

На правах рукописи



СОКОЛОВА Екатерина Михайловна

**КИНЕТИЧЕСКИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ И ФИЗИКО-
ХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
БИЯДЕРНЫХ ТЕТРАНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ
ЖЕЛЕЗА – ДОНОРОВ ОКСИДА АЗОТА
С ЭРИТРОЦИТАМИ**

03.01.02 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Черноголовка - 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
«Институт проблем химической физики Российской академии наук»

Научные руководители:

Психа Борис Львович
доктор химических наук

Нешев Николай Ильич
кандидат биологических наук

Официальные оппоненты:

Васильева Светлана Васильевна
доктор биологических наук, заведующая лабораторией теоретической генетики ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук»

Тимошин Александр Анатольевич
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физико-химических методов исследования ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздрава РФ»

Ведущая организация:

ФГБУН «Институт физиологически активных веществ Российской академии наук»

Защита диссертации состоится «28» сентября 2016 года в 12 часов 00 минут на заседании диссертационного совета Д 002.039.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук по адресу: 119334, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт химической физики им. Н.Н.Семенова РАН» по адресу: 119991, г. Москва, Ленинский проспект, дом 38 и на сайте: <http://new.chph.ras.ru/dissertatsionnyj-sovet>.

Автореферат разослан «__» июня 2016 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета Д 002.039.01,
кандидат химических наук



/Л.И. Мазалецкая/

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Установление роли оксида азота в качестве сигнального регулятора сердечно-сосудистой системы организма одновременно акцентировало внимание на его участии в возникновении многих сердечно-сосудистых патологий. Было доказано, что в развитии таких заболеваний как стенокардия, атеросклероз, многие виды тромбозов, присутствует общая патогенетическая составляющая, связанная с недостаточностью ферментативного синтеза NO из его естественного субстрата L-аргинина. При этом оказалось, что уже более столетия используемые в кардиологии препараты из класса органических нитратов, такие как нитроглицерин, попадая в организм, разлагаются с выделением оксида азота, что и определяет их фармакологическое действие в качестве экзогенных источников оксида азота. Многолетнее использование органических нитратов и нитритов в клинической практике выявило у них ряд серьезных недостатков, связанных с развитием толерантности и целого ряда эндотелиальных дисфункций [1]. Таким образом, поиск и изучение биологической активности новых доноров оксида азота среди других классов химических соединений, имеющие своей конечной целью создание новых высокоэффективных фармакологических препаратов, во многом определяют основное направление развития современной биохимической фармакологии и медицинской химии.

С точки зрения органической химии, почти из любого соединения, имеющего в своей структуре атом азота, можно получить оксид азота путем его химической модификации в подходящих условиях. Так в известной монографии Граница и Григорьева «Оксид азота (NO): новый путь к поиску лекарств» подробно рассмотрены 12 классов потенциальных химических прекурсоров оксида азота [2]. Несмотря на то, что к настоящему времени некоторые представители указанных классов продемонстрировали хорошую эффективность в биологических моделях и в предклинических испытаниях, они пока не получили статус клинически применяемых препаратов. Это обстоятельство показывает, что реализация химически обусловленной NO-донорной активности в условиях организма сталкивается с проблемами, требующими проведения углубленных биохимических и клинико-фармакологических исследований.

В настоящее время в Институте проблем химической физики РАН синтезированы и активно изучаются представители нового класса экзогенных доноров оксида азота – биядерные тетранитрозильные комплексы железа (Б-ТНКЖ) с тиолсодержащими лигандами на основе азагетероциклических тиолов и алифатических тиаминов. Выделение оксида азота указанными комплексами не требует какого-либо внешнего воздействия (фото-, термо- или ферментативной активации) и происходит в ходе спонтанной диссоциации в водной среде [3]. Изучение взаимодействия данных комплексов с биосубстратами, исследование донирования ими оксида азота непосредственно в биологических средах *in vitro* и *in vivo* представляет собой актуальное научное направление, развитие которого имеет несомненное практическое значение.

Известно, что клеточная фракция крови на 90 % состоит из эритроцитов. Именно потому мы использовали в нашей работе суспензию эритроцитов в качестве модели внутреннего содержимого кровеносного сосуда, где реализуется фармакологический эффект доноров оксида азота в отношении сердечно-сосудистой системы.

Цель и задачи исследования.

Целью работы было исследование кинетических закономерностей и физико-химических механизмов взаимодействия биядерных тетранитрозильных комплексов железа (Б-ТНКЖ) с суспензией эритроцитов.

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

1. В широком диапазоне концентраций исследовать кинетику гемолиза эритроцитов под действием Б-ТНКЖ.
2. Разработать методику оценки NO-донирующей способности Б-ТНКЖ на основе измерения концентрации внутриэритроцитарного метгемоглобина.
3. Проанализировать взаимосвязь между гемолитической активностью и NO-донирующей способностью Б-ТНКЖ.
4. Исследовать кинетику донирования NO в суспензиях эритроцитов с различным уровнем гематокрита.
5. Исследовать кинетику донирования NO в суспензиях эритроцитов с различной начальной концентрацией Б-ТНКЖ.
6. Проанализировать механизмы влияния клеточной среды на NO-донирующую способность Б-ТНКЖ.

Научная новизна работы:

- Разработана методика оценки NO-донирующей способности Б-ТНКЖ на основе исследования кинетики образования внутриэритроцитарного метгемоглобина.
- Впервые показано, что Б-ТНКЖ различной структуры вызывают гемолиз разбавленных (HCT=0.2%) суспензий эритроцитов. Непосредственным индуктором гемолиза выступает, по-видимому, продукт биохимической трансформации оксида азота с участием оксигемоглобина – пероксинитрит.
- NO-донирующая способность Б-ТНКЖ зависит не только от структурно-химических характеристик комплекса, но и от физико-химических взаимодействий комплекса с компонентами биологической среды.
- Показано, что влияние клеточной среды на NO-донирующую способность комплексов различной структуры зависит от уровня липофильности S-лигандов.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Из результатов работы следует важный в теоретическом отношении вывод: NO-донирующая способность Б-ТНКЖ зависит не только от структурно-химических характеристик комплекса, но и от физико-химических взаимодействий комплекса с компонентами биологической среды.

Разработанная в данной работе методика количественной оценки NO-донирующей способности Б-ТНКЖ по образованию внутриэритроцитарного метгемоглобина может быть использована для анализа NO-донорной активности других экзогенных доноров оксида азота.

Установленная в работе взаимосвязь между уровнем липофильности S-лигандов и NO-донирующей способностью комплексов в биологических средах открывает возможности для целенаправленной оптимизации базовой структуры донора NO с учетом конкретного объекта фармакологического воздействия.

Методология и методы исследования.

Как известно, характерным местом реализации фармакологического эффекта доноров NO являются кровеносные сосуды, заполненные кровью, клеточная фракция

которой на 90 % состоит из эритроцитов. В связи с этим в данной работе суспензия эритроцитов была использована в качестве модельной клеточной среды, в которой реализуется фармакологический эффект доноров оксида азота в отношении сердечно-сосудистой системы.

В основу методологии работы был положен кинетический подход к исследованию двух различных аспектов взаимодействия Б-ТНКЖ с эритроцитами: исследование кинетики донирования NO и исследование кинетики гемолиза эритроцитов. Анализ кинетических закономерностей указанных процессов позволил затем предложить количественные критерии оценки гемолитической активности и NO-донирующей способности Б-ТНКЖ, а также изучить физико-химические факторы, влияющие на донирование NO в клеточной среде.

Для исследования кинетики донирования NO в качестве ловушки оксида азота использовали суспензию эритроцитов. Концентрацию оксида азота определяли по его реакции с внутриэритроцитарным оксигемоглобином с образованием метгемоглобина с помощью разработанной в данной работе методики.

За кинетикой гемолиза эритроцитов следили по снижению оптической плотности разбавленной суспензии эритроцитов (НСТ=0,2%) за пределами области поглощения гемоглобина (700 нм). Гемолитическую активность Б-ТНКЖ характеризовали величиной периода индукции гемолиза.

Положения, выносимые на защиту.

1. Биядерные тетранитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами вызывают концентрационнозависимый гемолиз разбавленных суспензий эритроцитов. Источником гемолитической активности комплексов является выделяемый ими оксид азота, претерпевающий внутри эритроцитов биохимическую трансформацию с образованием непосредственного химического индуктора гемолиза - пероксинитрита.
2. В присутствии эритроцитов в системе образуется дополнительный равновесный пул мембраносвязанного комплекса, характеризующийся пониженной скоростью гидролитической диссоциации из-за ограничения контакта с водной средой. NO-донирующая способность Б-ТНКЖ в суспензии эритроцитов зависит от соотношения равновесных концентраций свободного и мембраносвязанного комплекса.
3. Влияние клеточной среды на NO-донирующую способность комплексов зависит от уровня липофильности S-лигандов. Это открывает возможности для целенаправленной оптимизации базовой структуры Б-ТНКЖ с учетом конкретной фармакологической мишени.

Апробация результатов работы.

