УДК 546.72+544.4+544.01+548.3

Два механизма распада нитрозильных комплексов железа [$Fe_2(\mu$-SR)$(NO)_4$]

О. В. Покидова, Н. А. Санина, Л. А. Сырцова, Б. Л. Психа, Н. И. Шкондина, А. И. Котельников, С. М. Алдошин*

Институт проблем химической физики Российской академии наук, Российская Федерация, 142432 Черноголовка Московской обл., просп. Акад. Семенова, 1. Факс: (496) 522 3507. E-mail: olesia16@mail.ru, shkon_ni@icp.ac.ru

Известны два механизма распада нитрозильных комплексов железа (НКЖ) [$Fe_2(\mu$-SR$)(NO)_4$] в водной среде. В одном случае (например, комплекс [$Fe_2(\mu$-$SC_4H_3N_2)_2(NO)_4$]) происходит необратимый гидролиз и быстрое разложение НКЖ с выделением NO, сопровождающееся образованием продуктов дальнейшего превращения последнего. В другом случае (например, комплексы [$Fe_2(\mu$-$S(CH_2)_2NH_3)_2(NO)_4]SO_4 \cdot 2.5H_2O$ и [$Fe_2(\mu$-$SC_5H_{11}NO_2)_2(NO)_4]SO_4 \cdot 5H_2O$) гидролиз не происходит, а наблюдается обратимая диссоциация НКЖ с выделением в среду как NO, так и тиолатного лиганда. В данной работе установлена причина различия механизмов распада НКЖ, связанная с различием их редокс-потенциалов. Приводится экспериментальное доказательство этого вывода.

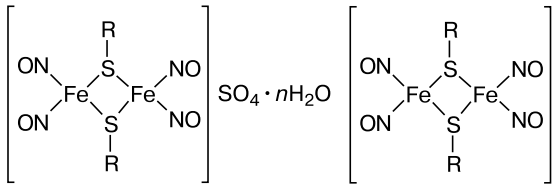
Ключевые слова: нитрозильные комплексы железа, оксид азота, NO-донор, цитохром С, редокс-потенциал.

В результате многочисленных исследований последних лет установлено, что монооксид азота (NO) является важным агентом биорегуляции разнообразных физиологических процессов[1,2]. В связи с этим растет интерес к синтезу и изучению новых соединений, которые могут легко доставлять NO к биологическим мишеням при физиологических значениях pH и служить основой для лекарственных препаратов нового поколения[3]. К их числу относятся тиолатные нитрозильные комплексы железа (НКЖ) с общей формулой [$Fe_2(SR)_2(NO)_4$], которые гидролизуются подобно S-нитрозотиолам[4] и диазениумдиалатам[5,6] с образованием NO в протонных средах[7] и составляют новый класс универсальных доноров NO для фармакологического применения[8–10].

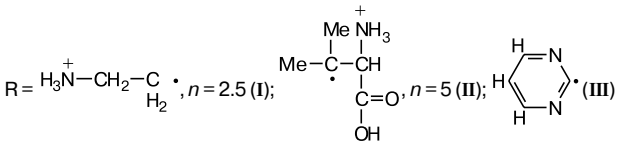
Особенно актуальным является изучение механизмов действия НКЖ и их трансформации в растворе. Ранее нами было установлено[7,11], что сера-нитрозильные комплексы железа в протонных средах в отсутствие активации разлагаются с выделением NO, причем константы скорости реакций зависят от молекулярного строения комплексов. При введении в раствор дезоксигемоглобина (Hb) образуется комплекс HbNO, который является депо-формой NO и обеспечивает не только хранение NO (время жизни свободного NO в клетке составляет секунды[12]), но и определяет пролонгированность действия НКЖ как доноров NO.

Кроме Hb, достаточно прочные нитрозильные комплексы может образовывать феррицитохром С (cyt c^{3+}), несмотря на то что атом Fe в геме cyt c^{3+} полностью координирован четырьмя атомами N порфирина и аминокислотами (гистидином-18 и метионином-80)[13]. Нами было установлено[14], что при введении в раствор, содержащий cyt c^{3+}, НКЖ [$Fe_2(\mu$-SR$)(NO)_4$] с цистеаминовыми тиоловыми лигандами (**I**) образуется NO-cyt c^{3+}. Реакции NO с cyt c^{3+} имеют большое значение для функционирования дыхательной цепи митохондрий[13]. Так, образование NO-cyt c^{3+} может приводить к ингибированию цепи переноса электронов. Вследствие взаимодействия NO с cyt c^{3+} происходит изменение пероксидазной активности cyt c^{3+}, что можно использовать для регуляции апоптоза[13].

Комплексы **I** и **II** обладают вазодилататорной[15] и противоопухолевой[16] активностью. Комплекс **I** является индуктором апоптоза клеток эритробластного лейкоза человека (линии K562) и карциномы толстой кишки человека (линии LS174T)[17].



I,II **III**



Ранее в наших работах были описаны два механизма распада НКЖ [$Fe_2(\mu$-SR$)(NO)_4$]. В одном случае происходит гидролиз с полным разложением НКЖ **III**,[18,19] в другом случае наблюдается обратимая диссоциация катионных НКЖ [$Fe_2(\mu$-SR$)(NO)_4$] (комплексы **I** и **II**) с выходом в раствор как NO, так

© 2017 «Известия Академии наук. Серия химическая»

и тиолатного лиганда[20,21]. Вследствие этого в присутствии избытка глутатиона в комплексах **I** и **II** происходит обмен тиолатного лиганда комплекса на глутатион с образованием более прочного комплекса[17]. Обнаруженный обмен тиолатного лиганда на глутатион может приводить к регенерации функционально важных глутатионированных ферментных систем с возвращением им противоопухолевой активности. Обнаруженная реакция обмена лиганда в НКЖ может быть полезна для прогнозирования противоопухолевой активности этих комплексов. Цель данной работы — выяснение причины различия механизмов распада НКЖ **III**, с одной стороны, и НКЖ **I**, НКЖ **II**, с другой.

