

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ ХИМИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

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

диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:

д.х.н. Психа Борис Львович
к.б.н. Нешев Николай Ильич

Черноголовка - 2016

Содержание

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОКСИД АЗОТА: СИГНАЛЬНЫЙ МЕССЕНДЖЕР И ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ АГЕНТ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	10
1.1. История открытия физиологической роли оксида азота.....	10
1.2. Физико-химические свойства NO, лежащие в основе его эволюционно закрепленных биологических функций.....	12
1.2.1. Высокая диффузионная способность	13
1.2.2. Высокая реакционная способность.....	14
1.2.3. Цитотоксичность.....	14
1.3. Образование оксида азота в организме.....	15
1.4. Сигнальный каскад оксида азота.....	17
1.4.1. Растворимая гуанилатциклаза и цГМФ.....	17
1.4.2. NO-зависимый механизм релаксации кровеносных сосудов.....	17
1.5. Цитотоксические свойства оксида азота. Пероксинитрит.....	20
1.5.1. Механизмы развития пероксинитритзависимой цитотоксичности.....	21
1.5.2. Биологические мишени пероксинитрита.....	23
1.5.3. Оксид азота в системе неспецифического иммунитета.....	25
1.6. Роль гемопротеидов в осуществлении сигнальной функции NO..	26
1.6.1. Гемоглобин как ловушка оксида азота.....	26
1.6.2. Пул эритроцитов как дренажная система.....	27
1.6.3. Представления об альтернативных гемоглобинзависимых механизмах NO-сигнализации.....	29
1.7. Доноры оксида азота как фармакологические эффекторы.....	31
1.7.1. Современные клинические средства с NO-донорной активностью	32
1.7.2. Новые классы доноров оксида азота.....	33
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	41
2.1. Химические реактивы и соединения.....	41
2.2. Приборы и оборудование	41
2.3. Доноры оксида азота.....	41
2.4. Получение эритроцитарной массы.....	43
2.5. Исследование кинетики гемолиза эритроцитов	43
2.6. Определение общего гемоглобина.....	44
2.7. Определение внутриэритроцитарного метгемоглобина.....	44

2.8. Анализ продуктов ПОЛ.....	45
ГЛАВА 3. ГЕМОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БИЯДЕРНЫХ ТЕТРАНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА.....	46
3.1. Феноменология и количественное описание кинетики гемолиза.....	46
3.2. Кинетические закономерности гемолиза эритроцитов под действием Б-ТНКЖ.....	48
3.3. Ослабление гемолитической активности раствора Б-ТНКЖ.....	52
3.4. Сравнительный анализ гемолитической активности Б-ТНКЖ.....	54
3.5. Зависимость гемолитического эффекта Б-ТНКЖ от гематокрита суспензии.....	56
3.6. Зависимость скорости гемолиза от температуры.....	57
3.7. Результаты ТБК-теста.....	59
3.8. Гемолитическая активность Б-ТНКЖ: предварительные итоги.....	61
ГЛАВА 4. ПЕРОКСИНИТРИТ КАК ХИМИЧЕСКИЙ ИНДУКТОР ГЕМОЛИЗА ЭРИТРОЦИТОВ.....	63
4.1. Эритроциты – Б-ТНКЖ: модель взаимодействия.....	63
4.2. Кинетические закономерности образования внутриэритроцитарного метгемоглобина под действием Б-ТНКЖ.....	64
4.3. Взаимосвязь между гемолитической активностью и NO-донирующей способностью Б-ТНКЖ.....	66
4.4. Биохимическая трансформация оксида азота в эритроците.....	67
4.5 Кинетическое моделирование генерации пероксинитрита в условиях гемолитического эксперимента.....	69
4.6. Гемолитическое действие синтетического пероксинитрита.....	76
4.7. Сульфгидрильные мишени пероксинитрита в эритроците.....	77
ГЛАВА 5. NO-ДОНИРУЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ БИЯДЕРНЫХ ТЕТРАНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА В ПРИСУТСТВИИ ЭРИТРОЦИТОВ.....	79
5.1. Влияние клеточной среды на скорость разложения Б-ТНКЖ.....	80
5.2. NO-донирующая способность ПЕН.....	82
5.3.Эффект «плавающей константы».....	84
5.4. Оценка липофильности лигандов.....	90
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	96
ВЫВОДЫ.....	97
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	98

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Установление роли оксида азота в качестве сигнального регулятора сердечнососудистой системы организма одновременно акцентировало внимание на его участии в возникновении многих сердечнососудистых 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 [136]. 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 Граника и Григорьева «Оксид азота (NO): новый путь к поиску лекарств» подробно рассмотрены 12 классов потенциальных химических прекурсоров оксида азота [5]. 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 азаетероциклических тиолов и алифатических тиоаминов. 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 [16]. 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 суспензий эритроцитов. Непосредственным индуктором гемолиза выступает, по-видимому, продукт биохимической трансформации оксида азота с участием оксигемоглобина – пероксинитрит.
- Впервые установлено, что 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 конкретной фармакологической мишени.

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 оригинальной методики. В ходе исследований было доказано, что определяемые экспериментально концентрации NO согласуются со стехиометрией процесса.

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 г.); 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 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 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.

Глава 1 Оксид азота: сигнальный мессенджер и цитотоксический агент

Оксид азота (II) или монооксид азота - это одно из пяти известных химии кислородных соединений азота. Однако за последние три десятилетия эта простая молекула (одна из десяти самых малых молекул в природе) приобрела исключительную значимость для биологии. В связи с этим это соединение получило в биологической научной литературе общепризнанное простое наименование - оксид азота.

1.1 История открытия физиологической роли оксида азота

До 1970 года оксид азота был известен как высокотоксичный загрязнитель окружающей среды [54]. Так, фотохимическая реакция NO с озоном приводит к разрушению озонового слоя атмосферы. Кроме того, попадающий в атмосферу NO способен превращаться в азотную кислоту, являющуюся составной частью кислотных дождей [182]. В то время единственным физиологическим эффектом NO считали его раздражающее действие на органы дыхания [28].

Исходным пунктом, который впоследствии привел к формированию современных представлений о физиологической роли NO в организме млекопитающих, стали исследования, выполненные в конце 1970 годов прошлого века под руководством Феррида Мюрада. Было обнаружено, что нитровазодилататоры и NO активируют гуанилатциклазу, что приводит к увеличению образования циклического гуанозин 3', 5'-монофосфата (цГМФ) в гладких мышцах кровеносных сосудов [103, 29, 137]. Впоследствии группа исследователей под руководством Луиса Игнарро продемонстрировала, что активация гуанилатциклазы под действием оксида азота приводит к физиологическому эффекту - релаксации коронарной артерии [77]. Вскоре стало окончательно ясно, что сосудорасширяющие свойства всех нитровазодилататоров связаны с их способностью выделять оксид азота [90]. Примерно в то же самое время было обнаружено, что нитровазодилататоры и оксид азота помимо

расширения кровеносных сосудов способны ингибировать агрегацию тромбоцитов, активируя гуанилатциклазу, содержащуюся в тромбоцитах [125].

Вне всякой связи с указанными выше исследованиями, в 1980 году Ферчготт (Furchgott) и Завадски (Zawadzki) обнаружили, что клетки эндотелия кровеносных сосудов способны выделять легко диффундирующий химический фактор способный вызывать релаксацию кровеносных сосудов путем активации гуанилатциклазы [67]. Данный фактор в иностранной научной литературе получил название «endothelium-derived relaxing factor» (EDRF) (фактор релаксации, происходящий из эндотелия). EDRF быстро инактивировался в присутствии гемоглобина и различных агентов, генерирующих супероксидный анион радикал [78, 128]. Вскоре было показано, что EDRF способен активировать растворимую гуанилатциклазу в клетках гладких мышц [91], что приводит к увеличению уровня цГМФ [88]. Кроме того, была обнаружена способность EDRF ингибировать агрегацию тромбоцитов [32]. В конечном счете, было установлено, что EDRF обладает фармакологическими, биохимическими и химическими свойствами, полностью совпадающими со свойствами оксида азота [92, 93, 94, 143]. Тогда же выделение оксида азота клетками эндотелия, было уже прямо зарегистрировано с помощью хемилюминесцентного газового анализатора [129].

В идентификации NO в качестве биологически значимой молекулы важную роль сыграли также совершенно независимые от упомянутых выше работы Джона Хиббса (John Hibbs). Изучая противоопухолевую активность макрофагов, он обнаружил, что эта активность зависит от некоторого химического фактора, активно поглощаемого макрофагами из среды инкубации. Истощение среды по этому фактору приводило к полному ингибированию противоопухолевой активности. Поочередно добавляя к истощенной среде различные биохимические компоненты, Хиббс довольно быстро установил, что биохимическим фактором, от которого зависит активность макрофагов, является аминокислота L-аргинин [85, 86]. Вскоре было обнаружено продуцирование макрофагами оксида азота [180] и пероксинитрита [99]. Работы Хиббса открыли путь к пониманию

общеизвестного в настоящее время биохимического механизма синтеза NO в организме млекопитающих из L-аргинина [124, 130].

В работах Гартвайта (Garthwaite) и соавторов впервые было продемонстрировано образование NO в центральной нервной системе. Более того, оказалось, что при нормальных физиологических условиях клетки мозга продуцируют в 20 раз больше NO, чем вся кровеносная система в совокупности [68, 69].

В 1992 году в редакционной статье главного редактора журнала «Science» Даниэла Кошланда (Daniel Edward Koshland) оксид азота был назван молекулой года [113]. В 1998 году за открытие роли оксида азота как сигнальной молекулы в сердечно-сосудистой системе была присуждена Нобелевская премия в области физиологии и медицины. Нобелевскими лауреатами стали Роберт Ферчготт (Университет штата Нью-Йорк), Ферид Мьюрэд (Техасский университет в Хьюстоне) и Луис Игнаро (Калифорнийский университет в Лос-Анджелесе).

1.2 Физико-химические свойства NO, лежащие в основе его эволюционно закрепленных биологических функций

Эволюция закрепила за оксидом азота две важные биологические функции: *сигнального мессенджера*, и *цитотоксического эффектора*. В качестве сигнального мессенджера оксид азота через каскад биохимических реакций обеспечивает регуляцию различных физиологических процессов. Среди них наиболее известным и изученным является механизм паракринной регуляции кровообращения. В качестве цитотоксического эффектора оксид азота через посредство пероксинитрита участвует в работе системы неспецифической иммунной защиты. Две эти функции, сигнальная и цитотоксическая, относятся к различным областям жизнедеятельности многоклеточного организма. Поэтому кажется неожиданным, что для их реализации была использована одна и та же простая молекула. Это можно понять, однако, если учитывать, что в каждом из этих случаев природой задействованы различные физические и химические свойства оксида азота.

1.2.1 Высокая диффузионная способность

Среди сотни миллионов известных в природе молекул оксид азота входит в десятку самых маленьких [114]. При этом NO является также самым маленьким энзиматическим продуктом, продуцируемым клетками млекопитающих [139]. В соответствии с известным законом Стокса-Эйнштейна, способность молекулы к диффузии в конденсированной фазе обратно пропорциональна ее молекулярному радиусу, что таким образом делает NO одной из самых быстро диффундирующих молекул в природе. Являясь незаряженной и почти неполярной молекулой, оксид азота умеренно растворим в воде (1,9 мМ при 20 °С и атмосферном давлении) [11] и почти в 10 раз лучше растворим в неполярных растворителях [168]. В силу высокой растворимости NO в гидрофобной фазе, биологические мембраны не служат барьером для диффузии NO. Так коэффициент диффузии для NO, измеренный как в водной среде [121], так и в ткани мозга [126] лежит в пределах 3300-3800 $\mu\text{m}^2/\text{s}$. Интересно отметить, что коэффициент диффузии NO в 1,4 раза выше, чем у O₂ [11].

Для молекулы с такими свойствами практически не существует барьеров, связанных с компартментализацией биоструктур. Действуя фактически «сквозь компартментализационные барьеры» оксид азота идеально подходит для осуществления межклеточной коммуникации как в пределах одной ткани, так и при межтканевых взаимодействиях. Так, например, оксид азота, синтезируемый клетками эндотелия кровеносных сосудов, легко диффундирует в гладкомышечную ткань сосудистой стенки, вызывая ее релаксацию. Одновременно, оксид азота, проникая в тромбоциты, ингибирует их агрегативную функцию, тормозя тромбообразование. Параллельно с этим NO, проникая внутрь лейкоцитов, запускает биохимический каскад, тормозящий их адгезию к сосудистой стенке, что снижает симптомы воспаления. Все эти эффекты осуществляет одна и та же порция NO, выделившаяся в конкретном месте сосудистого русла в ответ на затруднение в прохождении потока крови. Таким образом, оксид азота объединяет в единый ансамбль клетки совершенно разных тканей (миоциты гладкой мышцы, тромбоциты и лейкоциты крови) для решения

общей физиологической задачи – ускорения кровообращения на данном локальном участке кровяного русла. Аналогичным образом синтезируемый в нейронах головного мозга оксид азота синхронизирует скорость передачи нервного импульса через синапсы близлежащих нейронов, с чем связаны давно описанные в физиологии феномены возбуждения и торможения в локальных зонах головного мозга.

Именно в силу выраженной эволюционной потребности в сигнальном мессенджере межклеточной и межтканевой коммуникации, способном легко преодолевать компартментализационные барьеры в биоструктурах, оксид азота оказался востребованным на самых ранних стадиях эволюции многоклеточных организмов.

1.2.2 Высокая реакционная способность

Высокая реакционная способность и связанное с этим короткое время жизни в биологических тканях также, следует рассматривать в качестве второго эволюционно востребованного свойства NO при использовании его для паракринной сигнализации. Очевидно, что механизм паракринной сигнализации может эффективно работать только при условии эффективного удаления избытка сигнального мессенджера. Известным примером могут служить механизмы удаления избытка нейромедиаторов, задействованные в работе синапсов. По данным Игнаро время жизни оксида азота в биологических образцах составляет 3-5 с [95]. По оценке Лиу время жизни оксида азота в кровяном русле значительно короче, порядка нескольких миллисекунд. Это согласуется с представлением о том, что основной путь удаления избытка NO это его окислительная биотрансформация в быстрой реакции с оксигемоглобином с образованием безобидного для клетки нитрат-аниона.

1.2.3 Цитотоксичность

Цитотоксические свойства оксида азота были использованы природой для создания самой эволюционно древней защитной системы – системы неспецифического иммунитета. К настоящему времени твердо установлено, что

цитотоксичным является не сам оксид азота, а образующийся из него продукт – пероксинитрит. Таким образом, свойство цитотоксичности непосредственно связано с высокой реакционной способностью NO. В биологическом механизме неспецифической иммунной защиты эволюция использовала один из путей химической трансформации оксида азота, реализуемый в присутствии достаточной концентрации супероксидного анион-радикала [142].

1.3 Образование оксида азота в организме

Оксид азота образуется в организме только в одной биохимической реакции, которая осуществляется специфической оксигеназой – синтазой оксида азота, представленной в организме несколькими изоферментами. Субстратом для NO-синтазы служит аминокислота, L- аргинин, которую можно таким образом рассматривать в качестве естественного донора NO. NO-синтазы используют молекулярный кислород для окисления атома азота гуанидиновой группы L- аргинина, с образованием L-цитруллина и NO [25]. NO-синтаза катализирует двустадийное НАДФН–зависимое окисление аргинина до цитруллина с освобождением NO (рисунок 1.1). Два моля O_2 и 1,5 моля NADPH расходуются на образование 1 моля NO [115]. У позвоночных были идентифицированы три основных изоформы NOS: эндотелиальная NOS (e-NOS или NOS3 - встречается в эндотелии сосудов), нейрональная NOS (n-NOS или NOS1 – встречается в нейронах) и индуцибельная NOS (i-NOS или NOS2 – встречается в клетках иммунной системы) [40].

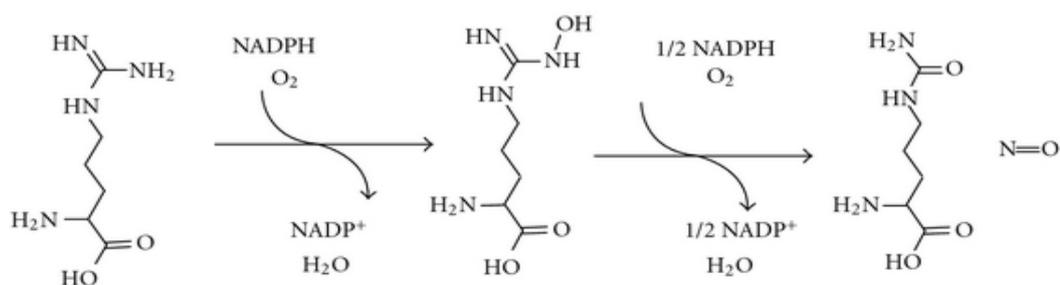


Рисунок 1.1 - Схема двустадийного окисления аргинина, катализируемого NO-синтазой.

Первые два изофермента являются конститутивными, а последний - индуцибельным. В эндотелии кровеносных сосудов присутствует конститутивная NO-синтаза. Уровень ее активности регулируется концентрацией иона кальция, Ca^{2+} с участием кальмодулина [185]. А именно, возрастание внутриклеточной концентрации кальция немедленно активирует синтез NO. И наоборот, конечным результатом биохимических изменений в клетке, начинающихся со связывания NO с растворимой гуанилатциклазой, является снижение уровня кальция в клетке, приводящее непосредственно к расслаблению миофибрилл в гладких мышцах стенки кровеносных сосудов.

В каталитически активной форме NO-синтаза является гомодимером, то есть состоит из двух идентичных субъединиц с молекулярной массой варьирующей у разных изоформ от 130-150 кДа. В составе каждой субъединицы димера различают редуктазный, кальмодулинсвязывающий и оксигеназный домены. В димере субъединицы соединены антипараллельно, при таком расположении происходит попарное сближение C-концевых редуктазных с N-концевыми оксигеназными доменами [76]. Сближение каталитических центров делает возможным перенос между ними электронов, что необходимо для окисления аргинина [37, 196]. Редуктазный домен содержит флавины FAD и FMN: FAD является первичным акцептором электронов от NADPH, а FMN переносит электроны от FAD на гем оксигеназного домена соседней субъединицы. Оксигеназный домен содержит участки связывания гема, аргинина (L-Arg) и тетрагидробиоптерина (BH_4). Фермент переходит в активную форму только после димеризации субъединиц, которая инициируется связыванием одной молекулы кальмодулина с каждым из мономеров. Именно различия в прочности связывания кальмодулина с димером NOS обуславливают каталитические различия отдельных изоформ NOS. А именно, активность nNOS и eNOS сильно зависит от концентрации Ca^{2+} , в то время как с iNOS кальмодулин связан настолько прочно, что изменение концентрации Ca^{2+} не может служить регулирующим фактором. Этого в данном случае и не требуется, так как

регуляция i-NOS осуществляется исключительно через посредство генетических механизмов.

1.4 Сигнальный каскад оксида азота

Как уже отмечено выше, сама история открытия сигнальной роли NO началась с установления в 70-ых годах прошлого века факта, что известные нитровазодилататоры способны активировать образование цГМФ в цитоплазме клеток [29]. Однако значение этого факта оставалось неясным до того момента, когда NO был отождествлен с обнаруженным ранее EDRF - эндогенным фактором релаксации, происходящим из эндотелия [143]. Стало понятно, что функция циклизации гуанозинмонофосфата является на самом деле первичным эффекторным звеном сигнального каскада, управляемого оксидом азота.

1.4.1 Растворимая гуанилатциклаза и цГМФ

Циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ) был впервые обнаружен в моче крыс через несколько лет после открытия своего более широко известного аналога цАМФ. Впоследствии цГМФ был найден практически во всех клетках организма [166]. Источником цГМФ оказался фермент гуанилатциклаза, впервые выделенный в чистом виде из ткани легких быка [70]. Было показано, что этот фермент состоит из двух различных субъединиц $\alpha_1\beta_1$ с молекулярными весами 73 кДа и 70 кДа, соответственно [101]. Фермент содержал гемовую простетическую группу, которая действовала в качестве рецептора NO [71]. Гем имел максимум поглощения при 431 нм, что свидетельствовало о координированном состоянии гема в пяти положениях с гистидином в качестве аксиального лиганда [179]. Присоединение NO к шестому координационному положению гема с образованием нитрозильного комплекса приводит к 300-кратному увеличению активности гуанилатциклазы [161].

1.4.2 NO-зависимый механизм релаксации кровеносных сосудов

На рисунке 1.2. представлена схема сигнального каскада, в котором сигнал оксида азота через ряд промежуточных биохимических стадий трансформируется в физиологический эффект – релаксацию гладкой мышцы. Весь процесс

реализуется внутри гладкомышечных клеток сосудистой стенки, в которые путем диффузии поступает генерируемый клетками эндотелия оксид азота. Выступая в роли первичного мессенджера, оксид азота активирует эффекторный фермент растворимую гуанилатциклазу, продуцирующую вторичный мессенджер – цГМФ. Легко диффундирующему сквозь клеточные мембраны оксиду азота не требуется специального механизма трансмембранной передачи сигнала, реализуемого через посредство G-белка, как это имеет место в случае широко известного аденилатциклазного механизма.

Для активации растворимой гуанилатциклазы достаточно 5-10 нМ NO. Вторичный мессенджер, цГМФ, в свою очередь, активирует цГМФ-зависимую протеинкиназу G, регулирующую уровень кальция в цитоплазме клетки. При этом снижение уровня кальция в цитоплазме клетки происходит одновременно по двум направлениям, показанным на схеме в виде правой и левой ветвей.

Левая ветвь. Фосфорилирование фосфолипазы C, приводящее к ингибированию ее активности и снижению образования инозитолтрифосфата (IP₃). Последний, как известно, является сигнальным мессенджером, вызывающим выход кальция из саркоплазматического ретикулума (СР) в цитоплазму через кальциевые каналы [197].

Правая ветвь. Фосфорилирование фосфоламбана, снимающее его ингибирующий эффект на Ca²⁺-АТФ-азу СР, приводит к увеличению транспорта Ca²⁺ из цитоплазмы в цистерны саркоплазматического ретикулума [51, 110, 164].

Эффекты фосфорилирования фосфолипазы C и фосфоламбана влияют, как мы видим, на систему транспорта кальция противоположным образом: выход кальция из цистерн СР через кальциевые каналы ингибируется (левая ветвь), а его закачивание внутрь цистерн СР, наоборот активируется (правая ветвь). Общий согласованный итог этих двух процессов: снижение уровня кальция в цитоплазме гладкомышечной клетки. Далее по известному механизму происходит снижение активности Ca²⁺-зависимой киназы легких цепей миозина [58, 102, 173]. Последнее, через снижение уровня фосфорилирования миозина, приводит к релаксации гладкой мышцы.

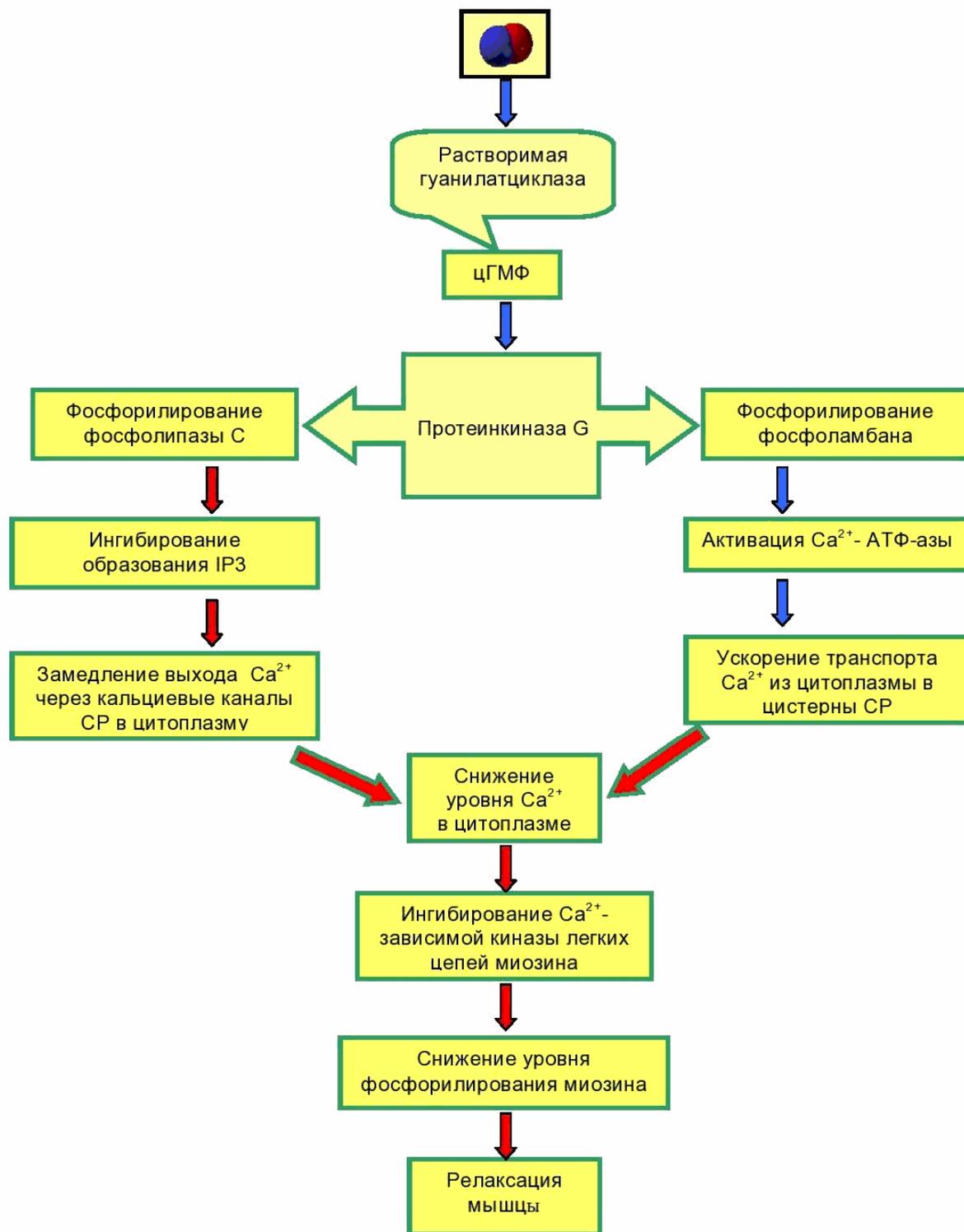


Рисунок 1.2 - NO-зависимый механизм релаксации гладких мышц сосудистой стенки. Синие (красные) стрелки означают активацию (ингибирование) ферментов, увеличение (снижение) концентраций веществ, ускорение (замедление) процессов. (СР -саркоплазматический ретикулум), IP3 - инозитолтрифосфат).

1.5 Цитотоксические свойства оксида азота. Пероксинитрит

По мере развития исследований сигнальных функций оксида азота, у него стали также обнаруживаться разнообразные цитотоксические эффекты, наиболее известными из которых являются разрывы цепей ДНК [193], АДФ-рибозилирование глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы [57], а также инактивация железо-серных кластеров в ферментах митохондрий [61, 85]. Однако к настоящему времени установлено, что большинство, если не все, цитотоксические эффекты, которые первоначально приписывались оксиду азота, на самом деле связаны с продуктом его взаимодействия с другой значимой для биологических систем радикальной формой – супероксидным анион-радикалом [142]. Такое взаимодействие было обнаружено еще до установления химической природы EDRF как оксида азота [78]. Впоследствии было показано, что в результате такого взаимодействия образуется пероксинитрит [34]:



Скорость данной реакции приближается к теоретически возможному пределу скорости для жидкофазных реакций, задаваемому скоростью диффузии. Константа скорости, определенная различными методами, находится в пределах $4\text{-}16 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [73, 89, 108]. Таким образом, в среднем константа скорости образования пероксинитрита составляет $\sim 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, что примерно на порядок превышает скорость ферментативной дисмутации супероксида, составляющую $1\text{-}2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [66]. Как полагает R. Radi, в организме могут возникать условия, связанные с повышенной генерацией оксида азота, при которых реакция (1.1) может конкурентно «побеждать» реакцию дисмутации [152]. Иначе говоря, следует вести речь о возможном существовании конкурентной «вилки», разветвляющей путь метаболизма супероксида, т.е. переключающей его биотрансформацию с пероксида на пероксинитрит. О высокой вероятности такого сценария свидетельствует большой список известных из литературы цитотоксических эффектов, индуцируемых пероксинитритом (раздел 1.5.2).

Необходимо уточнить также, что в биологической научной литературе под термином пероксинитрит принято обозначать не собственно пероксинитрит-

анион, а сопряженную кислотно-основную пару: протонированная форма (кислота)/пероксинитрит-анион с $pK_a=6.8$.



Это означает, что при $pH=7.4$ до 80 процентов пероксинитрита будет находиться в анионной форме. Это важно, так как реакционная способность и способность проникать через биомембраны резко различаются для недиссоциированной и анионной формы пероксинитрита [55, 64]. Поэтому биохимия пероксинитрита является в высокой степени pH зависимой. Этим он резко отличается от пероксида водорода ($pK_a=11,6$), который практически полностью протонирован при физиологических pH [64].

1.5.1 Механизмы развития пероксинитритзависимой цитотоксичности

Задолго до открытия биологической роли пероксинитрита, о его высокой реакционной способности было хорошо известно из химической литературы [81, 120]. Согласно современным данным, полученным уже на биологических объектах, период полупревращения пероксинитрита в биологических средах составляет $\sim 10-20$ мс. Высокая диффузионная способность, такая же, как у NO позволяет ему диффундировать за это время на расстояние до двух клеточных диаметров [55].

