

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РАЗЛИЧНЫХ НИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ГЕМОГЛОБИНА С АКТИВНЫМИ ФОРМАМИ КИСЛОРОДА И АЗОТА**  
Грачёв Д.И.<sup>1,2</sup>, Шумаев К.Б.<sup>2,3</sup>, Медведева В.А.<sup>1,2</sup>, Фефлер А.С.<sup>1</sup>, Космачевская О.В.<sup>3</sup>,  
Рууге Э.К.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

*Ленинские горы, 1, стр. 2, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: di.grachev@physics.msu.ru*

<sup>2</sup> Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Минздрава России

*3-я Черепковская ул., 15А, г. Москва, 121552, РФ*

<sup>3</sup> ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

*Ленинский проспект, 33, стр. 2, г. Москва, РФ*

Поступила в редакцию: 16.07.2021

**Аннотация.** В данной работе рассмотрено действие активных форм кислорода и азота на комплексы NO с гемоглобином в условиях, моделирующих различные физиологические и патофизиологические состояния. Хорошо известно, что активные формы кислорода, галогенов (гипохлорит), активные формы азота: пероксинитрит, нитрилхлорид и другие свободные радикалы участвуют в воспалительных реакциях и в патогенезе различных заболеваний важнейших систем организма человека и животных. Стабилизированные формы оксида азота (NO), связанного с гемоглобином: комплексы NO с гемовым железом (HbNO) и динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ), образующиеся на тиоловых группах цистеиновых остатков гемоглобина (Hb-ДНКЖ) являются важными физиологическими формами оксида азота. Особый интерес для исследования представляет участие подобных комплексов NO в процессах, связанных с окислительным стрессом. Нами было показано, что пероксинитрит и гипохлорит количественно разрушают Hb-ДНКЖ, причём в случае с гипохлоритом не происходит нитрозилирования гемовой группы гемоглобина. Кроме того, показано антиоксидантное действие Hb-ДНКЖ при взаимодействии с алкоксильным и алкилперекисным радикалами, полученными при добавлении гидропероксида трет-бутила к раствору метгемоглобина, что моделирует перекисное окисление, возникающее при окислительном стрессе. Полученные данные позволяют улучшить понимание роли комплексов оксида азота с гемоглобином в балансе между антиоксидантными и прооксидантными системами в организме.

**Ключевые слова:** активные формы кислорода и азота, гемоглобин, спектроскопия ЭПР.

## ВВЕДЕНИЕ

Комплексы NO с гемовым железом (HbNO) и динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ), образующиеся на тиоловых группах цистеиновых остатков гемоглобина (Hb-ДНКЖ) хорошо описаны в различных исследованиях [1,2]. Действие данных комплексов NO в процессах редокс-стресса в организме, во многом, требует дальнейшего изучения.

Активные формы кислорода, галогенов (такие как, например, гипохлорит), активные формы азота (например, пероксинитрит, нитрилхлорид) участвуют в воспалительных реакциях и в патогенезе различных сердечно-сосудистых заболеваний, хронических воспалительных заболеваний, онкологических заболеваний и нейродегенеративных расстройств [3, 4]. Все эти процессы сопровождаются развитием окислительного и нитрозативного стрессов [5]. Вместе с тем, в биологических системах оксид азота (NO) выступает в качестве как прооксиданта, так и антиоксиданта [6]. Такое двойственное действие NO определяется его реакциями с редокс-активными соединениями, в том числе с другими свободными радикалами, ионами переходных металлов и тиолами.

В результате взаимодействия NO с гемовым и негемовым железом образуются нитрозильные комплексы железа. С этими комплексами связаны сигнальные и регуляторные функции NO [7]. Также, ранее нами было показано, что динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) обладают антиоксидантной и антирадикальной активностью [2,6]. В тиолсодержащих моноядерных ДНКЖ ион железа координирован с двумя нитрозильными (NO<sup>+</sup>) и двумя тиольными лигандами (RS<sup>-</sup>) {общая формула: (RS<sup>-</sup>)<sub>2</sub>Fe<sup>+</sup>(NO<sup>+</sup>)<sub>2</sub>}. Лигандами этих ДНКЖ могут быть низкомолекулярные тиолы и SH-группы цистеиновых остатков белков. С другой стороны, лигандами ДНКЖ могут быть остатки гистидина и анионы фосфата. Считается, что с антиоксидантными свойствами содержащих глутатион комплексов (GS-ДНКЖ) связано их цитопротекторное действие в ходе индуцированного гипохлоритом гемолиза эритроцитов [8], а также в условиях окислительного стресса при ишемическом поражении сердечной ткани [9]. Предположительно, разрушение ДНКЖ при окислительном и нитрозативном стрессе, может быть важным элементом регуляции метаболизма NO, а также влиять на сигнальную функцию этой молекулы.