Экспериментальная часть

В работе использовали 2-амино-2-гидроксиметилпропан-1,3-диол (Tris) («Serva», Германия), $Na_2HPO_4 \cdot 6H_2O$ и $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, сафранин Т, метиленовую синь («MP Biomedicals», Германия), метилвиологен, сульфат железа(II), D-пеницилламин и цитохром С из сердца лошади («SIGMA», США). Воду очищали перегонкой в дистилляторе «Bi/Duplex» (Германия).

Комплексы **I** (CCDC 663194), **II** (CCDC 680286), **III** (CCDC 681094) синтезированы по известным методикам[16,18,22].

Элементный анализ полученного поликристаллического порошка образцов комплексов выполнен в Аналитическом центре Института проблем химической физики РАН.

ИК-спектры регистрировали на фурье-спектрометре «Spectrum BX-II». Образцы готовили в виде таблеток с KBr (1 мг исследуемого вещества на 300 мг KBr).

Техника работы в атмосфере инертного газа описана ранее[7].

Комплекс I, $[Fe_2(\mu_2\text{-}SC_2H_7N)_2(NO)_4]SO_4 \cdot 2.5H_2O$. Найдено (%): C, 8.53; H, 2.77; N, 15.70; S, 17.71. $C_4H_{19}Fe_2N_6O_{10.5}S_3$. Вычислено (%): C, 9.10; H, 3.60; Fe, 21.25; N, 15.93; O, 31.87; S, 18.27. ИК-спектр, ν/см$^{-1}$: 3454 (ср), 3003 (сл), 2927 (сл), 1769 (с), 1727 (с), 1461 (сл), 1385 (ср), 1340 (ср), 1266 (ср), 1120 (с), 770 (сл), 620 (с); 1769, 1727 (νNO).

Комплекс II, $[Fe_2(\mu_2\text{-}SC_5H_{11}NO_2)_2(NO)_4]SO_4 \cdot 5H_2O$. Найдено (%): Fe, 15.60; C, 16.72; H, 4.50; N, 11.75; O, 38.02; S, 13.40. $C_{10}H_{32}Fe_2N_6O_{17}S_3$. Вычислено (%): Fe, 15.64; C, 16.76; H, 4.47; N, 11.73; O, 37.99; S, 13.41. ИК-спектр, ν/см$^{-1}$: 1771 (с), 1723 (с), 1626 (ср), 1375 (ср), 1337 (ср), 1269 (ср), 1189 (ср), 1114 (ср), 1089 (ср), 746 (ср); 1771, 1723 (νNO).

Комплекс III, $[Fe_2(SC_4H_3N_2)_2(NO)_4]$. Найдено (%): C, 2.00; H, 1.17; Fe, 24.47; N, 23.83; S, 13.96. $C_8H_6Fe_2N_8O_4S_2$. Вычислено (%): C, 2.12; H, 1.34; Fe, 24.59; N, 24.68; S, 14.15. ИК-спектр, ν/см$^{-1}$: 3472 (с), 1797 (оч.с), 1746 (оч.с), 1551 (ср), 1425 (сл), 1376 (ср), 1191 (сл), 1151 (ср), 1070 (сл), 811 (сл), 774 (сл), 739 (сл), 629 (сл), 550 (сл); 480 (сл); 1797, 1746 (νNO).

Гидролиз НКЖ III. При проведении эксперимента использовали свежеприготовленный $6 \cdot 10^{-3}$ *M* раствор НКЖ **III** в ДМСО. К навеске комплекса **III** в сосуде, заполненном аргоном, прибавляли анаэробный ДМСО с расчетом, чтобы получить раствор комплекса с концентрацией $6 \cdot 10^{-3}$ моль·л$^{-1}$. Комплекс перемешивали под током аргона в течение 3—5 мин до полного растворения. Сразу отбирали 0.1 мл раствора комплекса и вводили в анаэробную опытную кювету (V = 4 мл, длина оптического пути 1 см), содержащую 2.9 мл анаэробного 0.05 *M* фосфатного буфера (pH 7.0). В кювету сравнения помещали 0.05 *M* фосфатный буфер (pH 7.0). Конечная концентрация комплекса **III** составляла $2 \cdot 10^{-4}$ моль·л$^{-1}$, концентрация ДМСО — 3.3%. Регистрацию спектров поглощения проводили через определенные интервалы времени в диапазоне 450—650 нм при 25 °C.

Гидролиз НКЖ III в присутствии $K_3[Fe(CN)_6]$. Для исследования использовали свежеприготовленный раствор **III** в ДМСО ($6 \cdot 10^{-3}$ моль·л$^{-1}$). Отбирали 0.1 мл раствора комплекса и вводили в анаэробную опытную кювету, содержащую 2.6 мл анаэробного 0.05 *M* фосфатного буфера (pH 7.0). В кювету сравнения помещали 2.7 мл 0.05 *M* фосфатного буфера (pH 7.0). Реакцию начинали введением в опытную кювету и кювету сравнения по 0.3 мл анаэробного $4 \cdot 10^{-2}$ *M* раствора $K_3[Fe(CN)_6]$ в 0.05 *M* фосфатном буфере (pH 7.0). Конечная концентрация НКЖ **III** составляла $2 \cdot 10^{-4}$ моль·л$^{-1}$, концентрация ДМСО — 3.3%. Спектр поглощения записывали сразу после введения $K_3[Fe(CN)_6]$.

Распад комплекса II. Эксперименты проводили, используя один и тот же исходный раствор комплекса **II**. К навеске комплекса **II** в сосуде, заполненном азотом, прибавляли 0.05 *M* трис-HCl (pH 7.0) с таким расчетом, чтобы получить раствор с концентрацией $6 \cdot 10^{-4}$ моль·л$^{-1}$. Комплекс растворяли в течение 15 мин при перемешивании, затем отбирали раствор анаэробным шприцом и по каплям замораживали в жидком азоте. Для опытов проводили размораживание комплекса **II** в токе азота в течение 20 мин, сразу отбирали аликвоту раствора 0.75 мл и вводили в анаэробную кювету объемом 4 мл с длиной оптического пути 1 см, содержащую 2.25 мл 0.05 *M* анаэробного буфера (pH 7.0), с таким расчетом, чтобы конечная концентрация комплекса **II** составляла $1.5 \cdot 10^{-4}$ моль·л$^{-1}$. Кювета сравнения содержала 3 мл этого буфера. Спектры поглощения регистрировали через определенные интервалы времени в диапазоне 250—650 нм при 25 °C.

