

КИНЕТИКА И МЕХАНИЗМ  
ХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ, КАТАЛИЗ

УДК 57.037:544.43

КИНЕТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ  
ДОНОРОВ ОКСИДА АЗОТА С ЭРИТРОЦИТАМИ

© 2020 г. Б. Л. Психа<sup>1\*</sup>, Н. И. Нешев<sup>1</sup>, Е. М. Соколова<sup>1</sup>, Н. А. Санина<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт проблем химической физики Российской академии наук, Черноголовка, Россия

\*E-mail: psi@icp.ac.ru

Поступила в редакцию 24.04.2019;  
после доработки 09.09.2019;  
принята в печать 20.12.2019

Исследован механизм взаимодействия с суспензией эритроцитов шести сера-нитрозильных комплексов железа, способных выделять оксид азота в результате спонтанного гидролитического разложения. Предложена кинетическая модель процесса, которая включает в себя реакции выделения NO из комплекса в раствор, взаимодействие NO с оксигемоглобином внутри эритроцита и растворенным кислородом, а также адсорбцию комплексов на поверхности эритроцитов. Определены значения кинетических параметров. Разработанная модель количественно описывает экспериментальные данные по накоплению метгемоглобина – продукта взаимодействия оксигемоглобина с оксидом азота, полученные при разных концентрациях исследуемых комплексов и эритроцитов в системе.

*Ключевые слова:* сера-нитрозильные комплексы железа, эритроциты, оксид азота, гемоглобин, механизм реакции, кинетическое моделирование.

DOI: 10.31857/S0207401X20070109

## ВВЕДЕНИЕ

Открытие роли оксида азота в качестве сигнальной молекулы, регулирующей многие физиологические процессы в организме, обозначило одновременно фармакологический потенциал химических соединений, способных разлагаться с выделением молекул оксида азота – доноров оксида азота [1–3]. В частности, в качестве перспективной NO-донорной субстанции для создания кардиотропных и противоопухолевых фармакологических препаратов рассматриваются биядерные нитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами – сера-нитрозильные комплексы железа (СНКЖ) [4–6]. К настоящему времени разработаны методы синтеза, которые позволили создать широкое разнообразие СНКЖ на основе меркаптопроизводных ароматических азотистых гетероциклов, а также алифатических сульфгидрильных соединений на основе аминокислот [7, 8].

Выделение оксида азота указанными комплексами происходит в ходе спонтанной гидролитической диссоциации в водной среде [8]. Вместе с тем реализация такой NO-донорной активности в условиях организма имеет определенную специфику, связанную с взаимодействием экзогенных NO-доноров с биосубстратами. Как известно, физиологическая активность оксида азота проявляется в первую очередь в крови, которая по своему клеточному

составу на 90% состоит из эритроцитов. В связи с этим было предложено использовать суспензию эритроцитов в качестве модели внутреннего содержания кровеносного сосуда, где реализуется фармакологический эффект доноров оксида азота в отношении сердечно-сосудистой системы [9, 10].

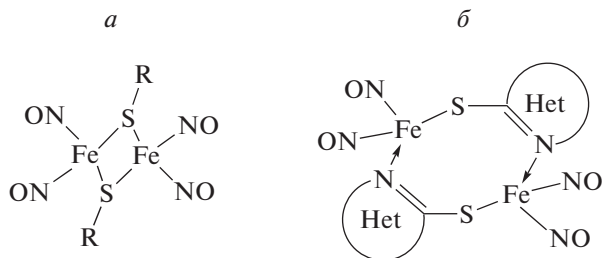
Экспериментальной основой настоящей работы послужили выполненные ранее исследования кинетики образования внутриэритроцитарного метгемоглобина в реакции оксигемоглобина с оксидом азота, выделяющимся при разложении СНКЖ [11, 12]. В качестве СНКЖ были использованы:

– нейтральные комплексы состава  $[\text{Fe}_2(\text{SR})_2(\text{NO})_4]$ , где R – бензотиазол-2-ил (БТЗ) [13], 1-метил-имидазол-2-ил (МИМ) [14] и пиримидин-2-ил (ПИМ) [15];

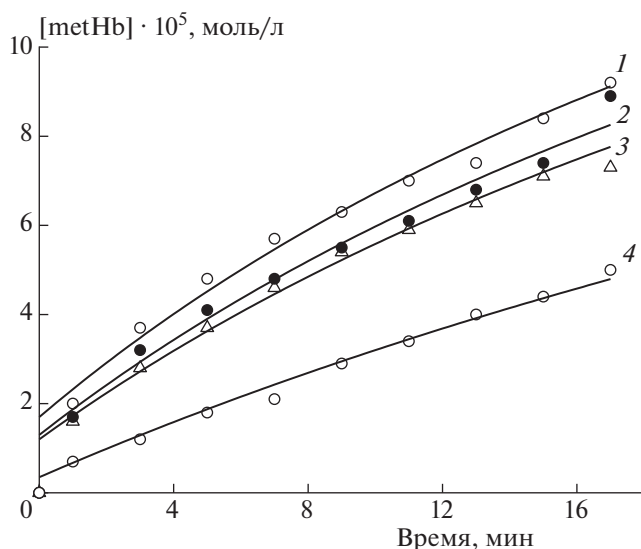
– неорганический анионный тиосульфатсодержащий комплекс ТНК состава  $\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  [16];

– катионные комплексы, содержащие в качестве S-лигандов цистеамин,  $[\text{Fe}_2(\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_3)_2(\text{NO})_4]\text{SO}_4 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$  (ЦАК) [17], и пеницилламин,  $[\text{Fe}_2(\text{S}(\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{NH}_3)\text{COOH}))_2(\text{NO})_4]\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (ПЕН) [18].

