

ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЕ НИТРОЗИЛИРОВАНИЕ ГЕМОГЛОБИНА И МИОГЛОБИНА И ЕГО АНТИОКСИДАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ

© 2024 г. К.Б. Шумаев*, **, #, Д.И. Грачев***, О.В. Космачевская*,
А.Ф. Топунов*, Э.К. Рууге**

*Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,
Ленинский просп., 33/2, Москва, 119071, Россия

**Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова
Минздрава России, ул. Академика Чазова, 15а, Москва, 121552, Россия

***Ереванский государственный университет, ул. Алека Манукяна, 1, Ереван, 0025, Республика Армения

#E-mail: tomorov@mail.ru

Поступила в редакцию 10.01.2024 г.

После доработки 24.01.2024 г.

Принята к публикации 07.02.2024 г.

Соль Анджели представляет собой донор нитроксила, благодаря чему может предотвращать негативные эффекты гемолиза, такие как суживающее действие свободного гемоглобина в плазме крови. Однако молекулярные механизмы взаимодействия нитроксила с различными гемопротейдами недостаточно выяснены. Известно, что возникающие при окислительном стрессе оксоферрильные формы гемопротейдов являются сильными прооксидантами. В данной работе было исследовано восстановительное нитрозилирование нитроксилом мет- и оксоферрильной форм гемоглобина и миоглобина. Эксперименты проводили *in vitro*, регистрируя нитрозильные формы гемопротейдов с помощью спектроскопии электронного парамагнитного резонанса. Полученные результаты указывают на антиоксидантный эффект соли Анджели в системах, моделирующих окисление гемоглобина или миоглобина пероксидом водорода. Кроме того, добавление пероксида водорода к метформам гемоглобина и миоглобина приводило к появлению ЭПР-сигнала свободных радикалов с $g = 2.005$, ассоциированного с белковой частью этих гемопротейдов. Таким образом, нитроксил действует одновременно как восстановительный и нитрозилирующий агент, тем самым предотвращая образование оксоферрильных форм гемопротейдов. Терапевтические свойства соли Анджели могут во многом быть связаны с антиоксидантным эффектом, оказываемым на компоненты крови.

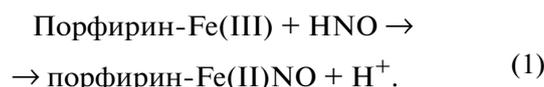
Ключевые слова: восстановительное нитрозилирование, гемоглобин, миоглобин, соль Анджели, спектроскопия ЭПР.

DOI: 10.31857/S0006302924020027, EDN: OVSSRT

Нитроксил (HNO) является продуктом одноэлектронного восстановления и протонирования такого важного биологически активного соединения как оксид азота (NO) [1–4]. Считается, что доноры нитроксила и его анионной формы (NO⁻) могут быть перспективными фармакологическими препаратами с достаточно широким спектром применения [1–3]. В частности, существуют данные о том, что при диабете в ткани миокарда возникает резистентность к NO, которую можно избежать в случае применения доноров HNO [2]. Уникальные химические свойства нитроксила

позволяют ему функционировать как в качестве классического антиоксиданта, так и ингибитора неферментативного гликирования биомолекул [1, 3].

Известно также, что нитроксил осуществляет восстановительное нитрозилирование метформ гемовых групп (порфиринов-Fe(II)) в следующей реакции [4]:



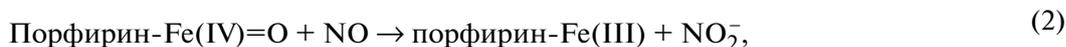
Константа скорости реакции (1), рассчитанная для различных гемопротейдов, колеблется в пределах от $3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ до $2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [4].

В ходе взаимодействия гемоглобина и миоглобина с различными гидропероксидами образуются оксоферрильные формы этих белков, которые

Сокращения: ЭПР – электронный парамагнитный резонанс; Hb-Fe(IV)=O и Mb-Fe(IV)=O – оксоферрильные формы гемоглобина и миоглобина, соответственно; Hb-Fe(II)NO и Mb-Fe(II)NO – нитрозилированные по железу гема формы гемоглобина и миоглобина.

