

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Грачев Дмитрий Иванович

**Взаимодействие нитрозильных комплексов гемового и негемового железа с
активными формами кислорода и азота**

Специальность 1.5.2. Биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Научные руководители:

доктор физико-математических наук,

профессор Э.К. Рууге

доктор биологических наук

К.Б. Шумаев

Москва - 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	13
1.1 Оксид азота (NO) и его физиологическая роль	13
1.2 Окислительный стресс и свободные радикалы	19
1.2.1 Активные формы кислорода	21
1.2.2 Активные формы азота / нитрозативный стресс	23
1.2.3 Активные формы галогенов и галогенирующий стресс	26
1.3 Гемопротеины и их физиологическая роль	27
1.4 Нитрозильные комплексы гемопротеинов	32
1.5 Динитрозильные комплексы железа	37
1.6 Антиоксидантное действие NO и его физиологических производных	45
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	52
2.1 Реактивы	52
2.2 Получение ДНКЖ	53
2.3 Подготовка суспензии эритроцитов	54
2.4 Модельная реакционная среда с бычьим гемоглобином	55
2.5 Выделение липопротеинов низкой плотности и получение липосом	55
2.6. Исследование люминол- и люцигенин-зависимой хемилюминесценции	56
2.7 Спектроскопия электронного парамагнитного резонанса	57
2.7.1 Изучение мембран эритроцитов с использованием спиновых меток	58
2.7.2 Изучение органических свободных радикалов с помощью спиновой ловушки	
DEPMPO	61
2.8 Анализ и математическая обработка экспериментальных данных	62
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	63
3.1 Физико-химические характеристики мембран эритроцитов	63
3.2. Действие ДНКЖ при гипохлорит-индуцированном гемолизе	65
3.3 Взаимодействие нитрозильных комплексов гемоглобина (HbNO и Hb-ДНКЖ) с АФК, АФА и АФГ	69

<i>3.4 Взаимодействие ДНКЖ и HbNO с органическими радикалами</i>	76
<i>3.5 Антиоксидантное действие ДНКЖ в экспериментах с липосомами и липопротеинами низкой плотности</i>	84
<i>3.6 Восстановительное нитрозилирование феррильной формы гемоглобина и миоглобина и его антиоксидантное действие</i>	96
<i>3.7 Взаимодействие нитрозильных комплексов железа с различными прооксидантами</i>	104
<i>3.8 Предполагаемые механизмы антиоксидантного действия ДНКЖ</i>	109
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	112
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ	113
ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	114
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	116

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФА – активные формы азота

АФК – активные формы кислорода

ГМФ - гуанозинмонофосфат

ГТФ - гуанозинтрифосфат

ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа

ЛПНП – липопротеины низкой плотности

МПО - миелопероксидаза

ПОЛ – перекисное окисление липидов

цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат

ЦПЭ – цепь переноса электронов митохондрий

ЭПР – электронный парамагнитный резонанс

ЭФРС – эндотелиальный фактор релаксации сосудов

Нб – гемоглобин

НbNO – нитрозилированный по гемовому железу гемоглобин

Мб – миоглобин

МbNO - нитрозилированный по гемовому железу миоглобин

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

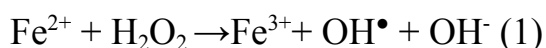
Процессы с участием различных свободных радикалов представляют интерес для исследователей из самых разных направлений науки: от фундаментальной биохимии и биофизики до различных областей клинической медицины. С одной стороны, свободные радикалы играют ключевую роль в важнейших физиологических процессах, 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 системах, 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 *c*, 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 гемопротеины (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 гемопротеины, 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 гемопротеинов 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 хемиллюминесценции. 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 Пущинская 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.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Оксид азота (NO) и его физиологическая роль

Оксид азота (NO) является важнейшей для различных физиологических процессов сигнальной молекулой – вторичным мессенджером [1], относящимся к группе так называемых газотрансмиттеров, наряду с монооксидом углерода (CO, «угарный газ») [2], сероводородом (H₂S) [3], а также, по некоторым данным, закисью азота (N₂O) [4], сернистым газом (SO₂) [5]. Важнейшие функции в организме может выполнять простая молекула двухатомного газа.

Стоит подробно остановиться на физиологических функциях NO. Как известно, функционирование клеток живых организмов регулируется при участии специфических рецепторов, локализованных на наружной поверхности клеточной (или плазматической) мембраны. Эти рецепторы воспринимают сигналы от гормонов, цитокинов и других молекул, которые реализуют физиологическую сигнализацию. Трансдукция сигнала внутрь клетки происходит с участием G-белков — внутримембранных сигнальных молекул, которые активируют каскады биохимических реакций. Активация внутриклеточных ферментов, таких как аденилатциклаза, приводит к синтезу вторичных посредников (вторичных мессенджеров), регулирующих ключевые метаболические процессы. Одним из таких мессенджеров является циклический аденозинмонофосфат (цАМФ), который синтезируется из аденозинтрифосфата (АТФ) под действием

аденилатциклазы. Таким же образом, циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ) образуется из гуанозинтрифосфата (ГТФ) с участием фермента гуанилатциклазы. цГМФ регулирует множество внутриклеточных процессов, включая расслабление гладкой мускулатуры сосудов за счет снижения концентрации ионов кальция в цитоплазме миоцитов. Гуанилатциклаза существует в двух формах: мембраносвязанной и водорастворимой, которая характеризуется достаточно высокой активностью [6].

Растворимая гуанилатциклаза может активироваться без участия клеточных рецепторов под воздействием растворимых в воде соединений разного характера. К ним относятся органические нитраты, такие как нитроглицерин (применяемый в медицине еще с конца XIX века), которые широко известны своими вазодилатирующими (т.е. расширяющими сосуды) свойствами. Ещё в конце 1970-х Ферид Мурад и его коллеги выдвинули гипотезу, что фармакологическое действие таких органических нитратов связано с возможностью этих молекул генерировать монооксид азота, осуществляющий стимуляцию гуанилатциклазы [6]. Это было подтверждено в экспериментах с обработкой гуанилатциклазы газообразным оксидом азота. Возникло представление о нормальном биологическом действии NO, который до этого рассматривался исключительно в качестве токсичного для организма животных и человека химического соединения. Таким образом, Мурад и его коллеги в своих работах [6,7] прояснили механизм действия органических нитратов в системе органов кровообращения, и в том числе наиболее известного среди них – нитроглицерина: их эффект вызван именно выделением монооксида азота. Фермент гуанилатциклаза, стимулируемая оксидом азота, способствует выработке цГМФ, который инициирует сигнальные пути, вызывающие высвобождение ионов кальция из гладкомышечных сосудистых клеток, что в свою очередь, приводит к релаксации гладкой мускулатуры и расширению сосуда. Кроме того, тогда же была высказана подтвердившаяся впоследствии гипотеза об образовании в организме оксида азота не только из внешних (экзогенных), но и из внутренних (эндогенных) источников.

На тот момент уже было установлено, что накопление нитратов и нитритов в среде инкубации активированных макрофагов коррелирует с их цитотоксическим эффектом на клетки-мишени. В настоящее время известно, что эти соединения образуются в результате окисления оксида азота (NO), который синтезируется активированными макрофагами и является ключевым фактором их цитотоксического действия [8,9]. Открытие Робертом Ферчготтом [10] эндотелиального фактора релаксации сосудов (ЭФРС, англ. *endothelium-derived relaxing factor*, EDRF) в изолированных кровеносных сосудах стало отправной точкой для интенсивных исследований, подтвердивших биологическую роль NO. Было показано, что ЭФРС синтезируется клетками эндотелия в качестве ответа на воздействие ацетилхолина, брадикинина и других соединений с физиологической активностью, вызывая расслабление гладкой мускулатуры сосудов. При этом установлено, что ЭФРС — нестабильное соединение: в экспериментах с сосудом-донором и сосудом-акцептором его вазодилаторный эффект сохранялся лишь около 6 секунд — время, необходимое для перемещения ЭФРС от донора к акцептору, после чего эффект совсем исчезал. Столь короткое время жизни ЭФРС во многом связано с его взаимодействием с АФК, образующимися в клетках и тканях. К отождествлению ЭФРС с NO привели данные группы Мурада о вазодилатирующем действии оксида азота [7], и предыдущие исследования самого Ферчготта, который исследовал расслабляющее воздействие на гладкую мускулатуру кровеносных сосудов нитрита натрия (NaNO_2). Это воздействие было существенно сильнее при фотолизе нитрита, результатом которого была продукция монооксида азота. Затем Р. Ферчготтом и его коллегами было продемонстрировано, что сосудорасширяющее действие этого агента сходно с действием NO [10]. Исходя из этого, возникло предположение, что ЭФРС либо и есть собственно монооксид азота, либо монооксид азота является составляющей частью ЭФРС. То же самое одновременно с Ферчготтом предположил Луис Игнарро, который активно изучал ЭФРС и выдвинул термин «оксид азота эндотелиального происхождения» (*endothelium-derived nitric oxide*, EDNO) [11].

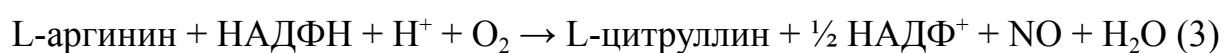
Монкада и др. проверили верифицировали данную гипотезу методом регистрации хемилюминесценции, исходящей от полученного в результате реакции монооксида азота и озона соединения [12]. Релаксация тестируемых ими тканей, индуцированная ЭФРС, была неотличима от релаксации, индуцированной NO. Оба вещества были одинаково нестабильны. Брадикинин вызывал зависимое от концентрации высвобождение NO из клеток в количествах, достаточных для обеспечения биологической активности ЭФРС. Эффекты релаксации, вызванные ЭФРС и NO, в одинаковой степени ингибировались гемоглобином и усиливались супероксиддисмутазой. Это означало, что NO, высвобождаемый из эндотелиальных клеток, неотличим от ЭФРС с точки зрения биологической активности, стабильности и чувствительности к ингибитору и катализатору, т.е. ЭФРС и NO идентичны [12]. Гарштейт и его коллеги [13] использовали экспериментальную систему, чтобы показать, что активация клеток мозжечка производит некое лабильное диффундирующее вещество, которое расслабляет гладкие мышцы сосудов, и продемонстрировали, что это вещество представляет собой ЭФРС (NO). Это было свидетельством того, что NO является не только мощным сосудорасширяющим и иммунным цитотоксическим средством, но и межклеточным нейротрансмиттером [11,14].

Таким образом, монооксид азота, будучи простой молекулой из 2-х атомов, имеет исключительное значение в регуляции различных сигнальных и метаболических путей. Помимо того, что монооксид азота выполняет в организме важную функцию, регулируя кровяное давление, он принимает участие в иммунном ответе на инфекционные агенты, а также монооксид азота имеет весьма важное значение в нервной деятельности в качестве нейромедиатора, в том числе в реализации механизмов обучения и памяти [14]. При этом, важно отметить, что чрезмерная генерация монооксида азота способна приводить к патологиям центральной нервной системы (ЦНС), включая судорожные расстройства.

В зависимости от концентрации NO в физиологических условиях осуществляются цГМФ-зависимые или цГМФ-независимые сигнальные пути: NO стимулирует продукцию цГМФ внутри клетки, переводя в активное состояние

фермент гуанилатциклазу в его растворимой форме, при этом цГМФ вместе с протеинкиназой G1 регулируют рост и функционирование мышечных клеток [11]. S-нитрозилирование остатков цистеина (Cys) в аминокислотных цепях белков является еще одним важным физиологическим механизмом действия монооксида азота, который позволяет регулировать работу различных белков. Важно отметить, ингибирование процесса S-нитрозилирования может происходить в результате увеличения концентрации супероксидного радикала. Так как двухатомная молекула монооксида азота является липофильным газообразным соединением и легко проникает через плазмалемму, она может осуществлять межклеточную сигнализацию [11].

NO в организме производится из аргинина в присутствии НАДФН и O₂ синтазами оксида азота (NO-синтазами, NO) в следующей реакции [15]:



Фермент NO-синтаза представляет собой флавогемопrotein, который впервые был выделен из мозжечка крыс [16]. Выделяют несколько основных типов NO-синтаз: нейрональная NO-синтаза (nNOS или NOS1), индуцируемая (индуцибельная) NO-синтаза (iNOS или NOS2), эндотелиальная NO-синтаза (eNOS, NOS3 или cNOS), также существует бактериальная NO-синтаза (bNOS). Следует упомянуть и митохондриальную NO-синтазу (mtNOS), открытую несколько позднее [17]. Функция нейрональной NO-синтазы - трансдукция сигнала в клетках нервной системы [18]. Индуцируемая NO-синтаза в иммунной системе участвует в защите от патологических агентов [19]. Эндотелиальная NO-синтаза, в соответствии со своим названием, располагается в эндотелии сосудов, основная ее функция расширение сосудов. В клетках сердечной мышцы (кардиомиоцитах) происходит экспрессия эндотелиальных и нейрональных синтаз оксида азота. Провоспалительными медиаторами может быть обусловлена экспрессия индуцибельных синтаз оксида азота в сердечной мышце, которой не наблюдается в нормальных условиях [20,21].

Существуют и другие пути синтеза оксида азота. Один из них происходит при гипоксии и аноксии в цепи переноса электронов в митохондриях, в результате

реакции происходит превращение нитрит-аниона NO_2^- в монооксид азота. Эта продукция NO зависит от концентрации нитрита (NO_2^-), требует донора электронов и осуществляется цитохром с-оксидазой в зависимости от pH. Интересно, что часть монооксида азота, произведенного в данном процессе, высвобождается из клеток. Значит, генерируемый в митохондриях оксид азота также может действовать во внеклеточных гипоксических сигнальных путях.

Оксид азота способен влиять и на работу митохондриальных генов [22]. Обратимое подавление функционирования цитохром с-оксидазного комплекса (комплекса IV ЦПЭ) со снижением окислительного фосфорилирования и продукции АТФ, а также реакции с промежуточными формами убисемихинонов (которые являются радикалами) также может осуществлять оксид азота. Действие NO на апоптоз амбивалентно: с одной стороны, подавление выделения цитохрома с из митохондрий при низком содержании оксида азота, что блокирует митохондриальный путь апоптоза, а с другой стороны, зависимый от катионов кальция рост проницаемости мембран митохондрий и выход цитохрома с при большом количестве монооксида азота (в этом процессе также занимают свое место S-нитрозотиолы). С цитохромоксидазой и другими компонентами дыхательной цепи митохондрий взаимодействуют также пероксинитрит и нитроксильный анион, которые формируются в этих органеллах.

Следует отметить значение метода электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) в обнаружении монооксида азота в органах различных живых организмов. Связано это с тем, что монооксид азота содержит неспаренный электрон и в силу этого является парамагнитным, поэтому появление NO в клетке можно зарегистрировать по сигналу электронного парамагнитного резонанса [23]. Однако, как уже было сказано выше, монооксид азота - короткоживущий радикал с высокой реакционной способностью, поэтому концентрация несвязанных молекул NO в клетке очень мала. По этой причине обнаружение NO-радикалов производится химическими ловушками, которые при взаимодействии с оксидом азота образуют стабильные парамагнитные соединения [24]. Такие комплексы дают характерные сигналы ЭПР, по которым можно судить о появлении

монооксида азота в исследуемом образце. Сигнал электронного парамагнитного резонанса, как было показано позднее, относящийся к радикалу NO, был обнаружен еще в 60-е годы А.Ф. Ваниным и Р.М. Налбандяном в пекарских дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* [25]. Характерными особенностями этого сигнала были вид дублета и среднее значение g-фактора, равное 2,03. Позднее были обнаружены парамагнитные центры, дающие аналогичный сигнал электронного парамагнитного резонанса в тканях животных. К настоящему моменту уже точно известно, что “сигнал 2,03” принадлежит нитрозильным комплексам железа (ДНКЖ) [26–28]. Характерные сигналы ЭПР этих комплексов железа были обнаружены в различных образцах из живых организмов [28].

Важнейшими формами стабилизации и хранения монооксида азота в физиологических условиях являются S-нитрозотиолы (RS^-NO^+) и динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами (ДНКЖ) ($(RS^-)_2Fe^+(NO^+)_2$) [29], о которых более подробно будет рассказано в следующих разделах работы.

1.2 Окислительный стресс и свободные радикалы

Нарушение баланса прооксидантной и антиоксидантной систем в пользу первой - окислительный стресс - вызывает повреждение белков, липидов, углеводов и нуклеиновых кислот [30–32]. Выживание в окислительной среде на самом деле является одной из самых больших проблем, с которыми сталкиваются живые организмы, начиная с кислородной катастрофы (около 2,3 млрд. лет назад). Постепенное накопление повреждений биологических макромолекул и клеточных структур в свободнорадикальной теории старения считается основным механизмом запрограммированного природой процесса старения живых организмов [33].

Клеточный ответ первого уровня на окислительный стресс заключается в использовании систем антиоксидантной защиты и регенерации, которые сводят к минимуму возникающие повреждения и удаляют или восстанавливают поврежденные клеточные компоненты [30–36]. Низкий уровень окислительной

модификации биологических макромолекул на протяжении большей части жизни организма поддерживается благодаря разнообразным взаимодействующим антиоксидантным системам соединений, включающих в себя как низкомолекулярные соединения, так и ферменты, ответственные за элиминацию прооксидантов и репарацию биомолекул [31].

К числу низкомолекулярных антиоксидантов относятся витамины С (аскорбиновая кислота, с рядом оговорок) и Е (токоферолы), убихинон, мочевиная кислота, глутатион (GSH), каротиноиды и флавоноиды. Эти соединения вступают в реакцию с АФК и АФА, предотвращая их разрушительное воздействие на клетки [31]. Антиоксидантные ферменты (т.е. высокомолекулярные антиоксиданты), такие как супероксиддисмутаза, гем-содержащие пероксидазы, глутатионпероксидазы и хинонредуктазы, способствуют превращению агрессивных молекул в менее реакционноспособные химические соединения [32,37]. За устранение окислительных повреждений белков отвечает такой сложный многобелковый комплекс как протеасома, которая способна находить и расщеплять подвергшиеся таким дефектам белки [32,33,36]. В случае, если окислению подвергаются липиды биологических мембран, их узнают и разрушают ферменты из класса липаз, в первую очередь фосфолипаза А₂ [32,33], после чего глутатионпероксидазы ликвидируют получившиеся гидропероксиды жирных кислот. Есть подобные энзиматические механизмы борьбы с окислительными повреждениями и для нуклеиновых кислот. В ряде исследований показано, что окисленная ДНК, в свою очередь, подлежит удалению или т.н. эксцизионной репарации с применением ферментов репарации ДНК, включая эндонуклеазы, гликозилазы, полимеразы и лигазы [32,33,35].

Многоклеточные живые организмы жестко регулируют уровень O₂ различными методами, что напрямую ограничивает окисление биополимеров. В частности, уровень O₂ падает с атмосферного (21%) в легких до 2–5% в тканях в организме человека. O₂ в клетках связывается и потребляется, в основном, комплексом цитохромоксидазы по своему прямому назначению, что происходит благодаря весьма небольшому значению константы Михаэлиса K_m у

цитохромоксидазы митохондрий для O_2 [31]. Таким образом, одним из компонентов защиты от окислительного стресса является сведение парциального давления кислорода в клетках к минимуму [31].

Вместе с тем, клетки обладают способностью адаптироваться к окислительному стрессу посредством активации сигнальных путей, регулируемых кислородом и его активными формами.

Окислительный стресс является неотъемлемой частью очень многих патологических состояний в организме человека и животных. В нервной системе это такие заболевания, как: синдром дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ) [38], болезнь Паркинсона [32,39], болезнь Лафора [40], болезнь Альцгеймера [32,41], аутизм [42], а также депрессивные расстройства [43]. Среди болезней системы кровообращения: атеросклероз [32,44], сердечная недостаточность [45], инфаркт миокарда [46].

Среди других патологических состояний, связанных с окислительным стрессом важно отметить серповидно-клеточную анемию [47], ряд кожных болезней, например, витилиго [48]. Окислительный стресс при онкологических новообразованиях также привлекает пристальное внимание многих исследователей [32,49].

1.2.1 Активные формы кислорода

Механизмы токсичного или, наоборот, нормального физиологического действия активных форм кислорода (АФК) давно привлекают внимание исследователей. К настоящему времени известно, что важнейшей АФК является супероксид ($O_2^{\cdot-}$) [31], который с химической точки зрения является анион-радикалом. Он может быть обнаружен во всех аэробных клетках организма и способен непосредственно вносить различные повреждения. $O_2^{\cdot-}$ может самостоятельно окислять ряд молекул, которые характеризуется высокой окисляемостью, такие как, в частности, аскорбиновая кислота и некоторые фенолы и тиолы, а такой процесс способен приводить ферменты в неактивное состояние. Из супероксидного радикала образуется H_2O_2 (пероксид водорода) в результате процессов восстановления или дисмутации, после чего происходит

формирование гидроксильного радикала ($\text{OH}^\cdot$) уже из H_2O_2 . Ионы металлов, чаще всего железа (реакция Фентона, упомянутая выше), являются важными участниками таких реакций. Важно отметить, что $\text{OH}^\cdot$ — одно из наиболее реакционноспособных из известных в химической науке соединений, которое в состоянии даже при комнатной температуре отщеплять неактивированный атом водорода. Благодаря этому своему свойству, $\text{OH}^\cdot$ вступает в реакции с большинством частиц, с которыми сталкивается, с константой скорости, очень близкой к пределу диффузии [31]. Подобные реакции с ионами переходных металлов относят к т.н. неферментативным источникам АФК.

Ферментативными источниками активных форм кислорода в организме человека и животных являются: дыхательная цепь переноса электронов; клетки, осуществляющие фагоцитоз (моноциты, макрофаги, нейтрофилы и др.) [37], в которых O_2^- синтезируется ферментами при активации такой иммунной клетки после ее столкновения с антигеном; молибден-содержащий фермент ксантиноксидаза, основной функцией которого является катаболизм пуринов, катализирует окисление ксантина (метаболита распада пуринов) кислородом до мочевой кислоты, что сопровождается продукцией анион-радикала супероксида.

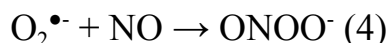
Цепь переноса электронов в митохондриях (дыхательная цепь) является мощным источником АФК, в первую очередь, $\text{O}_2^{\cdot-}$ и, следовательно, H_2O_2 . Образование последнего происходит либо ибо в виде продукта фермента супероксиддисмутазы, либо в результате спонтанного диспропорционирования супероксида [50]. Генерация АФК может усиливаться при одновременном росте концентрации кислорода и уровня восстановленных одноэлектронных доноров в митохондриальной цепи переноса электронов [51]. Снижение активности цитохром-с-оксидазы приводит к аналогичным последствиям [52]. В.П. Скулачев в своих работах [53,54], предложил мягкое разобщение цепи переноса электронов с усилением потребления кислорода митохондриями в качестве метода предотвращения или снижения продукции АФК. Существует два основных участка дыхательной цепи, где продуцируются АФК: комплекс I

(НАДН-дегидрогеназный комплекс) [55] и комплекс III (Цитохром- bc_1 -комплекс) [55,56].

1.2.2 Активные формы азота / нитрозативный стресс

Активные формы азота (АФА) образуются при аномальном повышении уровня оксида азота (NO), продуцируемого индуцибельной синтазой оксида азота (iNOS) и/или реже эндотелиальной синтазой оксида азота (eNOS). Кроме того, для образования пероксинитрита и ряда других АФА необходимо наличие высоких концентраций супероксид-анионов ($O_2^{\bullet-}$). АФА реагируют с другими молекулами в три раза быстрее, чем $O_2^{\bullet-}$, и имеют более длительный средний период полураспада [57]. Они вызывают необратимые повреждения клеточных мембран, белков, митохондрий, эндоплазматического ретикулума, нуклеиновых кислот и ферментов, изменяя их активность и приводя к некрозу и гибели клеток. Механизмы, которые вызывают подобные повреждения, остаются не вполне изученными [57].

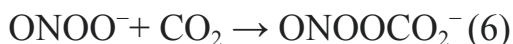
В 1990 г Фримен и Бекман [58] обнаружили, что источником весьма реакционноспособных окислительных радикалов в физиологически значимых условиях является пероксинитрит ($ONOO^-$) - продукт реакции супероксид-радикала и монооксида азота:



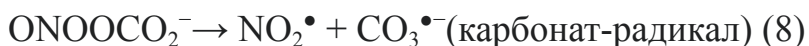
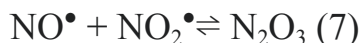
Реакция может происходить в эндотелиальных клетках, макрофагах, нейтрофилах и нейрональных клетках. Оксид азота является единственной биологической молекулой, вырабатываемой в достаточно высоких концентрациях, чтобы превзойти супероксиддисмутазу в конкурентной борьбе за супероксид. Пероксинитрит относительно медленно реагирует с большинством биологических молекул, что делает пероксинитрит селективным окислителем.

Следует более подробно остановиться на том, что представляют собой активные формы азота. Это, в первую очередь, вышеупомянутый пероксинитрит ($ONOO^-$) и его протонированная форма - пероксиазотистая кислота ($ONOOH$),

которые являются предшественниками таких активных форм кислорода и азота, как гидроксильный радикал ($\text{OH}^\bullet$), диоксид азота ($\text{NO}_2^\bullet$) и нитрозопероксикарбонат (ONOOCO_2^-) [58] :



Важно отметить, что свойства пероксинитрита как прооксиданта в значительной степени связаны с продукцией при его распаде гидроксильного радикала и $\text{NO}_2^\bullet$ в соответствии с реакцией (5). В свою очередь, из диоксида азота и NO образуется триоксид диазота (N_2O_3), а при распаде нитрозопероксикарбоната – карбонат-радикал:



Также необходимо отметить, что при изомеризации пероксиазотистой кислоты образуется нитрат (NO_3^-). Как видно из приведенных реакций, формирование АФА может сопровождаться также и образованием активных форм кислорода.

К другим активным формам азота следует отнести нитроксил (HNO), пероксинитрат (O_2NOO^-), пероксиазотную кислоту (O_2NOOH), катион нитрозония (NO^+), нитрит (NO_2^-) и катион нитрония (NO_2^+) [31,57].

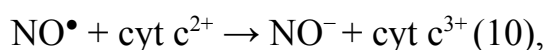
В нормальных условиях АФА служат важными посредниками в клеточной физиологии и генерируются во многих биохимических процессах [57]. Они являются частью иммунного ответа [59], выступая в качестве неспецифической защиты, и участвуют в качестве вторичных мессенджеров в путях передачи сигнала [60]. Однако АФА токсичны и могут нанести повреждения различным клеткам в условиях нитрозативного стресса, когда они присутствуют в высоких концентрациях [61]. В настоящее время установлено, что нитрозативный стресс участвует в патогенезе многих заболеваний. Некоторые из них: сахарный диабет [62,63], патологии сетчатки глаза [64], ожирение [57] и, особенно, различные

сердечно-сосудистые заболевания (эндотелиальная дисфункция, гипертония, инсульт) [20,57,65–68]. В частности, в работе [69] показана решающая роль нитрозативного стресса в развитии сердечной недостаточности с сохраненной фракцией выброса.

Пероксинитрит, который, как известно, окисляет сульфгидрилы и дает продукты, свидетельствующие о реакции гидроксильного радикала ($\cdot\text{OH}$) с дезоксирибозой и диметилсульфоксидом, индуцирует перекисное окисление мембранных липидов [70]. Кроме того, пероксинитрит может приводить к преобразованиям окислительного характера включенных в полипептидные (белковые) цепи аминокислотных остатков: нитрозировать тирозин (Tyr), окислять триптофан (Trp) и цистеин (Cys) [71,72]. Результатом действия пероксинитрита является и опосредованный NAD^+ выход из митохондрий катионов кальция [73].

Проапоптотические свойства NO , вероятно, обусловлены именно пероксинитритом. В некоторых исследованиях продемонстрировано, что именно эффект пероксинитрита как прооксиданта приводит к выходу цитохрома *c* (cyt *c*) из митохондрий, а это, в свою очередь, запускает каскад реакций апоптоза [74].

Нитроксильный анион (NO^-) тоже имеет выраженное действие в качестве прооксиданта. Продукция нитроксил-аниона происходит, в частности, в митохондриях в реакциях оксида азота с убихиноном (CoQ), цитохромом *c* и цитохромоксидазой (комплекс IV):

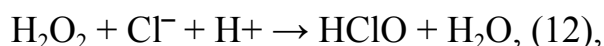


Важно заметить, что эти реакции оксида азота происходят именно с восстановленными формами указанных соединений. Продукция убисемихинона в результате производимого NO окисления CoQ в восстановленной форме способна приводить к формированию таких АФК как супероксидный радикал и пероксида водорода [75].

С другой стороны, нитроксильный анион NO^- и нитроксил (HNO) могут иметь вполне нормальное физиологическое действие, в том числе, быть вазодилататорами, как и NO [76,77] или, например, участвовать в регуляции NMDA-рецепторов в ЦНС [78].

1.2.3 Активные формы галогенов и галогенирующий стресс

Термины галогенирующий стресс и активные формы галогенов (АФГ) в качестве особого прооксидантного процесса и группы свободных радикалов, соответственно, были предложены в ряде работ О.М. Панасенко и его соавторами [79,80]. Основная активная форма галогенов и весьма важный молекулярный предшественник свободных радикалов в организме - хлорноватистая кислота (HClO), и ее соль - гипохлорит (ClO^-). HClO является продуктом реакции:



катализируемой ферментами, относящимися к семейству пероксидаз млекопитающих, в первую очередь, миелопероксидазой (МПО). Миелопероксидаза (МПО) является гемовым белком, высвобождаемым лейкоцитами и играющим решающую роль в воспалении и окислительном стрессе на клеточном уровне [81].

HClO имеет pK 7,5 [82], то есть при стандартном физиологическом значении pH HClO и ClO^- присутствуют в водной среде приблизительно в равных концентрациях. С одной стороны, HClO , будучи сильным окислителем, является важным компонентом врожденной иммунной системы организма человека и животных, так как оказывает мощное бактерицидное действие [59,80,81]. С другой, благодаря повышенной реакционной способности и возможности играть роль молекулы-предшественника свободных радикалов, HClO реагирует со многими биологически активными молекулами и оказывает цитотоксический эффект. По этой причине хлорноватистая кислота может провоцировать развитие целого ряда заболеваний, в той или иной мере связанных с воспалительной

реакцией организма: онкологических, нейродегенеративных, сердечно-сосудистых и других [80,81,83].

Следует несколько подробнее остановиться на роли галогенирующего стресса в сердечно-сосудистых заболеваниях. Показано, что продукция гипохлорита миелопероксидазой влияет на артериальный эндотелий с помощью ряда механизмов, которые включают в себя изменение потока клеточного холестерина и нарушение индуцируемой оксидом азота сосудистой релаксации [81]. Таким образом, МПО участвует как в формировании, так и в распространении т.н. атероматоза - стадии развития атеросклеротической бляшки с распадом липидных и белковых масс, коллагеновых и эластических волокон, а также кристаллизацией холестерина и жирных кислот.

Имеются убедительные доказательства того, что гипохлорит также способствует ишемии за счет дестабилизации уязвимой бляшки [81]. В многочисленных исследованиях установлено, что МПО и ее прооксидантные продукты являются частью воспалительного каскада, инициируемого повреждением эндотелия, и их продукция в значительном количестве увеличивается в месте артериального воспаления. В последующих работах была получена количественная оценка этого наблюдения, показывающая значительное повышение системных уровней МПО при широком спектре сердечно-сосудистых заболеваний, при этом наиболее изучаемыми в настоящий момент являются острые коронарные синдромы и сердечная недостаточность [81], а также атеросклероз [83].

1.3 Гемопротеины и их физиологическая роль

Гемопротеины представляют собой металлопротеины, которые содержат простетическую группу – гем, которая обеспечивает перенос кислорода, восстановление кислорода, перенос электронов и другие физиологически важные процессы. Гем состоит из катиона железа (обычно Fe^{2+} или Fe^{3+}), связанного в центре сопряженного плоского основания порфирина, а также других лигандов, одного или двух, присоединенных к «аксиальным участкам» железа.

Порфириновое кольцо имеет 4 атома азота, которые связываются с железом, оставляя два других координационных положения железа доступными для связывания с гистидином белка или другим лигандом. В качестве примера на рисунке 1 представлена структурная формула гема типа В, наиболее часто встречающегося варианта гема, входящего в состав как гемоглобина, так и миоглобина.

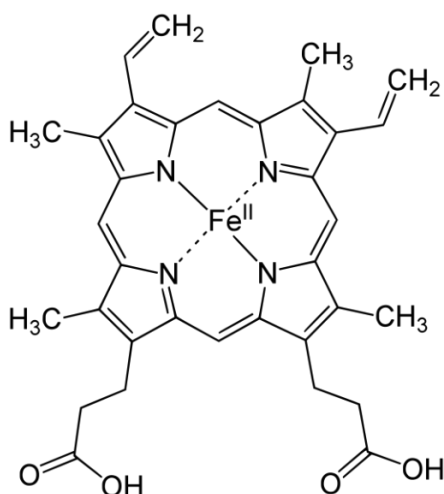


Рисунок 1. Структурная формула гема типа В.

Кислород (O_2), оксид азота (NO), монооксид углерода (CO) и сероводород (H_2S) связываются с гемовым железом [84]. После связывания с простетическими группами гема эти молекулы могут модулировать активность/функцию этих гемопротеинов, в том числе связанную с передачей сигнала [85].

Из-за их разнообразных и крайне важных для существования живых организмов биологических функций и широкого распространения гемопротеины являются одними из наиболее изученных биомолекул. В этом разделе подробно будут рассмотрены гемоглобин и цитохром *c*.

Гемоглобин (Hb) является, в свою очередь, наиболее известным и наиболее изученным среди гемопротеинов. Способность гемоглобина переносить кислород была описана еще в XIX веке. В 1959 году с помощью рентгеновской кристаллографии Макс Перуц определил структуру молекулы гемоглобина [86].

В оксигемоглобине молекула кислорода присоединяется к железу (Fe(II)) гема по шестой координационной связи, перпендикулярной плоскости

порфиринового кольца, причём на этой же оси находится координационная связь с азотом имидазола остатка гистидина. Гемоглобин человека является тетрамером, то есть состоит из 4 субъединиц, у взрослого человека это полипептидные цепи α_1 , α_2 , β_1 и β_2 . Объединение субъединиц тетрамера происходит в основном благодаря гидрофобным взаимодействиям. Как α -, так и β -цепи содержат восемь α -спиральных участков, обозначаемых буквами от А до Н (от N-конца к С-концу). Каждая из субъединиц содержит гемовую группу. Молекулярная масса гемоглобина составляет 65 кДа. Структура тетрамера гемоглобина показана на рисунке 2.

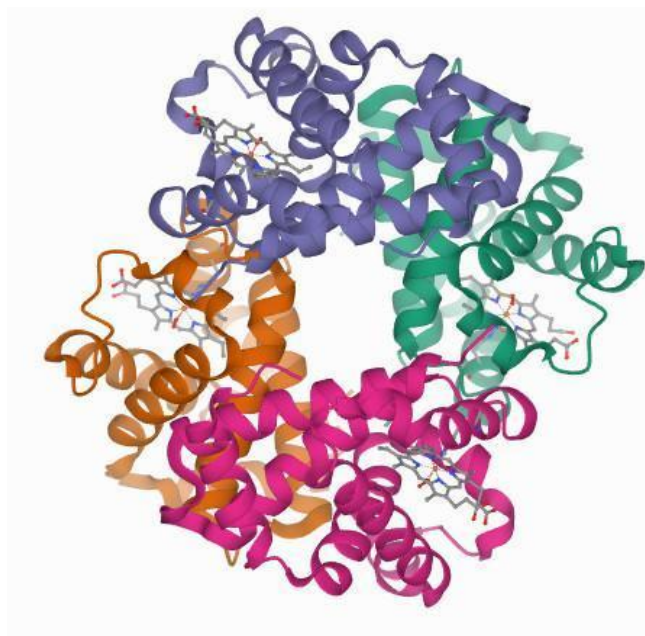


Рисунок 2. Структура оксигенированного гемоглобина (PDB: 1GZX) [87].