Основные результаты работы были доложены и обсуждены на следующих научных конференциях: The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Application of Nitric Oxide (Kyoto, 14-18 июня 2010 г.); 8-ая международная конференция "Биоантиоксидант" (Москва, 4-6 октября 2010 г.); Фестиваль студентов, аспирантов и молодых ученых «Молодая наука в классическом университете» (Иваново, 20-30 апреля 2010; 25-29 апреля 2011 гг.); I и II Всероссийская молодежная конференция «Успехи химической физики» (Черноголовка, 21-23 июня 2011; 19-24 мая 2013 гг.); X, XI, XII, XIII Ежегодная международная молодежная конференция ИБХФ РАН - Вузы

«Биохимическая физика» (Москва, 8-10 ноября 2010; 9-11 ноября 2011; 29-31 октября 2012; 28-30 октября 2013 гг.); XIX Всероссийская конференция «Структура и динамика молекулярных систем», (Яльчик, 25-30 июня 2012 г.); XXV Международная зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», (Москва, 11-15 февраля 2013 г.); VII и VIII Национальная научно-практическая конференция с международным участием «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека», (Смоленск, 14-18 сентября 2011; 25-29 сентября 2014 гг.).

Личный вклад автора:

- Выбор темы, формулирование целей и задач, планирование экспериментов, обсуждение результатов исследований проводились автором совместно с научными руководителями.
- Экспериментальная часть работы в полном объеме выполнена автором лично.
- Автор работы лично выступила с 7 устными докладами и 5 стендовыми сообщениями на Международных и Всероссийских научных конференциях, а также на 17 Ежегодном конкурсе научных работ молодых ученых ИПХФ РАН.
- Анализ данных литературы и написание диссертации выполнены автором лично

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 19 научных работ. Из них 3 - в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК, 9 - в других журналах, сборниках статей и трудах конференций, 7 - в сборниках тезисов конференций.

Объем и структура диссертации.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы (глава 1), описания материалов и методов исследования (глава 2), собственных исследований автора (главы 3-5), заключения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 121 странице машинописного текста, содержит 30 рисунков и 2 таблицы.

Работа выполнена в рамках планов фундаментальных научных исследований ИПХФ РАН 2010-2014 гг.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Первая глава диссертации, «Оксид азота: сигнальный мессенджер и цитотоксический агент», представляет собой обзор литературы, структурно разделенный на семь разделов. (1) История открытия физиологической роли оксида азота, (2) Физико-химические свойства NO, лежащие в основе его эволюционно закрепленных биологических функций, (3) Образование оксида азота в организме, (4) Сигнальный каскад оксида азота, (5) Цитотоксические свойства оксида азота. Пероксинитрит, (6) Роль гемопротеидов в осуществлении сигнальной функции NO, (7) Доноры оксида азота как фармакологические эффекторы.

Последние два раздела литературного обзора служат непосредственным введением к экспериментальной части работы. В разделе 6 приводятся данные о взаимодействии оксида азота с дезокси- и с оксигемоглобином. На основе анализа результатов работы Лиу и соавторов [4] и некоторых других обосновывается возможность использования суспензии эритроцитов в качестве ловушки оксида азота. Далее приводятся литературные данные, свидетельствующие о возможном физиологическом значении реакции оксида азота с оксигемоглобином, которая

трансформирует оксид азота в нитрат-анион. Согласно этим представлениям, пул эритроцитов крови рассматривается в качестве дренажной системы, удаляющей избыток оксида азота из кровяного русла [5].

В заключительном разделе первой главы представлены сведения об основных классах экзогенных доноров оксида азота: от давно используемых в клинической практике органических нитратов и нитритов до показавших хорошую фармакологическую активность на биологических моделях нитрозотиолов, диазениумдиолатов (NONO-аты) и нитрозильных комплексов железа. Особое внимание было уделено классу биядерных тетранитрозильных комплексов железа с тиолсодержащими лигандами (Б-ТНКЖ), которые являются объектом исследования в данной работе. Приводятся сведения об основах синтеза данных комплексов, сопоставляются различные методические подходы к анализу их NO-донорной активности. В заключение выделяются основные особенности Б-ТНКЖ в связи с перспективой их использования в фармакологии.

Вторая глава представляет собой методический раздел диссертации. В ней представлено научное оборудование, описаны объекты и методы исследований.

Доноры оксида азота. Предметом исследования были шесть Б-ТНКЖ (рис.1) состава $[\text{Fe}_2(\text{SR})_2(\text{NO})_4]$, где R – остаток лигандной группировки: пиримидин-2-ил (ПИМ), 1-метил-имидазол-2-ил (МИМ), бензотиазол-2-ил (БТЗ), остаток цистеина (ЦАК), остаток пеницилламина (ПЕН). Комплексы вводили в суспензию эритроцитов из растворов в воде или ДМСО, которые готовили непосредственно перед опытом. Концентрация ДМСО в образцах не превышала 3%.

Экспериментальные животные. В качестве источника крови были использованы мыши линии С 57 В1/6f (возраст 3 месяца, вес 18—20 г). Забор крови производили от предварительно наркотизированной эфиром мыши посредством ее декапитации. В качестве антикоагулянта использовали 0.11 М раствор цитрата натрия.

Получение эритроцитарной массы. Кровь центрифугировали в течение 7 мин. при 1500g. Плазму декантировали. Осадок эритроцитов осторожно ресуспендировали в изотоническом растворе NaCl. Операцию центрифугирования с декантированием супернатанта и ресуспендированием осадка эритроцитов в новой порции изотонического NaCl повторяли дважды. Эритроцитарную массу, полученную после последнего центрифугирования хранили в холодильнике при 4°C не более 36 часов.

Исследование кинетики гемолиза эритроцитов. В экспериментах использовали разбавленную суспензию эритроцитов в изотоническом растворе NaCl с гематокритом 0,2%. Эксперимент проводили в термостатируемой кювете (37 °C) при непрерывном слабом помешивании. За ходом гемолиза эритроцитов следили по изменению оптической плотности суспензии при 700 нм. Степень гемолиза определяли из соотношения:

$$\gamma = \frac{A_0 - A}{A_0 - A_{\text{H}_2\text{O}}} \quad (1)$$

где A_0 и A оптические плотности контрольного и опытного образца соответственно. $A_{\text{H}_2\text{O}}$ – оптическая плотность в условиях полного гемолиза эритроцитов водой. Во всех экспериментах оптическая плотность контрольного образца (A_0) составляла 0.8.

Гемолитическую активность Б-ТНКЖ характеризовали периодом индукции гемолиза, который определяли графически как длительность промежутка времени от запуска процесса до достижения уровня 10% гемолиза (I_{10}).