Для комплексов ТНК, ПИМ, ЦАК, ПЕН характерна структура  $\mu$ -S-типа, включающая два атома железа (расстояние между ними  $\sim 2.7 \text{ \AA}$ ),



**Рис. 1.** Структура биядерных сера-нитрозильных комплексов железа: *a* – ТНК, ПИМ, ЦАК, ПЕН; *б* – БТЗ, МИМ.



**Рис. 2.** Кинетические кривые образования метгемоглобина под действием нитрозильного комплекса железа БТЗ в суспензиях эритроцитов различного гематокрита. Концентрация комплекса  $[БТЗ]_0 = 1.2 \cdot 10^{-4}$  моль/л. Исходная концентрация гемоглобина в суспензиях  $[Hb]_0 \cdot 10^4 = 1.5$  (1), 2 (2), 3 (3), 5 моль/л (4). Температура – 37°C. Точки – эксперимент, линии – расчет по схеме реакций (1')–(4) и найденным значениям кинетических параметров.

несущие по две NO-группы каждый и связанные между собой мостиковыми атомами серы, принадлежащими соответствующему тиоловому лиганду – R (рис. 1а). Данные комплексы являются структурными аналогами  $Fe_2S_2$ -кластеров в активных центрах негемовых ферментов. Для комплексов БТЗ и МИМ характерна структура  $\mu$ -S–C–N-типа (рис. 1б). В этих комплексах атомы железа (расстояние между ними  $\sim 4.0$  Å) связаны через мостики из цепочки атомов –S–C–N– атомов тиолсодержащего азотистого гетероцикла: бензтиазола и метилимидазола соответственно.

В экспериментах использовали суспензию эритроцитов в изотоническом растворе NaCl, содержащем 5 мМ Na-фосфатного буфера, pH 7.4.

Суспензия содержала 1.6% клеток по объему, чему соответствовала концентрация внутриэритроцитарного гемоглобина  $\sim 2 \cdot 10^{-4}$  мол · л<sup>-1</sup> в расчете на один гем. Сера-нитрозильные комплексы железа вводили в суспензию эритроцитов в виде растворов в воде (ТНК, ЦАК, ПЕН) или в ДМСО (ПИМ, МИМ, БТЗ). Эксперимент проводили при 37°C и непрерывном перемешивании на воздухе.

Количество образовавшегося метгемоглобина определяли в предварительно гемолизированных аликвотах суспензии по оптическому поглощению при 630 нм с учетом поправки на светорассеяние. Концентрацию метгемоглобина рассчитывали по формуле

$$[HbFe^{3+}] = \frac{\Delta A_{630}}{\epsilon_{met} - \epsilon_{oxy}} d,$$

где  $\Delta A_{630}$  – прирост оптического поглощения образца при 630 нм в сравнении с контрольным образцом;  $\epsilon_{met} = 3.8$  мМ<sup>-1</sup> · см<sup>-1</sup>,  $\epsilon_{oxy} = 0.11$  мМ<sup>-1</sup> · см<sup>-1</sup> – коэффициенты экстинкции метгемоглобина и оксигемоглобина, соответственно;  $d$  – коэффициент разбавления в кювете.

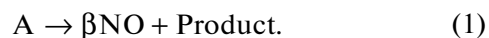
С каждым комплексом были проведены две серии кинетических экспериментов. В первой серии варьировали концентрацию СНКЖ, сохраняя неизменным гематокрит суспензии (объемное процентное содержание клеток). Во второй серии варьировали гематокрит, сохраняя неизменной концентрацию комплекса. Типичные экспериментальные данные приведены в виде точек на рис. 2–6.

Целью данной работы была разработка кинетической модели, количественно описывающей образование метгемоглобина в процессе взаимодействия СНКЖ с суспензией эритроцитов.

## ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ

Образование метгемоглобина в системе “нитрозильный комплекс железа – суспензия эритроцитов” происходит в результате следующих последовательно протекающих процессов:

1. *Распад комплекса с выделением NO.* Распад нитрозильных комплексов железа в водной среде – сложный, многостадийный процесс, механизм которого зависит от химического строения комплекса. Поэтому в первом приближении для исследуемых комплексов мы рассмотрим в качестве общей модели следующую реакцию:

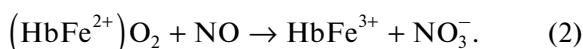


Здесь A – исследуемый комплекс, Product – продукт его превращения,  $\beta$  – стехиометрический коэффициент образования NO (значение  $\beta = 4$  соответствует полному выходу в раствор всех NO-групп биядерного СНКЖ). Константа скорости

реакции  $k_1$  и коэффициент  $\beta$  являются эффективными параметрами распада комплекса.

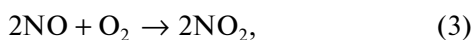
2. *Диффузия NO из раствора внутрь эритроцита.* Эта стадия не является лимитирующей, поскольку малый размер молекулы оксида азота в сочетании с ее липофильностью определяет высокую диффузионную способность NO в биологических тканях [19]. По этой причине мембрана эритроцита не может рассматриваться в качестве серьезного барьера для диффузии NO внутрь клетки. Поэтому в данном случае мы рассматриваем суспензию эритроцитов как гомогенную среду, в которой средняя концентрация оксигемоглобина  $[(\text{HbFe}^{2+})\text{O}_2]$  определяется процентным содержанием эритроцитов (гематокрит суспензии).