В настоящее время уже можно ответить на вопрос, почему эта нерадикальная форма проявляет более высокую реакционную способность, чем ее радикальные предшественники. На рисунке 1.3. представлена обобщенная схема возможных механизмов цитотоксичности пероксинитрита [152]. В целом можно выделить два базовых механизма метаболических превращений пероксинитрита, обуславливающих его цитотоксичность. Первый механизм состоит в *прямом окислении биологических молекул-мишеней*. В роли этих биологических мишеней выступают металлопротеиды, содержащие ионы переходных металлов (Fe, Cu, Mn) [153], либо различные тиолы, в первую очередь остатки цистеина в белках. Центры переходных металлов (Fe, Cu, Mn) в ферментах подвергаются одноэлектронному окислению (рисунок 1.3 - IV) [149], тогда как

сульфгидрильные соединения претерпевают двухэлектронное окисление с образованием нитрит-аниона и производного сульфеновой кислоты (рисунок 1.3 - I) [149, 186]:



В основе второго механизма лежит повреждение биологических мишеней, опосредованное свободными радикалами, образующимися из протонированной и анионной форм пероксинитрита. В первом случае это прямой гомолитический распад пероксинитровой кислоты до радикальных продуктов (рисунок 1.3 - II):



Во втором случае вначале формируется нестабильный промежуточный аддукт - нитрозопероксикарбонат, который, в свою очередь быстро распадается на два радикальных продукта, $\cdot\text{CO}_3^-$ и $\cdot\text{NO}_2$. (рисунок 1.3 - III):



В настоящее время считают, однако, что образование гидроксильного радикала (рисунок 1.3 - II) играет только незначительную роль *in vivo*. Приоритет отдается механизму распада пероксинитрит аниона через его реакцию с двуокисью углерода.

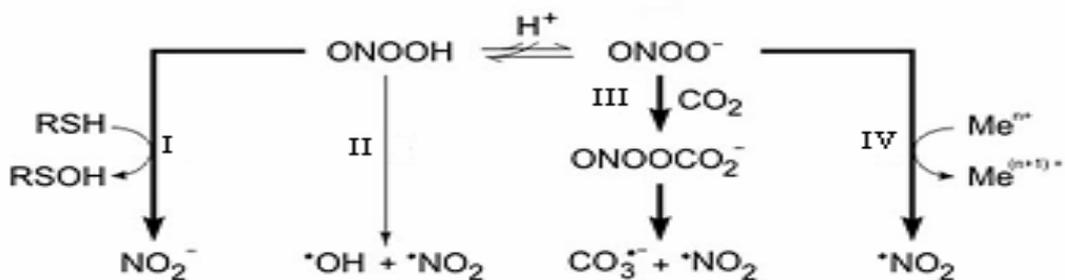


Рисунок 1.3 - Пероксинитрит как медиатор оксидативных и цитотоксических процессов в клетке. I, IV – Прямое окисление биологических молекул. II, III – Гомолитический распад с образованием радикальных продуктов [152].

Это связано с высокой концентрацией диоксида углерода в биологических средах с одной стороны и высоким содержанием анионной формы пероксинитрита (80% при pH 7.4) с другой. Поэтому полагают, что именно этот механизм имеет фундаментальное значение для проявления токсических свойств пероксинитрита в биологических реакциях *in vivo*. Таким образом, можно

считать, что диоксид углерода CO_2 перенаправляет образованный пероксинитрит по направлению к радикальным механизмам развития пероксинитритзависимой цитотоксичности.

1.5.2 Биологические мишени пероксинитрита

С учетом типологии химических реакций пероксинитрита (рисунок 1.3), наиболее уязвимой мишенью для него должны быть белки, включая низкомолекулярные пептиды и аминокислоты. Это подтверждается многочисленными экспериментальными данными, количество которых продолжает увеличиваться.

а) Реакции с металлсодержащими центрами белков (рисунок 1.3 - IV)

Прямые реакции пероксинитрита с переходными металлами в активных центрах белков являются самыми быстрыми среди реакций пероксинитрита ($k \sim 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$). Пероксинитрит модифицирует протеины, содержащие гемовые простетические группы, такие как оксигемоглобин [35], миоглобин [84] и цитохром с [184], окисляя двухвалентный гем в соответствующую трехвалентную форму. Особенно быстро пероксинитрит реагирует с железо-серными кластерами. Это приводит к инактивации ферментов, участвующих в важных метаболических процессах, включая митохондриальную аконитазу [48] и фосфоглюконат дегидротазу [107], алкоголь дегидрогеназу [53] и другие.

б) Реакции с серасодержащими аминокислотами (рисунок 1.3 - I).

Второй группой важных реакций пероксинитрита являются его реакции с сульфгидрильными группами аминокислот. Среди этих реакций преобладает реакция с цистеином, приводящая к окислению SH-группы [150]. Эти реакции протекают существенно медленнее в сравнении с реакциями предыдущей группы ($k \sim 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$). Окисление важных цистеиновых остатков пероксинитритом, инактивирует многие ферменты, вовлеченные в энергетические процессы в клетке, включая глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназу [41] и креатин киназу [112]. Помимо тиоловых групп в белках, пероксинитрит окисляет низкомолекулярные тиолы, включая глутатион. Поэтому последний иногда

рассматривают в качестве эндогенного перехватчика пероксинитрита, играющего важную роль в защите клетки [31].

в) Нитрование тирозина

Нитрование белкового тирозина является ковалентной модификацией белка, в результате которой в ароматический цикл тирозина в положение соседнее с гидроксильной группой включается нитрогруппа [74]. Нитрование тирозина влияет на структуру и функции белков, что приводит к изменению каталитической активности ферментов, изменению организации цитоскелета, ослаблению передачи внутриклеточных сигналов и даже к аутоиммунным реакциям на модифицированные нитрованием белки [165]. В настоящее время именно нитрование тирозиновых остатков в белках рассматривается в качестве центрального аспекта цитотоксичности опосредованной пероксинитритом. Так, нитрование тирозина идентифицировано, по крайней мере, в 50 болезнях человека и более чем в 80 модельных экспериментах на животных [75]. Характерным примером, существенно влияющим на жизненные функции организма, является нитрование митохондриальной Mn-SOD. Как было установлено, нитрование единичного остатка тирозина (Tyr-34) приводит к полной инактивации этого фермента [119]. Было высказано предположение, что нитрование нескольких важных белков в сердечной мышце может выступать в качестве важного механизма дисфункции сердца [141]. Установлено также, что альфа-синуклеин, нейрональный пресинаптический белок, подвергается олигомеризации в результате нитрования пероксинитритом с образованием телец Леви, являющихся характерным маркером болезни Паркинсона [27].

Второй важной группой макромолекул, повреждаемых пероксинитритом, являются нуклеиновые кислоты. Установлено, что в присутствии пероксинитрита ковалентной модификации подвергаются как азотистые основания, так и сахаро-фосфатный скелет полинуклеотидов [43]. Среди четырех нуклеотидов наиболее реакционноспособным в реакции с пероксинитритом является гуанин. Пероксинитрит может также атаковать сахаро-фосфатный скелет, отрывая атом водорода от диоксирибозного фрагмента, что ведет к раскрытию сахарного

кольца и последующему разрыву в цепи ДНК [43]. Указанные процессы рассматриваются в настоящее время в качестве одного из важных механизмов мутагенеза и канцерогенеза [140]. Интересно отметить, что под действием исследуемых в нашей работе биядерных тетраантрозильных комплексов железа (Б-ТНКЖ) происходят двунитевые разрывы в ДНК лейкоцитов, непосредственным индуктором которых, по всей вероятности, является образующийся из оксида азота пероксинитрит [4].

Важнейшим аспектом цитотоксичности пероксинитрита является его способность запускать пероксидное окисление липидов в биомембранах [151]. Полагают, что пероксинитрит играет важную роль в развитии воспалительных заболеваний нервной системы посредством инициирования пероксидного окисления липидов миелиновой оболочки нервов [188]. Отмечена также роль пероксинитрита в качестве мощного окисляющего агента в липопротеидах низкой плотности (ЛНП) плазмы крови, что рассматривается в качестве ключевого раннего события атерогенеза [79].

1.5.3 Оксид азота в системе неспецифического иммунитета

Как известно, функция иммунитета связана с работой двух иммунных систем: системы неспецифического (врожденного) иммунитета и системы приобретенного антигенспецифического иммунитета. Система приобретенного иммунитета является эволюционно сравнительно молодой (возникла только у позвоночных животных). В то же время система врожденного иммунитета имеется практически у всех многоклеточных организмов, включая растения. В настоящее время твердо установлено, что в клетках этой системы, прежде всего тканевых макрофагах, осуществляющих функцию фагоцитоза, реализован пероксинитритзависимый механизм цитотоксичности, основанный на одновременном быстром запуске синтеза супероксидного анион радикала и оксида азота в пределах одной клетки [155]. Синтез супероксида осуществляется мембраносвязанной ферментативной системой НАДФН-оксидазой:



Указанная ферментативная система называется также «оксидазой дыхательного взрыва», что подчеркивает известный факт резкого («взрывного») повышения поглощения кислорода (в 50 - 100 раз) происходящего через несколько секунд после контакта клетки с активирующим стимулом [133]. Образующийся супероксид выбрасывается либо в экстраклеточное пространство, либо (если процесс фагоцитоза уже начался) внутрь фагоцитирующей вакуоли (фагосомы). Тот же активирующий стимул вызывает одновременную экспрессию индуцибельной NO-синтазы (iNOS). При этом уже через 1-2 часа в области фагосомы наблюдали высокий уровень пероксинитрита, достаточный для уничтожения патогенного микроорганизма. При этом внутри фагосомы были обнаружены нитрованные и окисленные фрагменты патогена.

1.6 Роль гемопротеидов в сигнальной функции NO

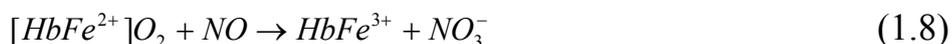
1.6.1 Гемоглобин как ловушка оксида азота

В одной из первых работ по оксиду азота Луисом Игнаро с соавторами было продемонстрировано, что релаксация фрагментов аорты под действием EDRF ингибировалась дезоксигемоглобином. При этом спектральные изменения гемоглобина указывали на образование нитрозильного комплекса, что и позволило заключить, что неизвестное вещество, выделяемое эндотелием (EDRF) - это монооксид азота NO [94]. В этой работе дезоксигемоглобин был использован по чисто формальному основанию, как эффективная ловушка оксида азота, в присутствии которой образуется высокоафинный комплекс Hb-NO:



По разным данным известно, что константа скорости прямой реакции (k_+) составляет $2-6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [47, 135]. При этом константа скорости обратной реакции (k_-) составляет по разным оценкам $10^{-4} - 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ [132, 167], то есть связывание можно считать практически необратимым.

Оксигемоглобин также эффективно взаимодействует с оксидом азота:



Как мы видим, суммарно идет соокисление гема и оксида азота с образованием нитрат-аниона. Константа скорости этого процесса также очень высока. По данным [62] она составляет $3-5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Интересно, что данная константа скорости практически совпадает с вышеупомянутой константой комплексообразования, что вряд ли может быть случайным. Скорее всего, механизм последней реакции включает в себя этап комплексообразования в качестве начальной стадии. Таким образом, как дезокси- так и оксигемоглобин могут быть использованы в качестве ловушки оксида азота.

По оценке Лиу с соавторами, при поступлении оксида азота не в раствор оксигемоглобина, а в суспензию эритроцитов данная реакция протекает с меньшей, но все же со значительной константой скорости $5.16 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [116]. На эффективность улавливания оксида азота суспензией эритроцитов указывают, например следующие данные. Время жизни оксида азота в плазме крови без эритроцитов по данным Рассафа и соавторов составило около одной минуты, тогда как время жизни NO для цельной крови измерить не удастся из-за его малой величины [154]. Оценка, полученная путем экстраполяции данных по разбавленным суспензиям на нормальный гематокрит крови, дает величину периода полужизни NO в крови порядка нескольких микросекунд [116]. Таким образом, суспензия эритроцитов также может рассматриваться как эффективная ловушка оксида азота.

1.6.2 Пул эритроцитов как дренажная система

Последующие исследования сигнальных функций оксида азота показали, что не только исследователи природы, но и сама природа использовала в эволюции высокое химическое сродство соединений железа к оксиду азота. Оказалось, что первичный сигнал NO воспринимает гемсодержащий фермент, растворимая гуанилатциклаза. В результате образования железонитрозильного комплекса активность указанного фермента возрастает примерно в 300 раз [161]. При этом важно отметить, что гем в гуанилатциклазе, в отличие от большинства известных гемсодержащих белков, не осуществляет активную редокс функцию, а играет роль аллостерического регуляторного центра.

Однако одной гуанилатциклазой дело не ограничивается. Важную роль в реализации сигнальной функции оксида азота отводят наиболее известному гемсодержащему белку - гемоглобину эритроцитов. Большинство исследователей в настоящее время считают, что реакция оксида азота с оксигемоглобином эритроцитов (уравнение 1.8) представляет собой основной путь метаболической трансформации выделяемого клетками эндотелия оксида азота с превращением его в безобидный с точки зрения цитотоксических свойств нитрат-анион [106, 146, 192], который далее выводится из организма через почки. В соответствии с этим пул эритроцитов рассматривается в качестве своеобразной дренажной системы, удаляющей избыток оксида азота из кровяного русла. В английской научной литературы для обозначения этой функции используют термин «sink», что примерно можно перевести как «сливная канализационная труба» [44, 49, 187, 194]. Этому способствуют как легкость проникновения оксида азота внутрь эритроцитов благодаря высокой диффузионной способности и липофильности, так и его способность к быстрому химическому взаимодействию с оксигемоглобином эритроцитов.

Наличие дренажного механизма, удаляющего избыток оксида азота из кровяного русла, представляется необходимым не только для детоксикации избыточного количества NO, но и, прежде всего, для обеспечения паракринной, т.е. ограниченной короткими дистанциями, сигнализации. Эффективный дренажный механизм способен предотвращать перемещение оксида азота по кровяному руслу с током крови на более далекие расстояния. Такое перемещение NO могло бы вызывать неконтролируемую вазодилатацию более отдаленных участков кровяного русла.

Имеются, однако, и другие точки зрения, получившие достаточно широкое освещение в научной литературе. В одной из них (J.S. Stamler), в противоположность вышесказанному, возможность отдаленного переноса оксида азота по кровяному руслу считается, наоборот, полезной. Ей приписывается особая физиологически значимая роль. Интересно отметить, что в роли переносчика NO, в рамках этой концепции, также выступает гемоглобин.

1.6.3 Представления об альтернативных гемоглобинзависимых механизмах NO-сигнализации

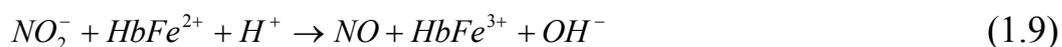
Химическое взаимодействие оксида азота с оксигемоглобином не исчерпывается его реакцией с гемовым железом. Известны, по крайней мере, еще две связанные с гемоглобином реакции, опираясь на которые разные авторы предложили альтернативные механизмы NO-сигнализации.

Одной из известных химических реакций оксида азота в биологических системах является S-нитрозилирование. Это сложный кислородзависимый процесс модификации сульфгидрильных групп белков и низкомолекулярных тиолов с образованием соединений вида RSNO – нитрозотиолов или тионитритов [39]. Таким образом, S-нитрозилирование должно рассматриваться как альтернативный вышеназванному путь трансформации оксида азота в кровеносной системе. Если учесть, что сами по себе нитрозотиолы нестабильны и способны самопроизвольно распадаться при комнатной температуре с выделением NO, то возникла идея рассматривать эти соединения как некую промежуточную форму, депонирующую оксид азота и тем самым предохраняющую его от быстрого окисления оксигемоглобином [176]. Впоследствии эта идея была развита Штемлером применительно к гемоглобину, имеющему на β -цепях по одному цистеиновому остатку (Cys β 93), который может подвергаться нитрозилированию. Согласно Штемлеру нитрозилирование остатка цистеина на гемоглобине сохраняет NO от окисления гемом оксигемоглобина. Благодаря этому оксид азота в составе RSNO-группировки способен перемещаться с током крови из артериального сегмента системы кровообращения в венозный, где происходит обратный процесс, с выделением NO, который вызывает вазодилатацию в венозных отделах микроциркуляторного русла, испытывающих недостаток в кислороде. Таким образом, вазодилатация в этой зоне увеличивает приток крови и, соответственно, приток кислорода. В обоснование своего подхода автор, опираясь на классические представления Перутца [145] об аллостерических конформационных переходах в гемоглобине (так называемые R- и T-формы гемоглобина), приводит ряд доводов в пользу

того, что аллостерические трансформеры R- и T-типа различаются не только сродством гема к кислороду, но сродством цистеинового сульфгидрила к оксиду азота. В соответствии с этим, насыщенный кислородом гемоглобин (R-форма) в артериальном сегменте системы кровообращения обладает повышенным сродством к оксиду азота, т.е. способен эффективно связывать его с образованием нитрогемоглобина. В то же время обедненный кислородом гемоглобин (T-форма), наоборот, обладает пониженным сродством к NO, что приводит к освобождению ранее запасенного оксида азота в гипоксических сегментах кровяного русла. Указанные выше положения составляют основу, так называемой, теории «нитрогемоглобинзависимой гипоксической вазодилатации» подробно обоснованной Штемлером и соавторами в целом ряде работ [26, 59, 80, 100, 169, 177].

Экспериментальные положения работ данной школы многократно подвергались критике. Так, не подтвердились их данные о концентрациях нитрозотиолов в крови порядка 1-10 микромолей. Измерения, проведенные другими методами, дали величины порядка наномолей, т.е. на три порядка ниже [123, 157].

Представителями другой научной школы под руководством Марка Глэдвина выдвинут еще один альтернативный механизм NO-сигналирования. Данный механизм основан на известной способности дезоксигемоглобина катализировать процесс восстановления нитрита до оксида азота:



Авторы полагают, что протекание этой реакции в гипоксической зоне кровяного русла, где значительная часть гемоглобина присутствует как раз в дезоксиформе, может иметь физиологическое значение, в качестве фактора той же самой «гипоксической вазодилатации» [42, 52, 72, 144].

Таким образом, как теория Штемлера, так и теория Глэдвина представляют собой два возможных механизма, объясняющих давно известное явление гипоксической вазодилатации [156], суть которого состоит в том, что сами

эритроциты, попадая в гипоксическую область кровяного русла, выделяют какой-то сигнальный фактор, вызывающий расширение сосуда. Однако к настоящему времени получены убедительные доказательства в пользу реализации третьего механизма, в рамках которого этим сигнальным фактором служит выделяемый гипоксическими эритроцитами в окружающую среду АТФ, который связывается с рецептором на поверхности эндотелиальной клетки, что приводит к активации NO-синтазы [63, 175]. Как мы видим, здесь тоже участвует оксид азота, однако он образуется вполне обычным, «классическим», способом, через активацию eNOS.

В качестве прямого опровержения теории Штемлера могут рассматриваться результаты экспериментов на нокаутных линиях мышей, в которых экспрессировался гемоглобин с аминокислотной заменой Cys β 93 на аланин. Было показано, что по способности вызывать гипоксическую вазодилатацию эритроциты с модифицированным гемоглобином ничем не отличались от эритроцитов с гемоглобином дикого типа [98, 117].

1.7 Доноры оксида азота как фармакологические эффекторы

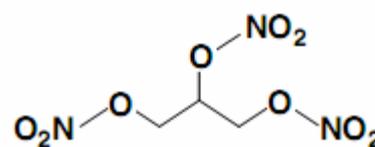
Как показали исследования последних трех десятилетий, факторы риска в патогенезе многих сердечнососудистых заболеваний связаны с нарушениями процесса естественного синтеза NO клетками сосудистого эндотелия. Недостаток эндогенного NO вызывает вазоконстрикцию, усиливает пролиферацию гладкомышечных клеток, увеличивает агрегацию тромбоцитов и повышает адгезию тромбоцитов и лейкоцитов в местах повреждения эндотелия. Дисфункция эндотелия является патогенетическим фактором таких заболеваний, как атеросклероз [118], сердечная недостаточность [104], сахарный диабет [46], гипертония [45] и ряда других.

Одновременно с открытием механизма эндогенного синтеза оксида азота был обнаружен весьма важный его экзогенный источник. Этим источником оказались широко используемые в кардиологии уже более 100 лет фармакологические препараты из класса органических нитратов и нитритов, в первую очередь нитроглицерин. Как оказалось, в процессе биотрансформации в организме все эти соединения выделяют оксид азота, который и лежит в основе

их фармакологического действия. В связи с этим в биохимической фармакологии появилось концептуальное понятие «донора оксида азота» как экзогенной химической субстанции, фармакологическая активность которой связана с выделением оксида азота [96].

1.7.1 Современные клинические средства с NO-донорной активностью

Органические нитраты и нитриты химически представляют собой эфиры. Эфиры – это продукты этерификации одно- и многоатомных спиртов с азотной кислотой (R-O-NO₂), либо с азотистой кислотой (R-O-NO), соответственно. Наиболее известный и хорошо изученный представитель органических нитратов – нитроглицерин



(рисунок 1.4) **Рисунок 1.4** – Нитроглицерин.

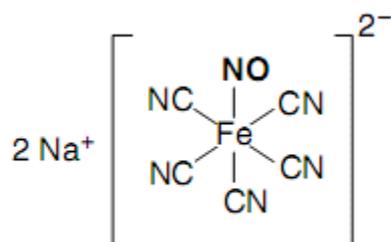


Рисунок 1.5 - Нитропруссид натрия.

чаще всего используется для снятия приступов стенокардии. Кроме того, давно используются на практике в качестве вазодилататоров такие органические нитриты как бутилнитрит, изобутилнитрит, амилнитрит, изоамилнитрит [5]. Органические нитраты и нитриты выделяют в группу доноров непрямого действия, так как выделение NO происходит не в результате простого химического восстановления, а в ходе биотрансформации – процесса, происходящего с участием эндогенных ферментативных систем организма. В настоящее время установлено, что главной такой системой является митохондриальная альдегиддегидрогеназа [50, 109].

Нитропруссид натрия. Помимо органических нитратов в клинической практике уже почти сто лет используется нитропруссид натрия. По своей химической природе это смешанный цианонитрозильный комплекс железа (рисунок 1.5). Обычно его применяют для быстрого снижения кровяного давления в ситуации острого гипертонического криза. Точный механизм выделения оксида азота из нитропруссидов до конца не изучен. Известно, что этот процесс включает

как ферментативные стадии (требует присутствия сосудистой ткани), так и простое химическое восстановление с участием тиолов, гемопротеидов и т.д. [33].

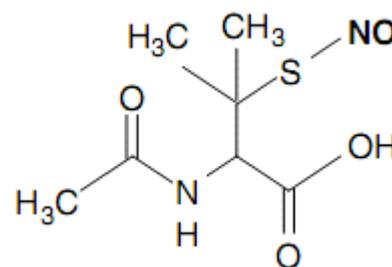
Общеизвестным следствием длительного фармакологического применения органических нитратов является развитие толерантности. Суть явления толерантности состоит в постепенном снижении фармакологического отклика организма на применяемые дозы, что требует их многократного увеличения. Развитие толерантности, а также целого ряда других эндотелиальных дисфункций при длительном применении считается серьезным недостатком органических нитратов [136].

Имеются проблемы и с использованием нитропруссид натрия. Как видно из его структуры, полное разложение нитропруссид связано с выделением пяти эквивалентов цианид-аниона, что обуславливает заметную цитотоксичность данного препарата [30].

Эти обстоятельства послужили серьезным стимулом в развитии исследований по разработке новых фармакологических препаратов обладающих NO-донорной активностью [96, 127, 191].

1.7.2 Новые классы доноров оксида азота

С точки зрения органической химии, почти из любого органического соединения, имеющего в своей структуре атом азота, можно путем его химической модификации получить оксид азота. Так в подробном обзоре Ванга и соавторов выделено 16 классов химических соединений - потенциальных доноров оксида азота [191].



В 2004 году в известной монографии Граника и Григорьева «Оксид азота (NO):

Рисунок 1.6 - S-нитрозо-N-ацетилпеницилламин (SNAP).

новый путь к поиску лекарств» подробно рассмотрены 12 групп потенциальных химических прекурсоров оксида азота [5]. Далее мы остановимся на нескольких классах доноров оксида азота, которые уже показали хорошую эффективность на

биологических моделях и в предклинических испытаниях, хотя пока еще не стали препаратами, допущенными к клиническому применению.

Нитрозотиолы. Это широкий класс химических соединений с одинарной химической связью RS-NO. Эти соединения могут рассматриваться как тиоэфиры азотистой кислоты, т.е. являются прямыми аналогами органических нитритов. Как указывает Хогг [87], часто встречающееся в биологической научной литературе представление о нитрозотиолах как о простых аддуктах, образующихся в результате обратимого связывания оксида азота с сульфгидрилами, и представляющих собой, таким образом, «связанную форму оксида азота» не соответствует действительности. На самом деле нитрозотиолы образуются в результате взаимодействия сульфгидрила не с самим монооксидом азота, а с продуктом окисления оксида азота молекулярным кислородом - N_2O_3 . В то время как прямое взаимодействие сульфгидрила с монооксидом азота дает совсем другие продукты, дисульфид и нитроксил.

Большинство нитрозотиолов нестабильны уже при комнатной температуре и легко подвергаются гомолитическому распаду с образованием оксида азота и RS^{\bullet} -радикала димеризующегося в дисульфид. Тем не менее, получены ряд относительно стабильных нитрозотиолов, представляющих значительный интерес для фармакологии. Широкую известность в работах по физиологии оксида азота получил, например, S-нитрозо-N-ацетилпеницилламин (рисунок 1.6), получивший широкую известность в виде английской аббревиатуры - SNAP. Повышенную стабильность этому и некоторым другим нитрозотиолам обеспечивает присоединение SNO-группы к третичному атому углерода. Помимо SNAPа в исследованиях на биологических моделях, а также в предклинических испытаниях высокую эффективность показали S-нитрозоглутатион, S-нитрозо-N-ацетилцистеин. Все они имеют хорошие перспективы клинического применения [127].

Важно отметить, что разложение нитрозотиолов с выделением NO может происходить под влиянием широкого ряда физических и химических факторов, таких как освещение, нагревание, ионы переходных металлов, тиолы, супероксид

и целый ряд ферментов. Такой широкий набор факторов на деле означает, что выделение оксида азота нитрозотиолами можно рассматривать как спонтанное, что является преимуществом, в сравнении с органическими нитратами, имеющими строгие метаболические требования для биотрансформации [127]. Нитрозотиолы, в отличие от нитратов, не вызывают развития толерантности [82] и обладают низкой цитотоксичностью [127]. Последнее, вполне понятно с учетом фактически эндогенной природы, например, нитрозоглутатиона, присутствующего в некоторых тканях в количестве до 250 нМ [40].

Диазениумдиолаты (NONOаты) Первым представителем данного класса соединений стал синтезированный и описанный еще в 1960 году продукт присоединения оксида азота к диэтиламину [60] (рисунок 1.7). В связи с установлением физиологических функций оксида азота эти соединения привлекли всеобщее внимание, получив в литературе широко распространенное наименование NONO-аты. Все NONO-аты состоят из диолатной группы «N(O)N(O⁻)» (выделена черным цветом на рисунке 1.7), присоединенной к нуклеофильному атому.

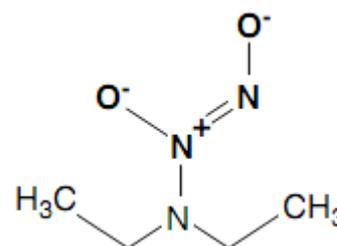


Рисунок 1.7 - Диэтиламин/NO.

Наиболее известные NONO-аты являются производными от первичных, вторичных аминов или полиаминов [122].

Необходимо отметить две особенности NONO-атов, которые делают их весьма привлекательными в плане химико-фармакологического дизайна и также благодаря которым они уже стали незаменимым инструментом в научных исследованиях по физиологии и биохимии оксида азота.

1. Разложение этих соединений в биологических средах при физиологических pH и температуре происходит стехиометрически и полностью спонтанно, не требуя какой-либо внешней активации. Разложение подчиняется кинетике первого порядка, поэтому его скорость и, соответственно, фармакологические эффекты могут быть точно предсказаны [105, 131].

2. Скорость разложения NONO-атов может сильно варьировать в зависимости от структуры нуклеофильного заместителя. Известны NONO-аты с периодами полураспада от нескольких секунд до нескольких часов [134].

NONO-аты показали высокую эффективность в экспериментальных моделях сердечно-сосудистых патологий [38, 147] а также как эффективное средство адресной доставки больших концентраций NO к опухолевым клеткам [181, 195].

Нитрозильные комплексы железа. Ион железа (II), имеющий полностью незаполненный 4-й электронный уровень и частично свободный 3d подуровень, является одним из самых мощных из известных в природе комплексообразователей. В то же время, оксид азота связывается с железом с разной степенью сродства (т.е. имеет разную степень обратимости) в зависимости от природы гемопротейна. Если в случае гема дезоксигемоглобина это связывание практически необратимо, то степень сродства при связывании оксида азота с гемом цитохрома ниже на 5-7 порядков [9]. Последнее означает, что при определенных условиях нитрозильные комплексы железа могут выступать в роли доноров оксида азота. В разделе 1.7.1 нами описан один из доноров NO данного класса, нитропруссид натрия, используемый в клинике. Там же были отмечены его цитотоксические свойства, связанные с выделением цианида. Обнаружение в биологических тканях моноядерных динитрозильных комплексов железа с S-лигандами в виде белковых или низкомолекулярных тиолов (рисунок 1.8) [2, 3, 190], а затем би- и полиядерных железосерных кластеров в ряде ферментов, которые могли легко нитрозилироваться в присутствии NO [148], привлекло внимание к тиолсодержащим нитрозильным комплексам как к потенциальным донорам оксида азота.

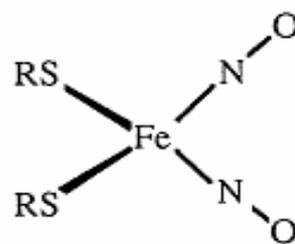


Рисунок 1.8 – Динитрозильный комплекс железа.

В химии основы синтеза тетра- и биядерных нитрозильных комплексов были разработаны еще более ста пятидесяти лет назад Руссиным. Структурная основа тетраядерного и биядерного нитрозильного

комплекса – это, так называемые «черная соль Руссина», $[\text{Fe}_4\text{S}_3(\text{NO})_7]^-$ и «красная соль Руссина», $[\text{Fe}_2\text{S}_2(\text{NO})_4]^{2-}$, соответственно [158] (рисунок 1.9). Вазодилаторная активность кластерных комплексов на основе тетраядерных нитрозильных комплексов (черная соль Руссина, так называемый кубан $[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{NO})_4]^-$) была продемонстрирована в работе Флитни [65]. Широкого использования тетраядерные нитрозильные комплексы не нашли, возможно, в силу обнаруженной у них заметно более высокой, в сравнении с биядерными комплексами, цитотоксичности [36].

