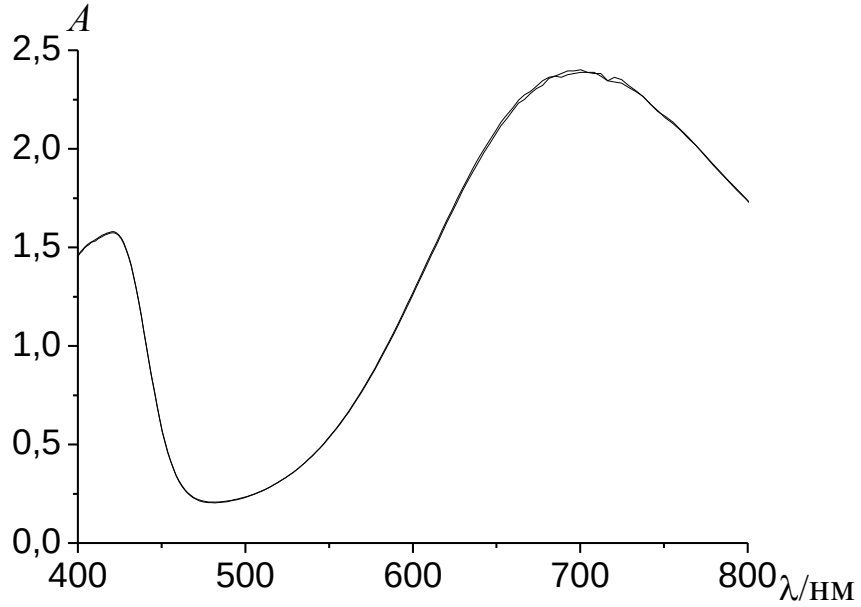


Рисунок 32 - Изменение спектров поглощения во времени при взаимодействии $1.5 \cdot 10^{-4}$ М Pen с $2 \cdot 10^{-3}$ М $K_3[Fe(CN)_6]$. Условия: 25 °С, растворитель-вода.

Далее перешли непосредственно к изучению реакции взаимодействия НКЖ с Cyt C^{3+} при разных исходных соотношениях реагентов. При нитрозилировании Cyt C^{2+} наблюдали постепенное образование NO-Cyt C^{2+}.

В случае же Cyt C^{3+} наибольшее количество NO-Cyt C^{3+} образуется в начальный момент времени, сразу после смешивания реагентов. Затем NO-Cyt C^{3+} медленно разлагается, и в конце наблюдаем спектр исходного Cyt C^{3+} (рисунок 33).

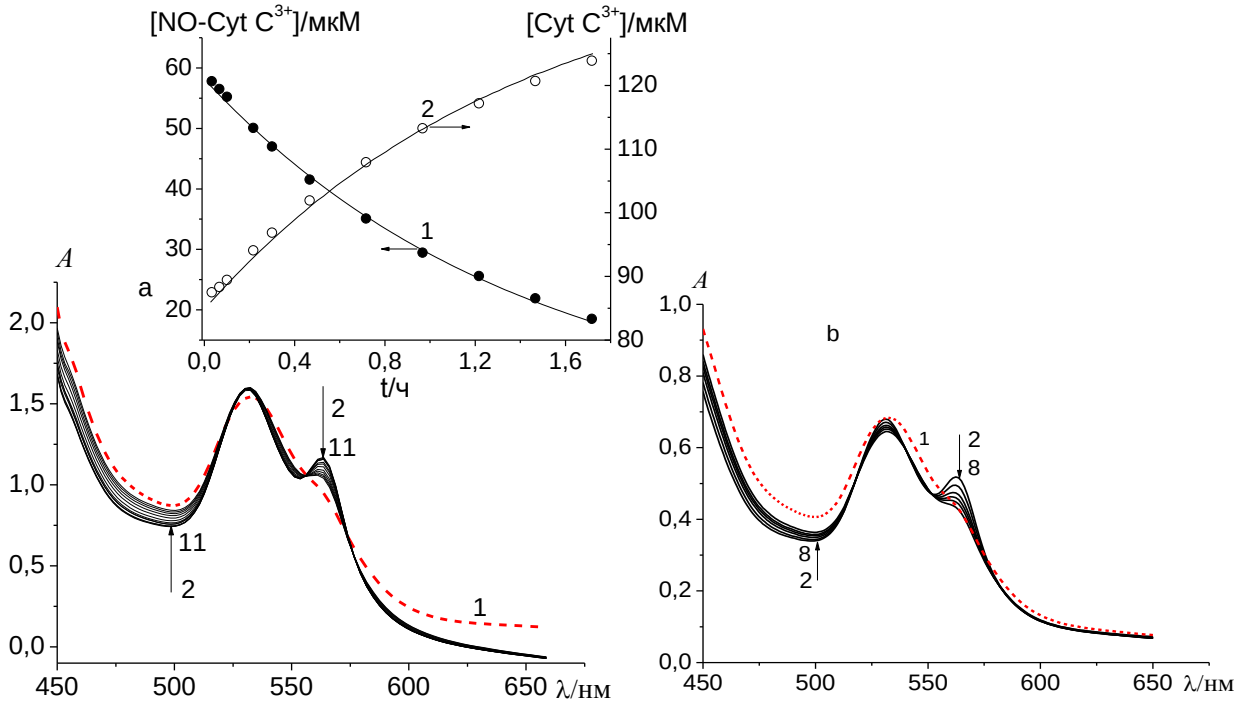


Рисунок 33 - Изменение разностных спектров поглощения во времени при взаимодействии $2\cdot10^{-5}$ М Pen с $14.3\cdot10^{-5}$ М Cyt C^{3+} (**a**) и $1.5\cdot10^{-5}$ М CysAm с $6.5\cdot10^{-5}$ М Cyt C^{3+} (**b**) в присутствии $4\cdot10^{-3}$ М (**a**) или $2\cdot10^{-3}$ М (**b**) $K_3[Fe(CN)_6]$ [163]. Спектр (l) – спектр исходного Cyt C^{3+}. (**a**) Спектры (2) – (11) соответствуют времени регистрации через 2; 4; 6; 13; 18; 28; 43; 58; 73; 88; 103 мин после начала реакции. (**b**) Спектры (2) – (8) соответствуют времени регистрации через 0.5; 3; 15; 36.5; 66.5; 96.5; 156.5 мин после начала реакции. На вставке рисунка (**a**) приведены кинетические кривые расходования NO-Cyt C^{3+} (l) и накопления Cyt C^{3+} (2). Условия: 23 °C, растворитель – 0.05 М фосфатный буфер, pH 7.0.

НКЖ под действием окислителя распадается по следующей схеме:

$$НКЖ \rightarrow 2RS^- + 2Fe^{2+} + 4NO$$

$K_3[Fe(CN)_6]$ во всех опытах присутствует в избытке. Fe^{2+} участвует в реакции (4.1.2.1) образования РВ. $[РВ]=2[НКЖ]_0$

Выделившиеся тиолатные лиганды (RS^-) вступают в две параллельные реакции:

$$RS^- \xrightarrow{K_3[Fe(CN)_6]} RS\text{-}SR;$$

$Cyt\ C^{3+} + RS^- \rightarrow Cyt\ C^{2+} + RS\text{-}SR$ (4.1.2.2)

Выделившиеся NO-группы также участвуют в реакции нитрозилирования $Cyt\ C^{3+}$, которую регистрировали спектрофотометрически - образование NO-$Cyt\ C^{3+}$: $NO + Cyt\ C^{3+} \rightleftharpoons NO\text{-}Cyt\ C^{3+}$ (4.1.2.3)

В работе [130] было установлено, что NO-$Cyt\ C^{3+}$ существует в равновесии со своей резонансной формой NO^+-$Cyt\ C^{2+}$:

$NO + Cyt\ C^{3+} \rightleftharpoons [NO\text{-}Cyt\ C^{3+}] \rightleftharpoons NO^+\text{-}Cyt\ C^{2+}$,

при гидратации которой образуются нитриты:

$NO^+\text{-}Cyt\ C^{2+} \rightleftharpoons Cyt\ C^{2+} + NO^-_2 + 2H^+$ (4.1.2.4)

Причем, как было описано в литературном обзоре, равновесие данной реакции сильно зависит от pH среды. При нейтральных значениях pH моментально образуется NO-Cyt C^{3+} и затем постепенно превращается в продукты. Cyt C^{2+}, который образуется в данной реакции (4.1.2.4), сразу окисляется $K_3[Fe(CN)_6]$. Поэтому при записи спектров поглощения, наблюдали расход NO-Cyt C^{3+} и накопление Cyt C^{3+}.

Для выяснения механизма процесса распада NO-Cyt C^{3+} и количественного описания экспериментальных данных была рассмотрена следующая схема реакций (на примере опыт с Pen):

$NO + Cyt\ C^{3+} \xleftrightarrow{k_1, k_2} NO\text{-}Cyt\ C^{3+}$

$NO\text{-}Cyt\ C^{3+} \xleftrightarrow{k_3, k_4} Cyt\ C^{3+} + P$

Соответствующая система уравнений имеет вид:

$d[NO]/dt = -k_1[NO][Cyt\ C^{3+}] + k_2[NO\text{-}Cyt\ C^{3+}]$

$d[Cyt\ C^{3+}]/dt = -k_1[NO][Cyt\ C^{3+}] + k_2[NO\text{-}Cyt\ C^{3+}] + k_3[NO\text{-}Cyt\ C^{3+}] - k_4[Cyt\ C^{3+}][P]$

$d[NO\text{-}Cyt\ C^{3+}]/dt = k_1[NO][Cyt\ C^{3+}] - k_2[NO\text{-}Cyt\ C^{3+}] - k_3[NO\text{-}Cyt\ C^{3+}] + k_4[Cyt\ C^{3+}][P]$

$d[P]/dt = k_3[NO\text{-}Cyt\ C^{3+}] - k_4[Cyt\ C^{3+}][P]$

Начальное значение концентрации монооксида азота $[NO]_0 = 8 \cdot 10^{-5}$ М задано в предположении, что все группы NO, содержащиеся в нитрозильном

комплексе железа, выделяются в раствор. При проведении расчетов были также уточнены концентрации реагентов [Cyt $C^{3+}]_0$ = $12.3 \cdot 10^{-5}$ М и [NO-Cyt $C^{3+}]_0$ = $2 \cdot 10^{-5}$ М, образовавшихся в системе к моменту начала регистрации экспериментальных данных.

Константы скорости реакции нитрозилирования Cyt C^{3+} известны [117]: k_1 = $7.2 \cdot 10^2$ $M^{-1}c^{-1}$, k_2 = $4.4 \cdot 10^{-2}$ c^{-1}. Задача заключалась в определении по имеющимся экспериментальным данным константы скорости k_3 и k_4.

В результате численного решения задачи найдены значения k_3 = $4.16 \cdot 10^{-4}$ c^{-1}, k_4 = 0.49 $M^{-1}c^{-1}$, которые удовлетворительно описывает как расходование NO-Cyt C^{3+}, так и накопление в системе Cyt C^{3+} (рисунок 33 а, вставка).

4.2 Взаимодействие НКЖ с GSH

Изучение механизмов распада и дальнейшей трансформации НКЖ *in vivo* является очень важным этапом исследования с точки зрения дальнейшего использования этих комплексов для NO терапии. Особое внимание следует уделить возможным процессам реакции обмена тиоловых лигандов НКЖ на биологически важные тиолы, находящиеся в среде. В качестве одного из таких внутриклеточных тиолов был выбран GSH. Он является самым распространенным небелковым тиолом в живых организмах и выполняет множество функций, а отношение GSH/GSSG составляет основу клеточного окислительно-восстановительного гомеостаза [135].

Исходя из этого, в данной работе исследовали взаимодействие НКЖ с GSH. Было установлено, что обратимо выделяющиеся из НКЖ тиоловые лиганды замещаются на GSH с образованием нового НКЖ такой же структуры, как и катионные комплексы (рисунок 17), но с GSH лигандами – *бис*-(глутатион-2-тиолат)тетранитрозилдижелезо
$[Fe_2(SC_{10}H_{17}N_3O_6)_2(NO)_4]SO_4 \cdot 2H_2O$ (Glut).

Для решения поставленной задачи на первом этапе были записаны спектры поглощения комплекса Glut (рисунок 34) и изучена его NO-

донирующая способность (рисунок 35, кривая 2). В качестве растворителя во всех опытах был использован 0.05 М Трис-HCl буфер, так как параллельно проводился масс-спектрометрический анализ образцов. У фосфатного буфера, который использовался ранее, спектр его компонентов накладывался в виде многочисленных пиков на спектр опытного образца. На вставке к рисунку 34 приведена кинетическая кривая процесса распада Glut, которая построена с использованием уравнения: $y(t) = y_o + A \cdot e^{-kt}$. Эффективная константа скорости составляет $3.8 \cdot 10^{-5}$ $с^{-1}$. Сравнивая данные, полученные методом спектрофотометрии, по распаду комплексов CysAm (рисунок 19 a), Pen (рисунок 19 b) и Glut (рисунок 34) при одинаковой исходной концентрации комплексов, можно сделать вывод, что Glut является самым устойчивым к гидролизу в водном растворе.

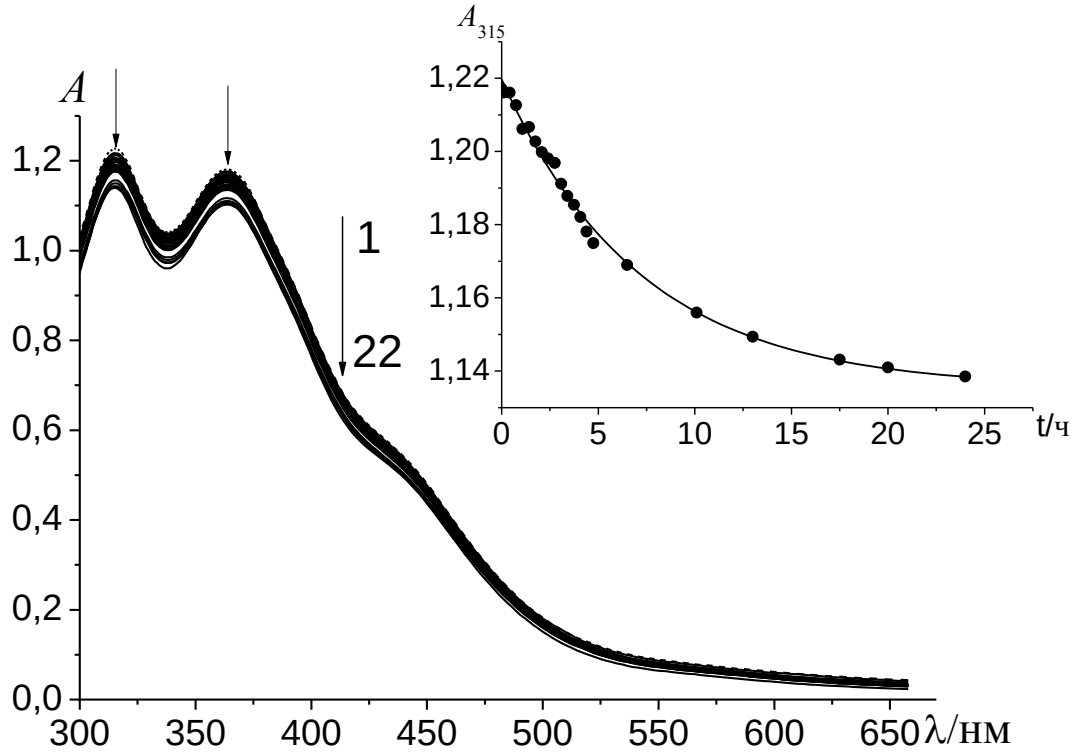


Рисунок 34 - Изменения спектров поглощения $1.5 \cdot 10^{-4}$ М Glut во времени: спектры зарегистрированы через 30 с (1), 5 (2) мин после начала реакции. Спектры (3)-(16) записаны далее с интервалом 20 мин. Спектры (17)-(22) записаны при временах 6.5 (17), 10.1 (18), 13 (19), 17.5 (20), 20 (21), 24 (22) ч после начала реакции. В спектрах (1)-(22) два максимума: $\lambda_1 = 315$ нм и $\lambda_2 = 365$ нм; $\varepsilon_{315\ нм}$ равна $8.18 \cdot 10^3$ $М^{-1}см^{-1}$. На вставке приведена кинетическая кривая данного опыта. Условия реакции: 25 ^oC, растворитель – 0.05 М Трис-HCl-буфер, pH 7.0.

Для того, чтобы сравнить NO-донорную активность исследуемых НКЖ с Glut, провели опыты в присутствии Hb. На рисунке 35 приведены кинетические кривые образования HbNO. Используя уравнение вида: $y(t) = y_o + A\cdot(1-e^{-kt})$, получили эффективные константы скорости первого порядка (k) для этих реакций (таблица 10). Установлено, что NO выделяется из Glut почти в 25 раз медленнее, чем из Pen, в тоже время скорость генерирования NO из CysAm и Glut практически одинаковая (таблица 10).