3. *Взаимодействие NO с оксигемоглобином.* Внутри клетки оксид азота вступает с оксигемоглобином в реакцию, продуктами которой являются метгемоглобин и нитрат-анион:



В хорошо перемешиваемой аэробной суспензии эритроцитов, которая использовалась для проведения экспериментов [11, 12], практически весь внутриэритроцитарный гемоглобин присутствует в виде комплекса с кислородом,  $(\text{HbFe}^{2+})\text{O}_2$ , — оксигемоглобина, содержание которого в рассматриваемых условиях составляет 97–98%. Константа скорости реакции (2) весьма высока и составляет по имеющимся данным  $(3 \div 5) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  [20]. Если в растворе содержится не собственно оксигемоглобин, а суспензия эритроцитов, оксид азота поглощается с меньшей, но все же значительной константой скорости, составляющей  $5.2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  [21].

Реакции (1), (2) являются основными в процессе образования метгемоглобина в системе “нитрозильный комплекс железа — суспензия эритроцитов”. Однако для количественного описания экспериментальных данных эти стадии необходимо дополнить другими реакциями. Поскольку эксперимент проводится в открытой системе на воздухе и в ней содержится определенное количество растворенного кислорода, необходимо учитывать процесс окисления NO. Содержание кислорода в системе в условиях эксперимента (37°C, атмосферное давление) при непрерывном перемешивании составляет  $\sim 2 \cdot 10^{-4}$  моль/л [22]. Согласно [23], взаимодействие оксида азота с кислородом включает несколько стадий и расходование NO в этом процессе может быть описано суммарной реакцией:



с эффективной константой скорости  $2k_3 = 8.8 \cdot 10^6 \text{ M}^{-2} \cdot \text{c}^{-1}$ .

Кроме того, для всех рассмотренных комплексов (кроме комплекса ПЕН) наблюдается характерная

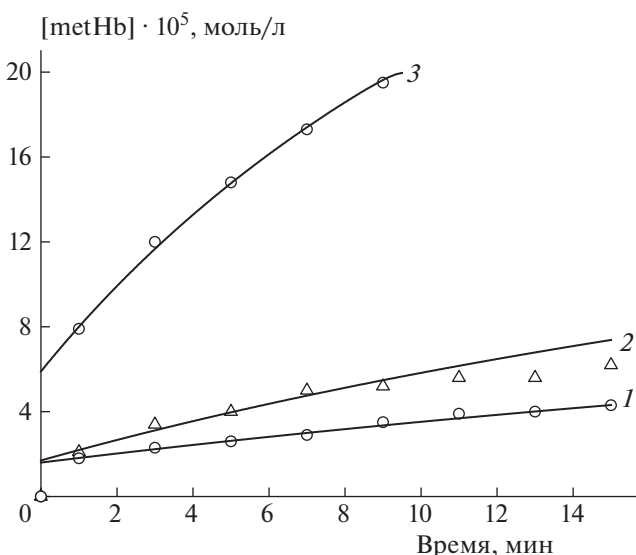


Рис. 3. Кинетические кривые образования метгемоглобина в суспензии эритроцитов под действием нитрозильного комплекса железа БТЗ. Концентрация комплекса  $[\text{БТЗ}]_0 \cdot 10^4 = 0.8$  (1), 1.2 (2), 2.4 моль/л (3). Исходная концентрация гемоглобина в суспензии  $[\text{Hb}]_0 = 2 \cdot 10^{-4}$  моль/л. Температура — 37°C. Точки — эксперимент, линии — расчет по схеме реакций (1)–(4) и найденным значениям кинетических параметров.

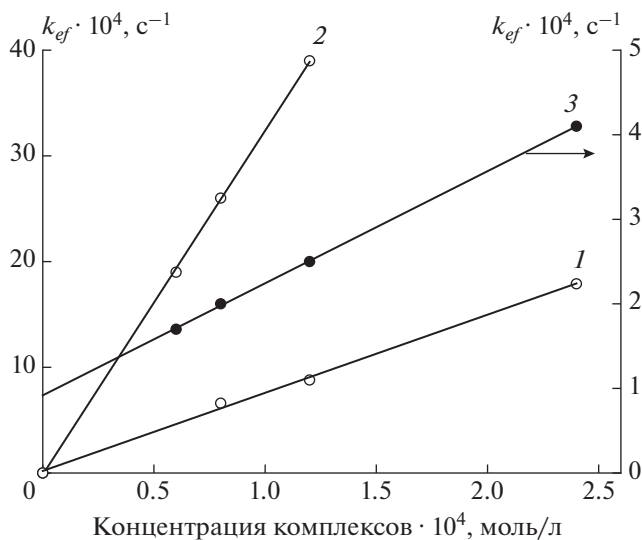
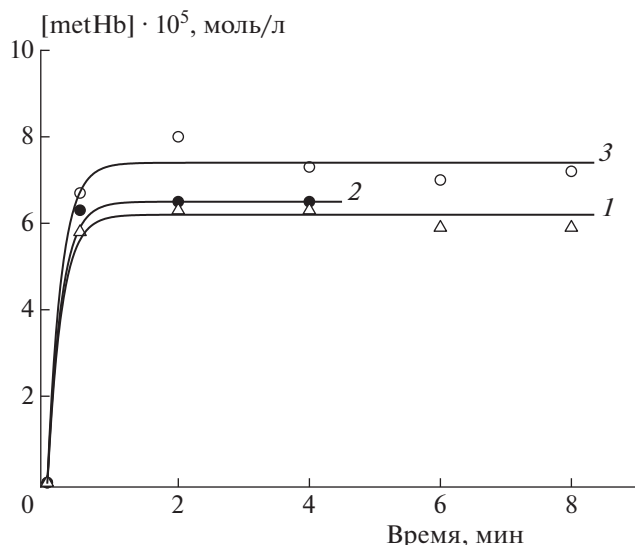
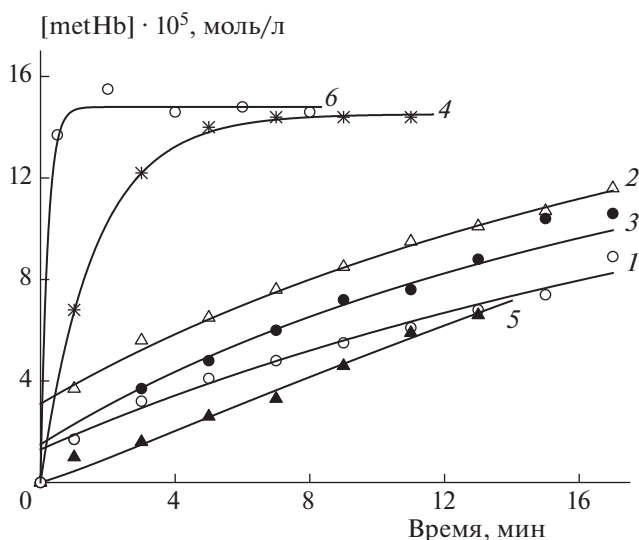