Распад комплекса II в присутствии $K_3[Fe(CN)_6]$ проводили по методике, описаной для комплекса **III**. Для экспериментов с комплексом **II** использовали 0.05 *M* трис-буфер (pH 7.0).

Кинетика взаимодействия комплексов II и III с cyt c^{3+} в присутствии $K_3[Fe(CN)_6]$. Эксперименты проводили, используя один и тот же исходный $2 \cdot 10^{-4}$ *M* раствор цитохрома С (коммерческий препарат цитохрома С содержал 10% ферроцитохрома). К навеске цитохрома С прибавляли 0.05 *M* фосфатный буфер (pH 7.0) с тем расчетом, чтобы получить раствор с концентрацией $2 \cdot 10^{-4}$ моль·л$^{-1}$, перемешивали под током аргона в течение 40 мин и замораживали в жидком азоте в виде шариков. Раствор хранили замороженным в жидком азоте. Перед использованием цитохром С размораживали в сосудах объемом 5 мл в токе аргона в течение 20 мин. В анаэробную кювету, содержащую 2.6 мл раствора $2 \cdot 10^{-4}$ *M* цитохрома С, вводили 0.3 мл $4 \cdot 10^{-2}$ моль·л$^{-1}$ раствора $K_3[Fe(CN)_6]$. Кювета сравнения содержала 2.6 мл 0.05 *M* фосфатного буфера (pH 7.0) и 0.3 мл $K_3[Fe(CN)_6]$. Записывали спектр поглощения раствора и убеждались, что получили cyt c^{3+}. Реакцию начинали введением одновременно в опытную кювету и кювету сравнения по 0.1 мл $6 \cdot 10^{-4}$ моль·л$^{-1}$ раствора **III** в ДМСО. Объем реакционной смеси в опытной кювете и кювете сравнения составлял 3 мл. Конечная концентрация комплекса **III** в опытной кювете и кювете сравнения была $2 \cdot 10^{-5}$ моль·л$^{-1}$. Далее записывали разностные спектры поглощения через определенные интервалы времени в диапазоне 450—650 нм при 25 °C.

Взаимодействие cyt c^{3+} с комплексом **II** в присутствии $K_3[Fe(CN)_6]$ проводили аналогично.

Взаимодействие II с цитохромом С без $K_3[Fe(CN)_6]$. В анаэробную кювету, содержащую 1 мл 0.05 *M* фосфатного буфера pH 7.0, вводили 1 мл $1.8 \cdot 10^{-4}$ моль·л$^{-1}$ раствора коммерческого препарата цитохрома С в 0.05 *M* фосфатном буфере (pH 7.0). Кювета сравнения содержала 2 мл 0.05 *M* фосфатного буфера (pH 7.0). Реакцию начинали введением одновременно в опытную кювету и кювету сравнения по 1 мл $6 \cdot 10^{-4}$ моль·л$^{-1}$ раствора **II** в том же буфере. Концентрация комплекса **II** в опытной кювете и кювете сравнения составляла $2 \cdot 10^{-4}$ моль·л$^{-1}$. Далее записывали разностные спектры поглощения через определенные интервалы времени в диапазоне 450—650 нм при 25 °С.

Взаимодействие комплексов I и II с редокс-индикаторами. В анаэробную кювету объемом 4 мл с длиной оптического пути 1 см, содержащую 2 мл раствора редокс-индикатора с исходной концентрацией $3 \cdot 10^{-5}$ моль·л$^{-1}$ (или $1.5 \cdot 10^{-5}$ моль·л$^{-1}$), вводили 1 мл $6 \cdot 10^{-4}$ моль·л$^{-1}$ раствора **I** или **II**. Кювета сравнения содержала 2 мл воды и 1 мл раствора **I** или **II**. Конечная концентрация НКЖ составила $2 \cdot 10^{-4}$ моль·л$^{-1}$, а редокс-индикатора — 10^{-5} или $2 \cdot 10^{-5}$ моль·л$^{-1}$. Записывали спектры поглощения в диапазоне 450—750 нм при 25 °С.

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

Определение количества cyt c^{3+} и NO-cyt c^{3+}. Количество cyt c^{3+} и NO-cyt c^{3+} оценивали спектрофотометрически. Для определения концентрации NO-cyt c^{3+} спектр поглощения реакционной системы, содержащей cyt c^{3+} и NO-cyt c^{3+}, разлагали на составляющие компоненты (cyt c^{3+} и NO-cyt c^{3+}) с помощью компьютерной программы MathCad, как описано в статье[7].

Обсуждение полученных результатов

В работах[18,19] описан механизм разложения комплекса **III** с пиримидиновыми тиолатными лигандами — (тетранитрозил)[μ-*S*-бис(пиримидин-2-илтио)дижелезо]. Кинетические зависимости количества NO, выделившегося в раствор при различных pH в одних и тех же условиях, имели максимумы, появление которых авторы объяснили дальнейшим превращением NO[18]. Для их описания была использована простейшая двухстадийная схема:

$$LFe(NO) \xrightarrow{k_1} LFe + NO, \quad (1)$$

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

$$NO \xrightarrow{k_2} \text{Продукты}. \quad (2)$$

В связи с возникновением закиси азота в растворах динитрозильных комплексов железа авторы[23] предположили, что конечным продуктом трансформации NO является N_2O. Образование закиси азота указывает на процесс образования связи N—N. Две молекулы NO не дают прочного связывания между собой, для его осуществления необходимо иметь молекулу NO в восстановленной форме. Как известно[24], взаимодействие NO и NO^- происходит с высокой скоростью и приводит к образованию гипонитритного анион-радикала $ONNO^-$, обладающего сильными окислительными свойствами. При его дальнейших превращениях образуется закись азота[25]. Два нитроксила HNO (протонированная форма NO^-) димеризуются с образованием непрочной молекулы HONNOH, которая разлагается на N_2O и H_2O. Однако протонирование NO^- является реакцией, запрещенной по спину, поэтому наиболее вероятной элементарной стадией, приводящей к закиси азота, является взаимодействие NO и NO^-. В обоих случаях восстановление молекул NO является первой наиболее вероятной элементарной стадией реакции, которая затем приводит к образованию закиси азота: $NO + e^- = NO^-$. Для образования NO^- из NO необходим восстановитель: стандартный редокс-потенциал NO составляет −0.8(±0.2) В.[26] В качестве такого восстановителя выступает комплекс **III** после диссоциации связи Fe—NO и координации молекулы растворителя (воды) по свободному координационному месту. Авторы полагают, что усиление его восстановительных свойств по сравнению с исходным комплексом является следствием увеличения электронной плотности на атоме Fe из-за потери NO-лиганда, несущего частичный отрицательный заряд, и координации донорной молекулы воды. Таким образом, можно предположить следующие две реакции, в которых потребляется NO. Первая реакция представляет собой окисление комплекса с переносом электрона

