

## НИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ГЕМОГЛОБИНА В РАЗЛИЧНЫХ МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ

© 2021 г. Д.И. Грачев\*, \*\*, К.Б. Шумаев\*\*, \*\*\*, О.В. Космачевская\*\*\*,  
А.Ф. Топунов\*\*\*, Э.К. Рууге\*, \*\*

\*Физический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,  
119991, Москва, Ленинские горы, 1/2

\*\*Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Минздрава России,  
121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15а

\*\*\*ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33/2

E-mail: di.grachev@physics.msu.ru

Поступила в редакцию 31.07.2021 г.

После доработки 31.07.2021 г.

Принята к публикации 14.09.2021 г.

Комплексы оксида азота (NO) с железом гемовой группы гемоглобина (Hb(II)NO) и динитрозильные комплексы железа с тиолами, в том числе с цистеиновыми остатками гемоглобина (Hb-ДНКЖ), могут играть важную роль в процессах окислительного, галогенирующего и нитрозативного стресса в сердечно-сосудистой системе. В работе в различных модельных системах с помощью спектроскопии электронного парамагнитного резонанса парамагнитных комплексов NO и спиновых аддуктов DEPMO рассмотрено взаимодействие гемоглобиновых комплексов NO двух этих типов с активными формами галогенов, кислорода и азота, а также алкоксильными и алкилперекисными радикалами. Показано, что хлорноватистая кислота (гипохлорит) и пероксинитрит количественно разрушают Hb-ДНКЖ. В присутствии дитионита S-нитрозоглутатион может участвовать в нитрозилировании дезоксигемоглобина с образованием Hb(II)NO, тогда как добавление в эту систему пероксинитрита приводит к формированию динитрозильных комплексов железа. Вместе с тем Hb(II)NO и Hb-ДНКЖ снижают уровень органических свободных радикалов, продуцируемых в реакции гемоглобина с гидропероксидом трет-бутила. Полученные данные указывают на способность исследованных нитрозильных комплексов гемоглобина перехватывать активные формы кислорода, азота и галогенов и тем самым влиять на процессы свободнорадикального окисления.

*Ключевые слова:* окислительный стресс, динитрозильные комплексы железа, гемоглобин, антиоксиданты, электронный парамагнитный резонанс, спиновые ловушки.

DOI: 10.31857/S0006302921060028

Изучение воздействия окислительного, галогенирующего и нитрозативного стресса на метаболизм оксида азота (NO) имеет весьма важное значение как для общего понимания физиологических процессов с участием NO и его комплексов, в первую очередь в сердечно-сосудистой системе, так и для изучения патогенеза различных заболеваний, возможностей терапевтического воздействия, а также разработки новых методов диагностики.

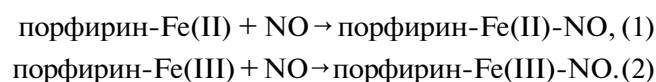
Во многих случаях, например при воспалении, проявления окислительного, нитрозативного и галогенирующего стрессов тесно связаны друг с другом. Наиболее существенную роль в развитии различных патофизиологических процессов иг-

рают активные формы галогенов, в частности хлорноватистая кислота (HClO), активные формы азота (пероксинитрит, нитроксильный анион и др.), а также активные формы кислорода (различные гидропероксиды, гидроксильный и супероксидный радикалы). Эти активные метаболиты вызывают модификацию и инактивацию биомолекул [1, 2], причем общими мишенями их действия в белках являются тиольные (–SH) группы и металлсодержащие центры. В гемоглобине (Hb) в качестве таких функциональных групп выступают гем и SH-группы цистеинов, в первую очередь остатков Cys93 β-субъединиц.

Наряду с транспортом кислорода гемоглобин участвует в метаболизме столь важной сигнальной молекулы, как оксид азота. Так, оксигемоглобин (Hb(II)O<sub>2</sub>) реагирует с NO, окисляя его до нитрата (NO-диоксигеназная реакция) [3]. Сле-

Сокращения: Hb – гемоглобин, ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа.

дует отметить, что интермедиатом этой реакции является связанный с гемовым железом пероксинитрит. С другой стороны, дезоксигемоглобин может действовать как нитритредуктаза с образованием оксида азота [4, 5]. Тем не менее NO, продуцируемый в эритроцитах при восстановлении нитрита, будет далее реагировать с другими молекулами гемоглобина. Известно, что ферроформа гема (порфирин-Fe(II)) связывает NO с очень высокой аффинностью, константа диссоциации образующегося нитрозильного комплекса гемового железа (Hb(II)NO) находится в пределах  $10^{-10}$ – $10^{-11}$  М [4]. Комплекс ферриформы гемовой группы (порфирин-Fe(III)) с оксидом азота намного менее прочен, константа его диссоциации равна  $2.5 \times 10^{-4}$  М. Образование нитрозильных комплексов гемового железа происходит в следующих реакциях:



Считается, что эти реакции, а также NO-диоксигеназная и нитритредуктазная реакции играют ключевую роль в регуляции гемоглобином сигнальной функции оксида азота [3, 4]. Вместе с тем NO может связываться с ионами железа и тиольными группами Cys93  $\beta$ -субъединиц Hb с образованием динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) [6–8]. Кроме того, в результате нитрозилирования этих SH-групп гемоглобина формируется белковый S-нитрозотиол [6]. В то же время ферриформа Hb (метгемоглобин) в сочетании с нитритом и тиолами участвует в продукции низкомолекулярных S-нитрозотиолов, в том числе S-нитрозоглутатион (GSNO) [5]. Нужно отметить, что S-нитрозотиолы и ДНКЖ, связанные с белками или низкомолекулярными лигандами, ответственны за реализацию большого числа физиологических функций оксида азота [5–8].