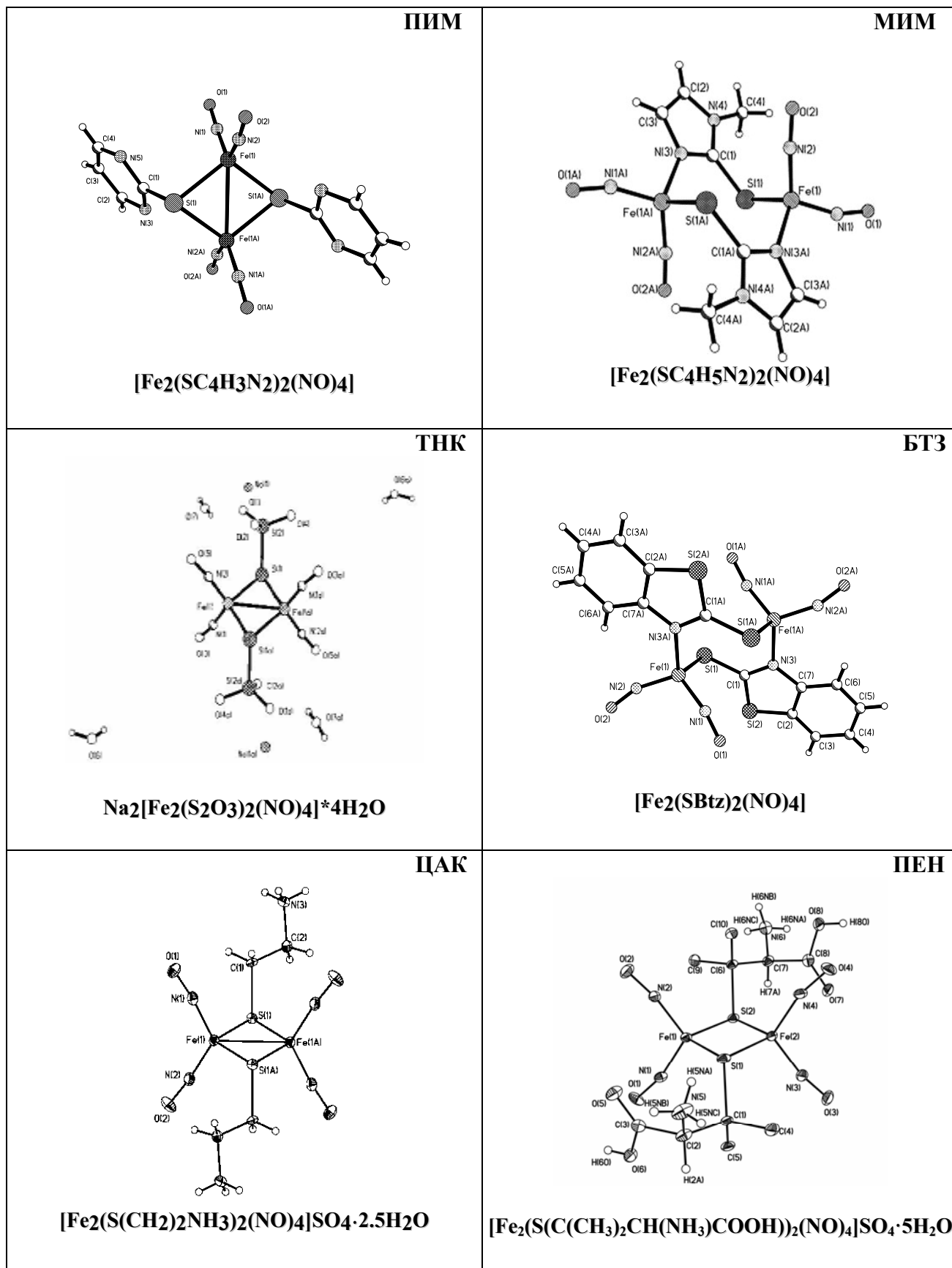


Рисунок 1 - Структуры биядерных тетранитрозильных комплексов железа по данным рентгеноструктурного анализа.

Определение общего гемоглобина. Из суспензии эритроцитов отбирали аликвоту 0.1 мл, к которой добавляли 1.7 мл., дистиллированной воды, выдерживали в течение 1 мин., до завершения гемолиза, центрифугировали при 20000g в течение 15 минут и измеряли оптическое поглощение в изобестической точке спектров дезокси-окси- и метгемоглобина, 525 нм, с использованием коэффициента экстинкции $7.5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (в расчете на один гем).

Определение метгемоглобина. Из суспензии эритроцитов гематокрита 0,8-4% осторожно перемешиваемой на магнитной мешалке при температуре 37 °С, отбирали аликвоту по 0.4 мл, к которым добавляли 1.4 мл., дистиллированной воды, выдерживали в течение 1 мин., до завершения гемолиза и измеряли оптическое поглощение при 630 нм. Концентрацию метгемоглобина (в расчете на один гем) определяли по формуле:

$$[\text{HbFe}^{3+}] = \frac{\Delta A_{630}}{\varepsilon_{\text{met}} - \varepsilon_{\text{oxy}}} \times d \quad (2)$$

где ΔA_{630} – прирост оптического поглощения образца при 630 нм относительно контроля без Б-ТНКЖ; $\varepsilon_{\text{met}} = 3.8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ и $\varepsilon_{\text{oxy}} = 0.11 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ – коэффициенты экстинкции метгемоглобина и оксигемоглобина соответственно при 630 нм, соответственно; d – коэффициент разбавления в кювете.

Анализ кинетики образования метгемоглобина. Экспериментальные значения концентраций внутриэритроцитарного метгемоглобина в зависимости от времени аппроксимировали, используя экспоненциальную функцию вида $y = Ae^{-k_{\text{эф}}t} + y_0$. Определяемую при этом величину эффективной константы скорости первого порядка $k_{\text{эф}}$ использовали в качестве характеристики NO-донирующей способности Б-ТНКЖ.

Коэффициенты распределения в системе октанол-вода. Величины $\log P_{o-w}$ определяли с помощью программы ALOGPS 2.1 [6].

В третьей главе представлены результаты исследований гемолиза эритроцитов под действием Б-ТНКЖ. Установлено, что пять из шести изученных комплексов, при добавлении к 0.2%-ной суспензии эритроцитов, показали гемолитический эффект (рисунок 2). В левой части рисунка показаны кинетические кривые гемолиза эритроцитов при различных концентрациях комплекса. Видно, что для всех Б-ТНКЖ гемолитический эффект наблюдается в одной и той же области концентраций порядка 10^{-5} М. Гемолитическую активность комплекса в каждом опыте характеризовали временем достижения 10% уровня гемолиза (период индукции гемолиза, I_{10}). Зависимости величин I_{10} от концентрации Б-ТНКЖ, показанные в правых ячейках на рисунок 2, имеют характерный вид «затухающей экспоненты» (точки аппроксимированы экспоненциальной кривой вида $y = Ae^{-kx} + y_0$). Вышесказанное приводит к предположению о едином механизме гемолитического действия пяти данных комплексов, согласно которому источником гемолитической активности Б-ТНКЖ является выделяемый ими в раствор оксид азота. В пользу этого предположения свидетельствует то, что гемолитическая активность свежеприготовленного раствора Б-ТНКЖ снижается в течение 1,5 часов вплоть до практически полного исчезновения. Это согласуется с известными данными о непрерывном снижении концентрации NO в растворе Б-ТНКЖ вследствие его испарения с поверхности и окисления растворенным в воде кислородом.

Один из исследованных нами комплексов, ПЕН, не показал никакого гемолитического действия в диапазоне концентраций 10^{-6} - 10^{-4} М.

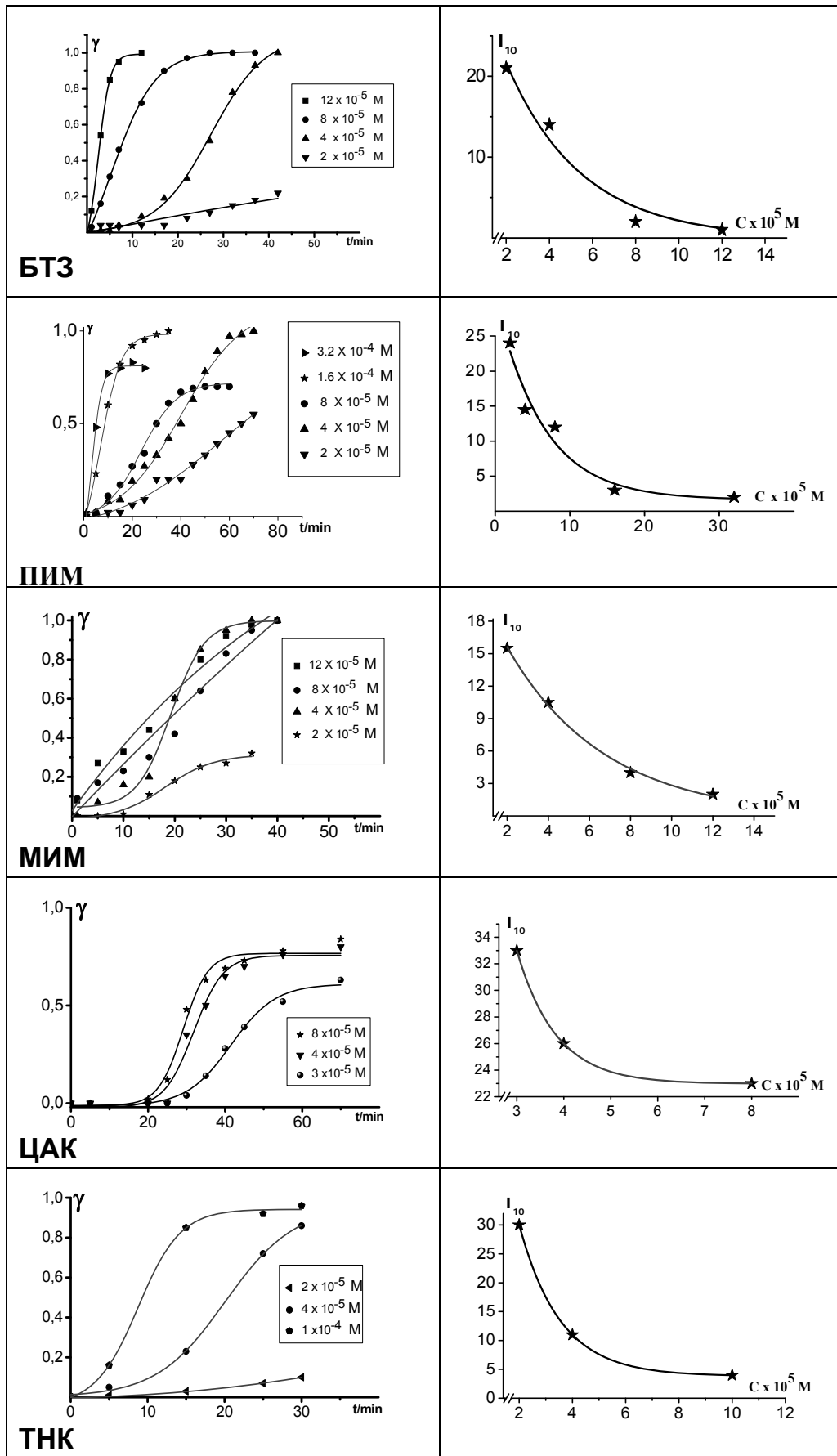


Рисунок 2 - Гемолиз эритроцитов под действием Б-ТНКЖ.

