

Покидова Олеся Викторовна

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

02.00.04 – физическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Черноголовка-2017

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

Научный руководитель: профессор, доктор физ.-мат. наук
Котельников Александр Иванович

Официальные оппоненты: **Левин Петр Петрович**
доктор химических наук,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики имени Н. М. Эмануэля РАН, г. Москва,
ведущий научный сотрудник, руководитель группы Фотоники химических и биологических систем лаборатории физико-химических основ регуляции биологических систем

Топунов Алексей Федорович
доктор биологических наук,
Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН», г. Москва,
заведующий лабораторией биохимии азотфиксации и метаболизма азота

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологически активных веществ Российской академии наук, г. Черноголовка

Защита состоится октября 2017 г. в -00 часов на заседании диссертационного совета Д 002.082.02 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем химической физики РАН (ИПХФ РАН) по адресу: 142432, Московская обл., г. Черноголовка, проспект академика Семенова, д.1, актовый зал корпуса общего назначения.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем химической физики РАН: www.icp.ac.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Д 002.082.02

доктор химических наук

Джабиев Таймураз Савельевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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

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

В работах, выполненных в ИПХФ РАН [1, 2], было установлено, что НКЖ нитрозилируют гемоглобин (Hb). Это обеспечивает не только форму хранения NO, но и определяет пролонгированность действия данных НКЖ как доноров NO. Кроме Hb, образовывать достаточно прочные нитрозильные комплексы может цитохром с (Cyt C). Реакции NO с Cyt C имеют большое значение для функционирования дыхательной цепи митохондрий и регуляции процесса апоптоза. На основании вышеизложенного следует, что образование нитрозильных комплексов Cyt C и Hb может влиять в широких пределах на процессы метаболизма и в результате определять различные свойства НКЖ как лекарств.

В качестве объекта исследования взаимодействия с НКЖ, помимо Hb и Cyt C, представлялось интересным рассмотреть глутатион (GSH), который является самым

распространенным небелковым тиолом в клетках. Глутатионилирование белка p53, предположительно, препятствует тетрамеризации p53 и поэтому подавляет его ДНК-связывающую активность. Новейшие подходы к лечению рака базируются на необходимости уменьшения концентрации GSH в злокачественных опухолевых клетках. Поэтому для дизайна новых соединений этого перспективного класса доноров NO представляется важным исследование способности НКЖ к взаимодействию с GSH, в том числе к обмену своих функциональных тиолатных лигандов на GSH, то есть способности НКЖ «убирать» GSH из среды.

Цель и задачи исследования.

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

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

1. Исследовать процесс распада НКЖ структурного “ μ -S” и “ μ -N-C-S” типа в различных растворителях с помощью современных физико-химических методов.
2. Исследовать влияние редокс-потенциала НКЖ на путь распада НКЖ.
3. Изучить кинетику выделения NO при взаимодействии катионных НКЖ с Hb.
4. Изучить кинетику реакции нитрозилирования Cyt C²⁺ и Cyt C³⁺ катионными НКЖ структурного “ μ -S” типа.
5. Исследовать реакцию обмена тиолатных лигандов на GSH в НКЖ структурного “ μ -S” типа и изучить влияние GSH на процесс распада НКЖ структурного “ μ -N-C-S” типа.

Научная новизна работы

- Впервые доказано, что в водном растворе при распаде катионных НКЖ структурного “ μ -S” типа обратимо выделяются не только NO, но и оба тиолатных лиганда.
- Установлено, что в ДМСО процесс распада катионных НКЖ структурного “ μ -S” типа сопровождается образованием моноядерной формы.
- Показано, что в присутствии GSH в комплексах НКЖ структурного “ μ -S” типа происходит замещение тиолатных лигандов на GSH: в катионных НКЖ замещаются оба лиганда, в нейтральных - один; в то же время в нейтральных НКЖ структурного “ μ -N-C-S” типа обмена лигандами не происходит.
- Обнаружен ранее неизвестный эффект стабилизации катионных НКЖ структурного “ μ -S” типа гемоглобином.

- На примере катионных НКЖ изучена реакция нитрозилирования Cyt C^{2+} в кислой среде и Cyt C^{3+} в нейтральной среде в присутствии $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

Теоретическая и практическая значимость работы.

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

Методология и методы исследования.

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

Положения, выносимые на защиту.

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

2. В НКЖ структурного “ μ -S” типа тиолатные лиганды обмениваются на GSH. В НКЖ структурного “ μ -N-C-S” типа такого обмена не происходит.
3. Гемоглобин стабилизирует катионные НКЖ структурного “ μ -S” типа. В его присутствии они становятся более пролонгированными донорами NO.
4. Изучена кинетика реакции нитрозилирования окисленной и восстановленной форм Сyt С катионными НКЖ.

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

Личный вклад автора.

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

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 18 научных работ. Из них 5 - в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК, 1 - в других журналах, 12 - в сборниках тезисов и трудах конференций.

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

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

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснован выбор темы исследования, сформулированы цели, задачи работы, представлены основные положения, выносимые на защиту, описаны структура и объем диссертации.

Глава 1 содержит обзор литературы и состоит из четырех разделов. В первом разделе описаны физико-химические и биологические свойства оксида азота, его синтез в организме и приведены основные классы доноров NO. Второй раздел посвящен нитрозильным комплексам железа, их свойствам и биологической активности. В третьем разделе рассмотрены основные характеристики гемоглобина, цитохрома C и их железо-нитрозильных комплексов. В четвертом разделе описана биологическая роль глутатиона.

В **Главе 2** представлены материалы и оборудование, использованные при проведении исследований, изложены методики экспериментов по распаду НКЖ в различных растворителях и по их взаимодействию с биологическими субстратами, редокс-индикаторами и $K_3[Fe(CN)_6]$. Кроме того, в главе описаны техника работы в атмосфере азота (аргона) и метод для расчета констант скорости, а также приведено описание программы квантово-химических расчетов и программы для анализа поверхности Nb. Структуры исследуемых соединений представлены на рис. 1.

В **Главе 3** изучен процесс распада в анаэробных условиях водорастворимых катионных НКЖ “μ-S” типа с алифатическими тиолатными лигандами CysAm и Pep (структуры комплексов приведены на рис. 1) в водных буферных растворах и в ДМСО с помощью различных физико-химических методов: по непосредственному определению количества выделившегося NO электрохимически с помощью сенсорного электрода, спектрофотометрически и с помощью методов ЭПР и ЯМР 1H .