$$LFe + NO \xleftrightarrow{k_3} LFe_{окисл} + NO^-. \quad (3)$$

Вторая реакция (уравнение (4)) происходит только в случае более глубоких степеней трансформации комплекса, когда значительное количество восстановленной формы NO^- накапливается в реакции (3).

$$NO + NO^- \longrightarrow ONNO^- \longrightarrow N_2O \quad (4)$$

В работе[14] при исследовании взаимодействия комплекса **I** с cyt c^{3+}, было установлено два основных факта: 1) по образованию NO-cyt c^{3+} можно определять количество выделившихся из комплекса **I** NO-групп, 2) в присутствии $K_3[Fe(CN)_6]$, который окисляет комплекс **I**, происходит выделение всех NO-групп из комплекса за время его смешивания с $K_3[Fe(CN)_6]$. Поэтому у нас возникло предположение, что реакция (3) является той ключевой стадией, которая обусловливает необратимый распад НКЖ.

Прежде всего мы исследовали кинетику распада комплекса **III** (рис. 1, *a*) и изучили взаимодействие этого комплекса с $K_3[Fe(CN)_6]$ (см. рис. 1, *b*). За время смешивания реагентов происходит значительное уменьшение интенсивности поглощения, что свидетельствует о распаде комплекса **III**.

Для определения количества выделившихся NO-групп был использован cyt c^{3+}. Спектры поглощения, приведенные на рисунке 2, демонстрируют взаимодействие комплекса **III** с cyt c^{3+}. В результате обратимости образования NO-cyt c^{3+} (cyt c^{3+} + NO $\longleftrightarrow$ NO-cyt c^{3+}) необходимо брать избыток cyt c^{3+} по отношению к НКЖ.[14] Условия, при которых проводил-

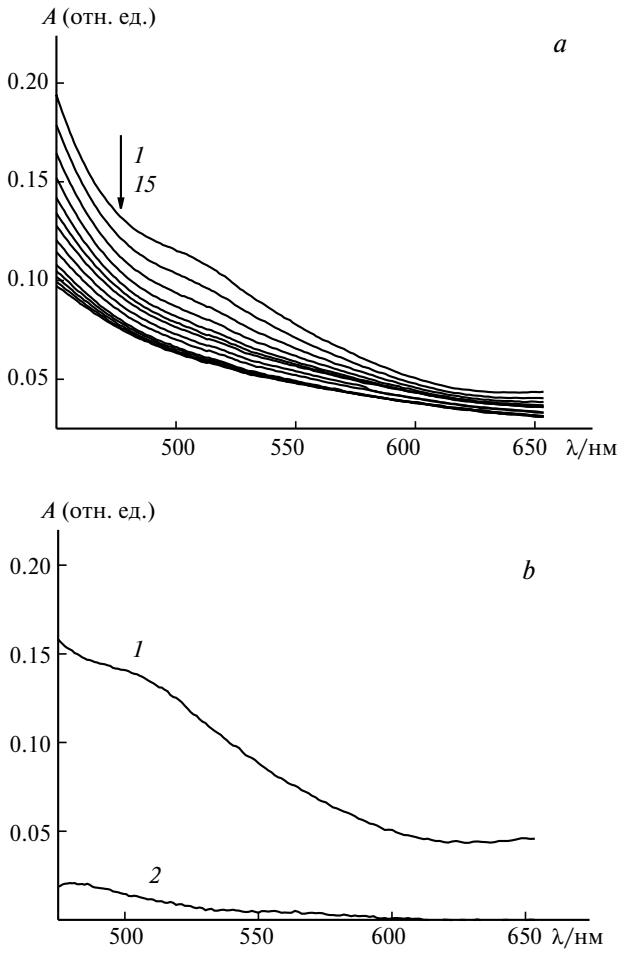


Рис. 1. (*a*) Изменение спектров поглощения комплекса **III** ($2 \cdot 10^{-4}$ моль·л$^{-1}$). Спектры зарегистрированы через 1 (*1*), 5 мин (*2*) после приготовления. Спектры (*3*)—(*15*) записаны последовательно с интервалом 15 мин. (*b*) Спектры поглощения при взаимодействии комплекса **III** ($2 \cdot 10^{-4}$ моль·л$^{-1}$) с $K_3[Fe(CN)_6]$ ($4 \cdot 10^{-3}$ моль·л$^{-1}$). *1* — Исходный спектр комплекса **III**, *2* — спектр, записанный сразу после добавления $K_3[Fe(CN)_6]$. Условия реакции (здесь и на рис. 2, 4): 25 °C, растворитель — 0.05 *M* фосфатный буффер (pH 7.0).

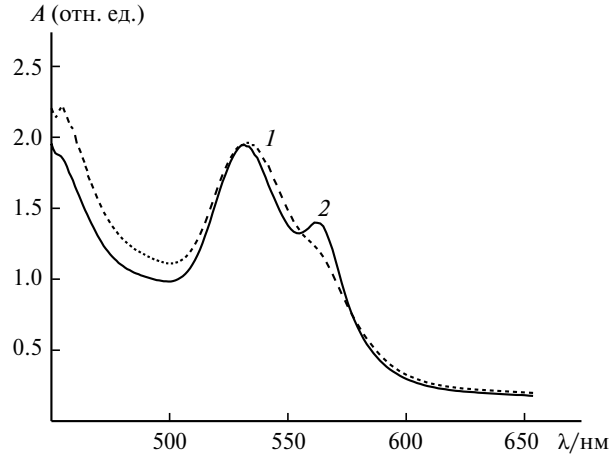


Рис. 2. Изменение разностных спектров поглощения при взаимодействии комплекса **III** ($2 \cdot 10^{-5}$ моль·л$^{-1}$) с $K_3[Fe(CN)_6]$ ($4 \cdot 10^{-3}$ моль·л$^{-1}$) и cyt c^{3+} ($1.5 \cdot 10^{-4}$ моль·л$^{-1}$). *1* — Спектр раствора cyt c^{3+} с $K_3[Fe(CN)_6]$; *2* — спектр, записанный сразу после добавления комплекса **III**.