Для сравнения гемолитической активности исследуемых Б-ТНКЖ между собой мы определили величины I_{10} для каждого комплекса при одной концентрации - 4×10^{-5} М (таблица 1). Сопоставление величин периодов индукции показывает, что данные величины для четырех их шести исследованных соединений, ПИМ, МИМ, БТЗ, ТНКЖ достаточно близки. На фоне этих комплексов выделяется ЦАК, отличающийся самым длительным периодом индукции, превышающим этот показатель для других комплексов в среднем в 2-3 раза.

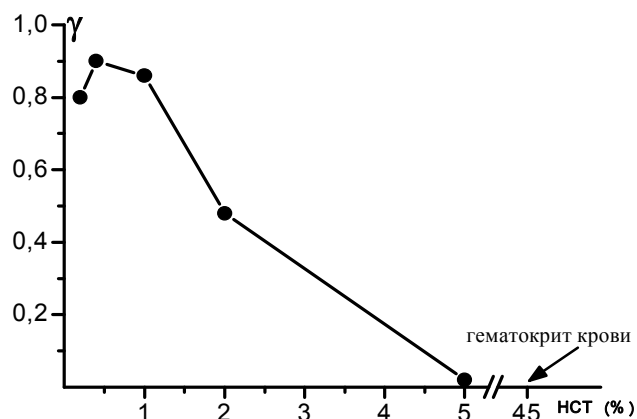
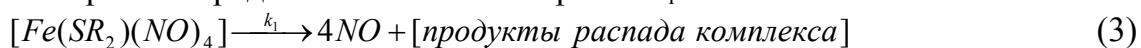


Рисунок 3 - Зависимость степени гемолиза от гематокрита (ТНК – 10^{-4} М, 37 °С, время инкубации – 18 минут).

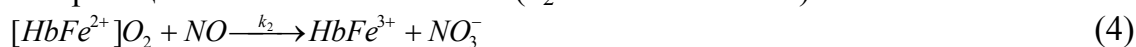
Важно было установить, как гемолитическая активность комплексов зависит от гематокрита суспензии. Результаты такого эксперимента показаны на рис. 3. Как видно из рисунка, с увеличением гематокрита суспензии гемолитический эффект ТНК резко снижается и начиная с 5% гематокрита не регистрируется вовсе. Стрелка на рисунке указывает на величину гематокрита цельной крови. Она составляет 45%, тогда как гематокрит суспензий, используемых в наших экспериментах составляет 0,2 %. Видно, что гемолитическое действие Б-ТНКЖ обнаруживается только на очень разбавленных суспензиях эритроцитов. Следовательно, нет оснований говорить о неблагоприятном токсикологическом прогнозе в отношении системы кровообращения при возможном практическом использовании Б-ТНКЖ. Вместе с тем представляло несомненный интерес дальнейшее изучение механизма, лежащего в основе гемолитического действия Б-ТНКЖ.

Четвертая глава работы посвящена изучению взаимодействия оксида азота с суспензией эритроцитов. В ходе проведения гемолитических экспериментов наблюдалось изменение окраски суспензии, что указывало на химические изменения в системе. Спектрофотометрическое исследование гемолизата выявляет характерную качественную картину спектральных изменений, происходящих при окислении оксигемоглобина в метгемоглобин: уменьшение двух пиков оксигемоглобина в области 500-600 нм и одновременное появление «плеча» метгемоглобина в области 630 нм. С учетом литературных данных, была сформулирована химическая (стехиометрическая) модель процессов, протекающих при разложении Б-ТНКЖ в суспензии эритроцитов, которая может быть представлена в виде двух последовательно протекающих реакций.

1. Самопроизвольный распад Б-ТНКЖ с донированием оксида азота протекает по уравнению первого порядка с константой скорости $k_1 \sim 10^{-3} \text{ с}^{-1}$:



2. Оксид азота, поступающий внутрь эритроцита путем диффузии, быстро окисляется в реакции с оксигемоглобином ($k_2 = 3,7 \cdot 10^7 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$):



В эксперименте измерялась концентрация конечного продукта второй реакции, метгемоглобина ($HbFe^{3+}$). Медленная первая стадия будет лимитировать скорость всего процесса. Поэтому эффективная константа скорости образования метгемоглобина ($k_{эф}$),

будет количественно характеризовать скорость разложения комплекса, т.е. служить оценкой NO-донирующей способности Б-ТНКЖ.

Окисление внутриэритроцитарного оксигемоглобина под действием Б-ТНКЖ. По увеличению оптического поглощения при 630 нм мы исследовали кинетику образования метгемоглобина внутри эритроцитов под действием Б-ТНКЖ (рисунок 4). Анализ полученных данных показал, что кинетика образования метгемоглобина хорошо описывается уравнением:

$$y = A \cdot e^{-k_{\text{эф}} t} + y_0 \quad (5)$$

где y – концентрация метгемоглобина, t – время, A , y_0 и $k_{\text{эф}}$ параметры.

На рисунке 4 показаны кинетические кривые, полученные при аппроксимации экспериментальных значений концентраций метгемоглобина по уравнению 5. Для каждого из изученных Б-ТНКЖ были определены эффективные константы скорости образования метгемоглобина первого порядка $k_{\text{эф}}$, (таблица 1) которые, как показано выше, могут служить количественной оценкой NO-донирующей способности Б-ТНКЖ.

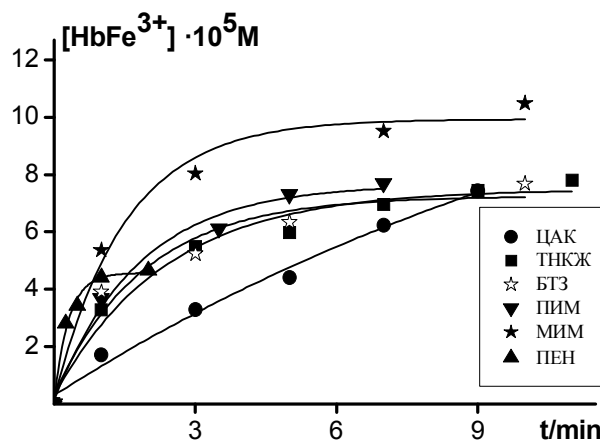


Рисунок 4 - Кинетика образования метгемоглобина под действием Б-ТНКЖ. (Hb - $2 \cdot 10^{-4}$ М, ПЕН - $2 \cdot 10^{-5}$ М, остальные Б-ТНКЖ - $1.2 \cdot 10^{-4}$ М).

Сопоставление представленных в таблице 1 характеристик гемолитической активности (I_{10}) и NO-донирующей способности Б-ТНКЖ ($k_{\text{эф}}$) не позволяет выявить какого-либо однозначного соотношения между уровнями NO-донирования и гемолитическими эффектами Б-ТНКЖ. Скорее всего, причиной этого является сложный характер биохимических процессов, в которые вовлекается оксид азота, попадая внутрь эритроцита. При этом бросается в глаза тот факт, что у самого эффективного донора NO, ПЕН полностью отсутствует гемолитическая активность.

Биохимическая трансформация оксида азота внутри эритроцита. На рис. 5 представлена составленная нами с учетом литературных данных схема превращений оксида азота в эритроците. В результате распада Б-ТНКЖ в раствор выделяется оксид азота (реакция I), который легко диффундирует внутрь клетки, где вступает в реакцию с оксигемоглобином (реакция II).

Характерной особенностью эритроцита, отличающей его от других клеток, является то, что в нем существует невысокий, но относительно постоянный уровень генерации супероксида, который непрерывно образуется в реакции автоокисления оксигемоглобина (реакция III). Как известно, одновременное присутствие в среде оксида азота и супероксидного анион-радикала приводит к образованию пероксинитрита (реакция IV).

Таблица 1 – Гемолитическая активность и NO-донирующая способность Б-ТНКЖ.

Б-ТНКЖ	I_{10} , мин	$k_{\text{эф}} \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$
ЦАК	25	1.2 ± 0.8
ТНК	10.5	7.0 ± 1.5
ПИМ	14	9.6 ± 1.7
МИМ	9	11 ± 2.5
БТЗ	3	8.6 ± 3.5
ПЕН	-	55 ± 9

Пероксинитрит, согласно современным представлениям, является основным источником цитотоксичности, связанной с оксидом азота. Наличие в эритроцитах постоянного источника генерации супероксида и прямые данные о гемолитическом действии синтетического пероксинитрита [7] позволяют предположить, что именно пероксинитрит выступает в качестве непосредственного химического индуктора гемолитического процесса в эритроцитах. Как видно из схемы, скорость образования пероксинитрита (реакция IV) должна зависеть от соотношения скоростей реакций (II) и (III), имеющих в качестве общего исходного реагента оксигемоглобин. В результате такой конкуренции скорость генерации пероксинитрита в клетке будет меняться сложным образом, как во времени, так и в зависимости от начальных условий.