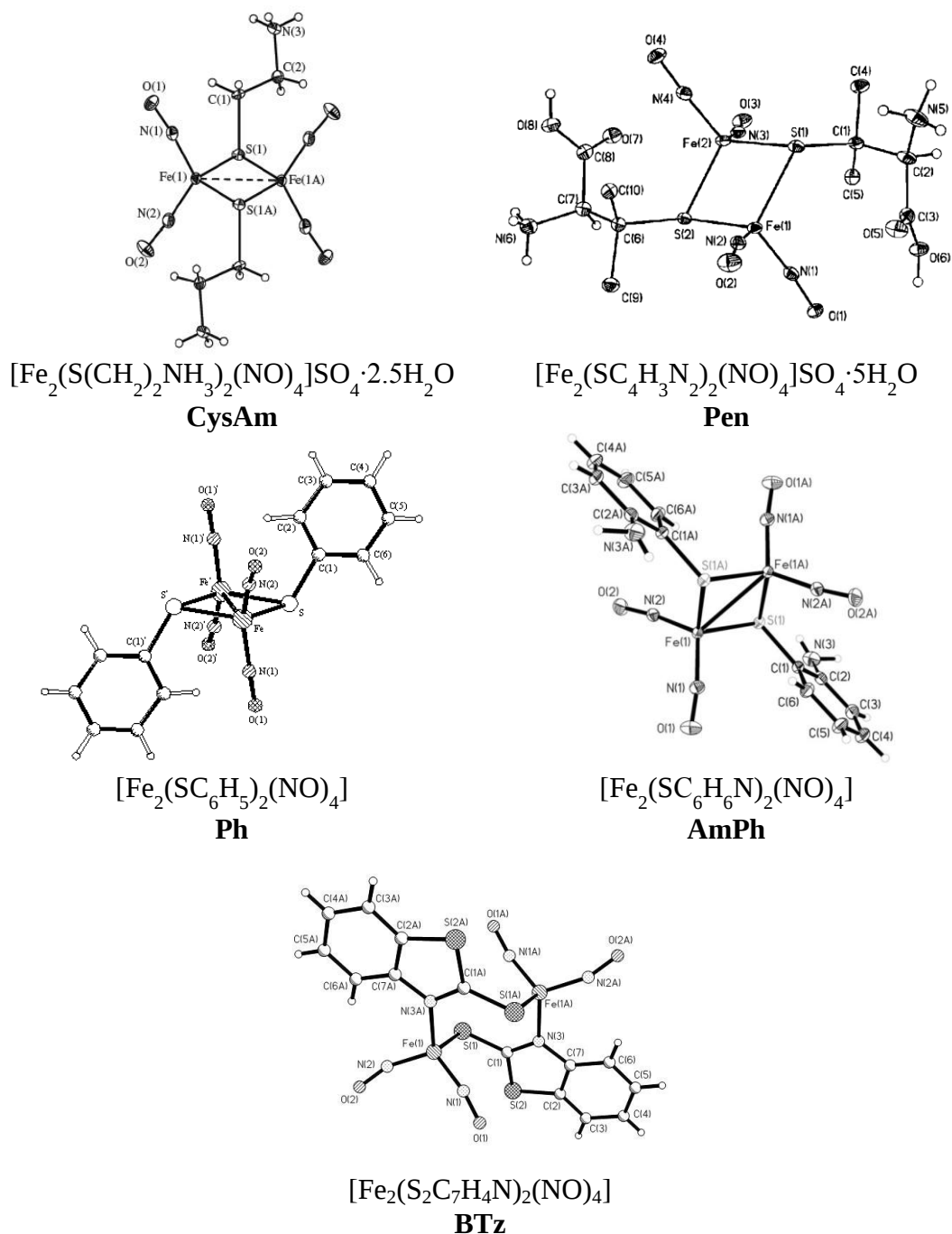


Рис. 1. Структура НКЖ структурного «μ-S» и «μ-N-C-S» типа

Известно, что НКЖ могут существовать в двух формах: парамагнитной моноядерной ($[\text{Fe}(\text{SR})_2(\text{NO})_2]$) и диамагнитной биядерной ($[\text{Fe}_2(\text{SR})_2(\text{NO})_4]$) [3]. Спектры поглощения для обоих исследуемых комплексов в водных растворах имеют сходную форму с двумя максимумами (306 и 363 нм для CysAm и 311 и 353 нм для Pen), что свидетельствует о том, что процесс распада протекает через биядерную форму НКЖ (рис. 2). Полученные результаты также были подтверждены методом ЭПР и ЯМР ^1H (на примере CysAm). Кристаллы НКЖ, как и водный раствор НКЖ, инкубируемый в течение 3 ч, не дают сигнала ЭПР.

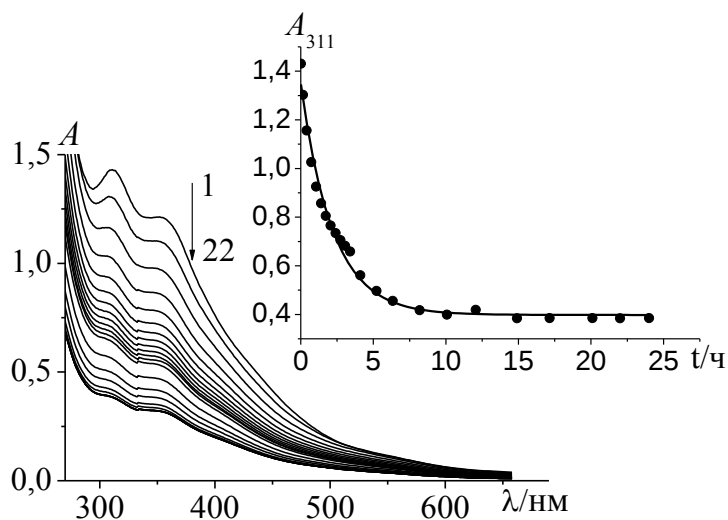


Рис. 2. Изменение спектров поглощения раствора комплекса Pen ($1.5 \cdot 10^{-4}$ М) во времени. На вставке показана кинетика распада Pen. Условия: 25 °С, растворитель - 0.05 М Трис-НСl буфер, pH 7.0.

ЯМР спектроскопия подтверждает предложенную структуру CysAm (рис. 3), а достаточно высокое разрешение спектра говорит об отсутствии в растворе примеси парамагнитного железа. ЯМР ^1H CysAm (D_2O , δ , м.д., J/Гц): 3.27 (т, 2H, $-\text{CH}_2-\text{S}-$, $J=6.7$); 3.37 (т.д., 2H, $-\text{CH}_2-\text{NH}_4^+$, $J=6.7$, $J=1.9$).

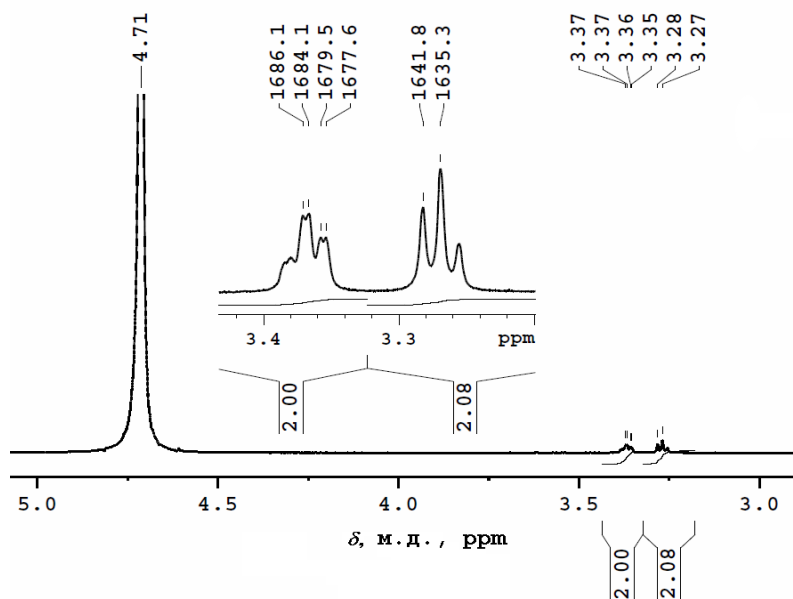


Рис. 3. ЯМР ^1H CysAm (10^{-3} М) в D_2O

Установлено, что если катионные НКЖ растворять сначала в ДМСО, то их распад будет протекать через стадию образования моноядерной формы.

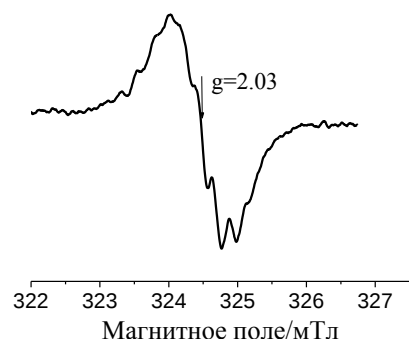
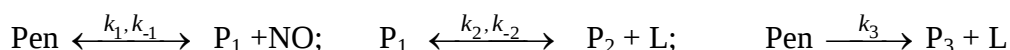


Рис. 4. Спектр ЭПР раствора CysAm (1 мМ) в ДМСО.