В настоящей работе было рассмотрено взаимодействие двух вариантов нитрозильных комплексов гемоглобина, а также глутатионовых ДНКЖ (GS-ДНКЖ) с органическими свободными радикалами (алкоксильным, алкилпероксильным) и такими сильными окислителями, как гипохлорит и нитрилхлорид.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Комплексы оксида азота (NO) с гемоглобином исследовались методом спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) на человеческих эритроцитах и в системе с бычьим гемоглобином. Продукция органических радикалов также оценивалась методом спектроскопии ЭПР при помощи спиновой ловушки ДЕРМО.

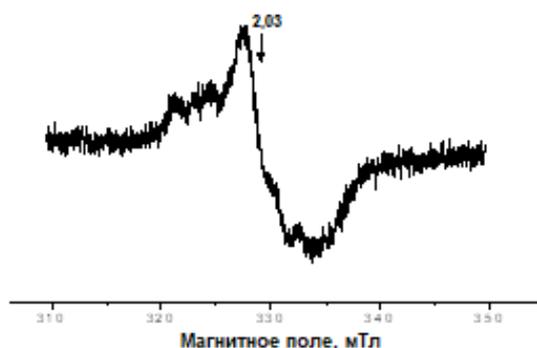
В работе использовались реактивы, полученные от Sigma-Aldrich (США) и Cayman Chemical Europe (Эстония). Человеческие эритроциты были получены в клинично-диагностической лаборатории НМИЦ Кардиологии. Эритроциты отмывали центрифугированием в изотоническом растворе 0,9% NaCl при ускорении 1000g в течение 5 мин, затем надосадочную жидкость удаляли, осадок ресуспендировали в изотоническом растворе 0,9% NaCl, после чего процедуру повторяли еще два раза. Гемоглобиновые ДНКЖ получали добавлением к раствору метгемоглобина (0,5 мМ) фосфатных ДНКЖ в молярном соотношении 1:2,75.

Спектры ЭПР записывали при комнатной температуре (25 °С) на спектрометре E-109E фирмы Varian (США), а также малогабаритном автоматизированном спектрометре ESR 70-03 XD/2 УП «КБСТ» БГУ (Беларусь). На Varian E-109E СВЧ мощность 10 мВт, частота СВЧ излучения 9,15 ГГц. На ESR 70-03 XD/2 частота СВЧ 9,35 ГГц.

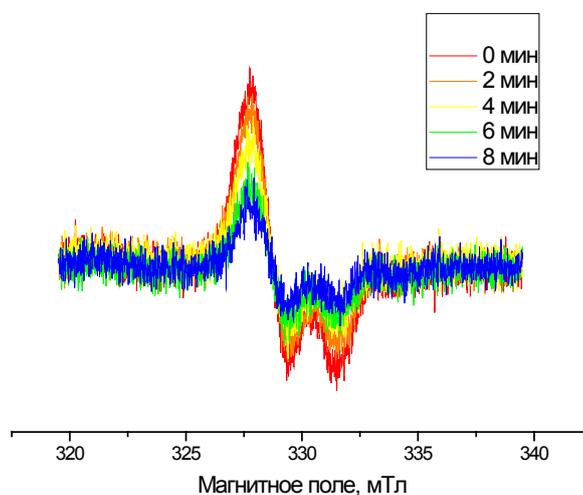
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В реакционной смеси, которая содержала дезоксигемоглобин, глутатионовые динитрозильные комплексы железа и синтетический донор NO (DEA/NO), был зарегистрирован как сигнал ЭПР ДНКЖ с g-фактором 2,03, так и сигнал нитрозилированного гемового железа (HbNO). Полученный спектр ЭПР представлен на рисунке 1.