ся этот эксперимент (см. рис. 2), являются наиболее оптимальными: исходная концентрация cyt c^{3+} имеет поглощение, близкое к 2, и ее нельзя повышать во избежание искажения спектра, а концентрацию НКЖ нельзя сделать больше $2 \cdot 10^{-5}$ моль·л$^{-1}$ без потери точности вследствие малого объема пробы. Реакция проводится в присутствии $K_3[Fe(CN)_6]$, так как без него происходит восстановление cyt c^{3+} до ферроцитохрома, который при pH 7 не взаимодействует с NO.[27] Как видно из рисунка 2, в результате реакции происходит быстрое образование $5 \cdot 10^{-5}$ моль·л$^{-1}$ NO-cyt c^{3+}, что свидетельствует о выделении в раствор и связывании с cyt c^{3+} 2.5 групп NO. Аналогичная картина наблюдалась и при разложении комплекса **I**. При тех же условиях освобождалось 3.08 группы NO.[14]

В данной работе также изучено взаимодействие $K_3[Fe(CN)_6]$ с другим катионным комплексом **II**. Сначала была исследована кинетика распада комплекса **II** (рис. 3, *a*). На рисунке 3, *a* показано изменение спектра поглощения комплекса **II** во времени. При

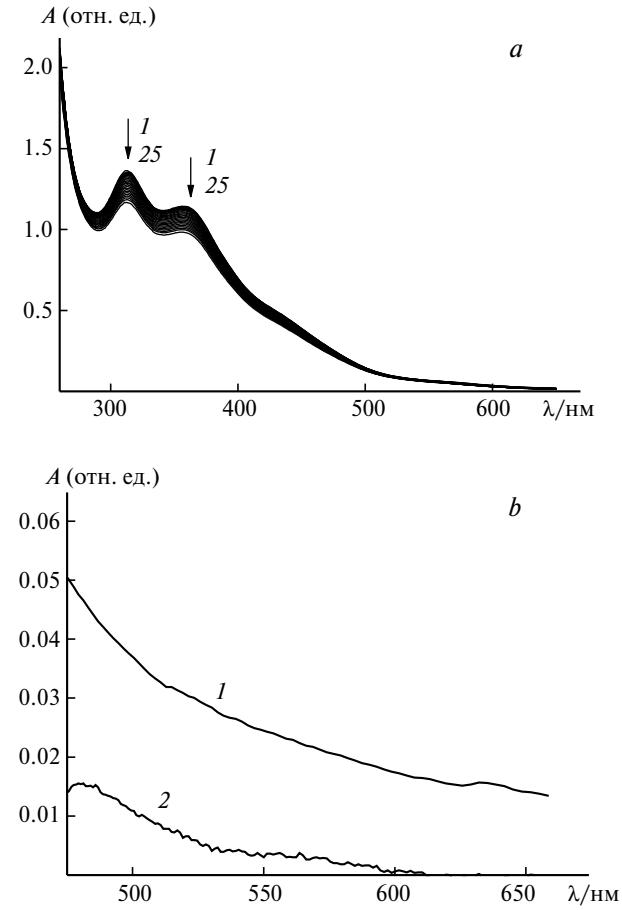


Рис. 3. (*a*) Изменение спектров поглощения комплекса **II** ($1.5 \cdot 10^{-4}$ моль·л$^{-1}$). Спектры зарегистрированы через 1 (*1*), 5 (*2*), 10 мин (*3*) после введения; спектры *4*, *5* записаны с интервалом в 10 мин, спектры *6*—*8* — с интервалом в 15 мин, спектры *9*—*25* — с интервалом в 30 мин. (*b*) Изменение спектров поглощения при взаимодействии комплекса **II** ($2 \cdot 10^{-5}$ моль·л$^{-1}$) с $4 \cdot 10^{-3}$ моль·л$^{-1}$ $K_3[Fe(CN)_6]$. *1* — Исходный спектр комплекса **II**, *2* — спектр, записанный сразу после добавления $K_3[Fe(CN)_6]$. Условия реакции: 25 °C, растворитель — трис-HCl (pH 7.0).

добавлении $K_3[Fe(CN)_6]$, как и в случае с **III**, окисленный комплекс **II** претерпевает быстрый распад, фиксируемый по значительному уменьшению интенсивности поглощения в видимой области спектра (см. рис. 3, *b*).

Видно, что распад комплекса **II**, как и комплекса **III**, происходит за время смешивания с $K_3[Fe(CN)_6]$. Для доказательства того, что при этом происходит быстрое освобождение NO-групп, была проведена реакция с cyt c^{3+} (рис. 4). При смешивании реагентов быстро образовывался комплекс NO-cyt c^{3+}. Его концентрация составила $6.7 \cdot 10^{-5}$ моль·л$^{-1}$, что соответствует выделению 3.3 групп NO на один комплекс **II**.