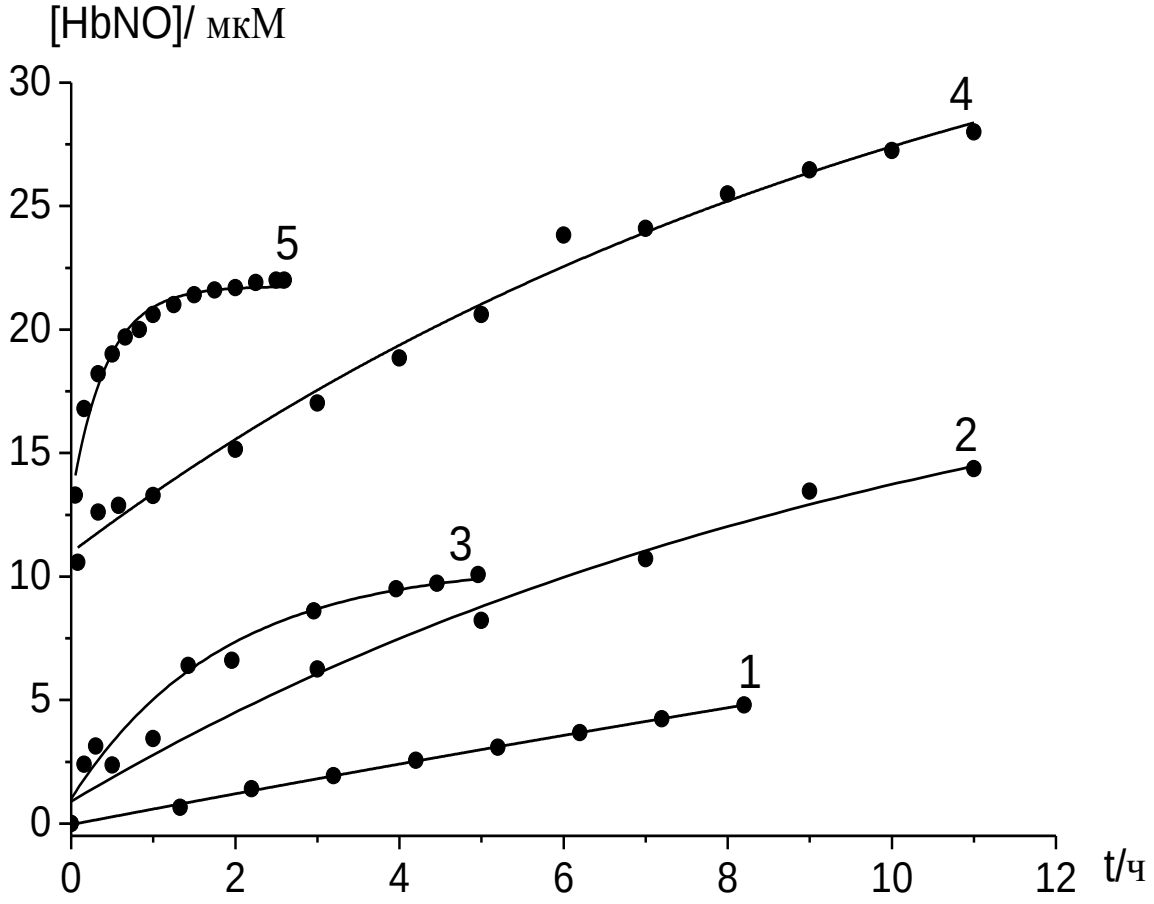


Рисунок 35 - Кинетика образования HbNO при взаимодействии: 1) $1.5\cdot10^{-4}$ М CysAm и $2\cdot10^{-5}$ М Hb в присутствии 10^{-3} М GSH; 2) $1.5\cdot10^{-4}$ М Glut и $2.1\cdot10^{-5}$ М Hb; 3) $1.5\cdot10^{-4}$ М Pen и $2.1\cdot10^{-5}$ Hb в присутствии 10^{-3} М GSH; 4) $1.5\cdot10^{-4}$ М CysAm и $3\cdot10^{-5}$ М Hb; 5) $1.5\cdot10^{-4}$ М Pen и $2.2\cdot10^{-5}$ М Hb [155]. Сплошные линии — аппроксимация данных с использованием уравнения $y(t) = y_o + A(1-\cdot e^{-kt})$. Условия: 25 °С, растворитель – 0.05 М Трис-HCl буфер, pH 7.0.

Таблица 10 - Результаты кинетических экспериментов.

Рисунок №	НКЖ	Процесс	k, $с^{-1}$
35, кривая 4	CysAm	Взаимодействие с Hb	$(2.5 \pm 0.2)\cdot10^{-5}$
35, кривая 5	Pen	Взаимодействие с Hb	$(6.4 \pm 0.6)\cdot10^{-4}$
35, кривая 2	Glut	Взаимодействие с Hb	$(2.6 \pm 0.3)\cdot10^{-5}$
35, кривая 1	CysAm	Взаимодействие с Hb в присутствии GSH	$(5 \pm 0.5)\cdot10^{-6}$
35, кривая 3	Pen	Взаимодействие с Hb в присутствии GSH	$(1.5 \pm 0.15)\cdot10^{-4}$
36 (b)	CysAm	Взаимодействие с GSH	$(5 \pm 0.5)\cdot10^{-6}$
36 (a)	Pen	Взаимодействие с GSH	$(6.9 \pm 0.7)\cdot10^{-5}$

Спектрофотометрический анализ реакции обмена тиолатных лигандов на GSH в НКЖ

Как было установлено в главе 3 на примере Pen, НКЖ в водной среде выделяют обратимо, помимо NO, также и оба тиолатных лиганда. Таким образом, в присутствии GSH можно ожидать, что будет происходить обмен цистеаминовых и пеницилламиновых лиандов на глутатионовые. В реакционных системах, содержащих НКЖ и GSH (рисунок 36), наблюдали нарастание интенсивности спектров поглощения, что свидетельствовало об образовании Glut. Максимальное увеличение поглощения происходило за сутки (для Pen) и 68 ч (для CysAm). При этом, концентрация образовавшегося Glut (учитывая, что $\varepsilon_{315\ нм} = 8.18\cdot10^{3}$ $М^{-1}см^{-1}$) составляла $1.15\cdot10^{-4}$ М (в опыте Pen, рисунок 36 a) и $1.16\cdot10^{-4}$ М (в опыте с CysAm, рисунок 36 b) при исходной концентрации НКЖ $1.5\cdot10^{-4}$ М. То есть выход Glut равен 76 % для опыта с Pen и 77% для опыта с CysAm. Выход не может достигать 100%, так как Glut параллельно также распадается. Очевидно, что наблюдаемый в этом эксперименте обмен лигандов зависит от прочности связи тиолатных лигндов с Fe. Используя уравнение $y(t) = y_o + A\cdot(1 - e^{-kt})$ вычислили эффективные константы процесса обмена тиолатных лигандов на GSH (таблица 10). Установлено, что в случае комплекса Pen обмен лигандами происходит быстрее.

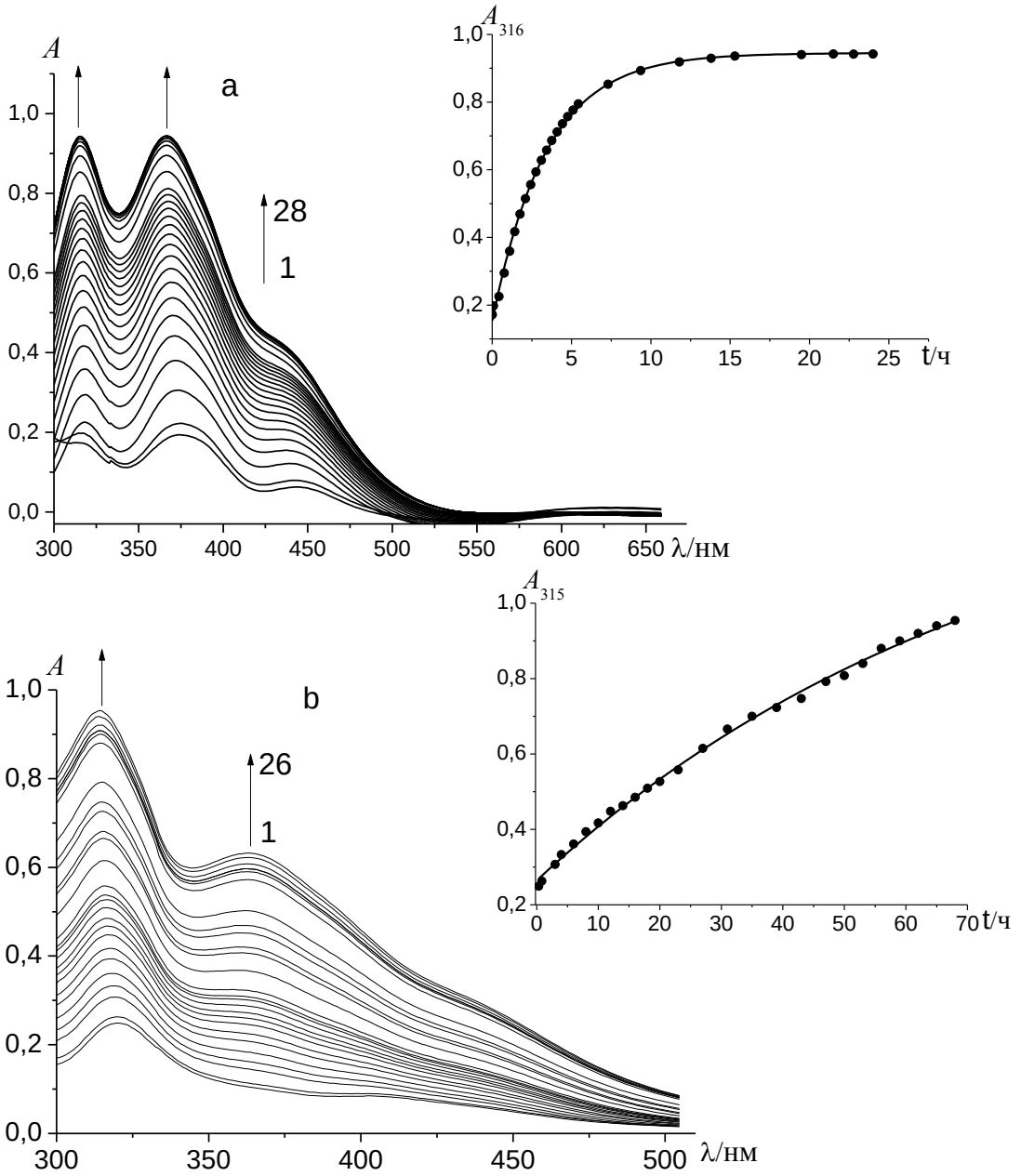


Рисунок 36 - Изменение разностных спектров поглощения при взаимодействии $1.5 \cdot 10^{-4}$ М Pen (**a**) и CysAm (**b**) с 10^{-3} М GSH во времени [155]. (**a**) Спектры зарегистрированы через 45 с (1), 5 мин (2), 20 мин (3) после начала реакции. Спектры (4)-(18) записаны далее с интервалом 20 мин. Спектры (19)-(28) записаны при временах 7.3 (19), 9.4 (20), 11.8 (21), 13.8 (22), 16.3 (23), 19.5 (24), 21.5 (25), 22.8 (26), 23 (27), 24 (28) ч после начала реакции. В спектрах (1)-(28) два максимума: λ_1 = 315 нм и λ_2 = 367 нм. (**b**) спектры зарегистрированы через 20 мин (1), 50 мин (2), 3 ч (3) после начала реакции. Спектры (4)-(12) записаны далее с интервалом 1 ч. Спектр (13) записан через 3 ч после спектра (12). Спектры (14)-(19) записаны далее с интервалом 4 ч, спектры (20)-(26) – 3 ч, спектр (26) записан через 68 ч после начала реакции. В спектрах (15)-(26) два максимума: λ_1 = 315 нм и λ_2 = 362 нм. На вставке приведены кинетические кривые образования Glut при взаимодействии НКЖ с GSH на основании данных опытов. Условия реакции: 25 ^{o}C, растворитель – 0.05 М Трис-HCl буфер, pH 7.0.

При проведении опытов обмена в присутствии Hb в системе Pen-GSH накопление HbNO происходило с *k*, равной $1.5 \cdot 10^{-4}$ $с^{-1}$ (кривая 3, рисунок 35, Таблица 10), то есть скорость выхода NO была промежуточной между системами Pen-Hb и Glut-Hb, поскольку NO выделялся как из Pen, так и из Glut. Видно, что в нулевой момент времени уже есть некоторое количество HbNO (реакцию начинали введением Hb), причём в случае Pen начальная концентрация больше. Это объясняется тем, что на растворение НКЖ затрачивалось время – 15 мин. За это время проходил частичный гидролиз с выделением NO, и при первой записи спектра поглощения фиксировался образовавшийся HbNO. При проведении опытов обмена в присутствии Hb в системе CysAm-GSH накопление HbNO происходило даже медленнее, чем в системе Glut-Hb, с *k*, равной $5 \cdot 10^{-6}$ $с^{-1}$ (кривая 1, рисунок 35, Таблица 10). Таким образом, в НКЖ-GSH системах, НКЖ становятся более пролонгированными донорами NO, что имеет большое значение для их метаболизма.

Масс-спектрометрический анализ продуктов взаимодействия катионных НКЖ с GSH

Для доказательства замещения лигандов в катионных НКЖ при взаимодействии с глутатионом была осуществлена регистрация масс-спектров растворов исследуемых комплексов НКЖ с GSH (рисунок 37). Анализ изотопных распределений полученных ионных пиков и соотношение интенсивностей позволили идентифицировать все основные зарегистрированные ионы. Относительная интенсивность ионов, равная 100 %, означает, что в зарегистрированном масс-спектре количество данных ионов является наибольшим; интенсивности остальных ионов в спектре нормированы на эту максимальную величину. При анализе продуктов взаимодействия НКЖ с GSH (рисунок 37) после 24 часов (для Pen) и 68 часов (для CysAm) инкубации при 25 ^{o}C, был обнаружен Glut (Таблица 11). Таким образом, результаты масс-спектральных экспериментов водных растворов

комплексов качественно соответствует данным, полученным при спектрофотометрическом исследовании.

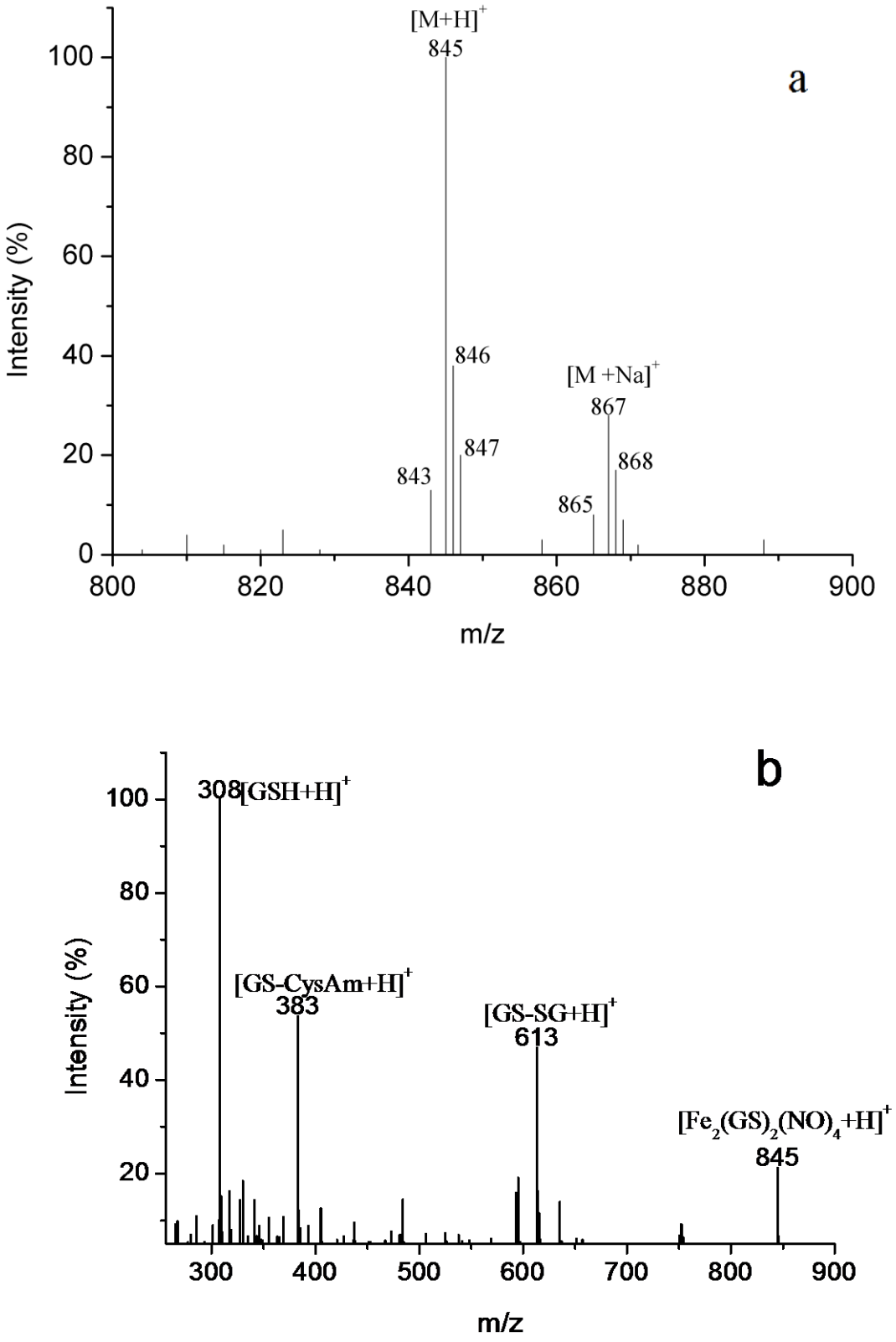


Рисунок 37 - Масс-спектр (ESI, +4,5 кВ) продукта взаимодействия $1.5 \cdot 10^{-4}$ М Pen (**a**) и CysAm (**b**) с 10^{-3} М GSH через 24 ч (**a**) и 68 ч (**b**) от начала реакции [155].