В свою очередь такие метаболиты NO, как GSNO и нитрит, в условиях, моделирующих окислительный и карбонильный стресс, вызывают модификацию винильных групп порфирина метгемоглобина и формирование Hb(II)NO [9]. Недавно нами было показано, что включение Cys-93  $\beta$ -субъединиц как лигандов в состав ДНКЖ является важным способом регуляции реакционной способности SH-групп Hb, причем формирование этих комплексов NO защищает тиольные группы от окисления гидропероксидом *трет*-бутила [10].

Авторы работ [11, 12] установили, что цитопротекторное и антиоксидантное действие NO в культуре обработанных гидропероксидом *трет*-бутила эритролейкемических клеток обусловлено как его взаимодействием с органическими свободными радикалами, так и образованием нитрозильных комплексов гемового и негемового же-

леза. Известно также, что нитрозилирование гемового железа может ингибировать прооксидантное действие гемопротеидов [13–15]. Имеются данные о том, что NO способен ингибировать реакции фентоновского типа, т.е. генерацию гидроксильного радикала при взаимодействии пероксида водорода с ионами двухвалентного железа. Однако механизм подобного действия NO остается не вполне ясным [16, 17].

Важно, что Hb(II)NO и моноядерные ДНКЖ являются парамагнитными, что позволяет исследовать их с помощью спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) [6–8]. Структура этих нитрозильных комплексов гемового и негемового железа представлена на рис. 1.

Целью настоящей работы является изучение взаимодействия между различными прооксидантами и комплексами гемоглобина с оксидом азота в системах, моделирующих галогенирующий, нитрозативный и окислительный стресс.

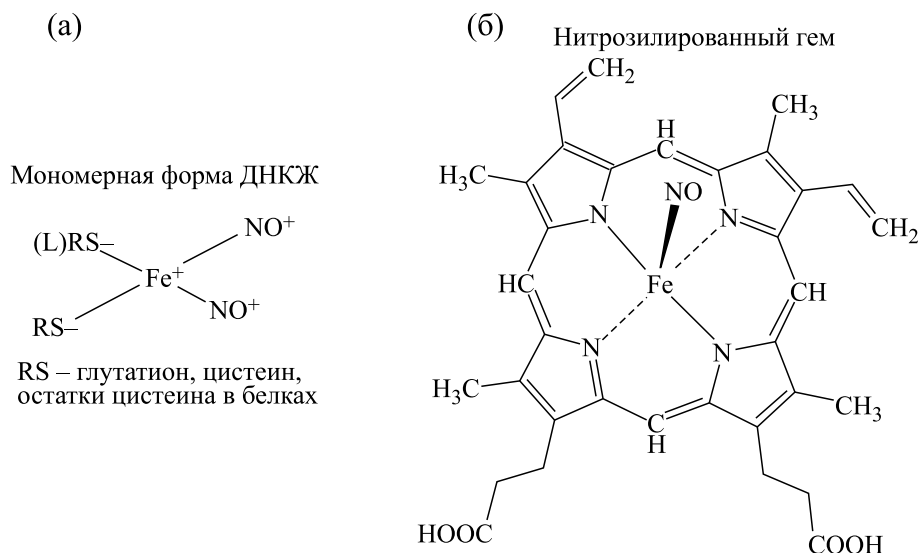
## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Реактивы.** Парамагнитные комплексы NO с гемоглобином регистрировали методом ЭПР-спектроскопии в суспензии эритроцитов крови человека и в модельных системах, содержащих бычий гемоглобин (Sigma-Aldrich, США) в различных реакционных смесях, в том числе с гипохлоритом натрия (NaClO) и донорами NO – DEA/NO (diethylamine NONOate) (Sigma-Aldrich, США). Спиновая ловушка DEPMPO (5-(диэтоксифосфорил)-5-метил-1-пирролин-N-оксид) была получена от фирмы Cayman Chemical Europe (Эстония).

Пероксинитрит (ONOO<sup>-</sup>) был синтезирован в соответствии с методикой, описанной в работах [7, 18]. GSNO получали, смешивая эквимольные концентрации восстановленного глутатиона и нитрита в кислой среде [9].

ДНКЖ с фосфатными лигандами получали, пропуская в сосуде Тунберга газообразный оксид азота через раствор FeSO<sub>4</sub> в 100 мМ K,Na-фосфатном буфере (pH 6.8). Для получения ДНКЖ, связанных с глутатионом, к фосфатным комплексам добавляли восстановленный глутатион, в результате чего Fe-NO-группа переходила на новые лиганды.

Эритроциты крови человека были получены в клиничко-диагностической лаборатории НИИЦ кардиологии (Москва). Эритроциты отмывали центрифугированием в изотоническом растворе (0.9% NaCl) при ускорении 1000 g в течение 5 мин, далее надосадочную жидкость удаляли, а осадок ресуспендировали в изотоническом растворе. Процедуру повторяли еще два раза.