Кинетическое моделирование генерации пероксинитрита. С целью проверки предложенной выше схемы генерации пероксинитрита (рисунок 5) в условиях наших гемолитических экспериментов было проведено численное исследование системы дифференциальных уравнений, моделирующих скорости процессов, протекающих в системе. Константы скоростей были взяты из литературных источников, концентрации реагентов были как в экспериментах. Расчетные кривые образования пероксинитрита при возрастающих концентрациях Б-ТНКЖ показаны на рисунке 6А. Анализ результатов моделирования приводит к следующим выводам:

1. За время счетного эксперимента (2500 с) достигаются значительные уровни пероксинитрита (до 160 μM), совпадающие с областью концентраций, при которых, по литературным данным, вызывал гемолитический синтетический пероксинитрит [6].

2. Моделирование позволило получить количественную интерпретацию влияния эффекта конкуренции реакций II и III (рисунок 5) на накопление пероксинитрита в клетке. Видно, что при малых концентрациях донора пероксинитрит накапливается более эффективно (кривые 1-3). С ростом концентрации донора

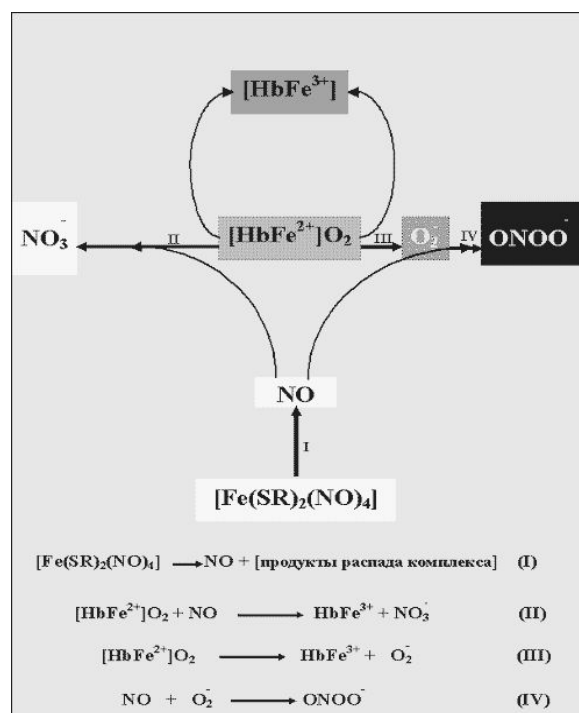


Рисунок 5 – Схема генерации пероксинитрита в эритроцитах.

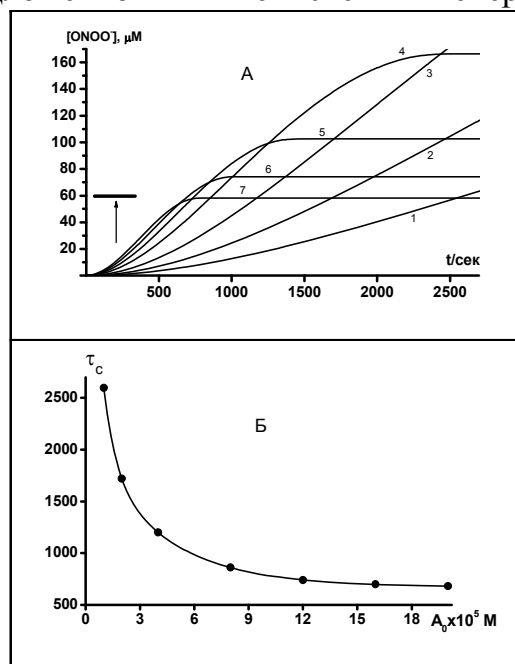


Рисунок 6 А - Расчетные кинетические кривые образования пероксинитрита ($k_{\text{don}}=4 \cdot 10^{-3} \text{ c}^{-1}$). Нач. концентрации Б-ТНКЖ: $A_0 \cdot 10^5$: 1(1), 2(2), 4(3), 8(4), 12(5), 16(6), 20(7). **Б** – Зависимость времени достижения уровня 60 μM (τ_c) от нач. концентрации Б-ТНКЖ.

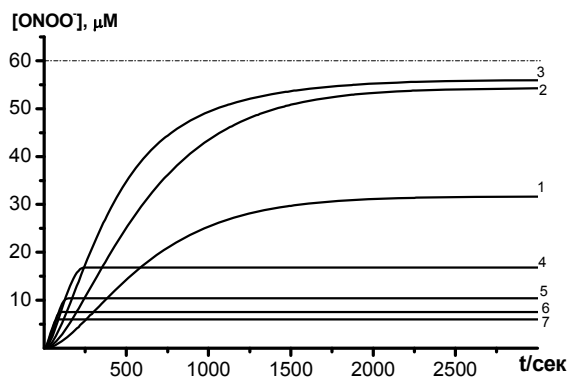


Рисунок 7 - Расчетные кинетические кривые пероксинитрита ($k_{don}=3 \cdot 10^{-3} \text{с}^{-1}$) Начальные концентрации Б-ТНКЖ: $A_0 \cdot 10^5$: 1(1), 2(2), 4(3), 8(4), 12(5), 16(6), 20(7).

скорости генерации оксида азота, все кривые при том же наборе величин A_0 успевают достичь своих предельных значений (рисунок 7). Причем в этом случае ни одна из кривых не достигает ранее обозначенного порогового уровня в $60 \mu\text{M}$. Это означает, что в присутствии Б-ТНКЖ с большой константой донирования NO гемолиз может не наблюдаться. Именно такая ситуация, скорее всего, имеет место в случае комплекса ПЕН, обладающего, в сравнении с остальными Б-ТНКЖ, значительно более высокой константой скорости NO-донирования (таблица 1). Как мы помним, ПЕН, в отличие от всех остальных Б-ТНКЖ, не вызывал в наших экспериментах гемолиза эритроцитов.

Предполагаемый молекулярный механизм гемолиза. С учетом того, что действие многих цитотоксических эфферторов включает стадию активации пероксидного окисления липидов (ПОЛ), мы провели сравнение действия на эритроциты Б-ТНКЖ и известного инициатора ПОЛ третбутилгидропероксида (t-BuOON).

Были изучены зависимости скорости гемолиза под действием Б-ТНКЖ (на примере ТНК) и t-BuOON от температуры. Представление полученных данных в координатах Аррениуса (рисунок 8) выявило значительное различие в энергиях активации гемолиза (тангенсы углов наклона графиков). Это может указывать на различие в механизмах гемолиза в этих двух случаях.

Было проведено также прямое определение продуктов ПОЛ в эритроцитах с помощью ТБК-теста. На рисунке 9 видно, что t-BuOON показывает характерное для него концентрационнозависимое нарастание уровня ТБК-реактивных продуктов. В случае комплексов ТНК и ЦАК образования ТБК-реактивных продуктов не регистрируется.

На основе полученных результатов был сделан вывод, что под действием изученных Б-ТНКЖ в условиях нашего эксперимента не происходит активации пероксидного окисления липидов эритроцитарной мембраны. С этим выводом согласуются также результаты Kondo и соавторов, которые исследовали гемолиз эритроцитов под действием синтетического пероксинитрита [6]. В

образование пероксинитрита выходит на градуально понижающиеся предельные уровни (кривые 4-7) из-за израсходования оксигемоглобина.

3. Модельная зависимость времени достижения условно принятого порога гемолиза в $60 \mu\text{M}$ пероксинитрита от начальной концентрации донора (рисунок 6Б) качественно соответствует полученным в экспериментах зависимостям периода индукции гемолиза от начальной концентрации Б-ТНКЖ (рисунок 2, правые ячейки).

Моделирование показало также, что при увеличении на порядок константы

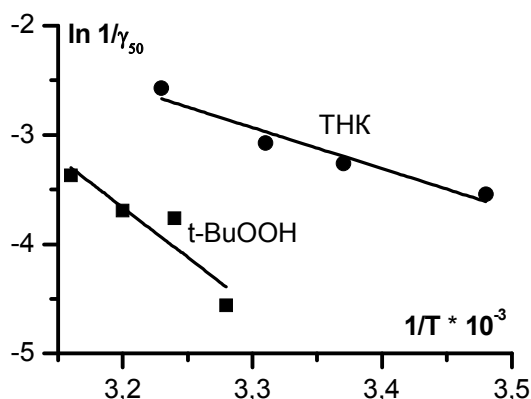


Рисунок 8 - Взаимосвязь между скоростью гемолиза и обратной температурой.

результаты Kondo и соавторов, которые исследовали гемолиз эритроцитов под действием синтетического пероксинитрита [6]. В

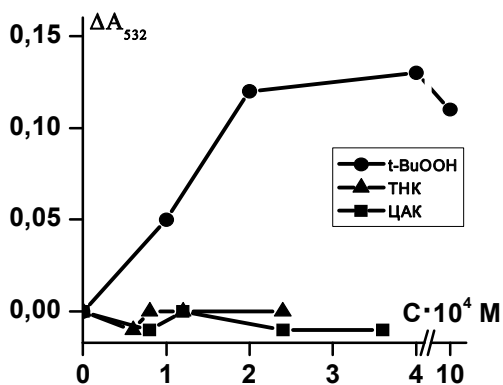


Рисунок 9 - Образование ТБК-реактивных продуктов в эритроцитах под действием Б-ТНКЖ и t-BuOOH.