Так, при исследовании раствора CysAm в ДМСО, получен спектр ЭПР (рис. 4) с g-фактором 2.030, характерным для железо-нитрозильных комплексов. Концентрация парамагнитных центров убывает во времени. Согласно оценке количества спинов при растворении в ДМСО 10^{-3} М CysAm, только 17.5 % CysAm находится в моноядерной форме. На спектрах ЯМР ^1H комплекса, растворенного в DMSO-d_6 , наблюдается уширение линий, что также свидетельствует о наличии парамагнитных моноядерных продуктов распада. При исследовании CysAm в 20% ДМСО методом спектрофотометрии происходит

перекрывание спектров поглощения мооядерной и биядерной форм, интенсивность полос поглощения уменьшается со временем. Через 3 суток после начала инкубации обнаруживается соединение с максимумом спектра поглощения при 331 нм. Следовательно, можно сделать вывод, что, как в буферных растворах, так и в ДМСО, CysAm медленно распадается с выделением NO. Причем при распаде CysAm в ДМСО в растворе присутствует как биядерная форма комплекса, так и мооядерная.

Также в данной главе анализируется механизм распада НКЖ в буферных растворах. На примере Pen установлено, что в исследуемых комплексах происходит обратимое отщепление как NO, так и обоих тиолатных лигандов (L). Схема реакций данного процесса:



В опытах с сенсорным электродом (рис. 5) для обоих НКЖ кривые, отражающие выделение NO в раствор, быстро выходят на плато, при этом в раствор выделяется всего порядка 1.5% от исходной концентрации НКЖ. Это позволяет предположить, что процесс выделения NO протекает обратимо, и через некоторое время в системе устанавливается динамическое равновесие. Константы k_1 и k_{-1} получены в результате аппроксимации экспериментальной кривой уравнением $dx/dt = k_1 \cdot [\text{НКЖ}]_0 - k_1 \cdot x - k_{-1} \cdot x^2$.

Для CysAm: $k_1 = (5.2 \pm 0.2) \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}$;

$k_{-1} = 1200 \pm 50 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, для Pen: $k_1 = (4.6 \pm 0.4) \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$; $k_{-1} = (9.7 \pm 1) \cdot 10^3 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Значения констант k_2 , k_{-2} и k_3 найдены методом кинетического моделирования для серии опытов с разной исходной концентрацией Pen (Таблица 1)

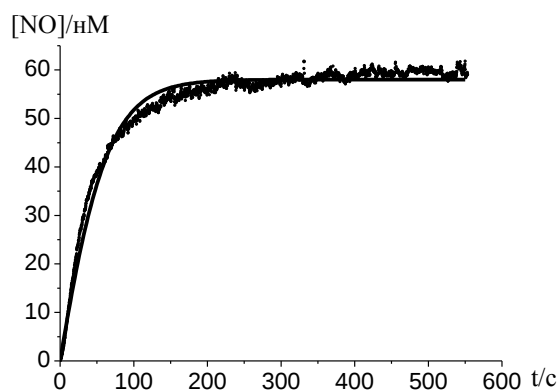


Рис. 5. Кинетика выделения NO из Pen ($4 \cdot 10^{-6} \text{ М}$), регистрируемая сенсорным электродом в атмосфере азота. Аппроксимация дана в виде линии. Условия: 25 °С, растворитель - 0.05 М фосфатный буфер, pH 7.0.

Таблица 1. Константы скорости реакции для процесса распада Pen

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

Данный путь распада катионных НКЖ отличается от ранее предложенного процесса распада для нейтрального НКЖ структурного “μ-S” типа с пиримидиновыми

тиолатными лигандами (Рум) [2], установлена причина их различия, связанная с их редокс-потенциалами. По данным работы [2], при растворении комплекса Рум кинетические зависимости количества NO имели максимумы, которые авторы связали с дальнейшим превращением NO. Было предположено, что на первой стадии происходит восстановление NO до NO^- ($E_{\text{NO}/\text{NO}^-} = -0.8 (\pm 0.2) \text{ В}$) с дальнейшим образованием N_2O . В качестве восстановителя выступает НКЖ после отщепления одной NO-группы и координации молекулы H_2O по свободному месту.

На основании вышеизложенного в диссертационной работе было выдвинуто предположение, что если НКЖ может восстановить NO, то есть имеет E_0 меньше, чем -0.8 В , то такое НКЖ с неизбежностью, переходя в окисленное состояние, подвергается необратимому распаду. В то же время комплекс, имеющий E_0 больше, чем -0.8 В , и не способный восстановить NO, не переходит в окисленное состояние, и поэтому претерпевает обратимую диссоциацию.

Чтобы проверить этот вывод, провели оценку E_0 комплексов CysAm и Pen по реакции с красителями с известными E_0 (сафранин Т, метилвиологен, метиленовый синий) и с цитохромом С. Было установлено, что редокс-потенциалы катионных НКЖ находятся в следующих диапазонах:

$$\begin{aligned} +0.01 \text{ В} < E_0 \text{ CysAm} < +0.24 \text{ В} \\ -0.29 \text{ В} < E_0 \text{ Pen} < +0.01 \text{ В}, \end{aligned}$$

что подтверждает высказанное предположение.

В **Главе 4** описано взаимодействие катионных НКЖ структурного « μ -S» типа с биологическими субстратами, такими как Hb, Cyt C и GSH. Все эксперименты проводились в анаэробных условиях.

Взаимодействие с Hb. Известно, что константа равновесия реакции NO с гемами Hb имеет величину $3 \cdot 10^{10} \text{ М}^{-1}$. Это позволяет использовать Hb в качестве «ловушки» NO. При этом образующийся продукт HbNO имеет характерный спектр поглощения с двумя максимумами при 545 и 575 нм, резко отличающийся от спектра исходного Hb с одним максимумом при 556 нм, что позволяет по анализу спектров определять количество выделившегося NO. Для исследования кинетики образования NO, генерируемого катионными НКЖ, регистрировали изменение во времени спектров поглощения реакционных систем, содержащих Hb и изучаемые комплексы (рис. 6,7).

Из полученных данных следует (рис. 7), что процесс распада комплекса проходит на большую глубину, чем в отсутствие Нб (по данным сенсорного электрода в отсутствие Нб выделяется всего 1.5% NO от исходной концентрации Реп и 1.4% от CysAm). Этот факт объясняется тем, что выделившиеся NO-группы быстро взаимодействуют с железом гема Нб, в результате чего равновесие в процессе распада НКЖ существенно сдвигается.

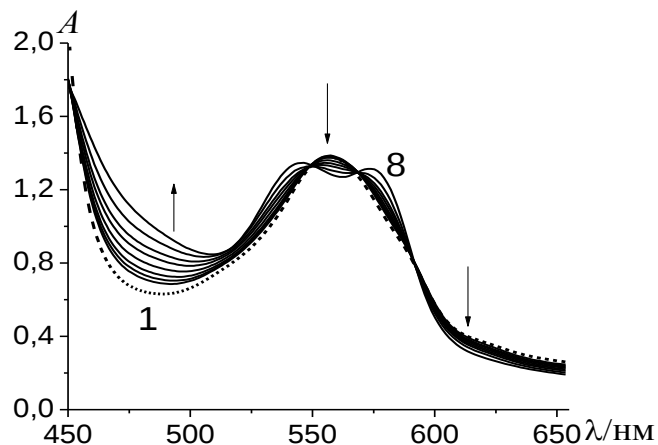


Рис. 6. Изменение разностных спектров поглощения при взаимодействии CysAm ($5.6 \cdot 10^{-4}$ М) с Нб ($2.76 \cdot 10^{-5}$ М). Штриховая линия – спектр раствора Нб. Условия: 25 °С, растворитель – 0.05 М фосфатный буфер, pH 7.0.