**Рис. 1.** (а) – Динитрозильные комплексы железа с тиольными лигандами (в белках один из остатков цистеина может быть заменен на другой лиганд (L), например, на остаток гистидина); (б) – нитрозилированный по железу гем (порфирин-Fe(II)-NO).

Концентрация гемоглобина, растворенного в 0.2 М К,Na-фосфатном буфере (рН 7.5), составляла 0.4 мМ.

Нв-ДНКЖ получали в результате добавления к раствору метгемоглобина фосфатных ДНКЖ в молярном соотношении 1 : 2.5.

Концентрация дитионита натрия во всех экспериментах с его использованием составляла 70 мМ.

**Регистрация спектров ЭПР динитрозильных комплексов железа и спиновых аддуктов ДЕРМРО.** Спектры ЭПР записывали при комнатной температуре (25°C) на спектрометре E-109E фирмы Varian (США), а также малогабаритном автоматизированном спектрометре ESR 70-03 XD/2 (УП «КБСТ» БГУ, Беларусь).

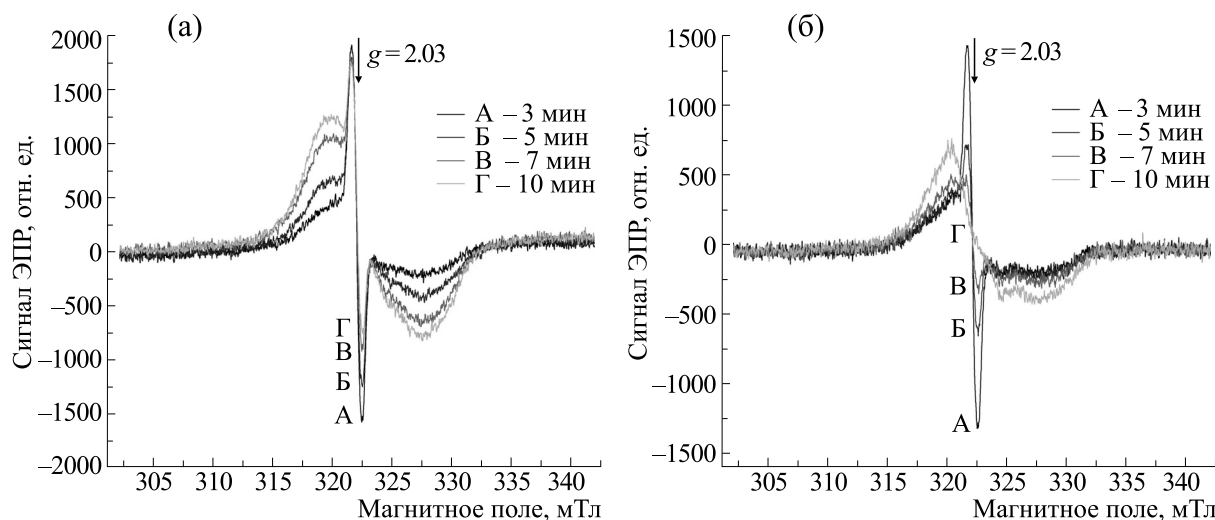
Условия записи спектров ЭПР: на Varian E-109E СВЧ-мощность 10 мВт, СВ-частота 9.15 ГГц; на ЭПР-спектрометре ESR 70-03 XD/2 частота 9.35 ГГц, ослабление СВЧ 5 дБ. Амплитуда модуляции внешнего магнитного поля составляла 0.2 мТл при регистрации сигналов ДНКЖ и Нв(II)NO, а при регистрации сигналов спиновых аддуктов ДЕРМРО – 0.025 мТл.

Для исследования алкоксильного и алкилперекисного радикалов *трет*-бутила использовали спиновую ловушку ДЕРМРО в соответствии с методикой, которая продемонстрирована в работах [19–21].

**Статистический анализ.** Обработка и анализ экспериментальных результатов, в том числе статистические расчеты, были проведены в программе Origin Pro 8 (OriginLab Corp., США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее в работе [22] было показано, что низкомолекулярные ДНКЖ с глутатионовыми лигандами (GS-ДНКЖ) эффективно защищают эритроциты человеческой крови от гемолиза, вызванного хлорноватистой кислотой. В связи с этим мы также исследовали взаимодействие GS-ДНКЖ с HClO в присутствии эритроцитов и донора NO, который имитировал продукцию оксида азота NO-синтазой. В данной системе моделировался галогенирующий стресс, возникающий при респираторном взрыве в ходе воспалительного ответа. Из спектров ЭПР, представленных на рис. 2, видно, что в суспензии эритроцитов человека, содержащей донор NO (DEA/NO), GS-ДНКЖ и HClO, образуется Нв(II)NO (рис. 1б), хотя кинетика этого процесса более медленная, чем в аналогичной реакционной среде без HClO (рис. 2а). Вместе с тем GS-ДНКЖ в этих условиях разрушаются почти полностью. Быстрое разрушение GS-ДНКЖ под действием HClO согласуется с данными работы [22]. При этом регенерация ДНКЖ не происходит даже в присутствии свободного NO, образующегося при распаде DEA/NO. В то же время Нв(II)NO внутри эритроцитов, вероятно, менее доступен окислению хлорноватистой кислотой. Также было показано, что ДНКЖ, связанные с бычьим гемоглобином, количественно разрушаются под действием HClO (рис. 3). Следовательно, если Нв-ДНКЖ образуется в модельной системе с эритроцитами, описанной выше, то эти комплексы NO не регистрируются, поскольку они должны быстро разрушаться.