которой должно приводить к гемолизу в результате нарушения коллоидно-осмотического равновесия в эритроците.

Заключительная **пятая глава** диссертации посвящена исследованию влияния клеточной среды на NO-донирующую способность Б-ТНКЖ. В ней представлены результаты двух серий кинетических экспериментов по исследованию кинетики образования внутриэритроцитарного метгемоглобина под действием Б-ТНКЖ. В первой серии экспериментов варьировали величину гематокрита суспензии (объемное процентное содержание клеток) при неизменной концентрации комплекса. Во второй серии варьировали концентрацию комплекса, сохраняя гематокрит неизменным. На рис. 10 в левых ячейках показаны кинетические кривые образования внутриэритроцитарного метгемоглобина под действием четырех Б-ТНКЖ в суспензиях различного гематокрита. За стандартное время эксперимента (15-17 минут), с учетом начальной концентрации Б-ТНКЖ и стехиометрии процесса, из комплексов выделяется приблизительно четвертая часть имеющихся NO-групп (стехиометрический предел выделения NO-групп – 48×10^{-5} М). Для каждой из кинетических кривых была определена эффективная константа скорости первого порядка ($k_{эф}$), которая, как установлено нами ранее, может служить характеристикой NO-донирующей способности комплекса. При этом оказалось, что полученные значения $k_{эф}$ монотонно снижались с ростом гематокрита (рисунок 10, правые ячейки). Во второй серии экспериментов наблюдалась обратная картина: с ростом концентрации комплекса значение $k_{эф}$ монотонно увеличивались.

Известно, что распад Б-ТНКЖ в водной среде с выделением NO происходит с участием молекул воды, проникающих в лигандную сферу железа, т.е. может быть определен по механизму как гидролитическая диссоциация. Наблюдаемый нами характерный «дрейф» $k_{эф}$ в противоположных направлениях может быть объяснен исходя из предположения, что при попадании в клеточную суспензию часть молекул комплекса связывается с эритроцитарной мембраной. Связывание, понимаемое либо как адсорбция на поверхности, либо как частичное или полное погружение внутрь липидного бислоя мембраны всегда будет в той или иной степени ограничивать контакт комплекса с водной средой. Последнее должно замедлять диссоциацию комплекса, т.е. приводить к снижению NO-донирующей способности Б-ТНКЖ в присутствии эритроцитов. Таким образом, при попадании Б-ТНКЖ в суспензию эритроцитов в

их работе была продемонстрирована нечувствительность гемолитического процесса к действию антирадикальных ингибиторов и, наоборот, его высокая чувствительность к действию тиоловых антиоксидантов, таких как ацетилцистеин. С учетом вышесказанного мы пришли к заключению, что гемолитическое действие Б-ТНКЖ реализуется через известный для пероксинитрита механизм окисления сульфгидрильных групп в белках [7]. Одной из таких мишеней пероксинитрита является, по имеющимся данным, сульфгидрильная группа активного центра Na^+/K^+ -АТФазы [8], ингибирование

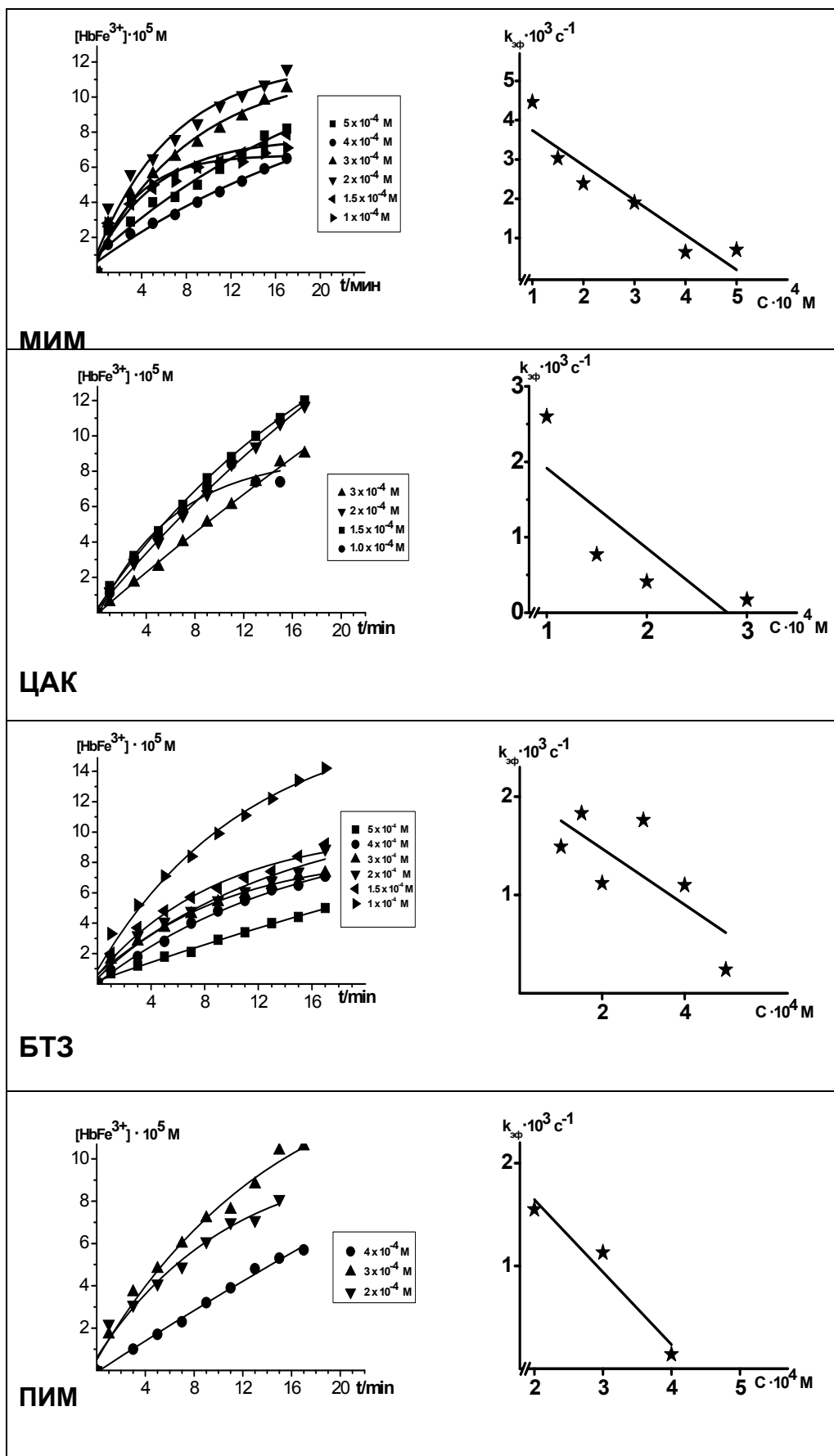


Рисунок 10 - Кинетика образования метгемоглобина под действием Б-ТНКЖ в суспензиях эритроцитов различного гематокрита (левые графики) и взаимосвязь между $k_{эф}$ и гематокритом (правые графики).

системе образуются, как минимум, два равновесных пула комплекса, водный и мембраносвязанный, которые будут обладать различной NO-донирующей способностью. В таком случае определяемая нами эффективная константа $k_{эф}$ будет возникать как комбинация индивидуальных констант, относящихся к каждому из пулов. При этом «дрейф» $k_{эф}$ будет обуславливаться изменением соотношения объемов указанных пулов, задаваемого условиями эксперимента.

Предложенный механизм можно проанализировать теоретически, опираясь на базовые положения теории мономолекулярной адсорбции Лэнгмюра. Исходя из предположений о равновесном характере связывания комплекса (X) с набором однотипных и независимых центров связывания на мембране эритроцита (P) было получено уравнение описывающее дрейф $k_{эф}$ в зависимости от концентрации свободных центров связывания:

$$k_{эф} = \frac{k_w - k_m}{K_a [P] + 1} + k_m \quad (6)$$

где k_w и k_m предельные значения $k_{эф}$ для водного и мембраносвязанного пулов комплекса, соответственно, K_a – константа связывания комплекса с мембраной. Графический вид данной зависимости показан на рисунке 11.

Полученный результат полностью согласуется с данными эксперимента. При увеличении числа свободных центров связывания значение константы $k_{эф}$ должно уменьшаться. Это наблюдается в первой серии экспериментов с увеличивающимся гематокритом. Во второй серии экспериментов с увеличивающейся начальной концентрацией комплекса при неизменном гематокрите концентрация центров незанятых комплексом снижается. Соответственно $k_{эф}$ должна возрастать, как это и происходит в эксперименте.

Один из пяти изученных нами комплексов, ПЕН, содержащий пеницилламиновые лиганды резко отличался по своим свойствам от всех остальных. На рисунке 12 показано образование метгемоглобина под действием ПЕН при возрастающем гематокрите суспензии. Видно, что процесс выделения NO полностью заканчивается в течение 0,5-1 минуты. Пунктирной линией показан стехиометрический предел выделения NO. Как видим, за это время выделяется практически весь оксид азота. При этом, увеличение гематокрита в этом случае не влияло на скорость выделения NO из комплекса ПЕН.