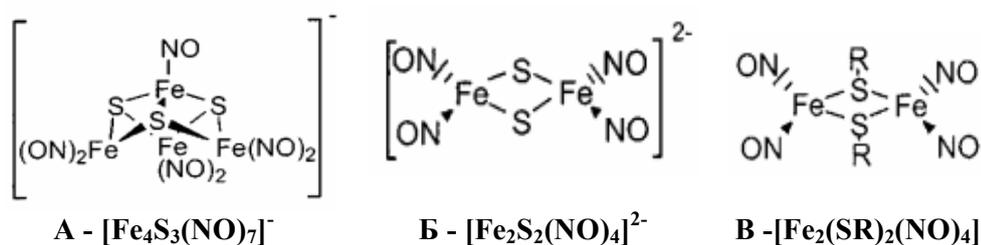


Рисунок 1.9 - Первые синтетические нитрозильные комплексы железа. А – черная соль Руссина, Б – красная соль Руссина, В – эфиры красной соли Руссина.

В последние годы широкое развитие получили работы по синтезу биядерных тетранитрозильных комплексов железа (Б-ТНКЖ), в которых было предложено использовать в качестве лигандов различные тиолы. В общей сложности в рамках этого направления исследований было синтезировано более 30 различных комплексов с S-лигандами на основе гетероциклических тиолов ряда триазола, тетразола, пиридина, пиримидина, имидазола и бензимидазола, а также некоторых алифатических тиоаминов [1, 12, 15]. Комплексы данного класса со структурно-химической точки зрения следует отнести к классу эфиров красной соли Руссина (рисунок 1.9 В), хотя, как сказано выше, прекурсорами в синтезе данных комплексов выступают тиоловые предшественники, а не сама красная соль Руссина.

Одновременно с синтезом данных комплексов были развернуты исследования по изучению кинетических закономерностей и механизмов

разложения Б-ТНКЖ. При этом в экспериментальных исследованиях кинетики разложения Б-ТНКЖ были использованы три различных методических подхода: спектрофотометрический анализ динамики изменения видимого спектра Б-ТНКЖ, электрохимическая регистрация NO в растворе с помощью сенсорного электрода, определение в растворе высокоафинного комплекса дезоксигемоглобин-NO («гемоглобиновая ловушка»). Первый из подходов основан на наличии в синей области спектра Б-ТНКЖ характерного пика, связанного, по-видимому, с присутствием характерного структурного элемента – железо-серного мостика. При гидролизе комплексов наблюдается, уменьшение оптического поглощения в области указанного спектрального пика вплоть до его полного исчезновения. Два других метода основаны на прямом аналитическом измерении NO, выделившегося из комплекса в свободный раствор. В первом случае проводили электрохимическое определение концентрации NO с помощью сенсорного электрода. Во втором случае использовали более сложную методику, основанную на использовании высокоафинной ловушки оксида азота. Так в работе Саниной с соавторами в качестве ловушки был использован раствор дезоксигемоглобина (эксперименты проводились в строго анаэробных условиях). По образованию комплекса HbNO было изучено донирование оксида азота шестью различными Б-ТНКЖ с тиолсодержащими лигандами. NO-донирующая способность комплексов была охарактеризована эффективными константами скорости псевдопервого порядка образования комплекса HbNO. Данные константы, как обосновали авторы, с хорошей точностью характеризуют константу скорости выделения NO из комплекса. Полученные эффективные константы скорости имели порядок величины - 10^{-3} с^{-1} [162]. В одной из последующих работ Саниной и соавторов был подробно изучен синтезированный ими пиримидинсодержащий Б-ТНКЖ. В частности были определены эффективные константы скорости первого порядка разложения данного комплекса, определенные всеми тремя упомянутыми выше методами. Полученные значения, определенные по динамике изменения оптического спектра, методом гемоглобиновой ловушки и электрохимическим методом

оказались равными $0.97 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$, $3.7 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$, $8.0 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$, соответственно [14]. Различия в экспериментальных оценках скорости одного и того же пиримидинсодержащего Б-ТНКЖ тремя разными методами, как видим, оказались значительными, что требовало обсуждения.

В методе спектрофотометрического исследования динамики оптического спектра комплекса присутствует очевидная неопределенность в вопросе о том, как соотносятся (и соотносится ли вообще) спектральные изменения, характеризующие скорость разрушения кластерной $\text{Fe}_2\text{-S}_2$ структуры со скоростью выхода в раствор свободного NO. Устранить эту неопределенность возможно только путем проведения специальных исследований. Без этого, возможность корректного оценивания NO-донирующей способности с помощью данного метода остается под вопросом.

Куда более неожиданным выглядело различие более чем на порядок между данными электрохимического и гемоглобинового методов, каждый из которых, несмотря на инструментальные различия, все же основан на прямом определении концентрации NO в растворе. Понимание причин данного явления вытекает из результатов работы [13] в которой было обнаружено снижение уровня донирования NO по мере увеличения концентрации дезоксигемоглобина, что было определено авторами как стабилизация комплекса дезоксигемоглобином. Это означало, что величина эффективной константы скорости донирования NO, определяемая гемоглобиновым методом снижается по мере увеличения концентрации гемоглобина и она, таким образом, будет всегда меньше соответствующей величины, определяемой в водном растворе электрохимическим методом. Авторы полагают, что в основе явления стабилизации лежит связывание комплекса на поверхности белка, приводящее к снижению скорости его гидролиза. Аналогичное явление стабилизации Б-ТНКЖ было обнаружено и в присутствии другого белка – сывороточного альбумина [159].

Впоследствии была предпринята попытка более подробного исследования данного вопроса. Используя данные кинетического эксперимента в сочетании с

результатами кинетического моделирования, авторы получили оценку величины константы равновесия, характеризующую связывание цистеаминсодержащего Б-ТНКЖ (ЦАК) гемоглобином. Полученная величина $K_{eq} \sim 5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, указывала на довольно высокую степень сродства данного комплекса к гемоглобину, сопоставимую с величиной сродства во многих фермент-субстратных комплексах. Из данных кинетического моделирования было определено также число мест связывания комплекса на поверхности молекулы, оказавшееся близким к 3. Опираясь на этот результат, авторы предприняли попытку локализовать возможные места связывания комплекса на поверхности дезоксигемоглобина с использованием популярной программы трехмерной визуализации химических структур PyMOL [17].

На основе вышесказанного можно выделить основные особенности Б-ТНКЖ, позволяющие оценить перспективы их фармакологического применения в качестве синтетических доноров оксида азота:

1. Разработанные к настоящему времени методы синтеза Б-ТНКЖ с использованием тиоловых предшественников в качестве лигандов комплексообразования, позволяет создать широкое разнообразие структур с NO-донорной активностью

2. Донирование оксида азота из Б-ТНКЖ не требует какой-либо специальной активации (фото-, термо- или ферментативной) и происходит спонтанно в ходе гидролитической диссоциации комплекса. Спонтанный характер донирования NO отличает эту группу от органических нитратов, нитритов и нитрозотиолов и сближает с группой NONOатов.

Глава 2 Материалы и методы

2.1. Химические реактивы и соединения

1. Натрий хлористый, ОСЧ.
2. Натрий лимоннокислый 5,5 водный, ХЧ.
3. Натрий фосфорнокислый однозамещенный, ЧДА.
4. Натрий фосфорнокислый двузамещенный, ЧДА.
5. Эфир для наркоза.
6. Тиобарбитуровая кислота.
7. Трихлоруксусная кислота.
8. Третбутилгидропероксид.

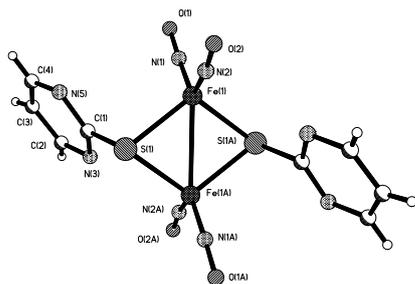
2.2. Приборы и оборудование

1. Спектрофотометр Spekol 11(Германия)
2. Термостат универсальный U3 (Германия)
3. Центрифуга К-23 (Германия)
4. Весы аналитические ВЛР-200 (Россия)
5. Весы технические ВЛК-500 (Россия)
6. Мешалка магнитная ММЗМ
7. Пипетки автоматические ПЛО1 – 1000, ПЛО1 – 200
8. Насос водоструйный

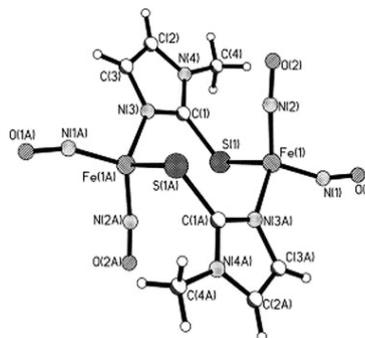
2.3 Доноры оксида азота

В работе были использованы следующие Б-ТНКЖ: тиосульфатный тетранитрозильный комплекс железа (ТНК), пиримидинсодержащий тетранитрозильный комплекс железа (ПИМ), цистеинсодержащий тетранитрозильный комплекс железа (ЦАК), имидазолсодержащий тетранитрозильный комплекс железа (МИМ), бензтиазолсодержащий тетранитрозильный комплекс железа (БТЗ), пеницилламинсодержащий тетранитрозильный комплекс железа (ПЕН) (рисунок 2.1). Комплексы вводили в

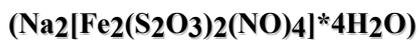
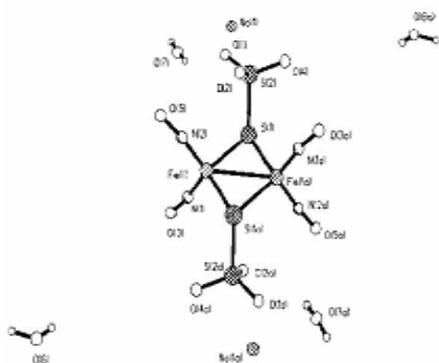
ПИМ



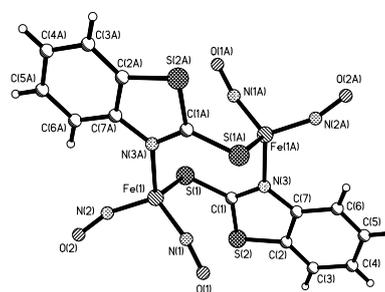
МИМ



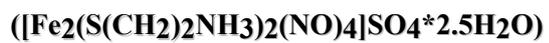
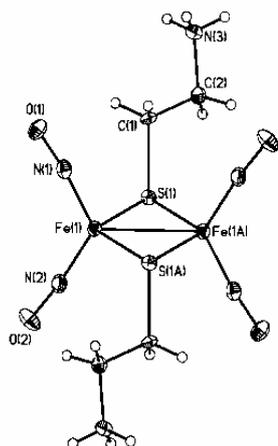
ТНК



БТЗ



ЦАК



ПЕН

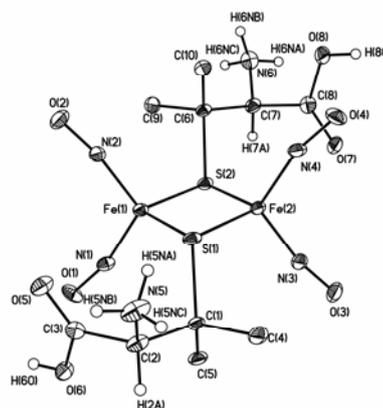


Рисунок 2.1 - Структуры биядерных тетранитрозильных комплексов железа.

суспензию эритроцитов из растворов в воде или ДМСО, которые готовили непосредственно перед опытом. Концентрация ДМСО в образцах не превышала 3%.

2.4 Получение эритроцитарной массы

Забор крови производили от предварительно наркотизированной эфиром мыши посредством ее декапитации. В качестве антикоагулянта использовали 0.11 М раствор цитрата натрия. Кровь собирали в склянку, куда предварительно добавляли раствор антикоагулянта, соблюдая соотношение цитрат/кровь – 1:5.

Кровь центрифугировали в течение 7 мин. при 1500g. Плазму декантировали. Осадок эритроцитов осторожно ресуспендировали в изотоническом растворе NaCl (0,85% NaCl, содержащий 5mM Na-фосфатного буфера, pH 7.4). Операцию центрифугирования повторяли троекратно. После каждого центрифугирования супернатант декантировали, осадок эритроцитов ресуспендировали в новой порции изотонического раствора NaCl. Эритроцитарную массу, полученную после последнего центрифугирования, хранили в холодильнике при 4°C не более 36 часов.

2.5 Исследование кинетики гемолиза эритроцитов

В экспериментах использовали суспензию эритроцитов, которую готовили непосредственно перед опытом путем разбавления эритроцитарной массы изотоническим раствором NaCl (0.85% NaCl, содержащий 5 mM Na-фосфатного буфера, pH=7.4) приблизительно в 500 раз. В полученной суспензии определяли концентрацию клеток путем подсчета в счетной камере Горяева. Полученное значение доводили путем дополнительного разбавления до стандартного для всех опытов значения – 4.4×10^7 кл./мл, что соответствовало 0.2% содержанию эритроцитов. Гемолитический эксперимент проводили при 37 С° в пластиковой кювете объемом 3 мл, при непрерывном слабом помешивании. За ходом гемолиза эритроцитов следили по изменению оптической плотности суспензии при 700 нм. Длина волны была выбрана за пределами области электронного поглощения гемоглобина. Ослабление светового потока в этом случае практически полностью

связано с рассеянием света на эритроцитах. При этом оптическая плотность 0.2% суспензии эритроцитов при 700 нм линейно зависит от доли разрушенных клеток [91, 192]. Степень гемолиза определяли из соотношения:

$$\gamma = \frac{A_0 - A}{A_0 - A_{H_2O}} \quad (2.2)$$

где A_0 и A оптические плотности контрольного и опытного образца соответственно. A_{H_2O} – оптическая плотность образца в условиях полного гемолиза эритроцитов дистиллированной водой. Во всех экспериментах оптическая плотность контрольного образца (A_0) была равна 0.8.

2.6 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).

2.7 Определение внутриэритроцитарного метгемоглобина [7]

Из суспензии эритроцитов, осторожно перемешиваемой на магнитной мешалке при температуре 37 °С, отбирали аликвоты 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 определяли по формуле:

$$[HbFe^{3+}] = \frac{\Delta A_{630}}{\epsilon_{met} - \epsilon_{oxy}} \times d \quad (2.3)$$

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

2.8 Анализ продуктов ПОЛ

Пероксидное окисление липидов мембран эритроцитов характеризовали по уровню образования ТБК-реактивных продуктов по методу Stocks and Dormandy [178] с модификациями. К 2 мл суспензии эритроцитов 1.6% гематокрита добавляли 1 мл. 30 % раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Затем центрифугировали при 6.000 g в течение 15 минут. Отбирали по 2 мл супернатанта и переносили в стеклянные пробирки объемом 20 мл. В каждую пробирку добавляли по 0,5 мл раствора 0,8 % тиобарбитуровой кислоты (ТБК) в 0,05 М NaOH. Пробирки закрывали колпачками из металлической фольги и помещали в кипящую водяную баню на 30 минут. После инкубации образцы охлаждали проточной водопроводной водой и определяли оптическое поглощение при 532 нм.

Глава 3 Гемолитическая активность биядерных тетранитрозильных комплексов железа

Образование в мембране эритроцита разрыва или разрывов, достаточных по размеру для выхода в окружающий раствор гемоглобина, называют гемолизом. Гемолиз эритроцитов представляет собой макроскопический ответ на физическое, химическое или биогенное воздействие на клетку.

3.1 Феноменология и количественное описание кинетики гемолиза

Когда речь идет о действии на эритроциты химических факторов, гемолиз эритроцитов обычно рассматривают как макроскопическое следствие развивающихся во времени химических изменений внутри клетки. В большинстве случаев непосредственным предшественником гемолиза является происходящее по различным механизмам нарушение коллоидно-осмотического равновесия клетки, в результате чего в клетку извне начинает поступать избыточное количество воды. При этом эритроцит из своей обычной формы дискоцита вначале переходит в предгемолитическую шарообразную форму – сфероцит. Дальнейшее набухание сфероцита заканчивается разрывом мембраны (рисунок 3.1).

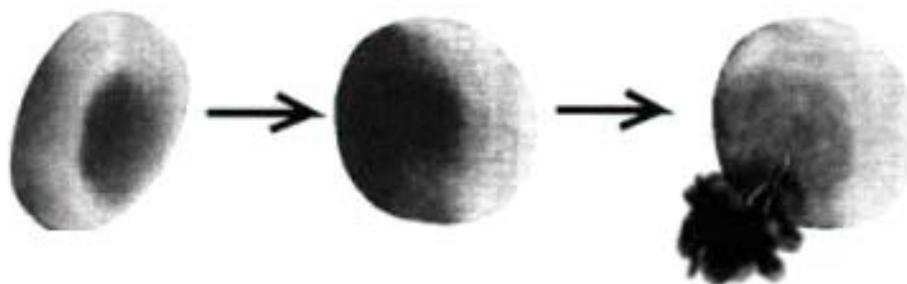


Рисунок 3.1 - Гемолиз эритроцита.

Гемолиз эритроцитов чаще всего регистрируют спектрофотометрически по выходу в среду инкубации свободного гемоглобина. Данный метод достаточно точен и вполне эффективен для регистрации гемолиза в стационарных условиях,

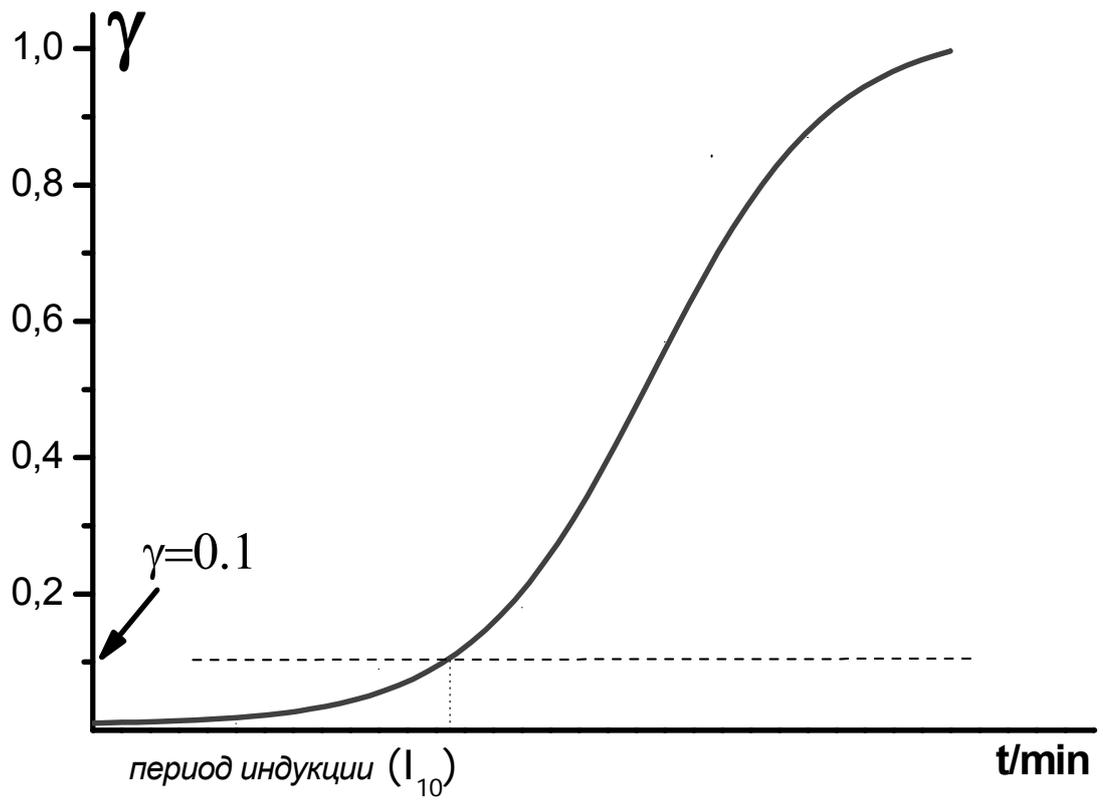


Рисунок 3.2 - Типичная кинетическая кривая гемолитического процесса.

однако он не позволяет регистрировать кинетику гемолиза. За ходом гемолиза во времени удобно следить по уменьшению оптической плотности суспензии эритроцитов в области, лежащей за пределами области поглощения гемоглобина. Именно такой подход использован нами в данной работе (смотри раздел 2.6). В большинстве случаев кинетика гемолиза хорошо описывается сигмоидной кривой (рисунок 3.2). По оси ординат откладывается величина степени гемолиза (γ), означающая долю разрушившихся клеток от их первоначального количества. Длительность промежутка времени от запуска процесса до достижения уровня 10% гемолиза мы называем периодом индукции гемолиза (I_{10} , рисунок 3.2). В рамках данной работы величина периода индукции рассматривается в качестве количественной характеристики гемолитической активности Б-ТНКЖ.

3.2 Кинетические закономерности гемолиза эритроцитов под действием Б-ТНКЖ

На рисунке 3.3 представлены кинетические кривые гемолиза эритроцитов, полученные при различных концентрациях одного из Б-ТНКЖ, БТЗ. Концентрации комплекса, при которых была получена каждая из гемолитических кривых, приведены на верхней врезке справа. Каждая кинетическая кривая была охарактеризована величиной периода индукции гемолиза (I_{10}). На нижней врезке показана зависимость величины I_{10} от концентрации БТЗ. На рисунках 3.4 и 3.5 представлены результаты кинетических исследований гемолиза эритроцитов под действием ПИМ (3.4 А), ЦАК (3.4 Б), ТНК (3.5 А), МИМ (3.5 Б). Графическое отображение этих результатов было таким же, как в случае БТЗ (рисунок 3.3).

При анализе полученных результатов в первую очередь обращает на себя внимание тот факт, что гемолитическое действие всех изученных Б-ТНКЖ проявляется примерно в одной и той же области концентраций порядка 10^5 М. Это может указывать на сходство в механизмах гемолитического действия исследуемых комплексов. Важно обратить внимание также на характер зависимости величин периодов индукции от концентрации комплексов (нижние

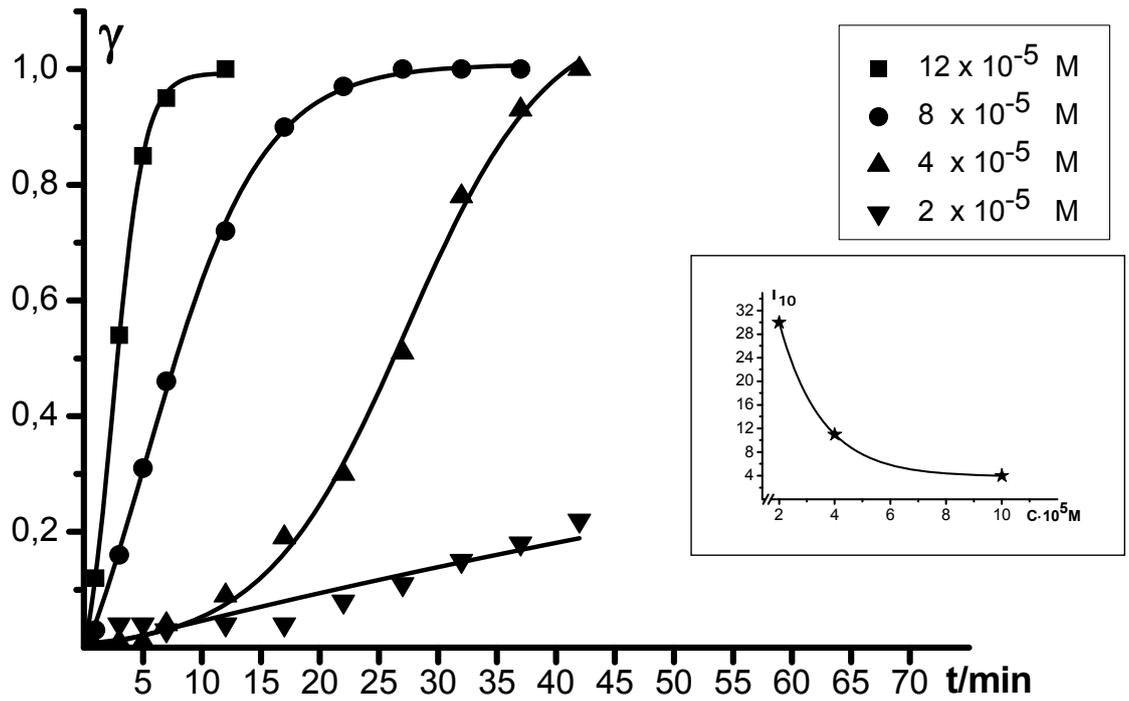


Рисунок 3.3 - Кинетика гемолиза 0,2% суспензии эритроцитов под действием БТЗ.

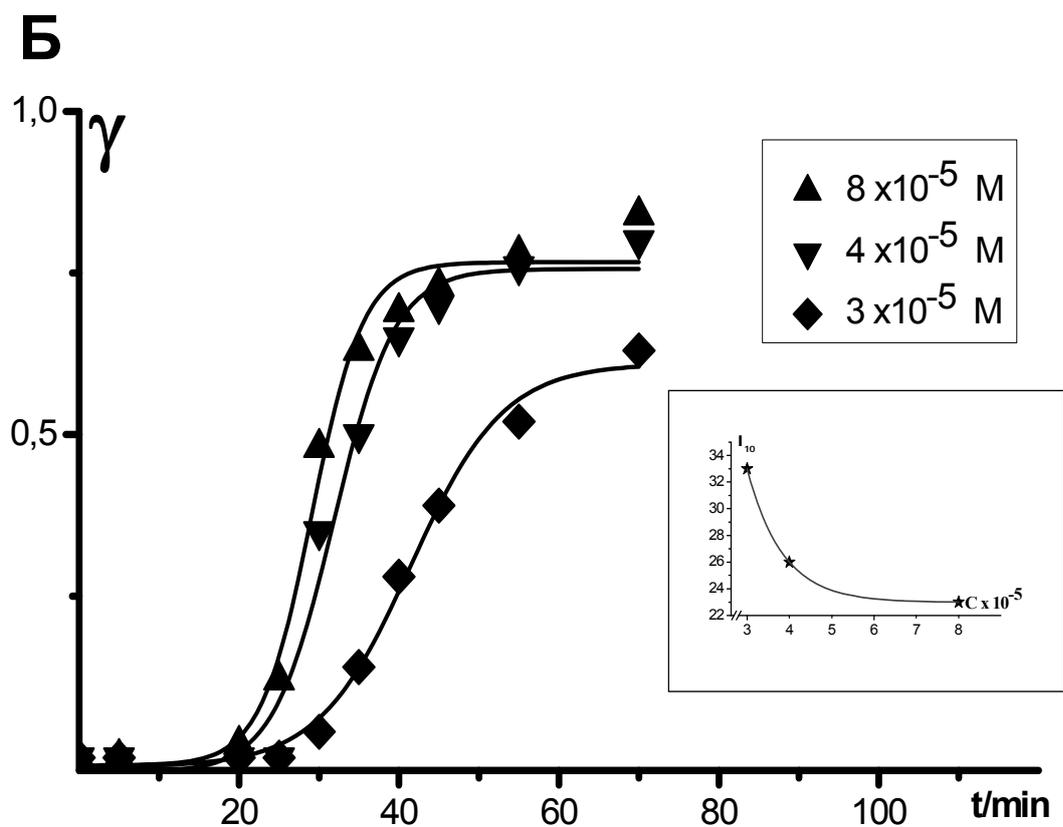
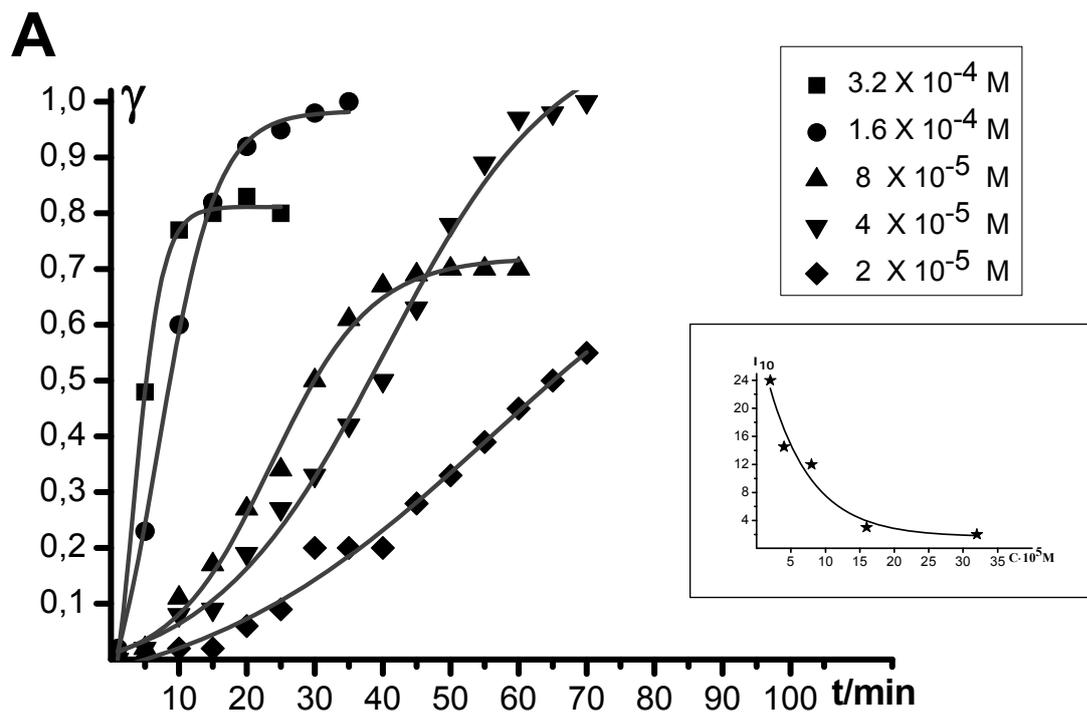


Рисунок 3.4 - Кинетика гемолита 0.2 % суспензии эритроцитов под действием ПИМ (А) и ЦАК (Б) при 37 °С.

