

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

*На правах рукописи*

**Грачев Дмитрий Иванович**

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ГЕМОВОГО И НЕГЕМОВОГО  
ЖЕЛЕЗА С АКТИВНЫМИ ФОРМАМИ КИСЛОРОДА И АЗОТА**

Специальность 1.5.2. Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Москва – 2025

Диссертация подготовлена на кафедре биофизики физического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

Научные руководители

**Рууге Энно Куставич,**  
доктор физико-математических наук, профессор

**Шумаев Константин Борисович,**  
доктор биологических наук

Официальные оппоненты

**Власова Ольга Леонардовна,**  
доктор физико-математических наук, профессор, ФГАОУ  
ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет  
Петра Великого», Институт биомедицинских систем и  
биотехнологий, Высшая школа биомедицинских систем и  
технологий, директор

**Проскураков Иван Игоревич,**  
доктор физико-математических наук,  
ФГБУН «Федеральный исследовательский центр  
«Пущинский научный центр биологических исследований  
Российской академии наук», Институт фундаментальных  
проблем биологии Российской академии наук –  
обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН,  
лаборатория молекулярной спектроскопии, и.о.  
заведующего, ведущий научный сотрудник

**Горин Дмитрий Александрович,**  
доктор химических наук, профессор,  
АНО ВО «Сколковский институт науки и технологий»,  
центр фотоники и фотонных технологий, профессор

Защита диссертации состоится 18 сентября 2025 года в 15:00 на заседании диссертационного совета МГУ.011.9 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991 Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2, Физический факультет МГУ, аудитория 5-19.

E-mail: [osminkinala@my.msu.ru](mailto:osminkinala@my.msu.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский пр-т, д. 27) и на портале <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3464>

Автореферат разослан «\_\_\_» июня 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета МГУ.011.9,  
кандидат физико-математических наук

Осминкина Л.А.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Процессы с участием различных свободных радикалов представляют интерес для исследователей из самых разных направлений науки: от фундаментальной биохимии и биофизики до различных областей клинической медицины. С одной стороны, свободные радикалы играют ключевую роль в важнейших физиологических процессах, с другой стороны они являются решающим фактором развития многих патологий. Окислительный (или оксидативный) стресс часто определяется как нарушение баланса между образованием свободнорадикальных соединений и способностью той или иной биологической системы устранять или обезвреживать реакционноспособные интермедиаты и восстанавливать полученные повреждения. Этот процесс может быть причиной формирования токсичных соединений, которые повреждают биополимеры (белки, липиды, ДНК), а также субклеточные структуры.

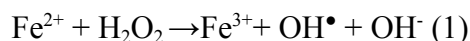
Основные химические соединения, ответственные за окислительный стресс - активные формы кислорода (АФК). Отдельно выделяют нитрозативный стресс, вызванный гиперпродукцией активных форм азота (АФА) и галогенирующий стресс, вызываемый активными формами галогенов (АФГ). По определению, свободные радикалы обладают неспаренным электроном, с чем связана их высокая реакционная способность и, соответственно, короткое время жизни (например, супероксида  $\sim 10^{-6}$  с, а гидроксильного радикала  $\sim 10^{-9}$  с). В живых организмах существует множество источников свободных радикалов, ключевым из которых является митохондриальная цепь переноса электронов. Среди других источников особенно выделяются некоторые ферменты. АФК и АФА занимают весьма важное место в развитии разных патологических состояний: сердечно-сосудистых, онкологических, нейродегенеративных и других болезней. Стоит упомянуть и т.н. свободнорадикальную теорию старения, которая отводит ключевую роль в старении живых организмов накоплению повреждений, наносимых свободными радикалами.

С другой стороны, различные свободные радикалы могут быть важнейшим звеном в нормальной работе некоторых систем организма. Одним из таких соединений является молекула монооксида азота (NO), которая обладает неспаренным электроном и поэтому является свободным радикалом. NO принадлежит к большой группе молекул, называемых вторичными посредниками или вторичными мессенджерами, которые высвобождаются в ответ на стимуляцию рецепторов и вызывают активацию первичных эффекторных белков. Действие оксида азота (здесь и далее имеется в виду монооксид азота) является ключевым для различных сигнальных и регуляторных путей в нервной, иммунной и, особенно,

кровеносной системе, в каждой из которых эта молекула синтезируется соответствующим ферментом – синтазой оксида азота (NO-синтазой).

Оксид азота, будучи короткоживущим соединением, имеет стабилизированные физиологические формы, такие как S-нитрозотиолы и динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ). NO занимает двойственную позицию в балансе между прооксидантными и антиоксидантными системами в организме. С одной стороны, монооксид азота, в результате некоторых реакций, образует АФА. С другой – некоторые из его стабилизированных форм, например, вышеупомянутые ДНКЖ, обладают антиоксидантным действием. Последние включают в себя два важных участника свободнорадикальных процессов: оксид азота и железо.

Хорошо известно то, как железо и другие ионы переходных металлов задействованы в оксидативном стрессе. В первую очередь, следует упомянуть реакции Фентона:



и Габера - Вайсса:



Известно, что эти реакции являются важными источниками гидроксильного и супероксидного радикалов. В продукции АФК принимают участие как ионы свободного железа, так и локализованные в простетических группах молекул гемопротеинов (порфириновых циклах гема). Гемопротеины, среди которых наиболее известными являются гемоглобин и цитохром с, которые выполняют функции, абсолютно необходимые для существования многих живых организмов.

Формирование нитрозильных комплексов гема происходит при взаимодействии NO с гемовым железом, что сопровождается изменением их физико-химических свойств, а также биологической функции.

Несмотря на весьма внушительное количество данных, взаимосвязь гомеостаза железа, метаболизма NO и процессов окислительного и нитрозативного стресса остается предметом новых исследований. Вполне возможно, что нитрозильные комплексы гемового и негемового железа играют существенную роль в сопряжении и регуляции этих путей.

Таким образом, исследование влияния оксидативного, галогенирующего и нитрозативного стресса на метаболизм NO и его стабилизированных форм является значимым и для определения принципов окислительно-восстановительных реакций в живых системах, и для установления механизмов развития различных патологий, а также для создания современных подходов к терапии и диагностике болезней.

### **Степень разработанности темы**

В рамках работы над диссертацией проведен анализ научно-исследовательских публикаций, в которых рассмотрены оксидативный, нитрозативный и галогенирующий стресс, биологическая роль монооксида азота, а также место NO и его комплексов с гемовым и негемовым железом в балансе антиоксидантных и прооксидантных систем в живых организмах. К настоящему времени показано участие активных форм кислорода (АФК) и азота (АФА) и в выполнении важной работы в различных биологических путях, и в развитии патологических состояний, однако молекулярные механизмы функционирования этих соединений в норме и при патологии требуют уточнения. Кроме того, необходимо более полное объяснение стабилизации монооксида азота в нитрозильных комплексах железа, а также реакций этих комплексов с прооксидантными соединениями.

### **Цель диссертационного исследования**

Целью диссертационной работы являлось изучение механизмов взаимодействия ДНКЖ, в том числе связанных с гемоглобином, и нитрозилированных по гемовому железу гемопротеинов с активными формами кислорода, азота и галогенов, а также редокс-реакций с участием гемоглобина.

**Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи.**

1. Сравнить физико-химические характеристики мембран эритроцитов пациентов с нормальным и повышенным показателями анизотропии эритроцитов, а также при воздействии прооксидантных соединений и без такового.
2. Изучить взаимодействие гемовых и негемовых нитрозильных комплексов железа с активными формами галогенов в суспензии эритроцитов человека и в модельных реакционных системах.
3. Получить экспериментальные данные о наличии или отсутствии антиоксидантного действия низкомолекулярных и белковых ДНКЖ при взаимодействии с различными прооксидантными соединениями.
4. Изучить роль ДНКЖ, в том числе связанных с гемоглобином, в предотвращении окислительного стресса, вызываемого реакциями органических гидропероксидов с гемовым железом гемоглобина и цитохрома *c*.
5. Определить кинетические параметры перекисного окисления липопротеинов низкой плотности и липосом.
6. Исследовать механизмы антиоксидантного действия нитроксила при взаимодействии с оксоферрильными и мет- формами гемопротеинов и роль этого процесса в окислительном стрессе.