В то же время нами установлено, что в других случаях (в отсутствие окислителей) гидролиз комплексов[20,21] $[Fe_2(\mu\text{-}S(CH_2)_2NH_3)_2(NO)_4]SO_4 \cdot 2.5H_2O$ и $[Fe_2(\mu\text{-}SC_5H_{11}NO_2)_2(NO)_4]SO_4 \cdot 5H_2O$ не происходит, а наблюдается обратимая диссоциация НКЖ с выделением в среду как NO, так и тиолатного лиганда. Если предположить, что лиганд (L) выделяется как из комплекса **II**, так и из продукта P_1, полученного после выделения NO из **II**, можно предложить следующий механизм реакции[21]:

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

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

$$\mathbf{II} \xleftrightarrow{k_3} P_3 + L.$$

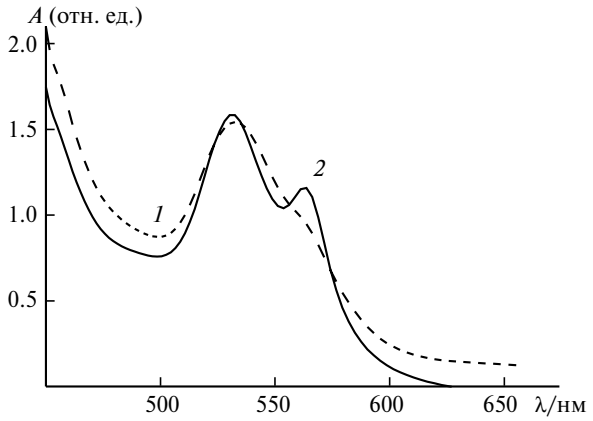


Рис. 4. Изменение разностных спектров поглощения при взаимодействии комплекса **II** ($2 \cdot 10^{-5}$ моль·л$^{-1}$) с cyt c^{3+} ($1.5 \cdot 10^{-4}$ моль·л$^{-1}$) в присутствии $K_3[Fe(CN)_6]$ ($4 \cdot 10^{-3}$ моль·л$^{-1}$). *1* — Спектр cyt c^{3+} в присутствии $K_3[Fe(CN)_6]$, *2* — спектр, записанный сразу после добавления комплекса **II**.

Ранее с помощью сенсорного электрода[17] были определены константы $k_1 = (4.6 \pm 0.1) \cdot 10^{-3}$ с$^{-1}$; $k_{-1} = (9.7 \pm 0.2) \cdot 10^3$ л·моль$^{-1}$·с$^{-1}$. Для полного описания системы требуется определить константы k_2, k_{-2}, и k_3. Мы полагаем, что комплекс **II** и продукт P_1 спектрофотометрически неразличимы. Таким образом, экспериментально измеряемая величина $x(t) = [\mathbf{II}] + [P_1]$.

Схеме реакций соответствует следующая система уравнений:

$$d[\mathbf{II}]/dt = -k_1[\mathbf{II}] + k_{-1}[P_1][NO] - k_3[\mathbf{II}],$$

$$d[NO]/dt = k_1[\mathbf{II}] - k_{-1}[P_1][NO],$$

$$d[P_1]/dt = k_1[\mathbf{II}] - k_{-1}[P_1][NO] - k_2[P_1] + k_{-2}[P_2][L], \quad (5)$$

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

$$d[L]/dt = k_2[P_1] - k_{-2}[P_2][L] + k_3[\mathbf{II}].$$

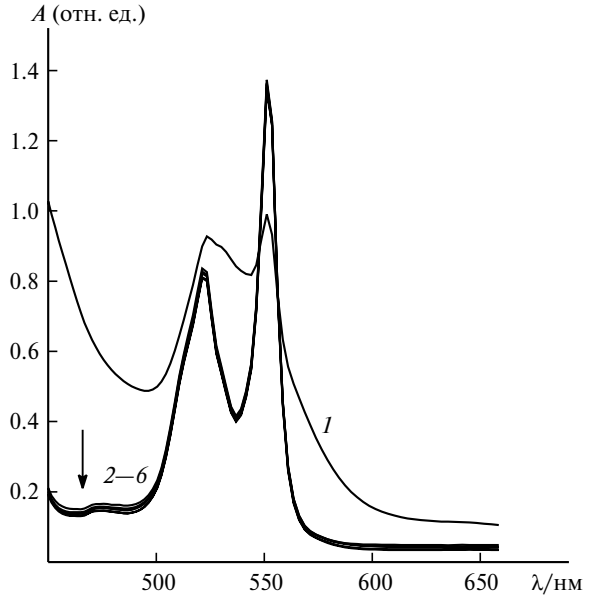


Рис. 5. Изменение разностных спектров поглощения при взаимодействии комплекса **II** ($2 \cdot 10^{-4}$ моль·л$^{-1}$) с Cyt ($6 \cdot 10^{-5}$ моль·л$^{-1}$) в отсутствие $K_3[Fe(CN)_6]$. Спектры записаны через 1 (*2*), 9 (*3*), 24 (*4*), 54 (*5*), 69 мин (*6*) после начала реакции. *1* — спектр исходного коммерческого цитохрома С (смесь ферроцитохрома и феррицитохрома). Условия реакции: 25 °С, растворитель — 0.05 *M* фосфатный буфер (pH 7.0).

Таблица 1. Редокс-потенциалы реагентов

Редокс-индикатор	Редокс-потенциал/В (при pH 7.0)	Окраска	
		восстановленная форма	окисленная форма
Метилвиологен	–0.4	Синяя	Бесцветная
Сафранин Т	–0.29	Бесцветная	Фиолетово-красная
Метиленовая синяя	+0.01	Бесцветная	Синяя
Цитохром С	+0.24	—	—
$K_3[Fe(CN)_6]$	+0.35	—	—

В результате решения системы уравнений, используя метод кинетического моделирования, было найдено значение k_2 (скорость реакции выделения пеницилламинового лиганда из комплекса **II**): $k_2 = (1.8 \pm 0.2) \cdot 10^{-3}$ с$^{-1}$, а также $k_{-2} \sim 0.1$—0.2 л·моль$^{-1}$·с$^{-1}$, $k_3 \sim 1.0 \cdot 10^{-3}$ с$^{-1}$.

Таким образом, если НКЖ может восстановить NO ($E_0 < -0.8$ В), то при переходе в окисленное состояние он будет неизбежно подвергаться необратимому распаду, о чем свидетельствуют рисунки 1, *b*, 3, *b* и данные статьи[18] (в случае комплекса **III**). В то же время мы предположили, что НКЖ, имеющие $E_0 > -0.8$ В и не способные поэтому восстановить NO, не переходят в окисленное состояние и вследствие этого претерпевают обратимую диссоциацию.

Для проверки этого вывода мы провели оценку величины E_0 комплексов **I** и **II** по реакции с красителями, значения E_0 которых известны (табл. 1).