Рис. 4. Зависимости эффективной константы скорости донирования NO от концентрации комплексов БТЗ (1), МИМ (2) и ПИМ (3).

закономерность: в сериях опытов с разным гематокритом (рис. 2) с увеличением концентрации эритроцитов количество образовавшегося метгемоглобина уменьшается, что указывает на снижение NO-донорной способности комплексов в присутствии эритроцитов. Было высказано предположение, что причиной указанного явления



**Рис. 5.** Кинетические кривые образования метгемоглобина под действием нитрозильного комплекса ПЕН в суспензиях эритроцитов различного гематокрита. Концентрация комплекса  $[\text{ПЕН}]_0 = 0.2 \cdot 10^{-4}$  моль/л. Исходная концентрация гемоглобина в суспензиях  $[\text{Hb}]_0 \cdot 10^4 = 1.0$  (1), 2.0 (2), 3.0 моль/л (3). Температура – 37°C. Точки – эксперимент, линии – расчет по схеме реакций (1)–(3) и найденным значениям кинетических параметров.



**Рис. 6.** Кинетические кривые образования метгемоглобина в суспензиях эритроцитов под действием нитрозильных комплексов железа: БТЗ (1), МИМ (2), ПИМ (3), ТНК (4), ЦАК (5), ПЕН (6). Концентрация комплексов –  $1.2 \cdot 10^{-4}$  (1–5) и  $0.4 \cdot 10^{-4}$  моль/л (6). Концентрация гемоглобина –  $2 \cdot 10^{-4}$  моль/л. Температура – 37°C. Точки – эксперимент, линии – расчет по найденным значениям кинетических параметров.

может быть адсорбция части комплексов на поверхности эритроцитов, в результате чего в системе образуется дополнительный равновесный пул

мембраносвязанного комплекса, характеризующийся пониженной скоростью гидролитической диссоциации из-за ограничения контакта с водной средой [11]. Как показал анализ, поведение системы в этом случае качественно согласуется с представлениями теории мономолекулярной адсорбции Лэнгмюра [12]. В связи с этим схема превращений была дополнена следующей реакцией:



Здесь Er – центры адсорбции на поверхности эритроцитов, Er–A – нитрозильный комплекс, адсорбированный на мембране эритроцита. Количественно процесс характеризуется константой равновесия  $K_4$ . В настоящей работе по результатам численных исследований с целью количественного описания экспериментальных данных были оценены значения константы равновесия  $K_4$  и концентрации центров связывания на поверхности эритроцитов [Er], выраженной через концентрацию оксигемоглобина в системе:

$$K_4 = 5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}, \quad [\text{Er}] = 0.3[(\text{HbFe}^{2+})\text{O}_2]. \quad (5)$$

Расчеты проводились в предположении, что в результате адсорбции на мембране эритроцита нитрозильные комплексы полностью теряют способность выделять NO.

Схему реакций (1)–(4) с соотношениями (5) следует рассматривать как начальное приближение для механизма превращения исследуемых нитрозильных комплексов в суспензии эритроцитов. В ходе исследований конкретных комплексов эта схема может претерпевать определенные изменения: она может дополняться новыми реакциями или, наоборот, некоторые реакции в ней могут оказаться несущественными в рассматриваемых условиях.

Система уравнений, соответствующая схеме реакций (1)–(4), с учетом детального равновесия в реакции (4) и уравнений материального баланса имеет вид

$$d[\text{A}]/dt = -k_1[\text{A}]/(1 + f([\text{A}])), \quad (6)$$

$$d[\text{NO}]/dt = \beta k_1[\text{A}] - k_2[\text{HbO}_2][\text{NO}] - 2k_3[\text{O}_2][\text{NO}]^2, \quad (7)$$

$$d[\text{HbO}_2]/dt = -k_2[\text{HbO}_2][\text{NO}], \quad (8)$$

$$[\text{metHb}](t) = [\text{HbO}_2]_0 - [\text{HbO}_2](t), \quad (9)$$

$$[\text{Er}](t) = [\text{Er}]_0/(1 + K_4[\text{A}](t)), \quad (10)$$

$$[\text{Er} - \text{A}](t) = K_4[\text{A}](t)[\text{Er}]_0/(1 + K_4[\text{A}](t)). \quad (11)$$

Здесь введены следующие обозначения:

$f([\text{A}]) = K_4[\text{Er}]_0/(1 + K_4[\text{A}])^2$ ,  $[\text{HbO}_2]$  – концентрация оксигемоглобина  $(\text{HbFe}^{2+})\text{O}_2$ ,  $[\text{metHb}]$  – концентрация метгемоглобина  $\text{HbFe}^{3+}$ .