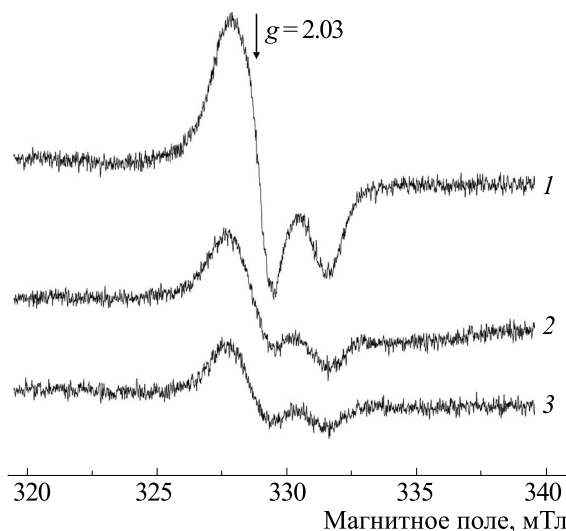
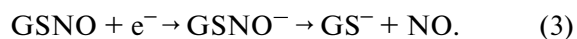


**Рис. 2.** Спектры ЭПР, зарегистрированные в реакционной среде, содержащей эритроциты, 0,8 мМ GS-ДНКЖ и 10 мМ DEA/NO (а), а также после добавления в реакционную среду 0,1 мМ NaOCl (б). Узкий сигнал с *g*-фактором 2,03 принадлежит ДНКЖ с глутатионовыми лигандами, широкий сигнал является суперпозицией сигналов ЭПР нитрозилированных гемовых групп Hb. Во всех образцах содержался изотонический K,Na-фосфатный буфер (pH 7,4).

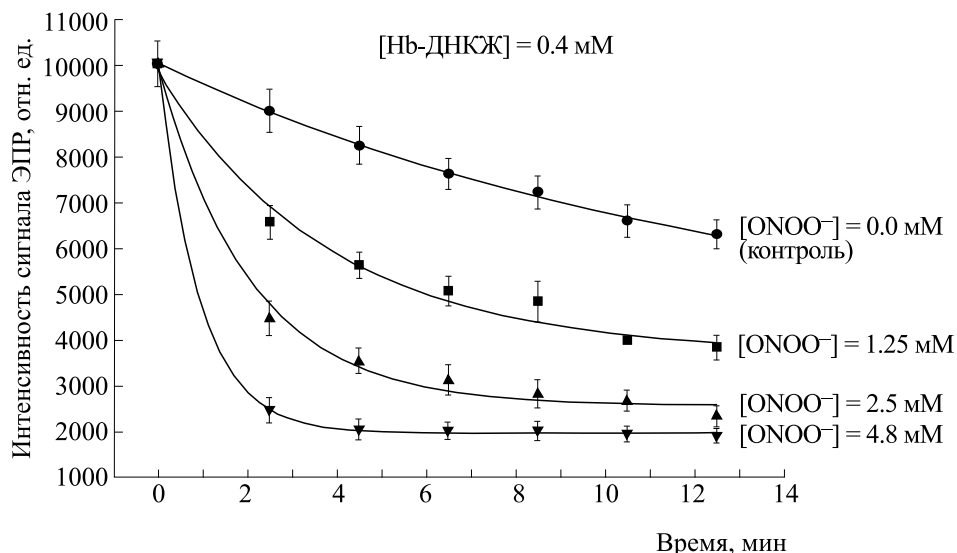
В условиях, моделирующих нитрозативный стресс, исследовали взаимодействие Hb-ДНКЖ и пероксинитрита (ONOO<sup>-</sup>). Было показано, что пероксинитрит, аналогично HClO, дозозависимо разрушает Hb-ДНКЖ. Кинетика разрушения Hb-ДНКЖ при трех разных концентрациях пероксинитрита в сравнении с контрольным образцом без пероксинитрита продемонстрирована на рис. 4. Нельзя исключить, что при разрушении Hb-ДНКЖ высвобождается NO и происходит нитрозилирование гемовой группы гемоглобина. Такой процесс происходил при разрушении Hb-

ДНКЖ под действием супероксида [8]. Тем не менее в данном эксперименте образование Hb(II)NO не наблюдалось.