являются сильными прооксидантами и участвуют в развитии патологий, связанных с окислительным стрессом [5–8]. В частности, оксоферрилгемоглобин (Hb-Fe(IV)=O) играет важную роль в патогенезе атеросклероза [9]. Вместе с тем имеются данные о формировании пероксида водорода (H₂O₂) и далее Hb-Fe(IV)=O в реакциях нит-

роксила с оксигемоглобином (Hb-Fe(II)=O) [10]. Антиоксидантные свойства доноров оксида азота обусловлены взаимодействием NO с оксоферрильными комплексами железа и свободными радикалами липидов [11–13]. Так, NO восстанавливает оксоферрильную форму гема (порфирин-Fe(IV)=O) до метформы (реакция (2)):



причем сам оксид азота окисляется до нитрита.

В этом случае константа скорости реакции восстановления оксоферрильных форм миоглобина и гемоглобина составляла $(18\text{--}24) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [14, 15]. В свою очередь, нитрит окисляется оксоферрильными гемами до диоксида азота ($\bullet\text{NO}_2$), хотя и с низкой скоростью. Константа скорости данной реакции находится в диапазоне $(1.6\text{--}7.5) \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [15].

Однако остается практически неизученным взаимодействие HNO с гемопротеидами в оксоферрильной форме и роль этих процессов при окислительном стрессе. Мы полагаем, что HNO восстанавливает порфирин-Fe(IV)=O с образованием нитрозильного комплекса гемового железа (порфирин-Fe(II)NO) в ходе следующей реакции:



В связи с этим в настоящей работе мы исследовали вызванное HNO/NO⁻ восстановительное нитрозилирование оксоферрильных форм гемоглобина и миоглобина, а также провели сравнение качественных особенностей и кинетики реакций оксоферрил- и метмиоглобина с нитроксилом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы. В работе использовали метгемоглобин быка и метмиоглобин из сердца лошади, каталазу из бычьей печени, пероксид водорода, KН₂РO₄ и Na₂НРО₄, полученные от фирмы Sigma-Aldrich (США), а также соль Анджели (оксигипонитрит натрия) от фирмы Sauman Егоро (Эстония).

Подготовка модельных реакционных систем. С помощью спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) было изучено восстановительное нитрозилирование оксоферрильных или метформ гемоглобина и миоглобина в модельных реакционных системах — растворах в К,Na-фосфатном буфере (100 мМ, рН 7.4). Конечная концентрация гемоглобина и миоглобина составляла 0.4 мМ и 1.6 мМ соответственно. В качестве донора нитроксила (HNO/NO⁻) была использована соль Анджели (Na₂(ONNO₂)) в диапазоне концентраций от 2 до 15 мМ. Для получения оксоферрильных форм исследуемых гемопротеидов пероксид водорода (H₂O₂) добавляли к метгемоглобину или метмиоглобину в

концентрации 18 мМ. Через 2 мин инкубации смеси непрореагировавший H₂O₂ удаляли каталазой (600 ед./мл).

Регистрация спектров ЭПР. Для обеспечения постоянства газового состава реакционную смесь вводили в газопроницаемую PTFE Sub-Lite-Wall капиллярную трубку (внутренний диаметр 0.635 мм, толщина стенки 0.051 мм) фирмы Zeus Industrial Products Inc. (США). Заполненную капиллярную трубку складывали дважды и помещали в кварцевую трубку (диаметром ~4 мм), открытую с обоих концов. Это обеспечивало поток газа варьируемого состава вокруг образца в резонаторе спектрометра ЭПР во время регистрации спектров.