Концентрации конечных продуктов,  $[P]$ ,  $[\text{NO}_3^-]$ ,  $[\text{NO}_2]$ , могут быть также выражены из соответствующих уравнений материального баланса через основные переменные:  $[A]$ ,  $[\text{NO}]$ ,  $[\text{HbO}_2]$ . Уравнение для кислорода не рассматривается, поскольку по условиям эксперимента его концентрация в системе постоянна:  $[\text{O}_2] = \text{const}$ .

Начальные условия с учетом равновесности реакции (4) имеют вид

$$[A](0) = \left[ -a + \left( a^2 + 4K_4[A]_0 \right)^{0.5} \right] / 2K_4,$$

где

$$a = 1 + K_4 ([\text{Er}]_0 - [A]_0);$$

$$[\text{NO}](0) = 0, \quad [\text{HbO}_2](0) = [\text{HbO}_2]_0.$$

Здесь  $[A]_0$ ,  $[\text{HbO}_2]_0$ ,  $[\text{Er}]_0 = 0.3[\text{HbO}_2]_0$  — концентрации исходных веществ.

Как было сказано выше, значения констант скорости реакций  $k_2$ ,  $k_3$  и константы равновесия  $K_4$  считаются известными. Ставится задача определить по экспериментальным данным параметры донирования NO — константу скорости  $k_1$  и стехиометрический коэффициент  $\beta$  — для каждого из рассматриваемых комплексов.

## ОБРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ

### *Нитрозильный комплекс БТЗ*

Кинетические кривые образования метгемоглобина в суспензии эритроцитов под действием комплекса БТЗ приведены на рис. 2, 3. Исследование серии опытов с разными концентрациями комплекса (рис. 3) показало, что схема реакций (1)–(4) и соответствующая ей система уравнений (6)–(11) позволяют количественно описать каждую экспериментальную кривую этой серии. При этом в опытах с разными начальными концентрациями  $[\text{BTZ}] = (0.8, 1.2, 2.4) \cdot 10^{-4}$  моль/л были получены соответствующие значения константы скорости  $k_1 = (6.6, 8.0, 17.9) \cdot 10^{-4} \text{ c}^{-1}$  (при значении стехиометрического коэффициента  $\beta = 1$  для всех опытов серии). Полученная зависимость  $k_1$  от  $[\text{BTZ}]$  является прямо пропорциональной (рис. 4, кривая 1). Это означает, что скорость выделения NO при разложении комплекса БТЗ зависит от концентрации комплекса квадратично, и этот процесс следует моделировать реакцией второго порядка:



с константой скорости  $k_1'$ .

Обе серии опытов с комплексом БТЗ были обработаны, исходя из схемы реакций (1'), (2)–(4). Методом наименьших квадратов определены

**Таблица 1. Кинетические параметры разложения нитрозильного комплекса железа БТЗ в суспензии эритроцитов. Серия опытов при разных концентрациях комплекса. Концентрация оксигемоглобина  $[\text{HbO}_2] = 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$**

$[\text{BTZ}] \cdot 10^4 \text{ M}$	$[\text{metHb}](0) \cdot 10^5 \text{ M}$	$k_1' \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$	$\beta$
0.8	1.6	4.5	1.9
1.2	1.7	4.5	1.9
2.4	5.9	4.5	1.9

**Таблица 2. Кинетические параметры разложения нитрозильного комплекса железа БТЗ в суспензии эритроцитов. Серия опытов при разных концентрациях эритроцитов. Концентрация комплекса  $[\text{BTZ}] = 1.2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$**

$[\text{HbO}_2] \cdot 10^4 \text{ M}$	$[\text{metHb}](0) \cdot 10^5 \text{ M}$	$k_1' \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$	$\beta$
1.5	1.7	4.9	2.0
2.0	1.3	4.9	2.0
3.0	1.2	5.4	2.0
5.0	0.35	4.5	2.0

значения кинетических параметров  $k_1'$  и  $\beta$ . При проведении расчетов учитывалось, что к моменту начала регистрации экспериментальных данных в системе уже образовалось некоторое количество метгемоглобина, поэтому в качестве дополнительного параметра оценивали также значения  $[\text{metHb}](0)$ . Результаты расчетов приведены в табл. 1, 2. Из этих таблиц видно, что для всех опытов удалось получить одинаковое значение стехиометрического коэффициента:  $\beta \approx 2$ . Наблюдается некоторый разброс значений константы  $k_1'$ , но явная зависимость  $k_1'$  от концентрации исходных веществ отсутствует. Найденные значения параметров удовлетворительно описывают экспериментальные данные (рис. 2, 3).