Все эксперименты проводили в атмосфере аргона, так как в присутствии кислорода НКЖ быстрее распадаются[18]. Было установлено[14], что комплексы **I** и **II** восстанавливают cyt c^{3+}, E_0 которого равен +0.254 В[28] (рис. 5).

В то же время комплексы **I** и **II** не восстанавливают метилвиологен и сафранин Т (рис. 6, 7), и только комплекс **II** восстанавливает метиленовую синь (см. рис. 7).

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что величина E_0 комплексов **I** и **II** находится в следующих диапазонах:

$$+0.01 \text{ В} < E_0 (\mathbf{I}) < +0.24 \text{ В},$$

$$-0.29 \text{ В} < E_0 (\mathbf{II}) < +0.01 \text{ В}.$$

Отсюда следует, что комплексы **I** и **II** не могут восстановить NO, и поэтому эти НКЖ в водной среде не претерпевают стадию окисления и не подвергаются необратимому гидролизу. Распад данных комплексов в водной среде с выделением NO и тиолатного лиганда происходит обратимо[20,21].

Таким образом, нами предложен способ, позволяющий легко предсказать, по какому пути будут распа-

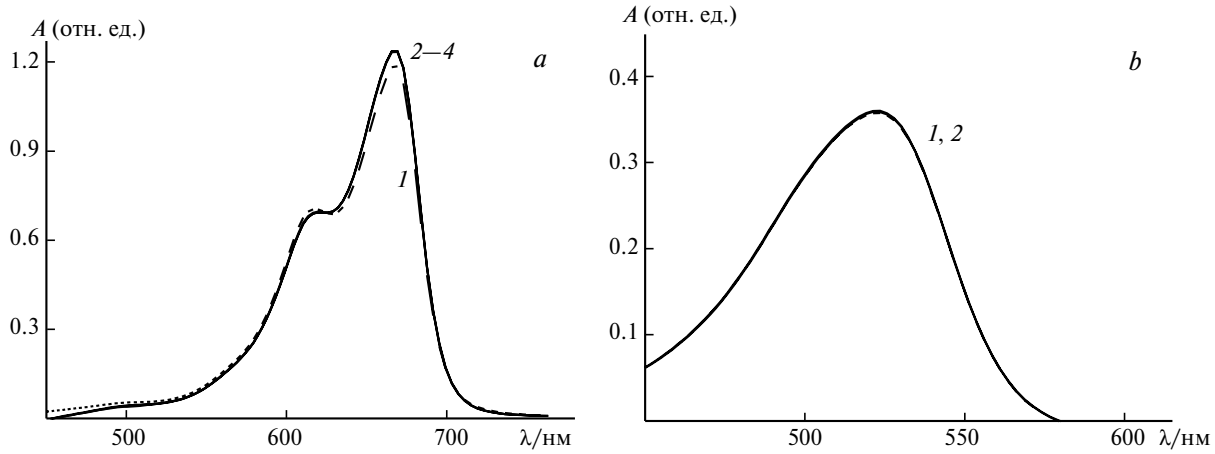


Рис. 6. Изменение спектров поглощения при взаимодействии комплекса **I** ($2 \cdot 10^{-4}$ моль·л$^{-1}$) с метиленовой синью ($2 \cdot 10^{-5}$ моль·л$^{-1}$) (*a*) и сафранином Т (10^{-5} моль·л$^{-1}$) (*b*). Спектры записаны через 1 (*2*), 5 (*3*) и 10 мин (*4*) после начала реакции. *1* — Исходный спектр метиленовой сини (*a*) или сафранина Т (*b*). Условия реакции: 25 °С, растворитель — вода.

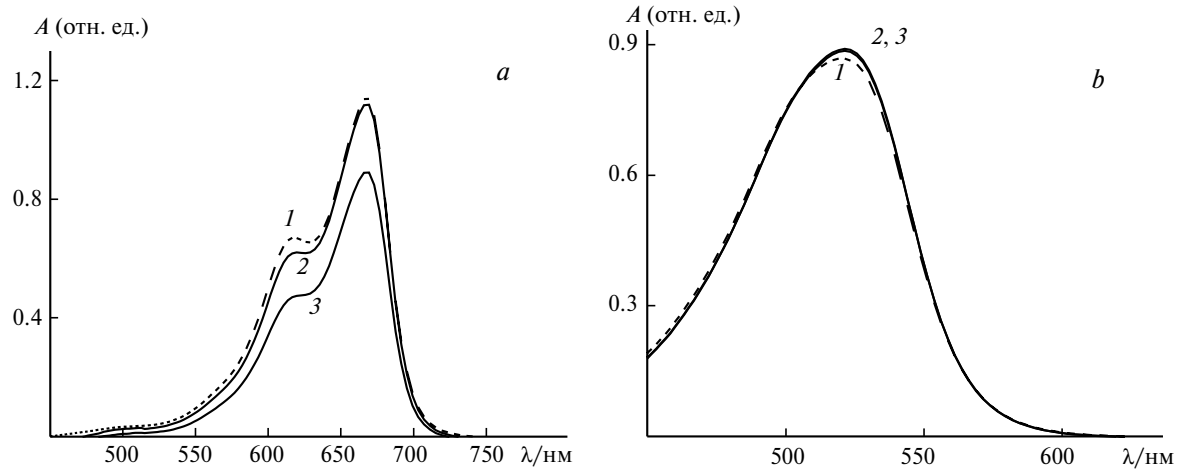


Рис. 7. Изменение спектров поглощения при взаимодействии комплекса **II** ($2 \cdot 10^{-4}$ моль·л$^{-1}$) с метиленовой синью ($2 \cdot 10^{-5}$ моль·л$^{-1}$) (*a*) или сафранином Т (10^{-5} моль·л$^{-1}$) (*b*). Спектры записаны через 1 (*2*) и 5 мин (*3*) после начала реакции. *1* — Исходный спектр метиленовой сини (*a*) или сафранина Т (*b*). Условия реакции: 25 °С, растворитель — вода.

даться НКЖ. Для этого достаточно провести реакцию с метилвиологеном. Если НКЖ не восстанавливает краситель, можно предполагать, что распад идет по пути обратимой диссоциации лигандов комплекса с возможным обменом лиганда на глутатион и существует возможность противоопухолевой активности НКЖ.