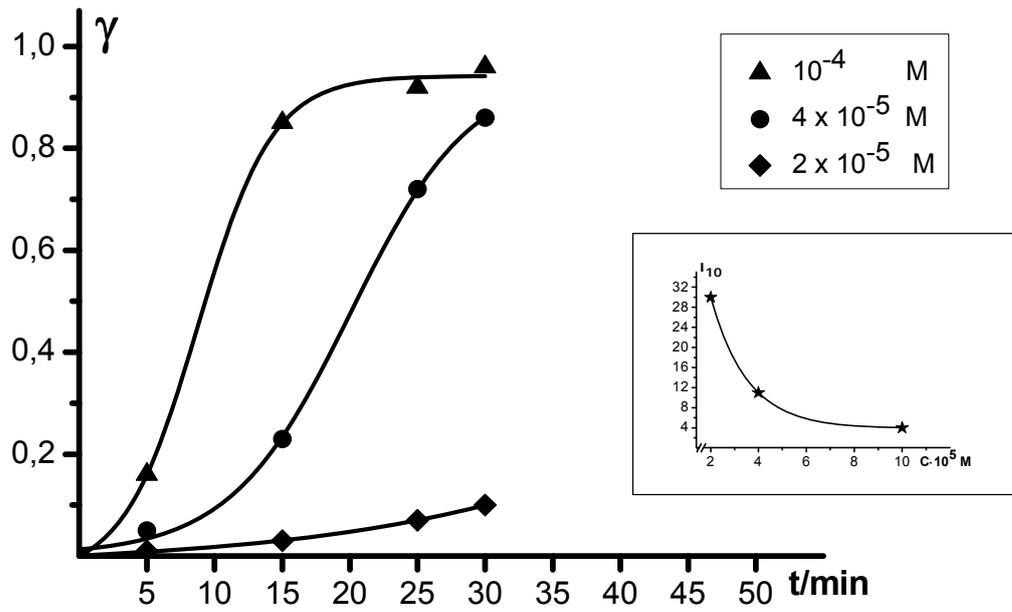
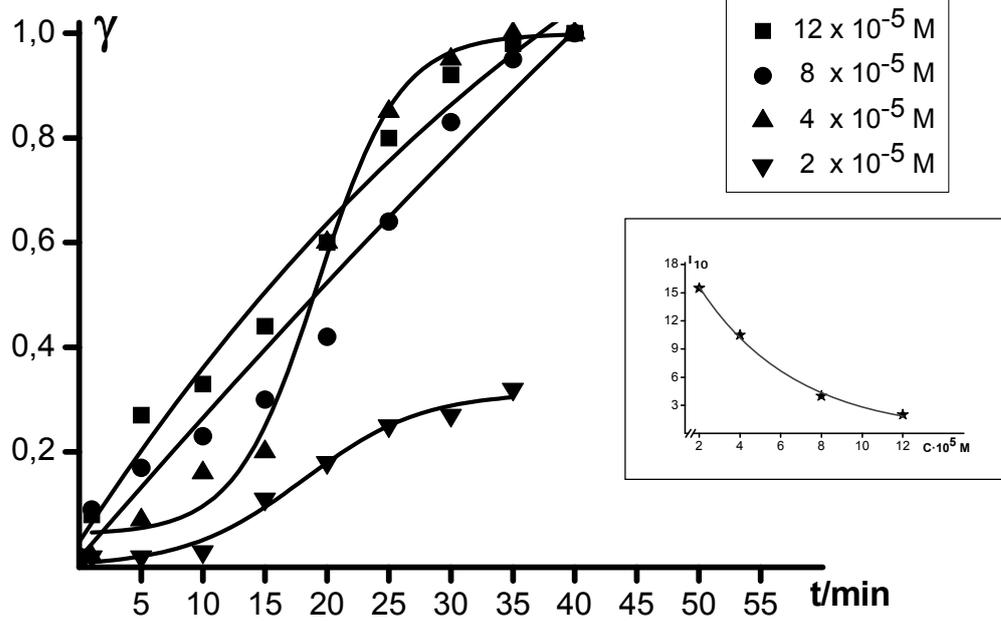
А**Б**

Рисунок 3.5 - Кинетика гемолиза 0.2 % суспензии эритроцитов под действием ТНК (А) и МИМ (Б) при 37 °С.

врезки на рисунке 3.3 – 3.5). Видно, что величина периода индукции гемолиза во всех случаях монотонно снижается с увеличением концентрации комплексов, что указывает на концентрационнозависимый характер гемолитического эффекта Б-ТНКЖ. При этом сами зависимости периодов индукции от концентрации комплексов внешне выглядят однотипными. Так, все экспериментальные точки хорошо аппроксимируются функцией экспоненциального затухания вида $y = Ae^{-kx}$. Однотипный математический характер зависимости гемолитического эффекта от концентрации комплексов может служить еще одним свидетельством в пользу сходного механизма гемолитического действия изученных Б-ТНКЖ.

Таким образом, анализ кинетических закономерностей и концентрационных особенностей гемолитического действия БТЗ, МИМ, ПИМ, ЦАК, ТНК свидетельствует в пользу предположения об однотипном механизме гемолитического действия данных комплексов. Сходный механизм гемолитического действия изученных Б-ТНКЖ предполагает наличие у них общего свойства, которое могло бы обуславливать их гемолитическую активность. С учетом того, что химическая природа S-лигандов, входящих в состав данных комплексов различна, единственным общим свойством для всех Б-ТНКЖ является их NO-донирующая способность.

3.3 Ослабление гемолитической активности раствора Б-ТНКЖ

Предположение о том, что источником гемолитической активности Б-ТНКЖ является оксид азота, а не другие составные части комплексов, допускает простую экспериментальную проверку. Известно, что NO, выходящий из структуры Б-ТНКЖ в водный раствор, быстро окисляется растворенным в воде кислородом, а также непрерывно испаряется с поверхности. По этой причине концентрация NO в растворе Б-ТНКЖ после его приготовления непрерывно снижается. Если источником гемолитической активности комплексов является оксид азота, то гемолитическая активность аликуот, взятых из раствора Б-ТНКЖ через разные промежутки времени после приготовления раствора должна

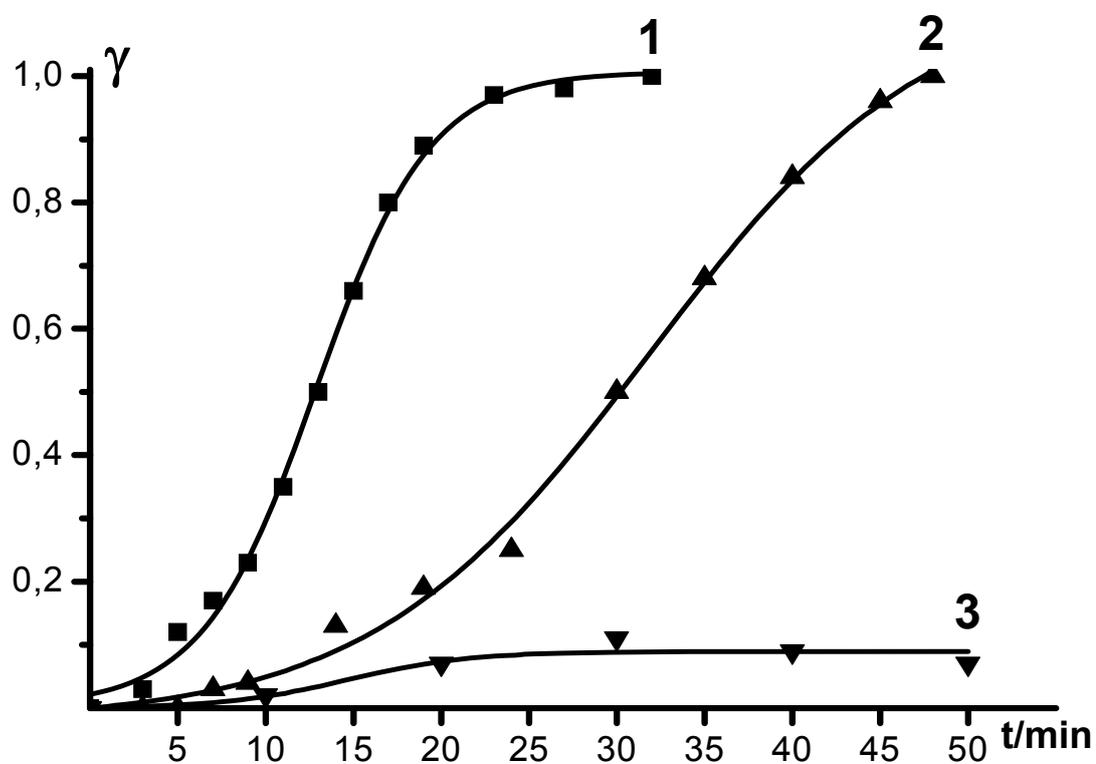


Рисунок 3.6 - Кинетика гемолиза эритроцитов под действием свежеприготовленным раствором ТНК (1) и растворами ТНК предварительно инкубированными при 25°C в течение 75 минут (2) и 100 минут (3).

убывать. Такой эффект действительно наблюдается. На рисунке 3.6 приведены результаты стандартных гемолитических экспериментов, в которых использовался свежеприготовленный раствор ТНК (кривая 1) и далее тот же раствор, выдержанный при температуре 25 °С в течение 75 минут (кривая 2) и 100 минут (кривая 3). Как видим, за период чуть более 1.5 часа гемолитическая активность комплекса почти полностью исчезает.

Таким образом, на основе анализа кинетических закономерностей гемолиза эритроцитов под действием Б-ТНКЖ (раздел 3.2) и с учетом результатов последнего эксперимента, мы пришли к заключению, что источником гемолитической активности Б-ТНКЖ в нашей системе является диффундирующий внутрь эритроцита оксидом азота.

3.4 Сравнительный анализ гемолитической активности Б-ТНКЖ

С учетом целей нашего исследования, представляло интерес сравнить гемолитическую активность всех изученных комплексов между собой [6, 20, 170,171,172]. На рис. 3.7 показаны кинетические кривые гемолиза эритроцитов, полученные при одинаковой концентрации исследуемого комплекса – $4 \cdot 10^{-5}$ М. На врезке рядом с названием комплекса в скобках показаны величины периодов индукции гемолиза. Сопоставление величин периодов индукции показывает, что данные величины для четырех из шести исследованных соединений, ПИМ, МИМ, БТЗ, ТНК достаточно близки и различаются не более чем на 50%. На фоне этого выделяются комплекс ЦАК, отличающийся самым длительным периодом индукции, превышающим данную характеристику других комплексов в среднем в 2 раза. Как видно из рисунка один из исследовавшихся нами комплексов, ПЕН, не проявил в условиях наших экспериментов никакого гемолитического действия. Дополнительные специальные исследования ПЕН в более широком диапазоне концентраций от 10^{-6} до 10^{-4} М также не выявили у него гемолитического эффекта.

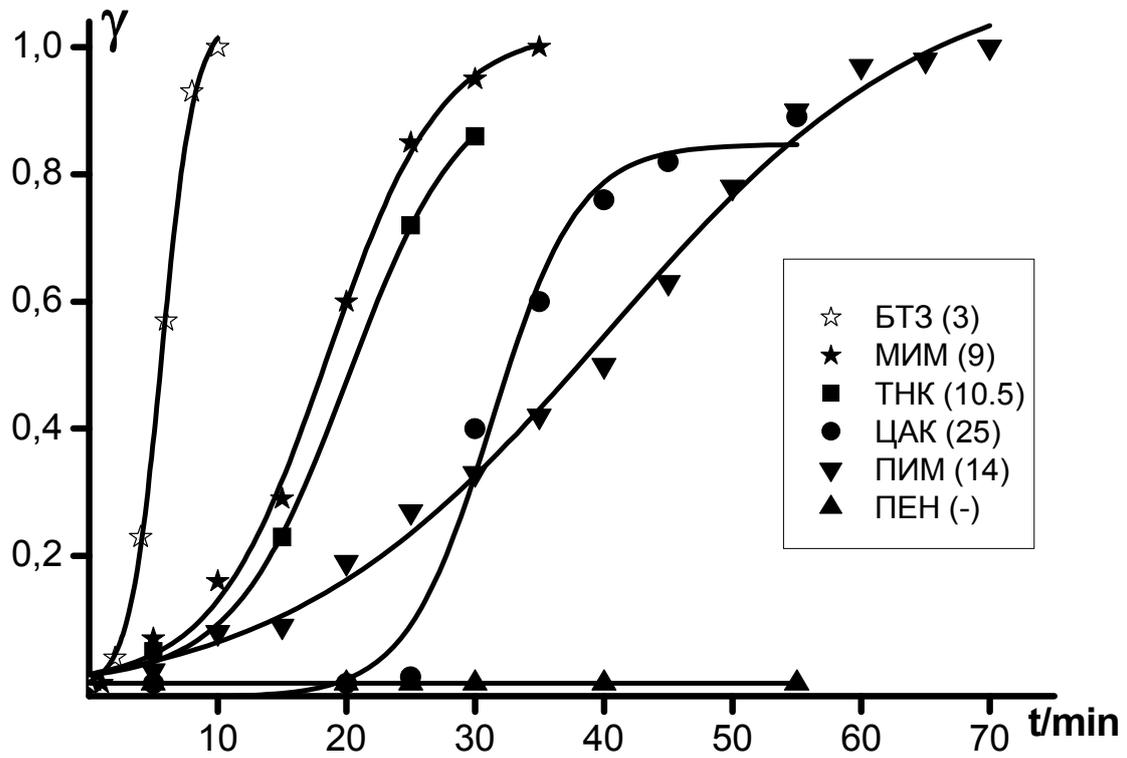


Рисунок 3.7 - Кинетика гемолиза эритроцитов под действием эквимольной (4×10^{-5} М) концентрации Б-ТНКЖ.

3.5 Зависимость гемолитического эффекта Б-ТНКЖ от гематокрита суспензии

Представляло интерес проанализировать зависимость обнаруженного нами гемолитического эффекта Б-ТНКЖ от гематокрита суспензии. Гематокрит – это принятая в физиологии и медицине характеристика, обозначающая процентное содержание клеток крови в объеме суспензии. На рисунке 3.8 показаны величины степени гемолита под действием одной и той же концентрации комплекса ТНК в суспензиях различного

гематокрита. Как видно из рисунка 3.8, с увеличением гематокрита суспензии гемолитический эффект ТНК резко снижается и, начиная с 5% гематокрита, не регистрируется совсем.

Стрелкой на рисунке показана величина гематокрита цельной крови (НСТ=45%). Сравнивая эту величину с величиной гематокрита суспензии,

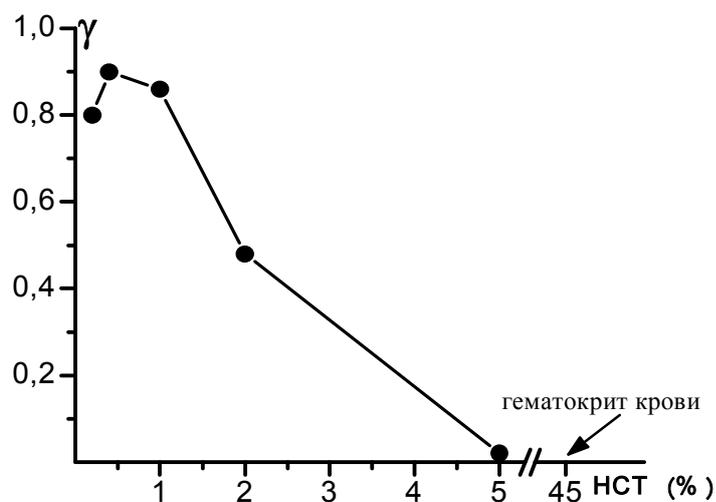


Рисунок 3.8 - Зависимость степени гемолита эритроцитов под действием ТНК от гематокрита суспензии. (ТНК – 10^{-4} М, время инкубации – 18 мин., 37°C).

которая использовалась в наших гемолитических исследованиях (НСТ=0.2%), можно определить коэффициент разбавления экспериментальной суспензии относительно цельной крови, равный 225. Таким образом, гемолитическое действие Б-ТНКЖ обнаруживается только на очень разбавленных суспензиях эритроцитов. В соответствии с этим данные наших экспериментов не могут служить основанием для неблагоприятного токсикологического прогноза при решении вопроса о возможном практическом применении Б-ТНКЖ в качестве доноров оксида азота в исследованиях *in vivo*. Вместе с тем несомненный интерес представляет изучение механизма лежащего в основе гемолитического действия Б-ТНКЖ.

3.6 Зависимость скорости гемолиза от температуры

Как известно в основе многих сложных макроскопических явлений в биологических системах лежат химические реакции. В связи с этим теоретическое описание зависимости скорости химической реакции от температуры, предложенное в конце еще 19 века Аррениусом, во второй половине 20 века стало широко использоваться в биофизике для анализа сложных процессов в биосистемах. Химический гемолиз эритроцитов можно считать классическим примером сложного макроскопического явления, основу которого составляют как химические, так и биохимические процессы, протекающие внутри клетки.

В связи с этим, исследование влияния температуры на скорость гемолиза в рамках уравнения Аррениуса может позволить сделать определенные выводы относительно механизма гемолиза в том или ином случае. Мы предприняли попытку сравнить влияние температуры на скорость гемолиза эритроцитов под действием одного из исследуемых нами комплексов, ТНК с гемолизом эритроцитов оксидативного типа, вызываемого известным инициатором пероксидного окисления – третбутилгидропероксидом (t-BuOOH). На рисунке 3.9 изображены кинетические кривые гемолиза эритроцитов под действием ТНК (А) и t-BuOOH (Б), полученные при четырех различных температурах. Для построения графиков в координатах Аррениуса в качестве оценки скорости гемолиза использовали величину, обратную времени достижения 50% гемолиза - $1/t_{\gamma(50)}$. Полученные таким образом графики Аррениуса для ТНК и t-BuOOH показаны на рисунке 3.10. Как известно, тангенс угла наклона графика Аррениуса характеризует величину энергии активации изучаемой химической реакции. Тот факт, что данные гемолитических экспериментов удается представить в аррениусовских координатах подтверждает наше первоначальное предположение о том, что гемолиз эритроцитов, в обоих случаях имеет химическую природу. Иначе говоря, к гемолизу приводит накопление химических модификаций в молекулярных структурах клетки. Природа этих модификаций хорошо изучена в случае t-BuOOH. Однако, как видно из рисунка 3.10 наклоны графиков Аррениуса для ТНК (1) и t-BuOOH (2) существенно различаются (тангенсы углов наклона

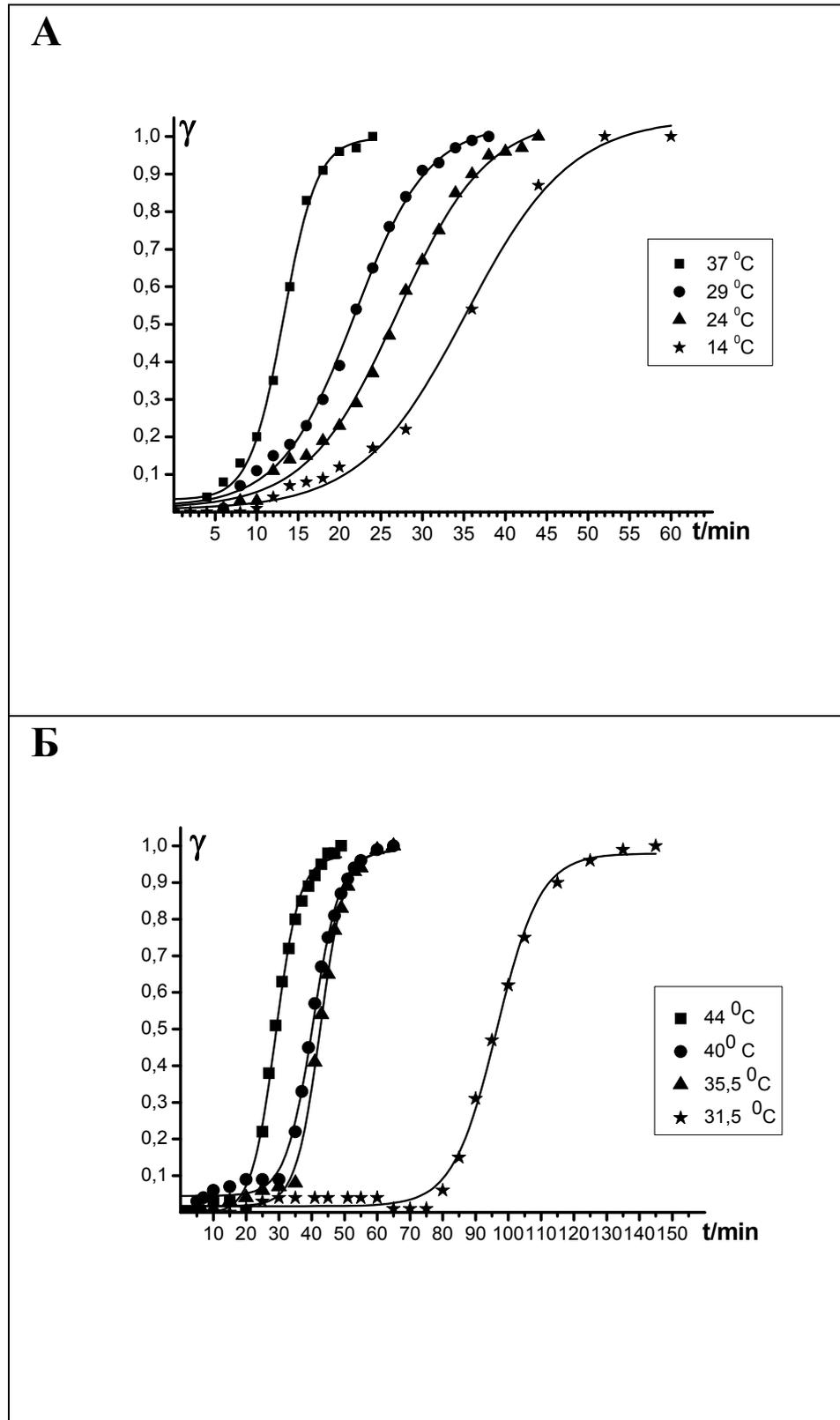
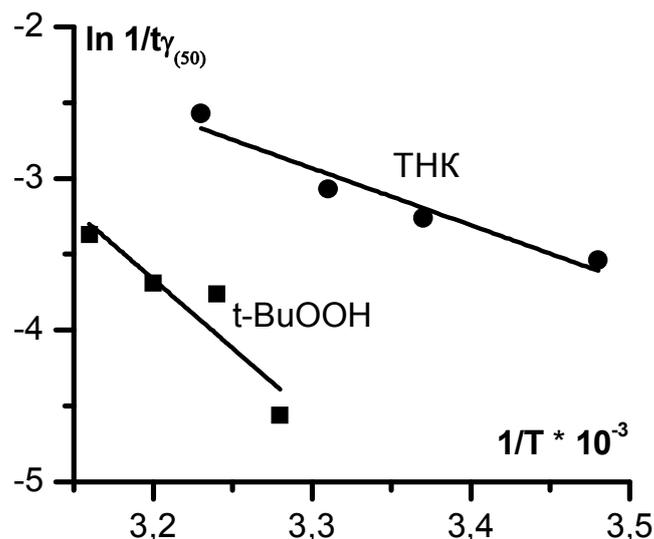


Рисунок 3.9 - Кинетика гемолиза 0.2 % суспензии эритроцитов под действием ТНК (А) и t-BuOOH (Б) при различных температурах.

графиков 1 и 2 равны 3.8 и 9.1, соответственно). Это может указывать на то, что в основе гемолиза под действием ТНК и t-BuOOH, возможно, лежат различные химические механизмы. В частности, существенно более низкая энергия активации гемолиза в случае Б-ТНКЖ может указывать на связь гемолитического



эффекта Б-ТНКЖ с нарушением работы ферментов. То есть в отличие от пероксидного гемолиза под действием t-BuOOH, гемолиз эритроцитов под действием Б-ТНКЖ может иметь в большей степени биохимическую основу.

Рисунок 3.10 - Зависимости скорости гемолиза от обратной температуры для ТНК (1) и t-BuOOH (2).

пероксидного гемолиза под действием t-BuOOH, гемолиз эритроцитов под действием Б-ТНКЖ может иметь в большей степени биохимическую основу.

3.7 Результаты ТБК-теста

В основе оксидативного гемолиза, инициируемого третбутилгидропероксидом, лежит процесс пероксидного окисления липидов эритроцитарной мембраны, приводящий к нарушению ее барьерных свойств [50]. Общеизвестным маркером пероксидного окисления в мембране считается образование ТБК-реактивных продуктов, главным из которых считается малоновый диальдегид. Представляло интерес выяснить, образуются ли ТБК-реактивные продукты в мембране под действием Б-ТНКЖ. На рисунке 3.11 показаны уровни образования ТБК-реактивных продуктов в суспензии эритроцитов под действием различных концентраций ТНК, ЦАК и t-BuOOH. Как видно из рисунка ни один из изученных в данном эксперименте Б-ТНКЖ не вызывал образования ТБК-реактивных продуктов. В то же время t-BuOOH показал характерное для него концентрационнозависимое нарастание уровня ТБК-реактивных продуктов. На основе полученного результата можно сделать вывод, что под действием изученных Б-ТНКЖ в условиях нашего эксперимента не происходит активации

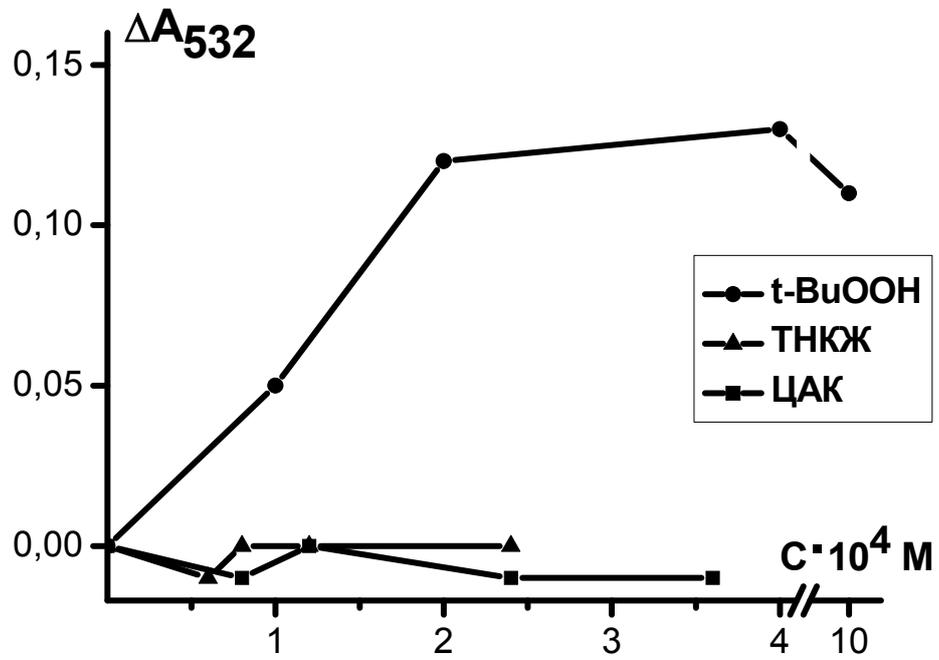


Рисунок 3.11 - Образование ТБК-реактивных продуктов в суспензии эритроцитов. Время инкубации реагентов с эритроцитами - 20 минут.

пероксидного окисления липидов эритроцитарной мембраны. Это означает, что пероксидное окисление липидов не может, скорее всего, рассматриваться в качестве молекулярной основы гемолиза эритроцитов под действием Б-ТНКЖ.

3.8 Гемолитическая активность Б-ТНКЖ: предварительные итоги

В целом на основе анализа полученных в данной главе результатов можно подвести итоги в виде предварительных выводов:

1. Пять из шести изученных нами Б-ТНКЖ оказывают концентрационнозависимый гемолитический эффект на суспензию эритроцитов 0,2 % гематокрита *in vitro*.
2. У комплекса ПЕН в диапазоне концентраций от 10^{-6} до 10^{-4} М гемолитической активности обнаружено не было.
3. По мере увеличения гематокрита суспензии эритроцитов гемолитический эффект снижается, исчезая при уровнях гематокрита 5% и выше. В связи с этим отсутствуют основания для неблагоприятного токсикологического прогноза при возможном практическом применении Б-ТНКЖ.
4. Гемолитический эффект БТЗ, ПИМ, ЦАК, ТНК, МИМ наблюдается в одной и той же области концентрации порядка 10^{-5} М), что может указывать на однотипный механизм гемолитического действия указанных Б-ТНКЖ.
5. Взаимосвязь между периодом индукции гемолиза и концентрацией Б-ТНКЖ описывается однотипными экспоненциальными зависимостями вида $y = Ae^{-kx}$, что может свидетельствовать о сходном механизме гемолиза.
6. Источником гемолитической активности Б-ТНКЖ, по-видимому, является выделяющийся из комплекса оксид азота.
7. Энергии активации гемолитического процесса под действием Б-ТНКЖ и третбутилгидропероксида существенно различаются, что может указывать на различие в молекулярных механизмах гемолиза.

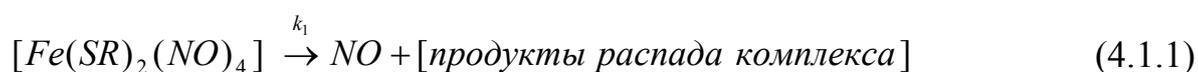
8. Молекулярный механизм гемолиза эритроцитов под действием Б-ТНКЖ, по-видимому, не включает стадию свободнорадикального пероксидного окисления липидов эритроцитарной мембраны.