### *Нитрозильный комплекс МИМ*

Результат обработки экспериментальных данных для комплекса МИМ в основном аналогичен результату для БТЗ. Комплексы принадлежат к структурному типу  $\mu\text{-N-C-S}$  (расстояние между атомами железа в структуре составляет  $\sim 4 \text{ \AA}$ ). При попытке описать исходной схемой реакций (1)–(4) серию опытов с разными начальными концентрациями комплекса  $[\text{МИМ}]_0$  была тоже получена прямо пропорциональная зависимость константы скорости  $k_1$  от  $[\text{МИМ}]_0$  (рис. 4, кривая 2). Поэтому вместо реакции (1) в схему была включена реакция второго порядка (1'). Значения кинетических параметров  $k_1'$  и  $\beta$ , полученные в результате

Таблица 3. Кинетические параметры разложения нитрозильных комплексов железа в суспензии эритроцитов

Комплекс	$k_1 \cdot 10^4, \text{с}^{-1}$	$k_1', \text{М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$	$\beta$
БТЗ	—	$4.7 \pm 0.4$	$2.0 \pm 0.1$
МИМ	—	$7.0 \pm 0.5$	$2.0 \pm 0.1$
ПИМ	$0.92 \pm 0.02$	$1.8 \pm 0.2$	$3.0 \pm 0.2$
ТНК	$69 \pm 1$	—	$0.48 \pm 0.05$
ЦАК	$4.7 \pm 0.3$	—	$3 \pm 1$
ПЕН	$\approx 800$	—	$3.4 \pm 0.3$

обработки экспериментальных данных для комплекса МИМ в соответствии со схемой реакций (1'), (2)–(4), представлены в табл. 3.

### Нитрозильный комплекс ПИМ

Обработка отдельных опытов серии с разными начальными концентрациями комплекса [ПИМ]<sub>0</sub> (структурный тип  $\mu\text{-S}$ , расстояние между атомами железа в структуре составляет  $\sim 2.7 \text{ \AA}$ ) в рамках исходной схемы реакций (1)–(4) также дает зависимость константы скорости  $k_1$  от начальной концентрации комплекса [ПИМ]<sub>0</sub>. Однако в отличие от предыдущих двух комплексов эта зависимость не прямо пропорциональная, а линейная (рис. 4, кривая 3): ее можно представить в виде  $k_{\text{эф}} = k_1 + k_1'[\text{ПИМ}]_0$ . Следовательно, в механизме распада комплекса ПИМ следует учитывать обе реакции: (1) и (1'). Поэтому экспериментальные данные, полученные для комплекса ПИМ, были обработаны в соответствии со схемой реакций (1), (1'), (2)–(4). Расчеты проводили при разных значениях  $\beta$ . Для заданного  $\beta$  использовали соответствующее значение  $k_1$  – отсечение на оси ординат (рис. 4, кривая 3) и в каждом опыте определяли значение  $k_1'$ . В результате находили оптимальное для обеих серий опытов значение  $\beta$  и соответствующие величины  $k_1$  и  $k_1'$ . Результат расчета параметров представлен в табл. 3.

### Нитрозильный комплекс ТНК

В отличие от трех предыдущих комплексов, обработка экспериментальных данных для комплекса ТНК в рамках схемы реакций (1)–(4) не дает зависимости константы скорости  $k_1$  от начальной концентрации комплекса [ТНК]<sub>0</sub>. В результате обработки экспериментальных данных в соответствии со схемой реакций (1), (2)–(4) были получены следующие значения параметров:  $k_1 = 7.0 \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ ,  $\beta = 0.48$  (табл. 3).

Из табл. 3 видно, что значение  $\beta$  у ТНК намного меньше, чем у БТЗ, МИМ и ПИМ. Это существенно меняет характер выделения NO. Оценим начальную скорость расходования комплексов. Для БТЗ и МИМ эта скорость равна  $k_1'[\text{X}]^2$ , для ПИМ –  $(k_1[\text{X}] + k_1'[\text{X}]^2)$ , а для ТНК –  $k_1[\text{X}]$ , где [X] – концентрация комплексов. При  $[\text{X}] \sim 10^{-4} \text{ М}$  скорость расходования комплексов  $V_1 \cdot 10^7 \text{ (М} \cdot \text{с}^{-1})$  равна:  $\approx 0.4$  для БТЗ,  $0.7$  для МИМ,  $0.3$  для ПИМ и  $7.0$  для ТНК. Таким образом, начальная скорость расходования ТНК на порядок больше, чем у остальных комплексов. Скорость выделения оксида азота  $V_2 = \beta V_1$  отличается хотя и не так сильно, но тоже значительно:  $V_2 \cdot 10^7$  равно  $\sim 0.8$  для БТЗ,  $1.4$  для МИМ,  $0.9$  для ПИМ и  $3.5 \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$  для ТНК. Это приводит к тому, что процесс выделения NO из ТНК, который начинается с большой скоростью, в результате быстрого расходования комплекса вскоре затухает (рис. 6, кривая 4).

### Нитрозильный комплекс ЦАК

Обработка экспериментальных данных для комплекса ЦАК в соответствии со схемой реакций (1)–(4), так же как и у ТНК, не выявила роста константы скорости  $k_1$  с увеличением концентрации комплекса. Поэтому обе серии опытов были обработаны в предположении, что распад комплекса и образование NO происходят по реакции (1). Результаты расчета приведены в табл. 3.

Кинетические кривые образования метгемоглобина под действием нитрозильного комплекса железа ЦАК имеют особенность: они представляют собой практически прямые линии (рис. 6, кривая 5). Это возможно только при достаточно большом значении стехиометрического коэффициента  $\beta$  и сравнительно небольшой величины константы скорости распада комплекса  $k_1$  (ситуация противоположная той, что была при рассмотрении комплекса ТНК). Численные исследования показали, что удовлетворительное описание эксперимента можно получить при  $2 \leq \beta \leq 4$ . То есть определить точное значение коэффициента  $\beta$  из имеющихся экспериментальных данных нельзя, приближенная оценка:  $\beta = 3 \pm 1$ . В табл. 3 приведено значение константы скорости  $k_1$ , найденное при заданном значении  $\beta = 3$ .