## **Объект и предмет исследования**

Объектом исследования являлись человеческие эритроциты и различные модельные системы, содержащие гемопротейны (в первую очередь – бычий гемоглобин, а также миоглобин и цитохром *c*) в условиях, имитирующих процессы окислительного и галогенирующего стресса *in vitro*. Предметом исследования являлось взаимодействие нитрозильных комплексов гемового железа, в первую очередь, в гемоглобине, и динитрозильных комплексов железа (негемовых).

## **Научная новизна**

1. При помощи спиновых меток выявлено достоверное различие микровязкости мембран эритроцитов у групп пациентов с нормальным и повышенным коэффициентом анизотропии эритроцитов, а также в группе образцов с добавлением гипохлорита в сравнении с контрольной группой.
2. Методом спектроскопии электронного парамагнитного резонанса показано разрушение низкомолекулярных динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) в среде с эритроцитами при гипохлорит-индуцированном гемолизе, а также в модельной реакционной системе, сопровождающееся антиоксидантным действием.
3. При помощи спектроскопии ЭПР выявлен механизм антиоксидантного действия глутатион-содержащих и связанных с гемоглобином ДНКЖ в отношении различных прооксидантных соединений, таких как пероксинитрит.
4. В экспериментах на модельных системах, содержащих различные гемопротейны, а также гидропероксид *трет*-бутила, показано антиоксидантное и антирадикальное действие ДНКЖ.
5. Продемонстрирована высокая антиоксидантная эффективность глутатион-содержащих ДНКЖ при свободнорадикальном окислении ЛПНП и лецитиновых липосом.
6. Продемонстрирован антиоксидантный эффект нитрозилирования гемового железа гемоглобина при воздействии различных прооксидантных соединений, а также впервые показана роль восстановительного нитрозилирования оксоферрильных форм гемопротейнов в процессе окислительного стресса.

## **Теоретическая и практическая значимость работы**

Полученные в работе экспериментальные данные, а также проведенный анализ как собственных, так и литературных данных, позволяют говорить о перспективах использования динитрозильных комплексов железа в качестве антиоксидантного средства.

## **Методология диссертационного исследования**

Основным экспериментальным методом, использованным в рамках данной работы, являлась спектроскопия электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). В работе также были применены методы спектрофотометрии и хемилюминиметрии. Для анализа и обработки результатов использовались статистические методы и современное программное обеспечение.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Микровязкость мембран эритроцитов достоверно различается в зависимости от коэффициента анизотропии эритроцитов, а также в присутствии и отсутствии гипохлорита.
2. В ходе индуцированного гипохлоритом гемолиза эритроцитов происходит разрушение динитрозильных комплексов железа, связанных с глутатионом и гемоглобином.
3. Динитрозильные комплексы железа, связанные с глутатионом или гемоглобином, нейтрализуют активные формы кислорода и азота.
4. Динитрозильные комплексы железа с тиол-содержащими лигандами перехватывают свободные радикалы, образующиеся при взаимодействии гемопротеинов с модельным органическим гидропероксидом (гидропероксидом *трет*-бутила).
5. Динитрозильные комплексы железа ингибируют свободнорадикальное окисление липопротеинов низкой плотности и липосом, причем наибольшей эффективностью обладают комплексы с глутатионовыми лигандами.
6. Под действием нитроксила (HNO) происходит восстановительное нитрозилирование прооксидантных оксоферрильных и мет- форм гемового железа гемоглобина и миоглобина.

### **Степень достоверности**

Достоверность полученных и представленных в диссертации результатов исследования определяется подробным обзором научных исследований по тематике диссертационной работы, применением апробированных и современных методов проведения экспериментов, а также методов анализа и обработки экспериментальных данных, в том числе с использованием статистических критериев. В экспериментальной работе были использованы метрологически поверенные приборы. Оценка рецензентов опубликованных статей, вошедших в список публикаций автора работы, также подтверждает достоверность результатов.

### **Личный вклад автора**

Совместно с научными руководителями, профессором, доктором физико-математических наук Э.К. Рууге и доктором биологических наук К.Б. Шумаевым, автором было определено направление исследований, сформулированы цель и задачи исследования. Автор персонально осуществлял поиск и анализ необходимых сведений из научной литературы, активно участвовал в планировании экспериментов вместе с научными руководителями, проводил запланированные эксперименты лично и, в некоторых случаях, в сотрудничестве с научными руководителями работы. Соискатель совместно с научными руководителями работы проводил обсуждение и интерпретацию полученных результатов, а также готовил публикации и доклады на научных конференциях. Во всех опубликованных по тематике диссертации работах основополагающий вклад принадлежит соискателю. При этом необходимо отдельно отметить следующее. Эксперименты, представленные в статье [А3] и разделе 3.5 диссертации были проведены совместно с научным руководителем работы - К.Б. Шумаевым. Кроме того, схема предполагаемого механизма антиоксидантного действия динитрозильных комплексов железа, предложенная в диссертации и в статье [А3], разработана также совместно с К.Б. Шумаевым.

### **Публикации**

Основные результаты по тематике диссертации изложены в 4 статьях в журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus и RSCI, а также 3 статьях в иных рецензируемых научных изданиях.

### **Апробация результатов**

Результаты диссертационного исследования были представлены на 11 всероссийских и международных конференциях:

1. XVII международная научная конференция «Актуальные вопросы биологической физики и химии» (БФФХ-2022) (Севастополь, Россия, 19 - 23 сентября 2022);
2. Ежегодная всероссийская научно-практическая конференция «Кардиология на марше 2022» (Москва, Россия, 7 - 9 июня 2022);
3. 25-а Пушкинская школа-конференция молодых ученых с международным участием «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА» (Пушино, Россия, 18 - 22 апреля 2022);
4. Научная конференция «ЛОМОНОСОВСКИЕ ЧТЕНИЯ». Секция физики. Сборник тезисов докладов (Москва, Россия, 15 - 22 апреля 2022);



5. XVI международная научная конференция «Актуальные вопросы биологической физики и химии» (БФФХ-2021) (Севастополь, Россия, 13 - 17 сентября 2021);
6. Международная конференция «Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии NT + M&Ec`2020» (Гурзуф, Россия, 31 мая – 10 июня 2021);
7. XXIV Международная медико-биологическая конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, Россия, 24 апреля 2021);
8. XV международная научная конференция «Актуальные вопросы биологической физики и химии» (БФФХ-2020) (Севастополь, Россия, 14 - 16 сентября 2020);
9. XI International Workshop on EPR in Biology and Medicine (Краков, Польша, 6 - 11 октября 2019);
10. VI съезд биофизиков России (Сочи, Россия, 16 - 21 сентября 2019);
11. Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2019» (Москва, Россия, 11 апреля 2019).

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа состоит из введения, трех глав, заключения, списка цитируемой литературы. Общий объем диссертации составляет 142 страницы текста, включая 4 таблицы и 39 рисунков. Список литературы содержит 240 наименований.

### **СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ**

Во **введении** обоснована актуальность темы исследования, показана степень ее разработанности, сформулированы цели и задачи диссертационной работы, определены объект и предмет исследования, а также продемонстрированы научная новизна и практическая значимость проведенного исследования. Кроме того, во введении представлены положения, выносимые на защиту и описана структура диссертации.

**Первая глава** диссертации представляет собой научный литературный обзор по теме исследования. В этой главе изложены основные сведения о метаболизме оксида азота (NO) и участии этой молекулы в реализации важнейших биохимических путей, известные прооксидантные и антиоксидантные эффекты самого NO и его физиологических производных. Отражены сложившиеся к настоящему моменту представления об оксидативном и нитрозативном стрессе, биологическом действии активных форм кислорода (АФК) и активных форм азота (АФА). Далее рассмотрены общее строение, функции и физико-химические свойства гемопротеинов, в первую очередь связанные с их ролью в окислительном стрессе. Приведены современные данные об одной из основных

стабилизированных форм NO - динитрозильных комплексах железа с разными лигандами, их образовании, основных физико-химических свойствах и функциях. Кроме того, в этой главе дано представление о физиологической роли нитрозильных комплексов с гемовым железом. Следует отметить, что обзор литературы включает в себя и общие сведения о методах изучения объектов, рассматриваемых в диссертационной работе.