Спектры ЭПР записывали при комнатной температуре (25°C) на малогабаритном автоматизированном спектрометре ESR 70-03 XD/2 (УП «КБСТ» БГУ, Беларусь). Условия записи спектров ЭПР: частота 9.35 ГГц, ослабление СВЧ 5 дБ. Амплитуда модуляции внешнего магнитного поля составляла 0.4 мТл, развертка — 40 мТл.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Показано, что после добавления соли Анджели в реакционную систему, содержащей оксоферрилгемоглобин, регистрируется сигнал ЭПР

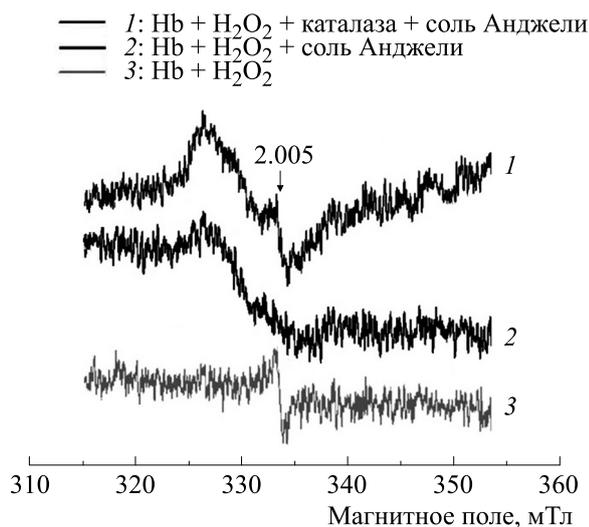


Рис. 1. Спектр 1 – ЭПР-спектр нитрозильного комплекса гемоглобина (Hb-Fe(II)NO), зарегистрированный при последовательном добавлении пероксида водорода, каталазы и далее соли Анджели к раствору метгемоглобина в фосфатном буфере (100 мМ, рН 7.4); спектр 2 – спектр Hb-Fe(II)NO, полученный взаимодействием нитроксила с метгемоглобином без добавления H₂O₂; спектр 3 – ЭПР-спектр свободнорадикального сигнала с *g*-фактором 2.005 в растворе метгемоглобина с H₂O₂.

(рис. 1, спектр 1), характерный для нитрозильного комплекса дезоксигемоглобина (Hb-Fe(II)NO). Этот факт свидетельствует о протекании реакции восстановительного нитрозилирования оксоферрильной гемовой группы (реакция (3)). С другой стороны, в этой реакционной системе наблюдался свободнорадикальный сигнал с *g*-фактором, равным 2.005. Сигнал аналогичного свободного радикала возникал также при добавлении пероксида водорода к метгемоглобину (рис. 1, спектр 3). Подобные сигналы ЭПР, описанные в работе [16], представляют собой стабильные белковые радикалы. В качестве контрольного представлен спектр ЭПР Hb-Fe(II)NO, полученный нитрозилированием метгемоглобина в присутствии соли Анджели (рис. 1, спектр 2).

Сигнал с *g*-фактором, равным 2.005, наблюдался также при добавлении H₂O₂ к метмиогло-

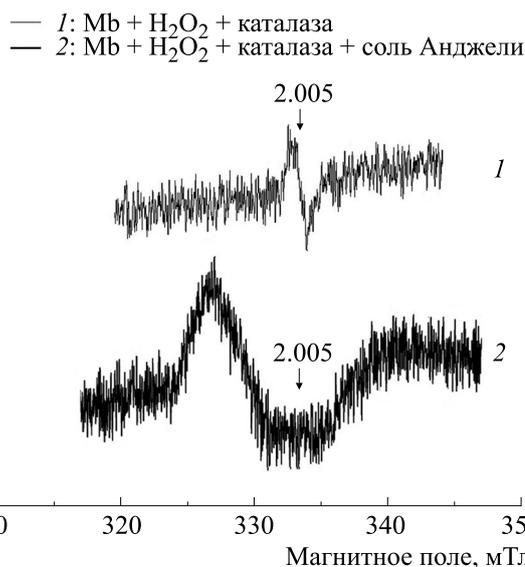
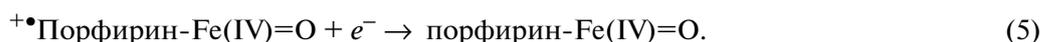
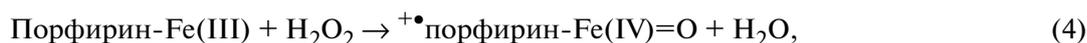