Глава 4 Пероксинитрит как химический индуктор гемолиза эритроцитов

В ходе проведения гемолитических экспериментов при использовании достаточно высоких концентраций Б-ТНКЖ часто визуально наблюдали изменение окраски суспензии эритроцитов, что могло предположительно указывать на происходящие в системе химические изменения. Важно отметить, что данные изменения окраски предшествовали началу гемолиза. В связи с этим мы предприняли серию экспериментов, посвященных исследованию процессов, протекающих внутри эритроцитов под действием Б-ТНКЖ. После добавления Б-ТНКЖ к суспензии эритроцитов, клетки быстро гемолизировали дистиллированной водой и производили спектрофотометрическое исследование их внутреннего содержимого. При этом наблюдалась характерная качественная картина спектральных изменений, происходящих при окислении гемоглобина в метгемоглобин: уменьшение двух пиков оксигемоглобина в области 500-600 нм и одновременное появление «плеча» метгемоглобина в области 630 нм. Это согласуется с известными литературными данными, согласно которым оксид азота способен быстро реагировать с оксигемоглобином в свободном растворе с образованием метгемоглобина и нитрат-аниона. С учетом того, что клеточные мембраны не являются серьезным препятствием для диффузии оксида азота, в нашем случае можно было ожидать протекания указанной реакции внутри эритроцитов еще до их разрушения.

4.1 Эритроциты – Б-ТНКЖ: модель взаимодействия

По имеющимся оценкам [162], самопроизвольный распад Б-ТНКЖ с донированием NO подчиняется уравнению первого порядка с константой скорости $\sim 10^{-3} \text{ с}^{-1}$.



Выделяющийся оксид азота, способен, как уже говорилось выше, быстро проникать внутрь эритроцитов и реагировать с оксигемоглобином:



Таким образом, мы имеем дело с процессом, включающим две последовательно протекающие химические реакции. В эксперименте измеряется концентрация конечного продукта второй реакции, метгемоглобина ($HbFe^{3+}$). Поглощение оксида азота суспензией эритроцитов, включающее стадию его прохождения через эритроцитарную мембрану, по оценкам Лиу [116], протекает с меньшей скоростью, чем в свободном растворе, но все же со значительной константой скорости - $5.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. Для используемой концентрации гемоглобина $2 \times 10^{-4} \text{ M}$, образование метгемоглобина будет происходить с эффективной константой скорости псевдопервого порядка $10,4 \text{ c}^{-1}$, что в 10400 раз превышает константу скорости выделения NO из комплекса (k_1). Превышение скорости образования метгемоглобина относительно скорости выделения NO из комплекса более чем на четыре порядка позволяет считать суспензию эритроцитов в условиях нашего эксперимента надежной ловушкой оксида азота, выделяющегося из Б-ТНКЖ. Как известно, суммарная скорость процесса, включающего ряд последовательных стадий, определяется самой медленной из этих стадий. В нашем случае это означает, что эффективная константа скорости образования метгемоглобина ($k_{\text{эф}}$), будет с хорошей точностью количественно характеризовать скорость разложения комплекса, т.е. служить количественной оценкой NO-донирующей способности Б-ТНКЖ. Данная характеристика может быть использована для анализа взаимосвязи структура-активность в рядах синтезируемых комплексов, а также при первичном отборе Б-ТНКЖ для последующего углубленного изучения их фармакологической активности.

4.2 Кинетические закономерности образования внутриэритроцитарного метгемоглобина под действием Б-ТНКЖ

На рисунке 4.1 показаны кинетические кривые, характеризующие накопление метгемоглобина внутри эритроцитов [6, 21]. Как видно из рисунка накопление метгемоглобина в присутствии каждого из исследуемых комплексов идет с разной скоростью, что может быть связано с различиями в скоростях

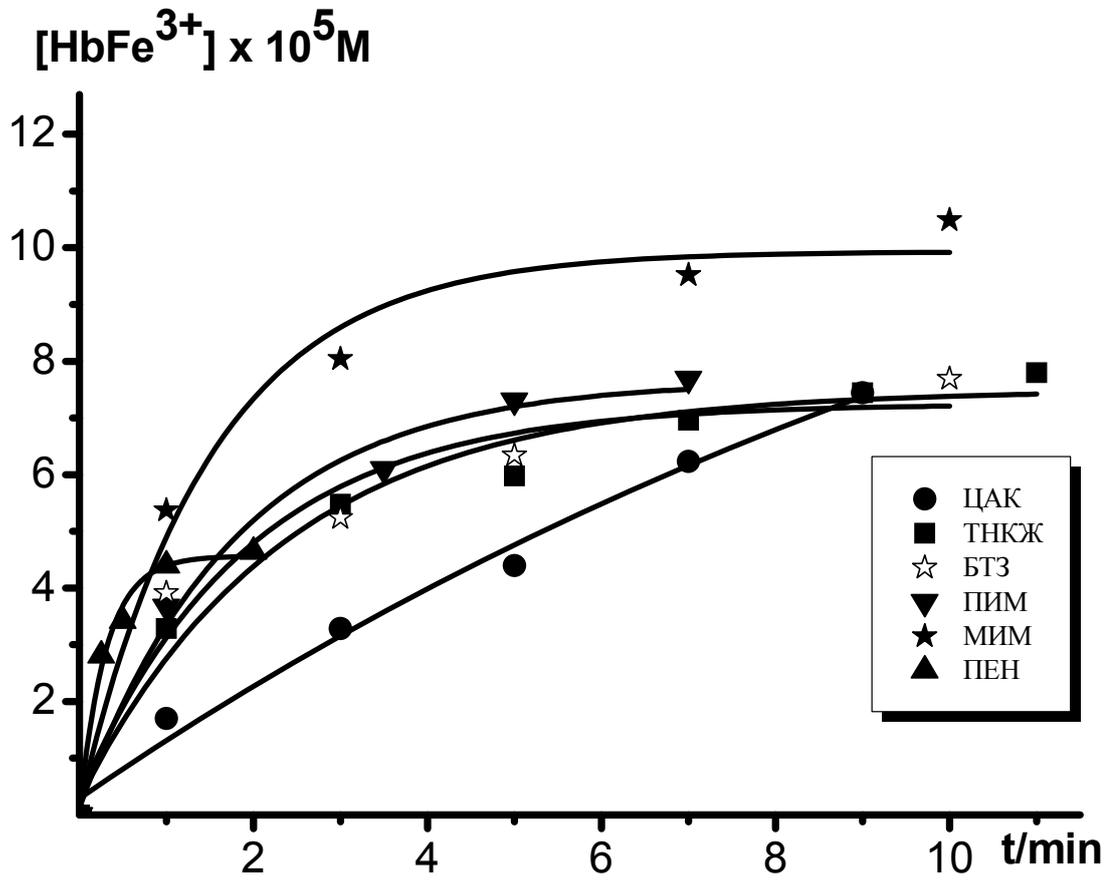


Рисунок 4.1 - Кинетика образования метгемоглобина внутри эритроцитов под действием Б-ТНКЖ. Содержание гемоглобина в суспензии $2 \times 10^{-4} \text{ M}$, концентрация ПЕН $2 \times 10^{-5} \text{ M}$, концентрация остальных Б-ТНКЖ - $1.2 \times 10^{-4} \text{ M}$.

гидролиза исследуемых комплексов. Анализ полученных данных показал, что кинетика образования метгемоглобина хорошо описывается эмпирическим уравнением вида:

$$y = A \cdot e^{-k_{\text{эф}}t} + y_0, \quad (4.2.1)$$

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

Показанные на рисунке 4.1 кинетические кривые были получены путем аппроксимации, полученных в кинетическом эксперименте значений концентраций метгемоглобина по уравнению 4.2.1. Для каждого из изученных Б-ТНКЖ были определены эффективные константы скорости образования метгемоглобина, $k_{\text{эф}}$, которые, как показано выше, могут служить количественной оценкой NO-донирующей способности Б-ТНКЖ (таблица 4.3.1).

4.3 Взаимосвязь между гемолитической активностью и NO-донирующей способностью Б-ТНКЖ

Далее представляет интерес рассмотреть, как соотносится NO-донирующая способность Б-ТНКЖ с ранее полученными нами оценками их гемолитической активности [6]. Постановка такого вопроса закономерно связана с выводом главы 3 нашей работы, согласно которому источником гемолитической активности Б-ТНКЖ является выделяемый ими в раствор оксид азота. В таблице 4.3.1 сопоставлены значения $k_{\text{эф}}$, характеризующие NO-донирующую способность изученных Б-ТНКЖ с ранее полученными величинами периодов индукции гемолиза (раздел 3.4), характеризующими их гемолитическую активность [6]. Как видно из таблицы наиболее слабый NO-донор, ЦАК ($k_{\text{эф}} = 1.2 \pm 0.8 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$) является одновременно наиболее слабым гемолитиком (I_{10} составляет 25 минут). Четыре других Б-ТНКЖ,

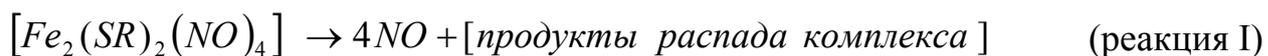
Таблица 4.3.1 - Взаимосвязь между гемолитической активностью и NO-донирующей способностью Б-ТНКЖ.

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

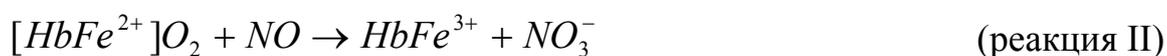
ТНК, ПИМ, МИМ и БТЗ, характеризуются более высокой NO-донирующей способностью ($k_{эф}$ лежит в пределах $(7-11 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1})$) и одновременно являются более сильными гемолитиками. В то же время самый сильный донор NO, ПЕН ($k_{эф} = 55 \pm 9 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$) при исследовании в широком диапазоне концентраций от 10^{-6} до 10^{-4} М, как мы помним, не показал никакого гемолитического эффекта. Таким образом, на основе этих данных пока трудно говорить о каком-либо однозначном 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.

4.4 Биохимическая трансформация оксида азота в эритроците

Анализ экспериментальных результатов в разделе 4.3 убеждает в необходимости подробно остановиться на механизмах биохимической трансформации оксида азота внутри эритроцита [18]. Современные представления о биохимических превращениях оксида азота внутри эритроцита, отдельные стороны, которых уже обсуждались нами ранее (разделы 1.5, 1.6.1, 4.1), отображены в виде общей схемы, показанной на рис. 4.2 [23]. В результате распада Б-ТНКЖ в раствор выделяется оксид азота:



Диффундируя внутрь эритроцита, оксид азота вступает в реакцию с оксигемоглобином:



Характерной особенностью эритроцита, отличающей его от других клеток, является то, что в нем поддерживается невысокий, но относительно постоянный уровень $\cdot O_2^-$, в силу его непрерывного образования в реакции автоокисления оксигемоглобина:



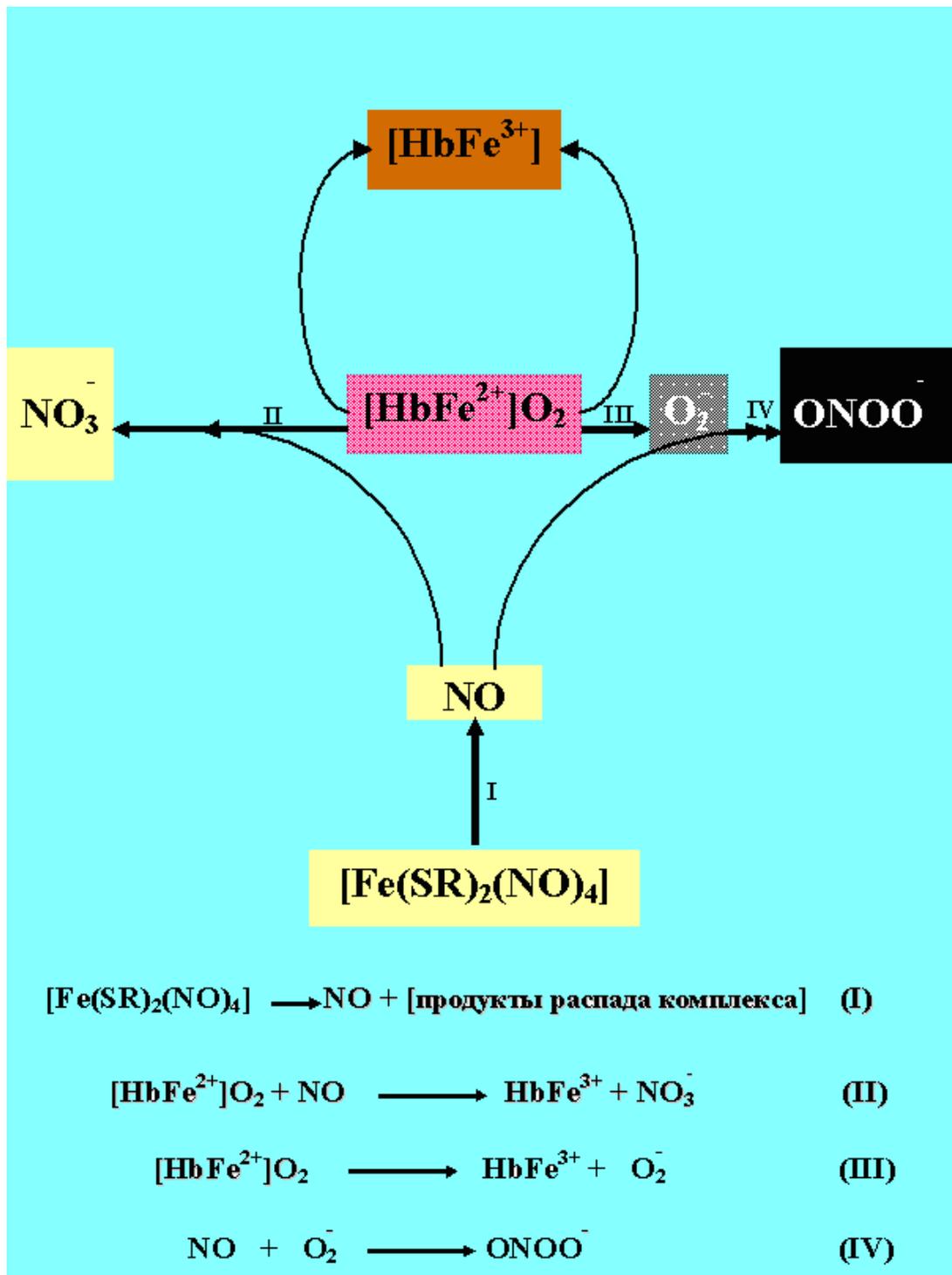


Рисунок 4.2 – Биохимические превращения оксида азота в эритроцитах.

Согласно современным представлениям, основным источником цитотоксичности оксида азота является не сам NO, а продукт его взаимодействия с супероксидным анион радикалом – пероксинитрит [28]:



Наличие в эритроците постоянного источника генерации супероксида, многочисленные литературные данные о цитотоксических свойствах пероксинитрита (раздел 1.5) и, наконец, прямые данные о гемолитическом действии синтетического пероксинитрита (раздел 4.6) позволяют предположить, что именно пероксинитрит является непосредственным химическим индуктором гемолитического процесса в нашей системе.

Как следует из схемы (рисунок 4.2), скорость образования пероксинитрита должна зависеть от соотношения скоростей реакций (II) и (III), имеющих в качестве общего исходного реагента оксигемоглобин. В силу конкурентных взаимоотношений между указанными процессами суммарное количество пероксинитрита, образующегося в эритроцитах в условиях наших гемолитических экспериментов будет сложным образом зависеть от начальной концентрации донора и константы скорости донирования.

В последующих разделах данной главы мы постараемся проверить и дополнительно обосновать предложенный здесь путь генерации пероксинитрита как химического механизма индукции гемолиза эритроцитов под действием Б-ТНКЖ.

4.5 Кинетическое моделирование генерации пероксинитрита в условиях гемолитического эксперимента

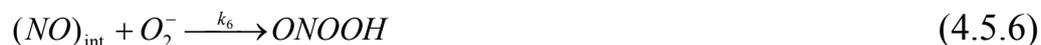
Ранее (раздел 3.1), мы уже указывали, что химический гемолиз эритроцитов феноменологически представляет собой макроскопическое следствие развивающихся во времени микроскопических (молекулярных) изменений внутри клетки. При этом мы имеем в виду, что разрушение сложной конструкции должно наступать в результате накопления в ней микромодификаций до определенного порогового уровня. Подобные явления, характерные для биологических систем, отличающихся многоуровневой иерархической

организацией, получили свое теоретическое воплощение в известной теории мишеней.

Пероксинитрит является сильным окислителем, благодаря чему он способен вызывать повреждения широкого спектра молекулярных мишеней в клетке (раздел 1.5). В соответствии с этим пороговому уровню повреждений клетки, приводящему к гемолизу, должна соответствовать пороговая концентрация пероксинитрита, образовавшегося в клетке от момента введения в систему донора оксида азота. Следует уточнить, что в реальности пероксинитрит в клетке в больших количествах не накапливается, в силу его высокой реакционной способности. Однако в клетке физически накапливаются повреждения ее молекулярных структур, вызванные пероксинитритом. Поэтому интегральное количество выделившегося в клетке пероксинитрита, как мы полагали, должно было прямо соотноситься с интегральным количеством возникших в клетке повреждений и, следовательно, определять порог гемолиза клетки. В связи с этим мы сочли возможным не усложнять модель рассмотрением реакций расходования пероксинитрита.

Целью кинетического моделирования было получение временных зависимостей концентрации пероксинитрита, образовавшегося в клетке от момента введения в систему донора оксида азота.

Для достижения поставленной цели было проведено численное исследование системы уравнений, моделирующей процесс генерации пероксинитрита в эритроците при разложении Б-ТНКЖ. Процесс был формализован в виде следующей схемы реакций:



При написании уравнений использованы следующие обозначения:

A – биядерный тетранитрозильный комплекс железа $Fe(SR)_2(NO)_4$;

$(NO)_{ext}$ – оксид азота, находящийся в объеме вне эритроцитов;

$(NO)_{int}$ – оксид азота внутри эритроцитов;

HbO_2 – оксигемоглобин;

$metHb$ – метгемоглобин.

Данная схема превращений включает реакции биохимической трансформации оксида азота NO в эритроцитах (реакции 4.5.1; 4.5.4; 4.5.5; 4.5.6 в соответствии с рисунком 4.2). Кроме того, в ней учитывается жидкофазное взаимодействие с кислородом молекул оксида азота, находящихся вне эритроцитов (реакция 4.5.2), а также процесс переноса оксида азота через плазматическую липидную мембрану внутрь эритроцита (реакция 4.5.3).

Исходя из литературных данных [162] константе скорости донирования NO было придано значение порядка $k_1 = \sim 10^{-3} \text{ с}^{-1}$. Значения остальных констант основывали на литературных данных: $k_2 = 8.8 \cdot 10^6 \text{ л}^2/(\text{моль}^2 \cdot \text{с})$ [10]; $k_4 = 3.4 \cdot 10^7 \text{ л}/(\text{моль} \cdot \text{с})$ [62]; $k_5 = 8 \cdot 10^{-6} \text{ с}^{-1}$ [83]; $k_6 = \sim 10^8 \text{ л}/(\text{моль} \cdot \text{с})$ [163]. Для оценки константы переноса оксида азота через липидную мембрану из объема суспензии внутрь эритроцита (реакция 4.5.3) были использованы данные работы [116], в которой авторы оценили скорость убыли молекул NO в присутствии эритроцитов: $7.74 \cdot 10^{-8} \text{ с}^{-1}$ при концентрации эритроцитов 1 клетка/мл. Поскольку в наших экспериментах концентрация эритроцитов составляла $\sim 10^7$ клеток/мл, для расчетов было взято приближенное значение $k_3 = 1 \text{ с}^{-1}$.

Концентрация гемоглобина внутри эритроцита мыши была определена нами по данным [160] и в расчетах принята равной, $[Hb]_0 = 2 \times 10^{-2} \text{ моль/л}$. Концентрация кислорода в системе принята постоянной и равной $[O_2] = 2 \cdot 10^{-4} \text{ моль/л}$ (опыты проведены на воздухе в открытой перемешиваемой системе). Начальные концентрации нитрозильных комплексов варьировались в интервале $A_0 = (1 \div 20) \cdot 10^{-5} \text{ М}$, как это было в экспериментах.

При заданных значениях кинетических параметров рассматриваемый процесс обладает рядом особенностей. В частности, он протекает в квазистационарном режиме относительно концентрации $[\text{NO}]_{\text{int}}$ внутри эритроцитов и описывается следующей системой дифференциальных уравнений:

$$d[\text{A}]/dt = -k_1[\text{A}] \quad (4.5.7)$$

$$d[\text{NO}]_{\text{ext}}/dt = k_1[\text{A}] - 2k_6[\text{O}_2][\text{NO}]_{\text{ext}}^2 - k_3([\text{NO}]_{\text{ext}} - [\text{NO}]_{\text{int}}) \quad (4.5.8)$$

$$d[\text{HbO}_2]/dt = -k_4[\text{HbO}_2][\text{NO}]_{\text{int}} - k_5[\text{HbO}_2] \quad (4.5.9)$$

$$d[\text{O}_2^-]/dt = k_5[\text{HbO}_2] - k_6[\text{O}_2^-][\text{NO}]_{\text{int}} \quad (4.5.10)$$

$$d[\text{ONOO}^-]/dt = k_6[\text{O}_2^-][\text{NO}]_{\text{int}} \quad (4.5.11)$$

$$[\text{NO}] = \delta_v \cdot k_3([\text{NO}]_{\text{ext}}) / (\delta_v \cdot k_3 + k_4[\text{HbO}_2] + k_6[\text{O}_2^-]) \quad (4.5.12)$$

Здесь $\delta_v=500$ – отношение объема среды вне эритроцитов к внутреннему объему эритроцитов (соответствует гематокриту системы 0.2 %).

На рисунке 4.3 А представлены расчетные кинетические кривые образования пероксинитрита при значении константы донирования NO нитрозильными комплексами $k_1 = 3 \cdot 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, соответствующие различным начальным концентрациям комплекса, A_0 . Видно, что за время счетного эксперимента (2500 с) достигаются значительные уровни пероксинитрита (до 160 μM), совпадающие с областью концентраций, при которых, по литературным данным, вызывал гемолиз синтетический пероксинитрит [111].

Модельный эксперимент позволяет нам получить количественную интерпретацию влияния эффекта конкуренции реакциям II и III (рисунок 5) на накопление пероксинитрита в клетке. Видно, что в пределах исследованного временного интервала (0 - 2500с) при малых концентрациях комплекса наблюдается монотонный рост концентрации пероксинитрита (кривые 1-3). С увеличением концентрации Б-ТНКЖ на кривых появляется характерная точка перегиба, соответствующая максимальному значению скорости генерации пероксинитрита в данном опыте (кривые 4-7). Далее по мере снижения скорости генерации пероксинитрита кривая выходит к предельному значению накопленной концентрации пероксинитрита в данном опыте. Предельная ситуация физически соответствует полному израсходованию оксигемоглобина, и, соответственно,

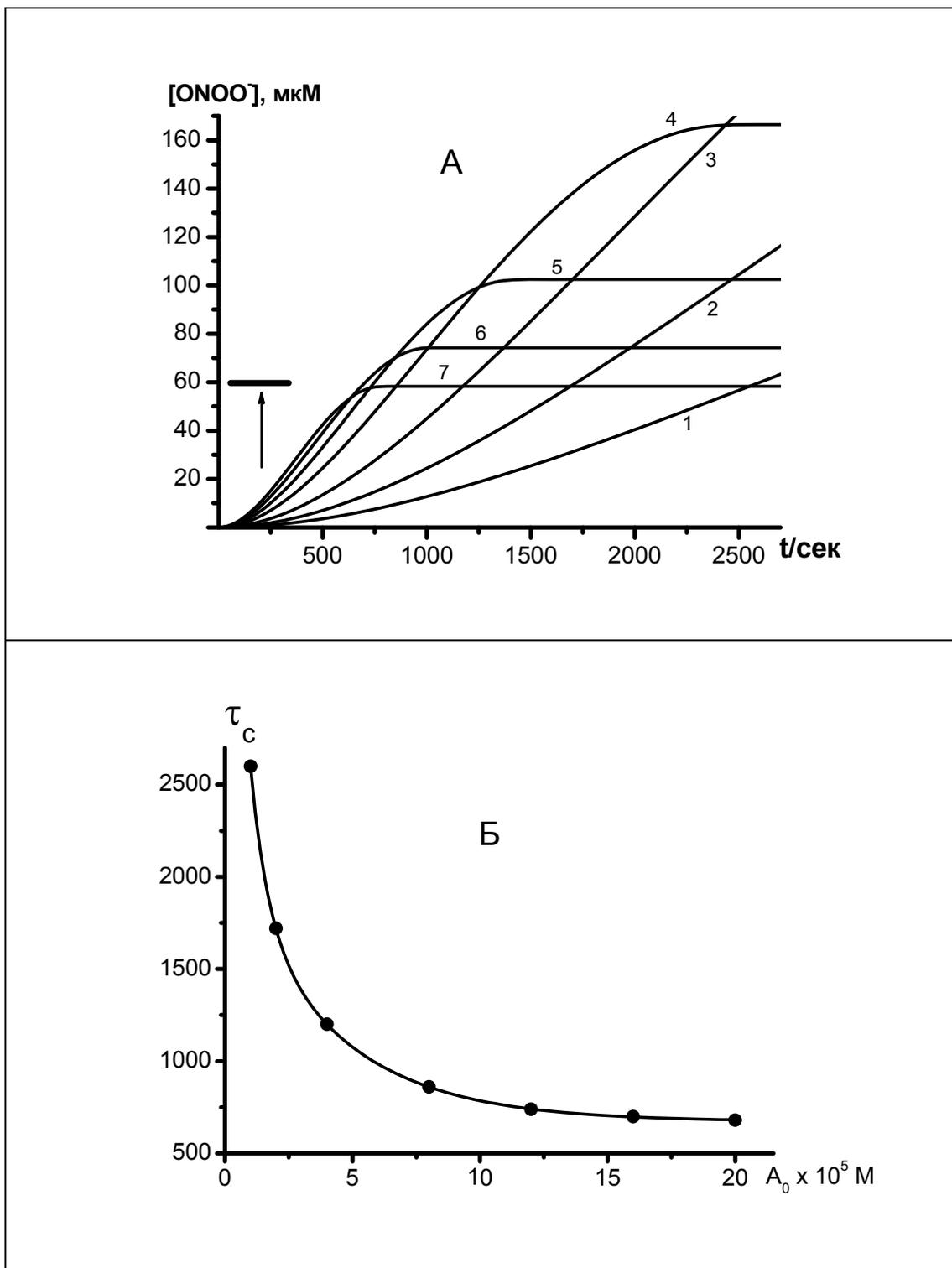


Рисунок 4.3 А – Расчетные кинетические кривые накопления пероксинитрита в опытах с разными начальными концентрациями Б-ТНКЖ. Концентрации комплекса $A_0 \cdot 10^5 \text{ M}$: 1 (1), 2 (2), 4 (3), 8 (4), 12 (5), 16 (6), 20 (7); $k_1 = 3 \cdot 10^{-4} \text{ c}^{-1}$.
Б – Зависимость времени достижения концентрации $[\text{ONOO}^-] = 60 \mu\text{M}$ (τ_c) от начальной концентрации Б-ТНКЖ.

прекращению генерации супероксида O_2^- . Важно отметить, что с ростом концентрации донора предельные уровни (кривые 4-7) градуально снижаются.

При анализе результатов кинетического моделирования необходимо учитывать, что физически клетка доживает лишь до определенного порогового значения суммарной концентрации пероксинитрита, вызывающего ее гемолиз. Как видно из рисунка, пороговое значение концентрации пероксинитрита, вызывающее гемолиз не может превышать 60 мкМ, так как только при этом условии гемолиз будет наблюдаться во всех опытах каждой серии, как это происходило в экспериментах. В противном случае (если порог гемолиза выше 60 мкМ), предельные концентрации пероксинитрита в некоторых опытах окажутся ниже пороговых, т.е. в них не будет гемолиза. Принимая для определенности величину в 60 мкМ в качестве порога гемолиза, мы построили зависимость времени достижения (τ_c) указанной пороговой концентрации пероксинитрита от начальной концентрации Б-ТНКЖ, A_0 . На рисунке 4.3 показан результат аппроксимации полученных точек затухающей экспоненциальной функцией. Таким образом можно сделать вывод, что полученная модельная зависимость $\tau_c = f(A_0)$ качественно соответствует экспериментальной зависимости периода индукции от начальной концентрации комплексов, наблюдавшейся нами на экспериментальных зависимостях периодов индукции гемолиза от концентрации Б-ТНКЖ (рисунки 3.3 – 3.5).

Как уже было отмечено, предельные уровни образования пероксинитрита градуально снижаются с ростом концентрации Б-ТНКЖ (кривые 4-7). Аналогичное снижение предельного уровня образования пероксинитрита может происходить также с увеличением константы скорости генерации оксида азота (константа k_1). На рисунке 4.4 А показаны результаты расчета кинетики генерации пероксинитрита при условиях аналогичных предыдущим, но с увеличенной на порядок скоростью генерации NO ($k_1 = 3 \cdot 10^{-3} \text{ c}^{-1}$). В этом случае все кривые за расчетное время успевают выйти или приблизиться к предельным значениям. Однако даже максимально достигнутое предельное значение (кривая

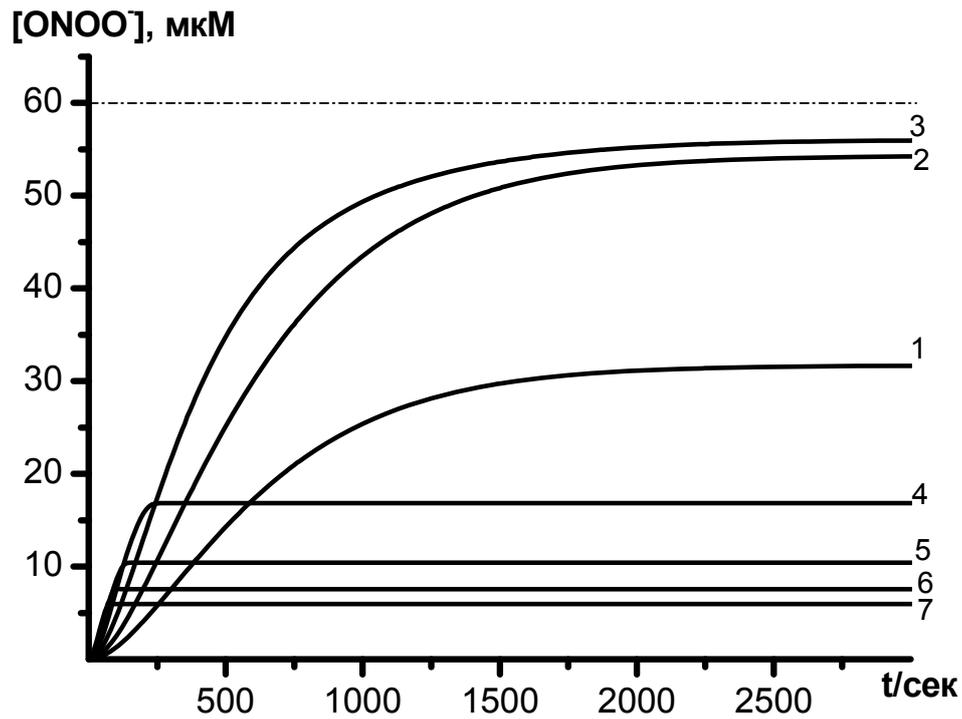


Рисунок 4.4 – Расчетные кинетические кривые накопления пероксинитрита в опытах с разными начальными концентрациями нитрозильных комплексов $[A]_0 \cdot 10^5 = 1$ (1), 2 (2), 4 (3), 8 (4), 12 (5), 16 (6), 20 (7) моль/л; $k_1 = 3 \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$.