Таблица 11 - Результаты масс-спектрометрии.

Масса однозарядного иона, m/z	Тип иона	Формула для M	Комментарии
308	$[M + H]^+$	GSH	Глутатион, $C_{10}O_6N_3SH_{17}$
383	$[M + H]^+$	цистеамин-SG	Продукт взаимодействия GSH с цистеамином
613	$[M + H]^+$	GS-SG	Окисленная форма глутатиона
635	$[M + Na]^+$	GS-SG	Окисленная форма глутатиона
845	$[M + H]^+$	$[Fe_2(GSH)_2(NO)_4]$	Катион Glut
867	$[M + Na]^+$	$[Fe_2(GSH)_2(NO)_4]$	Катион Glut-Na^+

Таким образом, можно предположить, что образование устойчивого соединения Glut при обмене тиолатных лигандов в НКЖ может играть важную роль в биотрансформации НКЖ, связанной с противоопухолевой активностью. GSH является трипептидом и связывается в НКЖ S-группой цистеина, который находится между глутаминовой кислотой и глицином. Возможно, что эти две аминокислоты "экранируют" связь Fe-S в Glut от атаки тиолов и H_2O, в результате чего эта связь становится более прочной. Также следует отметить, что комплексы НКЖ-GSH являются более пролонгированными донорами NO, что важно для их потенциального применения в медицине.

ГЛАВА 5.
РАСПАД НЕЙТРАЛЬНЫХ НКЖ СТРУКТУРНОГО “μ-S” И “μ-N-C-S” ТИПА В РАЗЛИЧНЫХ РАСТВОРИТЕЛЯХ. ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С GSH

На заключительном этапе диссертационной работы была поставлена задача изучить распад биядерных нейтральных НКЖ структурного “μ-S” типа общего состава $[Fe_2(SR)_2(NO)_4]^0$ и “μ-N-C-S” типа состава $[Fe_2(S_2C_7H_4N)_2(NO)_4]^0$. Ранее уже были проведены исследования по анализу процесса распада и NO-донорной активности при различных pH значениях нейтрального НКЖ “μ-S” типа с пиримидиновыми лигандами (Pym) [13]. В диссертационной работе в качестве объектов исследования выбраны комплексы Ph и AmPh, содержащие в качестве тиолатных лигандов тиофенол и 2-аминотиофенол (рисунок 17). Так как данные НКЖ показали хорошую противоопухолевую активность [11, 146], представлялось важным исследовать возможность протекания реакции обмена тиолатных лигандов на GSH. Ph и AmPh имеют центросимметричную биядерную структуру. В молекуле данных комплексов каждый атом Fe, координированный с двумя нитрозильными группами и мостиковыми атомами серы, также образует связь с соседним атомом железа. Ковалентное окружение для атома Fe можно описать как искажённый “тетраэдр” с одной дополнительной вершиной при атоме Fe. Оба комплекса, аналогично Pen и CysAm, диамагнитны. Сравнительный анализ NO-донорной активности данных комплексов в растворах при pH=6.5 показал [146], что в анаэробной среде комплекс AmPh генерирует вдвое больше NO (~ 40 нМ), чем Ph (~20 нМ). Кинетические зависимости для обоих НКЖ имеют максимумы, появление которых связано с дальнейшим превращением NO, также как и в случае комплекса Pym [13].

В данной главе также проводится исследование комплекса BTz, который, аналогично всем ранее рассматриваемым НКЖ, является

перспективным противоопухолевым агентом [9, 95]. Поэтому, помимо изучения его распада в различных растворителях, также важно исследовать взаимодействие данного комплекса с GSH. BTz имеет димерную биядерную центросиммеричную структуру (рисунок 17), в которой каждый атом железа координирован двумя NO-группами и двумя бензотиазольными лигандами. Атомы железа связаны мостиком Fe–S–C–N–Fe'. Комплекс является парамагнитным, так как расстояние Fe-Fe составляет ~ 4 Å, в результате чего величина внутримолекулярного обменного взаимодействия незначительна. Ранее в работе [160] уже была изучена NO-донорная активность комплекса BTz. Количество NO, генерируемое данным комплексом, оценивали спектрофотометрически по количеству образовавшегося HbNO. Показано, что скорость выделения NO в раствор зависит от соотношения концентраций BTz и Hb. Наличие в исследуемом комплексе свободной неподеленной пары электронов благоприятствует стабилизации комплекса BTz, обеспечивая при этом его взаимодействие с Hb.

5.1 Особенности распада Ph и AmPh в ДМСО и Трис-HCl буфере. Обмен тиолатных лигандов на GSH

Устойчивость комплексов в ДМСО

Комплексы Ph и AmPh, в отличие от катионных Pen, CysAm и Glut, не водорастворимы, поэтому, прежде всего, исследовали их устойчивость в ДМСО. На рисунке 38 представлены спектры поглощения комплекса Ph и AmPh в ДМСО. Спектры поглощения комплекса Ph изменялись во времени, цвет раствора (желто-коричневый) оставался постоянным. На вставке рисунка 38 а представлена кинетическая зависимость оптической плотности от времени для данного процесса при λ=400 нм. Экспериментальные точки аппроксимированы кривой с использованием уравнения $y(t) = y_o + A \cdot e^{-kt}$. Эффективная константа скорости $k=1.12 \cdot 10^{-4}$ c^{-1}. В случае комплекса AmPh наблюдали изменение цвета раствора из черного сначала в зеленый, а затем в желто-коричневый.

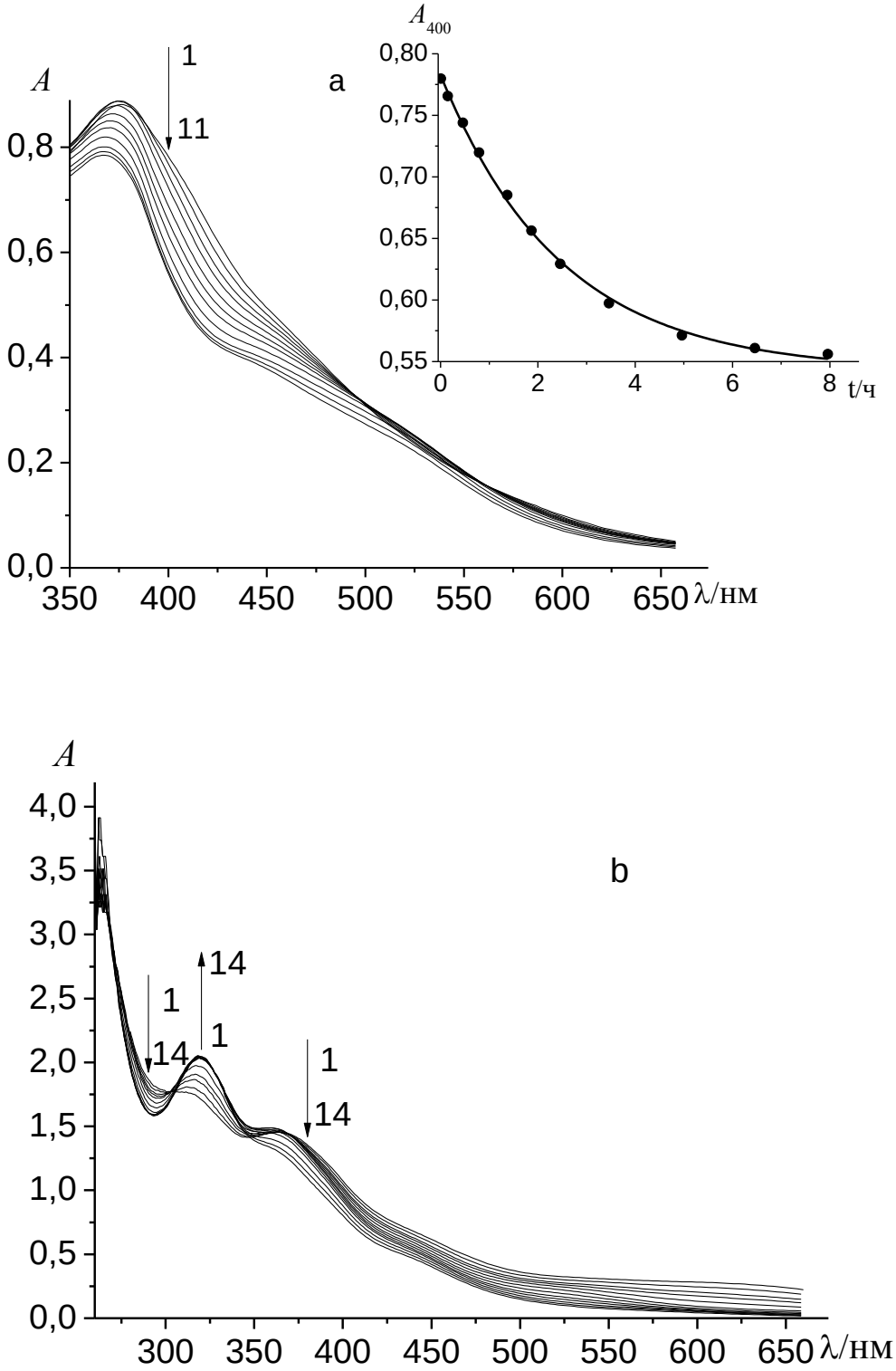


Рисунок 38 - Изменение спектров поглощения $8 \cdot 10^{-5}$ М Ph (**a**) и $1.14 \cdot 10^{-4}$ AmPh (**b**) во времени. (**a**) Спектры записаны через 0.4 (1), 9.1 (2) мин, 0.46 (3), 0.79 (4), 1.37 (5), 1.87 (6), 2.46 (7), 3.46 (8), 4.96 (9), 6.46 (10), 7.96 (11) ч и (**b**) через 2.42 (1), 5.92 (2), 11.37 (3), 16.37 (4), 21.37 (5), 26.37 (6), 36.37 (7), 46.37 (8), 56.37 мин (9), 1.12 (10), 1.36 (11), 1.61 (12), 1.86 (13), 2.11 (14) ч после введения. На вставке рисунка (**a**) представлена кинетическая зависимость данного процесса. Условия реакции: 25 °С, растворитель – 100% ДМСО.

Распад комплексов в Трис-HCl буфере

В случае ранее исследованных катионных комплексов Pen и CysAm в водной среде наблюдали медленное уменьшение интенсивности спектров поглощения во времени с двумя максимумами: λ_1=306 нм и λ_2 =363 нм для CysAm и λ_1=311 нм и λ_2 =353 нм для Pen (рисунок 19). Комплексы Ph и AmPh распадаются по-иному. На рисунке 39 приведены их спектры поглощения в Трис-HCl буфере. Комплексы в кюветы вводили в виде растворов в ДМСО. Отметим, что в случае комплекса Ph в кювете уже через 6 мин наблюдается образование белесой мутности, насыщенность которой нарастает со временем (рисунок 39 a), при этом максимум поглощения (419 нм) исходного соединения сдвигается вправо. В кювете с комплексом AmPh через 10 мин наблюдается выпадение черно-синего осадка (спектры (4) - (14), рисунок 39 b).

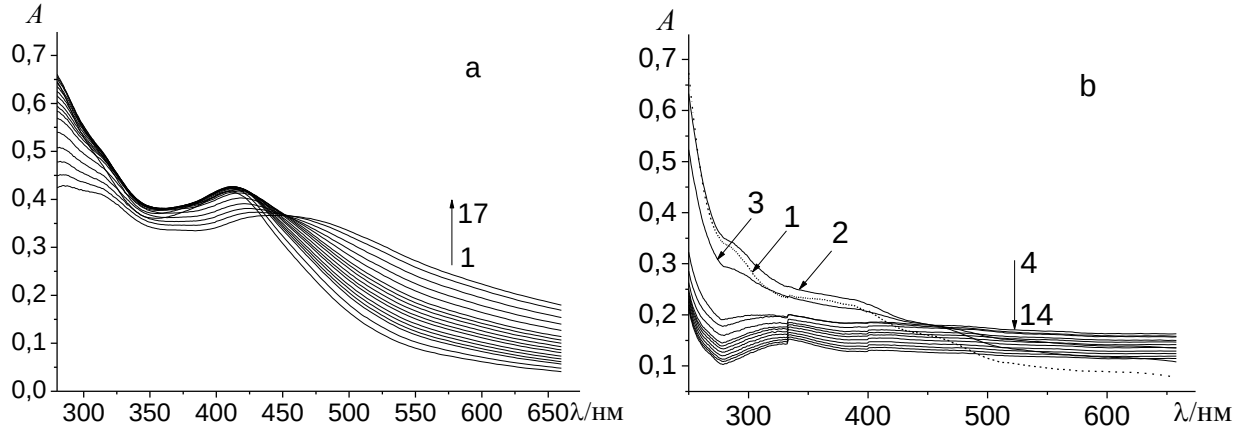


Рисунок 39 - Изменение спектров поглощения $1.05\cdot10^{-5}$ Ph (**a**) и $2\cdot10^{-5}$ M AmPh (**b**) во времени: (**a**) спектры зарегистрированы через 0.75 (1), 3.7 (2), 8.2 (3) мин после начала реакции, спектры (4) - (6) записаны с интервалом 5 мин, спектры (7), (8) – 10 мин, (9)-(12) – 15 мин, (13)-(17) – 30 мин, (**b**) спектры зарегистрированы через 0.52 (1), 4.03 (2), 7.31 (3) мин, 0.22 (4), 0.30 (5), 0.79 (6), 1.39 (7), 2.14 (8), 3.14 (9), 4.14 (10), 5.14 (11), 6.14 (12), 7.14 (13), 8.14 (14) ч после начала реакции. Условия реакции: 25 °C, растворитель - Трис-HCl буфер, pH 7.0, ДМСО 5.3% (**a**) и ДМСО 3.3% (**b**)

Квантово-химическое моделирование реакций распада Ph и AmPh комплексов в водном растворе

Квантово-химический анализ с помощью программы Gaussian 09 (версия D) исходных соединений и продуктов распада комплексов Ph и AmPh в водном растворе показал, что комплекс Ph может распадаться сразу по нескольким параллельным направлениям: с разрывом Fe-S, Fe-N связей и далее координацией молекулы воды. Таким образом, происходит замещение фенильного лиганда на молекулу воды, а также отрыв NO лиганда и замещение его на H_2O. Кроме того, происходит распад биядерного комплекса на моноядерный, в котором также могут наблюдаться вышеуказанные процессы, и, в то же время, димеризация образующихся комплексов. В водном растворе мы можем иметь целый набор промежуточных соединений, как биядерных, так и моноядерных, с фенильным, нитрозильным и аквалигандом, как мостиковыми, так и терминальными. Оптимизированные геометрии возможных продуктов распада комплекса Ph приведены на рисунке 40.

Таким образом, в случае комплекса Ph конечными продуктами будут плохо растворимые аквакомплексы железа различного состава, которые мы наблюдали уже через 6 мин от начала реакции (белесая мутность, рисунок 39 а).

В комплексе AmPh имеется аминогруппа в орто-положении, которая оказывает значительное влияние на распад комплекса. При отрыве NO, при диссоциации на мономерные комплексы по связи Fe-S, на свободное координационное место встраивается не молекула воды, как в случае комплекса Ph, а заместитель NH_2 фенильного кольца, что приводит к образованию внутримолекулярной координационной связи Fe-N (2.10-2.13 Å) (рисунок 41). Вероятно, за счет этого происходит стабилизация образующейся структуры и ее энергия понижается [146].

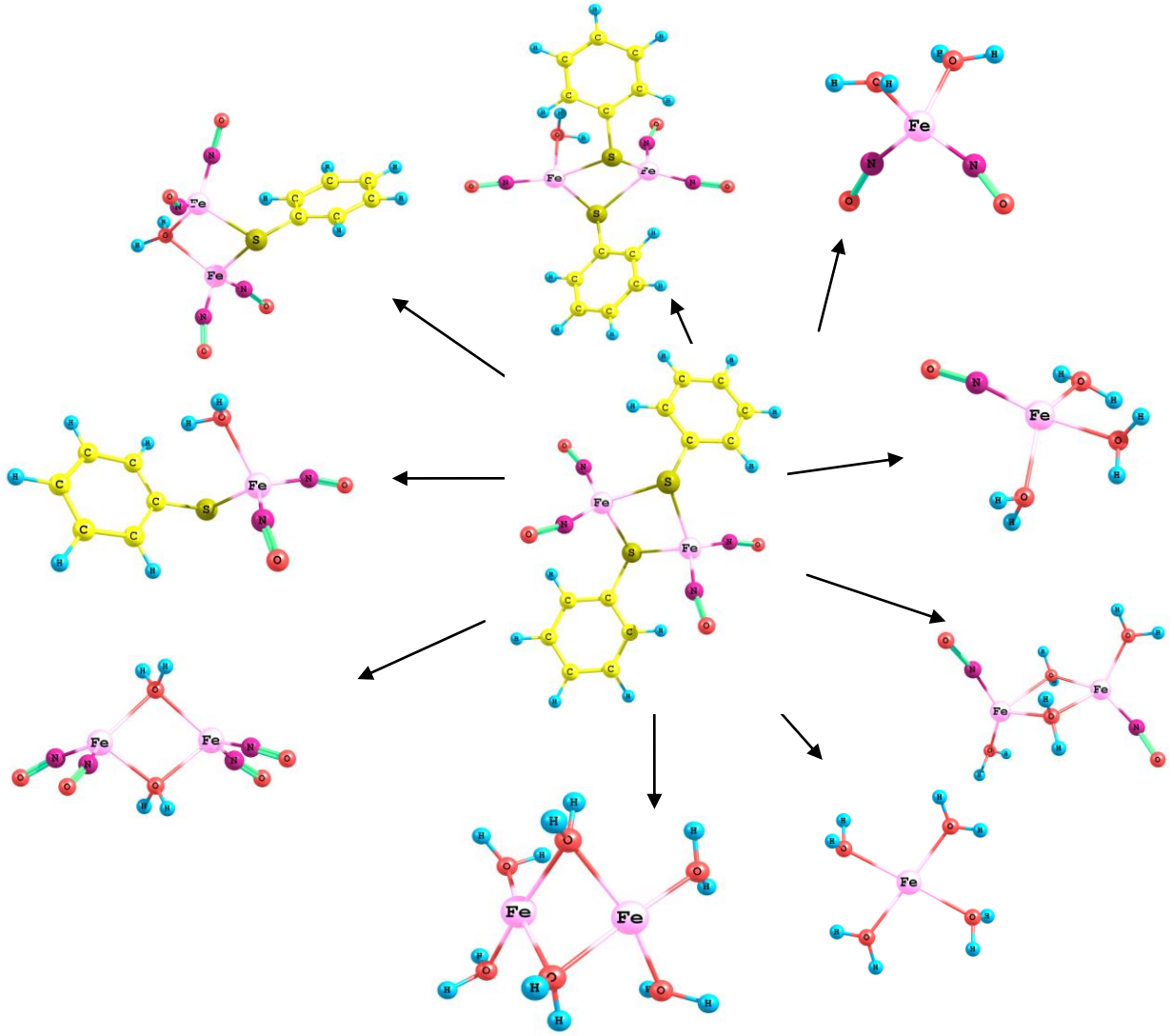


Рисунок 40 - Оптимизированные геометрии возможных продуктов распада комплекса Ph.