Рис. 2. Спектр 1 – ЭПР-спектр свободнорадикального сигнала с *g*-фактором 2.005, образующегося при добавлении H₂O₂ к раствору метмиоглобина (окисление до Mb-Fe(IV)=O); спектр 2 – ЭПР-спектр нитрозильного комплекса миоглобина (Mb-Fe(II)NO), полученного в результате восстановительного нитрозилирования нитроксилом его оксоферрильной формы.

бину (рис. 2, спектр 1). По всей видимости, этот сигнал, как и в аналогичных экспериментах с гемоглобином, связан с образованием свободных радикалов в белковой цепи гемопротеида, что согласуется с литературными данными [6, 7, 17]. Вместе с тем после удаления непрореагировавшего H₂O₂ каталазой и введения в реакционную смесь донора нитроксила происходило нитрозилирование образовавшегося оксоферрилмиоглобина (Mb-Fe(IV)=O) (рис. 2, спектр 2). Однако сигнал свободного радикала, ассоциированного с белком, в таком случае не регистрировался.

Считается, что при взаимодействии метформ гемопротеидов с H₂O₂ образуется в начале перферрильная (⁺•порфирин-Fe(IV)=O), а затем оксоферрильная (порфирин-Fe(IV)=O) форма гема в следующих реакциях:



Донором электрона при восстановлении катион-радикала перферрильного гема в реакции (5) могут быть аминокислотные остатки белковой цепи гемопротеида. Следует отметить, что в результате такого автоокисления гемопротеидов образу-

ются в основном свободные радикалы тирозина и триптофана [5–7].

В случае добавления соли Анджели к метгемоглобину до пероксида водорода и каталазы (рис. 3, спектр 2) не регистрировались сигналы

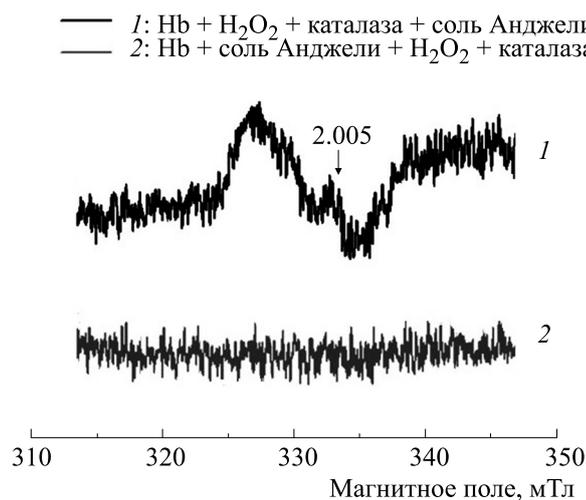


Рис. 3. Спектр 1 – ЭПР-спектр нитрозильного комплекса гемоглобина при последовательном добавлении пероксида водорода, каталазы и соли Анджели к раствору метгемоглобина в фосфатном буфере (восстановительное нитрозилирование Hb-Fe(IV)=O); спектр 2 – ЭПР-спектр реакционной смеси при добавлении H₂O₂ после введения соли Анджели.

ЭПР как Hb-Fe(II)NO, так и белкового радикала, что может быть следствием взаимодействия между нитрозилированной и оксоферрильной фор-

мами гемовых групп. Подобные реакции с участием нитрозильного комплекса миоглобина (Mb-Fe(II)NO) были описаны в работе [18]:



Таким образом, нейтрализация перферрильной и оксоферрильной форм гемопротеидов в реакциях (2), (3), (6) и (7) может лежать в основе антиоксидантного действия нитроксила. Также нитроксил, по-видимому, способен восстанавливать ассоциированные с белковой цепью миоглобина свободные радикалы (рис. 2). Однако в случае гемоглобина эта реакция не происходит. Этот факт может быть связан с большей доступностью свободных радикалов аминокислот для HNO/NO⁻ в молекуле миоглобина по сравнению с гемоглобином. Важно отметить, что именно свободные радикалы белковых цепей гемоглобина ответственны за образование ковалентных сшивок между его субъединицами [9, 19].