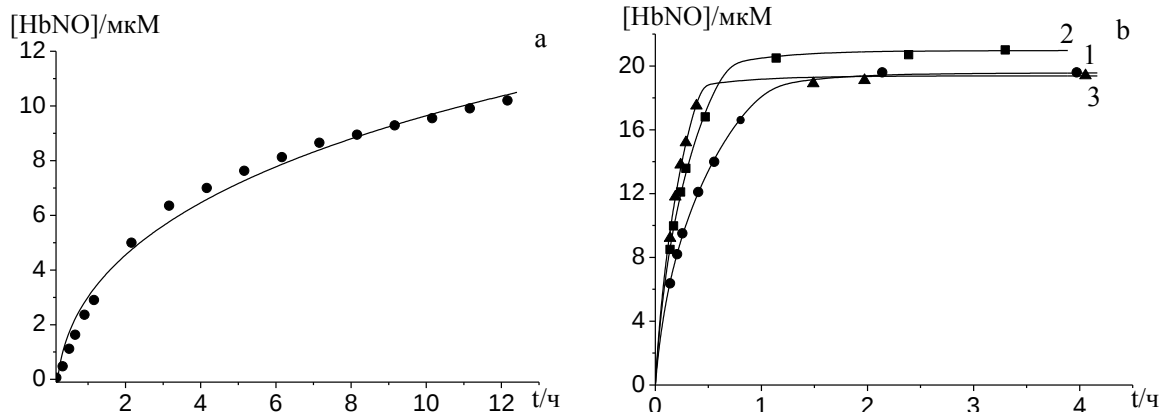


Рис. 7. Кинетические кривые выделения NO в водных растворах Реп (по регистрации образования HbNO методом спектрофотометрии). Линии – расчет по схеме реакций, точки – эксперимент.

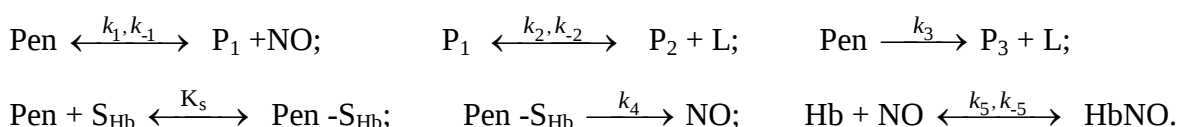
Условия эксперимента: (а) концентрация Реп – $2 \cdot 10^{-5}$ М, (б) концентрации Реп: 1 – 10^{-4} М, 2 – $1.5 \cdot 10^{-4}$ М, и 3 – $2 \cdot 10^{-4}$ М. Концентрация Нб – $2.0 \cdot 10^{-5}$ М. Температура 25 °С, растворитель – 0.05 М фосфатный буфер, pH 7.0.

Экспериментальные данные этих опытов хорошо аппроксимируются эмпирической формулой $y(t) = y_0 + A \cdot (1 - e^{-kt})$, рассчитанные эффективные константы скорости приведены в таблице 2. Видно, что при увеличении концентрации НКЖ значение k растет. Таким образом, в присутствии Нб выделение NO из НКЖ идет с заметно меньшей скоростью. Это согласуется с работами [4, 5], выполненными ранее на нейтральных комплексах, где было показано, что Нб, как правило, стабилизирует НКЖ, поэтому реакция выделения NO из НКЖ в присутствии Нб протекает медленнее, чем без Нб.

Таблица 2. Значения кинетических параметров, описывающих процесс взаимодействия комплекса Pen с Hb.

Рис. 7.	$[\text{Pen}]_0 \cdot 10^5, \text{M}$	$[\text{Hb}]_0 \cdot 10^5, \text{M}$	k, c^{-1}	$K_s \cdot 10^{-7}, \text{M}^{-1}$	n_s
кривая a	2	2.0	$8.4 \cdot 10^{-5}$	4.3	1.0
кривая b (1)	10	1.96	$5.9 \cdot 10^{-4}$	0.80	5.0
кривая b (2)	15	2.10	$8.9 \cdot 10^{-4}$	0.71	7.0
кривая b (3)	20	1.94	$1.8 \cdot 10^{-3}$	0.64	10.2

На примере Pen составлена схема реакций, учитывающая адсорбцию НКЖ молекулой Hb при распаде комплекса:



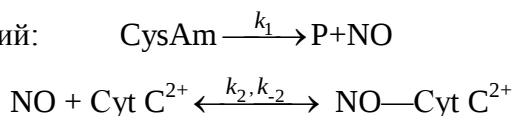
Здесь S_{Hb} – активные центры связывания Pen на поверхности Hb. Предполагается, что на поверхности Hb существуют центры связывания (в количестве n_s на одной молекуле Hb), с которыми молекулы комплекса могут обратимо взаимодействовать с константой равновесия K_s . Неизвестные кинетические параметры K_s и n_s были определены численным решением обратной задачи по кинетическим кривым накопления HbNO в четырех опытах взаимодействия Pen с Hb (таблица 2). Ранее параметры n_s и K_s для CysAm были определены в работе [6], но в ней не учитывалась стадия обратимого отщепления лигандов.

В обоих катионных комплексах имеются две NH_3^+ группы, которые несут положительные заряды, формируя солевую структуру с анионами SO_4^{2-} . В комплексе Pen также имеются две карбоксильные группы, несущие отрицательный заряд. Таким образом, стабилизация CysAm может осуществляться только за счет связывания комплекса с отрицательно заряженными функциональными группами Hb, а в стабилизации комплекса Pen могут также участвовать положительно заряженные функциональные группы белка. В этом разделе диссертационной работы приведены данные, полученные с помощью программы PyMOL, по распределению зарядов на поверхности Hb, и указаны возможные места локализации исследуемых НКЖ. Связанные с Hb молекулы НКЖ выделяют NO медленно ($k \sim 10^{-8} \text{ c}^{-1}$). Hb может переносить адсорбированные на поверхности макромолекулы белка НКЖ к другим мишеням.

Взаимодействие с Cyt C. K_p реакции Cyt C^{3+} с NO равна $1.6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ (при pH 7.0), что позволяет уверенно регистрировать кинетику методом спектрофотометрии. Cyt C^{2+} реагирует с NO быстро только при низких значениях pH, при нейтральных значениях pH его нельзя использовать в качестве «ловушки» NO. Максимумы поглощения: Cyt C^{3+} при

531 нм, NO—Cyt C³⁺ при 530 нм и 562 нм, Cyt C²⁺ при 521 нм и 551 нм, и NO—Cyt C²⁺ при 541 нм и 565 нм.

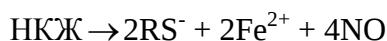
На рис. 8 представлен эксперимент по взаимодействию CysAm с Cyt C²⁺ при pH 3.0. Для количественного описания процесса была рассмотрена следующая последовательность реакций:



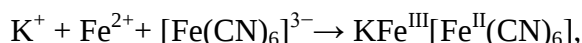
Согласно литературным данным, константы реакции нитрозилирования Cyt C²⁺ $k_2 = 8.3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ и $k_{-2} = 2.9 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. В результате численного решения задачи найдено значение $k_1 = (2.7 \pm 0.1) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, которое удовлетворительно описывает экспериментальные данные. Таким образом, при кислых значениях pH распад CysAm происходит значительно быстрее, чем при нейтральных (по данным сенсорного электрода при pH=7.0 $k = (5.2 \pm 0.2) \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$).