Основная функция гемоглобина заключается в транспортировке кислорода (O_2) от легких к тканям, связывании и высвобождении O_2 кооперативным образом, как показано на кривой кислородного равновесия (Рисунок 3), которая представляет насыщение гемоглобина кислородом (Y) при различных парциальных давлениях O_2 (P_{O_2}). Значение P_{O_2} при 50% насыщении (P_{50}) отражает сродство O_2 к Hb, которое составляет около 26 мм рт. ст. для нормального гемоглобина взрослого человека (HbA) [88]. Этот кооперативный эффект связывания кислорода гемоглобином [83,84] связан с тем, что связывание

кислорода одной субъединицей повышает аффинность к кислороду других субъединиц и может быть описан с помощью уравнения Хилла:

$$Y = \frac{P_{O_2}^n}{P_{50}^n + P_{O_2}^n}$$

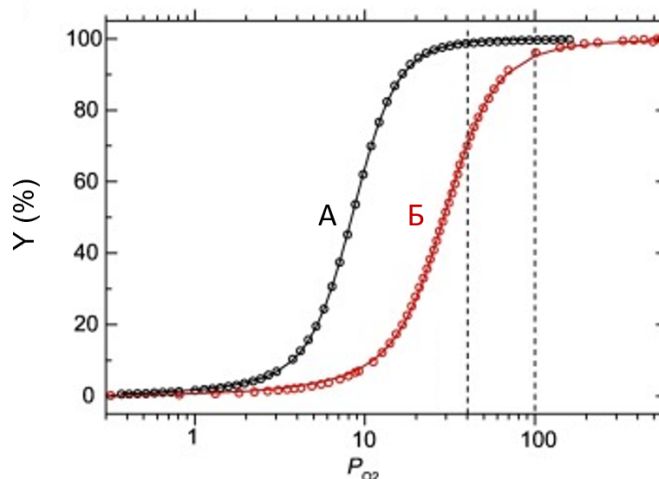


Рисунок 3. Кривые насыщения гемоглобина для очищенного гемоглобина (А) и для цельной крови (Б) [89].

Функционирование гемоглобина объясняют равновесием между двумя состояниями: напряженным (Т) состоянием (частично оксигенированный гемоглобин), проявляющим низкое сродство к O_2 , и расслабленным (R) состоянием (полностью оксигенированный гемоглобин), проявляющим высокое сродство к O_2 . Такое изменение четвертичной структуры гемоглобина обеспечивает эффективное поглощение и высвобождение O_2 in vivo [90–93].

Гемоглобин осуществляет и перенос CO_2 от тканей к легким. Как известно, продуктом процессов дыхания в клетке является CO_2 , гидратация которого приводит к формированию ионов H^+ и, следовательно, к уменьшению значений рН. Уменьшение рН и увеличение уровня CO_2 в крови существенно действует на связывание O_2 гемоглобином: в периферических сосудах меньшая величина рН, при соединении H^+ и CO_2 с гемоглобином уменьшается его сродство к O_2 . Такое влияние значения рН и уровня CO_2 на возможности гемоглобина по связыванию O_2 получило название эффекта Вериге – Бора [94,95].

Помимо транспорта кислорода и углекислого газа гемоглобин осуществляет следующие функции: каталитическую / ферментативную (монооксигеназа, эстераза, алкилгидропероксидаза, липоксигеназа, нитритредуктаза, NO-диоксигеназа); участие в метаболизме оксида азота (что связано с последними двумя ферментативными активностями); метаболическое перепрограммирование; регуляцию pH и поддержание окислительно-восстановительного баланса [88,96]. В последние десятилетия появился ряд новых вопросов в биохимии и биофизике гемоглобина, связанных с такими процессами, как его роль в транспорте оксида азота и сложный контроль развития кластеров генов α - и β -подобных глобинов [86]. Следует отметить, что подобные работы имеют существенное значение для понимания механизмов и разработки методов лечения распространенных заболеваний гемоглобина, например, серповидно-клеточной анемии [86].

Цитохром *c* (cyt *c*) представляет собой белок достаточно малого размера, имеющий молекулярную массу 12 кДа. Он имеет в качестве простетической группы гем типа C, образующий ковалентную связь с полипептидной цепью посредством аминокислотных остатков цистеина (Cys14 и Cys17). Цитохром *c* хорошо растворим в воде (растворимость около 100 г/л). Цитохром *c* прежде всего известен своей функцией в митохондриях как ключевой участник цепи переноса электронов. cyt *c* действует между внутренней и внешней мембранами митохондрий здоровых клеток, где он опосредует перенос электронов между комплексами III и IV дыхательной цепи [97]. В cyt *c* аксиальная связь, образованная остатком Met80 с гемовым железом (III), отвечает за относительно высокий окислительно-восстановительный потенциал ($E_0 = 250$ мВ по сравнению с нормальным водородным электродом, при pH 7,0), необходимый для того, чтобы белок выполнял свою функциональную роль в дыхательной цепи [97].

Однако, когда клетка получает апоптотический стимул, цитохром *c* высвобождается в цитозоль и запускает запрограммированную гибель клеток. Высвобождение цитохрома *c* и цитохром-с-опосредованный апоптоз контролируются несколькими уровнями регуляции, наиболее важными из которых являются члены семейства белков В-клеточной лимфомы-2 (Bcl-2).

Помимо своей роли в каноническом внутреннем апоптозе, цитохром *c* усиливает сигналы, которые генерируются другими путями апоптоза, и участвует в некоторых функциях, не связанных с апоптозом [98].

Среди гем-содержащих белков также стоит выделить различные ферменты, в частности, каталазы, некоторые пероксидазы и гуанилатциклазу, ключевой элемент сигнального пути оксида азота. Следует отметить, что упомянутые пероксидазы и каталаза в организме человека и животных являются важнейшими антиоксидантными ферментами.

Несмотря на то, что многие из гемопротеинов хорошо изучены, перед исследователями по-прежнему стоит ряд вопросов, одним из которых является физиологическая и патофизиологическая роль их взаимодействия с оксидом азота [99,100].

1.4 Нитрозильные комплексы гемопротеинов

Нитрозилирование гемового железа (Рисунок 4) может происходить в различных гемопротеинах и имеет важные биологические функции. Следует отметить некоторые из них, наиболее важные для данной работы.

Ингибирование NO кислородтранспортной функции миоглобина или гемоглобина является классическим примером специфического взаимодействия NO с гемопротеинами.

NO влияет на ряд гем-содержащих ферментов. Уже упомянутым примером гемопротеина, на который влияет NO, является гуанилатциклаза, фермент, который катализирует превращение ГТФ в циклический ГМФ и пиррофосфат. Еще одним интересным примером взаимодействия NO с гем-содержащими ферментами является простагландин H-синтаза (PGHS) [101].

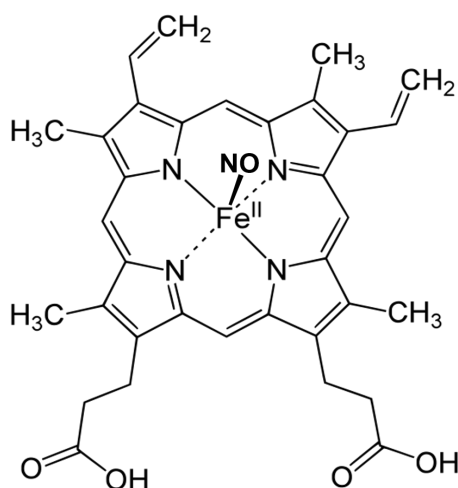


Рисунок 4. Нитрозилированный гем В.

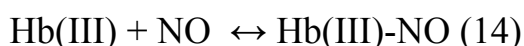
Кроме того, нитрозилированный гемоглобин рассматривается как маркер циркулирующего биодоступного NO, образующегося в сосудах эндотелиальной NOS, и который в свою очередь является важным показателем эндотелия сосудов [102]. В недавней работе [103] таким образом была показана прямая корреляция между уровнем NO и респираторными параметрами у пациентов с COVID-19.

На связывание NO с гемом в различных гемопротеинах влияют особенности полипептидных цепей гемопротеинов. Это, во-первых, стерические эффекты. У гемового железа есть 6 связей координационного типа, из которых 4 лежат в одной плоскости с гемом – это связи с атомами N в порфириновой группе. Оставшиеся пятая и шестая связи перпендикулярны по отношению к плоскости гема и в гемопротеинах обычно заполняются либо атомами N имидазольных групп, либо S из аминокислотных остатков цепи белка. Присоединение оксида азота к 5-координированному гему обычно происходит с более высокой скоростью, чем к 6-координированному, поскольку для удаления шестого лиганда требуется затратить дополнительную энергию [100,101]. Во-вторых, влияют эффекты растворимости: гидрофильный карман гема способствует доступу ионных лигандов к железу гема, тогда как карман гема, содержащий в основном неполярные аминокислоты, облегчает связывание нейтральных лигандов [101]. В-третьих, эффекты, связанные с конкретной аминокислотой: хорошим примером является водородная связь между дистальным лигандом гема миоглобина,

гистидином (E7), который имеет соседнюю молекулу воды и оказывает решающее влияние на скорость диссоциации лиганда [101].

Комплексы, в которых атом железа восстановлен ($-\text{Fe}^{2+}\text{-NO}$), парамагнитны, что связано с тем, что в такой конфигурации присутствует неспаренный электрон, который принадлежит монооксиду азота. Следует отметить, что эта характеристика определяет возможность их исследования с помощью спектроскопии ЭПР.

Более подробно следует рассмотреть нитрозилирование гемового железа в гемоглобине. Как метгемоглобин - окисленная форма гемоглобина ($\text{Hb}(\text{Fe}^{3+}) - \text{Hb(III)}$), так и восстановленная форма - феррогемоглобин ($\text{Hb}(\text{Fe}^{2+}) - \text{Hb(II)}$) способны вступать в реакции с оксидом азота. В случае метгемоглобина такое взаимодействие (реакция 14) обратимо, а скоростные константы как прямой, так и обратной реакций принимают сравнительно небольшие значения.



Близкое к необратимому взаимодействие деоксигенированного гемоглобина (Hb(II)) с монооксидом азота приводит к его присоединению к гемовому железу, которое в отличие от присоединения O_2 , не имеет кооперативного эффекта, так как для образования связи оксида азота с железом гема нет необходимости в значительных перестройках белковой конформации [100,104]. Константы скоростей реакций и сродства NO с различными формами гемоглобина указаны в таблице 1. По причине медленного распада нитрозильных комплексов гемового железа гемоглобина, сродство его деоксигенированной формы (deoxyHb) к монооксиду азота ($K = 10^{12} \text{ M}^{-1}$) выше, чем к угарному газу (CO) на три порядка [100]. То есть монооксид азота способен даже выводить из карбоксигемоглобина угарный газ таким образом:



При этом NO существенно менее токсичен, чем угарный газ. Последний включается в какую-либо субъединицу деоксигенированного гемоглобина, способствует переходу гемоглобина в R-форму и тем самым повышает его аффинность к O_2 и препятствует его высвобождению. Присоединение одной

молекулы монооксида азота к деоксигенированному гемоглобину тоже влияет на аффинность к кислороду, но рН в значительной степени оказывает влияние на константу такой реакции. При понижении рН, как было сказано выше, снижается аффинность гемоглобина к кислороду. По этой причине оксид азота, может повышать эффективность доставки O_2 к тканям, согласно А.Н. Осипову и др. [100,104].

Табл. 1. Константы скоростей для реакций гемоглобина и монооксида азота (по А.Н. Осипову и др.) [100].

	$K_{\text{асс}}, M^{-1}s^{-1}$	$K_{\text{дисс}}, s^{-1}$	K, M^{-1}	Источник
Hb(III), α-цепь	$1,7 \times 10^3$	0,65	$2,6 \times 10^3$	[100,105]
Hb(III), β-цепь	$6,4 \times 10^3$	1,5	$4,3 \times 10^3$	[100,105]
Hb(II), R-форма	$1,4 \times 10^7$	$1,8 \times 10^{-5}$	10^{12}	[100,106]
Hb(II), T-форма	$1,4 \times 10^7$	$3,0 \times 10^{-3}$	$4,7 \times 10^9$	[100,106]
Hb(II), α-цепь	$2,4 \times 10^7$	$4,6 \times 10^{-5}$	5×10^{11}	[100,106]
Hb(II), β-цепь	$2,4 \times 10^7$	$2,2 \times 10^{-5}$	10^{12}	[100,106]

Нитрозилирование гемоглобина имеет различные физиологические функции и, помимо этого, может быть важным показателем состояния сердечно-сосудистой системы. Известно, что в эритроцитах NO может реагировать с гемоглобином с образованием нитрозильного комплекса гемового железа (5-координированный-α-HbNO), что можно непосредственно количественно измерить с помощью спектроскопии ЭПР в венозной крови мышей, крыс и человека *ex vivo* [107]. Однако источники нитрозилирующих частиц *in vivo* и оптимальные условия сохранения HbNO для диагностического использования в эритроцитах человека пока не вполне известны. Обнаружено, что стабильность HbNO была значительно выше в условиях гипоксии, чем в интактных

эритроцитах; а также при кислом pH [107]. Нитрозильные комплексы гемоглобина являются важным элементом в метаболизме NO в сосуде. Показана связь уровня нитрозилированного гемоглобина с функционированием эндотелия сосуда [102]. Снижение уровня HbNO в венозных эритроцитах человека, коррелирует с развитием эндотелиальной дисфункции, параллельно с усилением окислительного стресса в сосудах [108]. При этом установлено, что на образование HbNO в венозных эритроцитах грызунов и человека в основном влияют сосудистые источники NO (в первую очередь eNOS), несмотря на активность собственных NO-синтаз эритроцитов, поэтому его измерение может служить показателем NO-зависимой функции эндотелия [107].

Внимание исследователей привлекала роль эритроцитов в транспорте NO в микроциркуляторном русле и сосудистый эффект этого оксида азота в облегчении тока крови по микроциркуляторному руслу [109]. Нитрит, который образуется в артериальной крови при взаимодействии оксида азота и O₂, затем подвергается повторному разрушению в артериолах. Это сопровождается снижением парциального давления O₂, а также восстановлением нитрита в монооксид азота, производимым deoxyHb. В процессе восстановления нитрита гемоглобином образующийся при этом монооксид азота преимущественно удерживается в промежуточной форме, где он ассоциирован с гемоглобином в окисленном состоянии (метгемоглобином) и находится в динамическом равновесии с катионом нитрозония (NO⁺), связанным с восстановленной формой гемоглобина (феррогемоглобином). В отличие от стабильного комплекса ферроформы гемоглобина с NO (Hb(II)NO), такой резерв оксида азота характеризуется слабой связью с гемовой группой, что позволяет ему легко высвобождаться. Учитывая нестабильность комплекса метгемоглобина с NO (Hb(III)NO) при воздействии O₂ и его вытеснение при обработке аргоном, для точного определения содержания оксида азота в эритроцитах необходимо использовать свежелизированные образцы, чтобы избежать их оксигенации. В свежей крови на долю Hb(III)NO приходится около 75% общего содержания NO в эритроцитах, при этом значения в венозной крови заметно выше, чем в артериальной. Таким образом, по данным

Nagababu и др. [109] восстановление нитритов при пониженном парциальном давлении кислорода является основным источником NO в эритроцитах. Также, показано, что метаболиты NO, такие как GSNO и нитрит, при физиологических значениях pH и аэробных условиях приводят к модификации винильных групп порфирина Hb(III) с образованием Hb(II)NO [110].

Взаимодействие NO с гемоглобином может иметь и патологический эффект. Наиболее очевидным примером является образование Hb(II)NO при гемолизе – разрушении эритроцитов с последующим высвобождением гемоглобина во внеклеточное пространство. Это происходит, в первую очередь, при переливании крови. Консервация и хранение крови и ее компонентов в банке крови сопряжены с повреждением, которое включает морфологические и метаболические изменения, повреждение белков и дезинтеграцию мембран [111,112]. Донорские эритроциты подвергаются деформации и гемолизу в условиях стресса, связанного с хранением, что влияет на клинический результат переливания крови [112]. В результате связывания оксида азота бесклеточным гемоглобином возникают вазоконстрикция и, соответственно, гипертензивные эффекты, обусловленные снижением уровня доступного NO [113,114]. В ряде исследований рассматривается терапевтическое использование доноров NO для улучшения тяжелых исходов у пациентов, страдающих эндотелиальной дисфункцией, вызванной гемолизом перелитой крови [112,113].

Таким образом, в различных исследованиях показано физиологическое значение нитрозилирования гемовых групп гемопroteинов и гемоглобина, в частности, но по-прежнему существует достаточное количество нерешенных вопросов, одним из которых является роль нитрозильных комплексов гемопroteинов в окислительном и нитрозативном стрессе.

1.5 Динитрозильные комплексы железа

Динитрозильные комплексы негемового железа (ДНКЖ) с тиолсодержащими лигандами представляют собой стабильную физиологическую форму депонирования монооксида азота. Время жизни динитрозильных

комплексов железа с белковыми лигандами может доходить до нескольких суток, в то время как время жизни свободного NO составляет в среднем 5-6 с [29].

ДНКЖ в биологических системах встречаются в двух формах – в парамагнитной, подходящей для исследования с помощью ЭПР, моноядерной форме (М-ДНКЖ: $[(RS)_2Fe(NO)_2]$) и в диамагнитной, не дающей сигнала ЭПР, биядерной форме (Б-ДНКЖ: $[(RS)_2Fe_2(NO)_4]$). Структура двух форм динитрозильных комплексов железа – моноядерной и биядерной, а также схема их взаимных превращений и обратимого распада с образованием S-нитрозотиолов и высвобождением NO показана на рисунке 5. Первая форма впервые была обнаружена с использованием спектроскопии ЭПР А.Ф. Ваниным и Р.М. Налбандяном в дрожжевых клетках в 1963-1964 годах по характерному для М-ДНКЖ сигналу ЭПР с $g_{cp}=2,03$ (т.н. сигналу 2,03). Несколько позже, в 1967 году аналогичный сигнал был зарегистрирован ими же и в тканях животных. На рисунке 6 показаны спектры ЭПР ДНКЖ, полученные в первых экспериментах, где был зарегистрирован «сигнал 2,03». Эти результаты были первым свидетельством того, что в живых организмах может производиться монооксид азота, необходимый для образования ДНКЖ.

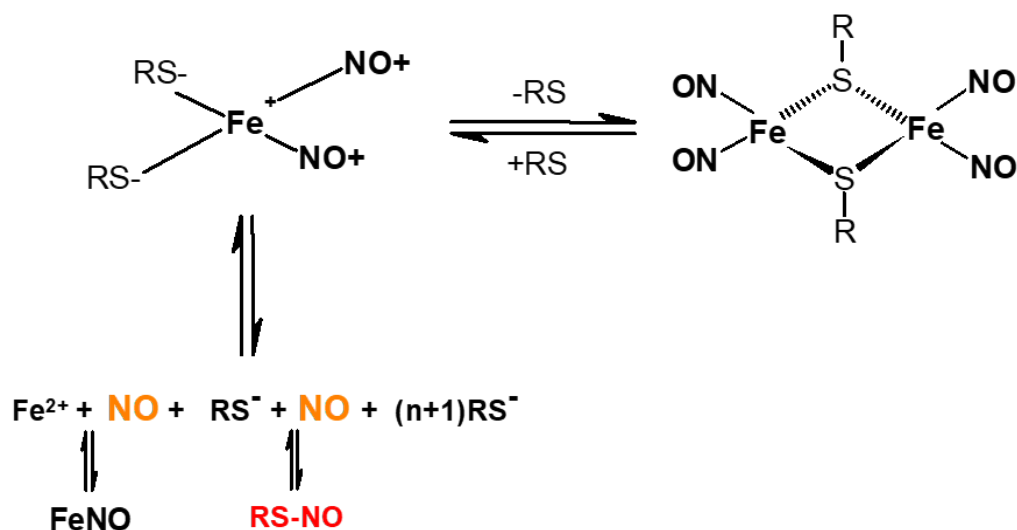


Рисунок 5. Моноядерная и биядерная формы динитрозильных комплексов железа со схемой их взаимных превращений и обратимого распада.

При взаимодействии динитрозильных комплексов железа с веществами, имеющими большую аффинность к монооксиду азота или катиону нитрозония, последние могут переноситься на эти вещества, например на некоторые гемопротейны или тиолсодержащие белки, следствием чего может быть как ингибирование, так и активация акцепторов NO или NO^+ [28].

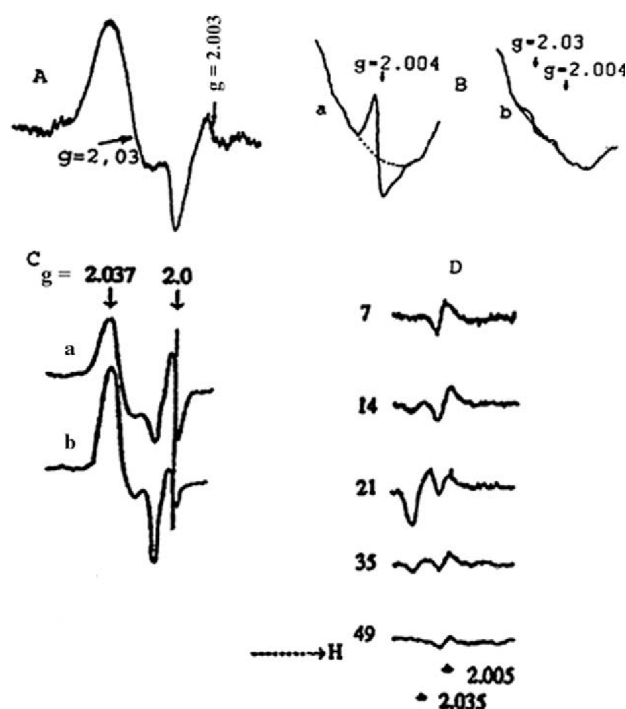


Рисунок 6. Первые записи сигнала ЭПР с g - фактором 2.03 (по А.Ф. Ванину [28]); в клетках дрожжей (А) [25]; карцинома печени крыс, индуцированная гепатоканцерогенным соединением, п-диметиламино-азобензолом (масляно-желтым) (В, спектр б; (а) спектр нормальной печени) [115]; печень дрожжей и кролика (С, спектры а и б) соответственно [25,26]; (D) печень крыс, выдерживающих 7, 14, 21, 35 и 49 дней на диете, содержащей масляно-желтый [116]. Записи проводились при 77 К (А–С) или комнатной температуре (D).

Тиолсодержащие лиганды могут представлять собой как низкомолекулярные соединения, например, цистеин или глутатион, так и цистеиновые остатки полипептидных цепей различных белков.

М-ДНКЖ и в современных исследованиях обнаруживаются в биологических системах, как правило, по свойственному им сигналу электронного парамагнитного резонанса, центр которого соответствует значению g -фактора,

равному 2,03. Следует отметить, что форма такого сигнала ЭПР обладает определенной асимметрией.

Вывод о белковом происхождении исследованных в этих работах комплексов был сделан в связи с тем, что параметры сигнала ЭПР ДНКЖ, благодаря анизотропии тензора g-фактора, сохраняются при увеличении температуры образца от 77 К (температура кипения жидкого азота) до комнатной. В клетках и тканях динитрозильные комплексы железа с тиоловыми лигандами связаны преимущественно с белками, что, судя по всему, обусловлено большей стабильностью этих комплексов [28,29].

К 90-м годам, когда было достоверно установлено, что в живых системах может ферментативным образом производиться NO, М-ДНКЖ были зарегистрированы в культурах различных клеток человека и животных. Однако, в экспериментах при усиленной генерации NO в тканях животных, например, с помощью активации у них iNOS, М-ДНКЖ в этих тканях методом ЭПР не обнаруживались [29].

А.Ф. Ваниным и его соавторами был предложен механизм образования М-ДНКЖ в реакции диспропорционирования двух нейтральных молекул NO связанных с ионом двухвалентного железа, причём другими лигандами Fe^{2+} могут быть анионные нетиоловые (L^-) или тиоловые (RS^-) соединения. В ходе этой реакции высвобождается протонированная форма нитроксильного аниона (NO^-), а вместо нее в комплекс включается нейтральная молекула NO и образуются М-ДНКЖ. Вид их резонансной конфигурации следующий: $[(L^-)_2Fe^{2+}(NO)(NO^+)]$. Нитрозильными лигандами в такой структуре являются, в одинаковых пропорциях, молекулярный монооксид азота и катион нитрозония (NO^+). Превращение NO^+ в нитрит-анионы при нейтральных показателях pH происходит в результате взаимодействия OH^- с NO^+ . Это вызывает преобразование динитрозильных комплексов железа в соответствующие высокоспиновые *мононитрозильные* комплексы железа (МНКЖ), обладающие резонансной конфигурацией: $[(L^-)_2Fe^{2+}(NO)]$. Если в динитрозильных комплексах железа происходит замена нетиоловых лигандов (L^-) на тиоловые, характерной чертой

которых является сильное π -донорное действие, образуются более устойчивые М-ДНКЖ с резонансной структурой $[(RS^-)_2Fe^{2+}(NO, NO^+)]$. Относительно высокая стабильность этих комплексов определяется тем, что положительный заряд на NO^+ нейтрализуется и не происходит гидролиз этих катионов, благодаря перераспределению электронной плотности с атомов S на Fe-динитрозильные группы. Таким образом, М-ДНКЖ на тиоловых лигандах, а также их биядерные аналоги (Б-ДНКЖ соответствующей резонансной структуры $[(RS^-)_2Fe^{2+}_2(NO, NO^+)_2]$) могут служить источниками как NO, так и NO^+ . Опыты с образцами, содержащими растворенные биядерных динитрозильных комплексов железа с GSH либо N-ацетил-L-цистеином (Б-ДНКЖ-GSH или Б-ДНКЖ-Ацц) продемонстрировали продукцию и монооксида азота, и катиона нитрозония этими комплексами в результате вызванного воздействием кислоты их распада или в том случае, когда их тиолсодержащие лиганды были подвергнуты окислению. Молекулы NO, высвобождаемые из ДНКЖ, обычно оказывают положительное и регуляторное действие на клетки и организмы в целом, а катионы нитрозония — цитотоксическое [117].

С другой стороны, в работах [118,119] предложен альтернативный механизм образования ДНКЖ с образованием тиольных радикалов в качестве побочных продуктов. Различные стадии формирования тиолсодержащих ДНКЖ, согласно этому механизму, представлены на рисунке 7. Действительно, образование тиольных радикалов было обнаружено в реакционной среде, содержавшей NO, Fe(II) и тиолы в водной среде с pH 7,4. Моделирование с установленными константами скорости и биологическими концентрациями реагентов подтвердило, что ДНКЖ легко образуются при физиологических и патологических уровнях продукции NO [119]. Вместе с тем, данный механизм не может объяснить образования нетиольных, например, фосфатных, динитрозильных комплексов железа.



Совокупность экспериментальных данных свидетельствует о том, что модель М-ДНКЖ, характеризующаяся низкоспиновой d^7 конфигурацией и локализацией неспаренного электрона на орбитали $MO(d_z^2)$ и квадратно-плоской пространственной структурой полностью согласуется с данными ЭПР для М-ДНКЖ в растворе. Кроме того, это дает явное объяснение способности ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами к S-нитрозилированию тиолов как в присутствии, так и в отсутствие кислорода [120].

42

России новых лекарственных препаратах гипотензивного характера, в первую очередь, «Оксаком». Проведены их доклинические и исследования и первые этапы клинических исследований [125,126]. При экспериментально поставленной региональной ишемии сердечной мышцы у крыс выявлено, что вслед за внесением динитрозильных комплексов железа с лигандом глутатионом (GS-ДНКЖ) в зоне ишемии более эффективно накапливаются белковые ДНКЖ, в сравнении с областью миокарда, не затронутой ишемией [127]. Также было обнаружено, что при добавлении GS-ДНКЖ в сердце на ранней стадии постишемической реперфузии увеличивалась концентрация белковых М-ДНКЖ, а эта концентрация в ткани принимала более высокие значения, чем при добавлении тех же глутатионсодержащих динитрозильных комплексов железа в процессе аэробной перфузии [124]. Имеются экспериментальные данные и о взаимных химических преобразованиях различных физиологических форм стабилизации монооксида азота: наблюдался переход $Fe^+(NO^+)_2$ -групп с GS- на белковые тиоловые лиганды в миокарде [127]. Также рассмотрено гипотензивное действие препарата «Оксаком» при различных способах его введения в организм экспериментальных животных [123].

Кроме гипотензивного эффекта показано, что динитрозильные комплексы железа подавляют агрегацию тромбоцитов, имеют антигипоксические и антиапоптотические свойства, также они повышают эластичность эритроцитов, делают более быстрой регенерацию ран кожи (табл.2).

Табл. 2. Биологическая активность ДНКЖ (По А.Ф. Ванину [29]).

	Эффект	Источник
1	Сильный сосудорасширяющий и снижающий давление эффект	[123,125,128–133]
2	Ингибирование тромбоцитарной агрегации	[134,135]
3	Антигипоксический эффект в отношении сердечной мышцы	[136]

4	Увеличение эритроцитарной эластичности	[137]
5	Увеличение скорости регенерации ран кожи	[138,139]
6	Улучшение показателей выживания у животных с кровоизлияниями	[140]
7	Стимулирование эрекции	[141]
8	Локализация некроза при экспериментальном инфаркте миокарда (крысы)	[142]
9	Противоапоптотические эффекты на культурах нормальных клеток животных и человека	[143,144],
10	Активация/торможение экспрессии некоторых бактериальных и эукариотических генов	[145–151]
11	Повышенное усвоение железа пораженными ржавчиной растениями	[152]

Следует отдельно отметить цитотоксическое и противовирусное действие ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами (табл.3), в значительной степени обусловленное действием катиона нитрозония NO^+ [153].

Табл. 3. Цитотоксическое и противовирусное действие ДНКЖ [29].

	Эффект	Источник
1	Проапоптотическое действие на клеточной линии HeLa в присутствии внешних хелаторов Fe	[143]
2	Стимулирование апоптоза на клеточной линии Jurkat	[154]

3	Ослабление развития новообразований при экспериментальных моделях эндометриоза	[155–157]
4	Ингибирование пролиферации злокачественных новообразований на первичных этапах роста	[158]
5	Ингибирование протеазы 2А вируса Коксаки типа В в сердечной мышце	[159]

Кроме того, *in silico* и *in vitro* было продемонстрировано ингибирующее действие ДНКЖ в отношении основной протеазы вируса SARS-COV-2 – возбудителя COVID-19 [160]. С учетом данных о возможном противовирусном действии ДНКЖ в качестве донора катиона нитрозония [161], ДНКЖ могут рассматриваться в качестве потенциального терапевтического средства и при данном заболевании.

Отдельного внимания заслуживает антиоксидантное действие ДНКЖ. Оно будет подробно рассмотрено далее в следующем разделе литературного обзора и в разделах «Результаты» и «Обсуждение».

1.6 Антиоксидантное действие NO и его физиологических производных.

Оксид азота в различных условиях может оказывать как прооксидантное, связанное с образованием АФА, так и антиоксидантное действие, которое в значительной степени обусловлено комплексами монооксида азота с гемовым и негемовым железом. Влияние таких комплексных соединений, в частности Нб-ДНКЖ, т.е. ДНКЖ с остатками Cys полипептидных цепей гемоглобина, на процессы оксидативного (связанного с АФК), нитрозативного (с АФА) и галогенирующего (с АФГ) стресса в различных органах и тканях, особенно в кровеносной системе, рассматривалось многими исследователями начиная с 90-х годов XX века.

Всего можно выделить три основных антиоксидантных пути, с помощью которых окислительный стресс, катализируемый железом, может регулироваться оксидом азота. Первые два пути включают прямое окислительно-восстановительное взаимодействие NO с каталитическими центрами железа и представляют собой быструю реакцию, которую можно рассматривать как аварийный механизм для защиты клеток от последствий острого и интенсивного окислительного стресса. Это, во-первых, восстановление оксоферрильных форм гемового и негемового железа в реакции с NO, в том числе непосредственное взаимодействие NO с оксоферрил-ассоциированными свободными радикалами; во-вторых, образование нитрозильных комплексов с внутриклеточным слабосвязанным редокс-активным железом и, в-третьих, не прямой регуляторный путь, который может функционировать как адаптивный механизм, который начинает действовать при длительном воздействии NO на клетки. В последнем пути NO подавляет экспрессию железосодержащих белков, чтобы предотвратить их каталитические прооксидантные реакции [162].

Говоря о влиянии производных оксида азота на антиоксидантные процессы нельзя не упомянуть S-нитрозотиолы (RSNO) как важную физиологическую форму NO. RSNO выполняют многие физиологические функции, сходные с ролью самого NO, которые предположительно связаны с высвобождением NO из RSNO. Гораздо большая продолжительность жизни S-нитрозотиолов в биологических системах, по сравнению с NO, позволяет предположить, что RSNO играют важную роль в биологической активности оксида азота. У здоровых людей RSNO обнаруживаются в плазме крови в низких наномолярных концентрациях. Однако механизм образования RSNO *in vivo* не вполне установлен [163].

Хорошо известна прямая и косвенная (активация антиоксидантной системы тиоредоксина и антиапоптотического белка Bcl-2 через цГМФ-зависимый механизм) антиоксидантная активность S-нитрозоглутатиона, который является одним наиболее распространенных и важных S-нитрозотиолов [164].

Еще одним важным S-нитрозотиолом в организме человека и животных является S-нитрозогемоглобин, в котором происходит S-нитрозилирование, как

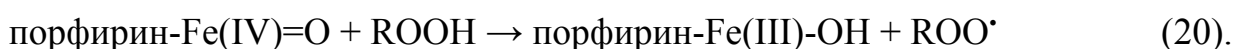
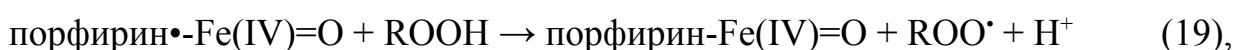
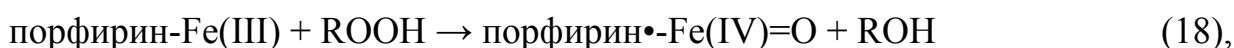
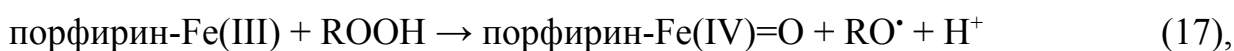
правило, остатка βCys93 . Примечательно, что S-нитрозилирование Cys93 оксидом азота происходит предпочтительно в оксигенированной форме Hb, тогда как деоксигенированный Hb высвобождает NO из связанного с ним S-нитрозотиола (SNO-Hb). Поскольку NO оказывает сосудорасширяющее действие, этот механизм обеспечивает физиологическую основу для гипоксической ауторегуляции кровотока, т.е. способности тканевой гипоксии увеличивать микроциркуляторный кровоток. Физиологические исследования с использованием мутантных мышей с аминокислотной заменой C93A подтверждают аллостерически контролируемую роль SNO-Hb в микрососудистом кровотоке и подтверждают существенную роль вазодилатации, опосредованной эритроцитами в физиологии сердечно-сосудистой системы [165]. Однако то, какое место занимает S-нитрозогемоглобин в антиоксидантных или прооксидантных процессах остается не вполне понятным.

В свою очередь, известен и относительно неплохо изучен механизм антиоксидантного действия нитрозилированного по гемовому железу гемоглобина, который заключается в предотвращении Фентон-подобных реакций гидропероксидов (включая H_2O_2 и органические гидропероксиды) с гемовым железом.

Известно, что гемопротейны взаимодействуют с пероксидом водорода и липопероксидами с образованием высокоокисленных форм гема (феррильный и оксоферрильный гем), а также свободных радикалов [162,166]. Эти процессы могут играть важную роль в развитии окислительного стресса и связанных с ним патологий. Свободный гем вызывает перекисное окисление липидов (ПОЛ), окислительный стресс и воспаление, аналогичным действием также обладает гем находящийся в составе гемопротейнов [167]. Так, цитохром c (III) играет ключевую роль в индуцированном гидропероксидами ПОЛ в митохондриальных мембранах [168]. Свободный гемоглобин также может быть биологически опасным, отчасти потому, что он действует как реагент Фентона, способный катализировать образование гидроксильных радикалов в очагах воспаления [169]. По этой причине в организме существуют защитные механизмы, реализуемые такими белками как гаптоглобин, который очень прочно связывает гемоглобин, и

гемопексин, связывающий свободный гем. Важной физиологической функцией гаптоглобина является предотвращение опосредованного гемоглобином окисления [169].