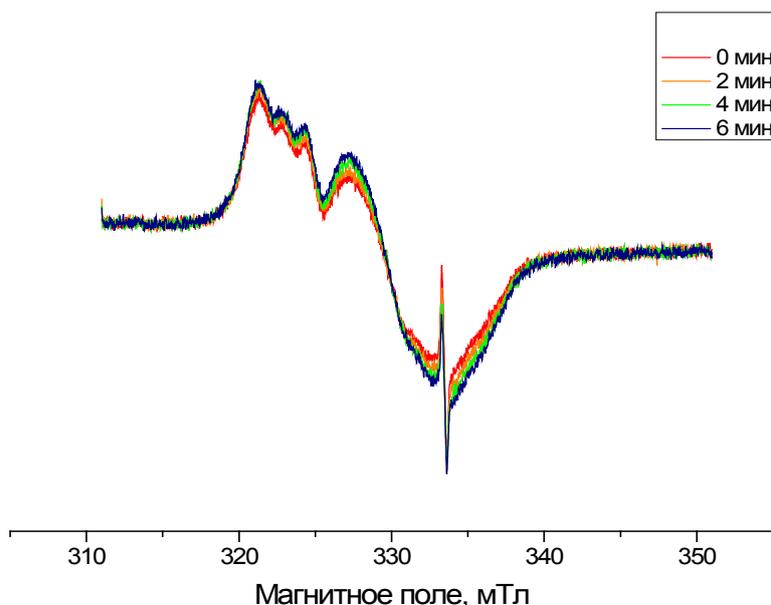
Было исследовано действие различных концентраций гипохлорита и нитрилхлорида на гемоглобиновые ДНКЖ, полученные при взаимодействии гемоглобина с нестабильными фосфатными ДНКЖ (ДНКЖ-РО4). Показано, что гипохлорит количественно разрушает Hb-ДНКЖ. Также, в эту реакционную смесь добавляли нитрит натрия с целью получения нитрилхлорида (NO<sub>2</sub>Cl). Спектры ЭПР, отражающие кинетику разрушения Hb-ДНКЖ в этих условиях представлены на рисунке 2.



**Рисунок 1.** Суперпозиция спектров ЭПР HbNO и Hb-ДНКЖ. Исходная реакционная смесь содержала [Hb]=0,5 мМ, [DEA/NO]= 3,2 мМ, [Na<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>] $\approx$ 70 мМ



**Рисунок 2.** Разрушение гемоглобиновых ДНКЖ ([Hb-ДНКЖ] = 0,4 мМ) под действием гипохлорита, [NaOCl]=0,1 мМ при добавлении нитрита натрия [NaNO<sub>2</sub>] = 10 мМ

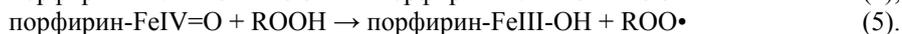
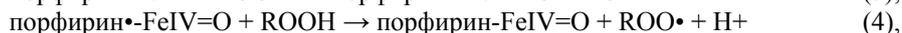
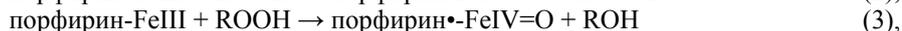
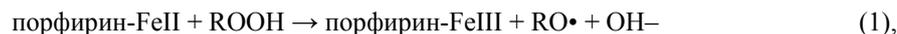


**Рисунок 3.** Спектры ЭПР HbNO при добавлении гипохлорита (суспензия эритроцитов,  $[\text{NaNO}_2] = 10 \text{ mM}$ ,  $[\text{NaOCl}] = 0,1 \text{ mM}$  ( $[\text{Na}_2\text{O}_4\text{S}_2] \approx 70 \text{ mM}$ ))

Следовательно, связанные с гемоглобином ДНКЖ могут выступать в качестве перехватчиков активных метаболитов NO. Эти результаты согласуются с полученными нами ранее данными о взаимодействии различных ДНКЖ с супероксидным радикалом и пероксинитритом [2].

В системе, содержащей эритроциты человека было изучено влияние гипохлорита на образование нитрозилированного гема т.е. комплексов NO с гемовым железом (HbNO). По спектрам ЭПР (рис. 3) можно было судить о постепенном увеличении сигнала HbNO в течение 6 минут после добавления в систему гипохлорита натрия. Представляется вероятным, что в этом случае дитионит ( $\text{Na}_2\text{O}_4\text{S}_2$ ) восстанавливает нитрит до NO, тогда как гипохлорит вызывает лизис эритроцитов, тем самым облегчая нитрозилирование гемовой группы гемоглобина.