При исследовании реакции взаимодействия Cyt C³⁺ с НКЖ сразу образуется Cyt C²⁺. Как было определено ранее, НКЖ восстанавливают Cyt C³⁺, поэтому все опыты с Cyt C³⁺ необходимо

было проводить в присутствии окислителя. В качестве окислителя был выбран K₃[Fe(CN)₆]. Под действием K₃[Fe(CN)₆] комплексы распадаются:



Высвободившееся Fe²⁺ с K₃[Fe(CN)₆] образует берлинскую лазурь:



которая представляет собой смесь гексацианоферратов (Fe(III)Fe(II)) от K₄Fe^{II}[Fe^{II}(CN)₆] до Fe₄^{III}[Fe^{III}(CN)₆]₃Cl₃. Интенсивность окраски раствора зависит от соотношения концентраций НКЖ и K₃[Fe(CN)₆]. Выделившиеся тиолатные лиганды под действием окислителя превращаются в дисульфиды или восстанавливают Cyt C³⁺, а NO участвует в реакции нитрозилирования белка. Причем наибольшее количество NO—Cyt C³⁺ образуется в начальный момент времени, сразу после смешивания реагентов (рис. 9). Затем NO—Cyt C³⁺ медленно разлагается, и в конце наблюдаем спектр исходного Cyt C³⁺. Была

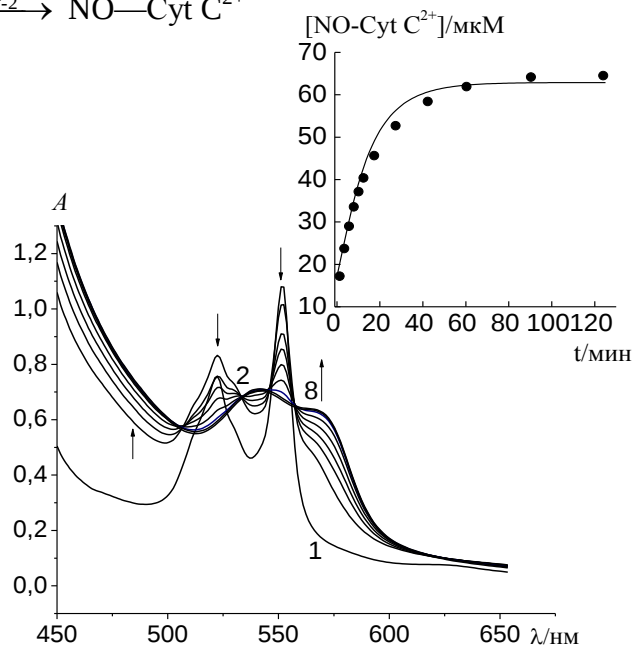
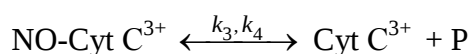
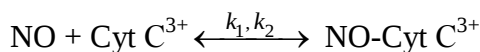


Рис. 8. Изменение разностных спектров поглощения во времени при взаимодействии CysAm ($2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) с Cyt C²⁺ ($6.5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$). Спектр (1) – спектр исходного Cyt C²⁺. На вставке представлена кинетическая кривая накопления аддукта NO—Cyt C²⁺. Условия: 23 °С, растворитель - 0.05 М цитрат-фосфатный буфер, pH 3.0.

предложена следующая схема реакций, описывающая процесс образования и распада NO-Cyt C³⁺:



Константы скорости реакции нитрозилирования Cyt C³⁺ известны в литературе: $k_1 = 7.2 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, $k_2 = 4.4 \cdot 10^{-2} \text{ c}^{-1}$. В результате численного решения задачи найдены значения $k_3 = 4.16 \cdot 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, $k_4 = 0.49 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, которые удовлетворительно описывают как расходование NO-Cyt C³⁺, так и накопление в системе Cyt C³⁺ (рис. 9, вставка).

Взаимодействие с GSH. В диссертационной работе было установлено, что обратимо выделяющиеся из НКЖ тиолатные лиганды замещаются на GSH с образованием нового НКЖ такой же структуры, как и катионные комплексы Pen и CysAm (рис. 1), но с GS⁻ лигандами – [Fe₂(SC₁₀H₁₇N₃O₆)₂(NO)₄]SO₄·2H₂O (Glut). В связи с поставленной задачей исследования реакции обмена лигандами были зарегистрированы спектры поглощения Glut. Форма спектров поглощения Glut аналогична форме спектров Pen и CysAm, с максимумами при 315 нм и 365 нм, $\epsilon_{315 \text{ нм}} = 8.18 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Из данных, полученных методом спектрофотометрии, следует, что Glut является самым устойчивым к распаду в водной среде из исследуемых катионных НКЖ.

На следующем этапе работы, при проведении экспериментов в реакционных системах, содержащих НКЖ (Pen или CysAm) и GSH (рис. 10а), наблюдали нарастание интенсивности спектров поглощения, что свидетельствовало об образовании Glut. Максимальное увеличение поглощения происходило за сутки (для Pen) и за 68 ч (для CysAm). При этом, выход продукта равен 76 % для опыта с Pen и 77% для опыта с CysAm. Установлено, что из комплекса Pen образование Glut происходило быстрее, чем из CysAm (для Pen: $k = (6.9 \pm 0.7) \cdot 10^{-5} \text{ c}^{-1}$, для CysAm: $k = (5 \pm 0.5) \cdot 10^{-6} \text{ c}^{-1}$). Результаты масс-

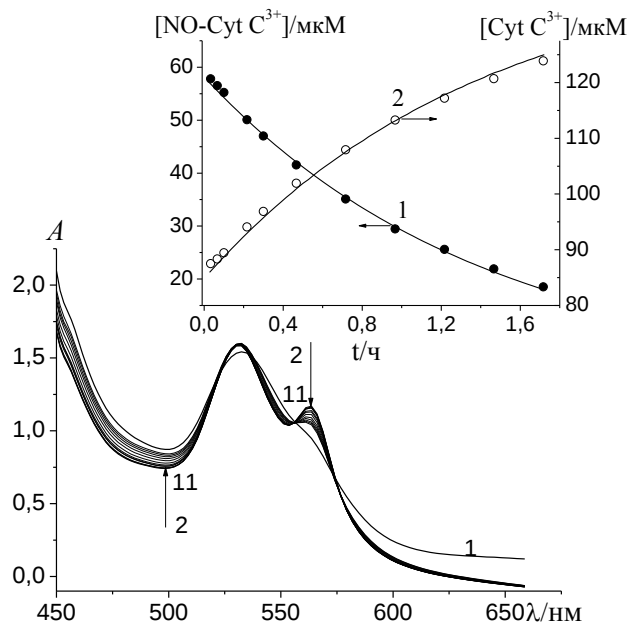


Рис. 9. Изменение разностных спектров поглощения во времени при взаимодействии Pen ($2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) с Cyt C³⁺ ($12.3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) в присутствии K₃[Fe(CN)₆] ($4 \cdot 10^{-3} \text{ M}$). Спектр (1) – спектр исходного Cyt C³⁺. На вставке приведены кинетические кривые расходования NO-Cyt C³⁺ (1) и накопления Cyt C³⁺ (2). Условия: 23 °C, растворитель - 0.05 M фосфатный буфер, pH 7.0.

спектрометрических экспериментов водных растворов комплексов качественно соответствует данным, полученным при спектрофотометрическом исследовании (рис. 10b). На масс-спектре катион Glut обозначен как М.