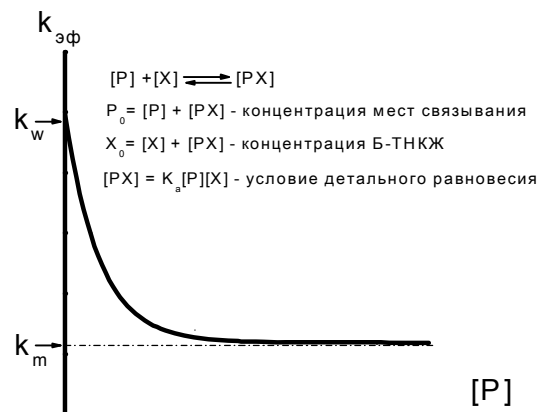


Рисунок 11 – Теоретически ожидаемая зависимость $k_{эф}$ от концентрации свободных центров связывания.

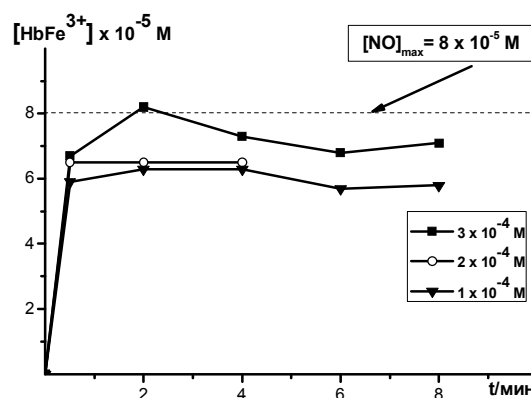


Рисунок 12 - Образование метгемоглобина под действием ПЕН в суспензиях эритроцитов с различным уровнем гематокрита.

Оценка липофильности лигандов. Чтобы проанализировать тенденцию к связыванию Б-ТНКЖ с липидной фазой биомембран мы теоретически рассчитали величины логарифмов коэффициентов распределения в системе октанол-вода для лигандов, входящих в состав исследуемых комплексов, используя программу ALOGPS 2.1 [9] (таблица 2). Видно, что лиганды, входящие в состав МИМ, ПИМ и БТЗ – гидрофобны, цистеамин, входящий в состав ЦАК – амфифиллен. Высокой растворимостью в воде обладает лишь один из изученных лигандов, пеницилламин, входящий в состав ПЕН. Его растворимость в воде примерно в 50 раз превышает растворимость в октаноле. В то же время, как было указано выше, NO-донирующая способность как раз этого комплекса, в отличие от всех остальных, не зависит от гематокрита суспензии. Можно полагать, что причиной этого является высокий уровень гидратации ПЕН в водной среде, препятствующей его связыванию с поверхностью клеток. В то же время комплексы МИМ, ЦАК, БТЗ, ПИМ, включающие липофильные лиганды могут в той или иной степени связываться с мембраной клеток, что с неизбежностью будет ограничивать их контакт с водной средой.

Влияние фактора липофильности лиганда на NO-донирующую способность соответствующего комплекса следует учитывать при прогнозе фармакологической активности Б-ТНКЖ. Важно отметить, что подобная зависимость NO-донирующей способности химического донора от среды инкубации может считаться уникальной особенностью данного класса доноров NO, которая непосредственно связана с механизмом донирования NO, основанном на гидролитической диссоциации комплекса.

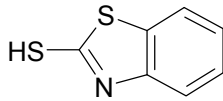
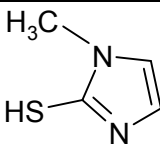
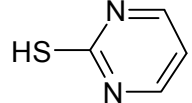
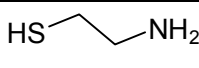
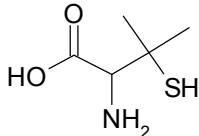
ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фармакологический эффект экзогенных доноров оксида азота в отношении сердечно-сосудистой системы реализуется, как известно, в кровеносных сосудах, клеточное содержимое которых на 90 процентов состоит из эритроцитов. Именно это обстоятельство определило цель данной работы – исследовать взаимодействие представителей нового класса доноров NO с эритроцитами в модельных экспериментах *in vitro*. Согласно полученным нами результатам,

можно выделить два уровня такого взаимодействия: химический, при котором с эритроцитом взаимодействует свободный оксид азота и физико-химический, когда Б-ТНКЖ выступает как отдельная химическая структура.

В первом случае в результате биохимической трансформации оксида азота внутри эритроцита образуется пероксинитрит, который способен индуцировать гемолиз

Таблица 2 - Коэффициенты распределения S-лигандов в системе октанол-вода.

Б-ТНКЖ	Лиганд	lg P _{o-w}
БТЗ	 2-меркаптобензтиазол	2,37
МИМ	 1-метил-2-меркапто-имидазол	0,50
ПИМ	 2-меркаптопиримидин	0,45
ЦАК	 цистеамин	0.01
ПЕН	 пеницилламин	- 1.70

эритроцитов. Гемолитическое действие Б-ТНКЖ наблюдается только на сильно разбавленных суспензиях эритроцитов, что не должно создавать непосредственных токсикологических ограничений при их однократном применении *in vivo*. Вместе с тем, влияние данного фактора на токсикологическую безопасность Б-ТНКЖ в условиях их многократного введения в организм требует дополнительного изучения.

Во втором случае Б-ТНКЖ выступает уже не как функция донирования NO групп, а как самостоятельная химическая структура. Из полученных результатов следует важный в практическом отношении вывод: NO-донирующая способность Б-ТНКЖ зависит не только от структурно-химических характеристик комплекса, но и от физико-химических взаимодействий комплекса с компонентами биологической среды. При этом NO-донирующая способность Б-ТНКЖ зависит как от присутствия в среде центров связывания комплекса, так и от величины сродства Б-ТНКЖ к указанным центрам, на которое влияет уровень липофильности S-лигандов. Учет влияния фактора липофильности лиганда позволит прогнозировать степень влияния среды на фармакологическую активность Б-ТНКЖ и на этой основе оптимизировать базовую структуру Б-ТНКЖ с учетом конкретного объекта фармакологического воздействия.

ВЫВОДЫ

1. Биядерные тетранитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами могут вызывать концентрационнозависимый гемолиз разбавленных суспензий эритроцитов.
2. Источником гемолитической активности Б-ТНКЖ является оксид азота, а непосредственным химическим индуктором гемолиза - продукт биохимической трансформации оксида азота внутри эритроцитов – пероксинитрит, вызывающий, по-видимому, окислительную модификацию сульфгидрильных центров клетки.
3. В присутствии эритроцитов в системе образуется дополнительный равновесный пул мембраносвязанного комплекса, характеризующийся пониженной скоростью гидролитической диссоциации из-за ограничения контакта с водной средой. NO-донирующая способность Б-ТНКЖ в этом случае зависит от соотношения равновесных концентраций свободного и мембраносвязанного комплекса.
4. Уровень липофильности S-лигандов может оказывать влияние на NO-донирующую способность Б-ТНКЖ в биологических средах. Это открывает возможности для целенаправленной оптимизации базовой структуры донора NO на основе Б-ТНКЖ с учетом объекта фармакологического воздействия.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Нешев, Н. И. Кинетические закономерности гемолиза эритроцитов и окисления гемоглобина под действием сера-нитрозильных комплексов железа - доноров оксида азота / Н. И. Нешев, Б. Л. Психа, **Е. М. Соколова**, Н. А. Санина, Т. Н. Руднева, С. В. Блохина // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2010. - № 12. - С. 2160-2163.
2. Нешев, Н. И. Влияние липофильности лигандов на NO-донирующую способность биядерных тетранитрозильных комплексов железа в суспензии эритроцитов / Н. И. Нешев, **Е. М. Соколова**, Б. Л. Психа, Н. А. Санина, Т. Н. Руднева // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2014. - № 9. - С. 2020-2025.
3. Нешев, Н. И. Донирование оксида азота биядерными тетранитрозильными комплексами железа в присутствии эритроцитов / Н. И. Нешев, **Е. М. Соколова**, Б. Л. Психа, Т. Н. Руднева, Н. А. Санина // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2016. - №3. – С. 779-783.
4. **Sokolova, E. M.** Hemolysis of Erythrocytes under Exposure to Sulfur Nitrosyl Iron Complexes: Nitric Oxide Donors / E. M. Sokolova, T. N. Rudneva, N. I. Neshev, B. L. Psikha, N. A. Sanina, S. V. Blokhina // Journal of Characterization and Development of Novel Materials. – 2011. - Vol. 3. - No. 3-4. – P. 41 – 45. ISSN 1937-7975.
5. **Соколова, Е. М.** Эритроцитарная модель цитотоксичности оксида азота / Е. М. Соколова // Вестник молодых ученых ИВГУ. – 2011. - №11. - С. 40-42.
6. **Sokolova, E. M.** Hemolysis of erythrocytes under exposure to sulfur nitrosyl iron complexes – nitric oxide donors / E. M. Sokolova, T. N. Rudneva, N. I. Neshev, B. L. Psikha, N. A. Sanina, S. V. Blokhina // In «Kinetics, Catalysis and Mechanism of Chemical Reactions»: From Pure to Applied Science Volume 2. – Tomorrow and Perspectives. - N.-Y.: Nova Science Publishers, Inc., 2012. - P. 173-178. ISBN: 9781614707127.
7. **Sokolova, E. M.** Hemolysis of Erythrocytes under Exposure to Sulfur Nitrosyl Iron Complexes: Nitric Oxide Donors / E. M. Sokolova, T. N. Rudneva, N. I. Neshev, B. L. Psikha, N. A. Sanina, S. V. Blokhina // In “Progress in Organic and Physical Chemistry: Structures and Mechanisms”. - Oakville, Ontario (Canada): «Apple Academic Press», 2013. - P. 131-137. ISBN: 9781926895406.
8. **Соколова, Е. М.** Кинетика донирования оксида азота биядерными нитрозильными комплексами железа с тиолсодержащими лигандами / Е. М. Соколова, Т. Н. Руднева, Н. И. Нешев, Б. Л. Психа, Н. А. Санина // Структура и динамика молекулярных систем: сборник статей XIX Всероссийской молодежной конференции. 25 – 30 июня 2012 г., Марий Эл, пансионат «Яльчик». – М.: ИФХЭ РАН, 2012. – Т.2. - С. 95-99.
9. **Соколова, Е. М.** Гемолиз эритроцитов под действием сера-нитрозильных комплексов железа – доноров оксида азота / Е. М. Соколова, Т. Н. Руднева, Н. И. Нешев, Б. Л. Психа, Н. А. Санина, С. В. Блохина // Биохимическая физика: сборник трудов X ежегодной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы. 8 - 10 ноября 2010 г., Москва. – Москва, 2011. - С. 219-223.
10. **Соколова, Е. М.** Кинетические закономерности и механизм гемолиза эритроцитов под действием сера-нитрозильных комплексов железа-доноров оксида азота / Е. М.