Известно, что образование Hb(II)NO в присутствии S-нитрозоглутатиона существенно стимулируется таким сильным восстановителем, как дитионит [23]. Авторы статьи предполагают, что при восстановлении GSNO образуется свободный NO и тиолят-анион глутатиона:



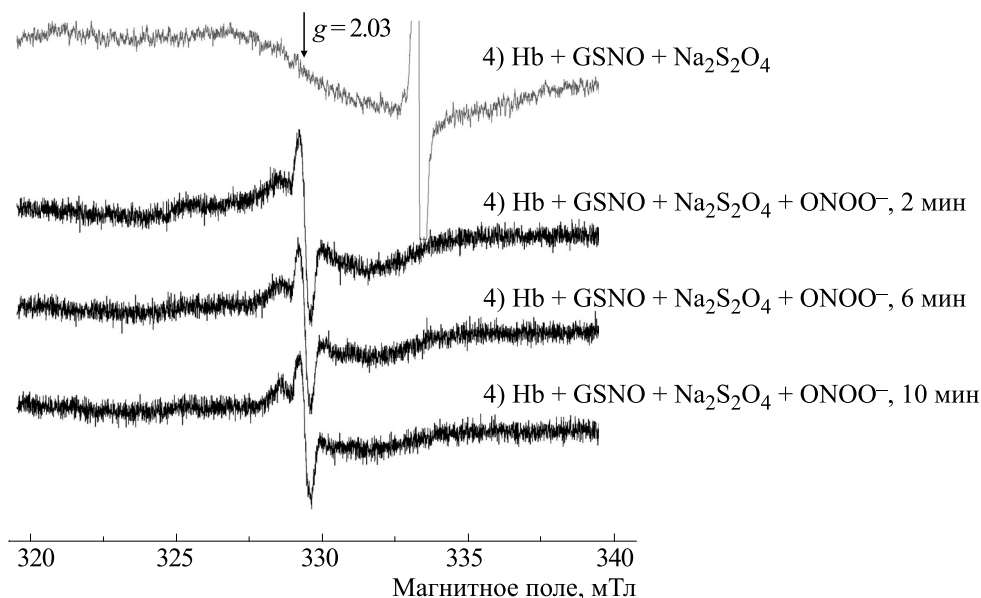
**Рис. 3.** Разрушение гемоглибиновых ДНКЖ под действием хлорноватистой кислоты. Спектры ЭПР Hb-ДНКЖ (концентрация 0,4 мМ): 1 – образец без хлорноватистой кислоты (контрольный); 2 – то же, что и (1), + HClO в концентрации 0,02 мМ; 3 – то же, что и (1), + HClO в концентрации 0,2 мМ. Во всех образцах содержался 100 мМ K,Na-фосфатный буфер.



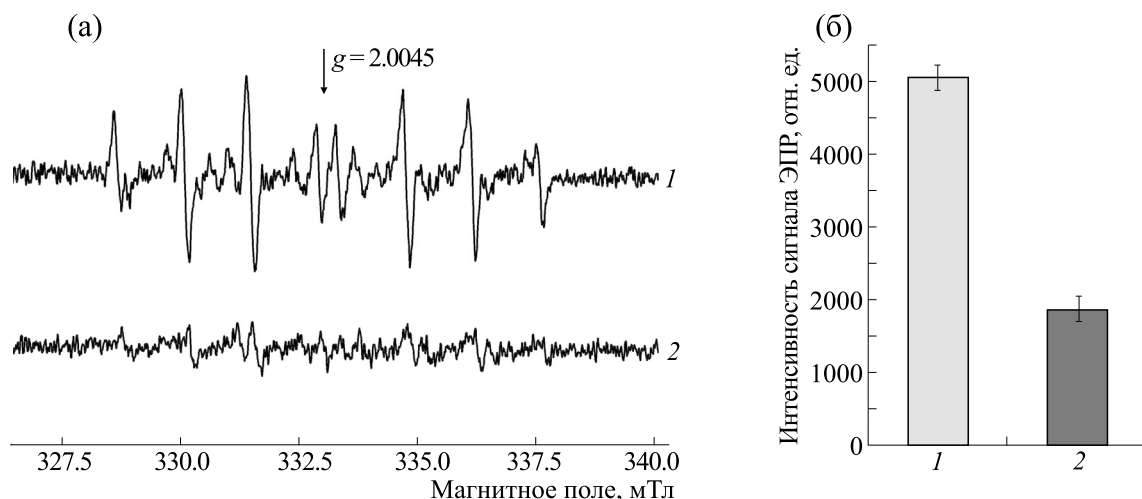
**Рис. 4.** Кинетические кривые дозозависимого разрушения Hb-ДНКЖ (концентрация 0.4 мМ) под действием пероксинитрита (используемые концентрации указаны на рисунке).

Действительно, в реакционной среде, содержащей метгемоглобин, дитионит и GSNO, мы наблюдали образование Hb(II)NO (рис. 5, спектр 1). Кроме того, на этом спектре мы видим ЭПР-сигнал самого дитионита. Следует отметить, что дитионит в данной системе также восстанавливает метгемоглобин до дезоксигемоглобина. После добавления в реакционную среду пероксинитрита мы наблюдаем появление сигнала ЭПР с  $g$ -фактором 2.03, характерного для ДНКЖ,

который, по-видимому, соответствует глутатион-содержащим ДНКЖ. Вместе с тем сохраняется сигнал нитрозильного комплекса гемового железа, тогда как сигнал дитионита исчезает (рис. 5, спектры 2–4). В литературе имеются данные, что под действием хлорноватистой кислоты или пероксинитрита происходит высвобождение гема в гемолизате эритроцитов [7, 24]. Также ONOO<sup>-</sup> вызывает модификацию и деструкцию гемовых групп Hb и NO-синтазы [9, 25]. Можно предполо-



**Рис. 5.** Спектры ЭПР реакционной смеси, содержащей: 1 – 0.5 мМ гемоглобина, 12 мМ S-нитрозоглутатиона (GSNO) и 70 мМ дитионита натрия ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ); 2–4 – то же + пероксинитрит (8 мМ ONOO<sup>-</sup> через 2, 6 и 10 мин после добавления пероксинитрита соответственно).