Во **второй главе** работы описаны материалы и методы, примененные в рамках диссертационной работы. Эксперименты были проведены с использованием человеческих эритроцитов, полученных у пациентов ФГБУ "НМИЦК им. ак. Е.И.Чазова" Минздрава России, и модельных реакционных сред, содержавших различные гемопотеины. Кроме того, ряд опытов был проведен с использованием липопотеинов низкой плотности и лецитиновых липосом.

Метод спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) являлся основным экспериментальным методом в работе. Регистрация спектров электронного парамагнитного резонанса производилась на спектрометре E-109 E (производитель - компания Varian, США), а также на спектрометре ESR 70-03 XD/2 (производитель - УП «КБСТ» БГУ, Республика Беларусь). В ряде экспериментов для получения сигналов ЭПР применялись методы спиновых меток и спиновых ловушек.

Были проведены эксперименты с измерением люминол- и люцигенин- зависимой хемилюминесценции. Спектрофотометрия использовалась как в качестве самостоятельного экспериментального метода, так и в качестве метода оценки концентраций некоторых реагентов.

Полученные в рамках данной диссертационной работы экспериментальные результаты были обработаны и проанализированы с применением программы Origin Pro 8 (OriginLab Corp., США). В этой же программе были выполнены и статистические расчеты. Проверка статистических гипотез осуществлялась с использованием t-критерия Стьюдента и непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Различия между экспериментальными данными рассматривались как достоверные при  $P \leq 0,05$ .

**Третья глава** включает результаты и их обсуждение.

**Раздел 3.1** посвящен изучению физико-химических характеристик мембран эритроцитов в норме и при отклонениях некоторых клинически значимых показателей крови, ассоциированных с окислительным стрессом. Последний может быть спровоцирован, в том числе, высвобождающимся при гемолизе внеклеточным гемоглобином. В исследованиях гемолиза, а также резистентности эритроцитов к подобным повреждениям перспективным методом является оценка микровязкости липидов мембран эритроцитов. В настоящей работе она оценена с помощью эмпирического параметра порядка в спектрах ЭПР суспензии

эритроцитов со спиновой меткой 5DS в образцах крови двух групп пациентов – с нормальным и повышенным коэффициентом анизотропии эритроцитов (RDW – Red blood cell Distribution Width). Параметр порядка S определялся по формуле:

$$S = (A'_{\parallel} - A'_{\perp}) / [A_{zz} - 1/2(A_{xx} + A_{yy})] \cdot a/a',$$

$$\text{где } A'_{\parallel} = 1/2\Delta H_{\parallel} \text{ и } A'_{\perp} \approx 1/2\Delta H_{\perp}, a' = 1/3(A'_{\parallel} + 2A'_{\perp}), a = 1/3(A_{zz} + A_{xx} + A_{yy}).$$

Данный параметр порядка по итогам анализа спектров ЭПР эритроцитарной массы у пациентов с нормальным коэффициентом анизотропии (RDW: 11,5 – 14,5%, N=27) эритроцитов составлял  $S \approx 0,762 \pm 0,004$ , а в группе образцов, имевших высокие (>16%, N=8) значения этого параметра были:  $S \approx 0,788 \pm 0,007$ , что свидетельствует о существенном различии по S в этих двух группах. Значимость результата определялась с помощью критерия Стьюдента ( $p < 0.05$ ).

Известно, что перекисное окисление мембран сопровождается увеличением их ригидности [1]. Обсуждается влияние окисления липидов мембран эритроцитов на их свойства в условиях некоторых патологий [2]. Эритроциты используются и как модель для изучения механизмов повреждения клеток при индуцированном фагоцитирующими клетками окислительном стрессе [3]. Ключевым окислителем, способным действовать на эритроциты в физиологических условиях является гипохлорит-анион ( $\text{ClO}^-$ ) или хлорноватистая кислота ( $\text{HClO}$ ).

Изменение микровязкости мембран эритроцитов под воздействием  $\text{HClO}/\text{ClO}^-$  было также оценено с помощью спиновой метки 5DS. При добавлении 0,1 мМ гипохлорита наблюдалось снижение амплитуды сигнала ЭПР и изменение формы сигнала. Значения параметра порядка для образцов с гипохлоритом и контрольных образцов (N=7 в обеих группах) составляли, соответственно:  $S \approx 0,757 \pm 0,005$ ;  $S \approx 0,772 \pm 0,004$ . Различия в этих значениях являлись статистически значимыми (критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ ).

В разделе 3.2 рассматривается действие ДНКЖ при гипохлорит-индуцированном гемолизе в условиях, имитирующих галогенирующий стресс.

В более раннем исследовании [3] было показано защитное действие глутатионовых ДНКЖ (GS-ДНКЖ) при вызываемом  $\text{HClO}$  лизисе эритроцитов из крови человека. В настоящей диссертационной работе было изучено влияние хлорноватистой кислоты на динитрозильные комплексы железа с лигандом глутатионом в суспензии эритроцитов человека, в которую также был добавлен синтетический источник монооксида азота ( $\text{DEA}/\text{NO}$ ), имитирующего образование ферментом NO-синтазой этого газообразного вторичного посредника. Такая среда является моделью галогенирующего стресса, который имеет место в процессе т.н. респираторного взрыва фагоцитирующих клеток в рамках процесса острого воспаления. Спектры ЭПР (рисунок 1) свидетельствуют о формировании

нитрозилированного по гемовому железу гемоглобина -  $\text{Hb(II)NO}$  (рисунок 1-II) в модельной среде с эритроцитами, в состав которой входили: донор NO ( $\text{DEA/NO}$ ), GS-ДНКЖ и  $\text{HClO/ClO}^-$ . Реакции в такой модельной среде характеризуется меньшей скоростью, нежели в подобной системе без  $\text{HClO}$  (рисунок 1-I). При этом, в образцах с гипохлоритом происходит практически 100% распад GS-ДНКЖ, и это соответствует сведениям из более ранних исследований [3]. Даже при наличии несвязанного оксида азота, производимого его синтетическим донором  $\text{DEA/NO}$ , не обнаружено регенерации ДНКЖ. В то же время,  $\text{Hb(II)NO}$  внутри эритроцитов, вероятно, менее доступен окислению хлорноватистой кислотой.