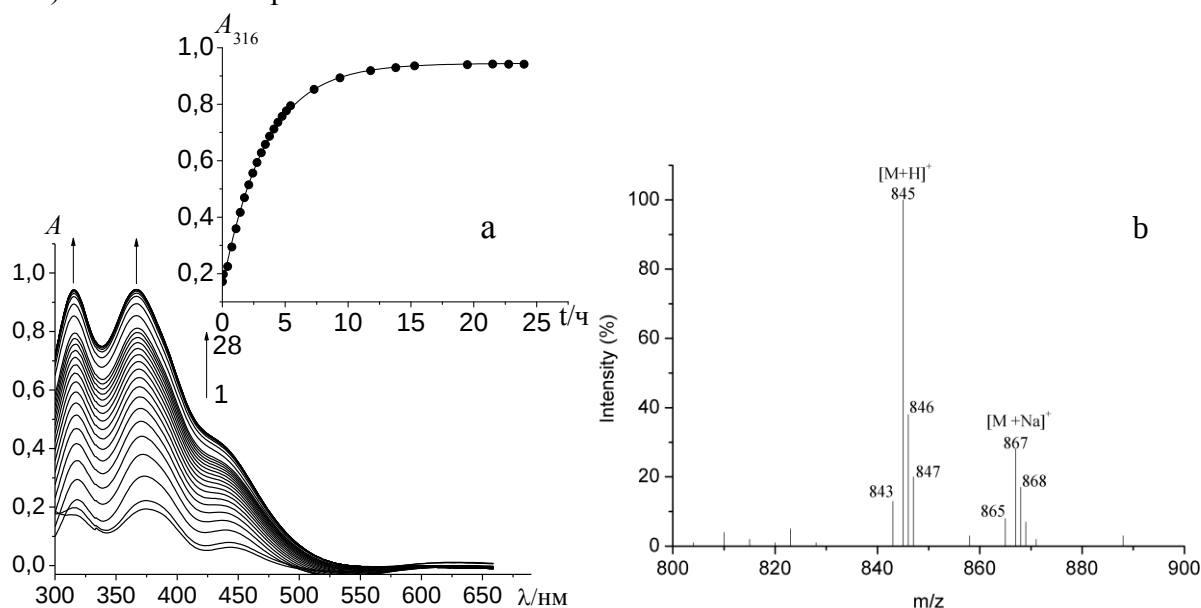


Рис. 10. (а) Изменение разностных спектров поглощения при взаимодействии Pen ($1.5 \cdot 10^{-4}$ М) с GSH (10^{-3} М) во времени. На вставке приведена кинетическая кривая данного опыта. (б) Масс-спектр (ESI, +4.5 кВ) продукта взаимодействия Pen ($1.5 \cdot 10^{-4}$ М) с GSH (10^{-3} М) через 24 ч от начала реакции. Условия реакции: 25 °С, растворитель - 0.05 М Трис-НСl буфер, pH 7.0.

В дальнейших экспериментах NO-донорная активность комплексов Pen-GSH и CysAm-GSH (измеряемая в присутствии Hb) сопоставлялась с аналогичными активностями комплексов Pen, CysAm, и Glut. Эффективные константы скорости первого порядка для этих реакций рассчитаны с использованием уравнения $y(t) = y_0 + A \cdot (1 - e^{-kt})$. Установлено, что скорость генерирования NO из Glut ($k = (2.6 \pm 0.3) \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}$; рис. 11, кривая 2) практически такая же как из CysAm ($k = (2.5 \pm 0.2) \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}$; рис. 11, кривая 4), и почти в 25 раз медленнее, чем из Pen ($k = (6.4 \pm 0.6) \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$; рис. 11, кривая 5). В системе Pen-GSH ($k = 1.5 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$; рис. 11, кривая 3) скорость выхода NO была промежуточной между

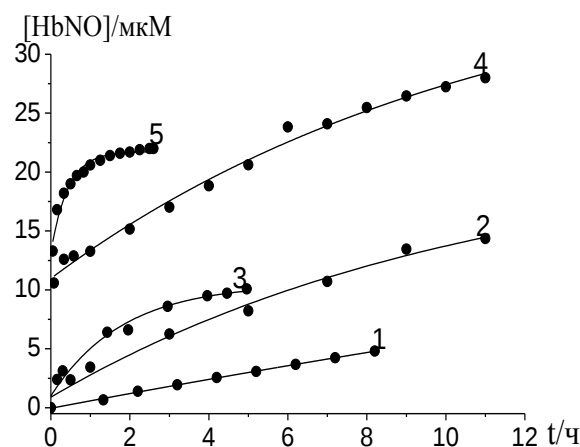


Рис. 11. Кинетика образования HbNO при взаимодействии НКЖ с GSH (в присутствии Hb): 1) CysAm ($1.5 \cdot 10^{-4}$ М), GSH (10^{-3} М), Hb ($2 \cdot 10^{-5}$ М); 2) Glut ($1.5 \cdot 10^{-4}$ М), Hb ($2.1 \cdot 10^{-5}$ М); 3) Pen ($1.5 \cdot 10^{-4}$ М), GSH (10^{-3} М), Hb ($2.1 \cdot 10^{-5}$ М); 4) CysAm ($1.5 \cdot 10^{-4}$ М), Hb ($3 \cdot 10^{-5}$ М); 5) Pen ($1.5 \cdot 10^{-4}$ М), Hb ($2.2 \cdot 10^{-5}$ М). Условия: 25 °С, растворитель - 0.05 М Трис-НСl буфер, pH 7.0.

системами Pen-Hb и Glut-Hb, а в системе CysAm-GSH ($k = 5 \cdot 10^{-6} \text{ с}^{-1}$; рис. 11, кривая 1) накопление HbNO происходило даже медленнее, чем в системе Glut-Hb. Таким образом, экспериментально показано, что в НКЖ-GSH системах НКЖ становятся более пролонгированными донорами NO, что имеет большое значение для их метаболизма. Это позволяет сделать вывод, что противоопухолевая активность катионных НКЖ может определяться не только их NO-донорной активностью, но и их способностью обменивать свои тиолатные лиганды на GSH, то есть «убирать» GSH из среды. Можно предположить, что соединения этого нового класса противоопухолевых агентов можно использовать для понижения уровня GSH в клетках злокачественных образований и для изучения молекулярно-генетических механизмов процессов S-глутунирования *in vivo*.

В **Главе 5** изучен распад нейтральных неводорастворимых НКЖ с ароматическими лигандами (структуры Ph, AmPh и BTz приведены на рис. 1) “ μ -S” и “ μ -N-C-S” типа в различных растворителях и их взаимодействие с GSH. Все эксперименты проводились в анаэробных условиях.

Распад Ph и AmPh комплексов и их взаимодействие с GSH. Ph и AmPh комплексы неустойчивы в ДМСО, их спектры поглощения значительно изменяются во времени. В Трис-HCl буфере для Ph и AmPh комплексов уже за первые 10 минут от начала реакции в кюветах наблюдается образование осадков.

Квантово-химическое моделирование продуктов реакций распада комплексов Ph и AmPh в водном растворе показало, что комплекс Ph может распадаться сразу по нескольким параллельным направлениям: с разрывом Fe-S, Fe-N связей и далее координацией молекулы воды по свободному месту. Таким образом, в случае комплекса Ph конечными продуктами будут плохо растворимые аквакомплексы железа различного состава. В комплексе AmPh имеется аминогруппа в орто-положении, которая оказывает значительное влияние на распад комплекса. При отрыве NO, при диссоциации на мономерные комплексы по связи Fe-S, на свободное координационное место встраивается не молекула воды, как в случае комплекса Ph, а заместитель NH_2 фенильного кольца, что приводит к образованию внутримолекулярной координационной связи Fe-N.

На рис. 12 приведены спектры поглощения, полученные в процессе взаимодействия исследуемых НКЖ с GSH. В отличие от распада комплексов в водных буферных растворах в отсутствие GSH, в данном случае не наблюдается образование осадков. Видно, что спектры образующихся продуктов обмена тиолатных лигандов (конечный спектр на рис. 12 а для Ph и 12 б для AmPh) идентичны друг другу. Они имеют два максимума, следовательно, это соединение является биядерным, но форма спектров

отличается от комплекса Glut - продукта обмена катионных НКЖ на GSH, который рассматривался ранее.

На основании вышесказанного было предположено, что на первой стадии в структуре данных НКЖ происходит замещение только одного тиолатного лиганда. Далее тиофенольный или тиаминофенольный лиганды замещаются в водном растворе на молекулу воды. Конечным продуктом будет биядерный НКЖ, где один лиганд – это GS^- , а второй – мостиковая молекула H_2O (рис. 13). Причем, согласно спектрам (рис. 12 а, б), из комплекса AmPh новое соединение образуется за время смешивания, тогда как для его образования из комплекса Ph требуется более значительное время.