Авторы выражают благодарность А. В. Чудинову за написание компьютерной программы для обработки спектров поглощения методом наименьших квадратов с использованием программы Mathcad.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 13-03-00549).

Список литературы

1. J. A. McCleverty, *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 403.
2. N. M. Crawford, *J. Exp. Bot.,* 2006, **57**, 471.
3. K. M. Davies, D. A. Wink, J. E. Saavedra, L. Keefer, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 5473.
4. R. Butler, I. L. Megson, *Chem. Rev.*, 2002, **102**, 1155.
5. A. S. Dutton, J. M. Fukuto, K. N. Houk, *Inorg. Chem.,* 2004, **43**, 1039.
6. A. S. Dutton, Ch. P. Suhrada, K. M. Miranda, D. A. Wink, J. M. Fukuto, K. N. Houk, *Inorg. Chem.,* 2006, **45**, 2448.
7. 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: Biol. Chem.*, 2007, **16**, 181.
8. О. С. Жукова, Н. А. Санина, Л. В. Фетисова, Г. К. Герасимова, *Биотерапевт. журн.*, 2006, **5**, 14.
9. A. A. Timoshin, A. F. Vanin, T. R. Orlova, N. A. Sanina, E. K. Ruuge, S. M. Aldoshin, E. I. Chazov, *Nitric Oxide*, 2007, **16**, 286.
10. Л. М. Борисова, И. Ю. Кубасова, М. П. Киселева, З. С. Смирнова, Н. А. Санина, С. М. Алдошин, Т. Н. Руднева, *Биотерапевт. журн.*, 2007, **6**, 42.
11. Н. А. Санина, Л. А. Сырцова, Н. И. Шкондина, Е. С. Малкова, А. И. Котельников, С. М. Алдошин, *Изв. АН. Сер. хим.*, 2007, 732 [N. A. Sanina, L. A. Syrtsova, N. I. Shkondina, E. S. Malkova, A. I. Kotelnikov, S. M. Aldoshin, *Russ. Chem. Bull.* (*Int. Ed.*), 2007, **56**, 761].
12. A. L. Lehninger, D. L. Nelson, M. M. Cox, in *Principles of Biochemistry*, Ed. V. Neal, Worth Publishers, New York, 1993, p. 769.
13. А. Н. Осипенко, Г. Г. Борисенко, Ю. А. Владимиров, *Успехи биол. химии*, 2007, **47**, 259 [A. N. Osipov, G. G. Borisenko, Yu. A. Vladimirov, *Biochemistry* (*Moscow*), *Special iss. Biol. Chem. Rev.* (*Engl. Transl.*), 2007, **72**, 1491].
14. Н. А. Санина, Л. А. Сырцова, Н. И. Шкондина, Т. Н. Руднева, А. И. Котельников, С. М. Алдошин, *Изв. АН. Сер. хим.*, 2010, 1528 [N. A. Sanina, L. A. Syrtsova, N. I. Shkondina, T. N. Rudneva, A. I. Kotel´nikov, S. M. Aldoshin, *Russ. Chem. Bull.* (*Int. Ed.*), 2010, **59**, 1565].
15. Пат. РФ 2460531 C1; *Бюл. изобрет.,* 2012, 25.
16. US Pat. 8067628 B2; 2011.
17. Н. А. Санина, О. С. Жукова, З. С. Смирнова, Л. М. Борисова, М. П. Киселева, С. М. Алдошин, *Биотерапевт. журн.*, 2008, **7**, № 1, 52.
18. 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, *Изв. АН. Сер. хим.*, 2009, 560 [N. A. Sanina, G. V. Shilov, S. M. Aldoshin, A. F. Shestakov, L. A. Syrtsova, N. S. Ovanesyan, E. S. Chudinova, N. I. Shkondina, N. S. Emel´yanova, A. I. Kotel´nikov, *Russ. Chem. Bull.* (*Int. Ed.*), 2009, **58**, 572].
19. Л. А. Сырцова, Н. А. Санина, А. Ф. Шестаков, Н. И. Шкондина, Т. Н. Руднева, Н. С. Емельянова, А. И. Котельников, С. М. Алдошин, *Изв. АН. Сер. хим.*, 2010, 2148 [L. A. Syrtsova, N. A. Sanina, A. F. Shestakov, N. I. Shkondina, T. N. Rudneva, N. S. Emel´yanova, A. I. Kotel´nikov, S. M. Aldoshin, *Russ. Chem. Bull.* (*Int. Ed.*), 2010, **59**, 2203].
20. L. A. Syrtsova, N. A. Sanina, E. N. Kabachkov, N. I. Shkondina, A. I. Kotel´nikov, S. M. Aldoshin, *RSC Adv.,* 2014, **4**, 24560.
21. L. A. Syrtsova, N. A. Sanina, K. A. Lyssenko, E. N. Kabachkov, B. L. Psikha, N. I. Shkondina, O. V. Pokidova, A. I. Kotel´nikov, S. M. Aldoshin, *Bioinorg. Chem. Appl.*, 2014, 9; http://dx.doi.org/10.1155/2014/641407.
22. Пат. РФ 2441873 C2, *Бюл. изобрет.*, 2012, 4.
23. А. Ф. Ванин, *Биохимия*, 1998, **63**, 924 [A. F. Vanin, *Biochemistry* (*Moscow*) (*Engl. Transl.*), 1998, **63**].
24. S. V. Lymar, V. Shafirovich, G. A. Poskrebyshev, *Inorg. Chem.*, 2005, **44**, 5212.
25. G. A. Poskrebyshev, V. Shafirovich, S. V. Lymar, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 891.
26. M. D. Bartberger,W. Liu, E. Ford, K. M. Miranda, C. Switzer, J. M. Fukuto, P. J. Farmer, D. A. Wink, K. N. Houk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, **99**, 10958.
27. M. Hoshino, K. Ozawa, H. Seki, P. C. Ford, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 9568.
28. A. L. Lehninger, D. L. Nelson, M. M. Cox, in *Principles of Biochemistry*, Ed. V. Neal, Worth Publishers, New York, 1993, p. 388.

Поступила в редакцию 14 июня 2016;
после доработки — 18 октября 2016