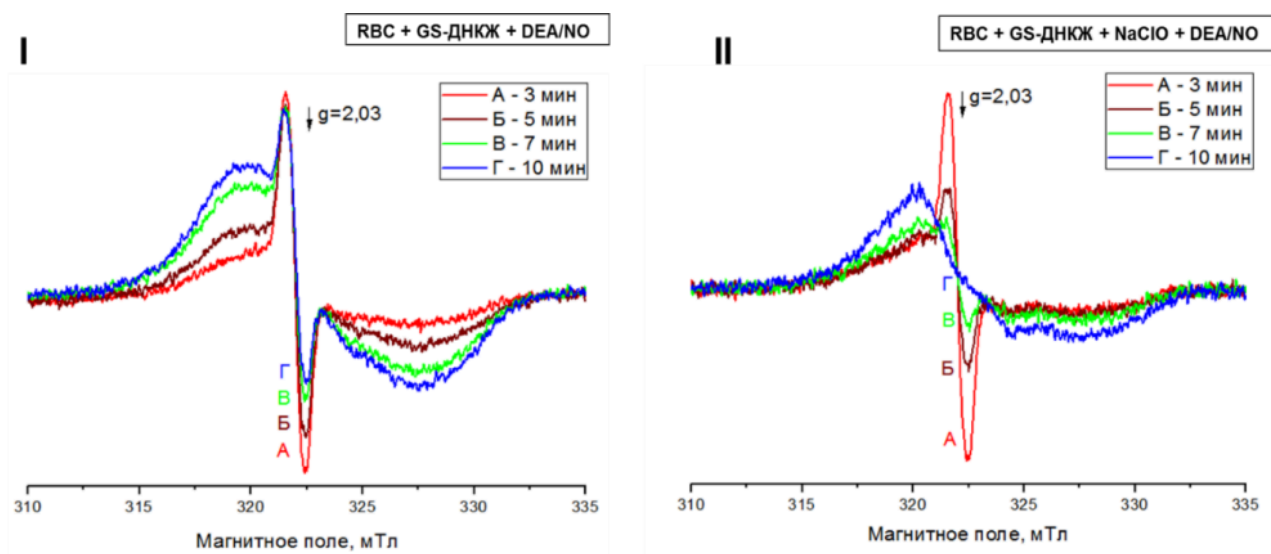


Рисунок 1. Взаимодействие комплексов NO с эритроцитами в интактном состоянии (I)  $[\text{GS-ДНКЖ}] = 0,8 \text{ мМ}$ ,  $[\text{DEA/NO}] = 10 \text{ мМ}$ ; и при гемолизе под действием  $\text{NaClO}$  (II),  $[\text{GS-ДНКЖ}] = 0,8 \text{ мМ}$ ,  $[\text{DEA/NO}] = 10 \text{ мМ}$ ,  $[\text{NaClO}] = 0,1 \text{ мМ}$ .

Также, в этом разделе диссертации описан дозозависимый распад  $\text{Hb-ДНКЖ}$ , связанных с бычьим гемоглобином ( $\text{Hb-ДНКЖ}$ ), под действием  $\text{HClO/ClO}^-$ . Поэтому, если происходит формирование подобных  $\text{Hb-ДНКЖ}$  в исследуемой здесь среде с эритроцитами, то данные производные NO не определяются методом спектроскопии ЭПР, так как должен иметь место их распад с высокой скоростью.

Таким образом, показано, что антиоксидантные свойства ДНКЖ, а также их защитное действие при индуцированном хлорноватистой кислотой гемолизе могут быть обусловлены непосредственным взаимодействием этих комплексов с  $\text{HOCl}$ , приводящим к разрушению ДНКЖ.

В разделе 3.3 диссертации представлены результаты экспериментов, демонстрирующих антиоксидантные свойства динитрозильных комплексов железа в различных реакционных средах, имитирующих нитрозативный стресс.

В частности, в одной из таких модельных систем, рассмотрена реакция гемоглобиновых динитрозильных комплексов железа (Hb-ДНКЖ) с пероксинитритом ( $\text{ONOO}^-$ ). Продemonстрирована количественная деструкция гемоглобиновых динитрозильных комплексов железа под действием  $\text{ONOO}^-$ , эквивалентная эффекту гипохлорита. Следует учитывать, что такая деструкция Hb-ДНКЖ способна приводить к выделению оксида азота и нитрозилированию гема гемоглобина. Это наблюдалось ранее при распаде Hb-ДНКЖ в результате реакции с супероксидом [4]. Однако, в опытах, поставленных в рамках этой диссертационной работы, нитрозилирование гема гемоглобина под действием  $\text{ONOO}^-$  не было обнаружено.

Процесс нитрозилирования гемовой группы гемоглобина (т.е. формирования Hb(II)NO) имел место в другой модельной реакционной системе, в состав которой входили: метгемоглобин (Hb(III)), дитионит ( $\text{Na}_2\text{O}_4\text{S}_2$ ) и S-нитрозоглутатион (GSNO) как донор NO. Этот процесс с участием GSNO значительно усиливается дитионитом, который является мощным восстановителем [5], что, вероятно, можно объяснить формированием несвязанного оксида азота вместе с тиолят-анионным состоянием глутатиона в результате восстановления S-нитрозоглутатиона в следующем химическом превращении:



Важно учитывать и восстановление Hb(III) до Hb(II) под действием  $\text{Na}_2\text{O}_4\text{S}_2$  в таких условиях. При включении  $\text{ONOO}^-$  как дополнительного реагента в эту модельную систему, был обнаружен сигнал ЭПР с  $g=2,03$ , который характерен для ДНКЖ, связанных с глутатионом или остатками цистеина гемоглобина. В этих условиях широкий сигнал Hb(II)NO постепенно снижается. По сведениям из ряда работ, HOCl или  $\text{ONOO}^-$  могут выделять свободный гем из лизированных эритроцитов [7,8]. Кроме того, известно, что пероксинитрит модифицирует и разрушает группы гема в NO-синтазе и гемоглобине [9,10]. По всей видимости, GSNO осуществляет формирование как нитрозилированного (по железу гема) гемоглобина, так и динитрозильных комплексов железа, причем в качестве донора Fe для ДНКЖ может выступать распад гема в результате влияния  $\text{ONOO}^-$ . Предположительно, подавлять химические превращения, аналогичные реакции Фентона, продуктами которых являются свободнорадикальные соединения, способна стабилизация Fe в динитрозильных комплексах железа.

Таким образом, Hb-ДНКЖ имеют свойство нейтрализовывать АФА, что согласуется с полученными ранее данными о реакциях супероксидного радикала и других прооксидантов со связанными с разными лигандами динитрозильными комплексами железа [4].

**Раздел 3.4** посвящен действию гемовых комплексов NO и ДНКЖ в системе с органическими гидропероксидами. Гидропероксид *трет*-бутила (*t*-BOOH) используется для моделирования реакций между гемсодержащими белками и гидропероксидами разного происхождения и химического строения [6]. Принятой на текущий момент точкой зрения является то, что образование органических свободных радикалов происходит вследствие взаимодействия *t*-BOOH с гемсодержащими белками [4,6,7]. В результате таких химических превращений происходит также образование оксоферрильного гема (порфирин-Fe(IV)=O) - мощного прооксидантного агента. Подобное взаимодействие групп гема с гидропероксидами липидов при оксидативном стрессе усиливает окислительную модификацию белков и перекисное окисление липидов (ПОЛ).

В рамках данной диссертационной работы по спектрам ЭПР были изучены реакции между Hb или его комплексами с оксидом азота (или, в других случаях - GS-ДНКЖ), с одной стороны, и гидропероксидом *трет*-бутила, с другой. Свободнорадикальные соединения были определены с применением спиновой ловушки DEPMPO на основе методики, показанной в ряде работ [6]. Рисунок 2 демонстрирует сигналы спиновых аддуктов DEPMPO с такими соединениями - промежуточными продуктами взаимодействия Hb(III) и *t*-BOOH. Учитывая литературные данные [6], сигнал с наибольшей амплитудой среди всех сигналов ЭПР в таких образцах относится к алкоксильному радикалу (в данном случае - к *трет*-бутоксильному радикалу, *t*-BO•). Обнаружен также метилпероксильный радикал (CH<sub>3</sub>OO•). При добавлении к исследуемой реакционной системе GS-ДНКЖ (рисунки 2 и 3, часть А) и особенно Hb-ДНКЖ (часть Б на рисунках 2 и 3), уменьшается концентрация таких соединений свободнорадикального характера, и этот эффект является достоверным (критерий Манна – Уитни,  $p < 0,05$ ).