Важную роль в процессах окислительного стресса играют реакции гемопротеинов, в том числе гемоглобина, с различными гидропероксидами. Так, при взаимодействии железа гема с органическими гидропероксидами, например, липидными гидропероксидами, образуются алкоксильные ( $\text{RO}\cdot$ ) и алкилпероксильные радикалы ( $\text{ROO}\cdot$ ) [2,6]:

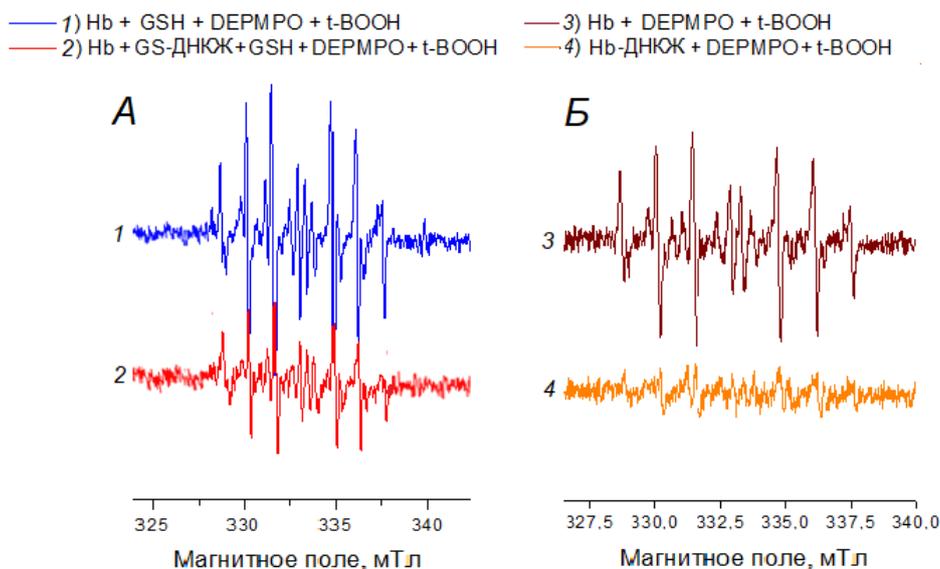


Другим продуктом этих реакций является такой сильный окислитель, как оксоферрильная форма гема (порфирин- $\text{FeIV=O}$ ). В условиях окислительного стресса реакции 1-5 приводят к усилению перекисного окисления липидов (ПОЛ) и окислительной модификации белков и других биополимеров.

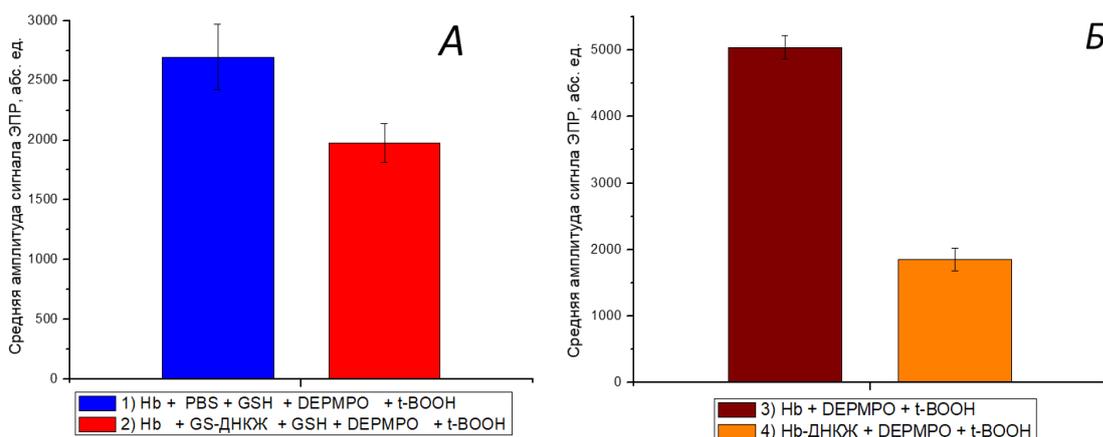
Для моделирования взаимодействия гемопротеидов с различными пероксидами в условиях окислительного стресса широко используется гидропероксид трет-бутила ( $t\text{-BOOH}$ ) [10]. Динамика концентрации органических радикалов оценивалась по сигналам ЭПР спиновых аддуктов DEPMPO (рисунок 4А). Нами было показано, что GS-ДНКЖ, статистически достоверно (значимость результата оценивалась по критерию Манна – Уитни, уровень значимости  $P < 0,05$ ) снижают концентрацию органических радикалов, образующихся при взаимодействии этого гемопротеина с гидропероксидом трет-бутила (рисунок 5А). Следует отметить, что аналогичные результаты были получены ранее в модельной системе, содержащей метмиоглобин и  $t\text{-BOOH}$  [6]. Нельзя исключить, что обнаруженный антиоксидантный эффект GS-ДНКЖ связан с восстановленным глутатионом (GSH). Глутатион входит в состав GS-ДНКЖ, в виде тиолят аниона ( $\text{GS}^-$ ). Кроме того, избыток глутатиона добавляли в реакционную среду для стабилизации мономерной парамагнитной формы GS-ДНКЖ.