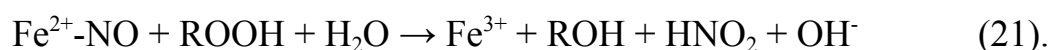
Таким образом, оксидативный стресс происходит при активном участии гемовых белков, таких как гемоглобин, миоглобин или цитохром *c*, которые взаимодействуют с разнообразными гидропероксидными соединениями. Гемовое железо в таких гемопротеинах реагирует с гидропероксидами органического химического строения, в частности, гидропероксидами липидов, что приводит к формированию алкоксильных (RO•) и алкилпероксильных радикалов (ROO•), как это показано в следующих реакциях [122,170]:



Эти химические превращения приводят к образованию оксоферрильных форм гема (порфирин-Fe(IV)=O) в гемовых белках. Реакции 16-20 при оксидативном стрессе стимулируют ПОЛ и окислительные повреждения остальных биологических макромолекул, особенно белковых.

Данные реакции действительно могут ингибироваться вследствие нитрозилирования гемового железа. В частности, продемонстрированы свойства оксида азота как антиоксиданта в экспериментах на клеточной линии K562 (хроническая миелогенная лейкемия) при добавлении гидропероксида *трет*-бутила (*t*-BOOH). Эти свойства были вызваны реакциями с органическими свободнорадикальными соединениями, и образованием комплексов монооксида азота с Fe как из гемовых групп, так и не связанного с ними [166]. Кроме того, во многих работах продемонстрировано подавление функционирования гемовых белков как прооксидантов через нитрозилирование железа гемовых групп

[171,172]. Известно и о ингибировании оксидом азота химических взаимодействий, подобных реакции Фентона, однако понимание молекулярного механизма, стоящего за такими свойствами NO по-прежнему не является полным [162,173]. Одним из возможных объяснений этого феномена может быть двухэлектронное восстановление гидропероксидов при их взаимодействии с комплексами гемового или негемового железа с NO [173,174]:



Динитрозильные комплексы железа занимают важное место в реализации антиоксидантного действия NO. При этом можно выделить различные, как уже хорошо известные, так и предложенные в недавних работах, механизмы антиоксидантного и антирадикального действия ДНКЖ.

Одним из таких механизмов является связывание и стабилизация железа. Т.н. пул хелатируемого (слабосвязанного) железа представляет собой небольшую, но химически активную фракцию железа в клетке. Значимость этого пула обусловлена участием ионов «слабосвязанного» железа в окислительно-восстановительных реакциях в которых генерируются АФК, что может привести к окислительному стрессу. Известно, что обработка макрофагов NO приводит к его взаимодействию с хелатируемым железом и образованию ДНКЖ [175]. Инкубация раковых клеток с NO также приводила к зависимому от времени и дозы увеличению образования ДНКЖ. Формирование ДНКЖ приводит к связыванию пула хелатируемого железа, которое является основным источником железа для редокс-реакций и образования АФК. Антиоксидантный эффект NO был рассмотрен посредством измерения способности ДНКЖ защищать клетки от окислительного стресса [176]. Раковые клетки, обработанные NO, были частично защищены от цитотоксичности, опосредованной H_2O_2 . Следует отметить, что присутствие NO во время обработки H_2O_2 коррелирует с уменьшением образования прооксидантов. Подобные защитные эффекты были достигнуты при обработке клеток хелаторами железа в присутствии H_2O_2 . Интересно, что NO снижает скорость клеточного метаболизма H_2O_2 , что указывает на то, что часть пероксида водорода расходуется в результате реакций с клеточным железом. При

искусственном увеличении концентрации хелатируемого железа путем добавления к клеткам железа наблюдалось значительное снижение цитопротекторного действия NO. Примечательно, что зависимые от NO цитопротекторный и антиоксидантный эффекты, коррелировали с увеличением уровня образующихся ДНКЖ. Эти результаты показывают, что NO обладает антиоксидантными свойствами благодаря своей способности связывать клеточное железо. Это может играть важную роль в различных заболеваниях, связанных с токсичным действием АФК, таких как рак и нейродегенеративные расстройства, где NO является важным этиологическим фактором [176].

Вместе с тем, антиоксидантное и антирадикальное действие ДНКЖ было продемонстрировано в экспериментах с полученными из миокарда крыс митохондриями [177]. Установлено, что динитрозильные комплексы железа выгодно отличаются от других физиологически активных производных оксида азота (NO). ДНКЖ с глутатионом успешно удаляют O^{2-} , генерируемый митохондриями при различном парциальном давлении кислорода. В условиях искусственной гипоксии синтез тиолсодержащих ДНКЖ происходит в митохондриях и сопровождается значительным снижением концентрации метаболитов NO на стадии реоксигенации. Свободный оксид азота, который нужен для образования ДНКЖ, является продуктом взаимодействия таких соединений как S-нитрозотиолы с O^{2-} , а также продуктом одноэлектронного окисления нитроксила (HNO) коэнзима Q [177]. Механизмы цитопротекторного действия динитрозильных комплексов железа с восстановленным глутатионом ($\{(GS^-)_2Fe^+(NO^+)_2\}$, GS-ДНКЖ) были также изучены в опытах с кардиоплегией и реперфузией сердца крысы [124]. Образование активных форм кислорода в коронарном оттоке и содержание ДНКЖ в миокарде было определено с помощью спектроскопии ЭПР. Кардиоплегия или реперфузия с GS-ДНКЖ значительно улучшили восстановление коронарного кровотока и сердечной функции по сравнению с контрольными образцами. Показано, что карбокси-PTIO, селективный «перехватчик» NO, снижает защитное действие GS-ДНКЖ. Более эффективное восстановление сердечной функции в присутствии GS-ДНКЖ

сопровождалось снижением выброса лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в коронарный отток, стимулировало восстановление энергетического состояния миокарда и снижало образование АФК при реперфузии. Благоприятные эффекты GS-ДНКЖ были связаны с переносом групп $[\text{Fe}(\text{NO})_2]$ на тиоловые группы белков миокарда с образованием внутриклеточных пулов ДНКЖ. В исследовании сделан вывод о том, что GS-ДНКЖ является многообещающим дополнительным средством метаболической и антиоксидантной защиты сердца при кардиоплегической остановке и последующей реперфузии [124].

То, каким образом ДНКЖ, с одной стороны, а гемопротеины, с другой, могут взаимодействовать в процессах окислительного или нитрозативного стресса, остается не вполне ясным. Как известно, NO и ДНКЖ способны быть восстановителями оксоферрильных форм гема у таких гемопротеинов, как миоглобин (Mb) или гемоглобин (Hb), которые являются продуктами реакций данных сложных белковых молекул с H_2O_2 и органическими гидропероксидами [170,174,178]. Предыдущие исследования по данной теме продемонстрировали успешное восстановление Mb в оксоферрильной форме глутатионовыми динитрозильными комплексами железа [170]. Как уже отмечалось выше в разделе про ДНКЖ, возможно формирование динитрозильных комплексов железа, в которых в качестве тиоловых лигандов выступают цистеины (а именно Cys93), входящие в аминокислотные цепи β -субъединиц гемоглобина [122]. Было выявлено, что такие гемоглобиновые ДНКЖ (Hb-ДНКЖ) формировались в эритроцитах кролика после внесения в кровь низкомолекулярных ДНКЖ с тиосульфатом [122]. Установлено, что в модельной системе распад Hb-ДНКЖ может происходить в присутствии как пероксида водорода, так и гидропероксида *трет*-бутила. Более того, Hb-ДНКЖ предотвращает окислительные повреждения гемоглобина, которые вносит H_2O_2 . Hb-ДНКЖ также разрушается при ферментативном образовании супероксида в ксантин-ксантинооксидазной системе. Если аэрация в этих условиях отсутствовала, то в процессе деструкции Hb-ДНКЖ наблюдалось образование нитрозилированной по железу гема формы гемоглобина [122]. Антиоксидантное действие гемоглобиновых ДНКЖ продемонстрировано в

различных экспериментах: в частности, в отношении окислительных модификаций, вызываемых пероксинитритом [179]. Однако, по-прежнему остается немало вопросов о механизмах подобного действия вообще и об особенностях их взаимодействия с различными биологически значимыми свободными радикалами, а также о роли Нв-ДНКЖ в физиологических и патофизиологических процессах и о возможных вариантах их клинического применения.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Реактивы

В экспериментах, поставленных в рамках диссертационного исследования, были применены реактивы, произведенные фирмами Sigma-Aldrich (США), Merck (Германия) и Cayman Chemical Europe (Эстония). Динитрозильные комплексы железа, S-нитрозотиолы и пероксинитрит были синтезированы в лаборатории физико-химических методов исследования НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова, лаборатории физической химии биополимеров ФИЦ ХФ РАН и лаборатории биохимии азотфиксации и метаболизма азота Института биохимии имени А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН.

В качестве искусственных источников NO использовались DEA/NO (Diethylamine NONOate, по номенклатуре ИЮПАК: 1,1-диэтил-2-гидрокси-2-нитрозо-гидразин натрия; Sigma-Aldrich), PAPA/NONO (полное название вещества по номенклатуре ИЮПАК: 3-(2-гидрокси-2-нитрозо-1-пропилгидразино)-1-пропанамин, Sigma-Aldrich) и S-нитрозоглутатион (GSNO). Синтез GSNO был осуществлен из GSH и нитрита натрия (NaNO_2), взятых в одинаковых концентрациях, в среде с низкими значениями pH, таким образом, как это описано в работе [110]. С помощью спектрофотометрии было установлено значение концентрации GSNO по величине оптического поглощения при длине волны $\lambda=338$ нм (коэффициент молярной экстинкции: $\epsilon_{338} = 930 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

В качестве донора нитроксильного аниона (NO^-) использовали оксогипонитрит натрия, или, по-другому, соль Анджели ($\text{Na}_2(\text{ONNO}_2)$) - натриевую

соль нитрогидроксамовой кислоты). Этот препарат и спиновая ловушка DEPMPO (название согласно номенклатуре ИЮПАК: 5-(диэтоксифосфорил)-5-метил-1-пирролин-N-оксид) произведены Cayman Europe (Эстония).

Синтез такой активной формы азота как пероксинитрит (ONOO^-) был проведен с помощью смешения охлажденных на льду растворов 1 М NaNO_2 и 1 М перекиси водорода (H_2O_2) в 0,3 М H_2SO_4 . Далее к реакционной смеси быстро добавляли равный объем 1,4 М NaOH . Избыток перекиси водорода удалялся с помощью порошкообразного MnO_2 . Концентрацию пероксинитрита определяли по оптическому поглощению при $\lambda=302$ нм ($\epsilon = 1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [180,181].

Формулы наиболее важных реактивов приведены на рисунке 8.

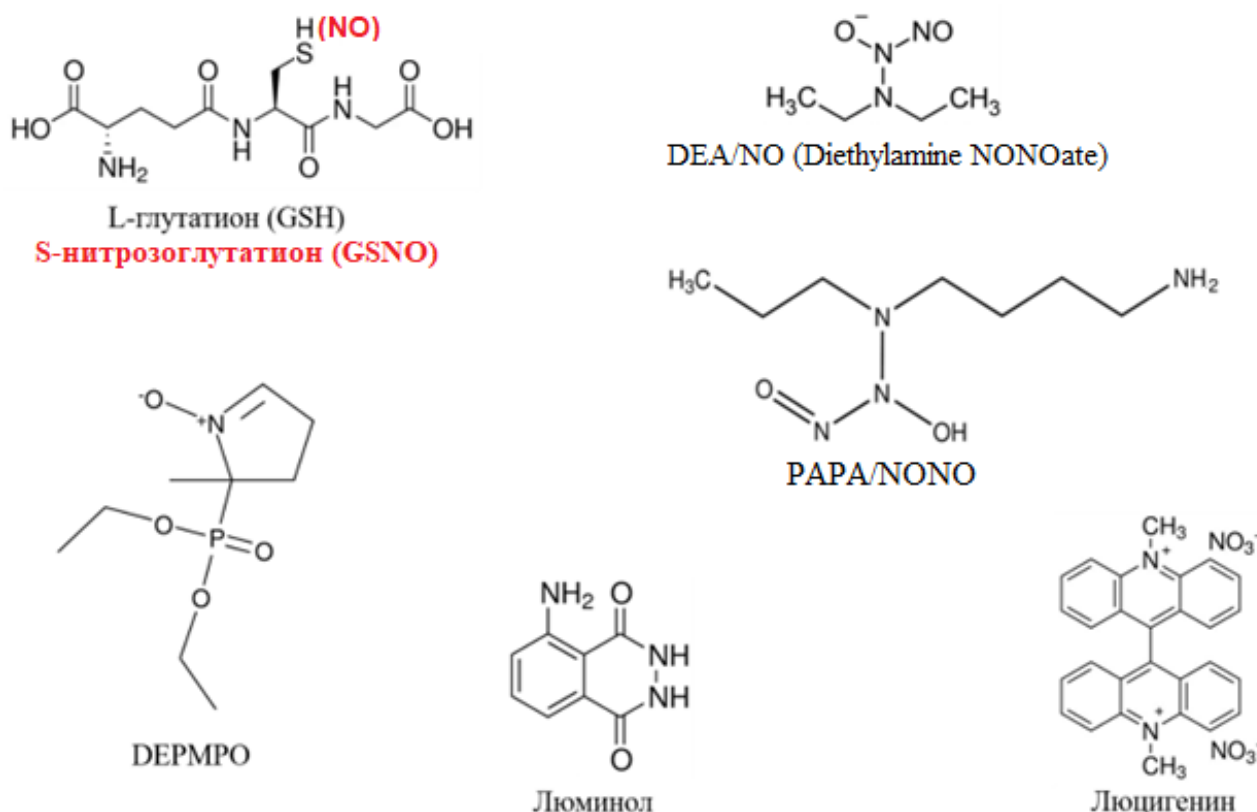


Рисунок 8. Структурные формулы основных используемых реактивов (GSH, GSNO, DEA/NO, PAPA/NONO, DEPMPO).

2.2 Получение ДНКЖ

Динитрозильные комплексы железа на основе фосфатных лигандов были синтезированы с помощью подачи в специальный сосуд Тунберга (схема сосуда

Тунберга представлена на рисунке 9) NO в газообразной форме сквозь среду с сульфатом железа (II) в K,Na-фосфатном буферном растворе (100 мМ, показатель pH был равен 6,8). Далее следующим образом проводился синтез динитрозильных комплексов железа с глутатионом в качестве лиганда (GS-ДНКЖ): проводилось взаимодействие синтезированных по указанной методике фосфатных ДНКЖ с глутатионом в восстановленной форме (GSH), и вследствие такого взаимодействия происходил Fe-NO группы к другим (в данном случае - глутатионовым) лигандам. Аналогично Hb-ДНКЖ (гемоглобиновые динитрозильные комплексы железа) были сформированы путем примешивания к среде с гемоглобином (в мет-форме) динитрозильных комплексов железа на фосфатных лигандов в пропорции по молярным концентрациям 1 (метгемоглобин) к 2,75 (фосфатные ДНКЖ).

Полученные препараты ДНКЖ, GSNO и пероксинитрита разливались по аликвотам и хранились при температуре жидкого азота.

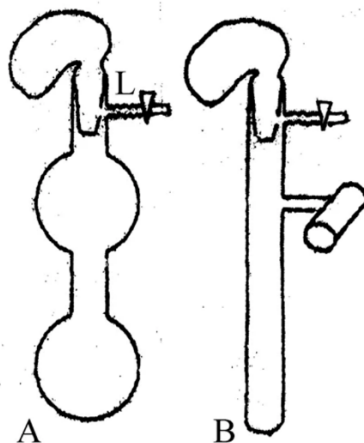


Рисунок 9. Схема сосуда Тунберга, используемого для синтеза фосфатных ДНКЖ [176].

2.3 Подготовка суспензии эритроцитов

Выделение человеческих эритроцитов (RBC) проводилось из образцов крови пациентов ФГБУ "НМИЦК им. ак. Е.И.Чазова" Минздрава России, которые были собраны клинико-диагностической лабораторией данного медицинского

центра. Исследование выполнено в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации и одобрено Комитетом по этике ФГБУ "НМИЦК им. ак. Е.И.Чазова" (Протокол №221 от 28 ноября 2016 г.). От пациентов было получено добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Эритроциты осаждались из крови, содержащей ЭДТА в качестве антикоагулянта, и далее подвергались 5-минутному центрифугированию в изотоническом растворе 0,9% хлорида натрия (физиологическом растворе) со значением ускорения 1000g, затем производилось удаление надосадочной жидкости и ресуспендирование осадка в таком же физиологическом растворе 0,9% NaCl, после чего этот процесс был повторен дважды.

2.4 Модельная реакционная среда с бычьим гемоглобином

Реакционная система с бычьим гемоглобином (Sigma-Aldrich) использовалась для моделирования взаимодействия гемоглобина с различными донорами и стабилизированными комплексами NO при добавлении активных форм кислорода, азота и галогенов. Был приготовлен исходный раствор гемоглобина в фосфатном буфере (pH=7,4) в концентрации 0,5 мМ. В экспериментальных образцах концентрация гемоглобина составляла 0,3-0,4 мМ. Для восстановления метгемоглобина до феррогемоглобина использовался дитионит натрия ($\text{Na}_2\text{O}_4\text{S}_2$), концентрация которого во всех экспериментах составляла ~70 мМ.

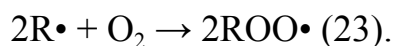
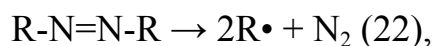
2.5 Выделение липопротеинов низкой плотности и получение липосом

Получение липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) производилось у здоровых доноров из плазмы крови, образцы которой были получены натошак из вены. Исследование одобрено Комитетом по этике ФГБУ "НМИЦК им. ак. Е.И.Чазова" (Протокол №221 от 28 ноября 2016 г.). Доноры крови, из которой были получены ЛПНП, дали добровольное информированное согласие на участие. Методика получения ЛПНП в среде с содержанием ЭДТА (массовая концентрация 1 мг/мл), в угловом роторе 50Ti с применением специальной рефрижераторной ультрацентрифуги (производитель - Beckman L-8, США) при

4°C соответствовала известным по литературе протоколам [14, 15]. На полученных ЛПНП был проведен диализ, длившийся 18 часов при температуре, также равной 4°C, против 2000 объемов хлорида натрия (его концентрация составляла 0,145 М) в 50 мМ К,Na-фосфатном буферном растворе с pH 7,4. Концентрация белковой компоненты ЛПНП была установлена с применением методики Лоури. Активация процесса окисления ЛПНП выполнялась при температуре 37°C путем включения в среду сульфата меди в концентрации 30 мкМ. Определение выработки первичных продуктов ПОЛ - липогидропероксидов - производилось при $\lambda=233$ нм (длине волны, соответствующей максимуму абсорбционного спектра конъюгированных диенов) с использованием спектрофотометра UV-2600 Shimadzu (Япония). Важно заметить, что данный прибор оснащен интегрирующей сферой ISR-2600, которая дает возможность выполнять измерения на мутных образцах.

Кроме ЛПНП для моделирования процессов перекисного окисления липидов использовались однослойные липосомы (диаметром 80 ± 25 нм), которые были получены согласно методике, показанной в статье [15], для чего был применен специальный микроэкструдер LiposoFast (изготовитель - "Avestin", Канада). Смесь фосфатидилхолина из яиц и липофильного азоинициатора - AIBN (азобисизобутиронитрил) в одинаковых молярных концентрациях была использована для образования таких липосом. В исследуемой экспериментальной среде с липосомами итоговые концентрации фосфатидилхолина и AIBN принимали значение 1,4 мМ.

Активация реакций перекисного окисления липидов проводилась алкильными ($R\cdot$) и алкилпероксильными радикалами ($ROO\cdot$), формирующимися вследствие распада азоинициатора (имеющего химическую структуру $R-N=N-R$) при температуре 50°C в химических превращениях такого вида:



2.6. Исследование люминол- и люцигенин-зависимой хемилюминесценции

Измерение хемилюминесценции люминола и люцигенина при их добавлении в исследуемые образцы проводилось при значениях температур 50°C и 37°C, соответственно, и перманентном взбалтывании образцов с применением люминометра Lum-5773 (производитель - “ИнтерОптика-С”, Российская Федерация). В изучаемых таким способом образцах на основе К,Na-фосфатного буфера (0,1 М, рН 7,8) концентрация люминола составляла 200 мкМ, а люцигенина - 20 мкМ.

2.7 Спектроскопия электронного парамагнитного резонанса

В изучении различных свободнорадикальных процессов, а также металлопротеинов и их комплексов с различными лигандами важное место занимает спектроскопия ЭПР, в частности – методы спиновых меток и спиновых ловушек.

Регистрация спектров электронного парамагнитного резонанса производилась на двух спектрометрах ЭПР: на спектрометре E-109E (производитель - компания Varian, США) и на автоматизированном спектрометре малогабаритного формата ESR 70-03 (производитель - XD/2 УП «КБСТ» БГУ, Республика Беларусь). Спектры электронного парамагнитного резонанса были получены при следующих параметрах: при измерениях на Varian E-109E СВЧ мощность 10 мВт, частота СВЧ-излучения 9,15 ГГц, а на спектрометре ESR 70-03 XD/2 частота СВЧ составляла 9,35 ГГц, ослабление СВЧ - 5 дБ. Значения амплитуды модуляции внешнего магнитного поля составляли 0,2 мТл при записи сигналов ЭПР от мооядерных динитрозильных комплексов железа и нитрозилированных по гемовому железу гемопротеинов, а в случае записи сигналов от аддуктов спиновой ловушки DEPMPO с различными радикалами она составляла 0,025 мТл.

Чтобы добиться неизменности концентраций атмосферных газов в образцах, были применены газопроницаемые капиллярные трубки PTFE Sub-Lite-Wall (внутренний диаметр капилляра 0,635 мм, толщина стенки капилляра 0,051 мм), произведенные компанией Zeus Industrial Products, Inc. (США). Такая специальная

трубочка, в которую были помещены исследуемые образцы, дважды складывалась и вставлялась в предназначенную для снятия спектров ЭПР различных образцов трубку из кварца (диаметром ~4 мм), которая открыта с обеих сторон. Благодаря этому газ в требуемой концентрации мог поступать в пространство в резонаторе спектрометра ЭПР около исследуемого образца при проведении на нем измерений.

Все спектры ЭПР, представленные в данном диссертационном исследовании, были записаны при комнатной температуре (25°C).

Спектры ЭПР, регистрация которых производилась на спектрометре E-109E (Varian), были проанализированы и обработаны с применением программного обеспечения, разработанного на физическом факультете МГУ имени М.В. Ломоносова под руководством Б.В. Трубицина, а спектры, записанные на ESR 70-03 XD/2 - с помощью программного обеспечения, разработанного производителем прибора.

2.7.1 Изучение мембран эритроцитов с использованием спиновых меток

Исследование физико-химических свойств плазматических мембран эритроцитов было проведено с применением спиновой метки - 5-доксилстеариновой кислоты (5DS). Данная спиновая метка представляет собой стабильный синтетический радикал: спин-меченую (ковалентным связыванием парамагнитной химической группы) стеариновую кислоту (рисунок 10). 5-доксилстеариновая кислота используется для изучения различных биологических макромолекул, способных связывать (например, альбумин) или включать в себя (липидные мембраны) жирные кислоты. Концентрация спиновой метки 5DS в образцах составляла от 0,4 до 1,6 мМ. Для регистрации спектров ЭПР исследуемыми средами были заполнены стеклянные капилляры, внутренний диаметр которых составлял 0,8 мм.

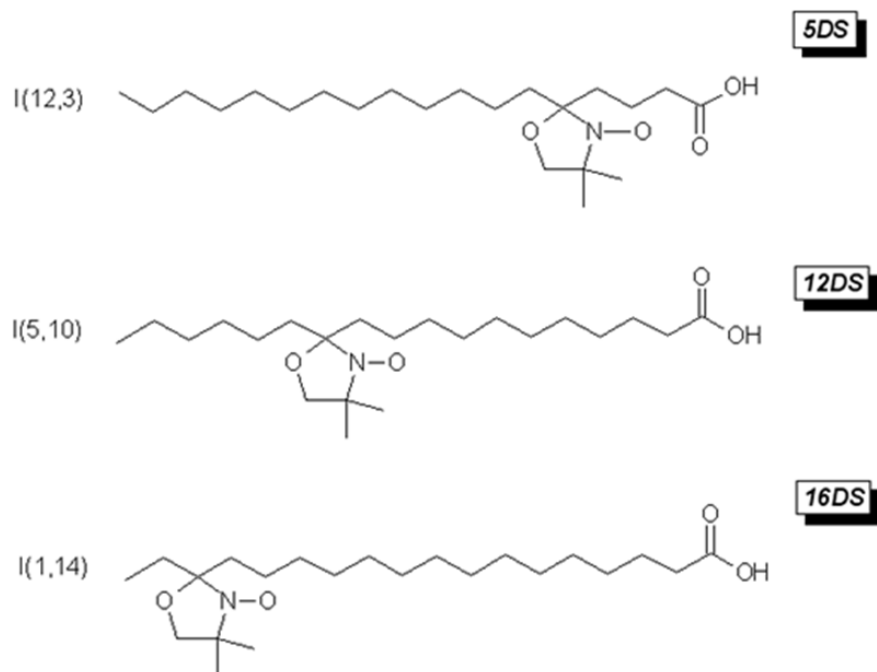


Рисунок 10. Спиновые метки, синтезируемые на основе стеариновой кислоты (5-доксил-стеариновая кислота (5DS), используемая в данной работе, в сравнении с аналогами: 12-доксил-стеариновой (12DS) и 16-доксил-стеариновой кислотой (16DS))

Рисунок 11 демонстрирует характерные спектры электронного парамагнитного резонанса спиновых меток 5DS и 16DS. Данные спиновые метки имеют различную степень углубления своего NO-содержащего (и обладающего неспаренным электроном) фрагмента в липидный бислой клеточных мембран, а значит и отличающиеся скорости вращательной диффузии.

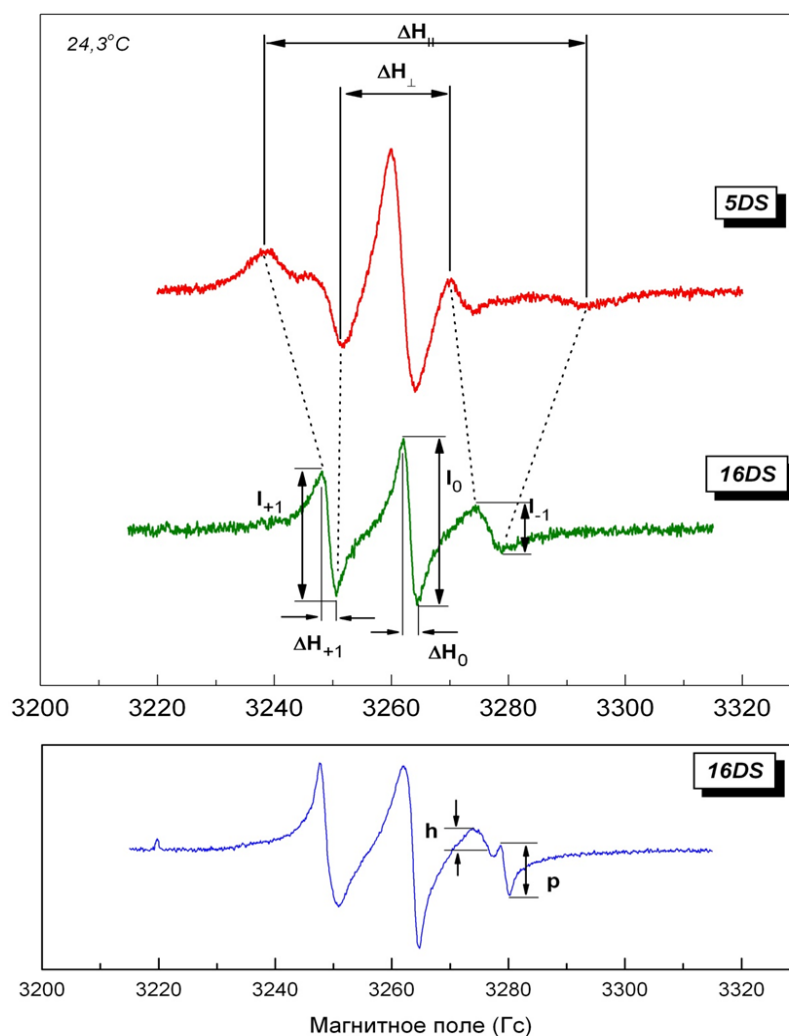


Рисунок 11. Параметры спектров ЭПР спиновых меток 5DS и 16DS в мембранах эритроцитов.

Рисунок 11 иллюстрирует и параметры, которые принято использовать для анализа спектров электронного парамагнитного резонанса спиновых меток 5DS и 16DS [182,183]. Используемый в данной работе для анализа спектров ЭПР спиновой метки 5DS, встроенной в мембраны эритроцитов, параметр порядка S определялся по формуле:

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

$$\text{где } A'_{\parallel} = 1/2\Delta H_{\parallel} \text{ и } A'_{\perp} \approx 1/2\Delta H_{\perp},$$

$$a' = 1/3(A'_{\parallel} + 2A'_{\perp}),$$

$$a = 1/3(A_{zz} + A_{xx} + A_{yy});$$

2.7.2 Изучение органических свободных радикалов с помощью спиновой ловушки DEPMPO

Спиновые ловушки представляют собой специальные химические соединения, способные в реакциях с короткоживущими радикалами образовывать уже стабильные радикалы, доступные для изучения с помощью спектроскопии ЭПР. Определение алкоксильного и алкилперекисного радикалов *трет*-бутила (*t*-BOOH) проводилось с применением DEPMPO - подобной спиновой ловушки, согласно экспериментальному подходу, описанному ряде работ [184–186]. Сигналы ЭПР, характерные для алкильного, алкоксильного и алкилперекисного радикалов приведены на рисунке 12.

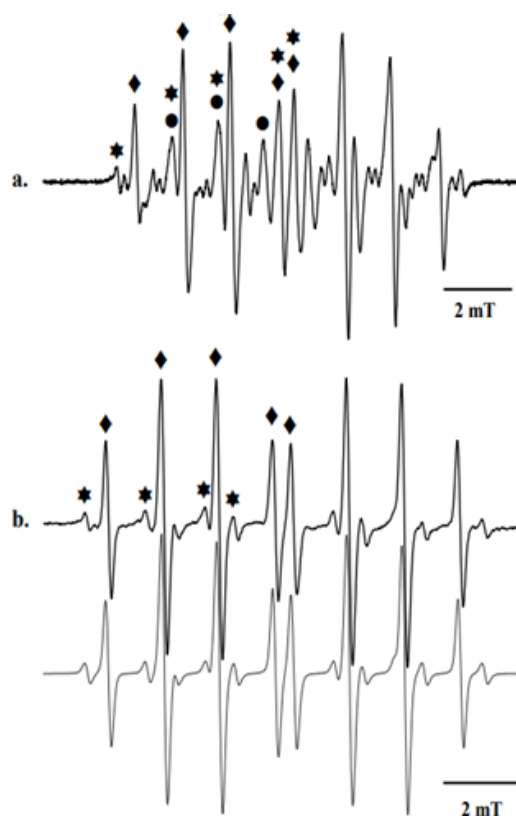


Рисунок 12. Спектры ЭПР спиновых аддуктов DEPMPO с различными радикалами: (а) - реакционная смесь, содержащая цитохром *c* (20 мкМ), *t*-BOOH (15 мМ), DTPA (0,3 мМ) и DEPMPO (100 мМ) в насыщенном кислородом фосфатном буфере (0,1 М, рН 7,4). Спектр (а) соответствует смеси спиновых аддуктов DEPMPO-O-*t*-Bu (♦), DEPMPO-OOCH₃ (·) и DEPMPO-CH₃ (“звезда Давида”); (б) – реакционная смесь как (а), но DEPMPO (400 мМ). Серый спектр ниже представляет собой компьютерное моделирование [185].

В экспериментах, проведенных в рамках данной работы, анализ суперпозиции сигналов ЭПР спиновых аддуктов DEPMPO позволил качественно определить наличие тех или иных свободных радикалов в реакционной смеси.

2.8 Анализ и математическая обработка экспериментальных данных

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 статистические расчеты, а также подготовка графиков и рисунков, представленных в диссертации. Проверка статистических гипотез осуществлялась с использованием t-критерия Стьюдента и непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Различия между экспериментальными данными считали достоверными при $P \leq 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Физико-химические характеристики мембран эритроцитов

Как известно, высвобождающийся при гемолизе внеклеточный гемоглобин способен провоцировать окислительный стресс. В ряде исследований показана слабая положительная корреляция между уровнем свободного гемоглобина в плазме (PFH – plasma free hemoglobin) и коэффициентом анизотропии эритроцитов (RDW – red blood cell distribution width) [187]. Предположительно, в исследованиях гемолиза, а также резистентности эритроцитов к подобным повреждениям оценка микровязкости мембран эритроцитов может быть перспективным методом.

Микровязкость липидов мембран эритроцитов оценивалась с помощью параметра порядка S (см. раздел «Материалы и методы») по спектрам суспензии эритроцитов со спиновой меткой 5DS.

Среднее значение параметра порядка по итогам анализа спектров ЭПР эритроцитарной массы пациентов с нормальным коэффициентом анизотропии ($RDW \approx 11,5 - 14,5\%$, $N = 27$) эритроцитов - $S \approx 0,762 \pm 0,004$. В группе с повышенным коэффициентом анизотропии эритроцитов ($RDW > 16\%$, $N = 8$) $S \approx 0,788 \pm 0,007$. Это свидетельствует о существенном различии по S в этих двух группах (Рисунок 13). Значимость результата определялась с помощью критерия Стьюдента ($p < 0.05$). Однако этого результата недостаточно для выводов о применимости метода для диагностических целей, поскольку объем выборки по группам для других параметров был недостаточен.

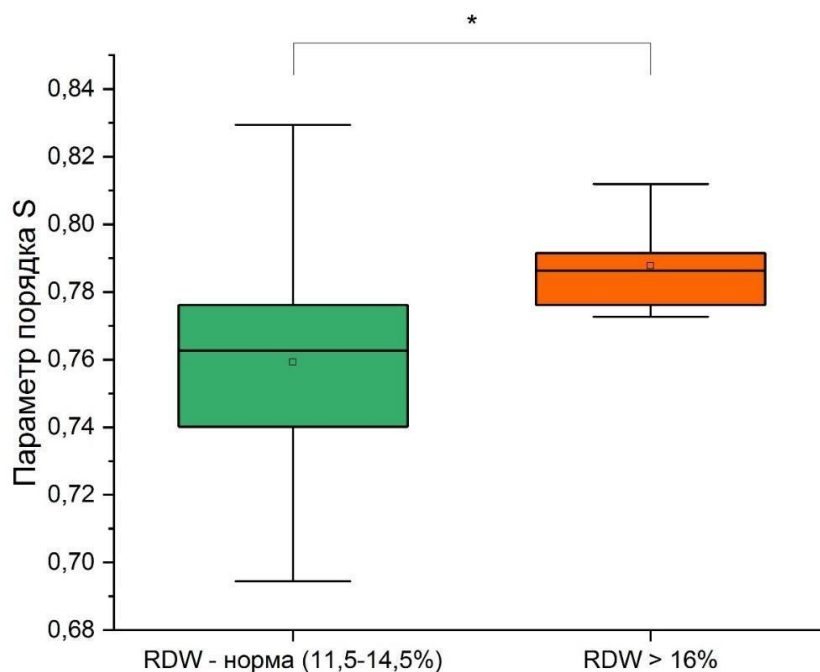


Рисунок 13. Значения параметра порядка в группах с нормальным RDW (11,5 – 14,5 %, N = 27) и повышенным RDW (>16%, N = 8).

Известно, что перекисное окисление мембран сопровождается увеличением их ригидности [188]. В работах [189–191] обсуждается влияние окисления липидов мембран эритроцитов на их физико-химические свойства, в том числе, в условиях определенных патологий. Полагают, что микровязкость мембран возрастает в результате кластеризации липидов. Следовательно, оценка микровязкости мембран эритроцитов с помощью спиновых меток может быть использована для изучения изменений структуры этих мембран под действием различных прооксидантов.

В рамках данной работы были оценены различия в спектрах ЭПР спиновой метки 5DS, встроенной в мембраны эритроцитов, в образцах с добавлением гипохлорита и в контрольных образцах (рисунок 14). При добавлении гипохлорита (в концентрации 0,1 мМ) наблюдалось снижение амплитуды сигнала ЭПР и изменение формы сигнала. Значения параметра порядка для образцов с гипохлоритом (N=7) и контрольных образцов (N=7), соответственно:

$$S = 0,757 \pm 0,005;$$

$$S = 0,772 \pm 0,004.$$

Различия в значениях являлись статистически значимыми (критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$).