По амплитуде сигналов ЭПР Mb-Fe(II)NO оценивали кинетику восстановительного нитрозилирования нитроксидом оксоферрильной и метформ миоглобина (рис. 4). Как видно из представленных на этом рисунке данных, самый высокий уровень и скорость образования Mb-Fe(II)NO наблюдаются при нитрозилировании Mb-Fe(IV)=O (рис. 4, кривая 3).

Кроме того, были получены концентрационные зависимости нитрозилирования оксоферрильной и метформ Mb под действием соли Ан-

джели (рис. 5). Нитрозилирование метMb происходило при меньших концентрациях донора нитроксила (рис. 5, кривая 1). Вместе с тем, в случае Mb-Fe(IV)=O эффективность нитрозилирования гема возрастала при высоких концентрациях донора HNO/NO⁻ (рис. 5, кривая 2). Эти факты согласуются с тем, что в реакции (3) для получения нитрозильного комплекса гемового железа требуются две молекулы нитроксила.

Необходимо отметить, что в используемых нами экспериментальных модельных системах наряду с реакциями (1) и (3) происходит взаимодействие нитроксильного аниона с молекулярным кислородом и образование такого сильного окислителя как пероксинитрит (ONOO⁻) [4]:



Можно предположить, что эта реакция снижает эффективность нитрозилирования гемовой группы, причем в большей степени в случае оксоферрильной формы Mb (реакция (3)). К тому же образующийся в реакции (8) пероксинитрит реагирует с оксоферрильной и метформами гемопротеидов с формированием различных интермедиатов и продуктов [19–21], которые также могут влиять на кинетику образования Mb-Fe(II)NO.

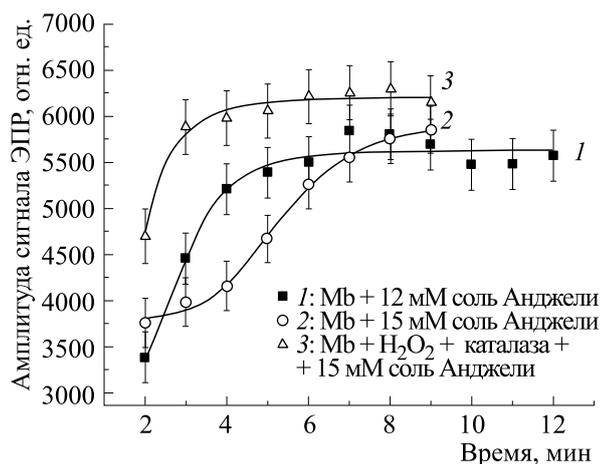


Рис. 4. Кинетика восстановительного нитрозилирования миоглобина при различных условиях (кривые 1 и 2 – восстановительное нитрозилирование метмиоглобина при разных концентрациях соли Анджели, 12 и 15 мМ соответственно, кривая 3 – восстановительное нитрозилирование оксоферрилмиоглобина). Аппроксимация логистическими кривыми выполнена в программе Origin Pro.

На основании полученных нами данных мы полагаем, что нитроксил действует как антиоксидант в системах, моделирующих перекисное окисление гемопротеидов. Ранее было показано, что антиоксидантными свойствами обладают такие физиологические производные NO, как динитрозильные комплексы железа [11, 12]. В частности, данные комплексы, связанные с гемогло-