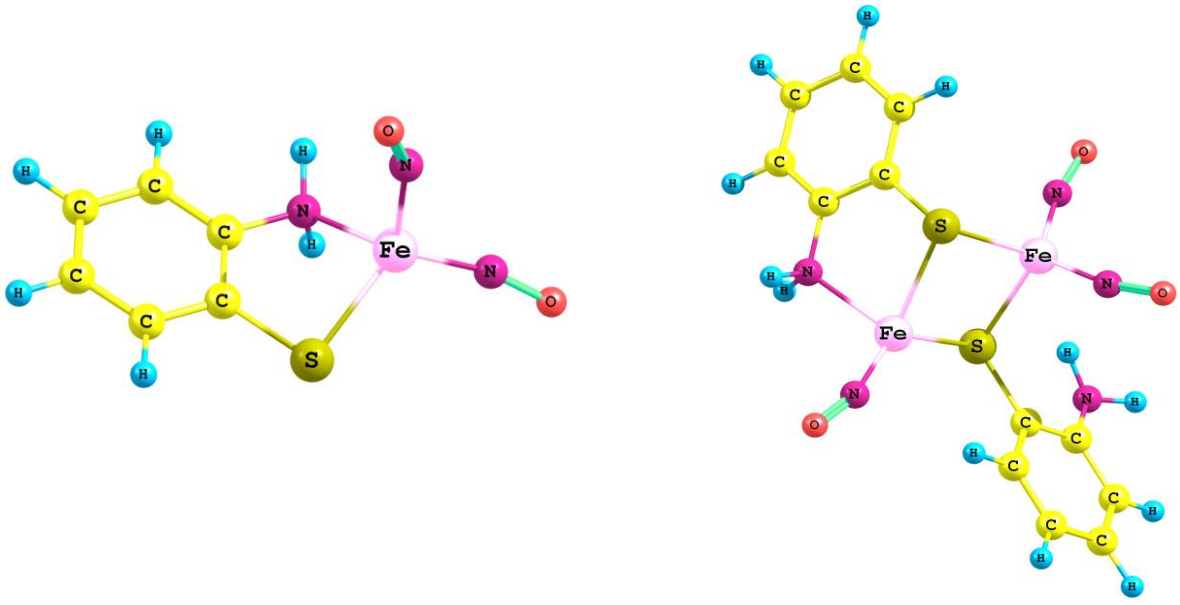


Рисунок 41 - Оптимизированные геометрии комплексов с аминофенольным лигандом, образующихся при распаде на моноядерные комплексы и отрыве NO.

Конечные продукты распада комплекса с аминофенольными лигандами, которые мы наблюдали в виде осадка, будут, скорее всего, содержать этот лиганд.

Обмен тиолатных лигандов комплексов Ph и AmPh на GSH в 0.05 М Трис-HCl буфере pH 7.0

Как было установлено в главе 3, катионные НКЖ “μ-S” типа (комплексы CysAm и Pen) не подвергаются необратимому гидролизу в водной среде. В них происходит обратимая диссоциация и тиолатных лигандов, и NO. В присутствии же GSH в катионных НКЖ оба тиолатных лиганда заменяются на GSH с образованием Glut, который имеет максимумы поглощения при 315 и 367 нм (рисунок 34).

В случае исследуемых нейтральных НКЖ Ph и AmPh наблюдаем иную картину обмена. Спектры поглощения, регистрируемые в процессе обмена комплекса Ph (рисунок 42 a), изменяются в течение 1.5 ч, и в итоге образуется соединение с максимумами 312 и 360 нм. На вставке рисунка 42 a представлена кинетическая зависимость оптической плотности данного процесса при λ=400 нм. Экспериментальные точки аппроксимированы с использованием уравнения вида: $y(t) = y_o + A \cdot e^{-kt}$. Эффективная константа скорости равна $8.1 \cdot 10^{-5}$ М. Для комплекса AmPh из спектров поглощения рисунка 42 b следует, что образующийся продукт имеет максимумы поглощения при 308 и 360 нм. Очевидно, что после добавления GSH спектры образующихся продуктов для обоих комплексов идентичны. Однако, в отличие от катионных НКЖ, в данных системах не наблюдается образования продукта полного замещения – комплекса Glut. В работе [62], в результате исследования НКЖ с различными тиоловыми лигандами, было показано, что биядерные комплексы имеют два максимума поглощения (λ_1 = 310 нм и λ_2 = 360 нм), в то время как моноядерные – один (λ_1 = 390 нм). Так как в нашем эксперименте в конечном продукте имеется два максимума, можно сделать

заключение, что в данном случае наблюдается образование именно биядерного соединения.

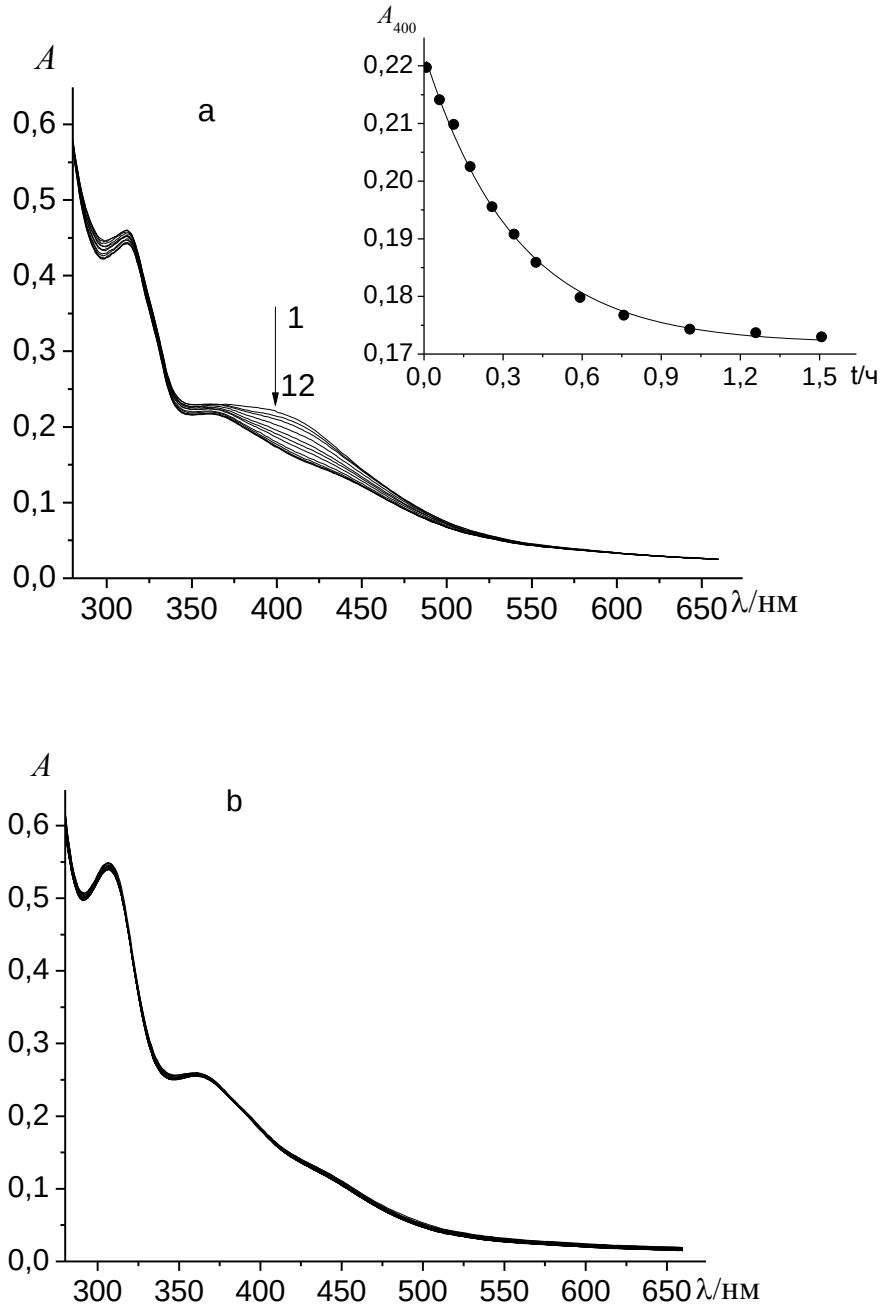


Рисунок 42 - Изменение спектров поглощения при взаимодействии $2 \cdot 10^{-5}$ М Ph (**a**) и $2 \cdot 10^{-5}$ М AmPh (**b**) в присутствии 10^{-3} М GSH во времени. Спектры (**a**) регистрировали через 0.6 (1), 3.6 (2), 6.6 (3), 10.6 (4), 15.6 (5), 20.6 (6), 25.6 (7), 35.6 (8), 45.6 (9) мин, 1.0 (10), 1.3 (11), 1.5 (12) ч после начала реакции и (**b**) в течение 5 ч. Спектр (12) на рисунке (**a**) имеет два максимума: λ_1 = 312 нм и λ_2 = 360 нм. Спектр (21) на рисунке (**b**) имеет два максимума: λ_1 = 308 нм и λ_2 = 360 нм. На вставкер рисунка (**a**) представлена кинетическая зависимость данного процесса. Условия реакции: 25 ^{o}C, растворитель – 0.05 М Трис-HCl буфер, pH 7.0, ДМСО 10%.

Можно предположить, что на первой стадии происходит замещение только одного тиолатного лиганда [166]. Однако, в данном случае такие смешанные эфиры, оптимизированные геометрии которых представлены на рисунке 43, являются лишь промежуточными продуктами. Далее тиофенольный или тиоаминофенольный лиганд замещается в водном растворе на молекулу воды. Конечным продуктом, по нашему предположению, будет биядерный железонитрозильный комплекс, где один лиганд – это GS^-, а второй – мостиковая молекула H_2O (рисунок 43). Причем, согласно спектрам (рисунок 42 a, b), из комплекса AmPh новое соединение образуется за время смешивания, тогда как для его образования из комплекса Ph требуется более продолжительное время.

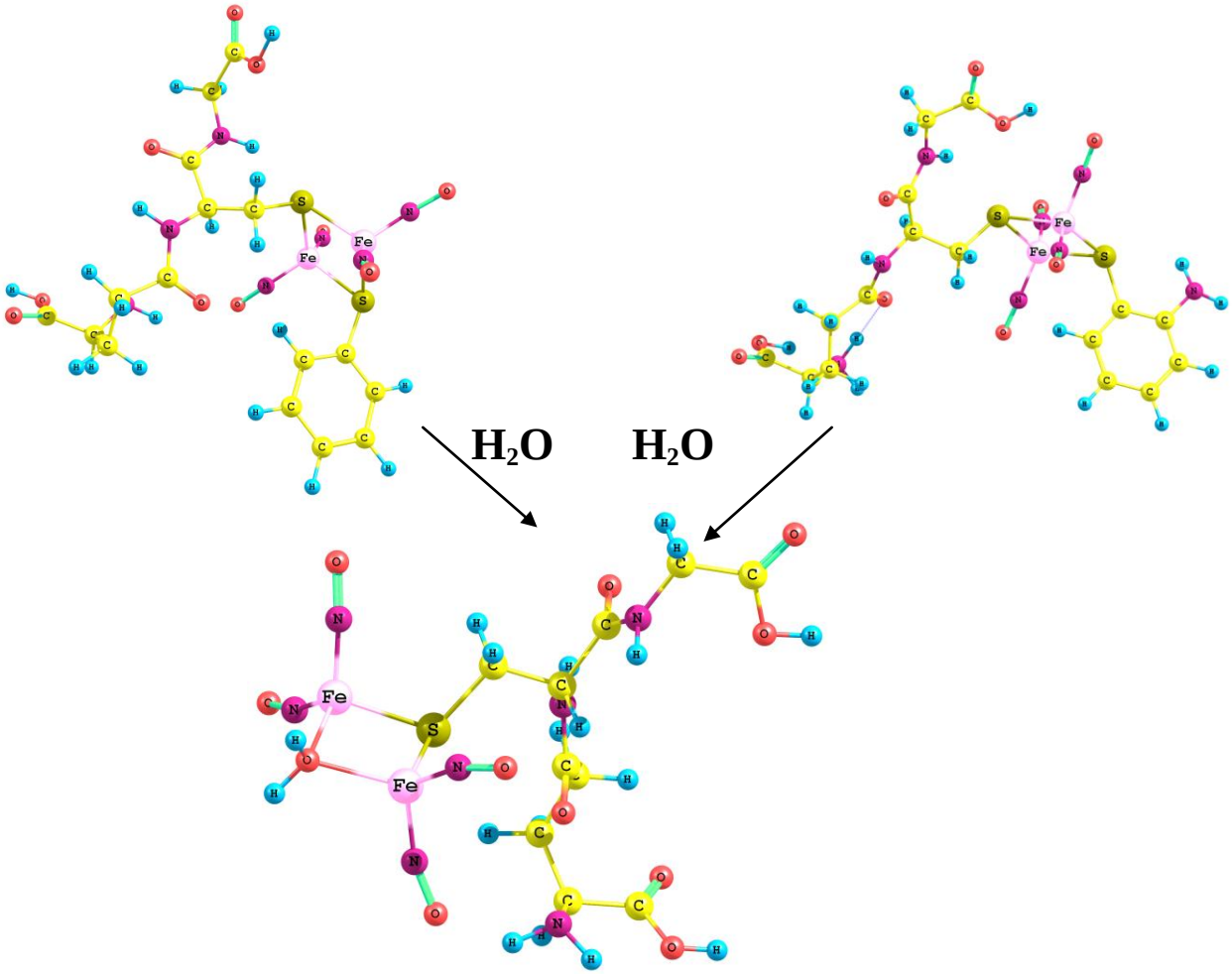


Рисунок 43 - Оптимизированные геометрии предполагаемых промежуточных и конечных продуктов в реакции замещения нейтральных тиолатных лигандов на GSH.

Таким образом, впервые получены экспериментальные данные, свидетельствующие в пользу того, что процесс трансформации нейтральных НКЖ в водных растворах, в том числе в присутствии GSH, значительно отличается от аналогичных процессов для ранее изученных катионных НКЖ. При этом противоопухолевая активность нейтральных НКЖ может определяться не только их NO-донорной активностью, но, также, как и в случае катионных НКЖ, их способностью обменивать тиолатный лиганд на GSH, то есть «убирать» GSH из среды. Следует отметить, что эта способность у нейтральных НКЖ значительно ниже, чем у катионных, что коррелирует с их меньшей противоопухолевой активностью. Можно предположить, что соединения этого нового класса противоопухолевых агентов можно использовать для понижения уровня GSH в клетках злокачественных образований и изучения молекулярно-генетических механизмов процессов S-глутионирования *in vivo*.

В данном разделе работы также были проведены серии опытов по взаимодейтсвию Ph и AmPh комплексов с Hb. Полученные результаты было трудно интерпретировать из-за наличия осадков, которые вносили свой вклад в спектры поглощения реакционной системы. После разложения на составляющие компоненты спектров поглощения реакции Ph/AmPh ($2\cdot10^{-5}$ M) комплексов с Hb ($2\cdot10^{-5}$ M), записанных через сутки, было определено (с большой погрешностью), что образовалось $1.4\cdot10^{-5}$ M HbNO (для опытов с Ph комплексом) и $1.5\cdot10^{-5}$ M HbNO (для AmPh).

5.2 Распад BTz в различных растворителях и влияние GSH на этот процесс

Влияние растворителей на процесс распада BTz

Комплекс BTz, аналогично Ph и AmPh, не растворим в воде, но хорошо растворим в ДМСО. Поэтому, прежде всего, исследовали его устойчивость в ДМСО. Спектры поглощения комплекса BTz, как и спектры всех НКЖ,

характеризуются наличием двух пиков в области 300-400 нм. Как видно из анализа полученных спектров, в отличие от ранее изученных комплексов, BTz в ДМСО не распадается в течение 6 часов (рисунок 44). Цвет раствора на протяжении всего времени регистрации остается коричневым.