Вместе с тем, Hb-ДНКЖ также эффективно перехватывают свободнорадикальные интермедиаты реакций 1-5 (рис. 4Б и 5Б).

Следовательно, и в системе, моделирующей свободнорадикальное перекисное окисление антиоксидантный эффект ДНКЖ в значительной степени определяется NO-лигандами этих комплексов.



**Рисунок 4.** Спектры ЭПР спиновых аддуктов DEPMPO. Панель А: 1) [Hb]≈0,25 мМ, [GSH] ≈ 2 мМ [DEPMPO]≈0,05 М, [t-BOOH]≈4 мМ, 2) [Hb]≈0,25 мМ, [ДНКЖ-GS] ≈0,75 мМ М, [GSH] ≈ 2 мМ, [DEPMPO] = 0,05 М, [t-BOOH] ≈ 4 мМ; панель Б: 3) [Hb] ≈ 0,3 мМ, [DEPMPO] ≈0,07 М, [t-BOOH] ≈ 1 мМ, 4) [Hb-ДНКЖ] ≈ 0,3 мМ, [DEPMPO] ≈ 0,07 М, [t-BOOH] ≈ 1 мМ



**Рисунок 5.** Антиоксидантное действие GS-ДНКЖ в присутствии глутатиона (Панель А) и Hb-ДНКЖ (Панель Б) 1) [Hb]≈0,25 мМ, [GSH] ≈ 2мМ [DEPMPO]≈0,05 М, [t-BOOH] ≈ 4 мМ 2). [Hb] ≈ 0,25, [GS-ДНКЖ] ≈ 0,75 мМ, [GSH] ≈ 2мМ, [DEPMPO] ≈ 0,05 М, [t-BOOH] ≈ 4 мМ; 3) [Hb] ≈ 0,3 мМ, [DEPMPO]≈0,07 М, [t-BOOH]≈ 1 мМ, 4) [Hb-ДНКЖ] ≈ 0,3 мМ, [DEPMPO] ≈ 0,07 М, [t-BOOH] ≈ 1 мМ

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в нашей работе было показано разрушение Hb-ДНКЖ под действием сильных окислителей: гипохлорита и нитрилхлорида, а также антиоксидантное действие Hb-ДНКЖ при взаимодействии с органическими свободными радикалами. С другой стороны, наблюдалось увеличение продукции HbNO при лизисе эритроцитов при помощи гипохлорита.

Можно предположить, что разрушение ДНКЖ при окислительном и нитрозативном стрессе может быть важным элементом регуляции метаболизма NO, а также влиять на сигнальную функцию этой молекулы. Кроме того, ДНКЖ, вероятно, могут предотвращать модификацию гемоглобина, перехватывая активные формы азота и галогенов. Представляется достаточно перспективной разработка терапевтических подходов для использования различных ДНКЖ, либо соединений, способствующих их образованию *in vivo*, в качестве фармакологических агентов, направленных на удаление или снижение уровня активных форм кислорода и азота в различных органах и тканях организма.

Работа была выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант 19-015-00444.