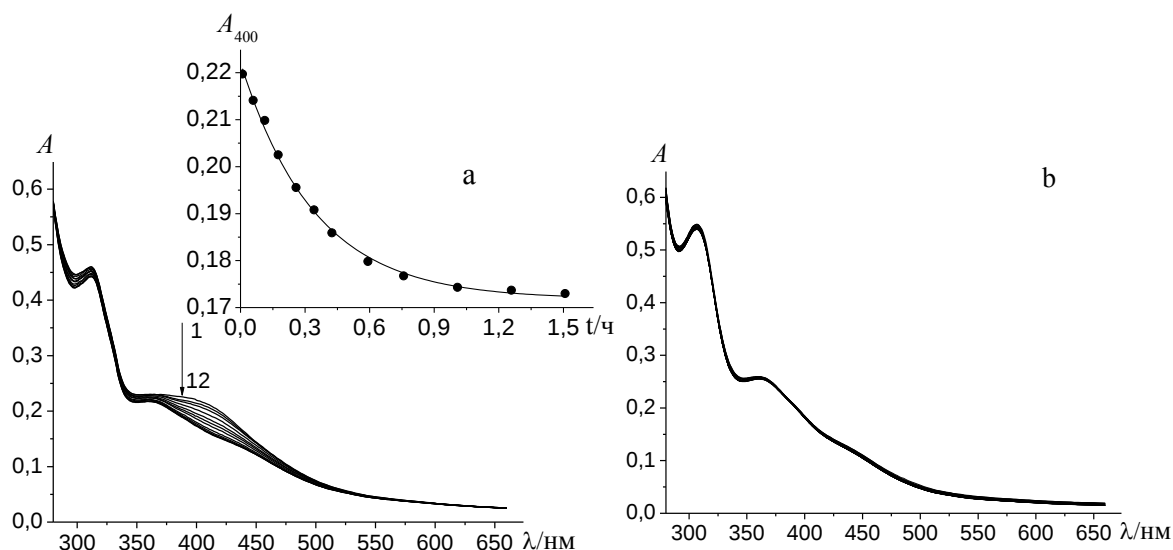


Рис. 12. Изменение спектров поглощения при взаимодействии Ph ($2 \cdot 10^{-5}$ М) (а) и AmPh ($2 \cdot 10^{-5}$ М) (б) комплексов с GSH (10^{-3} М) во времени. Спектры (б) регистрировали в течение 5 ч. Спектр (12) на рис. (а) имеет два максимума: $\lambda_1 = 312$ нм и $\lambda_2 = 360$ нм. Спектр (21) на рис. (б) имеет два максимума: $\lambda_1 = 308$ нм и $\lambda_2 = 360$ нм. На вставке рис. (а) представлена кинетическая зависимость данного процесса. Условия реакции: 25 °С, растворитель – 0.05 М Трис-НСl буфер, рН 7.0, ДМСО 10%.

Таким образом, процесс трансформации нейтральных НКЖ в водных растворах, в том числе в присутствии GSH, значительно отличается от аналогичных процессов для ранее изученных катионных НКЖ. Противоопухолевая активность данных комплексов, аналогично катионным НКЖ, может определяться не только их NO-донорной активностью, но и их способностью обменивать тиолатный лиганд на GSH. Следует отметить, что эта способность у нейтральных НКЖ значительно ниже, чем у катионных, что коррелирует с их меньшей противоопухолевой активностью.

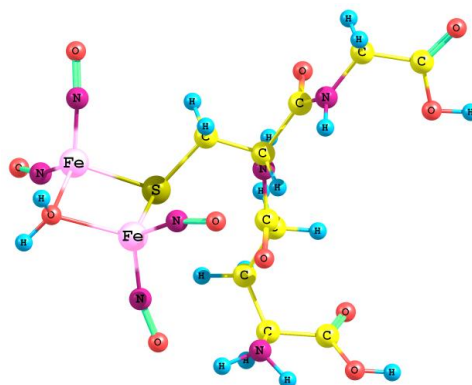


Рис. 13. Структура НКЖ, образованного при взаимодействии Ph или AmPh комплексов с GSH

Распад BTz и его взаимодействие с GSH. В отличие от Ph и AmPh комплексов, комплекс BTz устойчив в ДМСО, его спектр поглощения, как и спектры всех НКЖ, имеет два пика в области 300-400 нм и не изменяется во времени (регистрировали в течение 6 ч).

В Трис-НCl буфере спектры поглощения комплекса BTz уменьшаются по интенсивности (рис. 14 а), что свидетельствует о медленном распаде комплекса. Эффективная константа скорости реакции рассчитана по уравнению вида: $y(t) = y_0 + A \cdot e^{-kt}$ и составляет $1.9 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$.

На рис. 14 б показано изменение спектров поглощения во времени при взаимодействии BTz с GSH. Видно, что после добавления к комплексу GSH форма спектров поглощения не изменяется, что свидетельствует об отсутствии обмена тиолатных лигандов на GSH в структуре комплекса BTz. Также, как и в случае распада комплекса в Трис-НCl буфере, наблюдается уменьшение поглощения во времени. Эффективная константа скорости реакции рассчитана по уравнению вида: $y(t) = y_0 + A \cdot e^{-kt}$ и составляет $4.6 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$.

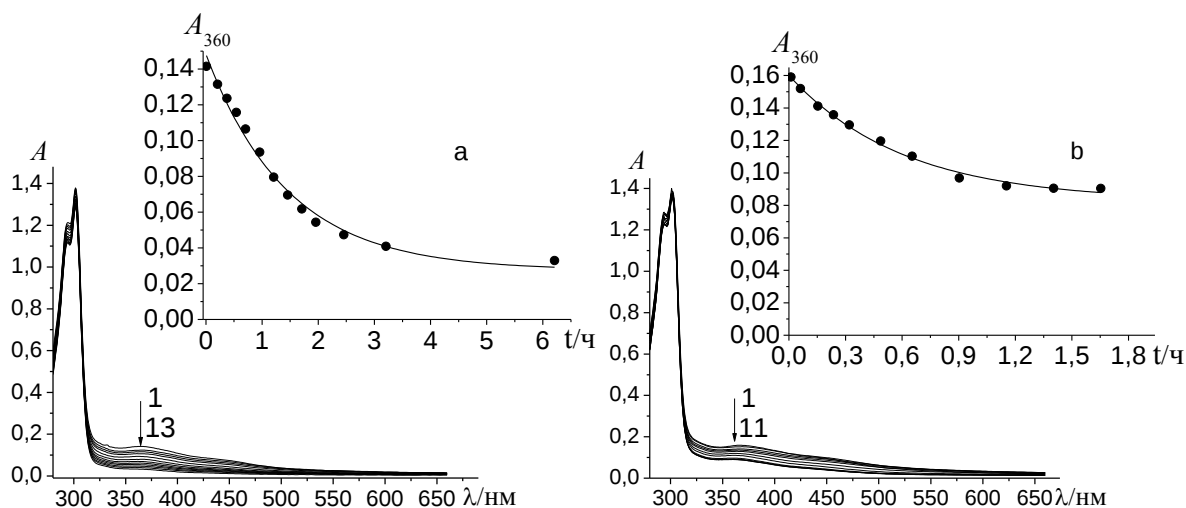


Рис. 14. (а) Изменение спектров поглощения комплекса BTz ($2 \cdot 10^{-5} \text{ М}$) во времени. (б) Изменение спектров поглощения при взаимодействии BTz ($2 \cdot 10^{-5} \text{ М}$) с GSH (10^{-3} М) во времени. На вставках представлены кинетические зависимости данных процессов. Условия: 25°C , растворитель - 0.05 М Трис-НCl буфер pH 7.0, ДМСО 10%.