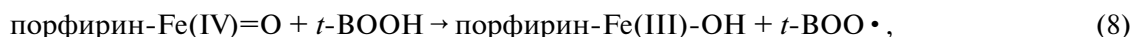
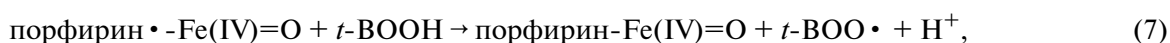


**Рис. 6.** Антиоксидантное действие Hb-ДНКЖ. (а) – Спектры ЭПР спинового аддукта DEPMPO, демонстрирующие антиоксидантное действие Hb-ДНКЖ. Концентрация DEPMPO в реакционной смеси составляла 70 мМ, гидропероксида *tert*-бутила – 1 мМ, метгемоглобина (1) или Hb-ДНКЖ (2) – 0.3 мМ. (б) – Средние значения интенсивности сигнала ЭПР спинового аддукта DEPMPO в двух группах образцов: 1 – контрольные образцы с 0.3 мМ метгемоглобина, 2 – образцы с Hb-ДНКЖ в расчетной концентрации 0.3 мМ.

жить, что S-нитрозоглутатион участвует в образовании не только Hb(II)NO, но и ДНКЖ, причем источником железа для последних является деструкция гемовой группы под действием пероксинитрита, а тиольный лиганд, как и NO, образуется в реакции (3). В этом случае связывание железа в составе ДНКЖ может ингибировать реакции фентоновского типа, в которых взаимодействие ионов переходных металлов с гидропе-

роксидами приводит к генерации свободных радикалов.

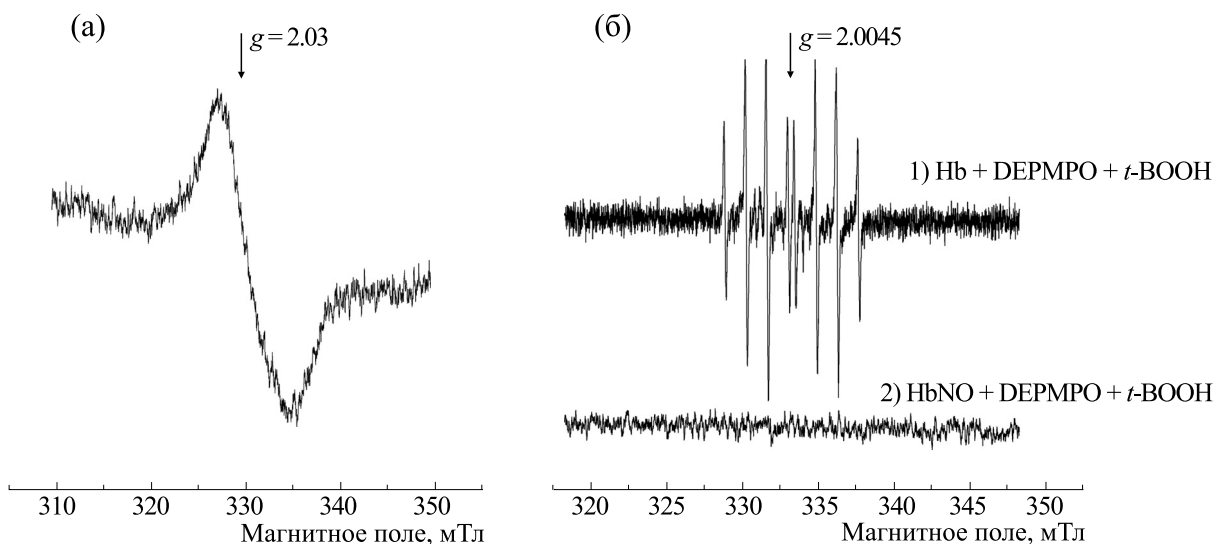
Взаимодействие гемопротейдов с различными гидропероксидами можно моделировать при помощи гидропероксида *tert*-бутила (*t*-BOOH) [11, 20]. Считается, что реакции гемопротейдов с гидропероксидом *tert*-бутила приводят к образованию органических свободных радикалов [8, 20, 26]:



Кроме того, продуктом этих реакций является такой сильный окислитель, как оксоферрильный гем (порфирин-Fe(IV)=O). В условиях окислительного стресса аналогичные реакции гемовых групп с липидными гидропероксидами стимулируют перекисное окисление липидов и окислительную модификацию белков и других биополимеров.