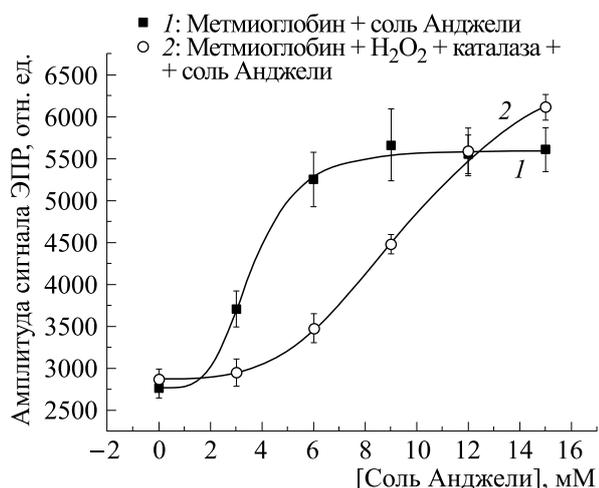


Рис. 5. Зависимости амплитуды сигнала ЭПР нитрозильного комплекса миоглобина, образующегося при восстановительном нитрозилировании метмиоглобина (кривая 1) и оксоферрилмиоглобина (кривая 2) от концентрации донора нитроксила – соли Анджели. Для построения графика были использованы максимальные значения амплитуды спектров за время измерения каждого образца.

бином, предотвращают его окислительную модификацию под действием пероксида водорода и пероксинитрита [22, 23], а также органических радикалов [24]. Можно предположить, что HNO, восстанавливая оксоферрилгемоглобин, предотвращает его атерогенное и провоспалительное действие [9]. С другой стороны известно, что соль Анджели или другие доноры нитроксила могут снижать негативные последствия гемолиза, возникающие при переливании консервированной крови, гемолитических анемиях, и других заболеваний, которые связаны в первую очередь с выходом гемоглобина в кровеносное русло [10].

ВЫВОДЫ

Анализ полученных результатов позволяет заключить, что антиоксидантное действие соли Анджели в значительной степени связано с нейтрализацией оксоферрильных форм гемопротеидов, способных вызывать окисление различных важных биомолекул [5, 8, 9, 22]. Нами установлено, что основным механизмом такой нейтрализации является восстановительное нитрозилирование оксоферрильных гемовых групп.

Таким образом, соль Анджели может проявлять широкий спектр физиологических эффектов, которые могут иметь потенциальное терапевтическое значение. Вместе с тем в ходе клинических испытаний этой терапии или ее применения в исследовательских целях необходим тщательный мониторинг гемодинамических эффектов и токсичности из-за ряда особенностей соли Анджели [10].

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность доц. Е.Ш. Мамасалисову за ряд ценных замечаний и интерес к этой работе.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе не использовались биологические образцы животных и человека.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lopez B. E., Shinyashiki M., Han T. H., and Fukuto J. M. Antioxidant actions of nitroxyl (HNO). *Free Radic. Biol. Med.*, **42** (4), 482–491 (2007). DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.11.015
- Li J. C., Velagic A., Qin C. X., Li M., Leo C. H., Kemp-Harper B. K., Ritchie R. H., and Woodman O. L.