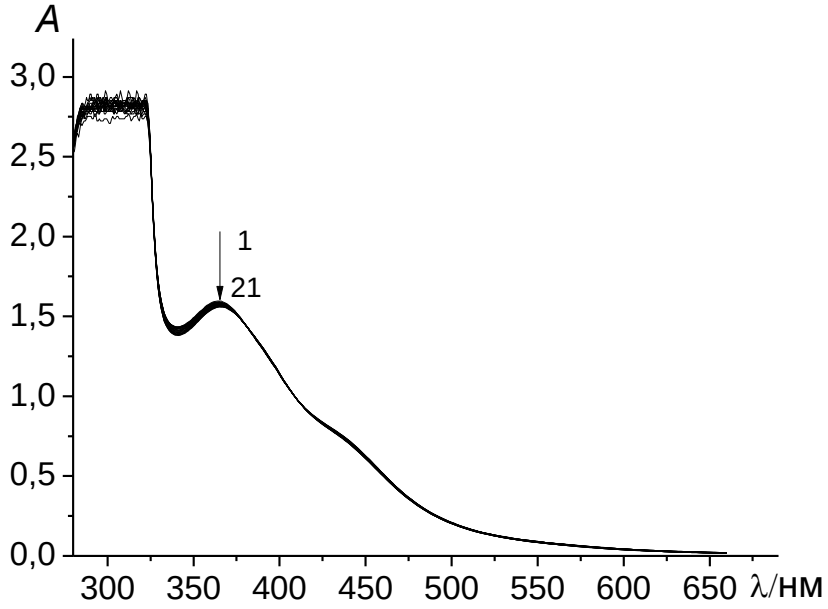


Рисунок 44 - Спектры поглощения $2 \cdot 10^{-4}$ М BTz в 100% ДМСО. Время регистрации спектров: спектры (1) – (5) записаны через 0.5, 3, 7.5, 11.5, 16.5 мин. Спектры (6) – (8) записаны с интервалом 10 мин, (9)-(13) - 15 мин, (14)-(21) - 30 мин. Условия: 25 °С, растворитель- 100% ДМСО.

Далее было проведено изучение поведения комплекса BTz в Трис-HCl буфере. Обнаружено, что спектры поглощения со временем уменьшаются по интенсивности (рисунок 45), что свидетельствует о медленном распаде комплекса BTz в Трис-HCl буфере. За этим процессом удобно наблюдать по уменьшению оптического поглощения при 360 нм. На вставке рисунка 45 представлена кинетическая зависимость изменения оптической плотности распада комплекса BTz. Теоретическая кривая построена с использованием уравнения вида: $y(t) = y_o + A \cdot e^{-kt}$. Эффективная константа скорости реакции равна $1.9 \cdot 10^{-4}$ $с^{-1}$.

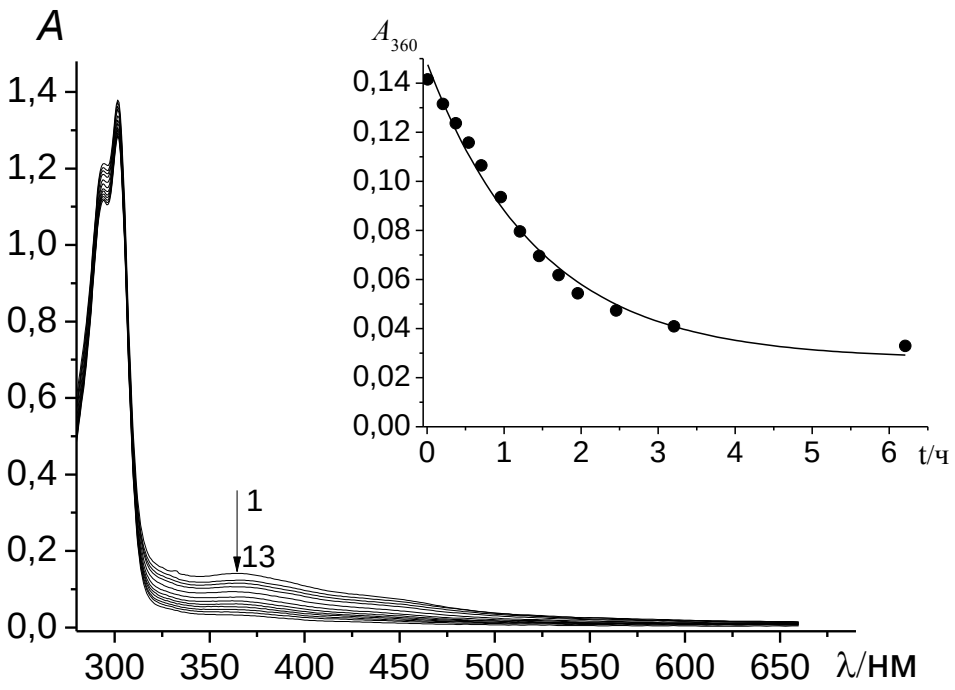


Рисунок 45 - Изменение спектров поглощения $2 \cdot 10^{-5}$ М BTz во времени: спектры (1) — (13) записаны через 0.5, 12.5, 22.5, 32.5, 42.5, 57.5 мин, 1.2, 1.5, 1.7, 2.0, 2.5, 3.2, 6.2 ч после начала реакции. Условия: 25 °С, растворитель - 0.05 М Трис-HCL буфер, pH 7.0, ДМСО 10%.

Влияние GSH на распад BTz

На рисунке 46 показано изменение спектров поглощения во времени при взаимодействии BTz с GSH. В предыдущей главе было показано, что при обмене обоих тиолатных лигандов Pen и CysAm на GSH образующийся комплекс Glut имеет два максимума поглощения при 315 нм и 365 нм, а соединение, полученное из Ph и AmPh комплекса, и содержащее один лиганд GSH, имеет максимумы в аналогичной области (308-312 нм и 360 нм), но иную форму спектра. В случае же комплекса BTz после добавления к нему GSH, форма спектров поглощения не изменяется, что свидетельствует об отсутствии обмена тиолатных лигандов на GSH в структуре комплекса BTz. Также, как и в случае распада комплекса в Трис-HCl буфере, наблюдается уменьшение поглощения во времени. На вставке рисунка 46 представлена кинетическая зависимость оптической плотности данного процесса при

λ=360 нм. Теоретическая кривая построена с использованием уравнения вида: $y(t) = y_o + A \cdot e^{-kt}$. Рассчитанная эффективная константа скорости данного процесса ($4.6 \cdot 10^{-4}$ c^{-1}) в 2.4 раза больше константы распада комплекса BTz в Трис-HCl буфере.

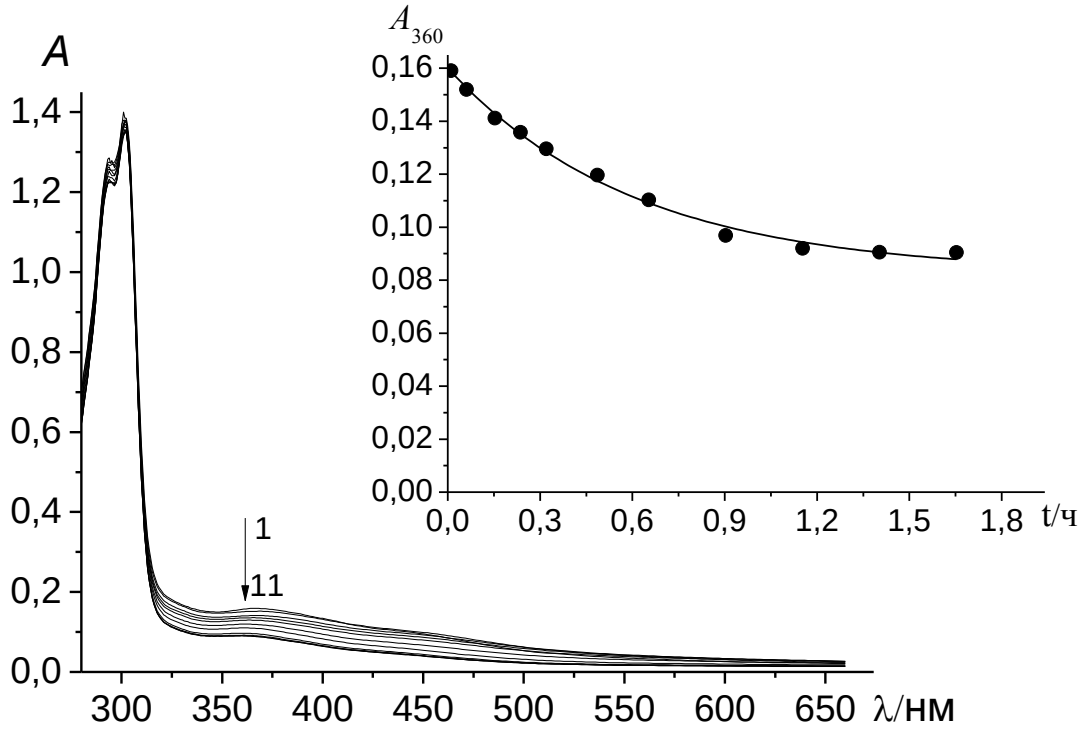


Рисунок 46 - Изменение разностных спектров поглощения при взаимодействии $2 \cdot 10^{-5}$ М BTz с 10^{-3} М GSH во времени: спектры (1) — (11) записаны через 0.7, 3.7, 9.2 мин, 0.2, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1.2, 1.4, 1.7 ч после начала реакции. Условия: 25 °С, растворитель- 0.05 М Трис-HCL буфер, pH 7.0, ДМСО 10%.

Таким образом, в нейтральном нитрозильном комплексе железа “μ-N-C-S” структурного типа состава $[Fe_2(S_2C_7H_4N)_2(NO)_4]^0$ BTz, в отличие от рассмотренных ранее комплексов “μ-S” типа, обмена тиолатных лигандов на GSH не наблюдается, что, вероятно, свидетельствует о большей прочности связи лиганда по “μ-N-C-S” способу в комплексах с азогетероциклическими лигандами [167] за счет смещение электронной плотности от лиганда на атом железа, как это было показано ранее с использованием метода NBO [168]. В то же время GSH оказывает значительное влияние на процесс распада комплекса, и механизм этой реакции требует дальнейшего изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в работе результаты по исследованию распада НКЖ структурного “μ-S” и “μ-N-C-S” типа в различных растворителях, а также по изучению их взаимодействия с Hb, Cyt C и GSH, являются важным этапом в процессе анализа возможности использования данных НКЖ в качестве лекарственных препаратов. Исходя из опытов по взаимодействию НКЖ с гемопротеидами, можно сделать важный вывод: NO-донорная способность НКЖ определяется не только их строением, но и взаимодействием с компонентами среды, в которую они попадают. Так, на примере катионных комплексов показано, что Hb стабилизирует НКЖ, в его присутствии комплексы становятся более пролонгированными донорами NO.

Основываясь на результатах экспериментов с GSH, высказано предположение, что противоопухолевая активность нейтральных и катионных НКЖ структурного “μ-S” типа может определяться не только их NO-донорной активностью, но также и их способностью обменивать тиолатный лиганд на GSH, то есть «убирать» GSH из среды. Однако следует отметить, что эта способность у нейтральных НКЖ значительно ниже, чем у катионных, что коррелирует с их меньшей противоопухолевой активностью. Можно предположить, что данный эффект позволяет использовать катионные и нейтральные НКЖ для понижения уровня GSH в клетках злокачественных образований и изучения молекулярно-генетических механизмов процессов S-глутатионилирования *in vivo*.

В тоже время показано, что в нейтральном комплексе “μ-N-C-S” структурного типа BTz обмена тиолатных лигандов на GSH не наблюдается, но при этом GSH оказывает значительное влияние на процесс распада комплекса.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что разложение катионных НКЖ с алифатическими лигандами (Pen, CysAm) в водном растворе буфера происходит через ряд последовательных равновесных стадий, включающих диссоциацию NO и тиоловых лигандов. Константы скорости донирования NO составляют $(5.2 \pm 0.2)\cdot 10^{-5}$ $с^{-1}$ и $(4.6\pm0.4)\cdot 10^{-3}$ $с^{-1}$ для CysAm и Pen, соответственно.

2. Предложен экспресс-метод оценки восстановительной способности НКЖ с помощью набора редокс-индикаторов с известными редокс-потенциалами. Установлено, что редокс-потенциал Pen и CysAm E_0> - 0.8 В, следовательно они не могут восстанавливать NO в растворе.

3. Установлено, что процесс распада CysAm в ДМСО, в отличие от водного буфера, сопровождается образованием моноядерной формы.

4. Обнаружен эффект стабилизации катионных НКЖ структурного “μ-S” типа гемоглобином. В его присутствии НКЖ становятся более пролонгированными донорами NO. С помощью программы 3D-визуализации молекулярных структур PyMOL определены возможные места связывания катионных НКЖ на поверхности Hb.

5. Методом кинетического моделирования оценена константа равновесия, описывающая взаимодействие комплекса Pen с центрами связывания на поверхности Hb.

6. С помощью метода квантово-химического моделирования предложены возможные продукты процесса разложения НКЖ с ароматическими лигандами (Ph и AmPh) и показана зависимость пути распада НКЖ от их строения.

7. Установлено, что в присутствии GSH в комплексах структурного “μ-S” типа происходит замещение тиолатных лигандов на GSH: в катионных замещаются оба лигадна, в нейтральных - один; в то же время в нейтральных НКЖ структурного “μ-N-C-S” типа обмена лигадами не происходит.

8. Изучена NO-донорная активность НКЖ структурного “μ-S” типа в кислой среде по его взаимодействию с Cyt C^{2+}. Исследована реакция нитрозилирования Cyt C^{3+} в присутствии $K_3[Fe(CN)_6]$ и предложены возможные продукты этой реакции.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

НКЖ – нитрозильный комплекс железа
Hb – дезоксигемоглобин
Cyt C – цитохром С
GSH – глутатион
EDRF – эндотельный фактор релаксации сосудов
RNS – реактивные формы азота
NOS – NO-синтаза
Arg – L-аргинин
ν_{NO} – частота валентных колебаний
SKOV-3 – линия опухолевых клеток человека, рак яичника
MCF-7 – линия опухолевых клеток человека, рак молочной железы
A549 – линия опухолевых клеток человека, немелкоклеточный рак легкого
K562 – линия опухолевых клеток человека, миелобластный лейкоз
GI_{50} – концентрации исследуемых веществ, при которых подавление развития опухолевых клеток составляет 50%
ТРО – торможение роста опухоли
УПЖ – увеличение продолжительности жизни
РВ – берлинская лазурь
Комплекс CysAm – $[Fe_2(S(CH_2)_2NH_3)_2(NO)_4]SO_4 \cdot 2.5H_2O$
Комплекс Pen – $[Fe_2(SC_4H_3N_2)_2(NO)_4]SO_4 \cdot 5H_2O$
Комплекс Glut – $[Fe_2(SC_{10}H_{17}N_3O_6)_2(NO)_4]SO_4 \cdot 2H_2O$
Комплекс Ph – $[Fe_2(SC_6H_5)_2(NO)_4]$
Комплекс AmPh – $[Fe_2(SC_6H_6N)_2(NO)_4]$
Комплекс BTz – $[Fe_2(S_2C_7H_4N)_2(NO)_4]$
Комплекс Pym – $[Fe_2(S\,C_4H_3N_2)_2(NO)_4]$
Комплекс Im – $[Fe_2(SC_3H_3N_2)_2(NO)_4]$
Комплекс RSR-Na – $Cs_2[Fe_2S_2(NO_4]\cdot 2H_2O$
Комплекс ТНКЖ-Na – $Na_2[Fe_2(S_2O_3)_2(NO)_4]\cdot 4H_2O$

ПРЕДСТАВЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Статьи

1. Сырцова, Л.А. Влияние растворителя на гидролиз нитрозильного комплекса железа $\{Fe_2[S(CH_2)_2NH_3]_2(NO)_4\}SO_4$ $2.5H_2O$: спектроскопические и кинетические исследования его мономерной и димерной форм / Сырцова Л.А., Санина Н.А., Психа Б.Л., Куликов А.В., Черняк А.В., Шкондина Н.И., Руднева Т.Н., **Шапошникова (Покидова) О.В.**, Котельников А.И., Алдошин С.М. // Известия Академии наук. Серия химическая – 2011.- № 6. – С. 1119 - 1124.

2. Syrtsova, L.A. Reversible dissociation and ligand-glutathione exchange reaction in binuclear cationic tetranitrosyl iron complex with penicillamine / Syrtsova L.A., Sanina N.A., Lyssenko K.A., Kabachkov E.N., Psikha B.L., Shkondina N.I., **Pokidova O.V.**, Kotelnikov A.I., Aldoshin S.M. // Journal of Bioinorganic Chemistry and Applications – 2014. – V. 2014. – P. 1- 9.

3. Syrtsova, L.A. Interaction of hemoglobin with binuclearcationic tetranitrosyl iron complex with penicillamine. Cations binding sites / Syrtsova L.A., Sanina N.A., Psikha B.L., Tukhvatullin I.A., Shkondina N.I., **Pokidova O.V.**, Kotelnikov A.I. // Advances in Biological Chemistry – 2015. – V. 5. – P. 169-178.

4. Покидова, О.В. Два механизма распада нитрозильных комплексов железа $[Fe_2(\mu\text{-}SR)(NO)_4]$ / Покидова О.В., Санина Н.А., Психа Б.Л., Сырцова Л.А., Психа Б.Л., Шкондина Н.И., Котельников А.И., Алдошин С.М. // Известия АН. Серия химическая – 2017. - № 3. С. 432-438.