### Нитрозильный комплекс ПЕН

Комплекс ПЕН качественно отличается от всех рассмотренных выше нитрозильных комплексов: в серии опытов с разным гематокритом с увеличением концентрации эритроцитов количество образовавшегося метгемоглобина не уменьшается, а увеличивается (рис. 5). Этот экспериментальный факт говорит о том, что адсорбция комплекса ПЕН на

мембране эритроцитов не происходит. Причиной этого является, по-видимому, большая гидрофильность пеницилламиновых лигандов [11]. Таким образом, реакцию (4) из механизма образования метгемоглобина в системе “ПЕН – суспензия эритроцитов” следует исключить. Поэтому экспериментальные данные для ПЕН были обработаны в соответствии с реакциями (1)–(3). Результаты расчета представлены в табл. 3.

Как видно из табл. 3, значение константы скорости  $k_1$  у ПЕН на 1–2 порядка больше, чем у рассмотренных ранее комплексов. Это значительно осложняет ее точное экспериментальное определение. Хотя в эксперименте были существенно уменьшены начальные концентрации  $[ПЕН]_0$ , провести надежные измерения на начальном участке из-за большой скорости процесса не удалось (рис. 5). В результате была получена лишь приблизительная оценка:  $k_1 \approx 8 \cdot 10^{-2} \text{ с}^{-1}$ .

Значение стехиометрического коэффициента  $\beta$  определяется гораздо точнее. В результате быстрого расходования комплекса кинетическая кривая накопления метгемоглобина выходит на стационарное значение, которое полностью определяется значением коэффициента  $\beta$ .

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что основным путем химической трансформации оксида азота в кровяном русле является его окисление в бимолекулярной реакции с оксигемоглобином с образованием нитрата и метгемоглобина [24, 25]. Результаты проведенного исследования показывают, что образование метгемоглобина в системе “донор NO – эритроциты” может информативно характеризовать кинетические особенности процесса донирования оксида азота.

В табл. 3 приведены средние значения кинетических параметров, полученные по двум сериям опытов для каждого из исследованных комплексов. По результатам исследования все рассмотренные комплексы можно разбить на две группы. К первой группе следует отнести комплексы БТЗ, МИМ и ПИМ, в механизме разложения которых присутствует реакция второго порядка (1'). Наилучшие значения параметров  $k_1'$  и  $\beta$  позволяют расположить эти комплексы по скорости разложения и образования NO в следующий ряд: БТЗ < ПИМ < МИМ (рис. 6, кривые 1–3). Из рис. 6 видно, что эти скорости сравнительно малы и не сильно отличаются друг от друга. Следует отметить, что вследствие малости скоростей разложения комплексов в эксперименте измерена концентрация метгемоглобина лишь на небольших участках процесса.

Разложение трех других комплексов – ТНК, ЦАК и ПЕН происходит по реакции первого

ка (1). Из табл. 3 видно, что имеет место большое различие в значениях константы скорости  $k_1$  у этих комплексов: значение этой константы у ПЕН на порядок больше, чем у ТНК, и на два порядка больше, чем у ЦАК. В результате у этих комплексов наблюдается различный характер выделения NO – от медленного и плавного у ЦАК до почти мгновенного у ПЕН (рис. 6, кривые 4–6).

Следует подчеркнуть, что реакции (1) и (1') представляют собой брутто-стадии, моделирующие процесс генерации NO исследованными комплексами. Тот факт, что у комплексов БТЗ, МИМ, ПИМ этот процесс описывается реакцией второго порядка (1') относительно их концентраций, а у ТНК, ЦАК, ПЕН – реакцией первого порядка (1), связан, по-видимому, с природой комплексов. Анионный комплекс ТНК и катионные комплексы ЦАК и ПЕН присутствуют в растворе в виде отдельных заряженных частиц, гидролитическое разложение которых представляет собой процесс постепенного замещения лигандов молекулами воды [26]. В отличие от этого, БТЗ, МИМ, ПИМ – нейтральные комплексы, способные к агрегации, что и приводит к более сложному механизму их распада.

Как следует из постановки задачи, значения искомым параметров получены для всех рассмотренных комплексов (кроме комплекса ПЕН) при одном и том же значении константы равновесия  $K_4 = 5 \cdot 10^3 \text{ М}^{-1}$ . Это связано с тем, что из экспериментальных данных для отдельно взятого комплекса (две серии опытов по накоплению метгемоглобина) нельзя однозначно определить и константу равновесия  $K_4$ , и искомые параметры донирования NO –  $k_1$ ,  $k_1'$  и  $\beta$ .

С другой стороны, способность адсорбироваться на поверхности эритроцитов у исследованных комплексов может быть разной, а значит, и значения  $K_4$  могут различаться. При изменении величины  $K_4$  изменятся и значения параметров донирования NO, которые были определены по экспериментальным данным. Чтобы оценить масштаб этих изменений, была проделана следующая работа:

1. Считая липофильность лигандов одним из основных факторов, определяющих способность комплексов адсорбироваться на поверхности эритроцитов, мы теоретически рассчитали для них коэффициенты распределения в системе октанол–вода, используя программу ALOGPS 2.1 [27, 28]. Соотношение этих коэффициентов, например для лигандов ЦАК, ПИМ и МИМ, равно 1 : 2.8 : 3.2. Приняв для ЦАК исходное значение  $K_4 = 5 \cdot 10^3 \text{ М}^{-1}$ , получим для комплексов ПИМ и МИМ значения этой константы, равные  $14 \cdot 10^3$  и  $16 \cdot 10^3$  соответственно.