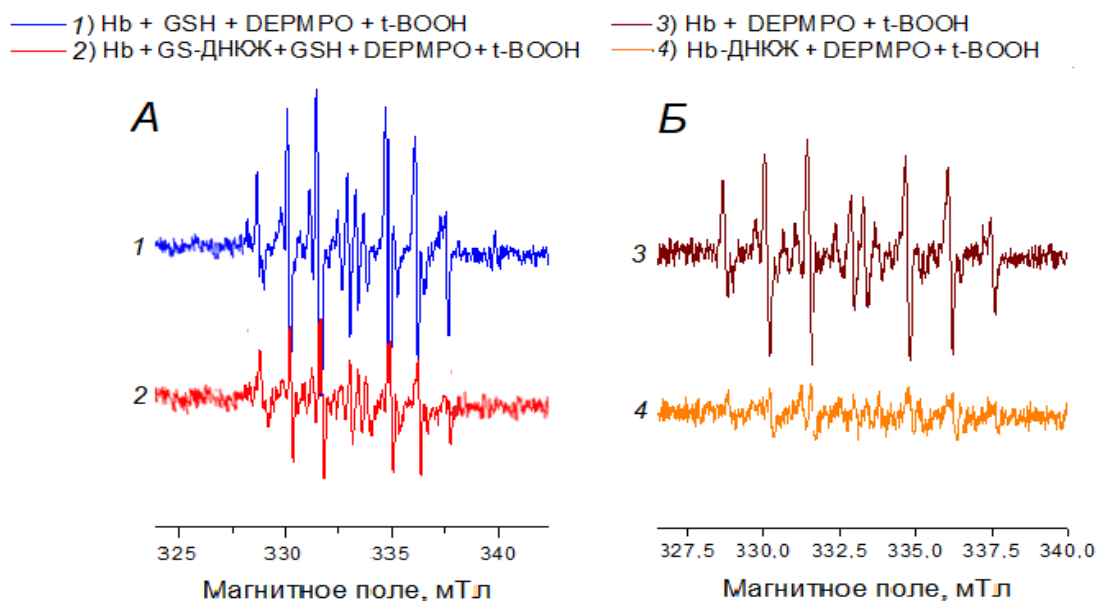


Рисунок 2. Сигналы ЭПР от спиновых аддуктов DEPMP с различными радикалами. Часть А. Образец 1): Hb в концентрации 0,25 мМ, 2 мМ глутатиона (GSH), DEPMP в концентрации 0,05 М, 4 мМ гидропероксида *трет*-бутила (*t*-BOOH), образец 2): аналогично 1) + 0,75 мМ GS-ДНКЖ. Часть Б. образец 3): Hb в концентрации 0,3 мМ, DEPMP - 0,07 М, *t*-BOOH в концентрации 1 мМ; образец 4): Hb-ДНКЖ в концентрации 0,3 мМ, DEPMP и *t*-BOOH как и в образце 3).

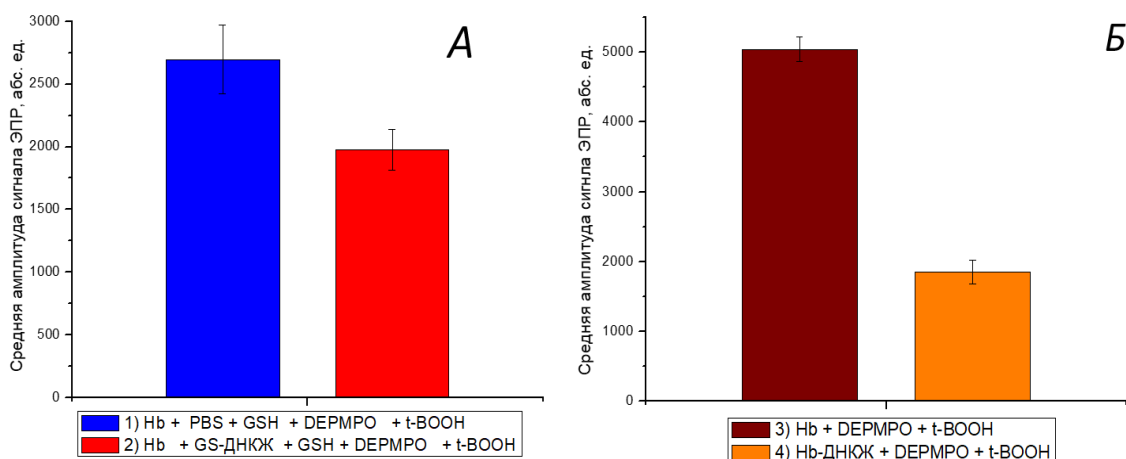
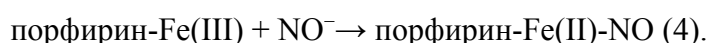


Рисунок 3. Гистограммы, демонстрирующие антиоксидантный эффект ДНКЖ по снижению амплитуды сигнала спиновых аддуктов DEPMP: GS-ДНКЖ в комбинации с GSH (А) и Hb-ДНКЖ (Б). Концентрации реагентов указаны в подписи к рисунку 2.

Вероятным объяснением такого действия ДНКЖ является взаимодействие описанных выше органических радикалов с NO-лигандами этих комплексов, а взаимодействие оксида азота и свободнорадикальных производных липидов прерывает цепные реакции ПОЛ с формированием нитролипидов. Такое антиоксидантное действие может быть вызвано

собственно глутатионом, так как он является компонентом GS-ДНКЖ и был включен в образцы с избытком, чтобы стабилизировать моноядерную парамагнитную форму GS-ДНКЖ. Тем не менее, эксперименты с Hb-ДНКЖ позволяют заключить, что в такой модели перекисного окисления антиоксидантные свойства динитрозильных комплексов железа, во-многом, реализованы входящими в их состав NO-лигандами

Образование нитрозилированного по Fe из гемовой группы гемоглобина (Hb(II)NO) из Hb(III), выполненное солью Анджели (оксогипонитрит натрия), которая является донором нитроксила / нитроксильного аниона ( $\text{HNO} / \text{NO}^-$ ), обладает даже более сильным действием против оксидативного стресса. Реакция такого восстановительного нитрозилирования показана ранее [8]:



При включении *t*-BOOH и спиновой ловушки DEPMPO в модельную среду после такой реакции, не был обнаружен сигнал спинового аддукта, по сравнению с контрольной средой с Hb(III) в отсутствие соли Анджели. Возможно, Hb(II)NO приводит *t*-BOOH к восстановлению до *трет*-бутилового спирта, что ранее обнаружено в случае нитрозилмиоглобина:



Другим важным гемопротеином, занимающим существенное место в процессах окислительного стресса и ПОЛ является цитохром *c*. В реакциях с органическими гидропероксидами, такими как *t*-BOOH, цитохром *c* катализирует образование радикалов [9], которые вызывают дальнейшие повреждения биомолекул и субклеточных структур. В рамках данной работы в экспериментах на модельных реакционных системах рассмотрено взаимодействие цитохрома *c* и *t*-BOOH. Реакционная система представляла собой 1 мМ раствор цитохрома *c* в фосфатном буфере (0,2 М, pH  $\approx$  7,5). Образование свободных радикалов - производных *t*-BOOH - также оценивалось при помощи DEPMPO. При добавлении к этим реакционным системам GS-ДНКЖ, они действовали как антиоксиданты, аналогично опытам с Hb.

**В разделе 3.5** диссертации рассмотрено антиоксидантное и антирадикальное действие GS-ДНКЖ в специальных образцах, моделирующих окислительный стресс и ПОЛ: липопротеинах низкой плотности (ЛПНП) с сульфатом меди в качестве инициатора ПОЛ, лецитиновых липосомах, а также в системе ксантин-ксантинооксидаза. В экспериментах с индуцированным ионами  $\text{Cu}^{2+}$  окислением ЛПНП, GS-ДНКЖ существенно подавляли накопление липогидропероксидов, что было обнаружено спектрофотометрически. Вероятно, взаимодействие оксида азота и свободнорадикальных производных липидов прерывает цепные реакции ПОЛ с формированием нитролипидов.

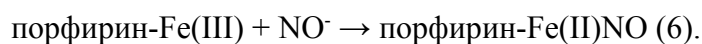


На лецитиновых липосомах при сравнении люминол-зависимой хемилюминесценции в контрольных образцах и образцах с GS-ДНКЖ было показано действие последних как антиоксидантов. При этом, добавление донора NO—PAPA/NONO, оказывало прооксидантное действие, которое может быть связано с образованием пероксинитрита в реакции NO и супероксидного радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ).