3) в этом случае не превышает порогового значения в 60 мкМ. Предельные значения для остальных кривых оказались значительно ниже порогового. Это означает, что в присутствии нитрозильного комплекса 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 (раздел 4.3, таблица 4.3.1). Как мы помним, ПЕН, в отличие от всех остальных Б-ТНКЖ, не вызывал в наших экспериментах гемолиза эритроцитов.

4.6 Гемолитическое действие синтетического пероксинитрита

В 1997 году появилась работа Kondo и соавторов [111], выполненная под руководством известного специалиста в области гемолиза эритроцитов Etsuo Niki. В данной работе авторы впервые наблюдали гемолитический эффект синтетического пероксинитрита в концентрациях от 0.1 – 0.5 mM при 37 °C на суспензии эритроцитов с гематокритом 5-10 %. Предполагая, что причиной гемолиза может быть пероксидативный процесс в эритроцитарной мембране, авторы сравнили действие известного инициатора пероксидного окисления липидов ААРН (2,2'-азобис-2-амидинопропан) с действием пероксинитрита. Оказалось, что пероксинитрит, в отличие от ААРН не вызывал образования липидных гидропероксидов в мембране. На основе этого авторы заключили, что пероксинитрит индуцирует гемолиз эритроцитов без активации пероксидного окисления липидов мембраны. Этот результат прямо соотносится с результатом нашей работы. Мы также обнаружили, что Б-ТНКЖ, в отличие от известного инициатора пероксидного окисления третбутилгидропероксида, не вызывают образования ТБК-реактивных продуктов пероксидного окисления липидов в эритроцитах (раздел 3.7, рисунок 3.11).

Кроме того, Kondo et al. установили, что гемолиз, вызываемый пероксинитритом, практически полностью подавлялся при добавлении тиолсодержащих антиоксидантов глутатиона или N-ацетилцистеина. В то же время антиоксиданты с антирадикальным механизмом действия (мочевая кислота,

тролокс, SOD), были практически неэффективны. Это полностью согласуется с нашим предположением о том, что механизм наблюдаемого нами пероксинитритзависимого гемолиза эритроцитов отличается от свободнорадикального. И, одновременно, эти данные Kondo et al. прямо указывают на то, что механизм гемолитического действия пероксинитрита реализуется через инактивацию тиолов, что непосредственно вписывается в предполагаемый нами механизм гемолиза под действием Б-ТНКЖ (смотри раздел, 4.5).

Интересно, что авторы обсуждаемой работы после обнаружения эффекта синтетического пероксинитрита предприняли безуспешную попытку вызывать гемолиз эритроцитов, используя, известный донор оксида азота SIN-1. Как мы помним, наш гемолитический эффект наблюдается только при очень малых значениях гематокрита (0,2%) и быстро ослабевает с его увеличением (раздел 3.5, рисунок 3.8). В частности, при гематокрите 5%, который использовали Kondo и соавторы в своей работе, у нас гемолиза также уже не наблюдалось.

Однако, как видно из результатов нашей работы, одним влиянием фактора гематокрита дело не ограничивается. Гемолиз эритроцитов в присутствии экзогенного донора может происходить только при оптимальном соотношении ряда взаимосвязанных граничных условий (гематокрит, константа скорости генерации NO, начальная концентрация донора), обеспечивающих превышение пороговой по гемолизу концентрации пероксинитрита в клетке.

4.7 Сульфгидрильные мишени пероксинитрита в эритроците

К настоящему времени механизмы развития пероксинитритзависимой цитотоксичности достаточно хорошо изучены (смотри раздел 1.5.1). Так принято выделять два базовых механизма метаболических превращений пероксинитрита, обуславливающих его цитотоксичность. Во-первых, это прямое окисление центров переходных металлов и сульфгидрильных групп в ферментах и низкомолекулярных тиолах. Во-вторых, это повреждение биологических мишеней, опосредованное свободными радикалами, образующимися из

пероксинитрита. Согласно литературным данным радикальные продукты разложения пероксинитрита способны запускать процесс свободнорадикального пероксидного окисления липидов мембран. Однако полученные нами данные это предположение в отношении эритроцитов не подтвердили (раздел 3.7). Этот результат находится в соответствии, как уже сказано, с данными Kondo и соавторов о гемолитическом действии синтетического пероксинитрита, которые подробно обсуждались выше (раздел 4.6). В связи с этим в решении вопроса о механизме пероксинитритзависимого гемолитического действия Б-ТНКЖ мы остановились на первом механизме действия пероксинитрита, связанным с ковалентной модификацией сульфгидрильных групп в активных центрах ферментов.

Анализируя механизм гемолитического действия Б-ТНКЖ, мы обратили внимание на данные Татьяненко и соавторов об ингибировании Ca^{2+} АТФ-азы саркоплазматического ретикулула мышечных клеток под действием Б-ТНКЖ [24]. Учитывая известное структурное родство различных АТФ-аз эти данные можно было распространить и на Na^+/K^+ -АТФазу мембраны эритроцитов. Это предположение прямо подтверждают данные работ [138, 174], в которых была продемонстрирована инактивация Na^+/K^+ -АТФазы мембраны эритроцитов под действием синтетического пероксинитрита, связанная с окислительной модификацией цистеиновой SH-группы в активном центре. Как известно инактивация данного фермента приводит к нарушению осмотического равновесия клетки, приводящему к ее осмотическому набуханию и, в конечном счете, к гемолизу. Вместе с тем следует понимать, что пероксинитрит действует в эритроците на широкий набор других сульфгидрильных мишеней. Инактивация этих мишеней, включая окисление внутриклеточного глутатиона, также может вносить вклад в гемолитический эффект Б-ТНКЖ, который мы наблюдаем в данной работе.

Глава 5 NO-донирующая способность биядерных тетранитрозильных комплексов железа в присутствии эритроцитов

Важным свойством, определяющим перспективу практического применения Б-ТНКЖ, является их NO-донирующая способность. Как видно из ранее полученных нами результатов эта характеристика существенным образом зависит от входящих в состав комплексов тиолсодержащих лигандов. Так среди исследуемых нами в данной работе шести Б-ТНКЖ самый слабый (ЦАК) и самый сильный (ПЕН) доноры различаются по NO-донирующей способности почти в 50 раз (раздел 4.3). С теоретической точки зрения такое значительное влияние химической природы тиолсодержащего лиганда на эффективность донирования NO комплексом не вызывает удивления. Известно, что лиганды существенным образом влияют на характер распределения электронной плотности в комплексе.

Значительно больший интерес вызывали у нас появившиеся в последние годы сообщения о стабилизирующем влиянии сывороточного альбумина и гемоглобина на скорость разложения Б-ТНКЖ на основе тиосульфата и пиридина [13, 159]. Эти сообщения свидетельствовали об определенном влиянии среды инкубации на NO-донирующую способность Б-ТНКЖ.

Насколько нам известно, при изучении других классов доноров оксида азота, вопроса о каком-либо существенном влиянии среды инкубации на NO-донирующую способность донора не возникало. В связи с этим актуальной проблемой является выяснение механизмов влияния среды инкубации на NO-донирующую способность Б-ТНКЖ. В разделе 4.1. мы обосновали возможность использования суспензии эритроцитов в качестве ловушки оксида азота, позволяющей получить количественную оценку NO-донирующей способности Б-ТНКЖ. Но суспензия эритроцитов является также и моделью внутреннего содержимого кровеносного сосуда, с помощью которой можно исследовать влияние клеточной среды на донирование NO.

5.1. Влияние клеточной среды на скорость разложения Б-ТНКЖ

Для изучения влияния клеточной среды на NO-донирующую способность Б-ТНКЖ мы предприняли две серии экспериментов по исследованию кинетики образования внутриэритроцитарного метгемоглобина под действием Б-ТНКЖ. В первой серии экспериментов варьировали концентрацию эритроцитов в суспензии (4-5 концентраций) при неизменной концентрации комплекса. Во второй серии экспериментов изменяли концентрацию комплекса (4-5 концентраций) при неизменной концентрации эритроцитов. На рисунке 5.1 (А–D) показаны кинетические кривые образования внутриэритроцитарного метгемоглобина под действием четырех Б-ТНКЖ в суспензиях эритроцитов различного гематокрита (первая серия экспериментов) [7, 19, 22]. Гематокрит (процентное содержание клеток в объеме суспензии) изменялся в этих экспериментах в пределах 0.8% - 4%. Этому диапазону соответствовало изменение концентрации внутриклеточного гемоглобина $(1 - 5) \times 10^{-4}$ моль·л⁻¹ в расчете на гем (концентрации гемоглобина показаны на врезках справа). Как видно из рисунка, за стандартное время эксперимента (15-17 минут), с учетом начальной концентрации комплексов МИМ, ЦАК; БТЗ; ПИМ ($1,2 \times 10^{-4}$ М) и стехиометрии последовательно протекающих реакций (4.1.2) и (4.1.3), 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 мы определили ранее (уравнение 4.2.1), может служить характеристикой NO-донирующей способности комплекса. Оказалось, однако, что значение данной константы является переменной величиной и находится в определенной зависимости от гематокрита суспензии. Эти зависимости показаны в рамках, расположенных под основным рисунком. Видно, что во всех случаях (А-D) наблюдается снижение эффективной константы скорости образования метгемоглобина с увеличением гематокрита суспензии. Это означает, что NO-донирующая способность МИМ, ЦАК, БТЗ,

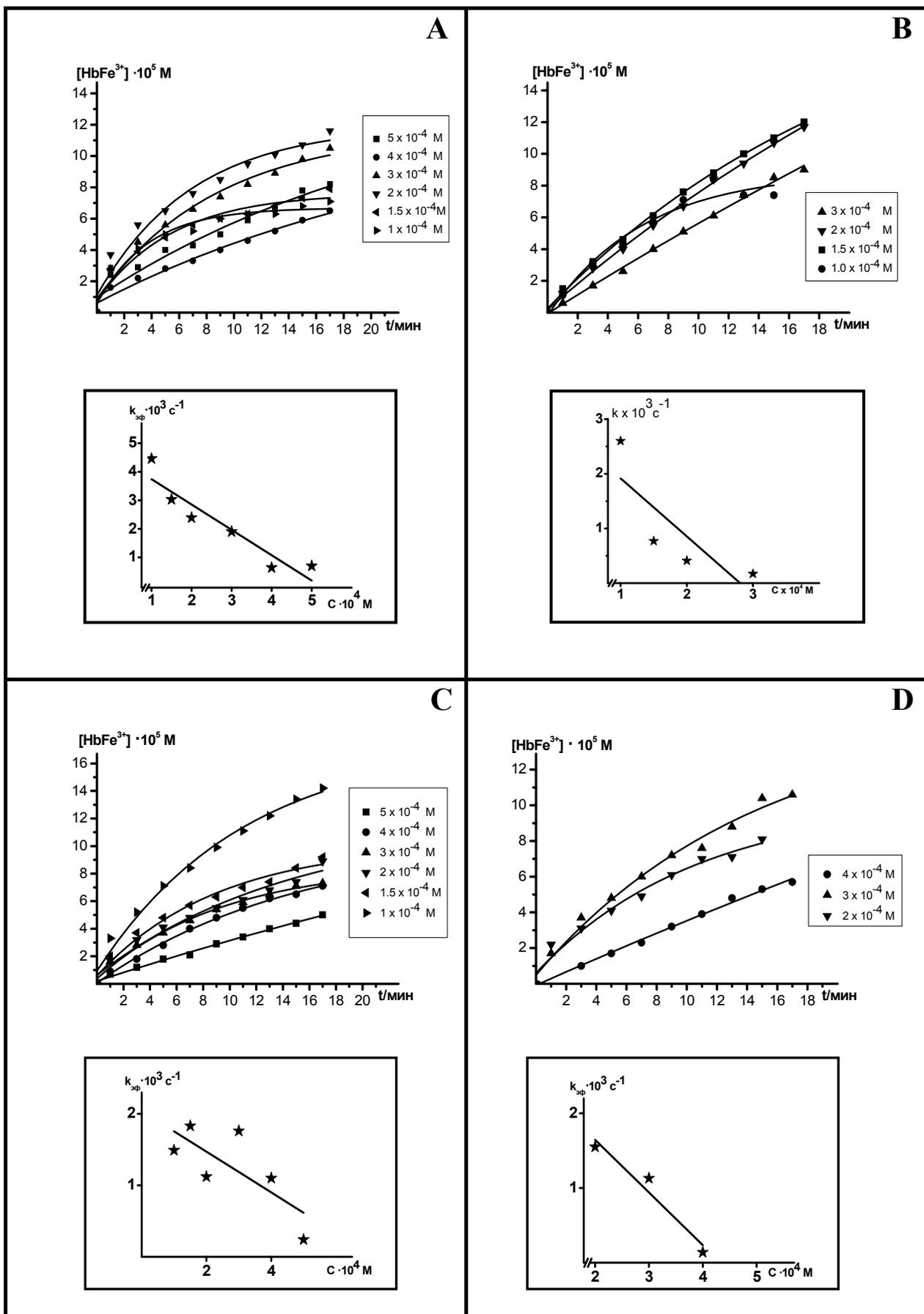


Рисунок 5.1 - Кинетика образования метгемоглобина в суспензиях эритроцитов различного гематокрита под действием Б-ТНКЖ. А – МИМ, В-ЦАК, С-БТЗ, Д–ПММ. Концентрации Б-ТНКЖ – 1.2×10^{-4} моль·л⁻¹. Концентрации гемоглобина указаны на врезках.

ПИМ не является постоянной величиной, а зависит от концентрации эритроцитов в суспензии.

На рисунке 5.2 (A-D) показаны кинетические кривые образования внутриэритроцитарного метгемоглобина под действием четырех Б-ТНКЖ в суспензиях с одинаковым гематокритом, но с переменной концентрацией комплекса (вторая серия экспериментов) [8]. Концентрация гемоглобина во всех образцах была 2×10^{-4} М. Концентрация комплекса указана на врезках. Для каждой кинетической кривой определили величину $k_{эф}$. Как и в предыдущем случае, данная константа оказалась переменной величиной, зависящей от концентрации комплекса, что показано на нижних рисунках в каждой из ячеек. Это означает, что и в этой серии экспериментов NO-донирующая способность Б-ТНКЖ является переменной величиной, зависящей в этом случае от концентрации комплекса.

Таким образом, на основе полученных данных могут быть сделаны следующие выводы:

1. NO-донирующая способность Б-ТНКЖ не является постоянной величиной, а зависит от условий эксперимента.
2. В первой серии величины $k_{эф}$ убывают с ростом концентрации эритроцитов. Во второй серии величины $k_{эф}$ возрастают с ростом концентрации комплекса.

Указанные закономерности требуют объяснения, так как они не согласуются с приведенной выше простой химической моделью процессов, протекающих в системе (раздел 4.1, уравнения 4.1.2 и 4.1.3) в соответствии с которой $k_{эф}$ не может быть переменной величиной. Это может указывать на присутствие в исследуемой системе дополнительных факторов, не учитываемых в рамках данной модели.

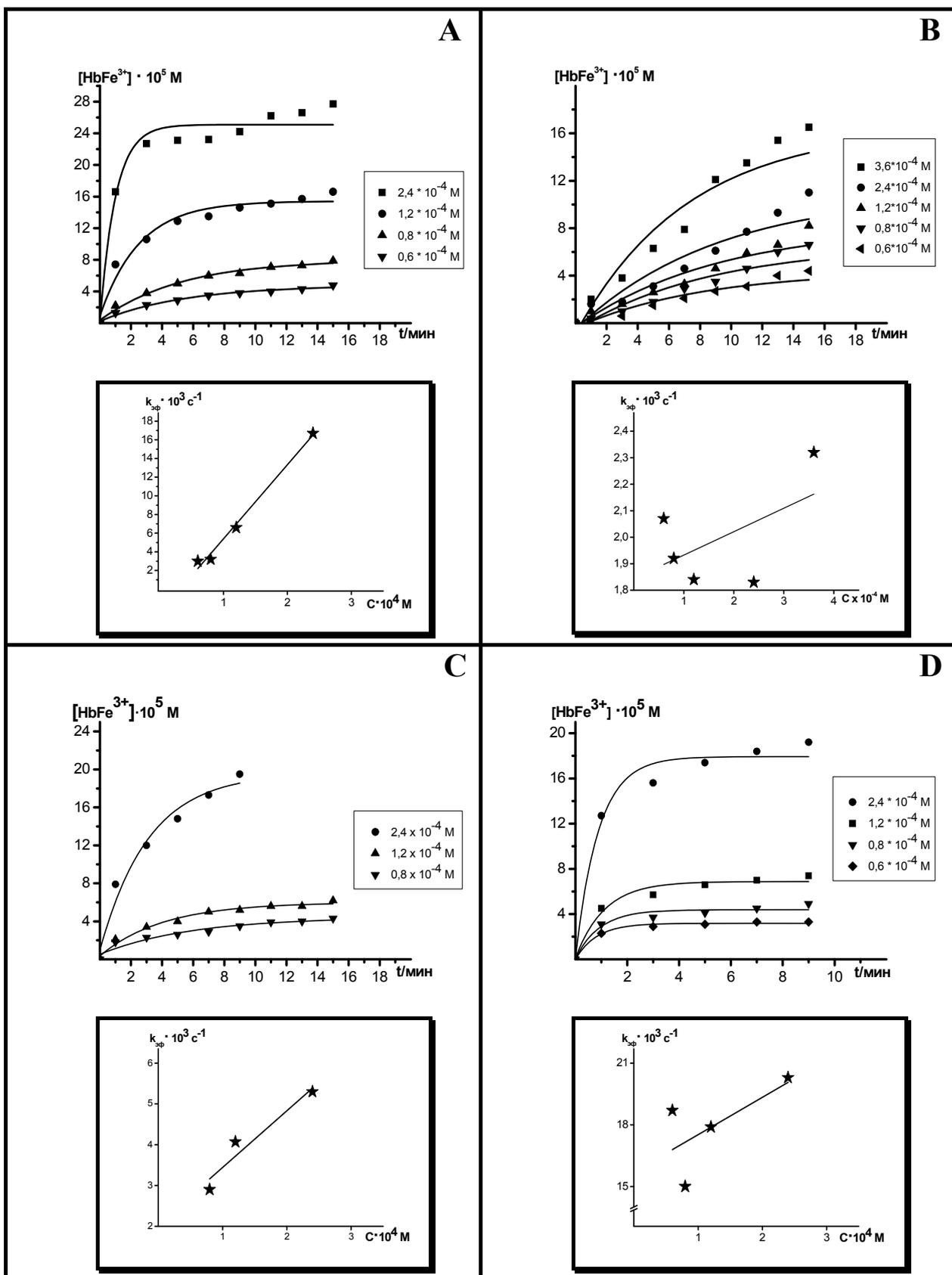


Рисунок 5.2 - Кинетика образования метгемоглобина под действием Б-ТНКЖ. в суспензиях с различной концентрацией комплекса. А – МИМ, В-ЦАК, С-БТЗ, Д–ПИМ. Концентрация гемоглобина – $2 \times 10^{-4} M$. Концентрации Б-ТНКЖ указаны на врезках.

5.2 NO-донирующая способность ПЕН

Принципиально иным оказалось поведение комплекса ПЕН (рисунок 5.3 А) [7, 8, 22]. Первое, что отличает ПЕН от остальных четырех комплексов это высокая NO-донирующая способность. Концентрация ПЕН в экспериментах была снижена в 6 раз в сравнении с остальными комплексами, чтобы в системе не происходило полного окисления гемоглобина. Видно, что за 0,5-1 мин достигается предельное значение концентрации NO согласно стехиометрии процесса (уравнение 4.1.2 и 4.1.3).

Посмотрим теперь, как ведет себя ПЕН во второй серии экспериментов, то есть при постоянной концентрации эритроцитов и переменной концентрации ПЕН (рисунок 5.3 Б). Пунктирными линиями показаны максимально возможные значения концентрации NO в соответствии со стехиометрией процесса. Как видим, при всех четырех концентрациях ПЕН достигается стехиометрически предельно возможное значение концентрации NO.

Таким образом, как в первой, так и во второй серии экспериментов разложение ПЕН происходит в полном соответствии со стехиометрией процесса с выделением в раствор практически 100% имеющихся NO-групп. Помимо прочего этот факт служит экспериментальным обоснованием как самой возможности использования суспензии эритроцитов в качестве ловушки оксида азота, так и ее методической реализации в рамках нашей работы.

Но самым характерным отличием ПЕН от остальных комплексов является то, что его NO-донирующая способность в условиях данных экспериментов не изменяется. Это означает, что поведение ПЕН, в отличие от остальных комплексов согласуется с задаваемой уравнениями 4.1.2 и 4.1.3 химической моделью взаимодействия Б-ТНКЖ с суспензией эритроцитов.

5.3 Эффект «плавающей константы»

Как отмечено в вводной части к данной главе, ранее уже наблюдалось стабилизирующее влияние растворов белков на разложение некоторых комплексов из класса Б-ТНКЖ. Наши данные свидетельствуют о снижении NO-

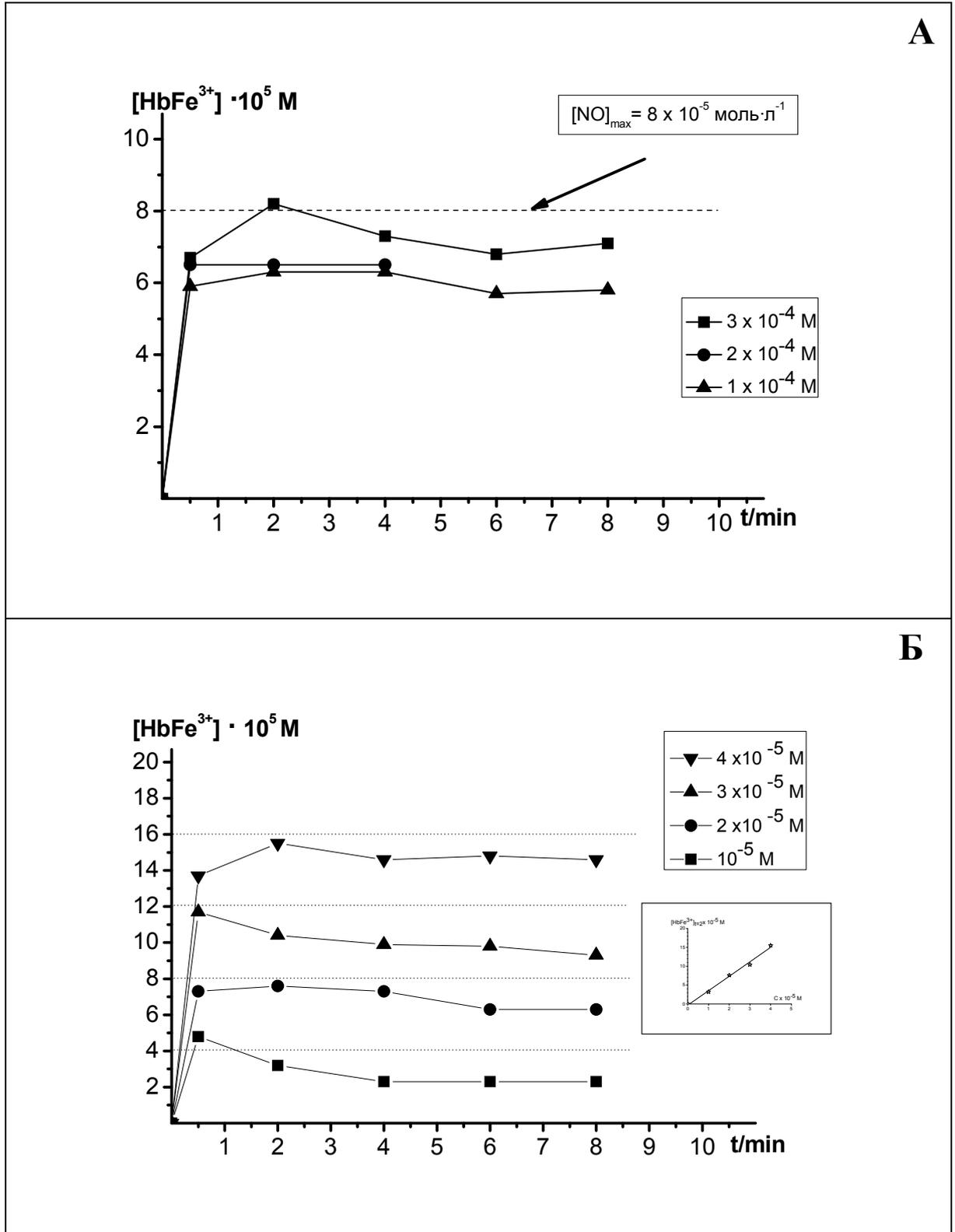


Рисунок 5.3 - Кинетика образования метгемоглобина под действием ПЕН. А - в суспензиях с различным содержанием клеток (концентрации гемоглобина указаны на врезке, концентрация ПЕН - $2 \times 10^{-5} \text{ M}$). Б - при различных концентрациях ПЕН (указаны на врезке), концентрация гемоглобина $2 \times 10^{-4} \text{ M}$).

донирующей способности Б-ТНКЖ в присутствии целых клеток. Таким образом, эффект стабилизации Б-ТНКЖ в биологических средах является, в значительной мере, универсальным.

Более того, комплексный характер нашего исследования позволил выявить характерную кинетическую закономерность, которую можно условно обозначить как «эффект плавающей константы». В самом деле, в первой серии экспериментов с увеличением концентрации эритроцитов при неизменной концентрации Б-ТНКЖ величина $k_{эф}$ монотонно снижается. Во второй серии экспериментов с увеличением концентрации Б-ТНКЖ при неизменной концентрации эритроцитов величина $k_{эф}$ движется в обратном направлении, т.е. монотонно возрастает. Как уже обосновано нами ранее, изменение константы $k_{эф}$ означает соответствующее изменение NO-донирующей способности комплекса в зависимости от среды инкубации. Причем это изменение может происходить как в сторону увеличения, так и в обратном направлении, что продемонстрировали две серии наших экспериментов.

Анализ полученных нами результатов показывает, что изменение NO-донирующей способности комплексов МИМ, ЦАК, БТЗ, ПИМ в зависимости от начальной концентрации комплекса и гематокрита суспензии эритроцитов не может быть объяснено в рамках первоначально выдвинутой нами простой химической модели взаимодействия (раздел 4.1). Очевидно, что процесс взаимодействия Б-ТНКЖ с суспензией эритроцитов является более сложным и для его описания потребуется рассмотреть дополнительные взаимодействия между компонентами изучаемой системы.

Известно, что распад Б-ТНКЖ в водной среде с выделением NO происходит с участием молекул воды, проникающих в лигандную сферу железа [162], т.е. может быть определен по механизму как гидролитическая диссоциация. В связи с этим, связывание комплекса с биосубстратом, 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. Это может приводить к снижению скорости

донирования NO молекулой комплекса, связанной с поверхностью эритроцита. Это означает, что при попадании Б-ТНКЖ в биологическую среду (в нашем случае в клеточную суспензию), в системе образуются, как минимум, два равновесных пула комплекса (водный и мембраносвязанный) которые обладают различной NO-донирующей способностью. А именно, у пула, связанного с поверхностью клеток эта способность может быть существенно сниженной из-за недостатка воды.

Анализ связывания Б-ТНКЖ с мембраной эритроцита можно провести опираясь на базовые положения теории мономолекулярной адсорбции Лэнгмюра, предполагающие равновесный характер связывания комплекса с набором однотипных и независимых центров связывания на мембране эритроцита [8]:



где X – молекула комплекса, P – место связывания комплекса на поверхности клетки. Равновесные концентрации комплекса и концентрацию мест связывания в объеме суспензии можно представить, как обычно, уравнениями материального баланса:

$$X_0 = [X] + [PX] \quad (5.3.2)$$

$$P_0 = [P] + [PX] \quad (5.3.3)$$

где X_0 – начальная концентрация комплекса, P_0 – общая концентрация мест связывания.

Условие детального равновесия в системе будет представлено следующим уравнением:

$$[PX] = K_a [P][X] \quad (5.3.4)$$

где K_a – константа связывания.

Делая подстановку $[PX] = X_0 - [X]$, получим зависимость относительной величины водного пула комплекса от концентрации свободных мест связывания:

$$\frac{[X]}{X_0} = \frac{1}{K_a [P] + 1} \quad (5.3.5)$$

Возвращаясь к высказанному выше предположению об образовании в системе двух пулов Б-ТНКЖ, обозначим константы скорости образования

метгемоглобина для водного и мембраносвязанного пулов как k_w и k_m , соответственно. Тогда наблюдаемая в эксперименте $k_{эф}$ будет дрейфовать между этими крайними значениями. При этом ее величина будет зависеть от относительного объема каждого из пулов:

$$k_{эф} = k_w \cdot \frac{[X]}{X_0} + k_m \frac{[PX]}{X_0} \quad (5.3.6)$$

Делая подстановку $[PX] = X_0 - [X]$ получим:

$$k_{эф} = \frac{[X]}{X_0} \cdot (k_w - k_m) + k_m \quad (5.3.7)$$

Объединяя 5.3.5 и 5.3.7, получим уравнение, описывающее взаимосвязь наблюдаемой в эксперименте $k_{эф}$ с концентрацией свободных центров связывания комплекса условиях равновесия:

$$k_{эф} = \frac{k_w - k_m}{K_a[P] + 1} + k_m \quad (5.3.8)$$

Из анализа предельных значений данной функции виден ее физический смысл. При $[P]$ равном нулю значение $k_{эф}$ сводится к k_w . Это верхняя граница дрейфа $k_{эф}$, соответствующая условиям водной среды. При $[P]$ стремящемся к бесконечности $k_{эф}$ стремится к своему нижнему пределу, k_m .