2. С вновь полученными значениями  $K_4$  для комплексов ПИМ и МИМ по экспериментальным данным рассчитали параметры донирования NO. Получили  $k_1 = (1.44 \pm 0.01) \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ ,  $k_1' = 1.9 \pm 0.3 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$  для ПИМ и  $k_1' = 10.4 \pm 1.5 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$  для МИМ. Сравнение с данными табл. 2 показывает, что увеличение константы равновесия  $K_4$  в три раза привело к увеличению констант скорости  $k_1$  и  $k_1'$  менее чем в полтора раза. При этом значения стехиометрического коэффициента  $\beta$  не изменились.

Для более точного определения параметров донирования NO нитрозильными комплексами железа по кинетическим кривым накопления метгемоглобина необходимо предварительно определить значение константы равновесия  $K$  из независимого эксперимента.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная в результате проведенного исследования кинетическая модель характеризует особенности распада сера-нитрозильных комплексов железа и их взаимодействия с эритроцитами. Она количественно описывает экспериментальные данные по накоплению метгемоглобина в системе и позволяет сопоставить NO-донорную активность комплексов в рассматриваемых условиях.

Работа выполнена по теме государственного задания (№ государственной регистрации 01201361859).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Граник В.Г., Григорьев Н.Б.* Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарств. М.: Вузовская книга, 2004.
2. Nitric Oxide Donors for Pharmaceutical and Biological Applications / Eds. Wang P.G., Cai T.B., Taniguchi N. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag, 2005.
3. Nitric oxide donors: Novel Biomedical Applications and Perspectives / Ed. Amedea Barozzi Seabra. London: Acad. press, 2017.
4. *Алдошин С.М., Санина Н.А.* // *Фундаментальные науки – медицине: Биофизические и медицинские технологии* / Под ред. Григорьева А.И., Владимирова Ю.В. Т. 1. М.: МАКС Пресс, 2015. С. 72.
5. *Ванин А.Ф.* Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами: физико-химия, биология, медицина. М.–Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2015.
6. *Алдошин С.М., Санина Н.А., Давыдов М.И., Чазов Е.И.* // *Вестник РАН.* 2016. Т. 86. С. 495.
7. *Санина Н.А., Алдошин С.М.* // *Изв. АН. Сер. хим.* 2004. №11. С. 2326.
8. *Санина Н.А., Алдошин С.М.* // *Изв. АН. Сер. хим.* 2011. № 7. С. 1199.
9. *Нешев Н.И., Психа Б.Л., Соколова Е.М. и др.* // *Изв. АН. Сер. хим.* 2010. № 12. С. 2160.
10. *Соколова Е.М.* Дис. ... канд. биол. наук. Черноголовка: ИПХФ РАН, 2016.
11. *Нешев Н.И., Психа Б.Л., Соколова Е.М., Санина Н.А., Руднева Т.Н.* // *Изв. АН. Сер. хим.* 2014. № 9. С. 2020.
12. *Нешев Н.И., Психа Б.Л., Соколова Е.М., Санина Н.А., Руднева Т.Н.* // *Изв. АН. Сер. хим.* 2016. № 3. С. 779.
13. *Санина Н.А., Шилов Г.В., Алдошин С.М. и др.* // *Изв. АН. Сер. хим.* 2009. № 3. С. 560.
14. *Sanina N.A., Rudneva T.N., Aldoshin S.M. и др.* // *Inorg. Chim. Acta.* 2006. V. 359. P. 570.
15. *Санина Н.А., Жукова О.С., Смирнова З.С. и др.* Биядерные нитрозильные комплексы железа с бензазагетероциклическими производными, способ их получения. Патент РФ № 2441872 // Б.И. 2012. № 4.
16. *Санина Н.А., Ракова О.А., Алдошин С.М. и др.* // *Кoordинац. химия.* 2001. Т. 27. № 3. С. 198.
17. *Rudneva T.N., Sanina N.A., Lysenko K.A. и др.* // *Mend. Comm.* 2009. V. 19. P. 253.
18. *Санина Н.А., Серебрякова Л.И., Шульженко В.С. и др.* Применение биядерного сера-нитрозильного комплекса железа катионного типа в качестве вазодилаторного лекарственного средства. Патент РФ № 2460531 // Б.И. 2012. № 25.
19. *Shaw A.W., Vosper A.J.* // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1977. V. 8. P. 1239.
20. *Eich R.F., Li T., Lemon D.D. et al.* // *Biochemistry.* 1996. V. 35. P. 6976.
21. *Liu X., Miller M.J.S., Joshi M.S. et al.* // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 18709.
22. *Weiss R.F.* // *Deep-Sea Res. Oceanogr. Abstr.* 1970. V.17. P.721.
23. *Погребная В.Л., Усов А.П., Баранов А.В., Нестеренко А.И., Безъязычный А.П.* // *ЖПХ.* 1975. Т. 48. С. 954.
24. *Butler A.R., Megson I.L., Wright P.G.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. V. 1425. P. 168.
25. *Joshi M.S., Ferguson T.B.J., Han T.H. et al.* // *PNAS.* 2002. V. 99. P. 10341.
26. *Sanina N.A., Syrtsova L.A., Shkondina N.I. et al.* // *Nitric oxide: biology & chemistry.* 2007. V. 16. P. 181.
27. *Tetko I.V., Gasteiger J., Todeschini R. et al.* // *J. Comput. Aid. Mol. Des.* 2005. V. 19. P. 453.
28. VCCLAB, Virtual Computational Chemistry Laboratory: электронный ресурс. 2005; <http://www.vcclab.org>