Это свидетельствует об уменьшении микровязкости мембран эритроцитов при интенсивном воздействии гипохлорита. Предположительно, такой эффект связан с тем, что при интенсивном окислительном стрессе, моделью которого является реакция системы с добавлением гипохлорита, происходит процесс разрушения клеточной мембраны, что, в свою очередь, приводит к ее более лабильному состоянию, имеющему меньшую микровязкость.

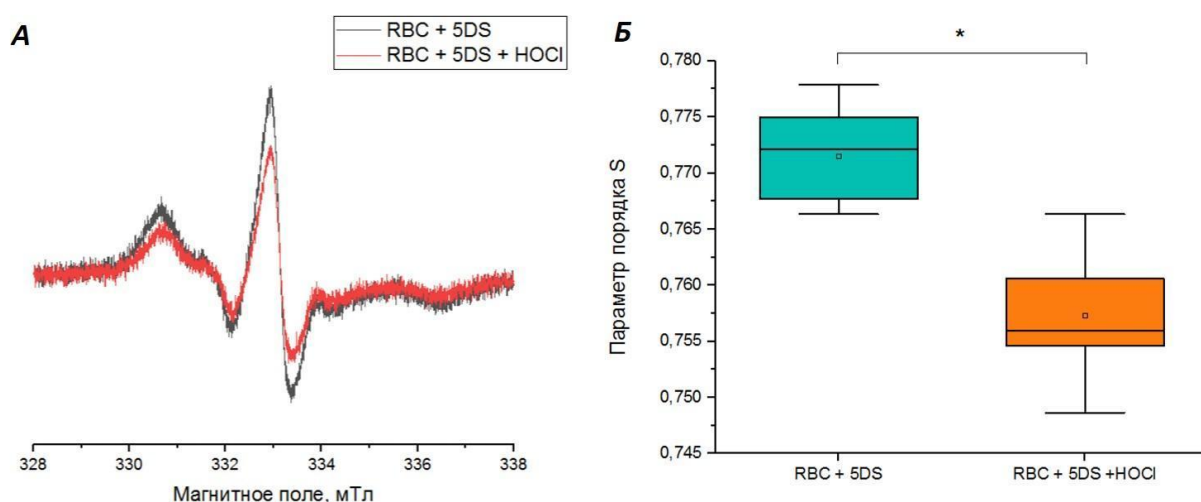


Рисунок 14. А - Спектры ЭПР мембран эритроцитов со спиновой меткой 5DS в контрольных образцах и при гипохлорит-индуцированном гемолизе. Б – Диаграмма размаха значений параметра порядка S в образцах без добавления гипохлорита (N=7) и с добавлением такового (N=7).

3.2. Действие ДНКЖ при гипохлорит-индуцированном гемолизе

Эритроциты в значительной степени подвержены окислительным повреждениям, а также широко используются в качестве модели для изучения общих механизмов повреждения клеток в условиях индуцированного фагоцитирующими клетками окислительного стресса [192]. К настоящему времени продемонстрирована связь между воздействием прооксидантных и антиоксидантных соединений и состоянием мембран эритроцитов [191]. Известно

также, что повреждения мембран, вносимые различными окислителями, и антиоксидантное действие различных соединений и экстрактов возможно оценивать с помощью спиновых меток [191]. Методика подобных экспериментов аналогична описанной в разделе 3.1 данной работы. Это дает основания полагать, что изменения физико-химических характеристик мембран эритроцитов могут отражать процессы, происходящие при окислительном стрессе и перекисном окислении липидов в мембранах этих клеток, а также связанные с их лизисом (гемолизом).

Одним из ключевых окислителей, способных воздействовать на эритроциты в физиологических условиях является гипохлорит-анион (ClO^-) и его протонированная форма – хлорноватистая кислота (HClO). В более раннем исследовании было продемонстрировано защитное действие глутатионовых динитрозильных комплексов железа (GS-ДНКЖ) при вызываемом HClO лизисе эритроцитов из крови человека [192]. 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 (DEA/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. Методом спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (рисунок 15 демонстрирует спектры) определено формирование нитрозилированного по железу гема гемоглобина, обладающего характерным широким сигналом ЭПР (Рисунок 15-II), в модельной среде с эритроцитами, в состав которой входили: глутатион-содержащие динитрозильные комплексы железа, хлорноватистая кислота и DEA/NO . При этом следует отметить, что реакции в такой модельной среде характеризуется меньшей скоростью, нежели в подобной системе, но в которую не был добавлен гипохлорит (Рисунок 15-I). Кроме того, в образцах с гипохлоритом происходит практически 100% распад глутатионовых динитрозильных комплексов железа, характеризующихся узким

пиком в спектре электронного парамагнитного резонанса с $g=2,03$. Вероятно, происходит деструкция глутатионовых динитрозильных комплексов железа с высокой скоростью под действием гипохлорита / хлорноватистой кислоты, что соответствует сведениям из более ранних исследований [186].

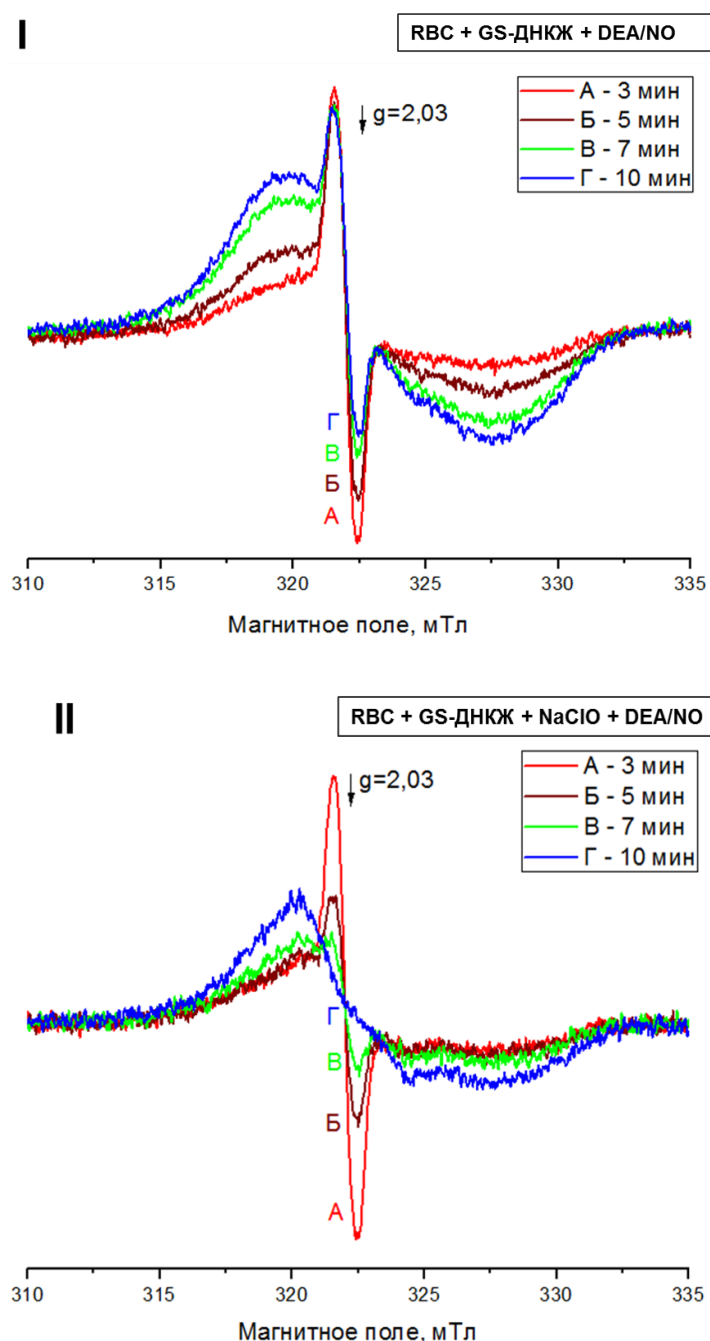
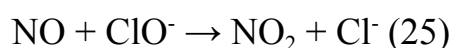
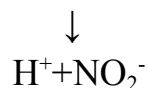
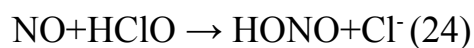


Рисунок 15. Взаимодействие комплексов NO с эритроцитами в интактном состоянии (I) $[GS-ДНКЖ] = 0,8 \text{ мМ}$, $[DEA/NO] = 10 \text{ мМ}$; и при гемолизе под действием NaClO (II), $[GS-ДНКЖ] = 0,8 \text{ мМ}$ $[DEA/NO] = 10 \text{ мМ}$, $[NaClO] = 0,1 \text{ мМ}$). Регистрация спектров ЭПР производилась на Varian E-109E.

Исходя из результатов экспериментов, проведенных в рамках этой диссертационной работы, даже при наличии несвязанного оксида азота, производимого его синтетическим донором DEA/NO, нет регенерации динитрозильных комплексов железа. Также, следует обратить внимание на более высокие значения широкого сигнала ЭПР Hb(II)NO в системе без добавления гипохлорита (Рисунок 15-I), объяснением чего может быть более низкая доступность нитрозилированного гемоглобина для окисления под воздействием HClO / ClO⁻ внутри клетки эритроцита.

В данной системе могут происходить и следующие реакции NO с HClO, описанная в работе [193]:



В случае взаимодействия HClO с NO-лигандами характер реакции может быть иным, поскольку известно, что NO-лиганды ДНКЖ достаточно устойчивы к окислению, вызванному гипохлоритом [192].

В другом эксперименте в настоящей работе продемонстрирован дозозависимый распад в результате воздействия гипохлорита динитрозильных комплексов железа с цистеиновыми остатками гемоглобина в качестве лигандов (Hb-ДНКЖ) (Рисунок 16). Поэтому, если происходит формирование подобных гемоглобиновых динитрозильных комплексов железа в исследуемой здесь среде с эритроцитами, то данные производные монооксида азота не определяются методом спектроскопии ЭПР в связи с тем, что должен иметь место их распад с высокой скоростью.

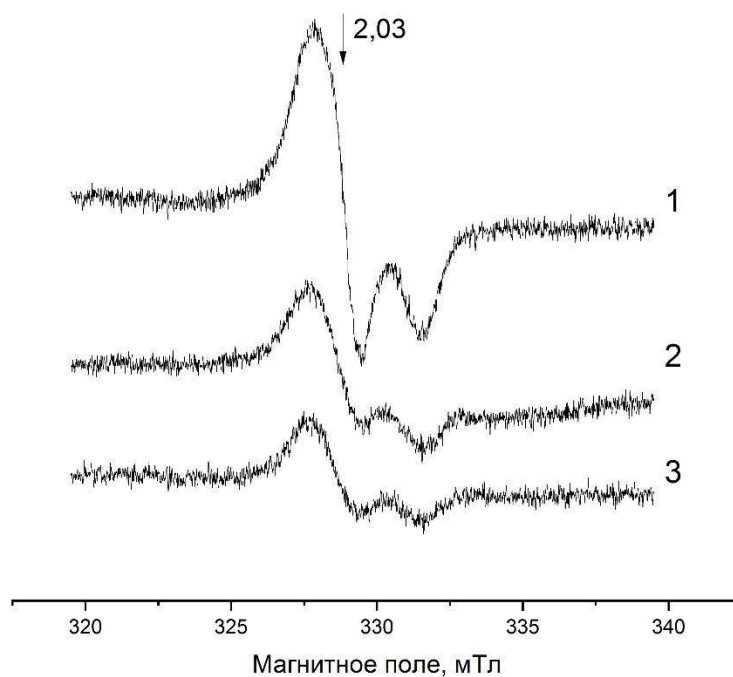


Рисунок 16. Спектры ЭПР гемоглобиновых ДНКЖ ($[\text{Hb-ДНКЖ}] = 0,4 \text{ мМ}$) при различных концентрациях гипохлорита 1) $[\text{ClO}^-] = 0 \text{ мМ}$ 2) $[\text{ClO}^-] = 0,02 \text{ мМ}$ 3) $[\text{ClO}^-] = 0,04 \text{ мМ}$.

Таким образом, антиоксидантные свойства ДНКЖ, а также их защитное действие при индуцированном хлорноватистой кислотой гемолизе могут быть обусловлены непосредственным взаимодействием этих комплексов с HClO , приводящим к распаду ДНКЖ.

3.3 Взаимодействие нитрозильных комплексов гемоглобина (HbNO и Hb-ДНКЖ) с АФК, АФА и АФГ

В модельной системе для проведения реакций, в состав которой входили дезоксиHb, GS-ДНКЖ, а также искусственный молекулярный источник оксида азота (DEA/NO), были обнаружены сигналы электронного парамагнитного резонанса (рисунок 17): пик динитрозильных комплексов железа с $g=2,03$, и широкий сигнал, связанный с нитрозильным комплексом гемового железа в гемоглобине (Hb(II)NO). Нитрозилированный по железу гемовых групп гемоглобин характеризуется широким сигналом ЭПР, являющимся суперпозицией сигналов, связанных с гемовыми группами различных субъединиц гемоглобина, в соответствии с литературными данными [100].

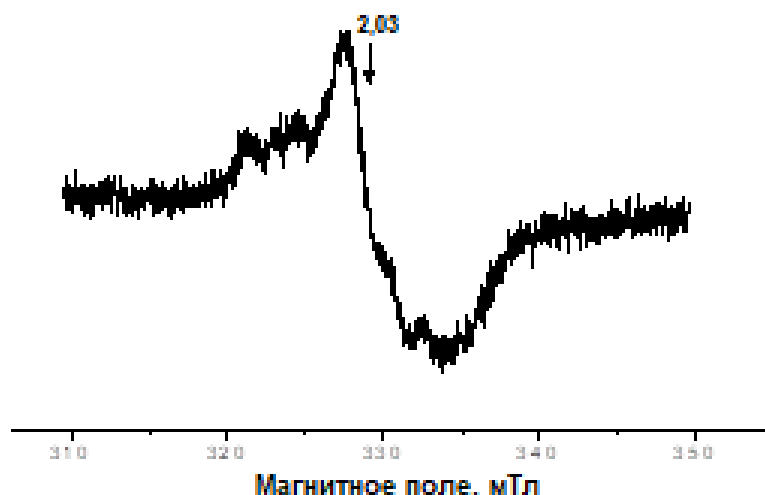


Рисунок 17. Суперпозиция сигналов электронного парамагнитного резонанса нитрозилированного по гемовому железу гемоглобина и гемоглобиновых динитрозильных комплексов железа в образце, содержащем: гемоглобин в концентрации 0,5 мМ, DEA/NO в концентрации 3,2 мМ и дитионит натрия в концентрации 70 мМ.

Похожий спектр ЭПР, являющийся суперпозицией спектров нитрозилированного гемоглобина и, вероятно, низкомолекулярных ДНКЖ, был получен и в несколько другой реакционной системе, которая содержала гемоглобин, DEA/NO в качестве искусственного источника оксида азота, дитионит натрия, пероксинитрит, глутатион (добавленный после перечисленных реагентов) и хелатор железа DTPA (рисунок 18). Так же, как и в предыдущем спектре, наблюдался сигнал нитрозилированного по гемовому железу гемоглобина с g -факторами, равными $g_1 = 2,051$, $g_2 = 2,044$, $g_3 = 2,038$, а также сигнал с $g_0 = 2,03$, исходя из формы сигнала и наличия в реакционной смеси глутатиона, относящийся к GS-ДНКЖ. Далее показано, что в аналогичной смеси без глутатиона данный сигнал отсутствовал, при этом, наоборот, присутствовал характерный «узкий» сигнал, вызванный дитионитом. Можно заметить, что соотношение амплитуд сигналов с $g_1:g_2:g_0 \approx 1:1:1$. При этом, сигналы с $g_1 = 2,051$, $g_2 = 2,044$, $g_3 = 2,038$ могут быть объяснены различиями в сигналах ЭПР от α - и β -субъединиц гемоглобина или наложением сигналов 5- и 6- координированного

гемоглобина, а также во вкладе этих сигналов в суммарный спектр [194]. Кроме того, следует учитывать и сверхтонкую структуру сигнала ЭПР нитрозилированного гемоглобина.

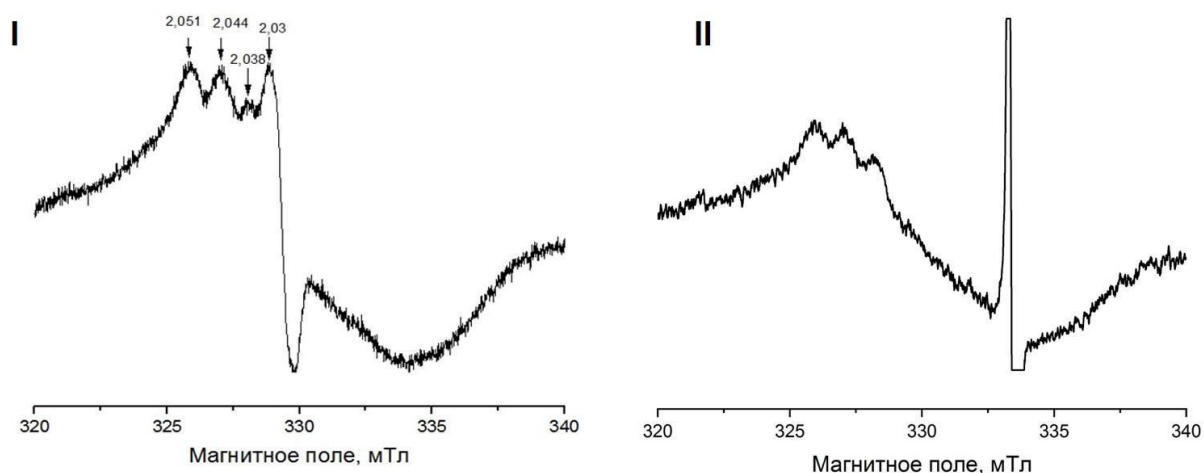


Рисунок 18. I - Спектр электронного парамагнитного резонанса с сигналами Hb(II)NO и ДНКЖ в модельной реакционной смеси с содержанием гемоглобина, донора NO (DEA/NO), дитионита ($\text{Na}_2\text{O}_4\text{S}_2$), пероксинитрита (ONOO), глутатиона GSH (добавленного после пероксинитрита) и хелатора железа DTPA. II – Спектр электронного парамагнитного резонанса образца с аналогичным составом, но без глутатиона.

На экспериментальной модели нитрозативного стресса была рассмотрена реакция гемоглобиновых динитрозильных комплексов железа с пероксинитритом - ключевой АФА. Продемонстрирована количественная деструкция гемоглобиновых динитрозильных комплексов железа под действием ONOO^- , эквивалентная эффекту гипохлорита. На рисунке 19 представлены кинетические кривые распада гемоглобиновых динитрозильных комплексов железа в результате добавления в систему ONOO^- , концентрации которого были взяты в 3 разных значениях, при сопоставлении с контрольной реакционной средой без ONOO^- (верхняя кривая). Возможно, разрушение гемоглобиновых динитрозильных комплексов железа приводит к выделению оксида азота, который, в свою очередь, вызывает формирование нитрозилированного по железу гема Hb. Подобное явление уже было описано ранее как результат распада гемоглобиновых динитрозильных комплексов железа при воздействии $\text{O}_2^{\cdot-}$ [122]. Однако, исходя из

анализа спектров ЭПР, в описываемом опыте не было обнаружено формирование нитрозилированного гемоглобина.

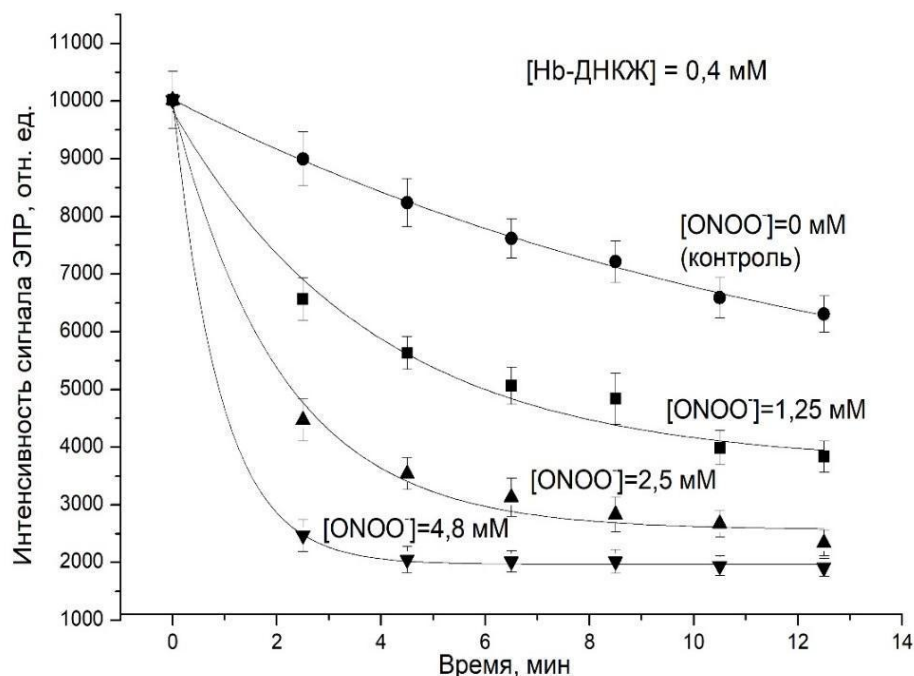


Рисунок 19. Кинетические кривые распада гемоглобиновых динитрозильных комплексов железа под действием ONOO^- (концентрации ONOO^- отмечены на графиках).

То, что $\text{Na}_2\text{O}_4\text{S}_2$ способствует формированию нитрозилированного по гемовому железу гемоглобина под воздействием S-нитрозоглутатиона (GSNO), показано ранее [195]. Вероятно, это связано с восстановлением S-нитрозоглутатиона, которое приводит к продукции несвязанного оксида азота и тиолят-аниона глутатиона (GS^-) в следующей реакции:



В поставленном в данной диссертационной работе эксперименте, был обнаружен сигнал ЭПР нитрозилированной ферроформы гемоглобина в образце, в который последовательно были добавлены метHb, дитионит и S-нитрозоглутатион (Рисунок 20, спектр 1). Помимо этого, сигнал электронного парамагнитного резонанса, характерный именно для $\text{Na}_2\text{O}_4\text{S}_2$, присутствует на

указанном спектре ЭПР. Заслуживает внимания и восстановление метHb до дезоксиHb дитионитом при таких условиях. Если же в эту систему включить еще ONOO^- , это приводит к появлению пика в спектре электронного парамагнитного резонанса с $g=2,03$, характерного для динитрозильных комплексов железа, связанных с глутатионом или цистеиновыми остатками аминокислотной цепи гемоглобина. В таких условиях наблюдается постепенное снижение широкого сигнала ЭПР нитрозилированного железа гема, при этом пик $\text{Na}_2\text{O}_4\text{S}_2$ не обнаруживается с самого начала 10-минутной инкубации реакционной смеси, (Рисунок 20, спектры 2-4). Согласно сведениям из научных статей, HOCl либо ONOO^- могут выделять свободный гем из лизированных эритроцитов [181,196]. Кроме того, известно, что пероксинитрит модифицирует и разрушает группы гема в NO-синтазе и гемоглобине [110,197]. Учитывая как данные этого эксперимента, так и указанные выше сведения из литературы, GSNO, гипотетически, может играть роль не только в нитрозилировании гемоглобина, но и в формировании динитрозильных комплексов железа, при этом нарушение целостности гема в результате влияния ONOO^- выступает для синтеза ДНКЖ в качестве донора Fe. При такой ситуации, подавлять химические превращения, аналогичные реакции Фентона (реакции ионов переходных металлов с гидропероксидами), продуктами которых являются свободнорадикальные соединения, способна стабилизация Fe как компонента динитрозильных комплексов железа.

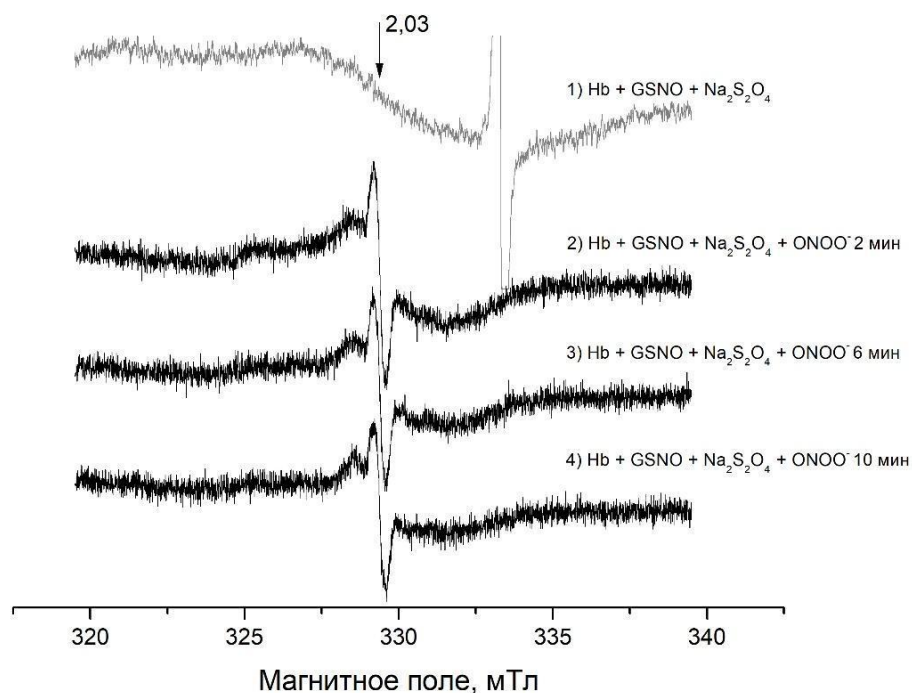


Рисунок 20. Спектры электронного парамагнитного резонанса модельных образцов, в состав которых входили: (1) гемоглобин $[Hb] = 0,5 \text{ мМ}$, S-нитрозоглутатион $[GSNO] = 12 \text{ мМ}$, дитионит натрия $[Na_2S_2O_4] = 70 \text{ мМ}$; (2) – (4) аналогично (1) + пероксинитрит $[ONOO^-] = 8 \text{ мМ}$, через 2 (спектр 2), 6 (спектр 3) и 10 (спектр 4) минут после добавления $ONOO^-$.

Кроме того, было изучено воздействие нитрилхлорида на Hb-ДНКЖ. Нитрилхлорид (NO_2Cl) был синтезирован в результате включения $NaNO_2$ в исходную модельную среду, содержащую Hb-ДНКЖ и гипохлорит. Как показал эксперимент, нитрилхлорид приводит к распаду динитрозильных комплексов с гемоглобином в качестве лиганда. На рисунке 21 приведены спектры электронного парамагнитного резонанса, по которым можно оценить кинетику распада гемоглобиновых динитрозильных комплексов железа в такой реакционной среде.

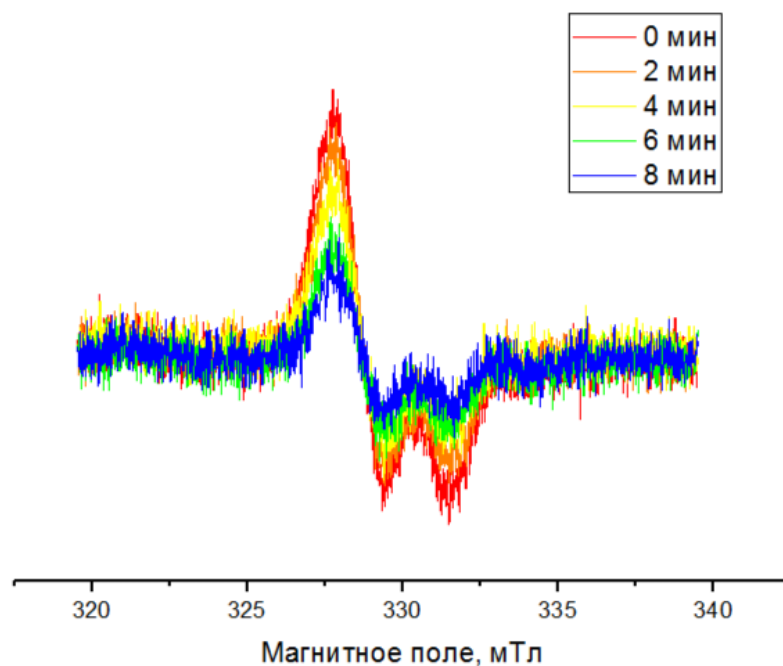


Рисунок 21. Спектры электронного парамагнитного резонанса, демонстрирующие распад гемоглобиновых динитрозильных комплексов железа (в концентрации 0,4 мМ) в результате влияния нитрилхлорида, полученного в системе из гипохлорита, $[\text{NaClO}] = 0,1$ мМ и нитрита натрия $[\text{NaNO}_2] = 10$ мМ.

Из экспериментальных данных, полученных в рамках этой диссертационной работы, следует, что Нв-ДНКЖ способны нейтрализовывать активные формы азота (АФА) или, если быть точнее, активные метаболиты оксида азота. Полученные в ходе этих опытов данные соответствуют известным на настоящий момент сведениям о реакциях с $\text{O}_2^{\cdot-}$ и с ONOO^- динитрозильных комплексов железа, связанных с различными лигандами [122].

Помимо этого, исследовано воздействие HOCl на формирование нитрозилированного по гемовому железу гемоглобина, то есть комплексов оксида азота с железом гема в гемоглобине (Hb(II)NO) в суспензии эритроцитов, полученной согласно методике, описанной в разделе 2.3 настоящей диссертации. Из спектров электронного парамагнитного резонанса (рисунок 22) следует вывод о росте сигнала, характерного для нитрозилированного гемоглобина, во временном интервале 6 минут после включения в суспензию эритроцитов следующих реагентов: NaClO и NaNO_2 , а далее дитионита ($\text{Na}_2\text{O}_4\text{S}_2$).

По-видимому, под действием $\text{Na}_2\text{O}_4\text{S}_2$ происходит восстановление до оксида азота нитрита, в то же время эритроциты лизируются под воздействием ClO^- , что делает гем гемоглобина доступным для нитрозилирования.

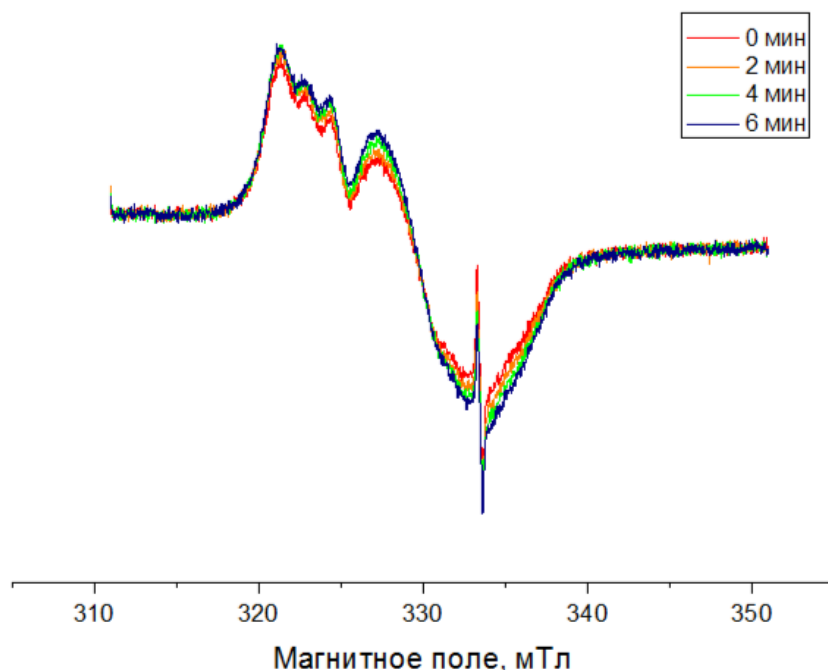
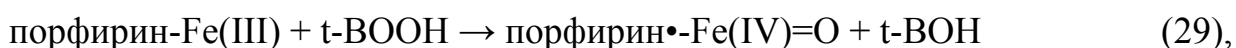
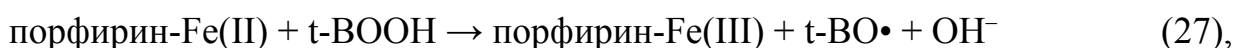
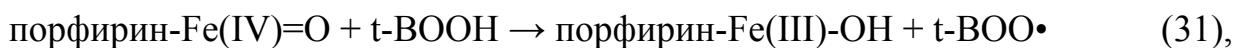


Рисунок 22. Сигнал электронного парамагнитного резонанса нитрозилированного гема гемоглобин в среде с эритроцитами, подвергнутыми воздействию гипохлорита в концентрации 0,1 мМ, кроме того образец содержал нитрит натрия, $[\text{NaNO}_2] = 10$ мМ, и дитионит, $[\text{Na}_2\text{O}_4\text{S}_2] \approx 70$ мМ.

3.4 Взаимодействие ДНКЖ и HbNO с органическими радикалами

Гидропероксид *трет*-бутила (*t*-BOOH) используется для моделирования реакций между гемсодержащими белками и гидропероксидами разного происхождения и химического строения [166,185]. Принятой на текущий момент точкой зрения является то, что образование органических свободных радикалов происходит вследствие взаимодействия *t*-BOOH с гемсодержащими белками [122,170,185]:





Помимо этого, в результате таких химических превращений происходит 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 ПОЛ.

При выполнении данной диссертационной работы по спектрам ЭПР были изучены реакции между Hb или его комплексами с оксидом азота, с одной стороны, и гидропероксидом *трет*-бутила, с другой. В таких реакционных средах было рассмотрено действие GS-ДНКЖ или Hb-ДНКЖ. Свободнорадикальные соединения, продуцируемые в образцах в результате взаимодействия метHb и гидропероксида *трет*-бутила, были определены по сигналам их аддуктов со спиновой ловушкой DEPMPO [184,185]. Рисунок 23 демонстрирует сигналы ЭПР этих спиновых аддуктов. По анализу сигналов аддуктов DEPMPO, проведенному на основе описанного ранее в литературе подхода [185], определено, что среди сигналов ЭПР, связанных с присутствующими в этой реакционной смеси свободнорадикальными соединениями, сигнал с наибольшей амплитудой относится к алкоксильному радикалу (или, конкретно в данном случае, *трет*-бутоксильному радикалу, *t*-BO $\cdot$). Это свидетельствует о его наибольшей концентрации по сравнению с другими органическими радикалами. Также, в этой модельной системе обнаружен метилпероксильный радикал (CH₃OO $\cdot$) (реакция 32).

При добавлении к исследуемой реакционной системе GS-ДНКЖ (рисунки 23 и 24, панель *A*) и особенно Hb-ДНКЖ (часть *B* на рисунках 23 и 24,), значимо (статистическая достоверность определена с применением U-критерия Манна – Уитни, $P < 0,05$) уменьшается концентрация описанных выше соединений свободнорадикального характера, которые образуются в реакциях 27-33. При

молярной пропорции динитрозильных комплексов железа к гидропероксиду *трет*-бутила $\sim 1:9$ (молярная пропорция гемоглобина к гидропероксиду *трет*-бутила, в свою очередь, была 1:4) имело место значительное снижение сигнала ЭПР аддуктов свободных радикалов (рисунок 23). Вероятным объяснением этого может быть взаимодействие алкилпероксильных либо алкоксильных радикалов, с одной стороны, и NO-лигандов динитрозильных комплексов железа, с другой. Прерывание цепных реакций ПОЛ вместе с продукцией нитролипидов как следствие взаимодействия оксида азота и липидных свободнорадикальных производных является еще одной важной деталью предположительного механизма действия ДНКЖ как ингибиторов ПОЛ. Возможно, в поставленных в рамках данной диссертационной работы опытах, в результате разрушения динитрозильных комплексов железа происходит выделение NO. Из предыдущих работ по данной тематике известно, что GS-ДНКЖ действуют как восстановитель в отношении гема Mb в оксоферрильной форме, а также нейтрализуют свободнорадикальные соединения, которые образуются в результате реакций гидропероксида *трет*-бутила и миоглобина [170].