5. Покидова, О.В. Изучение распада нитрозильного комплекса железа “μ-N-C-S” типа и его взаимодействие с GSH в водном растворе. / Покидова О.В., Шкондина Н.И., Руднева Т.Н., Котельников А.И., Сырцова Л.А., Санина Н.А., Алдошин С.М. // Доклады Академии Наук. Раздел химия – 2017. - Т. 473. - № 2. - С. 173–176.

6. Покидова, О.В. Особенности разложения нейтральных нитрозильных комплексов железа с арилсодержащими тиолатными лигандами в различных

средах. Взаимодействие с глутатионом / Покидова О.В., Емельянова Н.С., Шкондина Н.И., Котельников А.И., Сырцова Л.А., Санина Н.А., Алдошин С.М. // Известия АН. Серия химическая - 2016. - № 5. – С. 821-825.

Тезисы

1. Сырцова Л.А., Санина Н.А., Шкондина Н.И, Руднева Т.Н., **Шапошникова (Покидова) О.В.**, Котельников А.И., Алдошин С.М. Взаимодействие нитрозильного комплекса железа с феррицитохромом С. Труды XVIII Международной конференции и дискуссионного научного клуба «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии экологии». Украина, Крым, Ялта-Гурзуф, 31.05-10.06 2010 г., Т.1, С. 87-89.

2. Шапошникова (Покидова) О.В., Сырцова Л.А. Нитрозильные комплексы цитохрома С: получение, структура, свойства, биологическая роль. Труды XVIII Международной конференции и дискуссионного научного клуба «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии экологии». Украина, Крым, Ялта-Гурзуф, 31.05-10.06 2010 г., Т.1, С. 84-86.

3. Сырцова Л.А., Санина Н.А., **Шапошникова (Покидова) О.В.** Новые реакции гемопротеидов с нитрозильными комплексами железа. Тезисы докладов XXVIII Всероссийской школы-симпозиума молодых учёных по химической кинетике. Пансионат «Берёзки», Московская область, 15.10-18.10 2010 г., С. 59.

4. Покидова О.В., Сырцова Л.А., Санина Н.А., Психа Б.Л., Шкондина Н.И., Руднева Т.Н., Котельников А.И. Определение константы равновесия нитрозильного комплекса железа с пенициламиновым лигандом и его взаимодействие с гемоглобином. Труды XXI Международной конференции и дискуссионного научного клуба «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии». Украина, Крым, Ялта-Гурзуф, 05.06-15.06 2013 г., С. 156-157.

5. Санина Н.А., Сырцова Л.А., **Покидова О.В.**. Нитрозилированные гемоглобин и цитохром С как интермедиаты метаболизма нитрозильных комплексов железа, обладающих противоопухолевой и вазодилататорной

активностями. Первая Российская конференция по медицинской химии (MedChem Russia-2013) с международным участием. Москва, 08.09-12.09 2013 г., С. 138.

6. Сырцова Л.А., Санина Н.А., **Покидова О.В**., Психа Б. Л. Кинетика распада тетранитрозильного биядерного катионного комплекса железа с пеницилламиновым лигандом в водной среде. XXXI Всероссийский симпозиум молодых ученых по химической кинетике. Пансионат "Берёзки", Московская область, 18.11-21.11 2013 г., С. 34.

7. Санина Н.А., Сырцова Л.А., Психа Б.Л., **Покидова О.В.**, Шкондина Н.И., Руднева Т.Н., Котельников А.И., Алдошин С.М. Обратимая диссоциация тетранитрозильных биядерных катионных комплексов железа в водной среде. VIII Всероссийская конференция с международным участием молодых ученых по химии "Менделеев-2014". Санкт-Петербург, 01.05-04.04 2014 г., С. 85-86.

8. Покидова О.В., Сырцова Л.А., Санина Н.А., Шкондина Н.И., Котельников А.И. Взаимодействие цитохрома С (Cyt) с биядерным катионным тетранитрозильным комплексом железа μ_2-S-типа с пеницилламиновыми тиолатными лигандами. Загадка Cyt-NO. Труды XXII Международной конференции и дискуссионного научного клуба «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии». Россия, Крым, Ялта-Гурзуф, 02.06-12.06 2014 г., С. 115-117.

9. Покидова О.В., Сырцова Л.А., Санина Н.А., Шкондина Н.И., Котельников А.И., Алдошин С.М. Влияние редокс-потенциала нитрозильных комплексов железа μ_2-S-типа на их реакционную способность. XXXII Всероссийский симпозиум молодых ученых по химической кинетике. Пансионат "Берёзки", Московская область, 17.11-20.11 2014 г., С. 83.

10. Syrtsova L.A., Sanina N.A., **Pokidova O.V.**, Psikha B.L., Shkondina N.I., Kotelnikov A.I., Aldoshin S.M. IX Международная конференция молодых ученых по химии "Менделеев-2015", The reason for the difference of “μ_2-s”

structural type nitrosyl iron complexes decay mechanisms. Санкт-Петербург, 07.04-10.04 2015 г., С. 282.

11. Покидова О.В., Шкондина Н.И., Санина Н.А, Котельников А.И., Алдошин С.М. «Кинетика реакции обмена пеницилламинового и цистеаминового тиолатных лигандов нитрозильных комплексов железа μ_2-S-типа на GSH в водной среде» XXXIV Всероссийский симпозиум молодых ученых по химической кинетике. Пансионат "Берёзки", Московская область, 14.11-17.11 2016 г., С. 87.

12. Покидова О.В., Психа Б.Л., Руднева Т.Н., Шкондина Н.И., Санина Н.А, Котельников А.И. «Исследование взаимодействия катионных НКЖ структурного “μ-S” типа с ферри- и ферроцитохромом С» 21-я международная пущинская школа-конференция молодых учёных "биология - наука 21 века". Пущино, 17.04-21.04 2017 г., С.70-71.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность научному руководителю – д. ф.-м. н. Котельникову А.И. за поддержку, ценные советы и помощь во время выполнения диссертационной работы. Также автор благодарен своему первому руководителю – д.х.н. Сырцовой Л.А. за руководство, внимание и поддержку.

Отдельные благодарности автор выражает сотрудникам ОКХиБП: Шкондиной Н.И. и Кононыхиной О.К. за помощь в проведении спектрофотометрических экспериментов и д.х.н. Психе Б.Л. за кинетическое моделирование процессов и расчет констант.

Автор признателен сотрудникам ОСВ: д.х.н. Саниной Н.А., к.х.н. Рудневой Т.Н., Козуб Г.И., к.х.н. Кондратьевой Т.А. за предоставленные НКЖ для исследований; к.х.н. Рудневой Т.Н. за электрохимическое определение концентрации NO и к.х.н. Емельяновой Н.С. за квантово-химическое моделирование реакций.

Автор благодарит сотрудников ОКиК д.ф.-м.н. Куликова А.В. за снятие ЭПР-спектров образцов и Тухватуллина И.А. за анализ электростатических зарядов на поверхности Hb. Также автор признателен Кабачкову Е.Н. (ОФНМ) за снятие масс-спектров образцов и к.х.н. Черняку А.В. (АЦКП) за снятие ЯМР-спектров образцов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pacher, P. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease / Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L. // Physiological Reviews – 2007. – V. 87 – № 1 – P.315–424.

2. McCleverty, J.A. Chemistry of Nitric Oxide Relevant to Biology / McCleverty J.A. // Chemical Reviews – 2004. – V. 104 – № 2 – P.403–418.

3. Munzel, T. Nitrate Therapy: New Aspects Concerning Molecular Action and Tolerance / Munzel T., Daiber A., Gori T. // Circulation – 2011. – V. 123 – № 19 – P.2132–2144.

4. Davies, K.M. Chemistry of the Diazeniumdiolates. 2. Kinetics and Mechanism of Dissociation to Nitric Oxide in Aqueous Solution / Davies K.M., Wink D.A., Saavedra J.E., Keefer L.K. // Journal of the American Chemical Society – 2001. – V. 123. – № 23 – P.5473–5481.

5. Санина, Н.А. Строение и свойства нитрозильных комплексов железа с функциональными серосодержащими лигандами / Санина Н.А., Алдошин С.М. // Известия Академии наук. Серия химическая – 2011. – № 7 – С.1199–1227.

6. Алдошин, С.М. Функциональные нитрозильные комплексы железа – новый класс доноров монооксида азота для лечения социально значимых заболеваний: монография / Алдошин С.М., Санина Н.А.; под общ. ред. Григорьева А.И. и Владимирова Ю.А. - Москва: МАКС Пресс, 2015. – 72–102 с.

7. Санина, Н.А. Применение биядерного сера-нитрозильного комплекса железа катионного типа в качестве вазодилататорного лекарственного средства / Санина Н.А., Серебрякова Л.И., Шульженко В.С., Писаренко О.И., Руднева Т.Н., Алдошин С.М. // Патент РФ № 2460531 – 2012.

8. Санина, Н.А. Противоопухолевая активность нитрозильных комплексов железа – новых доноров оксида азота / Санина Н.А., Руднева Т.Н., Сулименков И.В., Коновалова Н.П., Сашенкова Т.Е., Алдошин С.М. // Росс.

хим. журнал – 2009. – V. LIII – № 1 – С.164–171.

9. Санина, Н.А. Противоопухолевая активность нитрозильных комплексов железа- нового класса доноров монооксида азота / Санина Н.А., Жукова О.С., Смирнова З.С., Борисова Л.М., Киселева М.П., Алдошин С.М. // Росс. биотерапевт. журнал – 2008. – № 1 – С.52.

10. Sanina, N.A. Water-soluble binuclear nitrosyl iron complexes with natural aliphatic thiolyls possessing cytotoxic, apoptotic and no-donor activity / Sanina N.A., Lysenko K.A., Zhukova O.S., Rudneva T.N., Emelianova N.S., Aldoshin S.M. // Patent US 8, 067, 628 B2 – 2011.

11. Санина, Н.А. Применение тетранитрозильного комплекса железа с тиофенолом в качестве противоопухолевого лекарственного средства / Санина Н.А., Жукова О.С., Алдошин С.М., Емельянова Н.С., Герасимова Г.К. // Патент РФ № 2429242 – 2011.

12. Sanina, N.A. Reactions of sulfur-nitrosyl iron complexes of “g=2.03” family with hemoglobin (Hb): Kinetics of Hb–NO formation in aqueous solutions / Sanina N.A., Syrtsova L.A., Shkondina N.I., Rudneva T.N., Malkova E.S., Bazanov T.A., Kotel’nikov A.I., Aldoshin S.M. // Nitric Oxide – 2007. – V. 16 – № 2 – P.181–188.

13. Санина, Н.А. Строение биядерного тетранитрозильного комплекса железа с пиримидин-2-илом “μ_2-S типа” и влияние pH на его NO донорную способность в водных растворах / Санина Н.А., Шилов Г.В., Алдошин С.М., Шестаков А.Ф., Сырцова Л.А., Ованесян Н.С., Чудинова Е.С., Шкондина Н.И., Емельянова Н.С., Котельников А.И. // Известия Академии наук. Серия химическая – 2009. – № 3 – С.560–571.

14. Осипов, А.Н. Биологическая роль нитрозильных комплексов гемопротеинов / Осипов А.Н., Борисенко Г.Г., Владимиров Ю.А. // Успехи биологической химии – 2007. – Т. 47 – С.259–292.

15. Velu, C.S. Human p53 Is Inhibited by Glutathionylation of Cysteines Present in the Proximal DNA-Binding Domain during Oxidative Stress. / Velu C.S., Niture S.K., Doneanu C.E., Pattabiraman N., Srivenugopal K.S. // Biochemistry – 2007. –

V. 46 – № 26 – P.7765–7780.

16. Priestley, J. Observations on Different Kinds of Air. By Joseph Priestley, LL.D. F. R. S. / Priestley J., Hey W. // Philosophical Transactions – 1772. – V. 62 – P.147–264.

17. Epstein, F.H. The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway / Epstein F.H., Moncada S., Higgs A. // New England Journal of Medicine – 1993. – V. 329 – № 27 – P.2002–2012.

18. Nakaki, T. Physiological and Clinical Significance of Nitric Oxide. / Nakaki T. // The Keio Journal of Medicine – 1994. – V. 43 – № 1 – P.15–26.

19. Snyder, S.H. Janus faces of nitric oxide. / Snyder S.H. // Nature – 1993. – V. 364 – № 6438 – P.577.

20. Furchgott, R.F. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. / Furchgott R.F., Zawadzki J. V. // Nature – 1980. – V. 288 – № 5789 – P.373–6.

21. Furchgott, R.F. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acid activatible factor from bovine retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. / ed. Vanhoutte P. M. - New York: Raven Press, 1988. – 401–414p.

22. Реутов, В.П. Проблемы оксида азота и цикличности в биологии и медицине / Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Косицын Н.С. // Успехи современной биологии – 2005. – Т. 125 – № 1 – С.41–65.

23. Ignarro, L.J. Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. / Ignarro L.J. // FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology – 1989. – V. 3 – № 1 – P.31–6.

24. Погребная, В.Л. Жидкофазное окисление оксида азота кислородом / Погребная В.Л., Усов А.П., Баранов А.В., Нестеренко А.И., Безъязычный А.П. // Журнал прикладной химии – 1975. – Т. 48 – С.954–958.

25. Nitric Oxide Donors: for Pharmaceutical and Biological Applications /eds. Wang P.G., Cai T.B., Taniguchi N. – Weinheim, FRG: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005.– 360p.

26. Bartberger, M.D. The reduction potential of nitric oxide (NO) and its importance to NO biochemistry / Bartberger M.D., Liu W., Ford E., Miranda K.M., Switzer C., Fukuto J.M., Farmer P.J., Wink D.A., Houk K.N. // Proceedings of the National Academy of Sciences – 2002. – V. 99 – № 17 – P.10958–10963.

27. Butler, A.R. Diffusion of nitric oxide and scavenging by blood in the vasculature / Butler A.R., Megson I.L., Wright P.G. // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects – 1998. – V. 1425 – № 1 – P.168–176.

28. Ванин, А.Ф. Оксид Азота – Регулятор Клеточного Метаболизма / Ванин А.Ф. // Соросовский образовательный журнал – 2001. – Т. 7 – № 11 – С.7–12.

29. Метельская, В.А. Оксид азота : роль в регуляции биологических функций, методы определения в крови человека / Метельская В.А., Гуманова Н.Г. // Лабораторная медицины – 2005. – № 7 – С.19–24.

30. Wu, G. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond / Wu G., Morris S.M. // Biochemical Journal – 1998. – V. 336 – № 1 – P.1–17.

31. Alderton, W.K. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition / Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. // Biochemical Journal – 2001. – V. 357 – № 3 – P.593–615.

32. Зеленин, К.Н. Оксид азота (II): новые возможности давно известной молекулы / Зеленин К.Н. // Соросовский образовательный журнал – 1997. – № 10 – С.105–110.

33. Ленинджер, А. Основы биохимии: в трех томах / А. Ленинджер; под ред. В.А. Энгельгардта и Я.М. Варшавского – М.: Мир, 1985.– 590с.

34. Сосунов, А.А. Оксид азота как межклеточный посредник / Сосунов А.А. // Соросовский образовательный журнал – 2000. – Т. 6 – № 12 – С.27–34.

35. Bryan, N.S. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development. / Bryan N.S., Bian K., Murad F. // Frontiers in bioscience (Landmark edition) – 2009. – V. 14 – P.1–18.

36. Toledo, J.C. Connecting the Chemical and Biological Properties of Nitric Oxide / Toledo J.C., Augusto O. // Chemical Research in Toxicology – 2012. – V. 25 – № 5 – P.975–989.

37. Реутов, В.П. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих / В. П. Реутов, Е. Г. Сорокина, В. Е. Охотин, Н. С. Косицын – М.: Наука, 1998.– 156с.

38. Zweier, J.L. Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems / Zweier J.L., Samouilov A., Kuppusamy P. // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics – 1999. – V. 1411 – № 2–3 – P.250–262.

39. Huang, Z. Enzymatic function of hemoglobin as a nitrite reductase that produces NO under allosteric control. / Huang Z., Shiva S., Kim-Shapiro D.B., Patel R.P., Ringwood L.A., Irby C.E., Huang K.T., Ho C., Hogg N., Schechter A.N., Gladwin M.T. // The Journal of clinical investigation – 2005. – V. 115 – № 8 – P.2099–107.

40. Ажипа, Я.И. Конформационные изомеры комплексов гемоглобина с окисью азота, возникающие в крови при действии нитрита натрия / Ажипа Я.И., Реутов В.П., Каюшин Л.П., Никишкин Е.И. // Известия АН СССР. Серия биологическая – 1983. – № 2 – С.240–250.

41. Nagase, S. A Novel Nonenzymatic Pathway for the Generation of Nitric Oxide by the Reaction of Hydrogen Peroxide and D- or L-Arginine / Nagase S., Takemura K., Ueda A., Hirayama A., Aoyagi K., Kondoh M., Koyama A. // Biochemical and Biophysical Research Communications – 1997. – V. 233 – № 1 – P.150–153.

42. Ignarro, L.J. Nitric Oxide Donors and Cardiovascular Agents Modulating the Bioactivity of Nitric Oxide: An Overview / Ignarro L.J. // Circulation Research – 2002. – V. 90 – № 1 – P.21–28.

43. Граник, В.Г. Экзогенные доноры оксида азота и ингибиторы его образования (химический аспект) / Граник В.Г., Рябова С.Ю., Григорьев Н.Б. // Успехи химии – 1997. – Т. 66 – № 8 – С.792–807.