Полученное уравнение представляет собой удобную математическую модель, с помощью которой можно проанализировать всю совокупность полученных нами экспериментальных результатов. Теоретически ожидаемый график изменения $k_{эф}$, задаваемый уравнением 5.3.8 показан на рис. 5.4. Увеличение гематокрита суспензии при неизменной концентрации комплекса означает увеличение концентрации свободных центров связывания, что должно приводить к уменьшению $k_{эф}$, как это и наблюдается в экспериментальной серии с переменным гематокритом суспензии (рисунок 5.1). Наоборот, увеличение начальной концентрации комплекса при неизменном гематокрите обеспечивают снижение числа свободных центров связывания, что должно приводить к росту $k_{эф}$. Это мы как раз и наблюдаем на рисунке 5.2. Таким образом, на основе предложенной модели равновесного связывания Б-ТНКЖ с клеточной фракцией

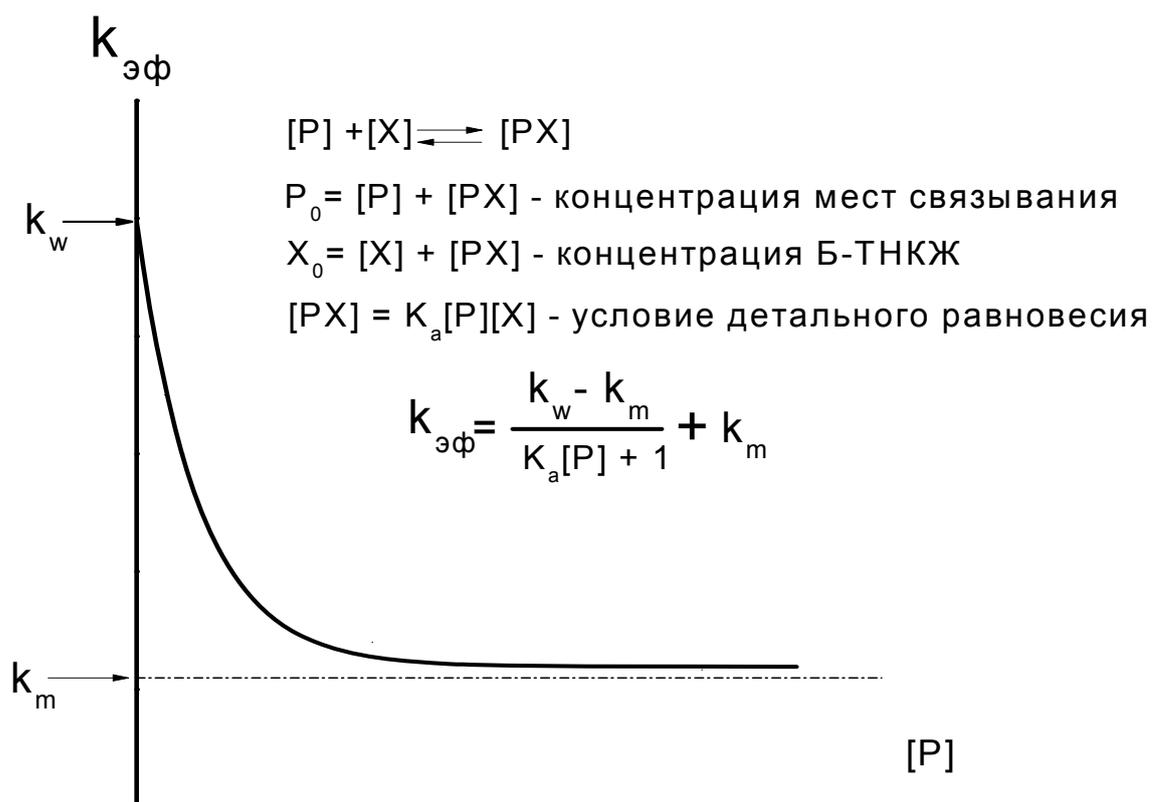


Рисунок 5.4 – Теоретически ожидаемая зависимость величины $k_{эф}$ от концентрации свободных центров связывания.

удается объяснить наблюдаемые в экспериментах закономерности изменения NO-донирующей способности Б-ТНКЖ в присутствии эритроцитов. Выполненное исследование позволяет сделать два важных в теоретическом отношении вывода:

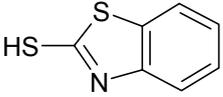
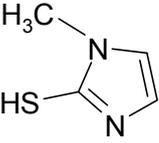
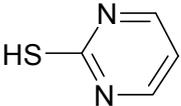
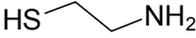
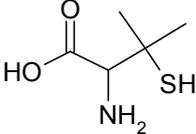
1. Взаимодействие Б-ТНКЖ с эритроцитами включает не только химические, но также и физико-химические составляющие, существенные для понимания механизма донирования оксида азота Б-ТНКЖ.

2. NO-донирующая способность Б-ТНКЖ зависит не только от структурно-химических характеристик комплекса, но и от физико-химических взаимодействий комплекса с компонентами биологической среды.

5.4 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 [183, 189]. Полученные результаты представлены в таблице 5.4.1. Видно, что лиганды, входящие в состав МИМ, ПИМ и БТЗ – гидрофобны, цистеамин, входящий в состав ЦАК является амфифильным. Наглядное отображение характера взаимодействия комплексов, различающихся по уровню

Таблица 5.4.1. Коэффициенты распределения S-лигандов в системе октанол-вода [7].

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

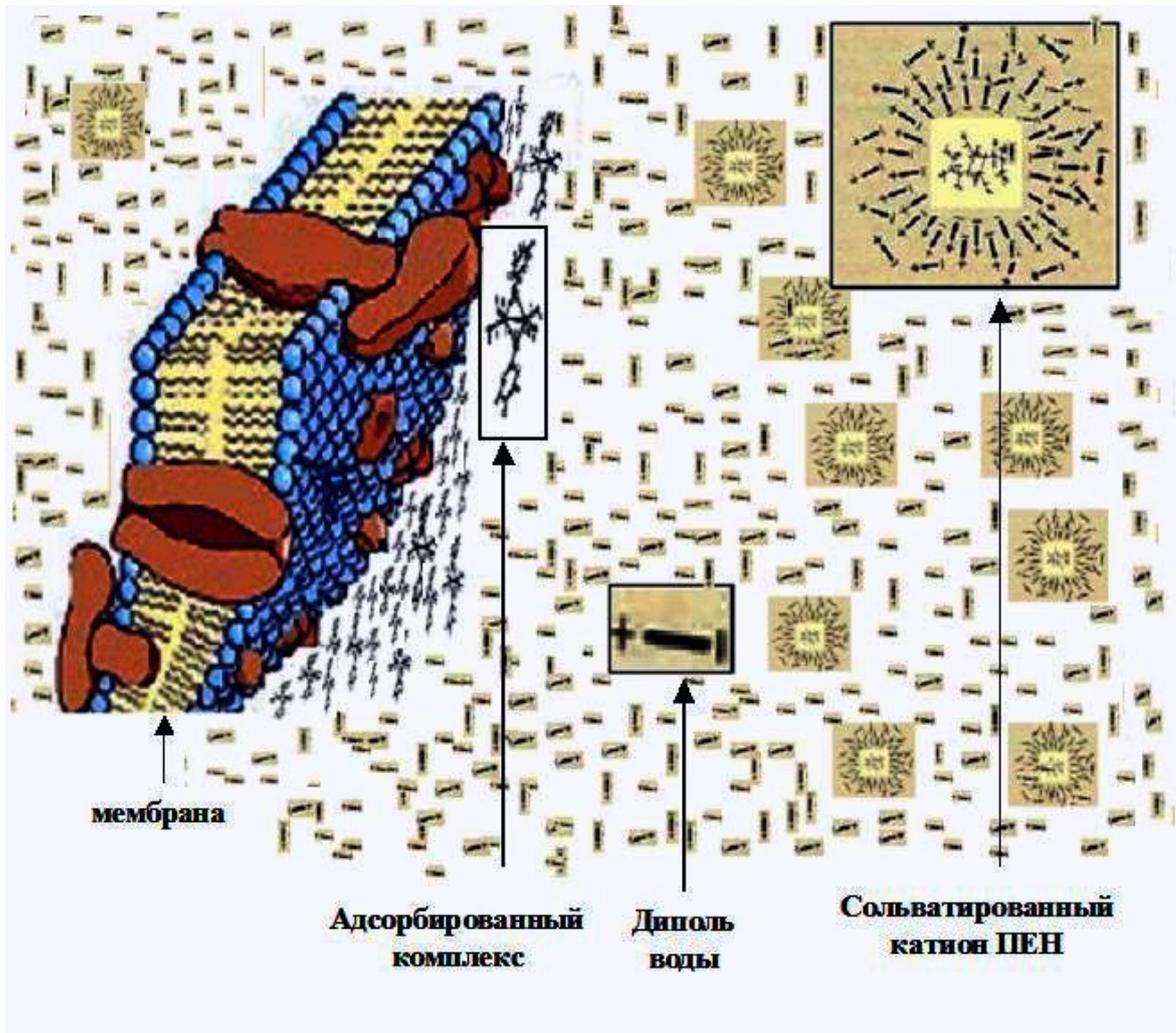


Рисунок 5.5 – NO-донирующая способность Б-ТНКЖ в клеточной среде.

липофильности, с мембранной фазой клеток представлено на рисунке 5.5. 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. При этом, как показано нами выше (раздел 5.2), 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 сольватации 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 контакт комплекса с водной средой, снижая скорость его гидролиза.

Вопрос о влиянии липофильности лиганда на NO-донирующую способность комплекса можно проанализировать в рамках разработанной нами модели равновесного связывания Б-ТНКЖ суспензией эритроцитов (раздел 5.3). Анализ полученных экспериментальных результатов показал, что значения тангенса угла наклона (φ) на нижних графиках рисунка 5.6, характеризующие скорость дрейфа константы $k_{эф}$ с увеличением гематокрита, коррелируют с величинами P_{o-w} для соответствующих лигандов (рисунок 5.6). Для понимания физического смысла данной корреляции на врезке к рисунку 5.6 мы построили семейство кривых, задаваемых уравнением 5.3.8 при различных значениях константы связывания комплекса, K_a . Видно, что наклон кривых, характеризующий скорость изменения $k_{эф}$ при фиксированном значении аргумента (вертикальная пунктирная линия) минимален для кривой с самым высоким значением константы связывания ($K_a=20$; кривая 1) и далее возрастает по мере снижения K_a от 10 до 2 (кривые 2-4). В то же время при значительном снижении величины K_a (кривые 5, 6) видно, что наклоны соответствующих графиков становятся меньшими, в сравнении с кривыми 2-4. Это приводит к предположению о прохождении K_a через экстремум. Чтобы убедиться в этом продифференцируем функцию 5.3.8. по $[P]$, получив, таким образом, формулу для

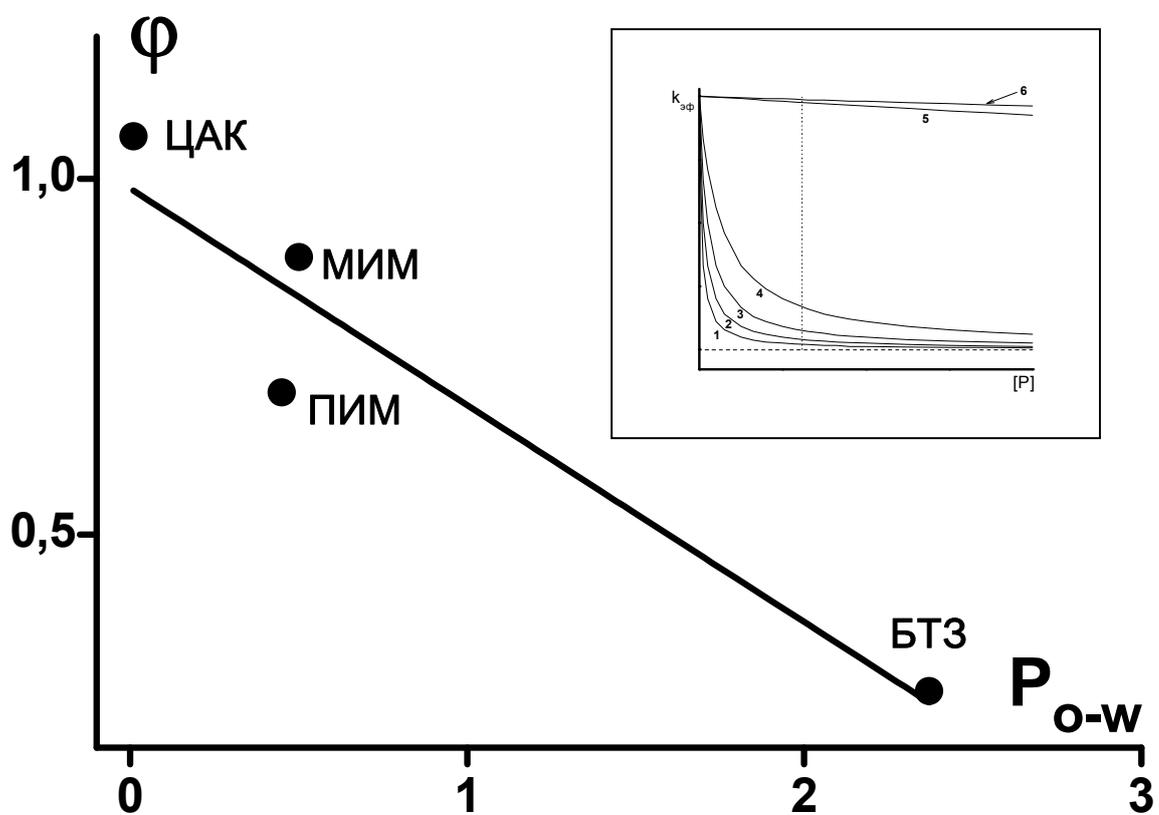


Рисунок 5.6 – Зависимость скорости изменения константы $k_{эф}$ от коэффициента распределения лиганда в системе октанол-вода. Значения K_a для кривых 1-6: 20, 10, 5, 2, 10^{-2} , 5×10^{-3} .

тангенса угла наклона рассматриваемого семейства кривых:

$$\varphi = \frac{dk_{\text{эф}}}{d[P]} = -\frac{K_a(k_w - k_m)}{(K_a[P] + 1)^2} \quad (5.3.9)$$

Продифференцируем теперь полученную функцию по K_a при фиксированном $[P]$:

$$\frac{d\varphi}{dK_a} = \frac{(K_a[P] - 1)(k_w - k_m)}{(K_a[P] + 1)^3} \quad (5.3.10)$$

Приравнивая полученную производную к нулю, убеждаемся, что у функции 5.3.9 существует экстремум при выполнении условия $K_a[P] = 1$.

Проведенный выше анализ в рамках разработанной нами модели равновесного связывания Б-ТНКЖ суспензией эритроцитов хорошо согласуется с экспериментальными данными. На врезке к рисунку 5.6 видно, что при фиксированном $[P]$ наклоны кривых для самого высокого и самого низкого значений K_a (кривые 1 и 6) приближаются к нулю, следовательно скорость изменения $k_{\text{эф}}$ в зависимости от $[P]$ в этих случаях минимальна. На основном графике (рисунок 5.6) величина φ является экспериментальной оценкой скорости изменения $k_{\text{эф}}$ в зависимости от гематокрита суспензии. Видно, что эта характеристика минимальна для самого гидрофобного комплекса, БТЗ, то есть $k_{\text{эф}}$ (а следовательно и NO-донирующая способность) для него в наименьшей степени чувствительна к изменению гематокрита. Одновременно, как мы помним, изменение гематокрита не влияло на NO-донирующую способность самого гидрофильного из изученных комплексов, ПЕН. Для остальных Б-ТНКЖ экспериментально наблюдаемое увеличение чувствительности к изменению гематокрита, дающее обратную корреляцию с величиной P_{o-w} (основной график на рисунок 5.6) качественно соответствует увеличению наклона кривых 2-4 на модельном графике (врезка к рисунку 5.6).

Таким образом, мы полагаем, что обнаруженное нами закономерное снижение NO-донирующей способности Б-ТНКЖ в присутствии эритроцитов, зависящее от содержания клеток, и ранее отмечавшиеся эффекты стабилизации комплексов растворами белков [13, 159] имеют единую природу. А именно, универсальной причиной снижения NO-донирующей способности Б-ТНКЖ в

биологических средах является ограничение контакта Б-ТНКЖ с водной средой, возникающее вследствие его связывания с биосубстратом. Важно отметить, что подобная зависимость NO-донирующей способности химического донора от среды инкубации может считаться уникальной особенностью данного класса доноров NO. Это свойство Б-ТНКЖ связано с механизмом донирования NO, основанном на гидролитической диссоциации комплекса. Эта особенность Б-ТНКЖ может оказаться весьма полезной в условиях их фармакологического использования, когда для оптимального эффекта могут требоваться различные скорости донирования NO.

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 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алдошин, С. М. Новый класс нейтральных парамагнитных биядерных нитрозильных серусодержащих комплексов железа / С. М. Алдошин, Н. А. Санина, О. А. Ракова, Г. В. Шилов, А.В. Куликов, Ю. М. Шульга, Н. С. Ованесян // Изв. Акад. наук. Серия химическая. - 2003. - № 8. – С. 1614-1620.
2. Ванин, А. Ф. Свободные радикалы нового типа в дрожжевых клетках / А. Ф. Ванин, Р. М. Налбандян // Биофизика. - 1965. - Т. 10. - С. 167-168.
3. Ванин, А. Ф. Идентификация комплексов двувалентного железа с цистеином в биологических системах / А. Ф. Ванин // Биохимия. - 1967. - Т.32. - С. 228-232.
4. Васильева, С. В. Формирование двунитевых разрывов ДНК в лейкоцитах крови мышей при обработке клеток нитрозильными комплексами железа / С. В. Васильева, А. Н. Осипов, Н. А. Санина, С. М. Алдошин // ДАН. – 2007. – Т. 414. - №2. – С. 259-262.
5. Граник, В. Г. Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарств / В. Г. Граник, Н. Б. Григорьев. - Москва: Вузовская книга, 2004. – 360 с.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Осипов, А. Н. Биологическая роль нитрозильных комплексов гемопротеинов / А. Н. Осипов, Г. Г. Борисенко, Ю. А. Владимиров // Успехи биологической химии. - 2007. - Т. 47. - С. 259–292.
 10. Погребная В. Л. Жидкофазное окисление оксида азота кислородом / В. Л. Погребная, А. П. Усов, А. В. Баранов, А. И. Нестеренко, А. П. Безъязычный // Журнал прикладной химии. - 1975. – Т. 48. – С. 954-958.
 11. Реутов, В. П. Проблемы оксида азота и цикличности в биологии и медицине / В. П. Реутов, Е. Г. Сорокина, Н. С. Косицын // Успехи современной биологии. - 2005. - № 1. - С. 41-65.
 12. Санина, Н. А. Функциональные модели нитрозильных [Fe-S] протеинов / Н. А. Санина, С. М. Алдошин // Изв. РАН, сер. хим. - 2004. - №11. - С. 2326-2345.
 13. Санина, Н. А. Стабилизация гемоглобином тетранитрозильного биядерного комплекса железа с пиридин-2-тиолом в водных растворах / Н. А. Санина, Л. А. Сырцова, Н. И. Шкондина, Е. С. Малкова, А. И. Котельников, С. М. Алдошин // Известия РАН, сер., хим. - 2007 - № 4. - С. 732-736.
 14. Санина, Н. А. Строение биядерного тетранитрозильного комплекса железа с пиридин-2-илом « μ_2 -S-типа» и влияние pH на его NO-донорную способность в водных растворах / Н. А. Санина, Г. В. Шилов, С. М. Алдошин, А. Ф. Шестаков, Л. А. Сырцова, Н. С. Ованесян, Е. С. Чудинова, Н. И. Шкондина, Н. С. Емельянова, А. И. Котельников // Известия РАН, сер., хим. - 2009 - № 3 - С. 560-571.
 15. Санина, Н. А. Новый класс доноров монооксида азота: строение и свойства нитрозильных комплексов железа с функциональными серосодержащими лигандами: дис. ... д-ра хим. наук. – Черноголовка: ИПХФ РАН, 2010. - 367 с.

16. Санина, Н. А. Структура и свойства нитрозильных комплексов железа с функциональными серосодержащими лигандами / Н. А. Санина, С. М. Алдошин // Изв. РАН, сер., хим. - 2011 - № 7 – С. 1199.
17. Санина, Н. А. Выявление центров связывания катионов на поверхности гемоглобина в его реакции с донором NO - нитрозильным комплексом железа $\{Fe_2[S(CH_2)_2NH_3]_2(NO)_4\}SO_4 \cdot 2.5H_2O$ / Н. А. Санина, Л. А. Сырцова, Б. Л. Психа, И. А. Тухватуллин, Н. И. Шкондина, Т. Н. Руднева, А. И. Котельников, С. М. Алдошин // Изв. РАН, сер., хим. - 2012 - № 12 – С. 2328-2333.
18. Соколова, Е. М. Эритроцитарная модель цитотоксичности оксида азота / Е. М. Соколова // Вестник молодых ученых ИВГУ. – 2011. - №11. - С. 40-42.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. Татьянаенко, Л. В. Влияние нитрозильных комплексов железа - доноров NO на активность Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулума и фосфодиэстеразы циклического гуанозинмонофосфата /Л. В. Татьянаенко, О. В. Доброхотова, А. И. Котельников, Н. А. Санина, Г. И. Козуб, Т. А. Кондратьева, С. М. Алдошин // Хим.-фарм. журнал. – 2013. – Т.47. - №9. - С. 3-6.
25. Alderton, W. K. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition / W. K. Alderton, C. E. Cooper, R. G. Knowles // Biochem. J. - 2001. – V. 357. - P. 593-615.
26. Allen, B. W. Hemoglobin, nitric oxide and molecular mechanisms of hypoxic vasodilation / B.W. Allen, J. S.Stamler, C. A. Piantadosi // Trends Mol. Med. – 2009. – V. 15. – P. 452-460.
27. Andrekopoulos, C. Bicarbonate enhances alpha-synuclein oligomerization and nitration: intermediacy of carbonate radical anion and nitrogen dioxide radical / C. Andrekopoulos, H. Zhang, J. Joseph, S. Kalivendi, B. Kalyanaraman // Biochem. J. – 2004. – V. 378. – P. 435–447.

28. Aranda, M. Inhaled nitric oxide and pulmonary vasoreactivity / M. Aranda, R. G. Pearl // *J. Clin. Monit. Comput.* – 2000. - V. 16. – P. 393–401.
29. Arnold, W. P. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations / W. P. Arnold, C. K. Mittal, S. Katsuki, F. Murad // *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)*. – 1977. - V. 74 – P. 3202-3207.
30. Arnold, W. P. Photodegradation of sodium nitroprusside: biologic activity and cyanide release / W. P. Arnold, D. E. Longnecker, R. M. Epstein // *Anesthesiology*. – 1984. – V.61. – P. 254-260.
31. Arteel, G. E. Protection against peroxynitrite / G. E. Arteel, K. Briviba, H. Sies // *FEBS Lett.* – 1999. – V. 445. – P. 226–230.
32. Azuma, H. Endothelium-dependent inhibition of platelet aggregation / H. Azuma, M. Ishikawa, S. Sekizaki // *Br. J. Pharmacol.* – 1986. - V. 88. - P. 411-415.
33. Bates, J. N. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required / J. N. Bates, M. T. Baker, R (Jr) Guerra, D. G. Harrison // *Biochem. Pharmacol.* - 1991. - V. 42, Suppl. - P. 157-165.
34. Beckman, J. S. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide / J. S. Beckman, T. W. Beckman, J. Chen, P. A. Marshall, B. A. Freeman // *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. - 1990. - V. 87. - P. 1620-1624.
35. Boccini, F. Mechanistic studies of the oxidation of oxyhemoglobin by peroxynitrite / F. Boccini, S. Herold // *Biochemistry*. – 2004. – V. 43. – P. 16393–16404.
36. Bourassa, J. Photochemistry of Roussins Red Salt, $\text{Na}_2[\text{Fe}_2\text{S}_2(\text{NO})_4]$, and of Roussins Black Salt, $\text{NH}_4[\text{Fe}_4\text{S}_3(\text{NO})_7]$. In situ nitric-oxide generation to sensitize γ -radiation induced cell-death / J. Bourassa, W. Degraff, S. Kudo, D. A. Wink, J. B. Mitchell, P. C. Ford. // *JACS*. – 1997 - V. 119. – P. 2853-2860.

37. Brecht, D. S. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology / D. S. Brecht // *Free radical research*. – 1999. – V. 31. – P. 577-596.
38. Brill, R. J. Intratracheal instillation of a novel NO/nucleophile adduct selectively reduces pulmonary hypertension / R. J. Brill, B. Krafte-Jacobs, D. J. Smith, D. Roselle, D. Passerini, A. Vromen // *J. Appl. Physiol.* – 1997. – V. 83. – P.1968–1975.
39. Broniowska, K. A. The chemical biology of S-nitrosothiols / K. A. Broniowska, N. Hogg // *Antioxid Redox Signal.* - 2012. - V. 17. - P. 969-980.
40. Bryan, N. S. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development / N. S. Bryan, R. Bian, F. Murad // *Frontiers in Bioscience.* – 2009. – V. 14. – P. 1-18.
41. Buchczyk, D. P. Modifications of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by increasing concentrations of peroxynitrite: early recognition by 20S proteasome / D. P. Buchczyk, T. Grune, H. Sies, L. O. Klotz // *Biol. Chem.* – 2003. – V. 384. – P. 237–241.
42. Bueno, M. Nitrite signaling in pulmonary hypertension: mechanisms of bioactivation, signaling, and therapeutics / M. Bueno, J. Wang, A. L. Mora, M. T. Gladwin // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2013. - V.14. – P. 1797-1809.
43. Burney, S. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite / S. Burney, J. L. Caulfield, J. C. Niles, J. S. Wishnok, S. R. Tannenbaum // *Mutat. Res.* –1999. – V. 424. – P. 37–49.
44. 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.
45. Calver, A. Effect of local intra-arterial NG-monomethyl-L-arginine in patients with hypertension: the nitric oxide dilator mechanism appears abnormal / A. Calver, J. Collier, S. Moncada, P. Vallance // *J. Hypertens.* – 1992a. – V. 10. - P.1025–1031.

46. Calver, A. Inhibition and stimulation of nitric oxide synthesis in the human forearm arterial bed of patients with insulin-dependent diabetes / A. Calver, J. Collier, P. Vallance // *J. Clin. Invest.* – 1992b. – V. 90. - P.2548–2554.
47. Cassoly, R. Conformation, co-operativity and ligand-binding in human hemoglobin / R. Cassoly, Q. H. Gibson // *J. Mol. Biol.* - 1975. – V. 91. - P. 301–313.
48. Castro, L. Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide / L. Castro, M. Rodriguez , R. Radi // *J. Biol. Chem.* - 1994. - V. 269. - P. 29409–29415.
49. Chakraborty, S. Diffusing capacity reexamined: relative roles of diffusion and chemical reaction in red cell uptake of O₂, CO, CO₂, and NO / S. Chakraborty, V. Balakotaiah, A. Bidani // *J. Appl. Physiol.* – 2004. - V. 97. – P. 2284–2302.
50. Chen, Z. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation / Z. Chen, J. Zhang, J. S. Stamler // *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. – 2002. – V. 99. – P. 8306–8311.
51. Colyer, J. Phosphorylation states of phospholamban / J. Colyer // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 1998. - V. 853. - P. 79–91.
52. Cosby, K. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation / K. Cosby, K. S. Partovi, J. H. Crawford, R. P. Patel, C. D. Reiter, S. Martyr, B. K. Yang, M. A. Waclawiw, G. Zalos, X. Xu, K. T. Huang, H. Shields, D. B. Kim-Shapiro, A. N. Schechter, R. O. Cannon, M. T. Gladwin // *Nat. Med.* – 2003. – V. 9. – P. 1498-1505.
53. Crow, J. P. Sensitivity of the essential zinc-thiolate moiety of yeast alcohol dehydrogenase to hypochlorite and peroxynitrite / J. P. Crow, J. S. Beckman, J. M. McCord // *Biochemistry.* – 1995. – V. 34. - P. 3544–3552.
54. Culotta, E. NO news is good news / E. Culotta, D. E (Jr) Koshland // *Science.* - 1992. – V.258. – P. 1862-1865.

55. Denicola, A. Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes / A. Denicola, J. M. Souza, R. Radi // *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A)*. – 1998. - V.95 – P. 3566–3571.
56. Deuticke, B. Leak formation in human erythrocytes by the radical-forming oxidant t-butylhydroperoxide / B. Deuticke, K. B. Heller, C. W. Haest // *Biochim. Biophys. Acta*. - 1986 – V. 854(2) – P. 169-183.
57. Dimmeler, S. Nitric oxide causes ADP-ribosylation and inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase / S. Dimmeler, F. Lottspeich, B. Brüne // *J. Biol. Chem*. – 1992. – V. 267 – P. 16771-16774.
58. Ding, H. L. Signaling processes for initiating smooth muscle contraction upon neural stimulation / H. L. Ding, J. W. Ryder, J. T. Stull, K. E. Kamm // *J. Biol. Chem*. – 2009. – V. 284. – P. 15541–15548.
59. Doctor, A. Nitric oxide transport in blood: a third gas in the respiratory cycle / A. Doctor, J. S. Stamler // *Compr. Physiol*. – 2011. – V. 1 – P. 541-568.
60. Drago, R. S. The reaction of nitrogen(II) oxide with diethylamine / R. S. Drago, F. E. Paulik // *J. Am. Chem. Soc*. – 1960. – V. 82. – P.96–98.
61. Drapier, J. C. Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity for tumor cells results in L-arginine-dependent inhibition of mitochondrial iron-sulfur enzymes in the macrophage effector cells / J. C. Drapier, J. B. Hibbs // *J. Immunol*. –1988. - V. 140 - P. 2829- 2838.
62. Eich, R. F. Mechanism of NO-induced oxidation of myoglobin and hemoglobin / R. F. Eich, T. Li, D. D. Lemon, D. H. Doherty, S. R. Curry, J. F. Aitken, A. J. Mathews, K. A. Johnson, R. D. Smith, G. N. J. Phillips, J. S. Olson // *Biochemistry*. – 1996. – V. 35. - P. 6976–6983.
63. Ellsworth, M. L. Regulation of blood flow distribution in skeletal muscle: role of erythrocyte-released ATP / M. L. Ellsworth, R. S. Sprague // *J. Physiol*. – 2012. – V. 590. – P. 4985-4991.
64. Ferrer-Sueta, G. Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals / G. Ferrer-Sueta, R. Radi // *ACS Chem. Biol*. – 2009. – V. 4. - P. 161–177.