Вместе с тем, взаимодействие GS-ДНКЖ и радикала супероксида исследовалось в ферментативной системе ксантин-ксантинооксидаза с помощью люцигенин-зависимой хемилюминесценции и с помощью спектроскопии ЭПР спиновых аддуктов DEPMPO с  $O_2^{\cdot-}$ . В этой системе также наблюдалось антиоксидантное действие GS-ДНКЖ, выраженное как в снижении интенсивности хемилюминесценции, так и сигнала ЭПР спиновых аддуктов.

**Раздел 3.6** включает в себя эксперименты, связанные с восстановительным нитрозилированием оксоферрильных форм гемопротеинов.

Нитроксил (HNO) является продуктом одноэлектронного восстановления и протонирования NO. Доноры HNO и его анионной формы, нитроксил-аниона ( $NO^-$ ) имеют значимый терапевтический потенциал, так как HNO способен и выступать как классический антиоксидант, и подавлять неферментативное гликирование биологических молекул [10]. Важным физиологическим эффектом нитроксила / нитроксильного аниона является восстановительное нитрозилирование гемопротеинов (особенно гемоглобина) в мет-форме (порфирин – Fe(III)) [8]:



При этом, нет ясности в отношении реакций нитроксила с гемопротеинами в оксоферрильной форме:



Поэтому, в рамках диссертации рассмотрено подобное восстановительное нитрозилирование гемоглобина, а также миоглобина, в оксоферрильных ( $Hb(IV)=O$ ) и мет- ( $Hb(III)$ ) состояниях, и сопоставлены характеристики взаимодействия этих гемопротеинов с HNO. Эксперименты с этими реакциями проведены в имитационных средах на основе фосфатного буферного раствора с 0,4 ммоль/л Hb и 1,6 ммоль/л Mb (Sigma Aldrich, США). Оксогипонитрит натрия, содержание которого составляло с 2 по 10 ммоль/л, был применен как искусственный источник HNO. Оксоферрильные формы гема были образованы с помощью  $H_2O_2$  (концентрация - 18 ммоль/л), включенного в образцы с гемопротеинами в мет-формах. Сигнал ЭПР (рисунок 4-I - спектр А), характерный для  $Hb\text{-Fe(II)NO}$ , обнаружен при включении соли Анджели к образцам с гемоглобином в оксоферрильной форме, что подтверждает восстановительное нитрозилирование  $Hb(IV)=O$  в реакции 7. При этом, в таких образцах зарегистрирован также сигнал с g-фактором 2,005, как и при добавлении

лишь  $\text{H}_2\text{O}_2$  к  $\text{Hb(III)}$  (рисунок 4-I – спектр В). Известно, что подобные сигналы ЭПР связаны со стабильными радикалами аминокислот белковой цепи [11]. Спектр  $\text{Hb(II)NO}$  в образце с нитрозилированием  $\text{Hb(III)}$  солью Анджели продемонстрирован для сравнения (рисунок 4-I – спектр Б).

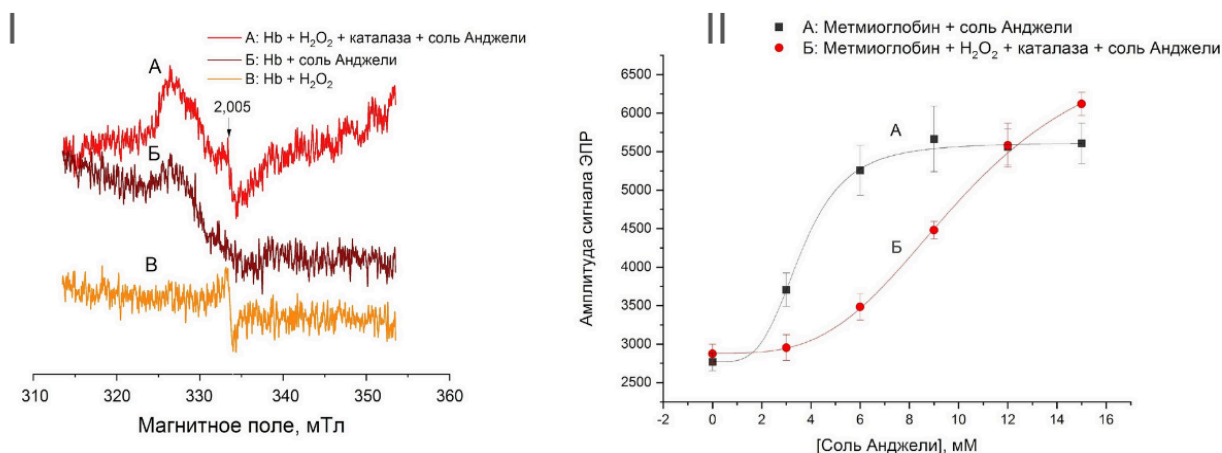


Рисунок 4. I - Спектры ЭПР нитрозилированного гемоглобина: (А) при последовательном добавлении  $\text{H}_2\text{O}_2$  и соли Анджели к раствору  $\text{Hb(III)}$  в фосфатном буфере с  $\text{pH}=7,4$ ; спектр  $\text{Hb(II)NO}$ , полученный взаимодействием соли Анджели с  $\text{Hb(III)}$  без добавления  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Б), а также спектр ЭПР свободнорадикального сигнала с  $g=2,005$  (В) в растворе  $\text{Hb(III)}$  с  $\text{H}_2\text{O}_2$ . II - Зависимость максимальной амплитуды сигнала ЭПР нитрозилированного миоглобина ( $\text{Mb(II)NO}$ ) от концентрации оксогипонитрита натрия при восстановительном нитрозилировании  $\text{Mb(III)}$  – линия А и  $\text{Mb(IV)=O}$  – линия Б.

При введении в образцы оксогипонитрита натрия до  $\text{H}_2\text{O}_2$  и каталазы не наблюдалось ни сигнала  $\text{Hb(II)NO}$ , ни сигнала с  $g \approx 2,005$ , вероятно, вследствие взаимодействия нитрозилированной и оксоферрильной форм гемов. Добавление  $\text{H}_2\text{O}_2$  к метмиоглобину ( $\text{Mb(III)}$ ) приводило к появлению сигнала с  $g \approx 2,005$ , который, как и у гемоглобина, относится к радикалам аминокислот полипептидной цепи самого гемопroteина, в соответствии с результатами работы [12]. Но при добавлении каталазы и соли Анджели к данной системе, в отличие от показанного выше эксперимента с гемоглобином, сигнал с  $g \approx 2,005$  отсутствовал. Предположительно,  $\text{HNO}$  восстанавливает эти аминокислотные радикалы, вследствие их большей доступности в молекуле миоглобина, нежели в гемоглобине с его сложной структурой. Кинетические кривые восстановительного нитрозилирования мет- ( $\text{Mb(III)}$ ) и оксоферрильной ( $\text{Mb(IV)=O}$ ) форм миоглобина показали более высокие концентрации и более быстрое формирование  $\text{Mb(II)NO}$  при нитрозилировании  $\text{Mb(IV)}$ . Нитрозилирование с помощью соли Анджели  $\text{Mb(III)}$  и  $\text{Mb(IV)=O}$

имело отличия в концентрационных зависимостях: у Mb(III) нитрозилирование происходило при меньшей концентрации соли Анджели, но сигнал Mb(II)NO достигал меньшего максимального значения, чем для Mb(IV)=O (рисунок 4-II).

Полученные результаты позволяют говорить об антиоксидантном действии соли Анджели в системах с мет- и оксоферрильными формами гемопротеинов. Кроме того, антиоксидантный эффект восстановительного нитрозилирования гемовых групп может быть связан с механизмом, описанным в разделе 3.4.

**Раздел 3.7** содержит обсуждение и обобщение полученных в работе результатов, а также сравнение их с литературными данными. В частности, представлена таблица показанных в данной работе и описанных в литературе эффектов взаимодействия нитрозильных комплексов гемового и негемового железа с различными прооксидантными соединениями.

В **разделе 3.8** обсуждаются возможные механизмы антиоксидантного действия нитрозильных комплексов гемового и негемового железа.