- Соколова, Т. Н. Руднева, Н. И. Нешев, Б. Л. Психа, Н. А. Санина, С. В. Блохина // Биохимическая физика: сборник трудов XI ежегодной международной молодежной конференции ИБХФ РАН-Вузы. 9 – 11 ноября 2011 г., Москва – М.: РУДН, 2012. - С. 255-258.
11. **Соколова, Е. М.** О механизме разложения биядерных нитрозильных комплексов железа в суспензии эритроцитов. / Е. М. Соколова, Т. Н. Руднева, Н. И. Нешев, Б. Л. Психа, Н. А. Санина, С. В. Блохина // Биохимическая физика: сборник трудов XII ежегодной международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы. 29 – 31 октября 2012 г., Москва. – М.: РУДН, 2012. - С. 165-169.
 12. **Соколова, Е. М.** Донирование оксида азота биядерными динитрозильными комплексами железа с тиолсодержащими лигандами в присутствии эритроцитов / Е. М. Соколова, Т. Н. Руднева, Н. И. Нешев, Б. Л. Психа, Н. А. Санина, С. В. Блохина // Биохимическая физика: сборник трудов XIII ежегодной международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы. 28-30 октября 2013 г., Москва. – М.: РУДН, 2013. - С. 206-210.
 13. Roudneva, T. N. Kinetic regularities of hemoglobin oxidation and hemolysis of erythrocytes under exposure to nitric oxide donors / T. N. Roudneva, N. I. Neshev, B. L. Psikha, N. A. Sanina, **E. M. Sokolova** // The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Application of Nitric Oxide. June 14-18, 2010. - Kyoto, Japan. Abstracts. Nitric Oxide. – V. 22, Suppl. – P. 63.
 14. Нешев, Н. И. Гемолитическая активность NO-доноров в разбавленной суспензии эритроцитов / Н. И. Нешев, **Е. М. Соколова**, Б. Л. Психа, Н. А. Санина, Т. Н. Руднева, С. В. Блохина // Биоантиоксидант: сборник тезисов VIII международной конференции. 4 - 6 октября 2010 г., Москва. – М.: РУДН, 2010. - С. 329.
 15. **Соколова, Е. М.** Пероксинитритзависимый гемолиз эритроцитов под действием сера-нитрозильных комплексов железа / Е. М. Соколова, Т. Н. Руднева, Н. И. Нешев, Б. Л. Психа, Н. А. Санина, С. В. Блохина // Успехи химической физики: сборник тезисов Всероссийской молодежной конференции. 21 – 23 июня 2011., Черногоровка. – Черногоровка: ИПХФ, 2011. - С. 212.
 16. Нешев, Н. И. Пероксинитритзависимая гемолитическая активность доноров оксида азота / Н. И. Нешев, **Е. М. Соколова**, Б. Л. Психа, Н. А. Санина, Т. Н. Руднева, С. В. Блохина // Активные формы кислорода, оксида азота, антиоксиданты и здоровье человека: сборник тезисов VII национальной научно-практической конференции с международным участием. 14 – 18 сентября 2011 г., Смоленск. – Смоленск, 2011. - С. 191.
 17. **Соколова, Е. М.** NO – донирующая способность синтетических нитрозильных комплексов железа в суспензии эритроцитов с разным уровнем гематокрита / Е. М. Соколова, Т. Н. Руднева, Н. И. Нешев, Б. Л. Психа, Н. А. Санина // Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии: сборник тезисов XXV Международной зимней молодежной научной школы. 11-15 февраля 2013 г., Москва. – М.: ИБХ, 2013. - С. 80.
 18. **Соколова, Е. М.** Влияние липофильности лигандов на NO-донирующую способность биядерных нитрозильных комплексов железа в суспензии эритроцитов / Е. М. Соколова, Т. Н. Руднева, Н. И. Нешев, Б. Л. Психа, Н. А. Санина, С. В. Блохина // Успехи химической физики: сборник тезисов II

Всероссийской молодежной конференции. 19 – 24 мая 2013 г., Черногоровка. – М.: Граница, 2013. - С. 185.

19. Нешев, Н. И. NO-донирующая способность биядерных динитрозильных комплексов железа с тиолсодержащими лигандами в суспензии эритроцитов / Н. И. Нешев, **Е. М. Соколова**, Б. Л. Психа, Н. А. Санина, Т. Н. Руднева // Активные формы кислорода, оксида азота, антиоксиданты и здоровье человека: сборник тезисов VIII национальной научно-практической конференции с международным участием. 25-29 мая 2014 г., Смоленск. – Смоленск, 2014. - С. 147-148.

ЦИТИРУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Münzel, T. Nitrate therapy: new aspects concerning molecular action and tolerance / A. Daiber, T. Gori // *Circulation*. - 2011. – V. 123. – P. 2132-2144.
2. Граник, В. Г. Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарств / В. Г. Граник, Н. Б. Григорьев. - Москва: Вузовская книга, 2004. – 360 с.
3. Санина, Н. А. Строение и свойства нитрозильных комплексов железа с функциональными серосодержащими лигандами / Н. А. Санина, С. М. Алдошин // *Изв. РАН, сер., хим.* - 2011 - № 7 – С. 1199.
4. Liu, X. Diffusion-limited Reaction of Free Nitric Oxide with Erythrocytes / X. Liu, M. J. S. Miller, M. S. Joshi, H. Sadowska-Krowicka, D. A. Clark, J. R. Lancaster // *J. Biol. Chem.* – 1998. – V. 273. – P. 18709-18713.
5. Butler, A. R. Diffusion of nitric oxide and scavenging by blood in the vasculature / A. R. Butler, I. L. Megson, P. G. Wright // *Biochim. Biophys. Acta.*– 1998. – V. 1425. - P. 168–176.
6. Kondo, H. Peroxynitrite-induced hemolysis of human erythrocytes and its inhibition by antioxidants / H. Kondo, M. Takahashi, E. Niki // *FEBS Letters*. – 1997. – V. 413. – P. 236 – 238.
7. Radi, R. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide / R. Radi, J. S. Beckman, K. M. Bush, B. A. Freeman // *J. Biol. Chem.* – 1991a. - V. 266. – P. 4244–4250.
8. Muriel, P. Insights into the mechanism of erythrocyte Na⁺/K⁺-ATPase inhibition by nitric oxide and peroxynitrite anion / P. Muriel, G. Castaneda, M. Ortega, F. Noel // *J. Appl. Toxicol.* - 2003. – V. 23. – P. 275–278.
9. Tetko, I. V. Virtual computational chemistry laboratory – design and description / I. V. Tetko, J. Gasteiger, R. Todeschini, A. Mauri, D. Livingstone, P. Ertl, V. A. Palyulin, E. V. Radchenko, N. S. Zefirov, A. S. Makarenko, V. Y. Tanchuk, V. V. Prokopenko // *J. Comput. Aid. Mol. Des.* – 2005 – V. 19 – P. 453-463.