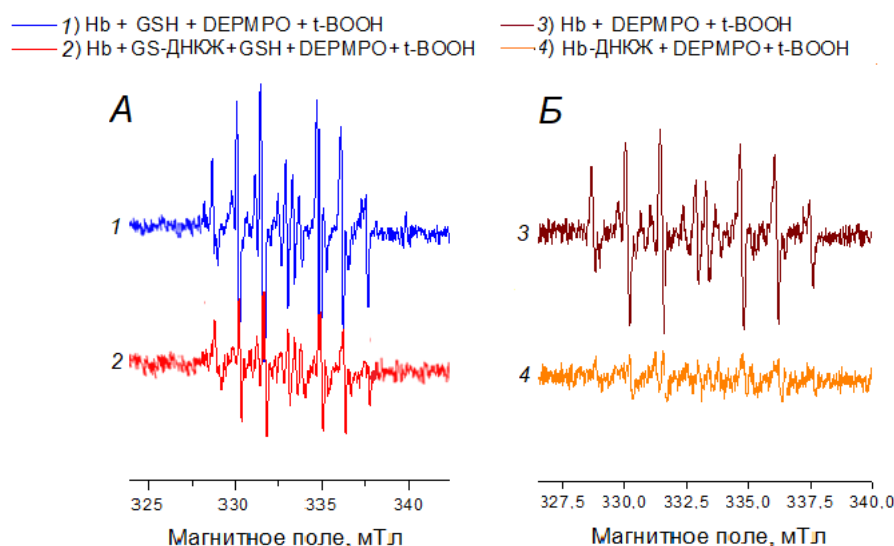


Рисунок 23. Сигналы электронного парамагнитного резонанса от спиновых аддуктов DEPMPO с различными радикалами. Часть А: образец 1) содержал:

гемоглобин (Hb) в концентрации 0,25 мМ, 2 мМ глутатиона (GSH), DEPMPO в концентрации 0,05 М, 4 мМ гидропероксида *трет*-бутила (*t*-BOOH), образец 2): Hb, GSH, DEPMPO, *t*-BOOH - в тех же концентрациях + 0,75 мМ глутатионовых динитрозильных комплексов железа; часть *Б*: образец 3) гемоглобин в концентрации 0,3 мМ, DEPMPO - 0,07 М, *t*-BOOH в концентрации 1 мМ; образец 4): динитрозильные комплексы железа, связанные с гемоглобином в концентрации 0,3 мМ, концентрации DEPMPO и гидропероксида *трет*-бутила как и в образце 3).

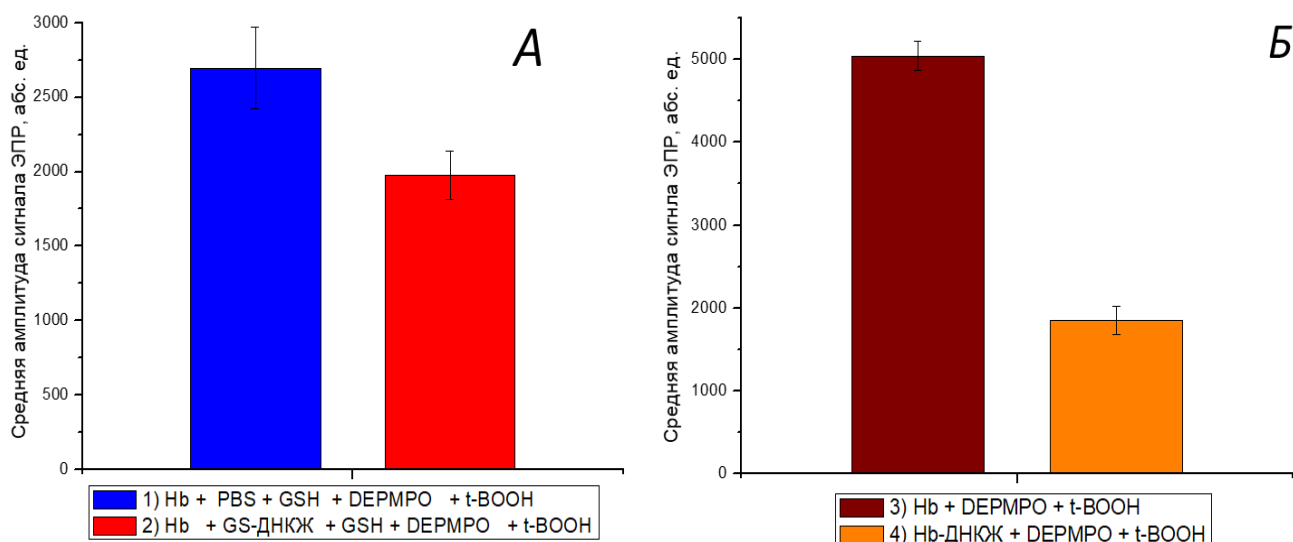
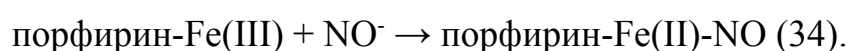


Рисунок 24. Гистограммы, демонстрирующие антиоксидантный эффект ДНКЖ по снижению амплитуды сигнала спиновых аддуктов DEPMPO: (*А*) - глутатионовых ДНКЖ в комбинации с восстановленным глутатионом и (*Б*) - ДНКЖ, связанных с гемоглобином. Состав образцов: 1) 0,25 мМ гемоглобина (Hb), 2мМ глутатиона (GSH), DEPMPO в концентрации 0,05 М, 4 мМ гидропероксида *трет*-бутила (*t*-BOOH); 2) гемоглобин, глутатион, DEPMPO, гидропероксид *трет*-бутила в концентрациях как в образце 1) + 0,75 мМ глутатионовых ДНКЖ; 3) 0,3 мМ гемоглобина, DEPMPO в концентрации 0,07 М, 1 мМ гидропероксида *трет*-бутила; 4) ДНКЖ, связанные с гемоглобином, в концентрации 0,3 мМ, гидропероксид *трет*-бутила и DEPMPO как и в образце 3).

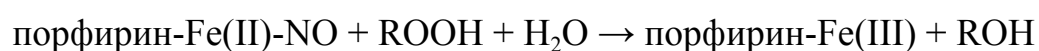
При этом, следует обратить внимание, что показанное в данной реакционной системе антиоксидантное действие глутатионовых динитрозильных комплексов железа может быть вызвано собственно глутатионом в восстановленном виде (GSH). Глутатион как тиолят-анион (GS-) является компонентом глутатионовых динитрозильных комплексов железа. Помимо этого, GSH был включен в исследуемые образцы с избытком для того, чтобы сохранять моноядерное состояние глутатионовых динитрозильных комплексов железа.

Тем не менее, полученные результаты позволяют заключить, что в экспериментальной модели перекисного окисления с участием свободных радикалов антиоксидантные свойства динитрозильных комплексов железа, во-многом, обусловлено входящими в их состав NO-лигандами.

Нитрозилирование гемоглобина по гемовому железу (сигнал электронного парамагнитного резонанса Hb(II)NO представлен на рисунке 25) обладает ещё более сильным антиоксидантным действием (Рисунок 26). Для нитрозилирования гема метгемоглобина был использован оксогипонитрит натрия (второе название - соль Анджели, является синтетическим донором нитроксила / нитроксильного аниона - HNO/NO^-), добавленный к реакционной среде с Hb-Fe(III). По сравнению с реакцией (14), при таких условиях имеет место восстановление гема до формы Hb-Fe(II).и его нитрозилирование, т.е. продукция Hb-Fe(II)NO (Рисунок 25):



При включении *t*-BOOH и DEPMPO в исследуемую модельную среду не обнаружено сигналов ЭПР спиновых аддуктов с этой спиновой ловушкой (Рисунок 26, нижний спектр). В контрольном образце, содержащем раствор Hb-Fe(III). и не содержащем оксогипонитрит натрия, такие сигналы ЭПР присутствовали (Рисунок 26, верхний спектр). Вероятным объяснением этого может быть действие Hb(II)NO как восстановителя в отношении гидропероксида *трет*-бутила аналогично продемонстрировано ранее действию Mb(II)NO в сходных условиях [172], при этом продуктом реакции Mb(II)NO и органических гидропероксидов являются Mb(III) и нитрит:



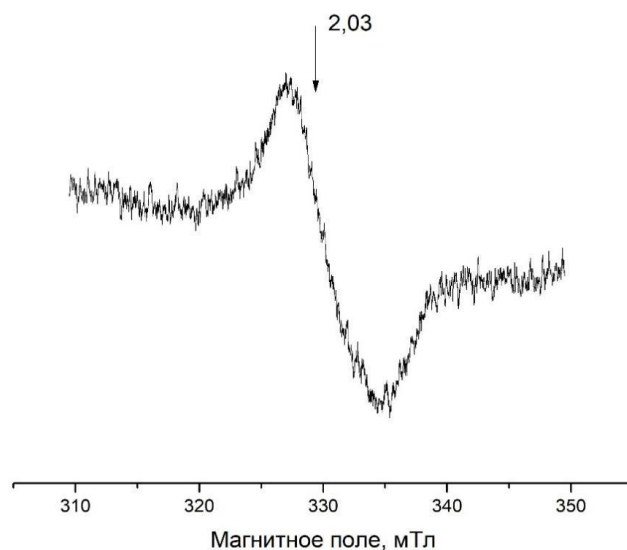


Рисунок 25. Сигнал электронного парамагнитного резонанса нитрозированной ферроформы гемоглобина, которая получена с помощью 12 мМ оксогипонитрита натрия (соли Анджели), включенного в реакционную среду с 0,3 мМ метгемоглобином (Hb(III)).

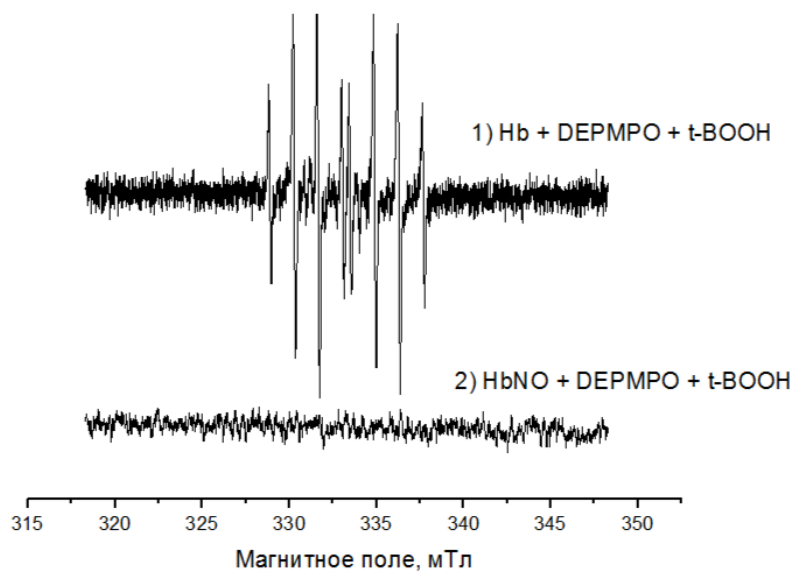


Рисунок 26. Спектры ЭПР, демонстрирующие антиоксидантный эффект нитрозилирования гемоглобина (в качестве донора нитроксила использован оксогипонитрит натрия) в реакционной среде с *t*-BOOH. Реакционная среда 1) содержала: 0,3 мМ гемоглобина, DEPMPO в концентрации 70 мМ, 2 мМ гидропероксида *трет*-бутила. Реакционная среда 2) была получена следующим

образом: сначала гемоглобин был нитрозилирован добавлением к раствору метгемоглобина оксогипонитрита натрия (12 мМ), затем к образцу добавляли DEPMPO и *t*-BOOH в конечной концентрации 70 мМ и 2 мМ, соответственно.

Другим важным гемопротеином, занимающим существенное место в процессах окислительного стресса и ПОЛ является цитохром *c*, который, как известно также проявляет пероксидативную активность в отношении различных субстратов и участвует в перекисном окислении митохондриальных мембран [168,198]. Неорганические или органические пероксиды могут провоцировать апоптоз, и цитохром *c* может участвовать в этом не только в качестве фактора активации каспаз, как это было уже упомянуто выше, но также и распространением пероксидативного повреждения. Исследования реакции органических гидропероксидов, таких как *t*-BOOH, с цитохромом *c* при помощи спектроскопии ЭПР и с использованием спиновых ловушек показывают, что цитохром *c* катализирует образование пероксильных, алкоксильных и алкильных радикалов [198] которые могут вызывать дальнейшие повреждения биомолекул и субклеточных структур.

В рамках данной работы в экспериментах на модельных реакционных системах рассмотрено взаимодействие цитохрома *c* с гидропероксидом *трет*-бутила при добавлении ДНКЖ с лигандом глутатионом. Реакционная система представляла собой 1 мМ раствор цитохрома *c* (Sigma-Aldrich) в фосфатном буфере (0,2 М, pH $\approx$ 7,5). Образование пероксильных, алкоксильных радикалов оценивалось при помощи спиновой ловушки DEPMPO. Рисунок 27 демонстрирует спектры электронного парамагнитного резонанса спиновых аддуктов DEPMPO, в то время как рисунок 28 – кинетику распада спинового аддукта DEPMPO в различных реакционных средах. Установлено, что при добавлении к этим реакционным системам глутатионовых динитрильных комплексов железа, они показали антиоксидантное и антирадикальное действие, которое возрастало при увеличении концентрации GS-ДНКЖ, а также при добавлении вместе с GS-ДНКЖ избытка глутатиона. Данные результаты аналогичны полученным в системе с гемоглобином.

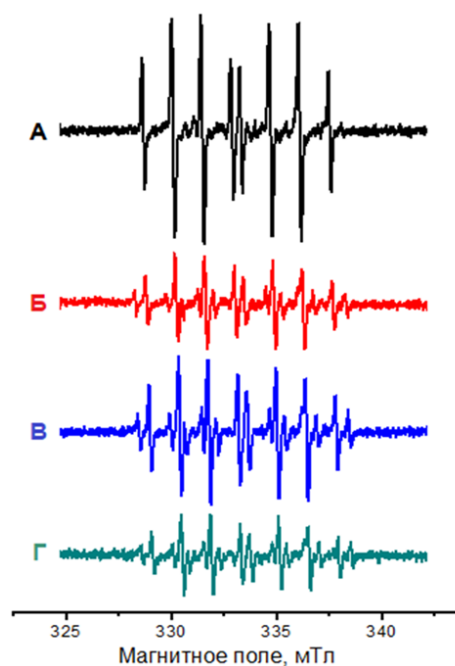


Рисунок 27. Спектры ЭПР аддуктов DEPMPO в различных реакционных системах. А: Cyt *c* + PBS + DEPMPO + *t*-BOOH; Б: Cyt *c* + GS-ДНКЖ + DEPMPO + *t*-BOOH; В: Cyt *c* + PBS + GSH + DEPMPO + *t*-BOOH; Г: Cyt *c* + GS-ДНКЖ + GSH + DEPMPO + *t*-BOOH.

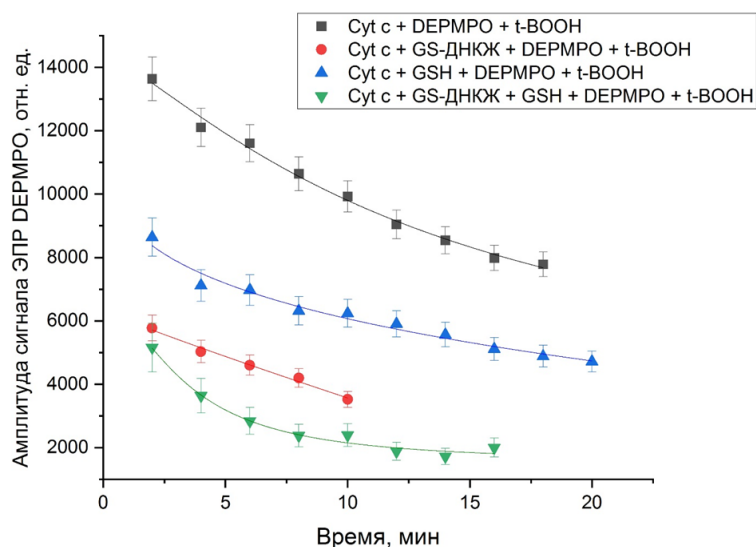


Рисунок 28. Кинетические кривые, демонстрирующие изменение (уменьшение) уровня спинового аддукта DEPMPO в модельных средах, в состав которых входили цитохром *c* и гидропероксидом *трет*-бутила в контрольных образцах и при добавлении антиоксидантов - ДНКЖ с глутатионом в качестве лиганда и/или собственно GSH.

3.5 Антиоксидантное действие ДНКЖ в экспериментах с липосомами и липопотеинами низкой плотности

К текущему моменту достаточно хорошо изучено важная место окислительных повреждений липопотеидов низкой плотности (ЛПНП) в патологических механизмах различных заболеваний [199–203]. В дополнение к этому, продемонстрировано антиоксидантное функционирование различных доноров NO в процессах ПОЛ, особенно в отношении ЛПНП [199,201]. В рамках данной работы было изучено воздействие ДНКЖ с глутатионовыми и фосфатными лигандами при свободнорадикальном окислении ненасыщенных липидов в ЛПНП, инициированном ионами Cu^{2+} (Рисунок 29).

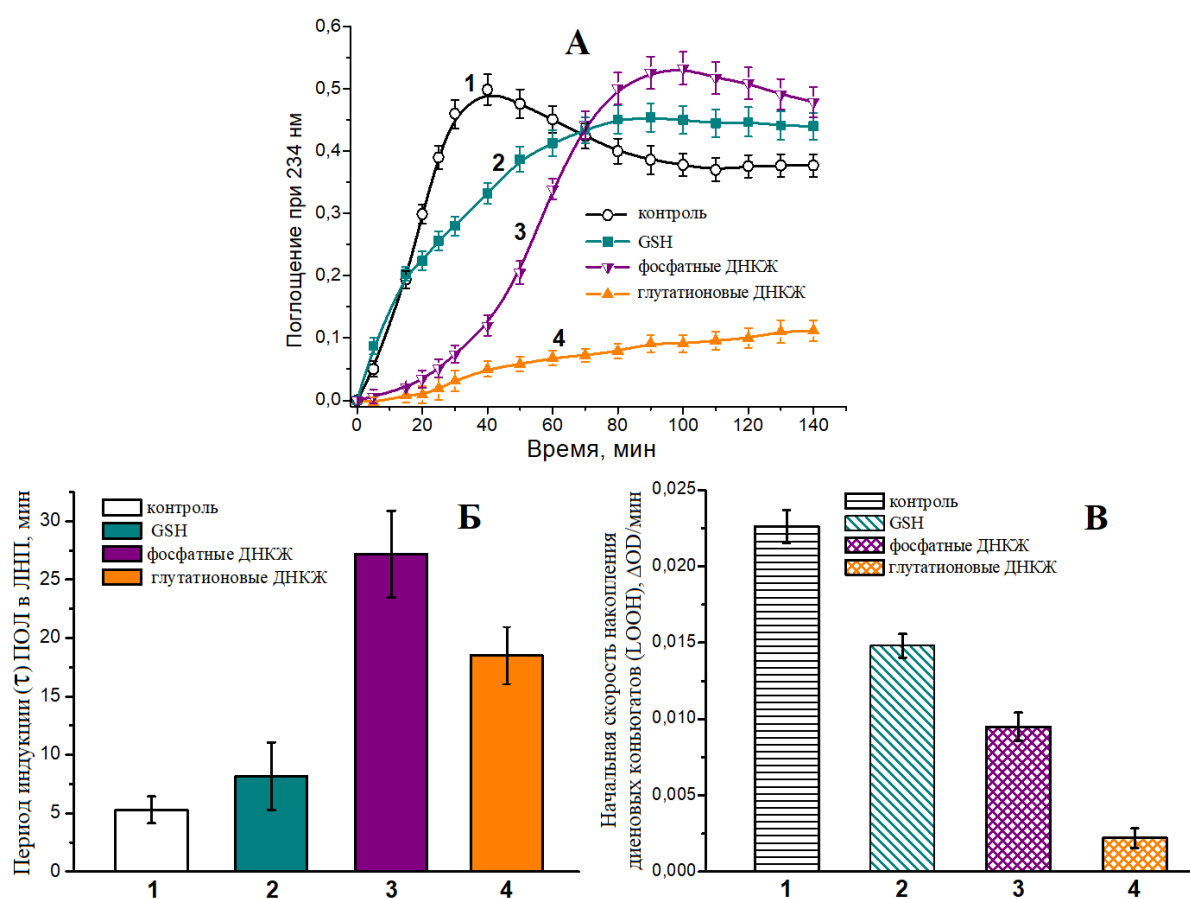
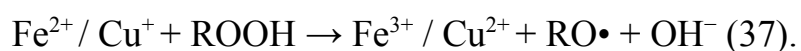
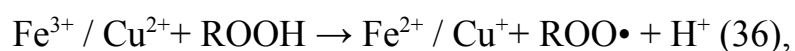


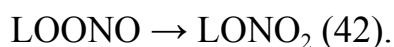
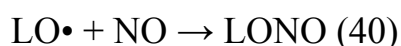
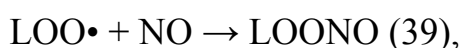
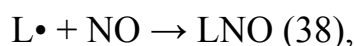
Рисунок 29. Воздействие динитрозильных комплексов железа с различными лигандами и восстановленного глутатиона (GSH) на процесс перекисного окисления ЛПНП. Кинетические кривые ПОЛ (панель А): (1) — окисление ЛПНП (50 мкг белка/мл) при наличии CuSO_4 в концентрации 30 мкМ; (2) — аналогично (1) + 45 мкМ GSH; (3) — аналогично (1) + фосфатные ДНКЖ в концентрации 20

мкМ; (4) — аналогично (1) + глутатионовые ДНКЖ в концентрации 20 мкМ. Температура инкубации составляла 37°C. Все варианты реакционной смеси были подготовлены на основе 50 мМ K₂Na-фосфатного буфера (с pH 7,4). Действие ДНКЖ и GSH на период индукции (τ) (панель Б) и начальную скорость (панель В) перекисного окисления в ЛПНП. Нумерация столбиков соответствует нумерации кривых на панели А.

Перекисное окисление ЛПНП измерялось по накоплению его первичных продуктов по методике, описанной выше в разделе 2.5. Как можно увидеть по кинетическим кривым и гистограммам, представленным на рисунке 29, в таких модельных средах с ЛПНП, эффекты ДНКЖ с различными лигандами имеют существенные различия. В проведенных экспериментах определено, что динитрозильные комплексы железа с лигандом глутатионом (при концентрации 20 мкМ) приводят к выраженному снижению накопления липогидропероксидов в ЛПНП. При этом эффективность таких комплексов (Рисунок 29, кривая 4) превосходит действие глутатиона в свободной форме (Рисунок 29, кривая 2). Это вполне соответствует полученным ранее результатам, согласно которым ДНКЖ с лигандом глутатионом обладают большей способностью предотвращать лизис эритроцитов, вызванный посредством добавления хлорноватистой кислоты, по сравнению со свободным глутатионом [192]. Фосфатные ДНКЖ первоначально проявляли антиоксидантный эффект, ингибируя процессы окисления ЛНП, однако со временем их защитное действие ослабевало (Рисунок 29, кривая 3). Через 70 минут инкубации ЛНП с этим типом комплексов отмечался переход их эффекта от антиоксидантного к прооксидантному. Нестабильность фосфатных ДНКЖ, возможно, вызывает подобное изменение их действия. Предположительно, ионы Fe³⁺, которые выделяются в результате разрушения ДНКЖ, таким же образом, как и Cu²⁺, способны стимулировать процессы перекисного окисления липидов:



Как известно, при фентоновской реакции (подобно 36-й) ионами железа осуществляется разложение H_2O_2 , одним из продуктов которого является весьма опасный прооксидант - гидроксильный радикал ($\text{HO}\cdot$), а другим - анион гидроксила OH^- . Антиоксидантные и антирадикальные эффекты NO могут быть объяснены в том числе купированием этих реакций за счет связывания и вхождения ионов Fe^{2+} в состав динитрозильных комплексов железа [204]. При этом, испускание несвязанного оксида азота должно происходить, в свою очередь, при разрушении динитрозильных комплексов железа. Цепи реакций перекисного окисления липидов могут быть прерваны, как принято считать, через взаимодействие NO с липидными алкильными ($\text{L}\cdot$), алкилпероксильными ($\text{LOO}\cdot$) и алкоксильными радикалами ($\text{LO}\cdot$) [31,122,181,199,201,205]:



В диапазоне $10^9 - 10^{11} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, по литературным данным, находятся, скоростные константы реакций 38-40 [181,199]. Эта величина конкретно для реакции 39 примерно равна $\sim 3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, в же то время у взаимодействия $\text{LOO}\cdot$ и такого известного липофильного антиоксиданта, как α -токоферол (витамин E), значение этой константы на 3 порядка ниже ($k = 2,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). При этом, существуют сведения о том, что NO и α -токоферол, обладающий доказанным антиоксидантным эффектом в отношении ЛПНП, могут быть, при определенных условиях, кооперативными антиоксидантами [199]. После формирования своего рода органического эквивалента пероксинитрита при реакции 39, следует его гомолиз с разделением на алкоксильный радикал и диоксид азота (реакция 41) либо преобразование до нитролипидов (реакция 42), а выход этих двух реакций составляет, по литературным сведениям, $\sim 14\%$ (для 41) и $\sim 86\%$ (для 42) [31]. Продукция нитролипидов (LNO_2), обладающих физиологическим действием,

имеет место и в результате взаимодействия алкильных радикалов ($L\cdot$) и $\cdot NO_2$ (двуокиси азота).

Чтобы оценить количественно результативность эффекта различных динитрозильных комплексов железа в качестве антиоксидантов использовались такие кинетические параметры как период индукции перекисного окисления липидов (лаг-период или τ) и начальная скорость образования гидропероксидов липидов (диеновых конъюгатов) в ходе этого окисления. Известно, что период индукции ПОЛ (τ) прямо пропорционален концентрации ингибитора свободнорадикального окисления (антиоксиданта) в системе – $[InH]$ и обратно пропорционален скорости инициации этого процесса – ω , т.е. $\tau = [InH]/\omega$ [206]. В использованной нами системе Cu^{2+} -индуцированного окисления ЛПНП с неизменным составом липидов ω является величиной постоянной, исходя из чего τ должен быть пропорционален концентрации антиоксиданта (или его активности). На рисунке 29Б представлены данные о продолжительности τ свободнорадикального перекисного окисления в ЛПНП. Как видно из этого рисунка, при добавлении фосфатных или глутатионовых ДНКЖ продолжительность τ возрастает, соответственно, в ~ 5 и $\sim 3,5$ раза ($p < 0,05$, критерий Манна-Уитни). В этом случае большая эффективность фосфатных ДНКЖ может быть связана с быстрым высвобождением из них NO , причём в начале Cu^{2+} -индуцированного окисления ЛПНП. В дальнейшем, как уже отмечалось, антиоксидантное действие этих ДНКЖ сменялось на прооксидантное. В то же время, величина τ для восстановленного глутатиона достоверно не отличалась от контроля.

Вместе с тем, начальная скорость накопления гидропероксидов липидов под действием глутатионовых ДНКЖ снижается почти на порядок (рисунок 29В), тогда как фосфатные комплексы ингибируют этот процесс только в 2,4 раза. Эти результаты свидетельствуют, что именно GS-ДНКЖ наиболее эффективно обрывают цепные реакции ПОЛ.

Сведениям о способности динитрозильных комплексов железа с тиоловыми лигандами нейтрализовывать свободнорадикальные соединения, формирующиеся

в результате разрушения *t*-BOOH, а также подавлять как реакции перекисного окисления липидов на образцах гомогената крысиной сердечной мышцы, так и совместное окисление β -каротина и арахидоновой кислоты [122], соответствует существенный антиоксидантный эффект ДНКЖ с тиоловыми лигандами в системе с ЛПНП, продемонстрированный в представленных здесь экспериментах.

Стимулятором ПОЛ при его рассмотрении на ЛПНП и липосомах является глюкоза [200]. В рамках диссертационной работы в экспериментальной среде, которая моделирует перекисное окисление в условиях гипергликемии [200], рассмотрены потенциальные антиоксидантные эффекты динитрозильных комплексов железа. С данной целью было применено соокисление лецитиновых (фосфатидилхолиновых) липосом с глюкозой. При помощи свободных радикалов, которые выделяются (реакции 22-23) в результате разложения азоинициатора (AIBN), в такой модельной системе было вызвано ПОЛ.

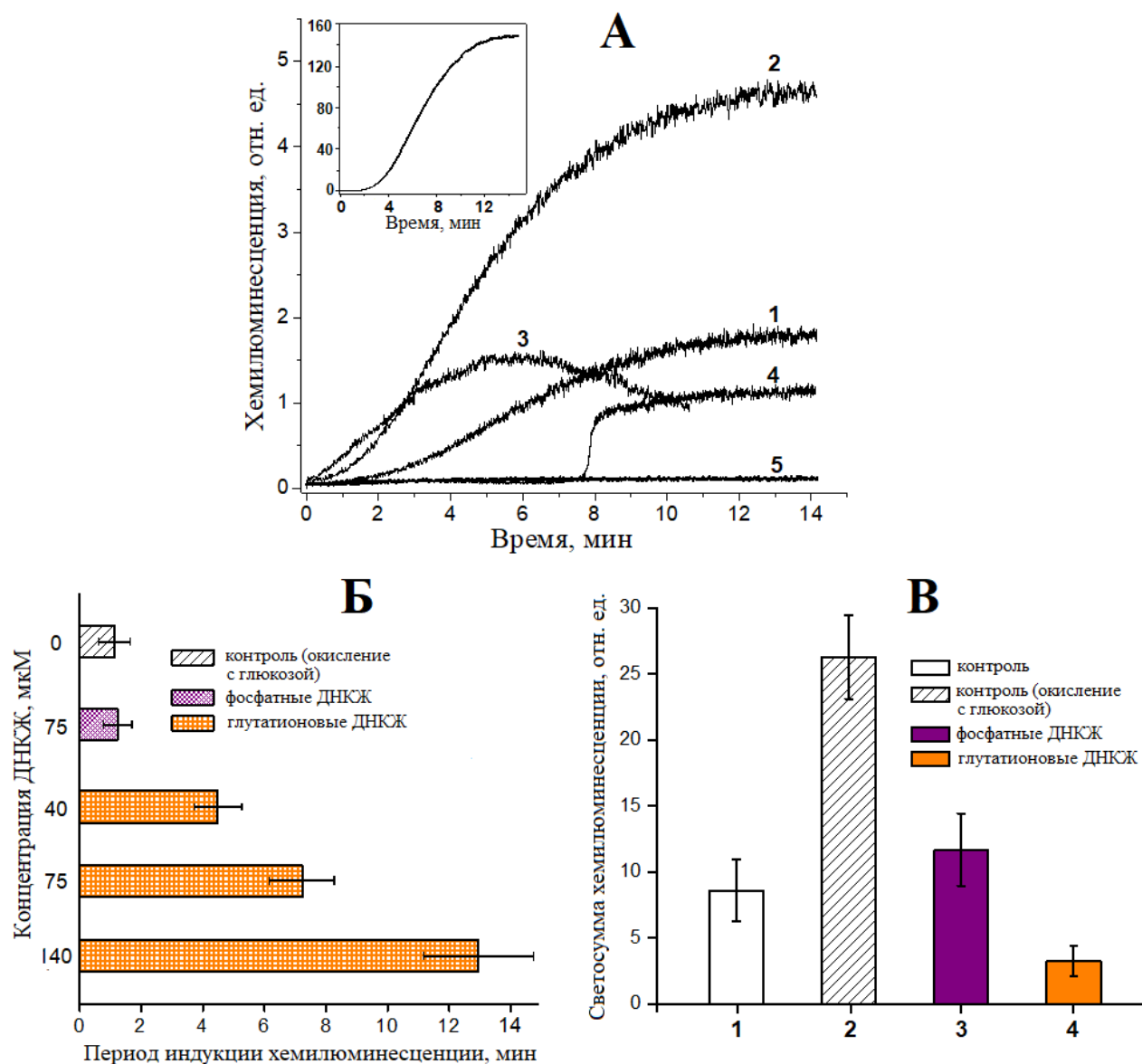


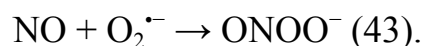
Рисунок 30. Кривые хемилюминесценции (А): (1) — окисление липосом, полученных из AIBN и лецитина; (2) — реакционная система, аналогичная (1) + глюкоза в концентрации 12,5 мМ (совместное окисление глюкозы и липосом); (3) — аналогично (2) + фосфатные динитрозильные комплексы железа в концентрации 75 мкМ; (4) — аналогично (2) + глутатионовые динитрозильные комплексы железа - 75 мкМ; (5) — то же, что (2) + 120 ед./мл СОД. График на врезке демонстрирует кривую для системы, аналогичной (2) + PAPA/NONO в концентрации 150 мкМ. Действие динитрозильных комплексов железа в отношении длительности периода индукции (Б) и светосуммы (В) хемилюминесценции при свободнорадикальном окислении липосом. Нумерация

столбиков в гистограмме на панели **В** соответствует нумерации кривых на панели **А**. Светосумму S рассчитывали как площадь под кривой хемилюминесценции, записанной в течении 10,5 мин инкубации реакционной среды.

В ходе экспериментов были получены кинетические кривые хемилюминесценции люминола, наблюдаемой в результате соокисления липосом, сформированных из яичного фосфатидилхолина по методике, описанной в разделе 2.5, и глюкозы (Рисунок 30А). Из анализа кривых хемилюминесценции следует, что динитрозильными комплексами железа с лигандом глутатионом в такой модельной среде уменьшается концентрация свободных радикалов, которые образуются при совместном окислении полиненасыщенных липидов и глюкозы, а также пропорционально увеличению дозы ДНКЖ удлиняется период индукции (лаг-период) хемилюминесценции, которая является индикатором окисления (Рисунок 30А, Б). Фосфатные динитрозильные комплексы железа тоже снижают концентрацию свободнорадикальных соединений, однако на длительность периода индукции хемилюминесценции не оказывают никакого воздействия (рисунок 30Б). Кроме того, для количественной оценки продукции свободных радикалов рассчитывали светосумму S (выход) хемилюминесценции в течении первых 10,5 мин инкубации (рисунок 30В). Установлено, что фосфатные и глутатионовые ДНКЖ в концентрации 75 мкМ снижают светосумму приблизительно в 2,25 и 8,1 раза, соответственно, по сравнению с контрольными образцами, содержащими глюкозу ($p < 0,05$, критерий Манна-Уитни).

Согласно литературным данным, в реакции с различными низкомолекулярными углеводами, приводя к их дроблению и окислению, вступают алкилпероксильные и алкоксильные радикалы [200,202,203]. Образование $O_2^{\cdot-}$ либо $HO_2^{\cdot}$ (пероксильного радикала) является результатом таких химических превращений и ассоциированного с ними гликозилирования (без участия ферментов) аминокислот в составе белков [200,203]. Близкое к полному подавление хемилюминесценции люминола утилизирующим супероксид ферментом супероксиддисмутазой (СОД), при его добавлении в среду в опытах, поставленных в рамках настоящей диссертационной работы, свидетельствует о

генерации в данных экспериментах этого свободного радикала (Рисунок 30А, линия 5). Вероятно, динитрозильные комплексы железа при экспериментах с исследуемой средой также нейтрализуют анион супероксида, что соответствует известным из ряда работ сведениям [122,177,181]. При этом, непосредственное воздействие ДНКЖ на образование супероксида как такового, тоже не следует исключать. В то же время, резко повышал хемилюминесценцию несвязанный оксид азота, образование которого происходит при распаде его искусственного донора PAPA/NONO (кривая 6 на рисунке 30А). Продукция ONOO^- при диффузно-контролируемом взаимодействии оксида азота с $\text{O}_2^{\bullet-}$ (с константой реакции, равной $1,9 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) способна объяснить подобный прооксидантный эффект оксида азота, наблюдаемый при соокислении липосом и глюкозы [207]:



Результатом протонирования ONOO^- становится его разрушение с образованием как $\text{OH}^\bullet$ и $^\bullet\text{NO}_2$, которые относятся к числу весьма сильных окислителей. Заслуживает внимания то, что процессы, ведущие к усилению генерации как пероксинитрита, так и супероксида способны играть существенную роль в патогенезе диабетических нарушений работы эндотелия кровеносных сосудов [62]. В некоторых работах демонстрируется повышенное образование аниона супероксида под влиянием фермента ксантиноксидазы и митохондрий в условиях ишемии с последующим восстановлением кровотока - реперфузией [29,208]. При этом, также известно разрушение под действием $\text{O}_2^{\bullet-}$ динитрозильных комплексов железа с гемоглобиновыми или альбуминовыми лигандами [122,181] и действие глутатионовых динитрозильных комплексов железа как перехватчиков супероксида, который был образован выделенными из крысиных сердец митохондриями [177]. Во втором из этих экспериментов было выявлено, что сигнал ЭПР продукта взаимодействия супероксида с TIRON, часто применяемой для детекции этой активной формы кислорода спиновой ловушкой, уменьшается под воздействием GS-ДНКЖ. Семихинон (химическая форма, являющаяся свободным радикалом) данной спиновой ловушки способен взаимодействовать либо непосредственно с динитрозильными комплексами

железа, либо с образующимися в результате их деструкции соединениями, что также следует учитывать. Поэтому, нельзя утверждать, что полностью выяснены механизмы реакций динитрозильных комплексов железа и супероксидного радикала. В настоящей работе, аналогично исследованиям проведенным ранее [122,181] была использована система, состоящая из ксантина и фермента ксантиноксидазы, с целью продукции анион-радикала супероксида. Посредством использования люцигенина, являющегося более избирательным индикатором супероксидного радикала при хемилюминесценции по сравнению с люминолом, были измерены кинетические кривые образования супероксида в этой системе [209].