В наших экспериментах также исследовалось взаимодействие между гемоглобином или его комплексами с NO и гидропероксидом *tert*-бу-

тила, причем для регистрации свободных радикалов мы использовали спиновую ловушку DEPMPO [20, 21]. На рис. 6а представлены спектры спиновых аддуктов DEPMPO со свободно-радикальными интермедиатами реакции метгемоглобина и *t*-BOOH. Исходя из данных работы [20], можно заключить, что основным свободным радикалом, образующимся в исследуемой модельной системе, является алкоксильный радикал (*tert*-бутоксильный радикал, *t*-BO•). Кроме того, в меньшей степени регистрируется метил-



**Рис. 7.** (а) – Спектр ЭПР  $\text{Hb(II)NO}$ , образованных при добавлении соли Анджели (концентрация  $\text{Na}_2(\text{ONNO}_2)$  в образце – 12 мМ) к 0.3 мМ раствору метгемоглобина. (б) – Антиоксидантное действие  $\text{Hb(II)NO}$  (донор  $\text{NO}$  – соль Анджели) в системе с гидропероксидом *трет*-бутила. Спектры образца 1, который содержал 0.3 мМ метгемоглобина, 70 мМ DEPMPO, 2 мМ *t*-BOOH; в случае образца 2 сначала получали  $\text{Hb(II)NO}$  добавлением соли Анджели к раствору метгемоглобина, затем в образец добавляли DEPMPO и *t*-BOOH (конечные концентрации 70 и 2 мМ соответственно).

пероксильный радикал ( $\text{CH}_3\text{OO}\cdot$ ) (реакция 10). Как видно из рис. 6,  $\text{Hb}$ -ДНКЖ достоверно снижают уровень свободных радикалов, формирующихся в реакциях (4)–(10). Существенное уменьшение концентрации свободнорадикальных интермедиатов наблюдалось уже при молярном соотношении ДНКЖ : *t*-BOOH  $\sim 1 : 9$  (молярное соотношение  $\text{Hb} : t\text{-BOOH}$  равно  $1 : 4$ ) (рис. 6б). Можно предположить, что этот эффект обусловлен реакциями алкоксильных и алкилпероксильных радикалов с  $\text{NO}$ -лигандами ДНКЖ [27]. Считается также, что взаимодействие  $\text{NO}$  и свободных радикалов липидов приводят к терминции цепных реакций перекисного окисления липидов и образованию нитролипидов [27]. В условиях наших экспериментов оксид азота может высво-

бождаться при распаде ДНКЖ. Ранее мы показали, что ДНКЖ с глутатионовыми лигандами восстанавливают оксоферрильную гемовую группу миоглобина и перехватывают свободные радикалы, образующиеся при взаимодействии этого гемопротейда с *t*-BOOH [26].

Интересно, что нитрозилирование гемоглобина по железу гема приводит к еще большему антиоксидантному эффекту (рис. 7). Нитрозилирование гема производили путем добавления донора нитроксильного аниона ( $\text{NO}^-$ ) – соли Анджели – к раствору метгемоглобина. В этом случае, в отличие от реакции (2), происходит восстановление ферроформы гема и образование  $\text{Hb(II)NO}$  (рис. 7а):



После добавления в реакционную систему гидропероксида *трет*-бутила и спиновой ловушки сигнал спинового аддукта DEPMPO не наблюдался, в отличие от контрольного образца с раствором метгемоглобина без соли Анджели

(рис. 7б). Можно предположить, что нитрозилгемоглобин восстанавливает *t*-BOOH, как это было показано для нитрозилмиоглобина в работе [15], причем при взаимодействии последнего с гидропероксидами образуется нитрит и метмиоглобин:



Вместе с тем подобный механизм взаимодействия с гидропероксидами предлагается и

для нитрозильных комплексов негемового железа [11, 17].

## ВЫВОДЫ

Деструкция ДНКЖ в условиях, моделирующей галогенирующий и нитрозилирующий стресс, может быть важным элементом регуляции метаболизма оксида азота, а также влиять на сигнальную функцию этой важнейшей молекулы. Кроме того, взаимодействие комплексов NO с гемоглобином с прооксидантными и антиоксидантными системами в системе кровообращения требует дальнейшего исследования. Нужно отметить, что нарушение функционирования различных форм NO играет ключевую роль в развитии многих патологий сердечно-сосудистой системы. Также не исключено, что ДНКЖ предотвращают модификацию гемоглобина, перехватывая активные формы азота и галогенов, а также свободные радикалы, образующиеся при распаде органических гидропероксидов. Действительно, в предшествующих работах нами было установлено, что комплексы железа с NO способны ингибировать окислительную модификацию гемоглобина [7, 8, 10]. В настоящей работе подтверждаются основные выводы наших предыдущих работ об антиоксидантном и антирадикальном действии комплексов NO.

По мнению авторов, в данной работе новыми являются следующие положения и результаты:

– ДНКЖ эффективно перехватывают свободные радикалы, образующиеся в различных системах, моделирующих окислительный стресс при некоторых патологиях;

– ДНКЖ являются одним из универсальных регуляторов свободнорадикальных процессов в живых системах и в этом качестве обладают значительным терапевтическим потенциалом.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, гранты № 19-015-00444 и 19-29-12052.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. P. Pacher, J. S. Beckman, and L. Liaudet, *Physiol. Rev.* **87** (1), 315 (2007).

2. О. М. Панасенко, Т. И. Торховская, А. В. Соколов и др., *Успехи биол. химии* **60**, 75 (2020).

3. P. R. Gardner, *Scientifica* **2012** (50), 683729 (2012).

4. C. Helms and D. B. Kim-Shapiro, *Free Radic. Biol. Med.* **61**, 464 (2013).

5. E. Nagababu and J. M. Rifkind, *Cell Biochem. Biophys.* **67** (2), 385 (2013).

6. E. Faassen and A. F. Vanin, *Radicals for Life. The Various Forms of Nitric Oxide* (Elsevier Science, Amsterdam, 2007).