44. Arnold, W.P. Photodegradation of sodium nitroprusside: biologic activity and cyanide release. / Arnold W.P., Longnecker D.E., Epstein R.M. // Anesthesiology – 1984. – V. 61 – № 3 – P.254–60.

45. Roy, B. New Thionitrites: Synthesis, Stability, and Nitric Oxide Generation /

Roy B., Moulinet d'Hardemare A. du, Fontecave M. // The Journal of Organic Chemistry – 1994. – V. 59 – № 23 – P.7019–7026.

46. Bainbrigge, N. The thermal stability of S-nitrosothiols: experimental studies and ab initio calculations on model compounds / Bainbrigge N., Butler A.R., Görbitz C. // Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2 – 1997. – № 2 – P.351.

47. Feelisch, M. The Biochemical Pathways of Nitric Oxide Formation from Nitrovasodilators / Feelisch M. // Journal of Cardiovascular Pharmacology – 1991. – V. 17 – № Supplement 3 – P.S25–S33.

48. Maragos, C.M. Complexes of NO with nucleophiles as agents for the controlled biological release of nitric oxide. Vasorelaxant effects / Maragos C.M., Morley D., Wink D.A., Dunams T.M., Saavedra J.E., Hoffman A., Bove A.A., Isaac L., Hrabie J.A., Keefer L.K. // Journal of Medicinal Chemistry – 1991. – V. 34 – № 11 – P.3242–3247.

49. Hrabie, J.A. New nitric oxide-releasing zwitterions derived from polyamines / Hrabie J.A., Klose J.R., Wink D.A., Keefer L.K. // The Journal of Organic Chemistry – 1993. – V. 58 – № 6 – P.1472–1476.

50. Smith, D.J. Nitric Oxide-Releasing Polymers Containing the [N(O)NO] - Group / Smith D.J., Chakravarthy D., Pulfer S., Simmons M.L., Hrabie J.A., Citro M.L., Saavedra J.E., Davies K.M., Hutsell T.C., Mooradian D.L., Hanson S.R., Keefer L.K. // Journal of Medicinal Chemistry – 1996. – V. 39 – № 5 – P.1148–1156.

51. Vanderford, P.A. Diethylamine/nitric oxide (NO) adduct, an NO donor, produces potent pulmonary and systemic vasodilation in intact newborn lambs. / Vanderford P.A., Wong J., Chang R., Keefer L.K., Soifer S.J., Fineman J.R. // Journal of cardiovascular pharmacology – 1994. – V. 23 – № 1 – P.113–9.

52. Wink, D.A. Inhibition of Cytochromes P450 by Nitric Oxide and a Nitric Oxide-Releasing Agent / Wink D.A., Osawa Y., Darbyshire J.F., Jones C.R., Eshenaur S.C., Nims R.W. // Archives of Biochemistry and Biophysics – 1993. – V. 300 – № 1 – P.115–123.

53. Vanin, A.F. Endothelium-derived relaxing factor is a nitrosyl iron complex with thiol ligands / Vanin A.F. // FEBS Letters – 1991. – V. 289 – № 1 – P.1–3.

54. Vanin, A.F. The relationship between l-arginine-dependent nitric oxide synthesis, nitrite release and dinitrosyl-iron complex formation by activated macrophages / Vanin A.F., Mordvintcev P.I., Hauschildt S., Mülsch A. // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research – 1993. – V. 1177 – № 1 – P.37–42.

55. Butler, A.R. Non-Heme Iron Nitrosyls in Biology / Butler A.R., Megson I.L. // Chemical Reviews – 2002. – V. 102 – № 4 – P.1155–1166.

56. Ванин, А.Ф. Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами и их обратимое превращение в нитрозотиолы / Ванин А.Ф., Маленкова И.В., Мордвинцев П.И., Мюльш А.Ф. // Биохимия – 1993. – Т. 58 – № 7 – С.1094–1103.

57. Ванин, А.Ф. Взаимопревращение двух возможных форм эндотелий-зависимого фактора релаксации / Ванин А.Ф. // Биофизика – 1993. – Т. 38 – С.751–760.

58. Храпова, Н.В. S-нитрозотиолы и динитрозотиольные комплексы железа как источники оксида азота в организмах животных / Храпова Н.В., Маленкова И.В., Ванин А.Ф. // Биофизика – 1995. – Т. 40 – С.117–121.

59. Ванин, А.Ф. Свободные радикалы нового типа в дрожжевых клетках / Ванин А.Ф., Налбандян Р.М. // Биофизика – 1965. – Т. 10 – С.167–168.

60. Vanin, A.F. Polynuclear water-soluble dinitrosyl iron complexes with cysteine or glutathione ligands: Electron paramagnetic resonance and optical studies / Vanin A.F., Poltorakov A.P., Mikoyan V.D., Kubrina L.N., Burbaev D.S. // Nitric Oxide - Biology and Chemistry – 2010. – V. 23 – № 2 – P.136–149.

61. Radicals for Life: The Various Forms of Nitric Oxide / eds. A.F. Vanin, E. van Faassen. - Amsterdam: Elsevier, 2007.– 442p.

62. Ванин, А.Ф. Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами: физикохимия, биология, медицина / А.Ф. Ванин – Москва-Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2015.– 220с.

63. Borodulin, R.R. Dinitrosyl iron complexes with glutathione as NO and NO^+ donors / Borodulin R.R., Kubrina L.N., Mikoyan V.D., Poltorakov A.P., Shvydkiy V.O., Burbaev D.S., Serezhenkov V.A., Yakhontova E.R., Vanin A.F. // Nitric Oxide – 2013. – V. 29 – P.4–16.

64. Roussin, M.L. Recherches sur les nitrosulfures doubles de fer (nouvelle classe de sels.) / Roussin M.L. // Ann. Chim. Phys. – 1858. – V. 52 – P.285.

65. Алдошин, С.М. Новый класс нейтральных парамагнитных биядерных нитрозильных серосодержащих комплексов железа / Алдошин С.М., Санина Н.А., Ракова О.А., Шилов Г.В., Куликов А.В., Шульга Ю.М., Ованесян Н.С. // Известия Академии наук. Серия химическая – 2003. – № 8 – С.1614–1620.

66. Санина, Н.А. Функциональные модели нитрозильных [Fe-S] протеинов / Санина Н.А., Алдошин С.М. // Известия Академии наук. Серия химическая – 2004. – № 11 – С.2326–2345.

67. Ванин, А.Ф. Роль ионов железа и цистеина в образовании и распаде S-нитрозоцистеина S-нитрозоглутатиона / Ванин А.Ф. // Биохимия – 1995. – Т. 60 – № 4 – С.593–601.

68. Bourassa, J.L. Flash and continuous photolysis studies of Roussin’s red salt dianion $Fe_2S_2(NO)_4^{2-}$ in solution / Bourassa J.L., Ford P.C. // Coordination Chemistry Reviews – 2000. – V. 200–202 – P.887–900.

69. Санина, Н.А. Синтез, структура и твердофазные превращения нитрозильного комплекса железа $Na_2[Fe_2(S_2O_3)_2(NO)_4]\cdot 4H_2O$ / Санина Н.А., Алдошин С.М., Руднева Т.Н., Головина Н.И., Шилов Г.В., Шульга Ю.М., Мартыненко В.М., Ованесян Н.С. // Координационная Химия – 2005. – Т. 31 – № 5 – С.301–306.

70. Sanina, N.A. Influence of CH_3 group in 1-methyl-imidazole-2-yl on the properties of binuclear sulfure-nitrosyl iron complex with the ligand of μ-N-C-S type / Sanina N.A., Rudneva T.N., Aldoshin S.M., Shilov G. V., Korchagin D. V., Shul’ga Y.M., Martinenko V.M., Ovanesyan N.S. // Inorganica Chimica Acta – 2006. – V. 359 – № 2 – P.570–576.

71. Санина, Н.А. Синтез, строение и NO-донорная активность

парамагнитного комплекса $[Fe_2(SC_3H_5N_2)_2(NO)_4]$ как модели нитрозильных [2Fe-2S] белков / Санина Н.А., Руднева Т.Н., Алдошин С.М., Чехлов А.Н., Моргунов Р.Б., Курганова Е.В., Ованесян Н.С. // Известия Академии наук. Серия химическая – 2007. – № 1 – С.28–34.

72. Lewandowska, H. Spectroscopic Characterization of Nitrosyl Complexes / Lewandowska H. // Structure and Bonding – 2013. – P.115–165.

73. Enemark, J.H. Principles of structure, bonding, and reactivity for metal nitrosyl complexes / Enemark J.H., Feltham R.D. // Coordination Chemistry Reviews – 1974. – V. 13 – № 4 – P.339–406.

74. Санина, Н.А. Синтез, строение и свойства можелей нитрозильных [2Fe-2S], [1Fe-2S] протеинов и перспективы применения их в биологии и медицине / Санина Н.А., Алдошин С.М. // Российский химический журнал (Журн. Рос. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева) – 2004. – Т. XLVIII – № 4 – С.12–19.

75. Vanin, A.F. Dinitrosyl–iron complexes with thiol-containing ligands: Spatial and electronic structures / Vanin A.F., Sanina N.A., Serezhenkov V.A., Burbaev D.S., Lozinsky V.I., Aldoshin S.M. // Nitric Oxide – 2007. – V. 16 – № 1 – P.82–93.

76. Vanin, A.F. The 2.03 Signal as an Indicator of Dinitrosyl–Iron Complexes with Thiol-Containing Ligands / Vanin A.F., Serezhenkov V.A., Mikoyan V.D., Genkin M. V. // Nitric Oxide – 1998. – V. 2 – № 4 – P.224–234.

77. Timoshin, A.A. Protein-bound dinitrosyl–iron complexes appearing in blood of rabbit added with a low-molecular dinitrosyl–iron complex: EPR studies / Timoshin A.A., Vanin A.F., Orlova T.R., Sanina N.A., Ruuge E.K., Aldoshin S.M., Chazov E.I. // Nitric Oxide – 2007. – V. 16 – № 2 – P.286–293.

78. Kleschyov, A.L. Biotransformation of Sodium Nitroprusside into Dinitrosyl Iron Complexes in Tissue of Ascites Tumors of Mice / Kleschyov A.L., Sedov K.R., Mordvintcev P.I., Vanin A.F. // Biochemical and Biophysical Research Communications – 1994. – V. 202 – № 1 – P.168–173.

79. Costanzo, S. Re-examination of the formation of dinitrosyl–iron complexes

during reaction of S-nitrosothiols with Fe(II) / Costanzo S., Menage S., Purrello R., Bonomo R.P., Fontecave M. // Inorganica Chimica Acta – 2001. – V. 318 – № 1–2 – P.1–7.

80. Conrado, C.L. Photochemical Investigation of Roussin's Red Salt Esters: $Fe_2(\mu\text{-}SR)_2(NO)_4$ / Conrado C.L., Bourassa J.L., Egler C., Wecksler S., Ford P.C. // Inorganic Chemistry – 2003. – V. 42 – № 7 – P.2288–2293.

81. Wanat, A. Kinetics, Mechanism, and Spectroscopy of the Reversible Binding of Nitric Oxide to Aquated Iron(II). An Undergraduate Text Book Reaction Revisited / Wanat A., Schneppensieper T., Stochel G., Eldik R. van, Bill E., Wieghardt K. // Inorganic Chemistry – 2002. – V. 41 – № 1 – P.4–10.

82. Lu, T.-T. Mononitrosyl Tris(Thiolate) Iron Complex $[Fe(NO)(SPh)_3]^-$ and Dinitrosyl Iron Complex $[(EtS)_2Fe(NO)_2]^-$: Formation Pathway of Dinitrosyl Iron Complexes (DNICs) from Nitrosylation of Biomimetic Rubredoxin $[Fe(SR)_4]^{2-/1-}$ (R = Ph, Et) / Lu T.-T., Chiou S.-J., Chen C.-Y., Liaw W.-F. // Inorganic Chemistry – 2006. – V. 45 – № 21 – P.8799–8806.

83. Praneeth, V.K.K. Spin Density Distribution in Five- and Six-Coordinate Iron(II)−Porphyrin NO Complexes Evidenced by Magnetic Circular Dichroism Spectroscopy / Praneeth V.K.K., Neese F., Lehnert N. // Inorganic Chemistry – 2005. – V. 44 – № 8 – P.2570–2572.

84. Vanin, A.F. Electronic and Spatial Structures of Water-Soluble Dinitrosyl Iron Complexes with Thiol-Containing Ligands Underlying Their Ability to Act as Nitric Oxide and Nitrosonium Ion Donors / Vanin A.F., Burbaev D.S. // Journal of Biophysics – 2011. – V. 2011 – P.1–14.

85. Vanin, A.F. Iron Catalyzes both Decomposition and Synthesis ofS-Nitrosothiols: Optical and Electron Paramagnetic Resonance Studies / Vanin A.F., Malenkova I. V., Serezhenkov V.A. // Nitric Oxide – 1997. – V. 1 – № 3 – P.191–203.

86. D'Autréaux, B. Spectroscopic Description of the Two Nitrosyl−Iron Complexes Responsible for Fur Inhibition by Nitric Oxide / D'Autréaux B., Horner O., Oddou J.-L., Jeandey C., Gambarelli S., Berthomieu C., Latour J.-M.,

Michaud-Soret I. // Journal of the American Chemical Society – 2004. – V. 126 – № 19 – P.6005–6016.

87. Stojanović, S. Iron catalyzed conversion of NO into nitrosonium (NO+) and nitroxyl (HNO/NO^-) species / Stojanović S., Stanić D., Nikolić M., Spasić M., Niketić V. // Nitric Oxide – 2004. – V. 11 – № 3 – P.256–262.

88. Keszler, A. Thiolate-based dinitrosyl iron complexes: Decomposition and detection and differentiation from S-nitrosothiols / Keszler A., Diers A.R., Ding Z., Hogg N. // Nitric Oxide – 2017.

89. Tsou, C.-C. Transformation of the $\{Fe(NO)_2\}^9$ Dinitrosyl Iron Complexes (DNICs) into S-Nitrosothiols (RSNOs) Triggered by Acid-Base Pairs / Tsou C.-C., Liaw W.-F. // Chemistry - A European Journal – 2011. – V. 17 – № 47 – P.13358–13366.

90. Граник, В.Г.Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарств / В. Г. Граник, Н. Б. Григорьев –М.:Вузовская книга, 2004. – 360с.

91. Ванин, А.Ф. Полимерная композиция для получения стабилизированной формы динитрозильного комплекса железа и способ получения указанной формы комплекса / Ванин А.Ф., Лозинский В.И., Капелько В.И. // Патент РФ № 2291880 – 2005.

92. Chazov, E.I. Hypotensive effect of Oxacom containing a dinitrosyl iron complex with glutathione: Animal studies and clinical trials on healthy volunteers / Chazov E.I., Rodnenkov O. V., Zorin A. V., Lakomkin V.L., Gramovich V. V., Vyborov O.N., Dragnev A.G., Timoshin A.A., Buryachkovskaya L.I., Abramov A.A., Massenko V.P., Arzamastsev E. V., Kapelko V.I., Vanin A.F. // Nitric Oxide – 2012. – V. 26 – № 3 – P.148–156.

93. Гостеев, А.Ю. Гемодинамические эффекты синтетического аналога эндогенных донаторов оксида азота (II) — препарата динитрозильных комплексов железа у больных артериальной гипертонией с неосложненными гипертоническими кризами / Гостеев А.Ю., Зорин А.В., Родненков О.В., Драгнев А.Г., Чазов Е.И. // Терапевтический архив – 2014. – Т. 86 – № 9 – С.49–55.

94. Санина, Н.А. Водорастворимые биядерные катионные нитрозильные комплексы железа с природными алифатическими тиолилами, обладающие цитотоксической, апоптотической и NO-донорной активностью / Санина Н.А., Лысенко К.А., Жукова О.С., Руднева Т.Н., Емельянова Н.С., Алдошин С.М. // Патент РФ № 2441873 – 2012.

95. Санина, Н.А. Биядерные нитрозильные комплексыжелеза с бензазагетероциклическими производными, способ их получения / Санина Н.А., Жукова О.С., Смирнова З.С., Руднева Т.Н., Шилов Г.В., Алдошин С.М., Давыдов М.И. // Патент РФ № 2441872 – 2012.

96. Antonini, E. Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands / eds. Tatum E.L., Neuberger A. - Amsterdam and London: North-Holland Publishing Company, 1971. - Vol. 21 – 276P.

97. Perutz, M.F. Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-A. resolution, obtained by X-ray analysis. / Perutz M.F., Rossmann M.G., Cullis A.F., MUuirhead H., Will G., North A.C. // Nature – 1960. – V. 185 – № 4711 – P.416–22.

98. Блюменфельд, Л.А. Гемоглобин / Блюменфельд Л.А. // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 4 – С.33–38.

99. Barwick, R.C. The computer-assisted differentiation of hemoglobin variants. / Barwick R.C., Schneider R.G. // Texas reports on biology and medicine – 1980. – V. 40 – P.143–156.

100. Perutz, M.F. Molecular anatomy, physiology, and pathology of hemoglobin / eds. M.P.W. Stamatoyannopoulos G., Nienhuis A.W., Leder P. - Philadelphia: WB Saunders, 1987. – 127–177p.

101. Monod, J. On the nature of allosteric transitions: A plausible model / Monod J., Wyman J., Changeux J.-P. // Journal of Molecular Biology – 1965. – V. 12 – № 1 – P.88–118.

102. Sharma, V.S. Reaction of nitric oxide with heme proteins and model compounds of hemoglobin / Sharma V.S., Traylor T.G., Gardiner R., Mizukami H. // Biochemistry – 1987. – V. 26 – № 13 – P.3837–3843.