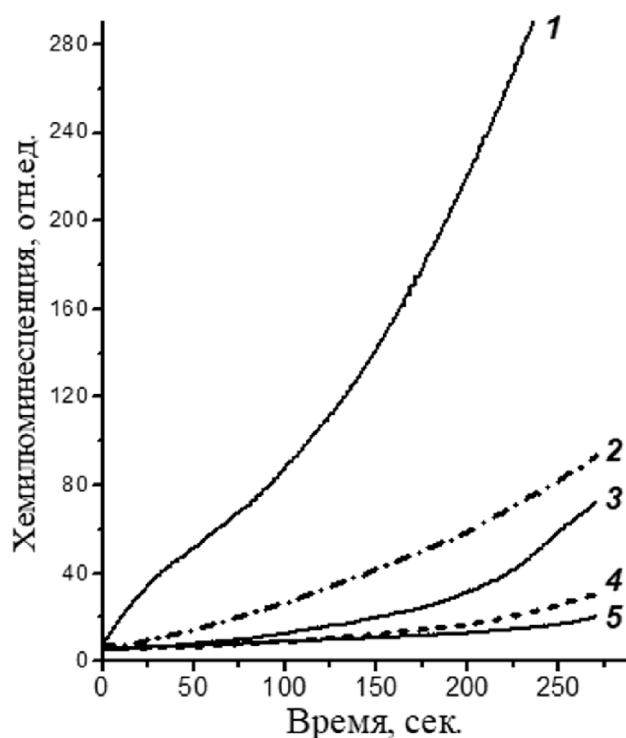


Рисунок 31. Воздействие глутатиона и GS-ДНКЖ на кинетические параметры хемилюминесценции люцигенина при образовании супероксида в ксантин-ксантиноксидазной ферментативной реакционной системе. Состав данной модельной среды: люцигенин в концентрации 20 мкМ, ксантин - 450 мкМ, ксантиноксидаза - 0,1 ед./мл; (1) — модельная среда в отсутствие дополнительных реагентов; (2) включение глутатиона в среду в концентрации 400 мкМ; а также подмешивание к этой среде 100 мкМ (кривая 3), 175 мкМ (кривая 4) и 350 мкМ (кривая 5) динитрозильных комплексов железа с лигандом глутатионом.

По кривым хемилюминесценции люцигенина, представленным на рисунке 31, можно судить о ее дозозависимом ингибировании - уменьшении концентрации образующегося в этой модельной системе супероксида динитрозильными комплексами железа с глутатионом в качестве лиганда. При этом, GS-ДНКЖ имеют большую эффективность, нежели свободный глутатион (Рисунок 31, кривые 2 и 4). Следовательно, результаты данного эксперимента позволяют предположить, что именно из-за образования динитрозильных комплексов железа может происходить уменьшение хемилюминесценции люцигенина в тканях животных как эффект оксида азота, продемонстрированный в работе [209].

С помощью спектроскопии ЭПР показано, что в содержащей ксантин и ксантиноксидазу аналогичной ферментативной системе, GS-ДНКЖ препятствуют образованию аддукта супероксида со спиновой ловушкой DEPMPO (Рисунок 32). Это свидетельствует о нейтрализации супероксидного радикала динитрозильными комплексами железа с лигандом глутатионом и подтверждает результаты, описанные выше и полученные с применением других экспериментальных методов,

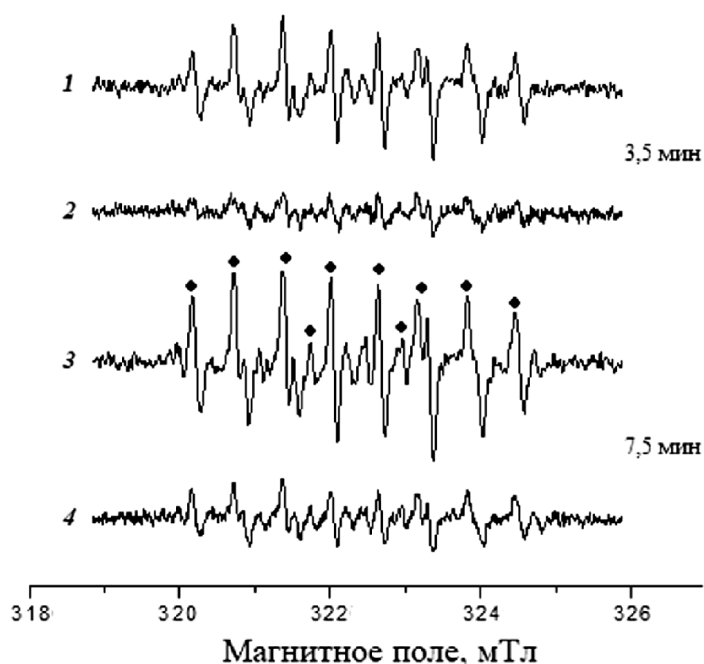


Рисунок 32. Сигналы ЭПР аддуктов свободнорадикальных соединений, формирующихся в ксантин-ксантиноксидазной энзиматической системе, со спиновой ловушкой DEPMPO. В состав модельной среды входили: ксантин - 450 мкМ, ксантиноксидаза - 0,1 ед/мл, каталаза - 400 ед/мл, DEPMPO - 45 мМ, ДТПА - 250 мкМ на основе K,Na-фосфатного буфера - (0,1 М, pH=7,4). Чтобы изучить воздействие ДНКЖ с лигандом глутатионом, они были добавлены к данной реакционной смеси, [GS-ДНКЖ]=220 мкМ (спектры 2 и 4). Спектры электронного парамагнитного резонанса были сняты через 3,5 минуты (спектры 1, 2) и 7,5 минуты (спектры 3, 4) вслед за подготовкой образцов. Значок (♦) соответствует относящимся к аддукту (DEPMPO-ООН) DEPMPO с анион-радикалом супероксида линиям в спектре ЭПР реакционной системы [21].

В данном эксперименте значительную роль может играть то, что DEPMPO способен формировать спиновые аддукты как $O_2^{\cdot-}$ [210], так и других активных форм кислорода (и свободных радикалов вообще), в частности, гидроксильного радикала. Кроме того, тиольные радикалы глутатиона (GS•) также могут образовывать спиновые аддукты с DEPMPO [122]. Чтобы избежать генерации гидроксильного радикала как продукта фентоновской реакции, и с учетом того, что при дисмутации супероксида происходит продукция пероксида водорода, в реакционную систему были дополнительно внесены каталаза и ДТПА (хелатор железа).

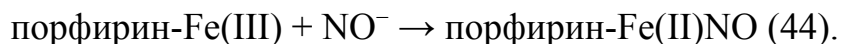
Результаты, представленные в данном разделе и полученные различными методиками, свидетельствуют, что перехватчиками супероксидного аниона являются глутатион-содержащие динитрозильные комплексы железа. Нитрозильные комплексы Cu и Mn, согласно сведениям из некоторых исследований, вступают в реакции соответственно с пероксидом водорода и супероксида, и вследствие этого происходит образование пероксинитрита, координированного с данными металлами [211]. Продуктами реакций ДНКЖ, содержащих нетиоловые (синтетические) лиганды, и O_2 , являются, как раз, подобные промежуточные соединения [212]. Нитрование различных органических

соединений, как было определено в ряде исследований, может быть вызвано металлосодержащими комплексами, которые также имеют в своем составе ONOO^- . При этом, возможна изомеризация до нитрата или восстановление до нитрита связанного с переходными металлами (в форме ионов) O [205,213]. Возможно взаимодействие свободнорадикальных молекул или ионов ($\text{LOO}^\bullet$, $\text{HO}_2^\bullet$, $\text{O}_2^{\bullet-}$), с одной стороны, и оксида азота как лиганда в составе динитрозильных комплексов железа, с другой. Такое взаимодействие должно сопровождаться продукцией промежуточных соединений: ONOO^- , координированный с ионом Fe , либо его аналог органического характера (LOONO). Что касается динитрозильных комплексов железа с лигандом глутатионом, предположительно, имеет место окисление тиоловых лигандов этих комплексов данными промежуточными соединениями. Опираясь на результаты, полученные методом спектроскопии ЭПР в рамках настоящей диссертационной работы (Рисунок 32), а также на сведения из литературы [186,210], представляется возможным заключить, что механизм окисления лиганда глутатиона в составе динитрозильных комплексов железа является двухэлектронным. Это подтверждается отсутствием тиольных радикалов, которые должны были бы возникать при одноэлектронном механизме окисления GSH , при опытах с применением спиновой ловушки DEPMPO . Также важно обратить внимание на способность ионов Fe выступать в качестве электронных доноров окислительно-восстановительных трансформаций молекул. Это подтверждается тем, что эффективность реакции с ONOO^- у комплекса ионов двухвалентного железа и глутатиона существенно выше, чем у несвязанного GSH , и такая реакция протекает с восстановлением пероксинитрита в нитрит, а также окислением глутатиона в сульфеновую кислоту (GSOH), как это было продемонстрировано в исследовании [62]. Активность фосфатных динитрозильных комплексов железа и глутатиона как такового в качестве антиоксидантов, в изученных в настоящей работе образцах, оказалась ниже по сравнению с глутатион-содержащими динитрозильными комплексами железа, тогда как несвязанный оксид азота демонстрировал прооксидантную активность.

3.6 Восстановительное нитрозилирование феррильной формы гемоглобина и миоглобина и его антиоксидантное действие

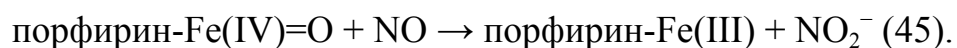
Известно, что формирование нитроксила (HNO) происходит в результате восстановления (1 электроном) и протонирования оксида азота (NO) [214–216]. Согласно итогам ряда исследований, доноры HNO и его анионной формы, нитроксил-аниона (NO^-), потенциально являются перспективными фармакологическими агентами с широким спектром применения [214,215,217]. Благодаря своим особым химическим свойствам нитроксил способен функционировать и как классический антиоксидант, и как ингибитор неферментативного гликирования биологических макромолекул [215].

Важным аспектом физиологического действия нитроксила является восстановительное нитрозилирование гемопroteинов – особенно гемоглобина. Известно [218], что NO^- осуществляет следующим образом восстановительное нитрозилирование гемопroteинов в мет-форме (Fe(III), координированное с порфирином гема):



Имеется достаточно сведений о том, что миоглобин (Mb) и гемоглобин (Hb), взаимодействуя с молекулами гидроперекисей, переходят в оксоферрильные состояния, имеющие значительные прооксидантные эффекты и занимающие существенное место в ассоциированных с оксидативным стрессом патологических процессах [219–222]. Кроме того, в случае, если HNO реагирует с оксигенированным гемоглобином (Hb-Fe(II)=O), показана продукция H_2O_2 , а затем оксоферрилгемоглобина (Hb-Fe(IV)=O) [223]. Активность доноров NO в качестве антиоксидантов объясняется тем, что оксид азота способен химически воздействовать на оксоферрильные формы железосодержащих биополимеров (особенно гемопroteинов), а также на липидные свободнорадикальные производные [170,208,224].

Это происходит следующим образом: оксид азота действует как восстановитель в отношении гемой группы в оксоферрильном состоянии (порфирин-Fe(IV)=O):



А продуктами данной реакции являются мет-форма гема и нитрит, в который, в свою очередь, переходит NO. Скоростная константа для такой реакции восстановления гемоглобина и миоглобина с оксоферрильных до мет- форм принимала значения в диапазоне $18-24 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [178,225]. Имеет место, однако достаточно медленное, окисление оксоферрильными формами гемового железа самого нитрита до NO_2 (диоксид азота). У этой реакции, исходя из различных литературных данных, константа скорости составляет $1,6-7,5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [178,225].

Несмотря на наличие исследований в смежных вопросах, весьма мало исследовано то, как нитроксил реагирует с оксоферрильными формами гемсодержащих белков и то, какое место занимает HNO в процессах оксидативного стресса.

В рамках данной диссертационной работы высказывается предположение о том, что нитроксил приводит к восстановлению оксоферрильного состояния гема и формированию нитрозильного комплекса железа гема в ферроформе (порфирин-Fe(II)NO) в реакции такого характера:



Поэтому, для проверки данного предположения проведено экспериментальное изучение происходящего под воздействием нитроксидо- / нитроксильной аниона нитрозилирования оксоферрильных состояний как миоглобина, так и гемоглобина, а также сопоставлены кинетические характеристики взаимодействия оксоферрильных и мет- форм миоглобина с HNO и качественные свойства спектров ЭПР в образцах, в которых проводились данные реакции.

Метод спектроскопии ЭПР (параметры снятия спектров ЭПР: модуляция 4 Гс, усиление 500, развертка 400 Гс) был использован для изучения восстановительного нитрозилирования феррильных и мет- форм Mb и Hb в растворах в фосфатном буфере 0,4 мМ гемоглобина и 1,6 мМ миоглобина (Sigma Aldrich, США), которые выполняли роль модельной среды. Соль Анджели ($\text{Na}_2(\text{ONNO}_2)$) - оксогипонитрит натрия), значения концентрации которой были выбраны в пределах 2 - 10 мМ, реализовывала функцию донора HNO / NO⁻

(нитроксила). Путем добавления H_2O_2 в концентрации 18 мМ были образованы феррильные формы как гемоглобина, так и миоглобина из мет- форм этих гемопротеинов.

В ходе этих экспериментов было определено, что включение $\text{Na}_2(\text{ONNO}_2)$ в модельную реакционную среду с оксоферрильной формой гемоглобина, наблюдается свойственный Hb(II)NO - нитрозилированной ферроформе гемоглобина - сигнал электронного парамагнитного резонанса (рис. 35 - спектр А). Из этого следует заключить, что происходит реакция восстановительного нитрозилирования оксоферрильной гемовой группы (реакция 46). Вместе с тем, в описываемой модельной среде был обнаружен свободнорадикальный сигнал ЭПР с $g=2,005$. Аналогичный сигнал был зарегистрирован и в реакционной системе с добавлением пероксида водорода к метгемоглобину (рис. 35 – спектр В). Сигналы с таким же g -фактором и сходной формы были продемонстрированы ранее группой исследователей под руководством Рамиреса и являются сигналами стабильных радикалов аминокислотных остатков, входящих в различные белки [226]. Был получен также спектр электронного парамагнитного резонанса образца с Hb-Fe(II)NO , образованного посредством нитрозилирования метгемоглобина в результате добавления к его раствору соли Анджели (Рисунок 33 – спектр Б).

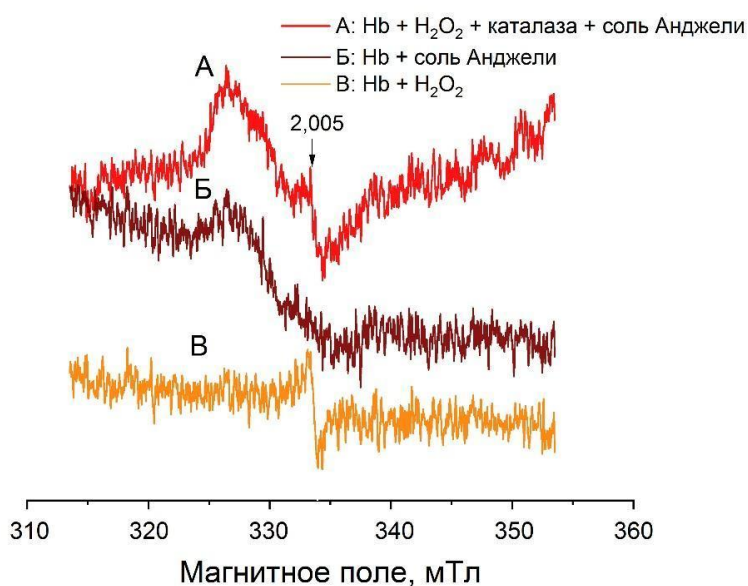


Рисунок 33. Спектры электронного парамагнитного резонанса нитрозилированного гемоглобина в различных условиях: (А) при

последовательном добавлении H_2O_2 и $\text{Na}_2(\text{ONNO}_2)$ к раствору метгемоглобина в фосфатном буфере с $\text{pH}=7,4$; (Б) спектр HbNO , образованного в результате реакции $\text{Na}_2(\text{ONNO}_2)$ и метHb без пероксида водорода; а также спектр сигнала с $g=2,005$, связанного со свободными радикалами (В), которые наблюдались в растворе метHb с добавлением только пероксида водорода.

Такой сигнал ЭПР с $g = 2,005$, обнаружен и в результате взаимодействия пероксида водорода с метMb (рисунок 34). Очевидно, данный сигнал должен быть связан, таким же образом как в приведенных выше подобных опытах с Hb, с образованием свободнорадикальных производных аминокислот в полипептидной цепи гемопroteина. Этот результат вполне соответствует сведениям из литературы [220,221].

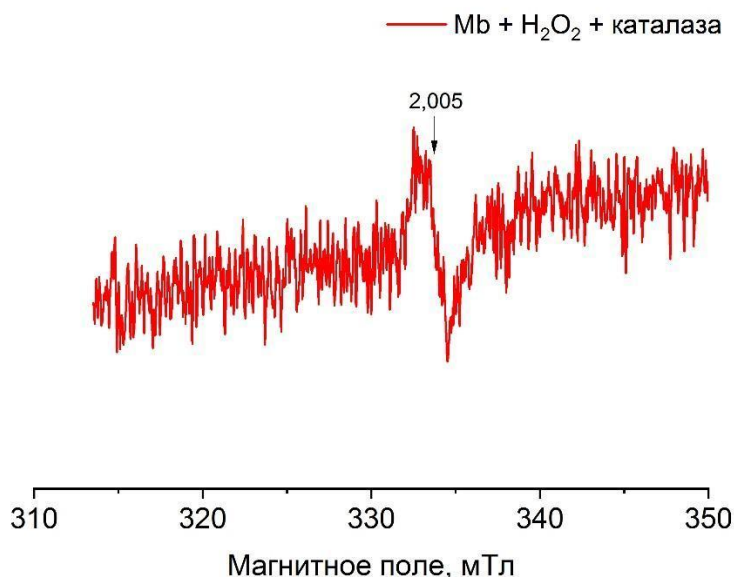
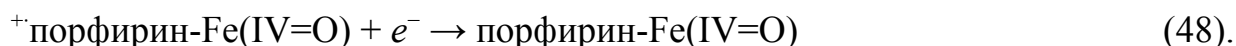
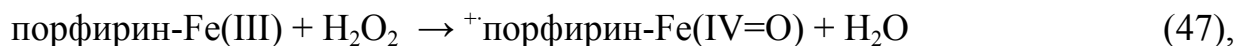


Рисунок 34. Спектр ЭПР свободнорадикального сигнала с $g=2,005$, появляющийся в результате добавления H_2O_2 к раствору метмиоглобина (окисление до $\bullet\text{Mb-Fe(IV)=O}$).

В случае миоглобина, вслед за разложением при помощи фермента каталазы непрореагировавшего пероксида водорода, а также добавлением к реакционной системе соли Анджели, нитрозилирование образовавшегося оксоферрилмиоглобина наблюдалось, но при этом ассоциированный с аминокислотными остатками белков свободнорадикальный сигнал в таких образцах не был обнаружен (рисунок 35 – спектр А). Принятой на настоящий

момент точкой зрения является то, что реакция между гемопротеинами в мет-формах и пероксидом водорода приводит к формированию сначала перферрильного ($^+$ порфирин-Fe(IV)=O), а далее оксоферрильного (порфирин-Fe(IV=O)) гема при процессах такого характера, как показано здесь:



Возможно, аминокислотные остатки полипептидных цепей гемопротеинов выступают в качестве электронных доноров в процессе восстановления перферрильной формы гема, которая является катион-радикалом (реакция 48). Свободнорадикальные производные таких аминокислот как тирозин (Tyr) и триптофан (Trp), являются, как правило, результатом описываемого автоокисления гемопротеинов [219–221].

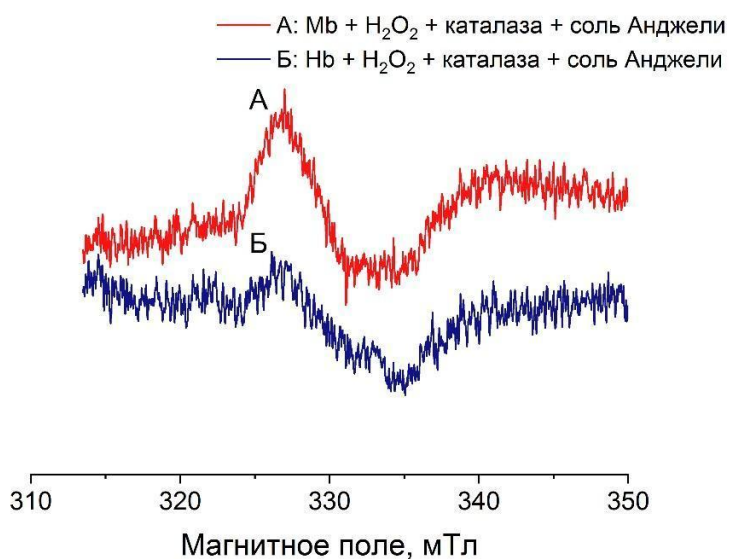


Рисунок 35. Спектры электронного парамагнитного резонанса нитрозильных комплексов Mb (А) и Hb (Б), полученных в результате восстановительного нитрозилирования нитроксидом их оксоферрильных форм.

При включении $\text{Na}_2(\text{ONNO}_2)$ в реакционную систему с гемоглобином до H_2O_2 и каталазы (рисунок 36, спектр - Б) не были обнаружены сигналы ЭПР ни Hb-Fe(II)NO , ни аминокислотных (белковых) радикалов, причиной чего может служить взаимодействие нитрозилированной и оксоферрильной форм железа в

гемовых группах. Для миоглобина подобный эффект был описан ранее [172] и проявляется в следующих реакциях:

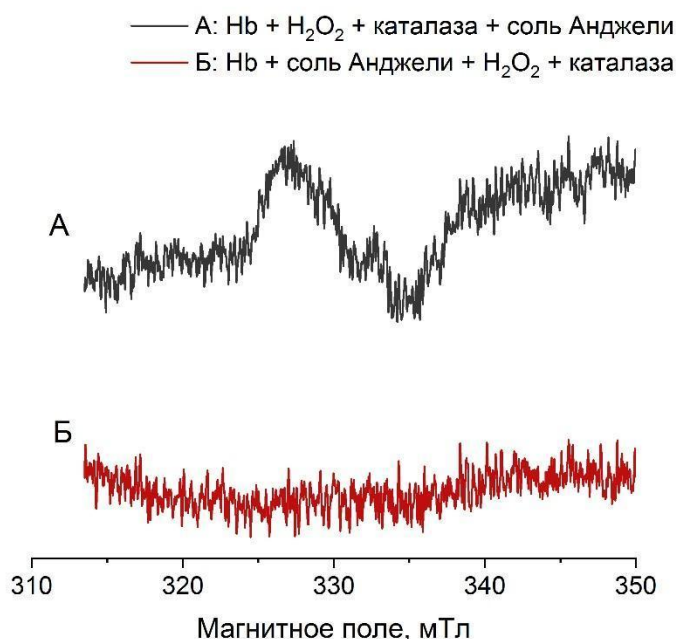
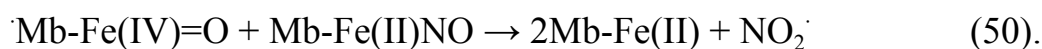
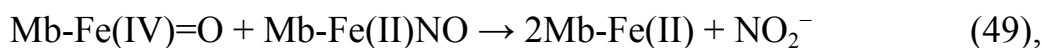


Рисунок 36. *А* - Спектр электронного парамагнитного резонанса Hb-Fe(II)NO при включении в реакционную среду сначала H_2O_2 , а затем $\text{Na}_2(\text{ONNO}_2)$ к раствору гемоглобина в фосфатном буфере, *Б* – спектр электронного парамагнитного резонанса аналогичной реакционной смеси, но при добавлении пероксида водорода после $\text{Na}_2(\text{ONNO}_2)$.

Исходя из полученных в описанных выше экспериментах результатов, обезвреживание оксоферрильных и перферрильных форм гема (в составе гемопroteинов) в ходе реакций 44-46, 49 и 50 способно быть базовым механизмом эффектов HNO/NO^- как антиоксиданта. Кроме того, нитроксил может, вероятно, восстанавливать свободные радикалы аминокислот полипептидной цепи миоглобина (рисунок 35). Но в случае с гемоглобином не осуществляется такой реакции. Возможным объяснением этого является большая доступность свободных радикалов аминокислот для нитроксила в молекуле миоглобина в сравнении с более крупной и обладающей сложной четвертичной структурой молекулой гемоглобина. При обсуждении этого вопроса следует обратить

внимание на то, что как раз свободнорадикальные производные аминокислот в полипептидных цепях гемоглобина реализуют между его субъединицами ковалентные соединения [227].

В следующем эксперименте производилась оценка кинетики (рисунок 37) восстановительного нитрозилирования оксоферрилмиоглобина и метмиоглобина, осуществляемого HNO/NO^- , исходя из амплитуды сигналов электронного парамагнитного резонанса от Mb(II)NO . Демонстрируемые на графике кривые говорят о том, что наибольшая концентрация и быстрее формирование Mb(II)NO имеют место при нитрозилировании оксоферрилмиоглобина (рисунок 37, кривая В - синяя).

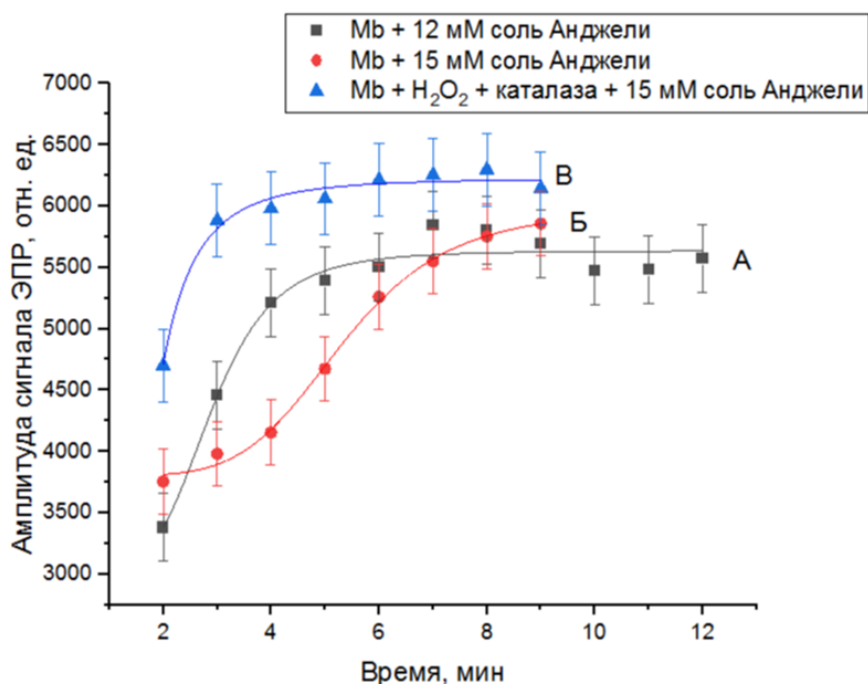


Рисунок 37. Полученные для реакционных смесей разного состава по амплитудам спектров ЭПР кинетические кривые восстановительного нитрозилирования миоглобина (кривые А и Б – восстановительное нитрозилирование метмиоглобина различными концентрациями $\text{Na}_2(\text{ONNO}_2)$: 12 и 15 мМ, соответственно; В – восстановительное нитрозилирование оксоферрилмиоглобина). Аппроксимация экспериментальных кривых при помощи логистической регрессии проведена с использованием программы Origin Pro.

Измерены также концентрационные зависимости нитрозилирования оксоферрильной и мет- форм миоглобина донором нитроксила - солью Анджели (рисунок 38). Для нитрозилирования метмиоглобина требовались более низкие значения концентрации соли Анджели (рисунок 38, кривая А). При этом, у оксоферрилмиоглобина нитрозилирование гема становилось более эффективным при высоких концентрациях соли Анджели (рисунок 38, кривая Б). Данный результат вполне соответствует тому, что в реакции 46 требуется 2 молекулы HNO для формирования нитрозилированного по гемовому железу гемоглобина (Hb(II)NO).

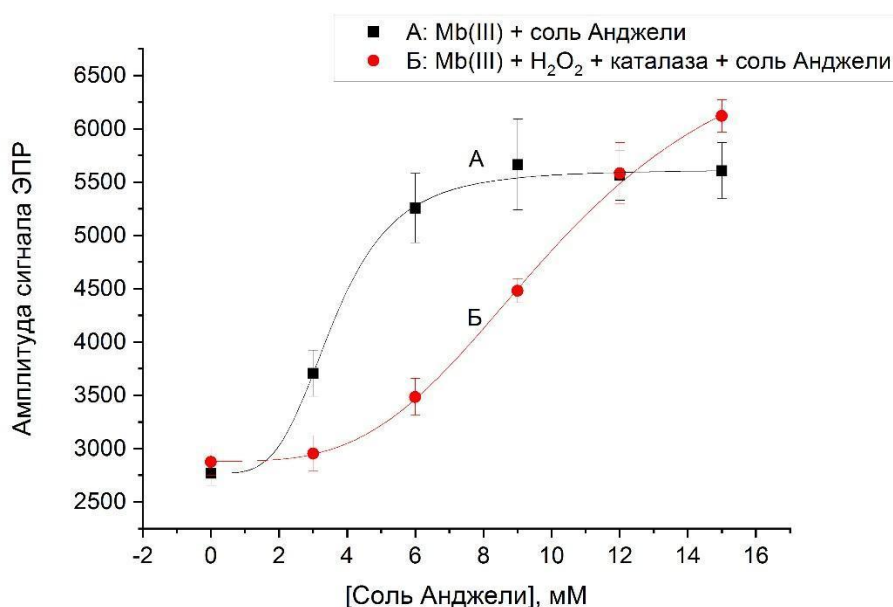
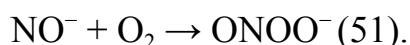


Рисунок 38. Зависимость от концентрации $\text{Na}_2(\text{ONNO}_2)$ амплитуды (ее максимального значения по спектру образца) сигнала электронного парамагнитного резонанса в процессе восстановительного нитрозилирования метмиоглобина (Mb(III)) – на кривой А и оксоферрилмиоглобина (Mb(IV)=O) – на кривой Б.

Нужно обратить внимание и на то, что в реакционной смеси, исследуемой в этих экспериментах, в дополнение к реакциям 44 и 46, нитроксильный анион взаимодействует с молекулярным кислородом, продуктом чего становится пероксинитрит (ONOO^-) - ключевая активная форма азота:



Обсуждаемая реакция может препятствовать нитрозилированию гемовой группы, особенно это касается оксоферрильной формы миоглобина (реакция 46). Помимо этого, пероксинитрит, который является продуктом реакции 51 взаимодействует с оксоферрильными и мет-формами гемопroteинов, образуя различные интермедиаты и конечные продукты [227–229], способные оказывать влияние на формирование нитрозилированного миоглобина (в ферроформе - Mb(II)NO) и кинетические параметры этого процесса.

Результаты проведенных в рамках диссертационной работы экспериментов позволяют говорить об антиоксидантном эффекте HNO/NO⁻ в реакционных средах, которые имитируют перекисное окисление гемопroteинов. Исходя из этого, нитроксил (в т.ч. в форме нитроксил-аниона), предположительно, помогает избежать провоспалительных, а также атерогенных эффектов Mb-Fe(IV)=O за счет его восстановления. Na₂(ONNO₂) либо альтернативные источники HNO/NO⁻, согласно имеющимся на текущий момент данным, способны уменьшать риск гемолиз, который может иметь место при гемотрансфузии, анемиях гемолитического характера, а также прочих патологиях, в значительной степени ассоциированных с выделением в кровоток свободного Hb [223].

3.7 Взаимодействие нитрозильных комплексов железа с различными прооксидантами

В современной литературе широко обсуждается роль редокс-активных соединений (например, ряда антиоксидантных белков и транскрипционных факторов) в качестве «редокс-реле» регулирующих многие процессы в клетке. Результаты исследования различных динитрозильных комплексов железа также позволяют рассматривать их как редокс-зависимые триггеры. При этом подразумевается регуляторное действие ДНКЖ, реализующее два возможных состояния системы. До определенного момента эти комплексы сдерживают прооксидантные процессы с помощью механизмов, которые по-прежнему являются предметом дискуссии исследователей. Один из таких механизмов будет рассмотрен ниже. Но при некоторых условиях, как правило, связанных с сильным окислительным стрессом, ДНКЖ могут оказывать и прооксидантное действие.

Кроме того, следует отметить, что антиоксидантное действие нитрозильных комплексов гемового и негемового железа имеет определенные особенности в зависимости от вида прооксиданта и самого комплекса.

Антиоксидантное действие глутатионовых ДНКЖ было показано в различных работах в отношении нескольких различных свободных радикалов. В данной диссертационной работе было подтверждено антиоксидантное действие динитрозильных комплексов железа с глутатионом или цистеиновыми остатками гемоглобина в качестве лигандов на экспериментальных реакционных средах, которые содержали *t*-BOOH и гемопротеины (гемоглобин и цитохром *c*). Такие системы являются имитацией продукции органических промежуточных соединений, являющихся свободными радикалами и подобных образуемым при процессах ПОЛ либо окисления иных физиологически важных биополимеров. Еще одним важным эффектом, рассмотренным в данной работе было защитное действие GS-ДНКЖ на эритроциты при гемолизе, индуцированном гипохлоритом. Продемонстрировано, что в таких условиях происходит разрушение GS-ДНКЖ, что согласуется с их защитным действием, обнаруженным в работе [192]. Следует отметить, что исследование физико-химических характеристик мембран эритроцитов в условиях гемолиза или других серьезных патофизиологических состояний требует дальнейшего изучения, в том числе и в контексте цитопротекторных свойств ДНКЖ.

В работе К.Б. Шумаева и др. [181] показано разрушение супероксидом и пероксинитритом ДНКЖ, связанных с бычьим сывороточным альбумином (ДНКЖ-БСА). При этом подобные эффекты не наблюдались при воздействии перекиси водорода и гидропероксида *трет*-бутила. Авторы работы предположили, что реакция между супероксидом и связанными с белками ДНКЖ является основным процессом, ответственным за деградацию комплексов в клетках и тканях.

В работе [181] также было рассмотрено разрушение Hb-ДНКЖ под действием супероксидного радикала, различных пероксидов, пероксинитрита (показана большая устойчивость Hb-ДНКЖ к ONOO^- по сравнению с

ДНКЖ-БСА). В данной работе в экспериментах на модельной реакционной среде, содержащей Нв-ДНКЖ были продолжены эти исследования, а также показано разрушение Нв-ДНКЖ под действием ClO^-/HClO . В последнем случае моделировался возникающий при воспалении галогенирующий стресс. Кроме того, использование спиновой ловушки DEPMPO позволило наблюдать сильный антирадикальный эффект Нв-ДНКЖ в среде с t-BOOH.

Нитрозилирование железа гемовых групп гемоглобина защищает от свободнорадикальных процессов, вызванных взаимодействием органических гидропероксидов с гемом, что было показано в данной работе и согласуется с результатами предшествующих исследований [166,174,230]. Аналогичное действие показано и для нитрозилированного по гемовому железу миоглобина при воздействии таких прооксидантов, как H_2O_2 , t-BOOH [172,231,232].