- Diabetes attenuates the contribution of endogenous nitric oxide but not nitroxyl to endothelium dependent relaxation of rat carotid. *Arteries Front. Pharmacol.*, **11**, 585740 (2021). DOI: 10.3389/fphar.2020.585740
3. Kosmachevskaya O. V., Nasybullina E. I., Pugachenko I. S., Novikova N. N., and Topunov A. F. Antiglycation and Antioxidant Effect of Nitroxyl towards Hemoglobin. *Antioxidants*, **11** (10), (2022). DOI: 10.3390/antiox11102007
 4. Michalski R., Smulik-Izydorczyk R., Pięta J., Rola M., Artelska A., Pierzchała K., Zielonka J., Kalyanaraman B., and Sikora A. B. The Chemistry of HNO: Mechanisms and Reaction Kinetics. *Front. Chem.*, **10**, Article 930657 (2022). DOI: 10.3389/fchem.2022.930657
 5. Baron C. P. and Andersen H. J. Myoglobin-induced lipid oxidation. A review. *Agric. Food Chem.*, **50** (14), 3887 (2002). DOI: 10.1021/jf011394w
 6. Reeder B. J., Svistunenko D. A., Sharpe M. A., and Wilson M. T. Characteristics and mechanism of formation of peroxide-induced heme to protein cross-linking in myoglobin. *Biochemistry*, **41** (1), 367–375 (2002). DOI: 10.1021/bi011335b
 7. Reeder B. J., Svistunenko D. A., Cooper C. E., and Wilson M. T. The radical and redox chemistry of myoglobin and hemoglobin: from in vitro studies to human pathology. *Antioxid. Redox Signal.*, **6** (6), 954–966 (2004). DOI: 10.1089/ars.2004.6.954
 8. Wilson M. T. and Reeder B. J. The peroxidatic activities of Myoglobin and Hemoglobin, their pathological consequences and possible medical interventions. *Mol. Aspects Med.*, **84**, 101045 (2022). DOI: 10.1016/j.mam.2021.101045
 9. Potor L., Bányai E., Becs G., Soares M. P., Balla G., Balla J., and Jeney V. Atherogenesis May Involve the Prooxidant and Proinflammatory Effects of Ferryl Hemoglobin. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2013**, Article ID 676425 (2013). DOI: 10.1155/2013/676_25
 10. Solomon S. B., Bellavia L., Sweeney D., Piknova B., Perlegas A., Helms C. C., Ferreyra G. A., King S. B., Raat N. J. H., Kern S. J., Sun J., McPhail L. C., Schechter A. N., Natanson C., Gladwin M. T., and Kim-Shapiro D. B. Angeli's Salt Counteracts the Vasoactive Effects of Elevated Plasma Hemoglobin. *Free Radic. Biol. Med.*, **53** (12), 2229–2239 (2012). DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.548
 11. Gorbunov N. V., Yalowich J. C., Gaddam A., Thampatty P., Ritov V. B., Kisin E. R., Elsayed N. M., and 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.*, **272** (19), 12328–12341 (1997). DOI: 10.1074/jbc.272.19.12328
 12. Шумаев К. Б., Петрова Н. Э., Заббарова И. В., Ванин А. Ф., Топунов А. Ф., Ланкин В. З. и Рууге Э. К. Взаимодействие оксоферрилмиоглобина и динитрозильных комплексов железа. *Биохимия*, **69** (5), 699–705 (2004). DOI: 10.1023/b:biry.0000029856.67884.c5
 13. Шумаев К. Б., Космачевская О. В., Грачев Д. И., Тимошин А. А., Топунов А. Ф., Ланкин В. З. и Рууге Э. К. Возможный механизм антиоксидантного действия динитрозильных комплексов железа. *Биомедицинская химия*, **67** (2), 162–168 (2021). DOI: 10.18097/PBMC20216702162
 14. Herold S. and K. Rehmman F.-J. Kinetic and mechanistic studies of the reactions of nitrogen monoxide and nitrite with ferryl myoglobin. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **6** (5), 543–555 (2001). DOI: 10.1007/s007750100231
 15. Herold S. and K. Rehmman F.-J. Kinetics of the reactions of nitrogen monoxide and nitrite with ferryl hemoglobin. *Free Radic. Biol. Med.*, **34** (5), 531–545 (2003). DOI: 10.1016/S0891-5849(02)01355-2
 16. Ramirez D. C., Chen Y.-R., and 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.*, **34** (7), 830–839 (2003). DOI: 10.1016/S0891-5849(02)01437-5
 17. Østdal H., Skibsted L. H., and Andersen H. J. Formation of long-lived protein radicals in the reaction between H₂O₂-activated metmyoglobin and other proteins. *Free Radic. Biol. Med.*, **23** (5), 754–761 (1997). DOI: 10.1016/s0891-5849(97)00023-3
 18. Baron C. P., Møller J. K. S., Skibsted L. H., and Andersen H. J. Nitrosylmyoglobin as antioxidant – kinetics and proposed mechanism for reduction of hydroperoxides. *Free Radic. Res.*, **41** (8), 892–902 (2007). DOI: 10.1080/10715760701416475
 19. Romero N., Radi R., Linares E., Augusto O., Detweiler C. D., Mason R. P., and Denicola A. Reaction of human hemoglobin with peroxynitrite: isomerization to nitrate and secondary formation of protein radicals. *J. Biol. Chem.*, **278** (45), 44049–44057 (2003). DOI: 10.1074/jbc.M305895200
 20. Herold S. and Shivashankar K. Metmyoglobin and methemoglobin catalyze the isomerization of peroxynitrite to nitrate. *Biochemistry*, **42** (47), 14036–14046 (2003). DOI: 10.1021/bi0350349
 21. Su J. and Groves J. T. Mechanisms of Peroxynitrite Interactions with Heme Proteins. *Inorg. Chem.*, **49** (14), 6317–6329 (2010). DOI: 10.1021/ic902157z
 22. Shumaev K. B., Gubkin A. A., Serezhenkov V. A., Lobysheva I. I., Kosmachevskaya O. V., Ruuge E. K., Lankin V. Z., Topunov A. F., and Vanin A. F. Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with albumin- and methemoglobin-bound dinitrosyl iron complexes. *Nitric Oxide*, **18** (1), 37–46 (2008). DOI: 10.1023/b:biry.0000029856.67884.c5
 23. Kosmachevskaya O. V., Nasybullina E. I., Shumaev K. B., Novikova N. N., and Topunov A. F. Protective effect of dinitrosyl iron complexes bound with hemoglobin on oxidative modification by peroxynitrite. *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (24), 13649 (2021). DOI: 10.3390/ijms222413649
 24. Грачев Д. И., Шумаев К. Б., Космачевская О. В., Топунов А. Ф. и Рууге Э. К. Нитрозильные комплексы гемоглобина в различных модельных системах. *Биофизика*, **66** (6), 1056–1064 (2021). DOI: 10.31857/S0006302921060028

