

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук»

На правах рукописи



Иванов Владимир Евгеньевич

**ОБРАЗОВАНИЕ ДОЛГОЖИВУЩИХ АКТИВНЫХ ФОРМ БЕЛКОВ
ПОД ДЕЙСТВИЕМ ТЕПЛА И ОПТИЧЕСКОГО
ЭЛЕКТРОМАГНИТОГО ИЗЛУЧЕНИЯ**

1.5.2 – биофизика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
Гудков Сергей Владимирович

Москва – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1. Окисление белков.....	9
1.1.1. Белки – основные мишени для окисления.....	11
1.1.2. Судьба исходных аминокислотных, пептидных и белковых радикалов	15
1.1.3. Механизмы возникновения гидропероксидов белков.....	17
1.1.4. Обнаружение и количественное определение аминокислотных, пептидных и белковых гидропероксидов	22
1.1.5. Доказательство образования аминокислотных, пептидных и белковых гидропероксидов <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	25
1.1.6. Вторичные реакции гидропероксидов	29
1.1.7. Долгоживущие активные формы белков	36
1.1.8. Биологические последствия образования долгоживущих активных форм белков	39
1.2. Пероксид водорода и его роль в клеточной сигнализации.....	45
1.2.1. Источники пероксида водорода.....	46
1.2.2. H ₂ O ₂ как молекулярный медиатор клеточной сигнализации	47
1.2.3. Концентрация пероксида водорода в клетке.....	49
1.2.4. Пероксид водорода и апоптоз.....	51
1.2.5. H ₂ O ₂ , бактерии и иммунные клетки	53
1.2.6. H ₂ O ₂ и воспаление	55
1.2.7. H ₂ O ₂ и контроль экспрессии генов.....	56
1.3. Влияние видимого света на биологические объекты	59
1.3.1. Роль света в жизни биологических объектов.....	59
1.3.3. Влияние света на физиологические реакции человека	60
1.3.4. Влияние света на микрофлору человека.....	62
1.3.5. Использование световых воздействий в диагностике и терапии.....	63

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	67
2.1. Материалы.....	67
2.2. Методы	67
2.2.1. Воздействие тепла и оптического электромагнитного излучения.....	67
2.2.2. Долгоживущие активные формы белков	68
2.2.3. Измерение генерации пероксида водорода	69
2.2.4. Измерение продукции гидроксильных радикалов.....	69
2.2.5. Измерение содержания кислорода в растворах белков и сыворотки крови .	70
2.2.6. Микроядерный тест.....	70
2.2.7. Определение 8-оксогуанина в ДНК при помощи неконкурентного твёрдофазного иммуноферментного анализа.....	71
2.2.8. Статистический анализ	73
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	74
3.1. Образование долгоживущих активных форм белков под действием тепла и оптического электромагнитного излучения	74
3.2. Образование активных форм кислорода под действием долгоживущих активных форм белков.....	94
3.3. Генотоксическое действие долгоживущих активных форм белков, индуцированных теплом и оптическим электромагнитным излучением	114
ОБСУЖДЕНИЕ	118
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	125
ВЫВОДЫ	128
СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	129
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	130

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В клетках аэробных организмов продуцируются активные формы кислорода (АФК) как в процессе нормального обмена веществ, так и под действием различных факторов, например ионизирующей радиации [Tharmalingam et al., 2017], ультрафиолетового [Piskarev, 2018], КВЧ [Gapeyev et al., 2014], СВЧ излучения, ксенобиотиков, теплового воздействия [Черников и др., 2007; Wang et al., 2013; Синицына и др., 2018], видимого и инфракрасного излучений с длинами волн, соответствующими линиям поглощения молекулярного кислорода [Gudkov et al., 2011; Гудков и др., 2012; Ahn, Chung, 2012], ионов уранила [Gudkov et al., 2016] и др. Повышение продукции АФК выше емкости антиоксидантной защиты клетки инициирует «окислительный стресс» [Sies, 1997]. Данное состояние сопровождается пагубными процессами для клеточной жизнедеятельности: окислительная деградация липидов, окислительная трансформация нуклеиновых кислот, а также белков [Ланкин и др., 2018a; Schieber, Chandel, 2014; Monich et al., 2018]. Показано, что АФК способны как повреждать биологические молекулы, так и выполнять в клетке дополнительно сигнальную функцию, которая связана с окислительно-восстановительной регуляцией [Zakharova et al., 2018].

Раньше было установлено, что в белковых растворах, содержащих кислород, под действием ионизирующего излучения происходит генерация долгоживущих активных форм белков (ДАФБ), включающие в себя долгоживущие радикалы и гидропероксиды белков [Davies et al., 1995; Gebicki, 1997; Koyama et al., 1998; Kumagai et al., 2003; Gracanin et al., 2011; Bruskov et al., 2012; Davies, 2016]. ДАФБ являются одной из форм окисленных модификаций белков, приводящие к их фрагментации и агрегации, а также генерации АФК и продлению окислительного стресса. Установлено, что ДАФБ способны влиять на изменение окислительно-восстановительного гомеостаза, а при больших концентрациях приводить к мутагенезу [Kumagai et al., 2003]. Тем не менее не

было показано, могут ли неионизирующие воздействия приводить к образованию окислительных повреждений белков в виде долгоживущих активных форм.