Антиоксидантное действие нитроксила в системах с гемоглобином и миоглобином, исходя из результатов данной работы, также может быть обусловлено образованием комплексов NO с гемом. С учетом, в том числе, более эффективного действия HNO при диабете по сравнению с NO, это существенным образом дополняет имеющиеся данные о нитроксили как о терапевтическом агенте [217]. Поскольку гемсодержащие белки в высоких концентрациях присутствуют в крови и сердечной мышце, образование аддуктов гемового железа с HNO представляет собой важный фактор в действии высвобождающих нитроксил препаратов. При этом, следует выделить несколько аспектов взаимодействия HNO с гемопротеинами.

С учетом данных о «сшивках» гема с белковой частью гемоглобина и миоглобина, связанных с их пероксидазной активностью [220–222], можно предположить защитное действие доноров нитроксила и при патологиях, сопряженных с подобными эффектами, среди которых следует особенно выделить рабдомиолиз [222]. Нейтрализация оксоферрильных форм гемопротеинов нитроксидом, продемонстрированная в этой работе, может предотвратить подобные сшивки, поскольку именно протонированная оксоферрильная форма

гема обладает высокой реакционной способностью, необходимой для инициирования сшивки [220].

Известно, что в реакции нитроксила с миоглобином образуется аддукт HNO-Mb, который может вновь взаимодействовать с HNO [233]. Хотя эти реакции обычно игнорируются исследователями, нельзя исключить, что они могут играть важную роль в физиологических эффектах доноров HNO [229].

Следовательно, $\text{Na}_2(\text{ONNO}_2)$ имеет ряд возможных терапевтических эффектов, заслуживающих дальнейшего изучения. При этом, безусловно, необходимо внимательно отслеживать токсичность донора нитроксила и его воздействие на гемодинамику при применении этой терапии в силу определенных свойств $\text{Na}_2(\text{ONNO}_2)$, а именно проявления нитроксидом прооксидантного действия при некоторых условиях, как в реакции с молекулярным кислородом (реакция 50) [216], а также в различных прооксидантных процессах, происходящих в миокарде при ишемии - реперфузии [234].

Данные о взаимодействии нитрозильных комплексов гемового и негемового железа и различных физиологически значимых свободных радикалов, как известные на настоящий момент, так и полученные в рамках данного диссертационного исследования, представлены в таблице 4.

Табл. 4. Взаимодействие нитрозильных комплексов гемового и негемового железа и различных физиологически значимых свободных радикалов и прооксидантов (данные, полученные в данной работе отмечены подчеркнутым шрифтом)

	O_2^-	H_2O_2	ClO^-	ONOO^-	t-BOOH
ДНКЖ-БС А	Деструкция ДНКЖ [181]	Нет определенной деструкции	Окисление низкомолекулярно	Деструкция ДНКЖ [181]	Отсутствие деструкции ДНКЖ [181]

		ДНКЖ [181]	тельного лиганда и его замена на остаток гистидин а БСА [192]		
ДНКЖ-GS	Антиоксидантное действие ДНКЖ (<u>показано в данной работе</u> + [177])	-	Деструкция ДНКЖ [192] + <u>показано в данной работе</u>	Деструкция ДНКЖ, антиоксидантное действие [235,236]	Антиоксидантное действие <u>показано в данной работе</u>
Cys-ДНКЖ	Деструкция ДНКЖ [237]	Деструкция ДНКЖ [235]	-	Деструкция ДНКЖ [235]	=
Hb-ДНКЖ	Деструкция ДНКЖ [181]	Деструкция ДНКЖ [181]	Деструкция ДНКЖ (<u>показана в данной работе</u>)	Гемоглобиновые ДНКЖ, разрушаются, но более устойчивы, чем ДНКЖ-БСА [122],	Деструкция ДНКЖ [181]

				антиоксидантное действие [179]	
HbNO	Взаимодействие, деструкция HbNO [238]	Взаимодействие [238]	Взаимодействие <u>показано в данной работе</u>	-	Антиоксидантное действие [166,174,230] + <u>подтверждено в данной работе</u>
MbNO	-	Антиоксидантное действие [172] <u>подтверждено в данной работе</u>	Показано окисление MbNO (Moller et al. 2014)	-	Антиоксидантное действие [172]

3.8 Предполагаемые механизмы антиоксидантного действия ДНКЖ

В настоящее время считается, что именно за счет одновременной стабилизации в различных комплексах как оксида азота, так и железа может предотвращаться их участие в прооксидантных процессах. В составе ДНКЖ железо исключается из редокс-цикла, в котором происходит генерация супероксидного и гидроксильного радикалов в реакциях Габера-Вайсса и Фентона [173,239].

Глутатион-содержащие динитрозильные комплексы железа успешно препятствуют ПОЛ, вызванному свободными радикалами, и нейтрализуют O_2^- .

Эффект обсуждаемых GS-ДНКЖ как антиоксидантов, судя по всему, вызван кооперативным влиянием оксида азота и тиолов, являющихся компонентами данных комплексов в качестве лигандов. Реакции динитрозильных комплексов железа как с супероксидным радикалом, так и с липидными алкилперекисными радикалами, вероятно, осуществляются через образование не приводящих к появлению мощных окислителей в процессе своего распада нестабильных промежуточных продуктов. В противоположность этому, взаимодействие несвязанного оксида азота с такими радикалами сопровождается образованием ONOO^- и его органического аналога, распад которых становится источником новых свободных радикалов.

Важно обратить внимание на то, что ионы Fe^{2+} способны выступать в качестве электронных доноров для редокс-реакции внутримолекулярного характера. Как было выявлено ранее, комплекс ионов железа с глутатионом вступает в реакцию с ONOO^- существенно сильнее, нежели несвязанный GSH, при этом происходит окисление глутатиона в сульфеновую кислоту (GSOH) и восстановление пероксинитрита в нитрит [62]. В примененных в работе модельных реакционных средах антиоксидантный эффект глутатиона и фосфатных динитрозильных комплексов железа был выражен слабее, чем у глутатионовых динитрозильных комплексов железа, а несвязанный оксид азота даже имел определенное прооксидантное действие. Предположительно, при оксидативном стрессе происходит взаимодействие между нитрозильными комплексами негемового и гемового железа, с одной стороны и O_2^- или свободными радикалами липидов, с другой, согласно представленному на рисунке 39 молекулярному механизму.

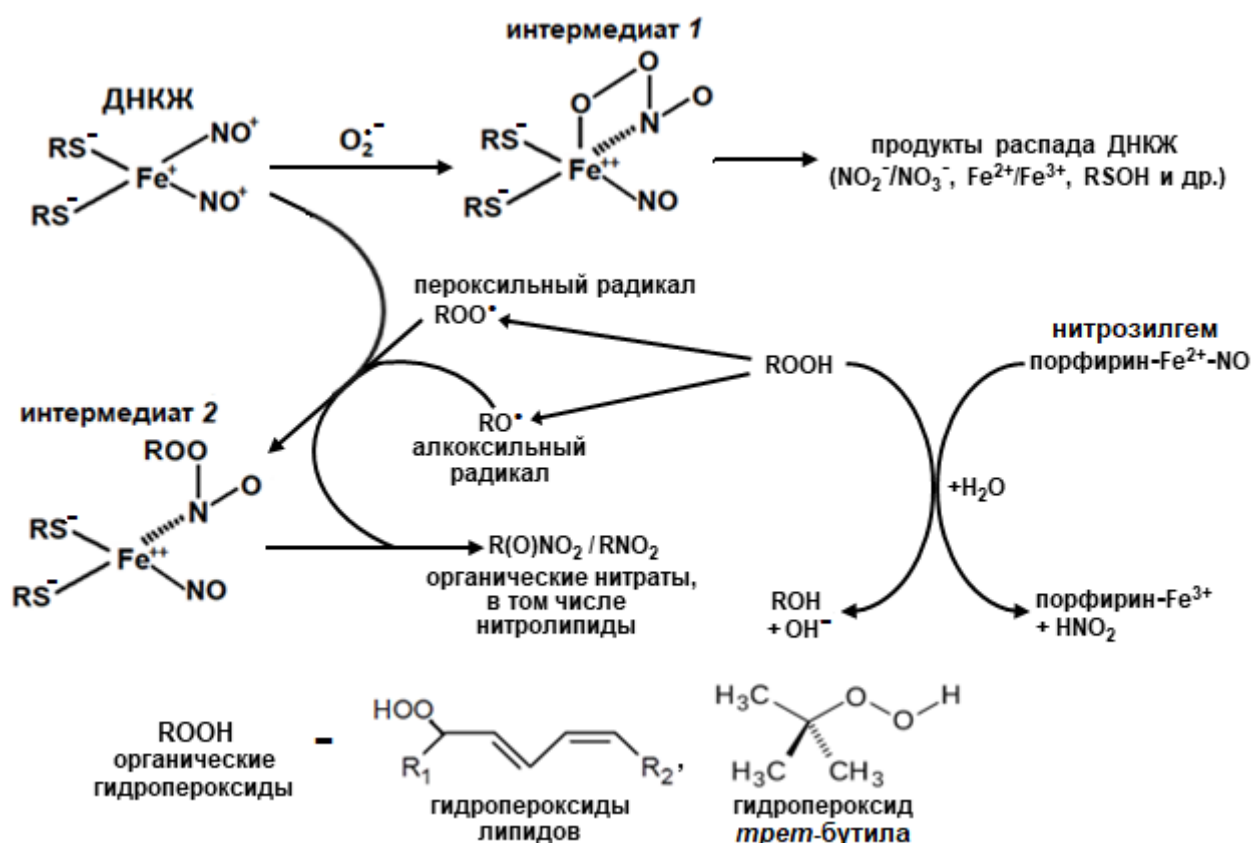


Рисунок 39. Предполагаемый молекулярный механизм антиоксидантного действия нитрозильных комплексов негемового и гемового железа. Глутатионовые ДНКЖ взаимодействуют с супероксидом, а также пероксильными и алкоксильными органическими радикалами. В реакциях между супероксидным анионом и NO-лигандами ДНКЖ образуется комплекс, содержащий связанный с железом $ONOO^-$ (интермедиат 1). В сходной реакции с пероксильным радикалом, по-видимому, формируется аналог $ONOO^-$ 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.

Предположительно, ДНКЖ могут быть донорами как нейтрального NO, так и катиона нитрозония NO^+ [153], и нитроксильного аниона NO^- [240].

Следовательно, ДНКЖ могут действовать как антиоксиданты – доноры $\text{HNO}/\text{NO}^\cdot$. В этом случае нитроксил действует как классический антиоксидант – донор электрона и протона, перехватывая алкилпероксильные и алкоксильные радикалы липидов и других биологических молекул в следующих реакциях [214]:



Следует отметить, что в этой реакции образуется оксид азота, который, как уже было отмечено, также способен перехватывать органические свободные радикалы. С другой стороны, как показано в этой диссертационной работе, нитроксил может восстанавливать такие сильные окислители, как оксоферрильные формы гемопротеинов. Таким образом, ДНКЖ, действуя в качестве комплексов и доноров NO и $\text{NO}^\cdot/\text{HNO}$, выступают в качестве универсальных антиоксидантов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование физико-химических свойств, а также физиологического действия стабилизированных производных оксида азота является актуальной задачей современной медицинской биофизики. На основании результатов настоящего исследования можно заключить, что взаимодействие ДНКЖ с активными формами кислорода, азота и галогенов является важным элементом регуляции метаболизма NO , а также способно влиять на сигнальную функцию этой важнейшей молекулы. Поскольку нарушение функционирования различных форм оксида азота играет ключевую роль в развитии многих патологий сердечно-сосудистой системы требуется дальнейшее исследование роли комплексов NO с гемоглобином в прооксидантных и антиоксидантных системах. В то же время необходимо продолжать изучение физико-химических свойств мембран эритроцитов при различных заболеваниях, в том числе связанных с воспалением и окислительным стрессом.

В настоящей работе дополняются и обобщаются основные выводы предыдущих исследований об антиоксидантном и антирадикальном действии комплексов NO с гемовым и негемовым железом. Более того, проведенные эксперименты позволяют подтвердить ранее высказанные гипотезы о механизмах

антиоксидантного действия NO-содержащих комплексов железа и предложить новые. Вместе с тем, полученные результаты позволяют обосновать возможное использование изучаемых комплексов как перспективных фармакологических средств.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

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 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
в 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., Dudylyna 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. Koshland D.E. The Molecule of the Year // Science (80-.). 1992. Vol. 258, № 5090. P. 1861.
2. Wu L., Wang R. Carbon Monoxide: Endogenous Production, Physiological Functions, and Pharmacological Applications // Pharmacol. Rev. 2005. Vol. 57, № 4. P. 585 LP – 630.
3. Lefer D.J. A new gaseous signaling molecule emerges: Cardioprotective role of hydrogen sulfide // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2007. Vol. 104, № 46. P. 17907–17908.
4. Hyun J., Chaudhuri G., Fukuto J.M. The Reductive Metabolism of Nitric Oxide in Hepatocytes: Possible Interaction with Thiols // Drug Metab. Dispos. 1999. Vol. 27, № 9. P. 1005 LP – 1009.
5. Liu D., Jin H., Tang C., Du J. Sulfur Dioxide: a Novel Gaseous Signal in the Regulation of Cardiovascular Functions // Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. 2010. Vol. 10, № 11. P. 1039–1045.
6. Arnold W.P., Mittal C.K., Katsuki S., Murad F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations // Proc. Natl. Acad. Sci. 1977. Vol. 74, № 8. P. 3203–3207.
7. Rapoport R.M., Murad F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. // Circ. Res. 1983. Vol. 52, № 3. P. 352–357.

8. Albina J.E., Reichner J.S. Role of nitric oxide in mediation of macrophage cytotoxicity and apoptosis // *Cancer Metastasis Rev.* 1998. Vol. 17, № 1. P. 39–53.
9. Kovacevic Z., Sahni S., Lok H., Davies M.J., Wink D.A., Richardson D.R. Regulation and control of nitric oxide (NO) in macrophages: Protecting the “professional killer cell” from its own cytotoxic arsenal via MRP1 and GSTP1 // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 2017. Vol. 1861, № 5, Part A. P. 995–999.
10. Furchgott R.F., Zawadzki J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine // *Nature.* 1980. Vol. 288, № 5789. P. 373–376.
11. Lancaster J.R. Historical origins of the discovery of mammalian nitric oxide (nitrogen monoxide) production/physiology/pathophysiology // *Biochem. Pharmacol.* 2020. Vol. 176. P. 113793.
12. Palmer R.M.J., Ferrige A.G., Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor // *Nature.* 1987. Vol. 327, № 6122. P. 524–526.
13. Garthwaite J., Charles S.L., Chess-Williams R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain // *Nature.* 1988. Vol. 336, № 6197. P. 385–388.
14. Susswein A.J., Katzoff A., Miller N., Hurwitz I. Nitric Oxide and Memory // *Neurosci.* 2004. Vol. 10, № 2. P. 153–162.
15. Stuehr D.J., Haque M.M. Nitric oxide synthase enzymology in the 20 years after the Nobel Prize // *Br. J. Pharmacol.* 2019. Vol. 176, № 2. P. 177–188.
16. Bredt D.S., Snyder S.H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1990. Vol. 87, № 2. P. 682–685.
17. Ghafourifar P., Sen C.K. Mitochondrial nitric oxide synthase // *FBL.* 2007. Vol. 12, № 3. P. 1072–1078.
18. Самосудова Н.В., Реутов В.П., Ларионова Н.П., Чайлахян Л.М. Возможное участие оксида азота в межнейронном взаимодействии // *Доклады Академии наук.* 2001. Vol. 378, № 3. P. 417–420.

19. Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К., Реутов В.П. Оксид азота и NO-синтазы в организме млекопитающих при различных функциональных состояниях // Биохимия. 2000. Vol. 65, № 4. P. 485–503.
20. Zhang Y., Tocchetti C.G., Krieg T., Moens A.L. Oxidative and nitrosative stress in the maintenance of myocardial function // Free Radic. Biol. Med. 2012. Vol. 53, № 8. P. 1531–1540.
21. Orrenius S., Gogvadze V., Zhivotovsky B. Mitochondrial Oxidative Stress: Implications for Cell Death // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2007. Vol. 47, № 1. P. 143–183.
22. Piantadosi C.A., Suliman H.B. Redox regulation of mitochondrial biogenesis // Free Radic. Biol. Med. 2012. Vol. 53, № 11. P. 2043–2053.
23. Ванин А.Ф. Оксид азота и его обнаружение в биосистемах методом электронного парамагнитного резонанса // Успехи физических наук. 2000. Vol. 170, № 4. P. 455–458.
24. Mordvintcev P., Mülsch A., Busse R., Vanin A. On-line detection of nitric oxide formation in liquid aqueous phase by electron paramagnetic resonance spectroscopy // Anal. Biochem. 1991. Vol. 199, № 1. P. 142–146.
25. Ванин А.Ф., Налбандян Р.М. Свободные радикалы нового типа в дрожжевых клетках // Биофизика. 1966. Vol. 10. P. 167.
26. Ванин А.Ф. Идентификация комплексов двухвалентного железа с цистеином в биологических системах // Биохимия. 1967. № 32. P. 228.
27. Woolum J.C., Tiezzi E., Commoner B. Electron spin resonance of iron-nitric oxide complexes with amino acids, peptides and proteins // Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. 1968. Vol. 160, № 3. P. 311–320.
28. Vanin A.F. Dinitrosyl iron complexes with thiolate ligands: Physico-chemistry, biochemistry and physiology // Nitric Oxide. 2009. Vol. 21, № 1. P. 1–13.
29. Vanin A.F. Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands as a “working form” of endogenous nitric oxide // Nitric Oxide. 2016. Vol. 54. P. 15–29.
30. Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity // Annu. Rev. Biochem. 1989. Vol. 58, № 1. P. 79–110.

31. Pryor W.A., Houk K.N., Foote C.S., Fukuto J.M., Ignarro L.J., Squadrito G.L., Davies K.J.A. Free radical biology and medicine: it's a gas, man! // *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 2006. Vol. 291, № 3. P. R491–R511.
32. Davies K.J.A. Oxidative stress: the paradox of aerobic life // *Biochem. Soc. Symp.* / ed. Rice-Evans C., Halliwell B., Lunt G.G. 1995. Vol. 61. P. 1–31.
33. Pacifici R.E., Davies K.J.A. Protein, Lipid and DNA Repair Systems in Oxidative Stress: The Free-Radical Theory of Aging Revisited // *Gerontology.* 1991. Vol. 37, № 1–3. P. 166–180.
34. Sies H. Introductory remarks in oxidative stress. 1985.
35. Wang D., Kreutzer D.A., Essigmann J.M. Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions // *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 1998. Vol. 400, № 1–2. P. 99–115.
36. Grune T., Reinheckel T., Davies K.J.A. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells // *FASEB J.* 1997. Vol. 11, № 7. P. 526–534.
37. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases // *Annu. Rev. Biochem.* 1995. Vol. 64, № 1. P. 97–112.
38. Joseph N., Zhang-James Y., Perl A., Faraone S. V. Oxidative Stress and ADHD: A Meta-Analysis // *J. Atten. Disord.* 2013. Vol. 19, № 11. P. 915–924.
39. Hwang O. Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease // *Exp. Neurobiol.* 2013/03/30. 2013. Vol. 22, № 1. P. 11–17.
40. Romá-Mateo C., Aguado C., García-Giménez J.L., Ibáñez-Cabellos J.S., Seco-Cervera M., Pallardó F. V, Knecht E., Sanz P. Increased Oxidative Stress and Impaired Antioxidant Response in Lafora Disease // *Mol. Neurobiol.* 2015. Vol. 51, № 3. P. 932–946.
41. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007. Vol. 39, № 1. P. 44–84.
42. James S.J., Cutler P., Melnyk S., Jernigan S., Janak L., Gaylor D.W., Neubrandner J.A. Metabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation capacity in children with autism // *Am. J. Clin. Nutr.* 2004. Vol. 80, № 6. P.

1611–1617.

43. Jimenez-Fernandez S., Gurpegui M., Diaz-Atienza F., Pérez-Costillas L., Gerstenberg M., Correll C.U. Oxidative stress and antioxidant parameters in patients with major depressive disorder compared to healthy controls before and after antidepressant treatment: results from a meta-analysis // *J. Clin. Psychiatry*. 2015. Vol. 76, № 12. P. 13705.
44. Kattoor A.J., Pothineni N.V.K., Palagiri D., Mehta J.L. Oxidative Stress in Atherosclerosis // *Curr. Atheroscler. Rep.* 2017. Vol. 19, № 11. P. 42.
45. Singh N., Dhalla A.K., Seneviratne C., Singal P.K. Oxidative stress and heart failure // *Mol. Cell. Biochem.* 1995. Vol. 147, № 1. P. 77–81.
46. Ramond A., Godin-Ribuot D., Ribaut C., Totoson P., Koritchneva I., Cachot S., Levy P., Joyeux-Faure M. Oxidative stress mediates cardiac infarction aggravation induced by intermittent hypoxia // *Fundam. Clin. Pharmacol.* 2013. Vol. 27, № 3. P. 252–261.
47. Amer J., Ghoti H., Rachmilewitz E., Koren A., Levin C., Fibach E. Red blood cells, platelets and polymorphonuclear neutrophils of patients with sickle cell disease exhibit oxidative stress that can be ameliorated by antioxidants // *Br. J. Haematol.* 2006. Vol. 132, № 1. P. 108–113.
48. Arican O., Kurutas E.B. Oxidative stress in the blood of patients with active localized vitiligo // *Acta Dermatovenerologica Alp. Panon. Adriat.* 2008. Vol. 17, № 1. P. 12.
49. Reuter S., Gupta S.C., Chaturvedi M.M., Aggarwal B.B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? // *Free Radic. Biol. Med.* 2010. Vol. 49, № 11. P. 1603–1616.
50. Lenaz G. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1998. Vol. 1366, № 1. P. 53–67.
51. Konstantinov A.A., Peskin A. V, Popova E.Y., Khomutov G.B., Ruuge E.K. Superoxide generation by the respiratory chain of tumor mitochondria // *BBA - Bioenerg.* 1987. Vol. 894, № 1. P. 1–10.
52. Sohal R.S. Aging, cytochrome oxidase activity, and hydrogen peroxide release by

- mitochondria // *Free Radic. Biol. Med.* 1993. Vol. 14, № 6. P. 583–588.
53. Skulachev V.P. Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants // *Q. Rev. Biophys.* 1996. Vol. 29, № 2. P. 169–202.
54. Skulachev V.P., Anisimov V.N., Antonenko Y.N., Bakeeva L.E., Chernyak B. V, Elichev V.P., Filenko O.F., Kalinina N.I., Kapelko V.I., Kolosova N.G., Kopnin B.P., Korshunova G.A., Lichinitser M.R., Obukhova L.A., Pasyukova E.G., Pisarenko O.I., Roginsky V.A., Ruuge E.K., Senin I.I., et al. An attempt to prevent senescence: A mitochondrial approach // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 2009. Vol. 1787, № 5. P. 437–461.
55. Cross A.R., Jones O.T.G. Enzymic mechanisms of superoxide production // *BBA - Bioenerg.* 1991. Vol. 1057, № 3. P. 281–298.
56. Ksenzenko M., Konstantinov A.A., Khomutov G.B., Tikhonov A.N., Ruuge E.K. Effect of electron transfer inhibitors on superoxide generation in the cytochrome bc1 site of the mitochondrial respiratory chain // *FEBS Lett.* 1983. Vol. 155, № 1. P. 19–24.
57. Pérez-Torres I., Manzano-Pech L., Rubio-Ruiz M.E., Soto M.E., Guarner-Lans V. Nitrosative Stress and Its Association with Cardiometabolic Disorders // *Molecules* . 2020. Vol. 25, № 11.
58. Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J., Marshall P.A., Freeman B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1990. Vol. 87, № 4. P. 1620–1624.
59. Al-Shehri S.S. Reactive oxygen and nitrogen species and innate immune response // *Biochimie.* 2021. Vol. 181. P. 52–64.
60. Forman H.J., Ursini F., Maiorino M. An overview of mechanisms of redox signaling // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2014. Vol. 73. P. 2–9.
61. Lancaster J.R. Nitroxidative, Nitrosative, and Nitrative Stress: Kinetic Predictions of Reactive Nitrogen Species Chemistry Under Biological Conditions // *Chem. Res. Toxicol.* 2006. Vol. 19, № 9. P. 1160–1174.

62. Zou M.-H., Cohen R.A., Ullrich V. Peroxynitrite and Vascular Endothelial Dysfunction in Diabetes Mellitus // *Endothelium*. 2004. Vol. 11, № 2. P. 89–97.
63. Watson D., Loweth A.C. Oxidative and nitrosative stress in β -cell apoptosis: their contribution to β -cell loss in type 1 diabetes mellitus // *Br. J. Biomed. Sci.* 2009. Vol. 66, № 4. P. 208–215.
64. Cantó A., Olivar T., Romero F.J., Miranda M. Nitrosative Stress in Retinal Pathologies: Review // *Antioxidants* . 2019. Vol. 8, № 11.
65. Martínez M.C., Andriantsitohaina R. Reactive Nitrogen Species: Molecular Mechanisms and Potential Significance in Health and Disease // *Antioxid. Redox Signal.* 2008. Vol. 11, № 3. P. 669–702.
66. Yoon S., Eom G.H., Kang G. Nitrosative Stress and Human Disease: Therapeutic Potential of Denitrosylation // *International Journal of Molecular Sciences* . 2021. Vol. 22, № 18.
67. Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease // *Physiol. Rev.* 2007. Vol. 87, № 1. P. 315–424.
68. Beckman J.S., Koppenol W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly // *Am. J. Physiol. Physiol.* 1996. Vol. 271, № 5. P. C1424–C1437.
69. Schiattarella G.G., Altamirano F., Tong D., French K.M., Villalobos E., Kim S.Y., Luo X., Jiang N., May H.I., Wang Z. V, Hill T.M., Mammen P.P.A., Huang J., Lee D.I., Hahn V.S., Sharma K., Kass D.A., Lavandro S., Gillette T.G., et al. Nitrosative stress drives heart failure with preserved ejection fraction // *Nature*. 2019. Vol. 568, № 7752. P. 351–356.
70. Radi R., Beckman J.S., Bush K.M., Freeman B.A. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide // *Arch. Biochem. Biophys.* 1991. Vol. 288, № 2. P. 481–487.
71. Murray J., Taylor S.W., Zhang B., Ghosh S.S., Capaldi R.A. Oxidative damage to mitochondrial complex I due to peroxynitrite: identification of reactive tyrosines by mass spectrometry // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, № 39. P. 37223–37230.
72. Ischiropoulos H., Al-Mehdi A.B. Peroxynitrite-mediated oxidative protein

- modifications // FEBS Lett. 1995. Vol. 364, № 3. P. 279–282.
73. Bringold U., Ghafourifar P., Richter C. Peroxynitrite formed by mitochondrial NO synthase promotes mitochondrial Ca²⁺ release // Free Radic. Biol. Med. 2000. Vol. 29, № 3. P. 343–348.
 74. Brookes P.S., Levonen A.-L., Shiva S., Sarti P., Darley-Usmar V.M. Mitochondria: regulators of signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species^{1, 2}
¹Guest Editor: Harry Ischiropoulos ²This article is part of a series of reviews on “Reactive Nitrogen Species, Tyrosine Nitration and Cell Signaling.” The full list // Free Radic. Biol. Med. 2002. Vol. 33, № 6. P. 755–764.
 75. Poderoso J.J., Lisdero C., Schöpfer F., Riobó N., Carreras M.C., Cadenas E., Boveris A. The Regulation of Mitochondrial Oxygen Uptake by Redox Reactions Involving Nitric Oxide and Ubiquinol* // J. Biol. Chem. 1999. Vol. 274, № 53. P. 37709–37716.
 76. Andrews K.L., Lumsden N.G., Farry J., Jefferis A.-M., Kemp-Harper B.K., Chin-Dusting J.P.F. Nitroxyl: a vasodilator of human vessels that is not susceptible to tolerance // Clin. Sci. 2015. Vol. 129, № 2. P. 179–187.
 77. Wynne M.B., Labazi H., Tostes C.R., Webb C.R. Nitroxyl Anion Mediates Relaxation in Mesenteric Arteries from Angiotensin II Hypertensive Mice // Current Vascular Pharmacology. 2018. Vol. 16, № 1. P. 93–101.
 78. Colton C.A., Gbadegesin M., Wink D.A., Miranda K.M., Espey M.G., Vicini S. Nitroxyl anion regulation of the NMDA receptor // J. Neurochem. 2001. Vol. 78, № 5. P. 1126–1134.
 79. Панасенко О.М., Сергиенко В.И. Галогенирующий стресс и его биомаркеры // Вестник Российской академии медицинских наук. 2010. № 1. P. 27–39.
 80. Панасенко О.М., Горудко И.В., Соколов А.В. Хлорноватистая кислота как предшественник свободных радикалов в живых системах // Успехи биологической химии. 2013. Vol. 53. P. 195–244.
 81. Anatoliotakis N., Deftereos S., Bouras G., Giannopoulos G., Tsounis D., Angelidis C., Kaoukis A., Stefanadis C. Myeloperoxidase: Expressing Inflammation and Oxidative Stress in Cardiovascular Disease // Current Topics in

- Medicinal Chemistry. 2013. Vol. 13, № 2. P. 115–138.
82. Morris J.C. The Acid Ionization Constant of HClO from 5 to 35° // J. Phys. Chem. 1966. Vol. 70, № 12. P. 3798–3805.
83. Панасенко О.М., Торховская Т.И., Горудко И.В., Соколов А.В. Роль галогенирующего стресса в атерогенной модификации липопротеинов низкой плотности // Успехи биологической химии. 2020. Vol. 60. P. 75–122.
84. Pietri R., Román-Morales E., López-Garriga J. Hydrogen sulfide and hemeproteins: knowledge and mysteries // Antioxid. Redox Signal. 2011/04/08. 2011. Vol. 15, № 2. P. 393–404.
85. Tsai A., Martin E., Berka V., Olson J.S. How Do Heme-Protein Sensors Exclude Oxygen? Lessons Learned from Cytochrome c', Nostoc punctiforme Heme Nitric Oxide/Oxygen-Binding Domain, and Soluble Guanylyl Cyclase // Antioxid. Redox Signal. 2012. Vol. 17, № 9. P. 1246–1263.
86. Schechter A.N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine // Blood. 2008. Vol. 112, № 10. P. 3927–3938.
87. Paoli M., Liddington R., Tame J., Wilkinson A., Dodson G. Crystal Structure of T State Haemoglobin with Oxygen Bound At All Four Haems // J. Mol. Biol. 1996. Vol. 256, № 4. P. 775–792.
88. Ahmed M.H., Ghatge M.S., Safo M.K. Hemoglobin: Structure, Function and Allostery BT - Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and other Body Fluid Proteins / ed. Hoeger U., Harris J.R. 2020. P. 345–382.
89. Gell D.A. Structure and function of haemoglobins // Blood Cells, Mol. Dis. 2018. Vol. 70. P. 13–42.
90. Perutz M.F. Nature of Haem–Haem Interaction // Nature. 1972. Vol. 237, № 5357. P. 495–499.
91. Perutz M.F., Wilkinson A.J., Paoli M., Dodson G.G. The stereochemical mechanism of the cooperative effects in hemoglobin revisited // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 1998. Vol. 27, № 1. P. 1–34.
92. Safo M.K., Ahmed M.H., Ghatge M.S., Boyiri T. Hemoglobin–ligand binding: Understanding Hb function and allostery on atomic level // Biochim. Biophys.

- Acta - Proteins Proteomics. 2011. Vol. 1814, № 6. P. 797–809.
93. Блюменфельд Л.А. Гемоглобин и обратимое присоединение кислорода // М. Советская наука. 1957.
 94. Нечипуренко Ю.Д., Семёнов Д.А., Лавриненко И.А., Лагуткин Д.А., Генералов Е.А., Зайцева А.Ю., Матвеева О.В., Егоров Е.Е. ПАТОГЕНЕЗ COVID-19: РОЛЬ АЦИДОЗА // Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. 2021. P. 247–256.
 95. Giardina B., Mosca D., De Rosa M.C. The Bohr effect of haemoglobin in vertebrates: an example of molecular adaptation to different physiological requirements // Acta Physiol. Scand. 2004. Vol. 182, № 3. P. 229–244.
 96. Kosmachevskaya O. V, Topunov A.F. Alternate and Additional Functions of Erythrocyte Hemoglobin // Biochem. 2018. Vol. 83, № 12. P. 1575–1593.
 97. Santucci R., Sinibaldi F., Cozza P., Polticelli F., Fiorucci L. Cytochrome c: An extreme multifunctional protein with a key role in cell fate // Int. J. Biol. Macromol. 2019. Vol. 136. P. 1237–1246.
 98. Ow Y.-L.P., Green D.R., Hao Z., Mak T.W. Cytochrome c: functions beyond respiration // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2008. Vol. 9, № 7. P. 532–542.
 99. Helms C., Kim-Shapiro D.B. Hemoglobin-mediated nitric oxide signaling // Free Radic. Biol. Med. 2013. Vol. 61. P. 464–472.
 100. Осипов А.Н., Борисенко Г.Г., Владимиров Ю.А. Биологическая роль нитрозильных комплексов гемопротеинов // Успехи биологической химии. 2007. Vol. 47. P. 259–292.
 101. Tsai A. How does NO activate hemeproteins? // FEBS Lett. 1994. Vol. 341, № 2–3. P. 141–145.
 102. Lobysheva I.I., Biller P., Gallez B., Beauloye C., Balligand J.-L. Nitrosylated Hemoglobin Levels in Human Venous Erythrocytes Correlate with Vascular Endothelial Function Measured by Digital Reactive Hyperemia // PLoS One. 2013. Vol. 8, № 10. P. e76457.
 103. Montiel V., Lobysheva I., Gérard L., Vermeersch M., Perez-Morga D., Castelein T., Mesland J.B., Hantson P., Collienne C., Gruson D., van Dievoet M.A., Persu

- A., Beauloye C., Dechamps M., Belkhir L., Robert A., Derive M., Laterre P.F., Danser A.H.J., et al. Oxidative stress-induced endothelial dysfunction and decreased vascular nitric oxide in COVID-19 patients // *eBioMedicine*. 2022. Vol. 77. P. 103893.
104. Yonetani T., Tsuneshige A., Zhou Y., Chen X. Electron Paramagnetic Resonance and Oxygen Binding Studies of α -Nitrosyl Hemoglobin: A NOVEL OXYGEN CARRIER HAVING NO-ASSISTED ALLOSTERIC FUNCTIONS* // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273, № 32. P. 20323–20333.
 105. Sharma V.S., Traylor T.G., Gardiner R., Mizukami H. Reaction of nitric oxide with heme proteins and model compounds of hemoglobin // *Biochemistry*. 1987. Vol. 26, № 13. P. 3837–3843.
 106. Moore E.G., Gibson Q.H. Cooperativity in the dissociation of nitric oxide from hemoglobin. // *J. Biol. Chem.* 1976. Vol. 251, № 9. P. 2788–2794.
 107. Dei Zotti F., Lobysheva I.I., Balligand J.-L. Nitrosyl-hemoglobin formation in rodent and human venous erythrocytes reflects NO formation from the vasculature in vivo // *PLoS One*. 2018. Vol. 13, № 7. P. e0200352.
 108. Lobysheva I.I., van Eeckhoudt S., Dei Zotti F., Rifahi A., Pothén L., Beauloye C., Balligand J.-L. Heme-nitrosylated hemoglobin and oxidative stress in women consuming combined contraceptives. Clinical application of the EPR spectroscopy // *Free Radic. Biol. Med.* 2017. Vol. 108. P. 524–532.
 109. Nagababu E., Ramasamy S., Abernethy D.R., Rifkind J.M. Active Nitric Oxide Produced in the Red Cell under Hypoxic Conditions by Deoxyhemoglobin-mediated Nitrite Reduction* // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, № 47. P. 46349–46356.
 110. Kosmachevskaya O. V, Shumaev K.B., Nasybullina E.I., Topunov A.F. Formation of nitri- and nitrosylhemoglobin in systems modeling the Maillard reaction // *Clin. Chem. Lab. Med.* 2014. Vol. 52, № 1. P. 161–168.
 111. Yoshida T., Prudent M., D'alessandro A. Red blood cell storage lesion: causes and potential clinical consequences // *Blood Transfus.* 2019. Vol. 17, № 1. P. 27–52.
 112. Sengupta P., Mahalakshmi V., Stebin J.J., Ganesh S., Suganya N., Chatterjee S.