Результаты данной диссертационной работы обобщают и подтверждают тот факт, что глутатионовые динитрозильные комплексы железа подавляют ПОЛ и нейтрализуют супероксид. Такое действие ДНКЖ как антиоксидантов может быть вызвано синергетическим эффектом их тиольных и NO-лигандов. В реакциях ДНКЖ с различными радикалами образование нестабильных промежуточных соединений, распад которых не сопровождается продукцией сильных прооксидантов, представляется вероятным объяснением. Продуктом аналогичных реакций свободного оксида азота является ONOO<sup>-</sup> или его органический аналоги, разрушение которых как раз приводит к формированию свободнорадикальных соединений. В модельных средах, примененных в рамках диссертационного исследования, антиоксидантные эффекты GSH и фосфатных ДНКЖ по сравнению GS-ДНКЖ были слабее, а свободный оксид азота имел прооксидантную активность. ДНКЖ с лигандом глутатионом и нитрозилированный гем при оксидативном стрессе могут взаимодействовать с супероксидом и свободными радикалами липидов по механизму, описанному на рисунке 5.

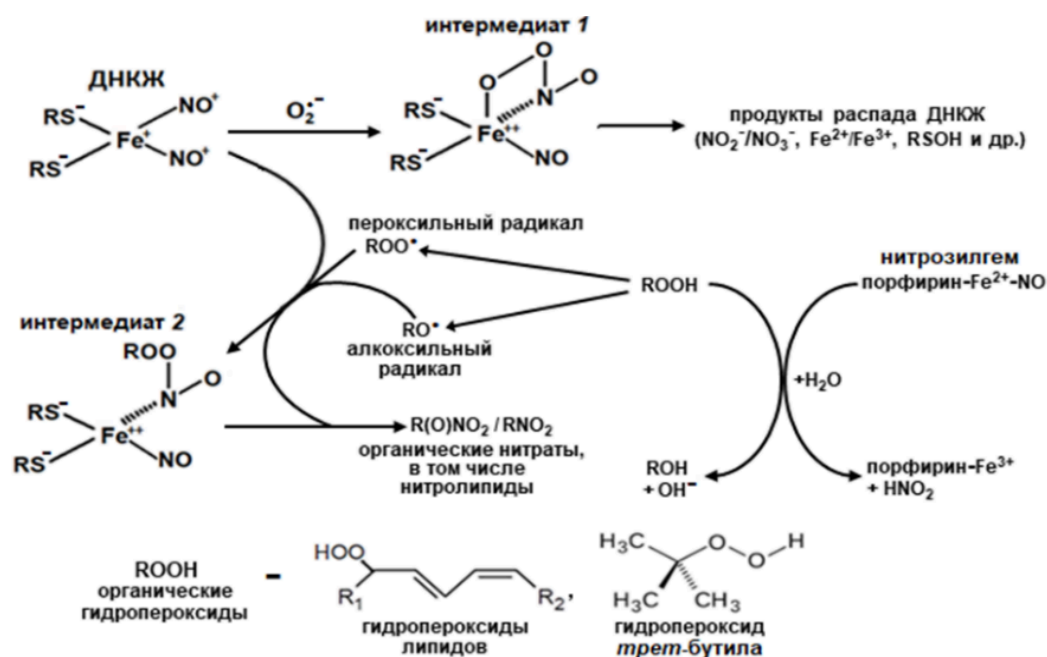


Рисунок 5. Предполагаемый молекулярный механизм антиоксидантного действия нитрозильных комплексов негемового и гемового железа. GS-ДНКЖ взаимодействуют с супероксидом, а также пероксильными и алкоксильными радикалами. В реакциях между супероксидом и NO-лигандами ДНКЖ образуется комплекс, содержащий связанный с железом  $\text{ONOO}^-$  (интермедиат 1). В сходной реакции с пероксильным радикалом, по-видимому, формируется аналог  $\text{ONOO}^-$  органического характера (интермедиат 2). Эти интермедиаты далее разрушаются без образования свободнорадикальных продуктов. При распаде интермедиата 2 могут возникать органические нитраты, последние, вероятно, формируются и в реакции ДНКЖ с алкоксильными радикалами. Органические свободные радикалы являются продуктами распада соответствующих гидропероксидов, которые, в свою очередь, эффективно утилизируются в реакции с нитрозилированным гемом.

### Заключение

В диссертационной работе, в первую очередь, существенно дополнены и расширены данные об антиоксидантном и антирадикальном действии комплексов монооксида азота с гемовым и негемовым железом. Кроме того, проведенные исследования позволяют подтвердить ранее высказанные гипотезы о механизмах антиоксидантного действия NO-содержащих комплексов железа и обосновать возможное использование изучаемых комплексов как перспективных фармакологических средств с учетом возможных ограничений и побочных эффектов.

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

1. С помощью спиновых меток показано, что в образцах крови пациентов из групп с нормальным и повышенным коэффициентом анизотропии эритроцитов достоверно различается микровязкость мембран эритроцитов (на 3%,  $p < 0,05$ ,  $n=57$ ).
2. Показано образование в эритроцитах нитрозильных гемовых групп гемоглобина и связанных с данными белком динитрозильных комплексов железа, причём концентрация последних снижается в условиях, моделирующих окислительный стресс при острой воспалительной реакции.
3. По сигналам ЭПР парамагнитных глутатион-содержащих и связанных с гемоглобином ДНКЖ показан механизм их антиоксидантного действия в отношении различных прооксидантных соединений, таких как пероксинитрит.
4. В системах, моделирующих окислительный стресс, определено, что ДНКЖ, связанные с гемоглобином или глутатионом, снижают уровень спиновых аддуктов DEPMPO с органическими свободными радикалами на 60 и 26 %, соответственно.
5. Установлено, что глутатионовые ДНКЖ ингибируют свободнорадикальное окисление липидов. В концентрации 20 мкМ ДНКЖ снижают начальную скорость накопления липопероксидов в ходе  $\text{Cu}^{2+}$ -индуцированного свободнорадикального окисления ЛПНП в 10,3 раза и увеличивают период индукции этого процесса в 3,5 раза. При соокислении лецитиновых липосом и глюкозы ДНКЖ в концентрации 75 мкМ снижают светосумму (выход) люминол-зависимой хемилюминесценции в 8,1 раза и увеличивают период индукции хемилюминесценции в 6,3 раза.
6. Продemonстрировано, что нитроксильный анион может действовать как антиоксидант благодаря восстановительному нитрозилированию гемовых групп миоглобина и гемоглобина, в том числе, восстановлению оксоферрильных форм этих гемопротеинов и предотвращению образования алкильных, алкоксильных и алкилпероксильных радикалов при распаде гидропероксида *трет*-бутила.

## ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI

[A1] Шумаев К.Б., Грачев Д.И., Космачевская О.В., Топунов А.Ф., Рууге Э.К. Восстановительное нитрозилирование гемоглобина и миоглобина и его антиоксидантное действие // Биофизика. – 2024. – Т. 69. – №. 2. – С. 230-236. DOI: [10.31857/S0006302924020027](https://doi.org/10.31857/S0006302924020027) Двухлетний импакт-фактор РИНЦ: 1,166. Объем: 0,75 п.л. / Вклад соискателя: 0,35 п.л.

Переводная версия статьи:

Shumaev K.B., **Grachev D.I.**, Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F., Ruuge E. K. Reductive Nitrosylation of Hemoglobin and Myoglobin and its Antioxidant Effect // Biophysics. – 2024. – Т. 69. – №. 2. – С. 195-200. DOI: [10.1134/S0006350924700210](https://doi.org/10.1134/S0006350924700210) SJR=0.19 (Scopus). Объем: 0,7 п.л. / Вклад соискателя: 0,3 п.л.

[A2] **Грачев Д.И.**, Шумаев К.Б., Космачевская О.В., Топунов А.Ф., Рууге Э.К. Нитрозильные комплексы гемоглобина в различных модельных системах // Биофизика. – 2021. – Т. 66. – №. 6. – С. 1056-1064. DOI: [10.31857/S0006302921060028](https://doi.org/10.31857/S0006302921060028) Двухлетний импакт-фактор РИНЦ: 1,166. Объем: 0,9 п.л. / Вклад соискателя: 0,6 п.л.