Таким образом, в комплексе BTz, в отличие от рассмотренных ранее комплексов “μ-S” типа, обмена тиолатных лигандов на GSH не наблюдается, что, вероятно, свидетельствует о большей прочности связи лиганда по “μ-N-C-S” способу в комплексах с азогетероциклическими лигандами за счет смещение электронной плотности от лиганда на атом железа. В то же время GSH оказывает значительное влияние на процесс распада комплекса, и механизм этой реакции требует дальнейшего изучения.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что разложение катионных НКЖ с алифатическими лигандами (Pen, CysAm) в водном растворе буфера происходит через ряд последовательных равновесных стадий, включающих диссоциацию NO и тиоловых лигандов. Константы скорости донирования NO составляют $(5.2 \pm 0.2) \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ и $(4.6 \pm 0.4) \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ для CysAm и Pen, соответственно.
2. Предложен экспресс-метод оценки восстановительной способности НКЖ с помощью набора редокс-индикаторов с известными редокс-потенциалами. Установлено, что редокс-потенциал Pen и CysAm $E_0 > -0.8 \text{ В}$, следовательно они не могут восстанавливать NO в растворе.
3. Установлено, что процесс распада CysAm в ДМСО, в отличие от водного буфера, сопровождается образованием моноядерной формы.
4. Обнаружен эффект стабилизации катионных НКЖ структурного “μ-S” типа гемоглобином. В его присутствии НКЖ становятся более пролонгированными донорами NO. С помощью программы 3D-визуализации молекулярных структур PyMOL определены возможные места связывания катионных НКЖ на поверхности Hb.
5. Методом кинетического моделирования оценена константа равновесия, описывающая взаимодействие комплекса Pen с центрами связывания на поверхности Hb.
6. С помощью метода квантово-химического моделирования предложены возможные продукты процесса разложения НКЖ с ароматическими лигандами (Ph и AmPh) и показана зависимость пути распада НКЖ от их строения.
7. Установлено, что в присутствии GSH в комплексах структурного “μ-S” типа происходит замещение тиолатных лигандов на GSH: в катионных замещаются оба лиганда, в нейтральных - один; в то же время в нейтральных НКЖ структурного “μ-N-C-S” типа обмена лигандами не происходит.
8. Изучена NO-донорная активность НКЖ структурного “μ-S” типа в кислой среде по его взаимодействию с Cyt C²⁺. Исследована реакция нитрозилирования Cyt C³⁺ в присутствии K₃[Fe(CN)₆] и предложены возможные продукты этой реакции.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- [1]. Sanina N.A., Syrtsova L.A., Shkondina N.I., Rudneva T.N., Malkova E.S., Bazanov T.A., Kotel'nikov A.I., Aldoshin S.M. // Nitric Oxide – 2007. – V. 16 – № 2 – P.181–188.
- [2]. Санина Н.А., Шилов Г.В., Алдошин С.М., Шестаков А.Ф., Сырцова Л.А., Ованесян Н.С., Чудинова Е.С., Шкондина Н.И., Емельянова Н.С., Котельников А.И. // Известия Академии наук. Серия химическая – 2009. – № 3 – С.560–571.

- [3]. Vanin A.F., Poltorakov A.P., Mikoyan V.D., Kubrina L.N., Burbaev D.S. // Nitric Oxide – Biology and Chemistry – 2010. – V. 23 – № 2 – P.136–149.
- [4]. Санина Н.А., Сырцова Л.А., Чудинова Е.С., Шкондина Н.И., Руднева Т.Н., Котельников А.И., Алдошин С.М. // Известия академии наук. Серия химическая – 2009. – № 3 – С.554–559.
- [5]. Санина Н.А., Сырцова Л.А., Шкондина Н.И., Малкова Е.С., Котельников А.И., Алдошин С.М. // Известия Академии наук. Серия химическая – 2007. – № 4 – С.732–736.
- [6]. Санина Н.А., Сырцова Л.А., Психа Б.Л., Тухватуллин И.А., Шкондина Н.И., Руднева Т.Н., Котельников А.И., Алдошин С.М. // Известия академии наук. Серия химическая – 2012. – № 1 – С.8–13.

ПРЕДСТАВЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Статьи

1. Сырцова, Л.А. Влияние растворителя на гидролиз нитрозильного комплекса железа $\{Fe_2[S(CH_2)_2NH_3]_2(NO)_4\}SO_4 \cdot 2,5H_2O$: спектроскопические и кинетические исследования его мономерной и димерной форм / Сырцова Л.А., Санина Н.А., Психа Б.Л., Куликов А.В., Черняк А.В., Шкондина Н.И., Руднева Т.Н., **Шапошникова (Покидова) О.В.**, Котельников А.И., Алдошин С.М. // Известия Академии наук. Серия химическая – 2011. – № 6. – С. 1119 -1124.
2. Syrtsova, L.A. Reversible dissociation and ligand-glutathione exchange reaction in binuclear cationic tetranitrosyl iron complex with penicillamine / Syrtsova L.A., Sanina N.A., Lyssenko K.A., Kabachkov E.N., Psikha B.L., Shkondina N.I., **Pokidova O.V.**, Kotelnikov A.I., Aldoshin S.M. // Journal of Bioinorganic Chemistry and Applications – 2014. – V. 2014. – P. 1- 9.
3. Syrtsova, L.A. Interaction of hemoglobin with binuclearcationic tetranitrosyl iron complex with penicillamine. Cations binding sites / Syrtsova L.A., Sanina N.A., Psikha B.L., Tukhvatullin I.A., Shkondina N.I., **Pokidova O.V.**, Kotelnikov A.I. // Advances in Biological Chemistry – 2015. – V. 5. – P. 169-178.
4. **Покидова, О.В.** Два механизма распада нитрозильных комплексов железа $[Fe_2(\mu-SR)(NO)_4]$ / Покидова О.В., Санина Н.А., Психа Б.Л., Сырцова Л.А., Психа Б.Л., Шкондина Н.И., Котельников А.И., Алдошин С.М. // Известия АН. Серия химическая – 2017. - № 3. - С. 432-438.
5. **Покидова, О.В.** Изучение распада нитрозильного комплекса железа “ μ -N-C-S” типа и его взаимодействие с GSH в водном растворе. / Покидова О.В., Шкондина Н.И., Руднева Т.Н., Котельников А.И., Сырцова Л.А., Санина Н.А., Алдошин С.М. // Доклады Академии Наук. Раздел химия – 2017. - Т. 473. - № 2. - С. 173–176.

6. Покидова, О.В. Особенности разложения нейтральных нитрозильных комплексов железа с арилсодержащими тиолатными лигандами в различных средах. Взаимодействие с глутатионом / Покидова О.В., Емельянова Н.С., Шкондина Н.И., Котельников А.И., Сырцова Л.А., Санина Н.А., Алдошин С.М. // Известия АН. Серия химическая - 2016. - № 5. – С. 821-825.

Тезисы

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

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

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

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

5. Санина Н.А., Сырцова Л.А., **Покидова О.В.** Нитрозилированные гемоглобин и цитохром С как интермедиаты метаболизма нитрозильных комплексов железа, обладающих противоопухолевой и вазодилататорной активностями. Первая Российская конференция по медицинской химии (MedChem Russia-2013) с международным участием. Москва, 08.09-12.09 2013 г., С. 138.

6. Сырцова Л.А., Санина Н.А., **Покидова О.В.**, Психа Б. Л. Кинетика распада тетранитрозильного биядерного катионного комплекса железа с пеницилламиновым лигандом в водной среде. XXXI Всероссийский симпозиум молодых ученых по

химической кинетике. Пансионат "Берёзки", Московская область, 18.11-21.11 2013 г., С. 34.

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

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

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

10. Syrtsova L.A., Sanina N.A., **Pokidova O.V.**, Psikha B.L., Shkondina N.I., Kotelnikov A.I., Aldoshin S.M. IX Международная конференция молодых ученых по химии "Менделеев-2015", The reason for the difference of " μ_2 -s" structural type nitrosyl iron complexes decay mechanisms. Санкт-Петербург, 07.04-10.04 2015 г., С. 282.

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

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