Reductive Nitrosylation of Hemoglobin and Myoglobin and Its Antioxidant Action

K.B. Shumaev^{*, **}, D.I. Grachev^{***}, O.V. Kosmachevskaya^{*}, A.F. Topunov^{*}, and E.K. Ruuge^{**}

^{*}*A.H. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology", Russian Academy of Sciences, Leninsky prosp. 33/2, Moscow, 119071 Russia*

^{**}*National Medical Research Centre of Cardiology named after academician E.I. Chazov, Ministry of Health of the Russian Federation, ul. Akademika Chazova 15a, Moscow, 121552 Russia*

^{***}*Yerevan State University, ul. Aleka Manoogiana 1, Yerevan, 0025 Armenia*

Angeli's salt is regarded as a nitroxyl donor, so it can counteract hemolysis-driven adverse effects such as the vasoconstrictive effects of free hemoglobin in blood plasma. However, the molecular mechanisms of interaction of nitroxyl with various heme proteins are not fully understood. Oxoferryl forms of hemoproteins emerged under oxidative stress are known to be strong pro-oxidants. This study has been carried out to investigate reductive nitrosylation of met- and oxoferryl forms of hemoglobin and myoglobin upon interaction with nitroxyl. Experiments were performed *in vitro* using electron paramagnetic resonance spectroscopy for detection of nitrosyl forms. The results obtained indicate the antioxidant effect of Angeli's salt in model systems of hemoglobin or myoglobin oxidation with hydrogen peroxide. Moreover, the addition of hydrogen peroxide to methemoglobin and metmyoglobin led to the appearance of an EPR signal of free radicals with $g = 2.005$, associated with the protein part of hemoproteins. Thus, nitroxyl acts both as a reducing agent and a nitrosylating agent, thereby preventing the formation of oxoferryl forms of hemoproteins. The therapeutic properties of Angeli's salt may be largely related to the antioxidant effect it has on blood components.

Keywords: reductive nitrosylation, hemoglobin, myoglobin, Angeli's salt, EPR spectroscopy