Переводная версия статьи:

**Grachev D.I.**, Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F., Ruuge E.K. Nitrosyl complexes of hemoglobin in various model systems // Biophysics. – 2021. – Т. 66. – №. 6. – С. 897-904. DOI: [10.1134/S000635092106004X](https://doi.org/10.1134/S000635092106004X) SJR=0.19 (Scopus). Объем: 0,8 п.л. / Вклад соискателя: 0,5 п.л.

[A3] Шумаев К.Б., Космачевская О.В., **Грачев Д.И.**, Тимошин А.А., Топунов А.Ф., Ланкин В.З., Рууге Э.К. Возможный механизм антиоксидантного действия динитрозильных комплексов железа // Биомедицинская химия. – 2021. – Т. 67. – №. 2. – С. 162-168. DOI: [10.18097/PBMC20216702162](https://doi.org/10.18097/PBMC20216702162) SJR=0.22 (Scopus). Двухлетний импакт-фактор РИНЦ: 0,942. Объем: 0,8 п.л. / Вклад соискателя: 0,2 п.л.

Переводная версия статьи:

Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., **Grachev D.I.**, Timoshin A.A., Topunov A.F., Lankin V.Z., Ruuge E.K. A possible mechanism of the antioxidant action of dinitrosyl iron complexes // Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry. – 2021. – Т. 15. – С.313-319. DOI: [10.1134/S1990750821040090](https://doi.org/10.1134/S1990750821040090) SJR= 0.2 (Scopus), JIF=0.6 (WoS). Объем: 0,7 п.л. / Вклад соискателя: 0,15 п.л.

[A4] **Грачев Д.И.**, Дудылина А.Л., Титов В.Н., Рууге Э.К. Физико-химические особенности сывороточного альбумина и мембран эритроцитов в норме и при проявлениях сердечной недостаточности // Биофизика. – 2019. – Т. 64. – №. 5. – С. 898-905. DOI: [10.1134/S0006302919050090](https://doi.org/10.1134/S0006302919050090) Двухлетний импакт-фактор РИНЦ: 1,166. Объем: 0,8 п.л. / Вклад соискателя: 0,4 п.л.

Переводная версия статьи:

**Grachev D.I.**, Dudylyina A.L., Titov V.N., Ruuge E.K. The Physicochemical Characteristics of Serum Albumin and Erythrocyte Cell Membranes under Normal and Heart Failure Symptom Conditions // Biophysics. – 2019. – Т. 64. – С.721-728. DOI: [10.1134/S0006350919050051](https://doi.org/10.1134/S0006350919050051) SJR=0.19 (Scopus). Объем: 0,7 п.л. / Вклад соискателя: 0,35 п.л.

### Иные статьи в рецензируемых изданиях:

[A5] Грачев Д.И., Медведева В.А., Шумаев К.Б., Ланкин В.З., Рууге Э.К. Динитрозильные комплексы железа как ингибиторы перекисного окисления липидов // Актуальные вопросы биологической физики и химии. – 2022. – Т. 7. -№4. - С. 600–603. DOI: [10.29039/rusjbpc.2022.0567](https://doi.org/10.29039/rusjbpc.2022.0567)

[A6] Шумаев К.Б., Космачевская О.В., Топунов А.Ф., Грачев Д.И., Насыбуллина Э.И., Пугаченко И.С., Рууге Э.К. Новые варианты динитрозильных комплексов железа: антиоксидантное и антирадикальное действие // Актуальные вопросы биологической физики и химии. – 2022. – Т. 7. – №. 4. – С. 624-627. DOI: [10.29039/rusjbpc.2022.0572](https://doi.org/10.29039/rusjbpc.2022.0572)

[A7] Грачев Д.И., Шумаев К.Б., Медведева В.А., Фефлер А.С., Космачевская О.В., Рууге Э.К. Взаимодействие различных нитрозильных комплексов гемоглобина с активными формами кислорода и азота // Актуальные вопросы биологической физики и химии. – 2021. – Т. 6. – №. 3. – С. 477-481.

### СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dobretsov G.E., Borschevskaya T.A., Petrov V.A., Vladimirov Y.A. The increase of phospholipid bilayer rigidity after lipid peroxidation // FEBS Lett. - 1977. - Т. 84., № 1.- С. 125–128.
2. Revin V.V, Gromova N.V, Revina E.S., Martynova M.I., Seikina A.I., Revina N.V, Imarova O.G., Solomadin I.N., Tychkov A.Y., Zhelev N. Role of Membrane Lipids in the Regulation of Erythrocytic Oxygen-Transport Function in Cardiovascular Diseases // Biomed Res. Int. - 2016. - Т. 2016. - С. 3429604.
3. Shumaev K.B., Gorudko I.V., Kosmachevskaya O.V., Grigorieva D.V., Panasenko O.M., Vanin A.F., Topunov A.F., Terekhova M.S., Sokolov A. V, Cherenkevich S.N., Ruuge E.K. Protective Effect of Dinitrosyl Iron Complexes with Glutathione in Red Blood Cell Lysis Induced by Hypochlorous Acid // Oxid. Med. Cell. Longev. - 2019. Т. 2019. - С. 2798154.
4. Shumaev K.B., Kosmachevskaya O. V, Timoshin A.A., Vanin A.F., Topunov A.F. Chapter Twenty-Five - Dinitrosyl Iron Complexes Bind with Hemoglobin as Markers of Oxidative Stress // Globins and Other Nitric Oxide-Reactive Proteins, Part A. — 2008. - Т. 436. - С. 445–461.
5. Kumar M.R., Clover T., Olaitan A.D., Becker C., Solouki T., Farmer P.J. The reaction between GSNO and H<sub>2</sub>S: On the generation of NO, HNO and N<sub>2</sub>O // Nitric Oxide. - 2018. - Т. 77. - С. 96–105.
6. Karoui H., Chalier F., Finet J.-P., Tordo P. DEPMPO: an efficient tool for the coupled

ESR-spin trapping of alkylperoxyl radicals in water // *Org. Biomol. Chem.* - 2011. Т. 9, № 7. - С. 2473–2480.

7. Шумаев К.Б., Петрова Н.Э., Заббарова И.В., Ванин А.Ф., Топунов А.Ф., Ланкин В.З., Рууге Э.К. Взаимодействие оксоферрилмиоглобина и динитрозильных комплексов железа // *Биохимия.* — 2004. - Т. 69, № 5. - С. 699–705.
8. Miranda K.M., Paolucci N., Katori T., Thomas D.D., Ford E., Bartberger M.D., Espey M.G., Kass D.A., Feelisch M., Fukuto J.M., Wink D.A. A biochemical rationale for the discrete behavior of nitroxyl and nitric oxide in the cardiovascular system // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 2003. - Т. 100, № 16. - С. 9196–9201.
9. Nantes I.L., Faljoni-Alário A., Nascimento O.R., Bandy B., Gatti R., Bechara E.J.H. Modifications in heme iron of free and vesicle bound cytochrome c by tert-butyl hydroperoxide: a magnetic circular dichroism and electron paramagnetic resonance investigation // *Free Radic. Biol. Med.* - 2000. - Т. 28, № 5. С. 786–796.
10. Kosmachevskaya O.V, Nasybullina E.I., Pugachenko I.S., Novikova N.N., Topunov A.F. Antiglycation and Antioxidant Effect of Nitroxyl towards Hemoglobin // *Antioxidants.* — 2022. - Т. 11, № 10. - С. 2007.
11. Ramirez D.C., Chen Y.-R., Mason R.P. Immunochemical detection of hemoglobin-derived radicals formed by reaction with hydrogen peroxide: involvement of a protein-tyrosyl radical // *Free Radic. Biol. Med.* - 2003. - Т. 34, № 7. - С. 830–839.
12. Østdal H., Skibsted L.H., Andersen H.J. Formation of Long-Lived Protein Radicals in the Reaction Between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Activated Metmyoglobin and Other Proteins // *Free Radic. Biol. Med.* — 1997. - Т. 23, № 5. - С. 754–761.