7. K. B. Shumaev, A. A. Gubkin, V. A. Serezhenkov, et al., *Nitric Oxide* **18**, 37 (2008).

8. K. B. Shumaev, O. V. Kosmachevskaya, A. A. Timoshin, et al., *Methods Enzymol.* **436**, 445 (2008).

9. O. V. Kosmachevskaya, K. B. Shumaev, E. I. Nasybulina, et al., *Clin. Chem. Lab. Med.* **52** (1), 161 (2014).

10. О. В. Космачевская, Э. И. Насыбуллина, К. Б. Шумаев и др., *Прикл. биохим. микробиол.* **56** (5), 436 (2020).

11. N. V. Gorbunov, J. C. Yalowich, A. Gaddam, et al., *J. Biol. Chem.* **272** (19), 12328 (1997).

12. J. C. Yalowich, N. V. Gorbunov, A. V. Kozlov, et al., *Biochemistry* **38** (33), 10691 (1999).

13. J. Kanner, I. Ben-Gera, and S. Berman, *Lipids* **15**, 944 (1980).

14. J. Kanner, S. Harel, and R. Granit, *Lipids* **27** (1), 46 (1992).

15. C. P. Baron, J. S. Móller, L. Skibsted, et al., *Free Radic. Res.* **41**, 892 (2007).

16. V. E. Kagan, A. V. Kozlov, and Y. Y. Tyurina, *Antioxid. Redox Signal.* **3** (2), 189 (2001).

17. C. Lu and W. H. Koppenol, *J. Biol. Inorg. Chem.* **10** (7), 732 (2005).

18. K. M. Robinson and J. S. Beckman, *Methods Enzymol.* **396**, 207 (2005).

19. H. Karoui, N. Hogg, C. Fréjaville, et al., *J. Biol. Chem.* **271** (11), 6000 (1996).

20. H. Karoui, F. Chalier, J. P. Finet, et al., *Org. Biomol. Chem.* **9** (7), 2473 (2011).

21. K. Stolze, N. Udilova, and H. Nohl, *Free Radic. Biol. Med.* **29** (10), 1005 (2000).

22. K. B. Shumaev, I. V. Gorudko, O. V. Kosmachevskaya, et al., *Oxid. Med. Cell Longev.* **2019**, 2798154 (2019).

23. M. R. Kumar, T. Clover, A. D. Olaitan, et al., *Nitric Oxide* **77**, 96 (2018).

24. J. Y. Oh, A. Williams, and R. P. Patel, *Arch. Biochem. Biophys.* **662**, 111 (2019).

25. W. Chen, L. J. Druhan, C. A. Chen, et al., *Biochemistry* **49** (14), 3129 (2010).

26. К. Б. Шумаев, Н. Э. Петрова, И. В. Заббарова и др., *Биохимия* **69** (5), 699 (2004).

27. К. Б. Шумаев, О. В. Космачевская, Д. И. Грачев, и др., *Биомед. химия* **67** (2), 162 (2021).



## Nitrosyl Hemoglobin Complexes in Various Model Systems

D.I. Grachev<sup>\*, \*\*</sup>, K.B. Shumaev<sup>\*\*</sup>, <sup>\*\*\*</sup>, O.V. Kosmachevskaya<sup>\*\*\*</sup>,  
A.F. Topunov<sup>\*\*\*</sup>, and E.K. Ruuge<sup>\*, \*\*</sup>

*\*Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/2, Moscow, 119991 Russia*

*\*\*National Medical Research Center for Cardiology, Ministry of Health of the Russian Federation,  
3rd Cherepkovskaya ul. 15a, Moscow, 121552 Russia*

*\*\*\*Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology", Russian Academy of Sciences,  
Leninsky prosp. 33/2, Moscow, 119071 Russia*

Complexes of nitric oxide (NO) with iron from the heme group of hemoglobin (HbNO) and dinitrosyl iron complexes with thiols, including complexes with hemoglobin cysteine residues (Hb-DNIC), may play an important role in the processes associated with oxidative, halogenative, and nitrosative stress in the cardiovascular system. In our work, in various model systems, electron paramagnetic resonance spectrum of paramagnetic NO complexes and DEPMPO spin adducts were used to explore the interaction of these two types of NO hemoglobin complexes with reactive halogen, oxygen, and nitrogen species, as well as with alkoxy and alkyl peroxide radicals. It was shown that hypochlorous acid (sodium hypochlorite) and peroxyxynitrite quantitatively destroy Hb-DNIC. In the presence of sodium dithionite, S-nitrosoglutathione can participate in heme nitrosylation of deoxyhemoglobin with the formation of Hb(II)NO, but when this system is exposed to peroxyxynitrite, dinitrosyl iron complexes are formed. At the same time, Hb(II)NO and Hb-DNIC reduce the level of organic free radicals produced in the reaction between hemoglobin and tert-butyl hydroperoxide. The results obtained demonstrate the ability of the nitrosyl hemoglobin complexes under study to intercept reactive oxygen, nitrogen and halogen species and thereby influence the processes of free radical oxidation.

*Keywords: oxidative stress, dinitrosyl iron complexes, hemoglobin, antioxidants, electron paramagnetic resonance, spin traps*