103. Cassoly, R. Conformation, co-operativity and ligand binding in human hemoglobin / Cassoly R., Gibson Q.H. // Journal of Molecular Biology – 1975. – V. 91 – № 3 – P.301–313.

104. Moore, E.G. Cooperativity in the dissociation of nitric oxide from hemoglobin. / Moore E.G., Gibson Q.H. // The Journal of biological chemistry – 1976. – V. 251 – № 9 – P.2788–94.

105. Kelm, M.Metabolic fate of nitric oxide and related N-oxides / M. Kelm, K. Yoshida / eds. Stamler J.S., Feelisch M. – London: John Wiley and Sons, 1996.– 47-58p.

106. Pepkezaba, J. Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilatation in pulmonary hypertension / Pepkezaba J. // The Lancet – 1991. – V. 338 – № 8776 – P.1173–1174.

107. Yonetani, T. Electron Paramagnetic Resonance and Oxygen Binding Studies of -Nitrosyl Hemoglobin: a novel oxygen carrier having no-assisted allosteric functions / Yonetani T., Tsuneshige A., Zhou Y., Chen X. // Journal of Biological Chemistry – 1998. – V. 273 – № 32 – P.20323–20333.

108. Doyle, M.P. Oxidation of oxymyoglobin by nitric oxide through dissociation from cobalt nitrosyls / Doyle M.P., Pickering R.A., Cook B.R. // Journal of Inorganic Biochemistry – 1983. – V. 19 – № 4 – P.329–338.

109. Gow, A.J. The oxyhemoglobin reaction of nitric oxide / Gow A.J., Luchsinger B.P., Pawloski J.R., Singel D.J., Stamler J.S. // Proceedings of the National Academy of Sciences – 1999. – V. 96 – № 16 – P.9027–9032.

110. Jia, L. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. / Jia L., Bonaventura C., Bonaventura J., Stamler J.S. // Nature – 1996. – V. 380 – № 6571 – P.221–6.

111. Зинчук, В.В. Участие оксида азота в формировании кислородосвязывающих свойств гемоглобина / Зинчук В.В. // Успехи физиологических наук. – 2003. – Т. 34 – № 2 – С.33–45.

112. Perutz, M.F. Taking the pressure off / Perutz M.F. // Nature – 1996. – Т. 380 – № 6571 – P.205–206.

113. Keilin, D.The History of Cell Respiration and Cytochrome / D. Keilin – London: Cambridge University Press, 1966.

114. Dickerson, R.E. The structure of cytochromec and the rates of molecular evolution / Dickerson R.E. // Journal of Molecular Evolution – 1971. – V. 1 – № 1 – P.26–45.

115. Северин, Е.С. Биохимия / Е. С. Северин, Т. Л. Алейникова, Е. В. Осипов – М.:Медицина, 2000.– 168с.

116. Lehninger, A.L. Principles of Biochemistry. / A. L. Lehninger, D. L. Nelson, M. M. Cox / ed. Neal V. –New-York: Worth Publishers, 1993. – 388p.

117. Hoshino, M. Photochemistry of nitric oxide adducts of water-soluble iron(III) porphyrin and ferrihemoproteins studied by nanosecond laser photolysis / Hoshino M., Ozawa K., Seki H., Ford P.C. // Journal of the American Chemical Society – 1993. – V. 115 – № 21 – P.9568–9575.

118. Margoliash, E. Appendix—Spectrum of horse-heart cytochrome c / Margoliash E., Frohwirt N. // Biochemical Journal – 1959. – V. 71 – № 3 – P.570–572.

119. Butt, W.D. Absorption Spectra and Some Other Properties of Cytochrome c and of Its Compounds with Ligands / Butt W.D., Keilin D. // Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences – 1962. – V. 156 – № 965 – P.429–458.

120. Ow, Y.-L.P. Cytochrome c: functions beyond respiration / Ow Y.-L.P., Green D.R., Hao Z., Mak T.W. // Nature Reviews Molecular Cell Biology – 2008. – V. 9 – № 7 – P.532–542.

121. Виноградов, А.Д. Преобразование энергии в митохондриях / Виноградов А.Д. // Соросовский образовательный журнал – 1999. – № 9 – С.11–19.

122. Electron Transfer in Biology and the Solid State / eds. M.K. Johnson, R.B. King, D.M. Kurtz, C. Kutal, M.L. Norton, R.A. Scott. –Washington, DC: American Chemical Society, 1989. - 470 p.

123. Губский, Ю.И.Смерть клетки: свободные радикалы, некроз, апоптоз: монография / Ю. И. Губский – Винница: Нова Книга, 2015.– 360с.

124. Kagan, V.E. Cytochrome c/cardiolipin relations in mitochondria: a kiss of

death / Kagan V.E., Bayır H.A., Belikova N.A., Kapralov O., Tyurina Y.Y., Tyurin V.A., Jiang J., Stoyanovsky D.A., Wipf P., Kochanek P.M., Greenberger J.S., Pitt B., Shvedova A.A., Borisenko G. // Free Radical Biology and Medicine – 2009. – V. 46 – № 11 – P.1439–1453.

125. Проскурнина, Е.В. Свободные радикалы как участники регуляторных и патологических процессов / под ред. В.Ю.А. Григорьев А. И. Москва: Макс Пресс, 2015. – 38–71р.

126. Skulachev, V.P. Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. / Skulachev V.P. // FEBS letters – 1998. – V. 423 – № 3 – P.275–80.

127. Skulachev, V.P. Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell / Skulachev V.P. // FEBS Letters – 1996. – V. 397 – № 1 – P.7–10.

128. Rose, E.J. Nitric oxide ferrohemes: kinetics of formation and photodissociation quantum yields / Rose E.J., Hoffman B.M. // Journal of the American Chemical Society. – 1983. – V. 105 – № 9 – P.2866–2873.

129. Sharpe, M.A. Reactions of nitric oxide with mitochondrial cytochrome c: a novel mechanism for the formation of nitroxyl anion and peroxynitrite / Sharpe M.A., Cooper C.E. // Biochemical Journal – 1998. – V. 332 – № 1 – P.9–19.

130. Orii, Y. Reaction of cytochrome c with nitrite and nitric oxide. A model of dissimilatory nitrite reductase. / Orii Y., Shimada H. // Journal of biochemistry – 1978. – V. 84 – № 6 – P.1542–52.

131. Hill, R. Spectral transitions of nitrosyl hemes during ligand binding to hemoglobin. / Hill R., Olson J.S., Palmer G. // Journal of Biological Chemistry – 1979. – V. 254 – № 23 – P.12110–12120.

132. Ascenzi, P. Nitric oxide binding to ferrous native horse heart cytochrome c and to its carboxymethylated derivative: A spectroscopic and thermodynamic Study / Ascenzi P., Coletta M., Santucci R., Polizio F., Desideri A. // Journal of Inorganic Biochemistry – 1994. – V. 53 – № 4 – P.273–280.

133. Hori, H. Electronic and stereochemical characterizations of the photoinduced

intermediates of nitrosyl complexes of metal (S = 5/2)-substituted hemoproteins trapped at low temperature. / Hori H., Ikeda-Saito M., Lang G., Yonetani T. // The Journal of biological chemistry – 1990. – V. 265 – № 25 – P.15028–33.

134. Osipov, A.N. Regulation of cytochrome c peroxidase activity by nitric oxide and laser irradiation / Osipov A.N., Stepanov G.O., Vladimirov Y.A., Kozlov A. V., Kagan V.E. // Biochemistry (Moscow) – 2006. – V. 71 – № 10 – P.1128–1132.

135. Калинина, Е.В. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов. / Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Новичкова М.Д. // Успехи биологической химии – 2014. – Т. 54 – С.299–348.

136. Nagy, P. Kinetics and Mechanisms of Thiol–Disulfide Exchange Covering Direct Substitution and Thiol Oxidation-Mediated Pathways / Nagy P. // Antioxidants & Redox Signaling – 2013. – V. 18 – № 13 – P.1623–1641.

137. Janssen-Heininger, Y.M.W. Emerging mechanisms of glutathione-dependent chemistry in biology and disease / Janssen-Heininger Y.M.W., Nolin J.D., Hoffman S.M., Velden J.L. van der, Tully J.E., Lahue K.G., Abdalla S.T., Chapman D.G., Reynaert N.L., Vliet A. van der, Anathy V. // Journal of Cellular Biochemistry – 2013. – V. 114 – № 9 – P.1962–1968.

138. Deponte, M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes / Deponte M. // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects – 2013. – V. 1830 – № 5 – P.3217–3266.

139. Townsend, D.M. The importance of glutathione in human disease / Townsend D.M., Tew K.D., Tapiero H. // Biomedicine & Pharmacotherapy – 2003. – V. 57 – № 3–4 – P.145–155.

140. Cai, Z. Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health. / Cai Z., Yan L.-J. // Journal of biochemical and pharmacological research – 2013. – V. 1 – № 1 – P.15–26.

141. Fitzpatrick, A.M. Glutathione Redox Control of Asthma: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities / Fitzpatrick A.M., Jones D.P., Brown L.A.S. // Antioxidants & Redox Signaling – 2012. – V. 17 – № 2 – P.375–408.

142. Чумаков, П.М. Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме / Чумаков П.М. // Успехи биологической химии. – 2007. – Т. 47 – № 1 – С.3–52.

143. Klatt, P. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress / Klatt P., Lamas S. // European Journal of Biochemistry – 2000. – V. 267 – № 16 – P.4928–4944.

144. Yusuf, M.A. Cys-141 glutathionylation of human p53: Studies using specific polyclonal antibodies in cancer samples and cell lines / Yusuf M.A., Chuang T., Bhat G.J., Srivenugopal K.S. // Free Radical Biology and Medicine – 2010. – V. 49 – № 5 – P.908–917.

145. Estrela, J.M. Glutathione in Cancer Biology and Therapy / Estrela J.M., Ortega A., Obrador E. // Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences – 2006. – V. 43 – № 2 – P.143–181.

146. Sanina, N.A. Synthesis, structure, NO donor activity of iron–sulfur nitrosyl complex with 2-aminophenol-2-yl and its antiproliferative activity against human cancer cells / Sanina N.A., Kozub G.I., Zhukova O.S., Emel'yanova N.S., Kondrat'eva T.A., Korchagin D. V., Shilov G. V., Ovanesyan N.S., Aldoshin S.M. // Journal of Coordination Chemistry – 2013. – V. 66 – № 20 – P.3602–3618.

147. Санина, Н.А. Новый класс доноров монооксида азота: строение и свойства нитрозильных комплексов железа с функциональными серосодержащими лигандами: автореф. дисс… докт. хим. наук: 02.00.04 / – Санина Наталиа Алексеевна. - Черноголовка, 2010.- 48 с.

148. Zhang, X. Amperometric detection of nitric oxide / Zhang X., Broderick M.P. // Modern aspects of immunology – 2000. – V. 1 – № 4 – P.160–165.

149. Frisch, M.J. GAUSSIAN 09, Revision D.01 Gaussian, Wallingford (CT) / M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J.A. Montgomery, Jr., J.E.

Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J.M. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, O. Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J. Fox – 2013.

150. DeLano,W. L. The PyMOL molecular graphics system. / DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA – 2002.

151. Perutz, M.F. A Novel Allosteric Mechanism in Haemoglobin / Perutz M.F., Fermi G., Poyart C., Pagnier J., Kister J. // Journal of Molecular Biology – 1993. – V. 233 – № 3 – P.536–545.

152. Bernstein, F.C. The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. / Bernstein F.C., Koetzle T.F., Williams G.J., Meyer E.F., Brice M.D., Rodgers J.R., Kennard O., Shimanouchi T., Tasumi M. // Journal of molecular biology – 1977. – V. 112 – № 3 – P.535–42.

153. Тимошин, А.А. Динитрозильные комплексы железа-новый тип гипотензивных препаратов / Тимошин А.А., Орлова Ц.Р., Ванин А.Ф., Санина Н.А., Рууге Э.К., Алдошин С.М., Чазов Е.И. // Российский химический журнал (Журн. Рос. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева) – 2007. – Т. LI – № 1 – С.88–92.

154. Санина, Н.А. Выявление центров связывания катионов на поверхности гемоглобина в его реакции с донором NO — нитрозильным комплексом железа { $Fe_2[S(CH_2)_2NH_3]_2(NO)_4\}SO_4 \cdot 2.5H_2O$ / Санина Н.А., Сырцова Л.А., Психа Б.Л., Тухватуллин И.А., Шкондина Н.И., Руднева Т.Н., Котельников А.И., Алдошин С.М. // Известия академии наук. Серия химическая – 2012. – № 1 – С.8–13.

155. Syrtsova, L.A. Exchange of cysteamine, thiol ligand in binuclear cationic tetranitrosyl iron complex, for glutathione / Syrtsova L.A., Sanina N.A.,

Kabachkov E.N., Shkondina N.I., Kotelnikov A.I., Aldoshin S.M. // RSC Advances – 2014. – V. 4 – № 47 – P.24560.

156. Сырцова, Л.А. Влияние гемоглобина на NO донорную активность μ2-S-бис(пиримидин-2-тиолато)тетранитрозилдижелеза / Сырцова Л.А., Санина Н.А., Шестаков А.Ф., Шкондина Н.И., Руднева Т.Н., Емельянова Н.С., Котельников А.И., Алдошин С.М. // Известия Академии наук. Серия химическая – 2010. – № 12 – С.1–12.

157. Rudneva, T.N. Synthesis and structure of a water-soluble nitrosyl iron complex with cysteamine ligand / Rudneva T.N., Sanina N.A., Lyssenko K.A., Aldoshin S.M., Antipin M.Y., Ovanesyan N.S. // Mendeleev Communications – 2009. – V. 19 – № 5 – P.253–255.

158. Gladwin, M.T. Nitric oxide donor properties of hydroxyurea in patients with sickle cell disease. / Gladwin M.T., Shelhamer J.H., Ognibene F.P., Pease-Fye M.E., Nichols J.S., Link B., Patel D.B., Jankowski M.A., Pannell L.K., Schechter A.N., Rodgers G.P. // British journal of haematology – 2002. – V. 116 – № 2 – P.436–44.

159. Miles, A.M. Determination of nitric oxide using fluorescence spectroscopy. / Miles A.M., Wink D.A., Cook J.C., Grisham M.B. // Methods in enzymology – 1996. – V. 268 – P.105–20.

160. Санина, Н.А. Закономерности в стабилизации гемоглобином биядерных комплексов железа $[Fe_2(\mu\text{-}N — C — SR)_2(NO)_4]$, содержащих бензимидазолил и бензотиазолилтиольные лиганды / Санина Н.А., Сырцова Л.А., Чудинова Е.С., Шкондина Н.И., Руднева Т.Н., Котельников А.И., Алдошин С.М. // Известия академии наук. Серия химическая – 2009. – № 3 – С.554–559.

161. Санина, Н.А. Стабилизация гемоглобином тетранитрозильного биядерного комплекса железа с пиридин-2-тиолом в водных растворах / Санина Н.А., Сырцова Л.А., Шкондина Н.И., Малкова Е.С., Котельников А.И., Алдошин С.М. // Известия Академии наук. Серия химическая – 2007. – № 4 – С.732–736.

162. The Proteins. The biochemistry of protein substances. / eds. H. Neurath, K.

Bailey. –New York: Academic Press Inc., 1954.– 425p.

163. Санина, Н.А. Взаимодействие феррицитохрома С с нитрозильным комплексом железа $\{Fe_2[S(CH_2)_2NH_3]_2(NO)_4\}SO4•2.5H_2O$ / Санина Н.А., Сырцова Л.А., Шкондина Н.И., Руднева Т.Н., Котельников А.И., Алдошин С.М. // Известия академии наук. Серия химическая – 2010. – № 8 – С.1528–1534.

164. Санина, Н.А. Реакция ферроцитохрома с и дезоксигемоглобина с нитрозильным комплексом железа $\{Fe_2[S(CH_2)_2NH_3]_2(NO)_4\}SO_4•2.5H_2O$ / Санина Н.А., Сырцова Л.А., Психа Б.Л., Шкондина Н.И., Руднева Т.Н., Алдошин С.М. // Известия академии наук. Серия химическая – 2010. – № 10 – С.1944–1948.

165. Pan, K.-C. Electrocatalytic reactions of nitric oxide on Prussian blue film modified electrodes / Pan K.-C., Chuang C.-S., Cheng S.-H., Su Y.O. // Journal of Electroanalytical Chemistry – 2001. – V. 501 – № 1–2 – P.160–165.

166. Емельянова, Н.С. Квантово-химические подходы к изучению связи Fe-S в эфирах руссена: реакция замещения функциональных лигандов на глутатион / Емельянова Н.С., Санина Н.А., Алдошин С.М. // Известия академии наук. Серия химическая – 2016. – № 8 - С. 1945-1951.

167. Shestakov, A.F. Experimental and theoretical study of the arrangement, electronic structure and properties of neutral paramagnetic binuclear nitrosyl iron complexes with azaheterocyclic thyolyls having “S–C–N type” coordination of bridging ligands / Shestakov A.F., Shul’ga Y.M., Emel’yanova N.S., Sanina N.A., Rudneva T.N., Aldoshin S.M., Ikorskii V.N., Ovcharenko V.I. // Inorganica Chimica Acta – 2009. – V. 362 – № 7 – P.2499–2504.

168. Емельянова, Н.С. Квантово-химические подходы к объяснению различий в NO-донорной активности железо-серных нитрозильных комплексов / Емельянова Н.С., Полещук О.Х., Санина Н.А., Боженко К.В., Алдошин С.М. // Известия академии наук. Серия химическая – 2014. – № 1 – С.37.