65. Flitney, F. W. Iron-sulphur cluster nitrosyls, a novel class of nitric oxide generator: mechanism of vasodilator action on rat isolated tail artery / F. W. Flitney, I. L. Megson, D. E. Flitney, A. R. Butler // *Br. J. Pharmacol.* – 1992. - V. 107. – P. 842-848.
66. Fridovich, I. Superoxide radical and superoxide dismutases / I. Fridovich // *Annu. Rev. Biochem.* – 1995. – V. 64. – P.97-112.
67. Furchgott, R. F. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine / R. F. Furchgott, J. V. Zawadzki // *Nature.* - 1980. – V. 288. – P. 373–376.
68. Garthwaite, J. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptor suggests role as intercellular messenger in the brain / J. Garthwaite, S. L. Charles, R. Chess-Williams // *Nature.* - 1988. - V. 336. – P. 385–388.
69. Garthwaite, J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system / J. Garthwaite // *Trends Neurosci.* - 1991. – V. 14. - P. 75–82.
70. Gerzer, R. Purification of a soluble, sodium nitroprusside-stimulated guanylate cyclase from bovine lung / R. Gerzer, F. Hofmann, G. Schultz // *Eur. J. Biochem.* – 1981. – V. 116. – P. 479-486.
71. Gerzer, R. Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper / R. Gerzer, E. Böhme, F. Hofmann, G. Schultz // *FEBS Lett.* – 1981. – V. 132. – P. 71-74.
72. Gladwin, M. T. Role of the red blood cell in nitric oxide homeostasis and hypoxic vasodilation / M. T. Gladwin // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2006. – V. 588. – P. 189-205.
73. Goldstein, S. The reaction of $\text{NO}\cdot$ with $\text{O}_2^{\cdot-}$ and HO_2^{\cdot} a pulse radiolysis study / S. Goldstein, G. Czapski // *Free Radical Biol. Med.* – 1995. - V. 19. – P. 505–510.
74. Gow, A. J. Biological significance of nitricoxide-mediated protein modifications / A. J. Gow, C. R. Farkouh, D. A. Munson, M. A. Posencheg,

- H. Ischiropoulos // *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* – 2004. – V.287. – P. 262–268.
75. Greenacre, S. A. Tyrosine nitration: localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction / S. A. Greenacre, H. Ischiropoulos // *Free Radic. Res.* – 2001. – V. 34 - P. 541–581.
76. Griffith, O. W. Nitric oxides synthases: properties and catalytic mechanism / O. W. Griffith, D. J Stuehr // *Annu. Rev. Physiol.* - 1995. – V. 57. - P. 707–736.
77. Gruetter, C. A. Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosoamine / C. A. Gruetter, B. K. Barry, D. B. McNamara, D. Y. Gruetter, P. J. Kadowitz, L. Ignarro // *J. Cyclic Nucleotide Res.* - 1979. - V. 5. - P. 211-224.
78. Gryglewski, R. J. Syperoxide anions is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor / R. J. Gryglewski, R. M. J Palmer, S. Moncada // *Nature.* – 1986. – V. 320. - P. 454-456.
79. Guy, R. A. Characterization of peroxyxynitrite-oxidized low density lipoprotein binding to human CD36 / R. A. Guy, G. F. Maguire, I. Crandall, P. W. Connelly, K. C. Kain // *Atherosclerosis.* – 2001. –V. 155. - P. 19 –28.
80. Haldar, S. M. S-nitrosylation: integrator of cardiovascular performance and oxygen delivery / S. M. Haldar, J. S. Stamler // *J. Clin. Invest.* – 2013. – V. 123. – P. 101-110.
81. Halfpenny, E. The nitration and hydroxylation of aromatic compounds by pernitrous acid / E. Halfpenny, P. L. Robinson // *J. Chem. Soc.* - 1952. - P. 939–946.
82. Hanspal, I. S. The effect of oxidative stress on endothelium-dependent and nitric oxide donor-induced relaxation: implications for nitrate tolerance / I. S. Hanspal, K. S. Magid, D. J. Webb, I. L. Megson // *Nitric Oxide.* – 2002. – V. 6. – P. 263–270.

83. Hebbel, R. P. Accelerated autoxidation and heme loss due to instability of sickle hemoglobin / R. P. Hebbel, W. T. Morgan, J. W. Eaton, B. E. Hedlund // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 1988. – V. 85. – P. 237-241.
84. Herold, S. The mechanism of the peroxynitrite-mediated oxidation of myoglobin in the absence and presence of carbon dioxide / S. Herold, M. Exner, F. Boccini // *Chem. Res. Toxicol.* – 2003. – V. 16. – P. 390–402.
85. Hibbs, J. B (Jr). Macrophage cytotoxicity: role of L-arginine deminase and imino nitrogen oxidation to nitrite / J. B (Jr) Hibbs, R. R. Taintor, Z. Vavrin // *Science.* – 1987. – V. 235. – P. 473–476.
86. Hibbs, J. B (Jr). Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule / J. B (Jr) Hibbs, R. R. Taintor, Z. Vavrin, E. M. Rachlin // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1988. – V. 157. – P. 87–94.
87. Hogg, N. The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols / N. Hogg // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* – 2002. – V.42. – P. 585-600.
88. Holzmann, S. Endothelium-induced relaxation by acetylcholine associated with larger rises in cyclic GMP in coronary arterial strips / S. Holzmann // *J. Cyclic Nucleotide Res.* – 1982. – V. 8. – P. 409-412.
89. Huie, R. E. The reaction of NO with superoxide / R. E. Huie, S. Padmaja // *Free Radical Res. Commun.* - 1993. - V. 18. - P. 195–199.
90. Ignarro, L.J. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: Evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates / L. J. Ignarro, H. Lipton, J. C. Edwards, W. H. Baricos, A. L. Hyman, P. J. Kadowitz, C. A. Gruetter // *J. Pharmacol Exp. Ther.* – 1981. - V. 218. – P. 739-749.
91. Ignarro, L. J. Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: Stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid / L. J. Ignarro, R. G. Harbison, K. S. Wood , P. J. Kadowitz // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1986. - V. 237. - P. 893-900.

92. Ignarro, L. J. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide / L. J. Ignarro, G. M. Buga, K. S. Wood, R. E. Byrns, G. Chaudhuri // *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. – 1987. - V. 84. - P. 9265-9269.
93. Ignarro, L. J. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical / L. J. Ignarro, R. E. Byrns, G. M. Buga, K. S. Wood // *Circ. Res.* – 1987. – V. 61. - P. 866-879.
94. Ignarro, L. J. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide / L. J. Ignarro, G. M. Buga, K. S. Wood, R. E. Byrns, G. Chaudhuri // *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. – 1987. - V. 84. – P. 9265-9269.
95. Ignarro, L. J. Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties / L. J. Ignarro // *FASEB J.* – 1989. – V. 3. - P 31-36.
96. Ignarro, L. J. Nitric Oxide Donors and Cardiovascular Agents Modulating the Bioactivity of Nitric Oxide / L. J. Ignarro, C. Napoli, J. Loscalzo // *Circ. Res.* – 2002. – V. 90. – P. 21-28.
97. Ilani, A. The pH dependence of the hemolytic potency of bile salts / A. Ilani, R. Granoth // *BBA (Biomembranes)*. – 1990. – V. 1027. – P. 199-204.
98. Isbell, T. S. SNO-hemoglobin is not essential for red blood cell-dependent hypoxic vasodilation / T. S. Isbell, C. W. Sun, L. C. Wu, X. Teng, D. A. Vitturi, B. G. Branch, C. G. Kevil, N. Peng, J. M. Wyss, N. Ambalavanan, L. Schwiebert, J. Ren, K. M. Pawlik, M. B. Renfrow, R. P. Patel, T. M. Townes // *Nat. Med.* – 2008 - V.14. - P. 773-777.
99. Ischiropoulos, H. Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide / H. Ischiropoulos, L. Zhu, J. S. Beckman // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1992 - V. 298. – P. 446–451.
100. Jia, L. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control / L. Jia, C. Bonaventura, J. Bonaventura, J. S. Stamler // *Nature*. – 1996. – V. 380. – P. 221-226.

101. Kamisaki, Y. Soluble guanylate cyclase from rat lung exists as a heterodimer. / Y. Kamisaki, S. Saheki, M. Nakane, J. A. Palmieri, T. Kuno, B. Y. Chang, S. A. Waldman, F. Murad // *J. Biol. Chem.* – 1986. – V. 261. – P. 7236-7241.
102. Kamm, K. E. The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle / K. E. Kamm, J. T. Stull // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 1985. – V. 25 - P. 593–620.
103. Katsuki, S. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine / S. Katsuki, W. Arnold, C. Mittal, F. Murad // *J. Cyclic Nucleotide Res.* – 1977. – V. 3. – P. 23-25.
104. Katz, S. D. Impaired endothelium-mediated vasodilation in the peripheral vasculature of patients with congestive heart failure / S. D. Katz, L. Biasucci, C. Sabba, J. A. Strom, G. Jondeau, M. Galvao, S. Solomon, S. D. Nikolic, R. Forman, T. H. LeJemtel // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 1992. – V. 19. – P. 918–925.
105. Kavdia, M. Nitric oxide delivery in stagnant systems via nitric oxide donors: a mathematical model / M. Kavdia, R. S. Lewis // *Chem. Res. Toxicol.* – 2003. - V. 16. - P 7–14.
106. Kelm, M. Metabolic Fate of Nitric Oxide and Related N-Oxides / M. Kelm, K. Yoshida // In *Methods in nitric oxide research.* (eds. Feelisch M. & Stamler J. S.). - London: Wiley, 1996. - P. 47–58.
107. Keyer, K. Inactivation of dehydratase [4Fe-4S] clusters and disruption of iron homeostasis upon cell exposure to peroxynitrite / K. Keyer, J. A. Imlay // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272. – P. 27652–27659.
108. Kissner, R. Formation and properties of peroxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis / R. Kissner, T. Nauser, P. Bugnon, P. G. Lye, W. H. Koppenol // *Chem. Res. Toxicol.* – 1997. – V.10. – P. 1285–1292.

109. Kollau, A. Contribution of aldehyde dehydrogenase to mitochondrial bioactivation of nitroglycerin: evidence for the activation of purified soluble guanylate cyclase through direct formation of nitric oxide / A. Kollau, A. Hofer, M. Russwurm, D. Koesling, W. M. Keung, K. Schmidt, F. Brunner, B. Mayer // *Biochem J.* – 2005. - V. 385. – P. 769–777.
110. Koller, A. Association of phospholamban with a cGMP kinase signaling complex / A. Koller, J. Schlossmann, K. Ashman, S. Uttenweiler-Joseph, P. Ruth, F. Hofmann // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2003. – V. 300. - P. 55–160.
111. 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.
112. Konorev, E. A. Rapid and irreversible inhibition of creatinekinase by peroxynitrite / E. A. Konorev, N. Hogg, B. Kalyanaraman // *FEBS Lett.* - 1998. – V. 427. – P. 171–174.
113. Koshland, D. E (Jr). The molecule of the year / D. E (Jr) Koshland // *Science.* – 1992. – V. 258. – P. 1861.
114. Lancaster, J. R (Jr). Nitric Oxide in Cells / J. R (Jr). Lancaster // *Am. Sci.* - 1992. – V. 80. – P. 248–259.
115. Liu, Q. Binding sites of nitric oxide synthases / Q. Liu, S. S. Gross // *Methods Enzymol.* – 1996. – V. 268. - P. 311-324.
116. 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.
117. Liu, Y. Role of the b93cys, ATP and adenosine in red cell dependent hypoxic vasorelaxation / Y. Liu, C-W. Sun, J. Honavar, T. Townes, R. P. Patel // *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* – 2013. – V. 5. – P. 21-31.
118. Ludmer, P. L. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries / P. L. Ludmer, A. P. Selwyn, T. L. Shook,

- R. R. Wayne, G. H. Mudge, R. W. Alexander, P. Ganz // *N. Engl. J. Med.* – 1986. – V. 315. – P. 1046–1051.
119. MacMillan-Crow, L. A. Tyrosine modifications and inactivation of active site manganese superoxide dismutase mutant (Y34F) by peroxynitrite / L. A. MacMillan-Crow, J. A. Thompson // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1999. – V. 366. – P. 82–88.
120. Mahoney, L. R. Evidence for the formation of hydroxyl radicals in the isomerization of pernitrous acid to nitric acid in aqueous solution / L. R. Mahoney // *J. Am. Chem. Soc.* – 1970. – V. 92. - P. 5262–5263.
121. Malinski, T. Diffusion of nitric oxide in the aorta wall monitored in situ by porphyrinic microsensors / T. Malinski, Z. Taha, S. Grunfeld, S. Patton, M. Kapturczak, P. Tomboulia // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1993. - V. 193. - P. 1076–1082.
122. Maragos, C. M. Complexes of NO with nucleophiles as agents for the controlled biological release of nitric oxide. Vasorelaxant effects / C. M. Maragos, D. Morley, D. A. Wink, T. M. Dunams, J. E. Saavedra, A. Hoffman, A. A. Bove, L. Isaac, J. A. Hrabie, L. K. Keefer // *J. Med. Chem.* – 1991. – V. 34. – P. 3242–3247.
123. Marley, R. A chemiluminescence-based assay for S-nitrosoalbumin and other plasma S-nitrosothiols / R. Marley, M. Feelisch, S. Holt, K. Moore // *Free Radical Research.* - 2000. - V. 32. – P. 1–9.
124. McCall, T. B. Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with superoxide anion / T. B. McCall, N. K. Boughton-Smith, R. M. Palmer, B. J. Whittle, S. Moncada // *Biochem. J.* - 1989. - V. 261. - P. 293-296.
125. Mellion, B. T. Evidence for the inhibitory role of guanosine 3',5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators / B. T. Mellion, L. J. Ignarro, E. H. Ohlstein, E. G. Pontecorvo, A. L. Hyman, P. J. Kadowitz // *Blood.* – 1981. – V. 57. - P. 946-955.

126. Meulemans, A. Diffusion coefficients and half-lives of nitric oxide and N-nitroso-L-arginine in rat cortex / A. Meulemans // *Neurosci. Lett.* - 1994. - V.171. - P. 89–93.
127. Miller, M.R. Recent developments in nitric oxide donor drugs / M. R. Miller, I. L. Megson // *Br.J. Pharm.* - 2007. - V. 151. - P. 305 – 321.
128. Moncada, S. Mechanism of action of some inhibitors of endothelium-derived relaxing factor / S. Moncada, R. M. Palmer, R. J. Gryglewski // *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. - 1986. - V. 83. - P. 9164–9168.
129. Moncada, S., Herman A.G, Vanhoutte P.M. Endothelium-derived relaxing factor is identified as nitric oxide / S. Moncada, A. G. Herman, P. M. Vanhoutte // *Trends Pharmacol. Sci.* - 1987. - V. 8 - P. 365–368.
130. Moncada, S. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication / S. Moncada, R. M. Palmer, E. A. Higgs // *Biochem. Pharmacol.* - 1989. - V. 38. - P. 1709-1715.
131. Mooradian, D. L. Nitric oxide (NO) donor molecules: effect of NO release rate on vascular smooth muscle cell proliferation in vitro / D. L. Mooradian, T. C. Hutsell, L. K. Keefer // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* - 1995. - V. 25. - P. 674–678.
132. Moore, E. G. Cooperativity in dissociation of nitric-oxide from hemoglobin / E. G. Moore, Q. H. Gibson // *J. Biol. Chem.* - 1976. - V.251. - P. 2788–2794.
133. Morel, F. The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects / F. Morel, L. Douddirre, P. V. Vignais // *Eur. J. Biochem.* -1991. - V. 201. - P. 523-546.
134. Morley, D. Nitric oxide/nucleophile complexes: a unique class of nitric oxide-based vasodilators / D. Morley, L. K. Keefer // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* - 1993 - V. 22, Suppl. 7. - P. 3–9.
135. Morris, R. J. The role of diffusion in limiting the rate of ligand-binding to hemoglobin / R. J. Morris, Q. H. Gibson // *J. Biol. Chem.* - 1980. - V.255. - P. 8050–8053.

136. Münzel, T. Nitrate therapy: new aspects concerning molecular action and tolerance / T. Münzel, A. Daiber, T. Gori // *Circulation*. - 2011. – V. 123. –P. 2132-2144.
137. Murad, F. Guanylate cyclase: Activation by azide, nitro compounds, nitric oxide, and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin / F. Murad, C. K. Mittal, W. P. Arnold, S. Katsuki, H. Kimura // *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* – 1978. - V. 9. – P. 145-158.
138. 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.
139. Nathan, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells / C. Nathan // *FASEB J.* – 1992. – V. 6. – P. 3051-3064.
140. Niles, J. C. Peroxynitrite-induced oxidation and nitration products of guanine and 8-oxoguanine: structures and mechanisms of product formation / J. C. Niles, J. S. Wishnok, S. R. Tannenbaum // *Nitric Oxide*. – 2006. – V. 14. – P. 109–121.
141. Pacher, P. Nitrosative stress and pharmacological modulation of heart failure / P. Pacher, R. Schulz, L. Liaudet, C. Szabo // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2005. - V. 26. - P. 302–310.
142. Pacher, P. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease / P. Pacher, J. S. Beckman, L. Liaudet // *Physiol. Rev.* - 2007. - V. 87. – P. 315-424.
143. Palmer, R. M. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor / R. M. Palmer, A. G. Ferrige, S. Moncada // *Nature*. - 1987. – V. 327. - P. 524-526.
144. Patel, R. P. The potential role of the red blood cell in nitrite-dependent regulation of blood flow / R. P. Patel, N. Hogg, D. B. Kim-Shapiro // *Cardiovas. Res.* - 2011. - V. 89. - P. 507-515.
145. Perutz, M. F. Molecular anatomy, physiology, and pathology of hemoglobin. In: *The Molecular Basis of Blood Disorders* (Eds: Stamatoyannopoulos G,

- Nienhuis A.W.) / M. F. Perutz // Philadelphia: WB Saunders company Ltd. - 1987. - P. 127-178.
146. Pietraforte, D. Role of thiols in the targeting of S-nitroso thiols to red blood cells. / D. Pietraforte, C. Mallozzi, G. Scorza, M. Minetti // *Biochemistry*. – 1995. - V. 34. – P. 7177–7185.
147. Pluta, R. M. Reversal and prevention of cerebral vasospasm by intracarotid infusions of nitric oxide donors in a primate model of subarachnoid hemorrhage. / R. M. Pluta, E. H. Oldfield, R. J. Boock // *J. Neurosurg.* – 1997. – V. 87. – P. 746–751.
148. Prince, R. C. Novel iron-sulfur clusters. / R. C. Prince, M. J. Grossman // *Trends Biochem. Sci.* - 1993. - V. 18. - P. 153-154.
149. 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.* – 1991. – V. 266 – P. 4244–4250.
150. 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.* – 1991. - V. 266. – P. 4244–4250.
151. Radi, R. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. / R. Radi, J. S. Beckman, K. M. Bush, B. A. Freeman // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1991. – V. 288. – P. 481–487.
152. Radi, R. Peroxynitrite, a Stealthy Biological Oxidant. / R. Radi // *J. Biol. Chem.* – 2013. - V. 288. - P. 26464-26472.
153. Rajagopalan, S. Angiotensin II-mediated hyper-tension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone / S. Rajagopalan, S. Kurz, T. Munzel, M. Tarpey, B. A. Freeman, K. K. Griendling, D. G. Harrison // *J. Clin. Invest.* - 1996. - V. 97. - P. 1916–1923.
154. Rassaf, T. Plasma nitrosothiols contribute to the systemical vasodilator effects of intravenously applied / T. Rassaf, P. Kleinbongard, M. Preik, A.

- Dejam, P. Gharini, T. Lauer, J. Erckenbrecht, A. Duschin, R. Schultz, G. Heusch, M. Feelisch, M. Kelm // *Circ. Res.* – 2002. – V. 91. - P. 470–477.
155. Ratnam, S. The regulation of superoxide generation and nitric oxide synthesis by C-reactive protein / S. Ratnam, S. Mookerjea // *Immunology.* - 1998 – V. 94 – P. 560-568.
156. Ross, J. M. Autoregulation of blood flow by oxygen lack / J. M. Ross, H. M. Fairchild, J. Weldy, A. C. Guyton // *Am. J. Physiol.* - 1962. - V. 202. - P. 21-24.
157. Rossi, R. Physiological levels of S-nitrosothiols in human plasma / R. Rossi, D. Giustarini, A. Milzani, R. Colombo, I. Dalle-Donne, P. Di Simplicio // *Circulation Research.* - 2001. - V. 89. – P. 47.
158. Roussin, F. Z. Recherches ur lesnitrosulures doubles de fer (nouvelle classe de sels) / F. Z. Roussin // *Ann. Chim. Phys.* – 1858. - V. 52. - P. 285-303.
159. Rudneva, T. N. Stabilisation of tetranitrosyl thiosulfate iron complex by albumin / T. N. Rudneva, N. A. Sanina, D. V. Mischenko, E. S. Frog, R. A. Kotel'nikova, S. M. Aldoshin. // *Nitric Oxide.* - 2008. - V. 19, Suppl. – P. 43.
160. Russell, E. S. Comparison of normal blood picture of young adults from 18 inbred strains of mice / E. S. Russell, E.F. Neufeld, C.T. Higgins // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* - 1951. – V. 78. – P. 761-766.
161. Russwurm, M. Functional properties of a naturally occurring isoform of soluble guanylyl cyclase / M. Russwurm, S. Behrends, C. Harteneck, D. Koesling // *The Biochemical journal.* – 1998. – V. 335. – P. 125-130.
162. 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 / N. A. Sanina, L. A. Syrtsova, N. I. Shkondina, T. N. Rudneva, E. S. Malkova, T. A. Bazanov, A. I. Kotel'nikov, S. M. Aldoshin // *Nitric oxide: biology & chemistry.* – 2007. - V. 16. - P. 181-188.

163. Saran, M. Reaction of NO with O^{2-} implications for the action of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) / M. Saran, C. Michel, W. Bors // *Free Radic Res Commun.* – 1990. – V.10. – P. 221-226.
164. Schlossmann, J. Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I β / J. Schlossmann, A. Ammendola, K. Ashman, X. Zong, A. Huber, G. Neubauer, G. X. Wang, H. D. Allescher, M. Korth, M. Wilm, F. Hofmann, P. Ruth // *Nature.* – 2000. – V. 404. - P. 197–201.
165. Schopfer, F. J. NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response / F. J. Schopfer, P. R. Baker, B. A. Freeman // *Trends Biochem. Sci.* – 2003. – V.28. – P. 646–654.
166. Schultz, G. Guanyl cyclase. Determination of enzyme activity / G. Schultz, E. Böhme, K. Munske // *Life Sci.* – 1969. – V. 8. – P. 1323-1332.
167. Sharma, V. S. Dissociation of NO from nitrosylhemoglobin / V. S. Sharma, H. M. Ranney // *J. Biol. Chem.* - 1978. – V. 253. - P. 6467–6472.
168. Shaw, A. W. Solubility of nitric oxide in aqueous and non aqueous solvents / A. W. Shaw, A. J. Vosper // *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I.* - 1977. – V.8. – P. 1239–1244.
169. Singel, D. J. Chemical physiology of blood flow regulation by red blood cells: the role of nitric oxide and S-nitrosohemoglobin / D. J. Singel, J. S. Stamler // *Annu. Rev. Physiol.* – 2005. – V. 67. – P. 99-145.
170. 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.
171. 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.
172. 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.
173. Somlyo, A. P. Ca^{2+} sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase / A. P. Somlyo, A. V. Somlyo // *Physiol. Rev.* - 2003. - V. 83. - P.1325–1358.
174. Soszyński, M. Effect of peroxynitrite on erythrocytes / M. Soszynski, G. Bartosz // *BBA.* – 1996. – V. 1291. - P. 107-114.
175. Sprague, R. S. Erythrocytes as Controllers of Perfusion Distribution in the Microvasculature of Skeletal Muscle / R. S. Sprague, E. A. Bowles, D. Achilles, M. L. Ellsworth // *Acta Physiol (Oxf).* - 2011. – V. 202. – P. 285-292.
176. Stamler, J. S. S-Nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds / J. S. Stamler, J. A. Osborne, M. E. Mullins, O. Jaraki, T. Michel, D. J. Singel, J. Loscalzo // *PNAS (USA).* – 1992. – V. 89. - P. 444–448.
177. Stamler, J. S. Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient / J. S. Stamler, L. Jia, J. P. Eu, T. J. McMahon, I. T. Demchenko, J. Bonaventura, K. Gernert, C. A. Piantadosi // *Science.* – 1997. – V. 276. – P. 2034–2037.
178. Stocks, J. The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide / J. Stocks, T. L. Dormandy // *Br. J. Haematol.* - 1971. – V. 20. – P. 95-111.
179. Stone, J. R. Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous

- and ferric states / J. R. Stone, M. A. Marletta // *Biochemistry*. – 1994. - V. 33. – P. 5636–5640.
180. Stuehr, D. J. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor cells / D. J. Stuehr, C. F. Nathan // *J. Exp. Med.* - 1989. - V. 169. – P. 1543–1555.
181. Tang, X. Synthesis of peptide-dizenyumdiolate conjugates: towards enzyme activated antitumor agents / X. Tang, M. Xian, M. Trikha, K. V. Honn, P. G. Wang // *Tetrahedron Lett.* – 2001. – V. 42. – P. 2625–2629.
182. Tennyson, A. G. Generation, Translocation and Action of Nitric Oxide in Living Systems / A. G. Tennyson, S. J. Lippard // *Chemistry and Biology*. - 2011. – V. 18. - P. 1211-1220.
183. 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.
184. Thomson, L. Kinetics of cytochrome c oxidation by peroxynitrite: implications for superoxide measurements in nitric oxide-producing biological systems / L. Thomson, M. Trujillo, R. Telleri, R. Radi // *Arch Biochem Biophys.* – 1995. – V. 319. – P. 491–497.
185. Toledo, J. C (Jr). Connecting the chemical and biological properties of nitric oxide / J. C (Jr) Toledo, O. Augusto // *Chem. Res. Toxicol.* - 2012. - V. 25. - P. 975–989.
186. Trujillo, M. Peroxynitrite reaction with the reduced and the oxidized forms of lipoic acid: new insights into the reaction of peroxynitrite with thiols / M. Trujillo, R. Radi // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2002. – V. 397. - P. 91–98.
187. Tsoukias, N. M. Erythrocyte consumption of nitric oxide in presence and absence of plasma-based hemoglobin / N. M. Tsoukias, A. S. Popel // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2002. – V. 282. – P. 2265–2277.

188. Van der Veen, R. C. Contrasting roles for nitric oxide and peroxyxynitrite in the peroxidation of myelin lipids / R. C. Van der Veen, L. J. Roberts // *J. Neuro-immunol.* – 1999. - V. 95. – P. 1–7.
189. VCCLAB, Virtual Computational Chemistry Laboratory: [Электронный ресурс]. URL: <http://www.vcclab.org>, 2005 (Дата посещения 10.04.2014).
190. Vithaythil, A. J. Changes in electron spin resonance signals of rat liver during chemical carcinogenesis / A. J. Vithaythil, J. L. Ternberg, B. Commoner // *Nature.* – 1965. – V. 207. – P. 1246–1249.
191. Wang, P. G. Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications / P. G. Wang, M. Xian, X. Tang, X. Wu, Z. Wen, T. Cai, A. J. Janczuk // *Chem. Rev.* – 2002. - V.102. P. 1091-1134.
192. Wennmalm, A. Dependence of the metabolism of nitric oxide (NO) in healthy human whole blood on the oxygenation of its red cell haemoglobin / A. Wennmalm, G. Bentin, A. S. Petersson // *Br. J. Pharmacol.* – 1992. – V. 106. - P. 507–508.
193. Wink, D. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors / D. Wink, K. Kasprzak, C. Maragos, R. Elespuru, M. Misra, T. Dunams, T. Cebula, W. Koch, A. Andrews, J. Allen, L. Keefer // *Science.* – 1991. - V. 254. – P. 1001-1003.
194. Wood, J. Models of the diffusional spread of nitric oxide: implications for neural nitric oxide signalling and its pharmacological properties / J. Wood, J. Garthwaite // *Neuropharmacology.* – 1994. – V. 33. – P. 1235–1244.
195. Wu, X. Glycosylated diazeniumdiolates: a novel class of enzyme-activated nitric oxide donors / X. Wu, X. Tang, M. Xian, P. G. Wang // *Tetrahedron. Let.* – 2001. – V. 42. – P. 3779–3782.
196. Xia, H. Cloned and expressed nitric oxide synthase proteins / H. Xia, D. S. Bredt // *Methods in enzymology.* – 1996. – V. 268. – P. 427-436.
197. Xia, C. Phosphorylation and regulation of G-protein-activated phospholipase C-beta 3 by cGMP-dependent protein kinases / C. Xia, Z. Bao, C. Yue, B. M. Sanborn, M. Liu // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276. – P. 9770–9777.

198. Young, J. D. A semiautomated hemolysis microassay for membrane lytic proteins / J. D. Young, L. G. Leong, M. A. DiNome, Z. A. Gohn // *Anal. Biochem.* – 1986. - V. 154. – P. 649-654.