**Список литературы / References:**

1. 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, no. 7. doi: 10.1371/journal.pone.0200352
2. Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Timoshin A.A., Vanin A.F., Topunov A.F. Dinitrosyl Iron Complexes Bind With Hemoglobin as Markers of Oxidative Stress. *Methods in Enzymology*, 2008, vol. 436. doi: 10.1016/S0076-6879(08)36025-X
3. 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, т. 60, с. 75-122. [Panassenko O.M., Torkhovskaya T.I., Gorudko I.V., Sokolov A.V. The role of halogenated stress in atherogenic modification of low density lipoproteins. *Uspekhi biologicheskoy khimii*, 2020, vol. 60, pp. 75-122. (In Russ.)]
4. Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological reviews*, 2007, vol. 87, no. 1, pp. 315-424.
5. 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! *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2006, vol. 291, pp. 491-511.
6. Шумаев К.Б., Петрова Н.Э., Заббарова И.В., Ванин А.Ф., Топунов А.Ф., Ланкин В.З., Рууге Э.К. Взаимодействие оксоферрилмиоглобина и динитрозильных комплексов железа. *Биохимия*, 2004, т. 69, № 5, с. 699-705. [Shumaev K.B., Petrova N.E., Zabbarova I.V., Vanin A.F., Topunov A.F., Lankin V.Z., Ruuge E.K. Interaction of oxoferrylmyoglobin and dinitrosyl iron complexes. *Biochemistry (Moscow)*, 2004, vol. 69, no. 5, pp. 699-705. (In Russ.)]
7. Vanin A.F. Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands as a “working forms” of endogenous nitric oxide. *Nitric Oxide*, 2016, vol. 54. pp. 15-29.
8. Shumaev K.B., Gorudko I.V., Kosmachevskaya O.V. et al. Protective Effect of Dinitrosyl Iron Complexes with Glutathione in Red Blood Cell Lysis Induced by Hypochlorous Acid. *Oxidative Medicine Cellular Longevity*, 2019, pp. 1-12. DOI: 10.1155/2019/2798154
9. Pisarenko O., Studneva I., Timoshin A., Veselova O. Protective efficacy of dinitrosyl iron complexes with reduced glutathione in cardioplegia and reperfusion. *European Journal of Physiology*, 2019, vol. 471, pp. 583-593.
10. Karoui H., Chalier F., Finet J.P., Tordo P. DEPMPO: an efficient tool for the coupled ESR-spin trapping of alkylperoxyl radicals in water. *Organic & biomolecular chemistry*, 2011, vol. 9, no. 7, pp. 2473-2480. doi: 10.1039/c0ob00876a

**INTERACTION OF VARIOUS NITROSYL COMPLEXES OF HEMOGLOBIN WITH REACTIVE OXYGEN AND NITROGEN SPECIES****Grachev D.I.<sup>1,2</sup>, Shumaev K.B.<sup>2,3</sup>, Medvedeva V.A.<sup>1,2</sup>, Fefler A.S.<sup>1</sup>, Kosmachevskaya O.V.<sup>3</sup>, Ruuge E.K.<sup>1,2</sup>**<sup>1</sup> Lomonosov Moscow State University

Leninskie Gory 1/2, Moscow, 119991, Russia; e-mail: di.grachev@physics.msu.ru

<sup>2</sup> National Medical Research Center of Cardiology of the Ministry of Health of Russian Federation, 3-ya Cherepkovskaya ul., 15a, Moscow, 121552, Russia<sup>3</sup> Federal Research Center “Fundamentals of Biotechnology”, Russian Academy of Sciences, Leninskiy prosp. 33/2, Moscow, Russia

**Abstract.** In this work, we studied the effect of reactive oxygen and nitrogen forms on the complexes of NO with hemoglobin under conditions simulating various physiological and pathophysiological conditions. It is well known that reactive oxygen species, reactive halogen species (hypochlorite), reactive nitrogen species (peroxynitrite and nitryl chloride) and other free radicals are involved in inflammatory reactions and in the pathogenesis of various diseases of the most important systems of the human and animal body. Stabilized forms of nitric oxide (NO) bound to hemoglobin: complexes of NO with heme iron (HbNO) and dinitrosyl iron complexes (DNIC) formed on thiol groups of cysteine residues of hemoglobin (Hb-DNIC) are important physiological forms of nitric oxide. Of particular interest for research is the participation of such NO complexes in processes associated with oxidative stress. We showed that peroxynitrite and hypochlorite quantitatively destroy Hb-DNIC, and in the case of hypochlorite, nitrosylation of the hemoglobin heme group does not occur. In addition, the antioxidant effect of Hb-DNIC was shown when interacting with alkoxyl and alkyl peroxide radicals obtained by adding tert-butyl hydroperoxide to a methemoglobin solution, which simulates peroxidation that occurs during oxidative stress. The data obtained make it possible to improve understanding of the role of complexes of nitric oxide with hemoglobin in the balance between antioxidant and prooxidant systems in the body.

**Key words:** reactive oxygen and nitrogen species, hemoglobin, EPR spectroscopy.