- Nitric oxide donors offer protection to RBC from storage lesion // *Transfus. Clin. Biol.* 2020. Vol. 27, № 4. P. 229–236.
113. Kanias T., Gladwin M.T. Nitric oxide, hemolysis, and the red blood cell storage lesion: interactions between transfusion, donor, and recipient // *Transfusion*. 2012. Vol. 52, № 7. P. 1388–1392.
 114. Gladwin M.T., Kim-Shapiro D.B. Storage lesion in banked blood due to hemolysis-dependent disruption of nitric oxide homeostasis // *Curr. Opin. Hematol.* 2009. Vol. 16, № 6.
 115. Mallard J.R., Kent M. Differences observed between Electron Spin Resonance Signals from Surviving Tumour Tissues and from their Corresponding Normal Tissues // *Nature*. 1964. Vol. 204, № 4964. P. 1192.
 116. Vithayathil A.J., Ternberg J.L., Commoner B. Changes in Electron Spin Resonance Signals of Rat Liver During Chemical Carcinogenesis // *Nature*. 1965. Vol. 207, № 5003. P. 1246–1249.
 117. Vanin A.F. Physico-Chemistry of Dinitrosyl Iron Complexes as a Determinant of Their Biological Activity // *International Journal of Molecular Sciences* . 2021. Vol. 22, № 19.
 118. Truzzi D.R., Augusto O., Ford P.C. Thiyl radicals are co-products of dinitrosyl iron complex (DNIC) formation // *Chem. Commun.* 2019. Vol. 55, № 62. P. 9156–9159.
 119. Truzzi D.R., Augusto O., Iretskii A. V, Ford P.C. Dynamics of Dinitrosyl Iron Complex (DNIC) Formation with Low Molecular Weight Thiols // *Inorg. Chem.* 2019. Vol. 58, № 19. P. 13446–13456.
 120. Vanin A.F., Burbaev D.S. Electronic and Spatial Structures of Water-Soluble Dinitrosyl Iron Complexes with Thiol-Containing Ligands Underlying Their Ability to Act as Nitric Oxide and Nitrosonium Ion Donors // *J. Biophys.* / ed. Lattman E.E. 2011. Vol. 2011. P. 878236.
 121. Allakhverdiev E.S., Maksimov G. V, Rodnenkov O. V, Luneva O.G., Tsoraev G. V, Ivanov A.D., Yusipovich A.I., Martynyuk T. V. Effect of Dinitrosyl Iron Complex on Albumin Conformation // *Biochem.* 2021. Vol. 86, № 5. P. 533–539.

122. 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* / ed. Poole R.K.B.T.-M. in E. 2008. Vol. 436. P. 445–461.
123. Timoshin A.A., Lakomkin V.L., Abramov A.A., Ruuge E.K., Kapel'ko V.I., Chazov E.I., Vanin A.F. The hypotensive effect of the nitric monoxide donor Oxacom at different routs of its administration to experimental animals // *Eur. J. Pharmacol.* 2015. Vol. 765. P. 525–532.
124. Pisarenko O., Studneva I., Timoshin A., Veselova O. Protective efficacy of dinitrosyl iron complexes with reduced glutathione in cardioplegia and reperfusion // *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 2019. Vol. 471, № 4. P. 583–593.
125. Chazov E.I., Rodnenkov O. V, Zorin A. V, Lakomkin V.L., Gramovich V. V, Vyborov O.N., Dragnev A.G., Timoshin A.A., Buryachkovskaya L.I., Abramov A.A., Massenko V.P., Arzamastsev E. V, Kapelko V.I., Vanin A.F. Hypotensive effect of Oxacom® containing a dinitrosyl iron complex with glutathione: Animal studies and clinical trials on healthy volunteers // *Nitric Oxide.* 2012. Vol. 26, № 3. P. 148–156.
126. Чазов Е.И., Родненков О.В., Зорин А.В., Лакомкин В.Л., Грамович В.В., Выборов О.Н., Драгнев А.Г., Тимошин А.А., Бурячковская Л.И., Абрамов А.А. Испытание гипотензивного действия препарата оксаком, содержащего динитрозильный комплекс железа с глутатионом, на здоровых добровольцах // *Кардиология.* 2011. Vol. 51, № 11. P. 28–37.
127. Тимошин А.А., Лакомкин В.Л., Дроботова Д.Ю., Рууге Э.К., Ванин А.Ф. Превращения динитрозильных комплексов железа в ткани изолированного сердца крысы при введении этого соединения в состав среды перфузии // *Биофизика.* 2013. Vol. 58, № 2. P. 281–288.
128. Vedernikov Y.P., Mordvintcev P.I., Malenkova I. V, Vanin A.F. Similarity between the vasorelaxing activity of dinitrosyl iron cysteine complexes and endothelium-derived relaxing factor // *Eur. J. Pharmacol.* 1992. Vol. 211, № 3. P. 313–317.

129. Галаган М.Е., Киладзе С.В., Ванин А.Ф. Реакция динитрозильных комплексов негемового железа с диэтилдитиокарбаматом в крови анестезированных крыс: ее специфическое проявление на физико-химическом и физиологическом уровнях // Биофизика. 1997. Vol. 42, № 3. P. 687–693.
130. Kleschyov A.L., Mordvintsev P.I., Vanin A.F. Role of nitric oxide and iron in hypotensive action of nitrosyl iron complexes with various anion ligands // Stud. Biophys. 1985. Vol. 105. P. 93–102.
131. Flitney F.W., Megson I.L., Flitney D.E., Butler A.R. Iron-sulphur cluster nitrosyls, a novel class of nitric oxide generator: mechanism of vasodilator action on rat isolated tail artery // Br. J. Pharmacol. 1992. Vol. 107, № 3. P. 842–848.
132. Vanin A.F., Mokh V.P., Serezhenkov V.A., Chazov E.I. Vasorelaxing activity of stable powder preparations of dinitrosyl iron complexes with cysteine or glutathione ligands // Nitric Oxide. 2007. Vol. 16, № 3. P. 322–330.
133. Lakomkin V.L., Vanin A.F., Timoshin A.A., Kapelko V.I., Chazov E.I. Long-lasting hypotensive action of stable preparations of dinitrosyl-iron complexes with thiol-containing ligands in conscious normotensive and hypertensive rats // Nitric Oxide. 2007. Vol. 16, № 4. P. 413–418.
134. Мордвинцев П.И., Руднева В.Г., Ванин А.Ф., Шимкевич Л.Л., Ходоров Б.И. Ингибиторное действие низкомолекулярных динитрозильных комплексов на агрегацию тромбоцитов // Биохимия. 1986. Vol. 51. P. 1851–1857.
135. Arkhipova M.A., Mikoian V.D., Vanin A.F. Effect of exogenous donors of nitric oxide and inhibitors of its enzymatic synthesis on experimental ischemic thrombosis in conjunctive veins of the rabbit eyes // Biofizika. 2008. Vol. 53, № 2. P. 315–325.
136. Ширинский В.П., Капелько В.И., Ванин А.Ф. Средство против гипоксии миокарда // Патент на изобретение № 2522953 Российская Федерация, заявл. 2013127124, 14.06.2013; опубл. 20.07.2014 бюлл. № 15.
137. Шамова Е.В., Бичан О.Д., Дрозд И.В., Горудко И.В., Чижик С.А., Шумаев К.Б., Черенкевич С.Н., Ванин А.Ф. Регуляция функциональных и

- механических свойств тромбоцитов и эритроцитов донорами оксида азота // Биофизика. 2011. Vol. 56, № 2. P. 265–271.
138. Shekhter A.B., Rudenko T.G., Istranov L.P., Guller A.E., Borodulin R.R., Vanin A.F. Dinitrosyl iron complexes with glutathione incorporated into a collagen matrix as a base for the design of drugs accelerating skin wound healing // Eur. J. Pharm. Sci. 2015. Vol. 78. P. 8–18.
139. Shekhter A.B., Rudenko T.G., Serezhenkov V.A., Vanin A.F. [Dinitrosyl]-iron complexes with cysteine or glutathione accelerate skin wound healing in animals] // Biofizika. 2007. Vol. 52, № 3. P. 539–547.
140. Remizova M.I., Kochetygov N.I., Gerbout K.A., Lakomkin V.L., Timoshin A.A., Burgova E.N., Vanin A.F. Effect of dinitrosyl iron complexes with glutathione on hemorrhagic shock followed by saline treatment // Eur. J. Pharmacol. 2011. Vol. 662, № 1. P. 40–46.
141. Andreyev-Andriyevsky A.A., Mikoyan V.D., Serezhenkov V.A., Vanin A.F. Penile erectile activity of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands // Nitric Oxide. 2011. Vol. 24, № 4. P. 217–223.
142. Писаренко О.И., Серебрякова Л.И., Цкитишвили О.В., Студнева И.М., Ванин А.Ф., Чазов Е.И. Кардиопротекторная эффективность динитрозильного комплекса железа с L-цистеином у крыс *in vivo* // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. 2008. № 1. P. 110–114.
143. Giliano N.Y., Konevega L. V, Noskin L.A., Serezhenkov V.A., Poltorakov A.P., Vanin A.F. Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands and apoptosis: Studies with HeLa cell cultures // Nitric Oxide. 2011. Vol. 24, № 3. P. 151–159.
144. Serezhenkov V.A., Kalinina E. V, Glazunova V.A., Saprin A.N., Vanin A.F. Why does iron abrogate the cytotoxic effect of S-nitrosothiols on human and animal cultured cells? // Biofizika. 2007. Vol. 52, № 5. P. 869–875.
145. Ding H., Demple B. Direct nitric oxide signal transduction via nitrosylation of iron-sulfur centers in the SoxR transcription activator // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2000. Vol. 97, № 10. P. 5146–5150.
146. Cruz-Ramos H., Crack J., Wu G., Hughes M.N., Scott C., Thomson A.J., Green J.,

- Poole R.K. NO sensing by FNR: Regulation of the Escherichia coli NO-detoxifying flavohaemoglobin, Hmp // EMBO J. 2002. Vol. 21, № 13. P. 3235–3244.
147. Lo F.-C., Chen C.-L., Lee C.-M., Tsai M.-C., Lu T.-T., Liaw W.-F., Yu S.S.-F. A study of NO trafficking from dinitrosyl–iron complexes to the recombinant E. coli transcriptional factor SoxR // JBIC J. Biol. Inorg. Chem. 2008. Vol. 13, № 6. P. 961–972.
 148. Fujikawa M., Kobayashi K., Kozawa T. Mechanistic studies on formation of the dinitrosyl iron complex of the [2Fe-2S] cluster of SoxR protein // J. Biochem. 2014. Vol. 156, № 3. P. 163–172.
 149. Lo F.-C., Lee J.-F., Liaw W.-F., Hsu I.-J., Tsai Y.-F., Chan S.I., Yu S.S.-F. The Metal Core Structures in the Recombinant Escherichia coli Transcriptional Factor SoxR // Chem. – A Eur. J. 2012. Vol. 18, № 9. P. 2565–2577.
 150. Crack J.C., Green J., Thomson A.J., Brun N.E. Le. Iron–Sulfur Clusters as Biological Sensors: The Chemistry of Reactions with Molecular Oxygen and Nitric Oxide // Acc. Chem. Res. 2014. Vol. 47, № 10. P. 3196–3205.
 151. Васильева С.В., Ступакова М.В., Лобышева И.И. Активация SoxRS-регулона Escherichia coli оксидом азота и его физиологическими донорами // Биохимия. 2001. Vol. 66, № 9. P. 1209.
 152. Graziano M., Lamattina L. Nitric oxide and iron in plants: an emerging and converging story // Trends Plant Sci. 2005. Vol. 10, № 1. P. 4–8.
 153. Vanin A.F., Tronov V.A., Borodulin R.R. Nitrosonium Cation as a Cytotoxic Component of Dinitrosyl Iron Complexes with Thiol-containing Ligands (based on the Experimental Work on MCF7 Human Breast Cancer Cell Culture) // Cell Biochem. Biophys. 2021. Vol. 79, № 1. P. 93–102.
 154. Kleschyov A.L., Strand S., Schmitt S., Gottfried D., Skatchkov M., Sjakste N., Daiber A., Umansky V., Munzel T. Dinitrosyl-iron triggers apoptosis in Jurkat cells despite overexpression of Bcl-2 // Free Radic. Biol. Med. 2006. Vol. 40, № 8. P. 1340–1348.
 155. Бургова Е.Н., Ткачев Н.А., Ванин А.Ф. Динитрозильные комплексы железа с

- цистеином тормозят развитие экспериментального эндометриоза у крыс // Биофизика. 2012. Vol. 57, № 1. P. 105–109.
156. Burgova E.N., Tkachev N.A., Adamyan L. V, Mikoyan V.D., Paklina O. V, Stepanyan A.A., Vanin A.F. Dinitrosyl iron complexes with glutathione suppress experimental endometriosis in rats // Eur. J. Pharmacol. 2014. Vol. 727. P. 140–147.
 157. Burgova E.N., Tkachev N.A., Paklina O. V, Mikoyan V.D., Adamyan L. V, Vanin A.F. The effect of dinitrosyl iron complexes with glutathione and S-nitrosoglutathione on the development of experimental endometriosis in rats: A comparative studies // Eur. J. Pharmacol. 2014. Vol. 741. P. 37–44.
 158. Ванин А.Ф., Островская Л.А., Корман Д.Б., Микоян В.Д., Кубрина Л.Н., Бородулин Р.Р., Фомина М.М., Блюхтерова Н.В., Рыкова В.А. Антинитрозативная система как фактор резистентности злокачественных опухолей к цитотоксическому действию монооксида азота // Биофизика. 2015. Vol. 60, № 1. P. 152–157.
 159. Badorff C., Fichtlscherer B., Muelsch A., Zeiher A.M., Dimmeler S. Selective Delivery of Nitric Oxide to a Cellular Target: A Pseudosubstrate-Coupled Dinitrosyl–Iron Complex Inhibits the Enteroviral Protease 2A // Nitric Oxide. 2002. Vol. 6, № 3. P. 305–312.
 160. Pectol D.C., DeLaney C.R., Zhu J., Mellott D.M., Katzfuss A., Taylor Z.W., Meek T.D., Darensbourg M.Y. Dinitrosyl iron complexes (DNICs) as inhibitors of the SARS-CoV-2 main protease // Chem. Commun. 2021. Vol. 57, № 67. P. 8352–8355.
 161. Vanin A.F., Pekshev A. V, Vagapov A.B., Sharapov N.A., Lakomkin V.L., Abramov A.A., Timoshin A.A., Kapelko V.I. Gaseous Nitric Oxide and Dinitrosyl Iron Complexes with Thiol-Containing Ligands as Potential Medicines that Can Relieve COVID-19 // Biophysics (Oxf). 2021/04/27. 2021. Vol. 66, № 1. P. 155–163.
 162. Kagan V.E., Kozlov A. V, Tyurina Y.Y., Shvedova A.A., Yalowich J.C. Antioxidant Mechanisms of Nitric Oxide Against Iron-Catalyzed Oxidative Stress

- in Cells // Antioxid. Redox Signal. 2001. Vol. 3, № 2. P. 189–202.
163. Nagababu E., Rifkind J.M. Routes for Formation of S-Nitrosothiols in Blood // Cell Biochemistry and Biophysics. 2013. Vol. 67, № 2. P. 385–398.
 164. Rauhala P., Andoh T., Chiueh C.C. Neuroprotective properties of nitric oxide and S-nitrosoglutathione // Toxicol. Appl. Pharmacol. 2005. Vol. 207, № 2, Supplement. P. 91–95.
 165. Premont R.T., Stamler J.S. Essential Role of Hemoglobin β Cys93 in Cardiovascular Physiology // Physiology. 2020. Vol. 35, № 4. P. 234–243.
 166. Yalowich J.C., Gorbunov N. V, Kozlov A. V, Allan W., Kagan V.E. Mechanisms of Nitric Oxide Protection against tert-Butyl Hydroperoxide-Induced Cytotoxicity in iNOS-Transduced Human Erythroleukemia Cells // Biochemistry. 1999. Vol. 38, № 33. P. 10691–10698.
 167. Vasconcellos L.R.C., Martimiano L., Dantas D.P., Fonseca F.M., Mata-Santos H., Travassos L., Mendez-Otero R., Bozza M.T., Pimentel-Coelho P.M. Intracerebral Injection of Heme Induces Lipid Peroxidation, Neuroinflammation, and Sensorimotor Deficits // Stroke. 2021. Vol. 52, № 5. P. 1788–1797.
 168. Radi R., Bush K.M., Freeman B.A. The Role of Cytochrome c and Mitochondrial Catalase in Hydroperoxide-Induced Heart Mitochondrial Lipid Peroxidation // Arch. Biochem. Biophys. 1993. Vol. 300, № 1. P. 409–415.
 169. Sadrzadeh S.M., Graf E., Panter S.S., Hallaway P.E., Eaton J.W. Hemoglobin. A biologic fenton reagent. // J. Biol. Chem. 1984. Vol. 259, № 23. P. 14354–14356.
 170. 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. Vol. 69, № 5. P. 699–705.
 171. Kanner J., Ben-Gera I., Berman S. Nitric-oxide myoglobin as an inhibitor of lipid oxidation // Lipids. 1980. Vol. 15, № 11. P. 944–948.
 172. Baron C.P., Møller J.K.S., Skibsted L.H., Andersen H.J. Nitrosylmyoglobin as antioxidant—kinetics and proposed mechanism for reduction of hydroperoxides // Free Radic. Res. 2007. Vol. 41, № 8. P. 892–902.

173. Lu C., Koppenol W.H. Inhibition of the Fenton reaction by nitrogen monoxide // JBIC J. Biol. Inorg. Chem. 2005. Vol. 10, № 7. P. 732–738.
174. Gorbunov N. V, Osipov A.N., Day B.W., Zayas-Rivera B., Kagan V.E., Elsayed N.M. Reduction of ferrylmyoglobin and ferrylhemoglobin by nitric oxide: a protective mechanism against ferryl hemoprotein-induced oxidations // Biochemistry. 1995. Vol. 34, № 20. P. 6689–6699.
175. Vanin A.F., Men'shikov G.B., Moroz I.A., Mordvintcev P.I., Serezhenkov V.A., Burbaev D.S. The source of non-heme iron that binds nitric oxide in cultivated macrophages // Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res. 1992. Vol. 1135, № 3. P. 275–279.
176. Sahni S., Hickok J.R., Thomas D.D. Nitric oxide reduces oxidative stress in cancer cells by forming dinitrosyliron complexes // Nitric Oxide. 2018. Vol. 76. P. 37–44.
177. Shumaev K.B., Dudylyna A.L., Ivanova M. V, Pugachenko I.S., Ruuge E.K. Dinitrosyl iron complexes: Formation and antiradical action in heart mitochondria // BioFactors. 2018. Vol. 44, № 3. P. 237–244.
178. Herold S., Rehmann F.-J.K. Kinetic and mechanistic studies of the reactions of nitrogen monoxide and nitrite with ferryl myoglobin // JBIC J. Biol. Inorg. Chem. 2001. Vol. 6, № 5. P. 543–555.
179. Kosmachevskaya O. V, Nasybullina E.I., Shumaev K.B., Novikova N.N., Topunov A.F. Protective Effect of Dinitrosyl Iron Complexes Bound with Hemoglobin on Oxidative Modification by Peroxynitrite // International Journal of Molecular Sciences . 2021. Vol. 22, № 24.
180. Robinson K.M., Beckman J.S.B.T.-M. in E. Synthesis of Peroxynitrite from Nitrite and Hydrogen Peroxide // Nitric Oxide, Part E. 2005. Vol. 396. P. 207–214.
181. Shumaev K.B., Gubkin A.A., Serezhenkov V.A., Lobysheva I.I., Kosmachevskaya O. V, Ruuge E.K., Lankin V.Z., Topunov A.F., Vanin A.F. Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with albumin- and methemoglobin-bound dinitrosyl-iron complexes // Nitric Oxide. 2008. Vol. 18, № 1. P. 37–46.
182. Gaffney B.J., McConnell H.M. The paramagnetic resonance spectra of spin labels

- in phospholipid membranes // J. Magn. Reson. 1974. Vol. 16, № 1. P. 1–28.
183. Hemminga M.A. Interpretation of ESR and saturation transfer ESR spectra of spin labeled lipids and membranes // Chem. Phys. Lipids. 1983. Vol. 32, № 3. P. 323–383.
184. Stolze K., Udilova N., Nohl H. Spin trapping of lipid radicals with DEPMPO-derived spin traps: detection of superoxide, alkyl and alkoxy radicals in aqueous and lipid phase // Free Radic. Biol. Med. 2000. Vol. 29, № 10. P. 1005–1014.
185. 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. Vol. 9, № 7. P. 2473–2480.
186. Karoui H., Hogg N., Fréjaville C., Tordo P., Kalyanaraman B. Characterization of Sulfur-centered Radical Intermediates Formed during the Oxidation of Thiols and Sulfite by Peroxynitrite: ESR-SPIN TRAPPING AND OXYGEN UPTAKE STUDIES // J. Biol. Chem. 1996. Vol. 271, № 11. P. 6000–6009.
187. Ghaleb S., Reagor J.A., Tarango C., Benscoter A., Smith R., Byrnes J.W. Correlation among Hemolysis Biomarkers in Pediatric Patients Undergoing Extracorporeal Membrane Oxygenation // J. Extra. Corpor. Technol. 2021. Vol. 53, № 2. P. 125.
188. Dobretsov G.E., Borschevskaya T.A., Petrov V.A., Vladimirov Y.A. The increase of phospholipid bilayer rigidity after lipid peroxidation // FEBS Lett. 1977. Vol. 84, № 1. P. 125–128.
189. Вилков Г.А., Кирой Р.И., Степнина Е.Г. Перекисное окисление липидов и микровязкость мембран эритроцитов больных шизофренией // Журнал неврологии и психиатрии. 1991. № 10. P. 45–47.
190. 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. / ed. Smith T.K. 2016. Vol. 2016. P. 3429604.

191. Colina J.R., Suwalsky M., Petit K., Contreras D., Manrique-Moreno M., Jemiola-Rzeminska M., Strzalka K. In vitro evaluation of the protective effect of crocin on human erythrocytes // *Biophys. Chem.* 2022. Vol. 281. P. 106738.
192. 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.* / ed. Kozlov A. V. 2019. Vol. 2019. P. 2798154.
193. Ghibaudi E., Barker J.R., Benson S.W. Reaction of NO with hypochlorous acid // *Int. J. Chem. Kinet.* 1979. Vol. 11, № 8. P. 843–851.
194. Luchsinger B.P., Walter E.D., Lee L.J., Stamler J.S., Singel D.J. EPR studies of the chemical dynamics of NO and hemoglobin interactions // *High Resolut. EPR Appl. to Met. Med.* 2009. P. 419–438.
195. Kumar M.R., Clover T., Olaitan A.D., Becker C., Solouki T., Farmer P.J. The reaction between GSNO and H₂S: On the generation of NO, HNO and N₂O // *Nitric Oxide.* 2018. Vol. 77. P. 96–105.
196. Oh J.-Y., Williams A., Patel R.P. The role of redox-dependent mechanisms in heme release from hemoglobin and erythrocyte hemolysates // *Arch. Biochem. Biophys.* 2019. Vol. 662. P. 111–120.
197. Chen W., Druhan L.J., Chen C.-A., Hemann C., Chen Y.-R., Berka V., Tsai A.-L., Zweier J.L. Peroxynitrite Induces Destruction of the Tetrahydrobiopterin and Heme in Endothelial Nitric Oxide Synthase: Transition from Reversible to Irreversible Enzyme Inhibition // *Biochemistry.* 2010. Vol. 49, № 14. P. 3129–3137.
198. 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. Vol. 28, № 5. P. 786–796.
199. Rubbo H., O'Donnell V. Nitric oxide, peroxynitrite and lipoxxygenase in atherogenesis: mechanistic insights // *Toxicology.* 2005. Vol. 208, № 2. P.

305–317.

200. Lankin V., Konovalova G., Tikhaze A., Shumaev K., Kumskova E., Viigimaa M. The initiation of free radical peroxidation of low-density lipoproteins by glucose and its metabolite methylglyoxal: a common molecular mechanism of vascular wall injury in atherosclerosis and diabetes // *Mol. Cell. Biochem.* 2014. Vol. 395, № 1. P. 241–252.
201. Hogg N., Kalyanaraman B., Joseph J., Struck A., Parthasarathy S. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide Potential role in atherogenesis // *FEBS Lett.* 1993. Vol. 334, № 2. P. 170–174.
202. Lankin Z.V., Tikhaze K.A. Role of Oxidative Stress in the Genesis of Atherosclerosis and Diabetes Mellitus: A Personal Look Back on 50 Years of Research // *Current Aging Science.* 2017. Vol. 10, № 1. P. 18–25.
203. Lankin V.Z., Shadyro O.I., Shumaev K.B., Shumaev K.B., Tikhaze A.K., Sladkova A.A. Non-enzymatic methylglyoxal formation from glucose metabolites and generation of superoxide anion radical during methylglyoxal-dependent cross-links reaction // *J. Antioxid. Act.* 2019. Vol. 1, № 4.
204. Li Q., Li C., Mahtani H.K., Du J., Patel A.R., Lancaster J.R. Nitrosothiol Formation and Protection against Fenton Chemistry by Nitric Oxide-induced Dinitrosyliron Complex Formation from Anoxia-initiated Cellular Chelatable Iron Increase* // *J. Biol. Chem.* 2014. Vol. 289, № 29. P. 19917–19927.
205. Radi R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2018. Vol. 115, № 23. P. 5839 LP – 5848.
206. Эммануэль Н.М., Денисов Е.Т., Майзус З.К. Цепные реакции окисления углеводов в жидкой фазе. Издательство «Наука» // Москва. 1965.
207. Damasceno F.C., Condeles A.L., Lopes A.K.B., Facci R.R., Linares E., Truzzi D.R., Augusto O., Toledo J.C. The labile iron pool attenuates peroxynitrite-dependent damage and can no longer be considered solely a pro-oxidative cellular iron source // *J. Biol. Chem.* 2018. Vol. 293, № 22. P. 8530–8542.

208. Гудков Л.Л., Шумаев К.Б., Каленикова Е.И., Губкина С.А., Ванин А.Ф., Рууге Э.К. Антиоксидантное и прооксидантное действие доноров и метаболитов оксида азота // Биофизика. 2007. Vol. 52, № 3. P. 503–509.
209. Матвеева Н.С., Любичский О.Б., Осипов А.Н., Владимиров Ю.А. Активированная люцигенином хемилюминесценция тканей животных // биофизика. 2007. Vol. 52, № 6. P. 1120–1127.
210. Dikalov S., Jiang J., Mason R.P. Characterization of the high-resolution ESR spectra of superoxide radical adducts of 5-(diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide (DEPMPO) and 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO). Analysis of conformational exchange // Free Radic. Res. 2005. Vol. 39, № 8. P. 825–836.
211. Kumar P., Kalita A., Mondal B. Nitric oxide sensors based on copper(II) complexes of N-donor ligands // Inorganica Chim. Acta. 2013. Vol. 404. P. 88–96.
212. Tran N.G., Kalyvas H., Skodje K.M., Hayashi T., Moënne-Loccoz P., Callan P.E., Shearer J., Kirschenbaum L.J., Kim E. Phenol Nitration Induced by an {Fe(NO)₂}₁₀ Dinitrosyl Iron Complex // J. Am. Chem. Soc. 2011. Vol. 133, № 5. P. 1184–1187.
213. Kumar P., Kalita A., Mondal B. Nitric oxide sensors based on copper(II) complexes of N-donor ligands // Inorganica Chim. Acta. 2013. Vol. 404. P. 88–96.
214. Lopez B.E., Shinyashiki M., Han T.H., Fukuto J.M. Antioxidant actions of nitroxyl (HNO) // Free Radic. Biol. Med. 2007. Vol. 42, № 4. P. 482–491.
215. 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. Vol. 11, № 10.
216. Michalski R., Smulik-Izydorczyk R., Pięta J., Rola M., Artelska A., Pierzchała K., Zielonka J., Kalyanaraman B., Sikora A.B. The Chemistry of HNO: Mechanisms and Reaction Kinetics // Frontiers in Chemistry . 2022. Vol. 10.
217. Li J.C., Velagic A., Qin C.X., Li M., Leo C.H., Kemp-Harper B.K., Ritchie R.H., Woodman O.L. Diabetes Attenuates the Contribution of Endogenous Nitric Oxide but Not Nitroxyl to Endothelium Dependent Relaxation of Rat Carotid Arteries

- // *Frontiers in Pharmacology* . 2021. Vol. 11.
218. Miranda K.M., Paolocci 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. Vol. 100, № 16. P. 9196–9201.
 219. Baron C.P., Andersen H.J. Myoglobin-Induced Lipid Oxidation. A Review // *J. Agric. Food Chem.* 2002. Vol. 50, № 14. P. 3887–3897.
 220. Reeder B.J., Svistunenko D.A., Sharpe M.A., Wilson M.T. Characteristics and Mechanism of Formation of Peroxide-Induced Heme to Protein Cross-Linking in Myoglobin // *Biochemistry.* 2002. Vol. 41, № 1. P. 367–375.
 221. Reeder B.J., Svistunenko D.A., Cooper C.E., Wilson M.T. The Radical and Redox Chemistry of Myoglobin and Hemoglobin: From In Vitro Studies to Human Pathology // *Antioxid. Redox Signal.* 2004. Vol. 6, № 6. P. 954–966.
 222. Wilson M.T., Reeder B.J. The peroxidatic activities of Myoglobin and Hemoglobin, their pathological consequences and possible medical interventions // *Mol. Aspects Med.* 2022. Vol. 84. P. 101045.
 223. Solomon S.B., Bellavia L., Sweeney D., Piknova B., Perlegas A., Helms C.C., Ferreyra G.A., Bruce King S., Raat N.J.H., Kern S.J., Sun J., McPhail L.C., Schechter A.N., Natanson C., Gladwin M.T., Kim-Shapiro D.B. Angeli's salt counteracts the vasoactive effects of elevated plasma hemoglobin // *Free Radic. Biol. Med.* 2012. Vol. 53, № 12. P. 2229–2239.
 224. Gorbunov N. V, Yalowich J.C., Gaddam A., Thampatty P., Ritov V.B., Kisin E.R., Elsayed N.M., Kagan V.E. Nitric Oxide Prevents Oxidative Damage Produced by tert-Butyl Hydroperoxide in Erythroleukemia Cells via Nitrosylation of Heme and Non-heme Iron: ELECTRON PARAMAGNETIC RESONANCE EVIDENCE // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272, № 19. P. 12328–12341.
 225. Herold S., Rehmann F.-J.K. Kinetics of the reactions of nitrogen monoxide and nitrite with ferryl hemoglobin // *Free Radic. Biol. Med.* 2003. Vol. 34, № 5. P. 531–545.
 226. 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. Vol. 34, № 7. P. 830–839.
227. Romero N., Radi R., Linares E., Augusto O., Detweiler C.D., Mason R.P., Denicola A. Reaction of Human Hemoglobin with Peroxynitrite: ISOMERIZATION TO NITRATE AND SECONDARY FORMATION OF PROTEIN RADICALS * // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, № 45. P. 44049–44057.
 228. Herold S., Shivashankar K. Metmyoglobin and Methemoglobin Catalyze the Isomerization of Peroxynitrite to Nitrate // *Biochemistry.* 2003. Vol. 42, № 47. P. 14036–14046.
 229. Su J., Groves J.T. Mechanisms of Peroxynitrite Interactions with Heme Proteins // *Inorg. Chem.* 2010. Vol. 49, № 14. P. 6317–6329.
 230. Menshikova E. V, Ritov V.B., Gorbunov N. V, Salama G.U.Y., Claycamp H.G., Kagan V.E. Nitric Oxide Prevents Myoglobin/tert-Butyl Hydroperoxide-Induced Inhibition of Ca²⁺ Transport in Skeletal and Cardiac Sarcoplasmic Reticulum // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1999. Vol. 874, № 1. P. 371–385.
 231. Møller J.K.S., Skibsted L.H. Mechanism of Nitrosylmyoglobin Autoxidation: Temperature and Oxygen Pressure Effects on the Two Consecutive Reactions // *Chem. – A Eur. J.* 2004. Vol. 10, № 9. P. 2291–2300.
 232. Nakamura M., Nakamura S. Conversion of metmyoglobin to NO myoglobin in the presence of nitrite and reductants // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1996. Vol. 1289, № 3. P. 329–335.
 233. Zapata A.L., Kumar M.R., Pervitsky D., Farmer P.J. A singular value decomposition approach for kinetic analysis of reactions of HNO with myoglobin // *J. Inorg. Biochem.* 2013. Vol. 118. P. 171–178.
 234. Ma X.L., Gao F., Liu G.-L., Lopez B.L., Christopher T.A., Fukuto J.M., Wink D.A., Feelisch M. Opposite effects of nitric oxide and nitroxyl on postischemic myocardial injury // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999. Vol. 96, № 25. P. 14617–14622.
 235. Лобышева И.И., Сереженков В.А., Ванин А.Ф. Взаимодействие динитрозильных тиолсодержащих комплексов железа с пероксинитритом и

- перекисью водорода *in vitro* // Биохимия. 1999. Vol. 64, № 2. P. 194–200.
236. Шумаев К.Б., Заббарова И.В., Рууге Э.К., Ванин А.Ф. Влияние активных форм кислорода и азота на высвобождение ионов железа из ферритина и синтез динитрозильных комплексов железа // Биофизика. 2003. Vol. 48, № 1. P. 5–10.
237. Заббарова И.В., Шумаев К.Б., Ванин А.Ф., Губкин А.А., Петрова Н.Э., Рууге Э.К. Взаимодействие ферритина и миоглобина как индукторов перекисного окисления липидов. Роль активных форм кислорода и азота // Биофизика. 2004. Vol. 49, № 4. P. 659–665.
238. Dei Zotti F., Verdoy R., Brusa D., Lobysheva I.I., Balligand J.-L. Redox regulation of nitrosyl-hemoglobin in human erythrocytes // Redox Biol. 2020. Vol. 34. P. 101399.
239. Шумаев К.Б., Губкин А.А., Губкина С.А., Гудков Л.Л., Свиряева И.В., Тимошин А.А., Топунов А.Ф., Ванин А.Ф., Рууге Э.К. Взаимодействие динитрозильных комплексов железа с интермедиатами окислительного стресса // Биофизика. 2006. Vol. 51, № 3. P. 472–483.
240. Tseng Y.-T., Chen C.-H., Lin J.-Y., Li B.-H., Lu Y.-H., Lin C.-H., Chen H.-T., Weng T.-C., Sokaras D., Chen H.-Y., Soo Y.-L., Lu T.-T. To Transfer or Not to Transfer? Development of a Dinitrosyl Iron Complex as a Nitroxyl Donor for the Nitroxylation of an FeIII–Porphyrin Center // Chem. – A Eur. J. 2015. Vol. 21, № 49. P. 17570–17573.

Благодарности

В первую очередь, благодарю своего научного руководителя, главного научного сотрудника НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова Минздрава России, профессора кафедры биофизики физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, доктора физико-математических наук Рууге Энно Куставича, за всестороннюю помощь в выполнении работы и неоценимый вклад в мое становление как научного работника.

Особую благодарность выражаю научному руководителю работы, доктору биологических наук Шумаеву Константину Борисовичу за плодотворную совместную работу и весьма значительный вклад в повышение моей грамотности в области биохимии и биофизики.

Выражаю благодарность сотрудникам кафедры биофизики физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова и лично ее заведующему профессору Всеволоду Александровичу Твердислову и профессору Александру Николаевичу Тихонову за поддержку и внимание к моей работе.

Благодарю председателя диссертационного совета академика Панченко Владислава Яковлевича, и ученого секретаря диссертационного совета Осминкину Любовь Андреевну за помощь в подготовке диссертации к защите, а также заместителя председателя диссертационного совета члена-корреспондента РАН, профессора Шкуринова Александра Павловича за важные замечания в процессе подготовки работы к защите.

Благодарю оппонентов своей кандидатской диссертации Власову Ольгу Леонардовну, Горина Дмитрия Александровича и Проскурякова Ивана Игоревича за ценные замечания.

Также, благодарю всех коллег по лаборатории физико-химических методов исследования НМИЦК им. ак. Е.И Чазова, в первую очередь: Фефлер Анастасию Сергеевну, Тимошина Александра Анатольевича, Иванову Марину Валентиновну, Дворянцева Сергея Николаевича и Медведеву Валерию Андреевну за помощь в выполнении работы, а также коллег из других лабораторий НМИЦК им. ак. Е.И Чазова.

Выражаю благодарность доценту Ереванского государственного университета Мамасакхлисову Евгению Шамильевичу за ряд ценных замечаний и предложений.