Среди всех АФК пероксид водорода считается ключевым вторичным посредником в клетке [Stone, Yang, 2006; Zhang et al., 2012; Simon et al., 2016; Sies et al., 2017; Di Marzo et al., 2018]. Современные данные о роли пероксида водорода во внутри- и межклеточной сигнализации в клетках млекопитающих, в том числе о его влиянии на клеточный рост, развитие апоптоза и некроза, приведены в обзорах [Stadtman, Berlett, 1997; Stone, Yang, 2006; Silachev et al., 2014; Smirnova et al., 2018; Vlasova et al., 2018]. Изменение продукции пероксида водорода в клетке, спровоцированное разнообразными воздействиями, может являться существенным фактором терапевтического результата и адаптивного эффекта из-за возникающих регуляторных механизмов [Sharapov et al., 2017]. Сейчас в медицине обширно применяются разнообразные физиотерапевтические методы лечения, базирующиеся на применении умеренной гипертермии [Mallory et al., 2016], а также источников когерентного и некогерентного светового воздействия [Калганова и др., 2015; Снопина и др., 2016; Forbat et al., 2017; Tsai, Hamblin, 2017; Губарькова и др., 2017; Lima et al., 2018; Gavrina et al., 2018]. Тем не менее биофизические механизмы полезного применения этих процедур продолжают находиться слабо исследованными [Gao, Chen, 2014; Alexandrovskaya et al., 2018]. Возможно, терапевтический эффект данных воздействий связан с генерацией как АФК, так и ДАФБ. По этой причине изучение возможности ДАФБ к продолжительной продукции H_2O_2 после действия неионизирующих низкоинтенсивным факторов является актуальным. Данный процесс может являться одним из этапов активации адаптационных механизмов, приводящих к преодолению болезней, обусловленных окислительным стрессом.

Цель и основные задачи диссертационной работы

Цель данного исследования – изучение возможности генерации ДАФБ под действием оптического электромагнитного излучения или тепла. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить генерацию ДАФБ под действием тепла и оптического электромагнитного излучения;
2. Исследовать физико-химические механизмы образования АФК в белковых растворах под действием тепла и оптического электромагнитного излучения;
3. Исследовать влияние ДАФБ, индуцированных теплом и оптическим электромагнитным излучением, на образование окислительных повреждений в ДНК *in vitro* и *in vivo*.

Научная новизна

Впервые методом индуцированной хемилюминесценции показано, что излучение He-Ne лазера (632,8 нм) или тепловое воздействие вызывают в белковых растворах и сыворотке крови образование ДАФБ. Проведено сравнение результатов, полученных в модельных системах (растворах бычьего сывороточного альбумина (БСА), бычьего гамма-глобулина (БГГ), желатина, казеина и гидролизата казеина (ГК)) и нативной сыворотке крови. Установлено, что ДАФБ, индуцированные теплом или оптическим излучением с длинами волн, соответствующими линиям поглощения молекулярного кислорода, в течение длительного времени способны продуцировать АФК ($^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$, H_2O_2). При этом в результате воздействия лазерного излучения или тепла происходит длительная генерация H_2O_2 . Образование ДАФБ и H_2O_2 не наблюдалось при тепловом и лазерном воздействии на растворы без кислорода или вне полосы его резонансного возбуждения с переходом в синглетное состояние. С помощью различных перехватчиков АФК установлен возможный механизм этого процесса. Методом иммуноферментного анализа показана способность сыворотки крови, подвергнутой воздействию лазерного излучения или тепла, приводить в модельной системе к образованию 8-оксогуанина (8-ОГ) – ключевого биомаркера окислительного повреждения в ДНК *in vitro*. Установлено, что введение мышам сывороток крови, подвергнутых воздействию лазерного излучения или тепла, приводит к развитию адаптивного эффекта – уменьшению количества полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ) с микроядрами (МЯ).

Научно-практическая значимость

Состоит в необходимости понимания молекулярных механизмов различных физиотерапевтических процедур, широко используемых в медицинской практике. Эти процедуры в зависимости от интенсивности и продолжительности воздействия ведут к образованию АФК, которые могут оказывать на организм человека как полезное, так и повреждающее воздействие путем возникновения окислительного стресса. Следовательно, актуальной является медико-биологическая проблема разработки норм безопасности при использовании отдельных физиотерапевтических процедур, т.к. все эти воздействия приводят к генерации АФК аналогично ионизирующим излучениям. Результаты диссертационной работы носят фундаментальный характер в области выяснения механизмов действия электромагнитных излучений и эффективного их использования в молекулярной и клеточной медицине.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Под действием исследованных неионизирующих физических факторов происходит образование ДАФБ с временами полужизни 4–5 ч.
2. ДАФБ, индуцированных теплом и оптическим излучением с длиной волны, соответствующей переходу димолей молекулярного кислорода в синглетное состояние, генерируют активные формы кислорода.
3. Активные формы кислорода, продуцируемые ДАФБ, способны повреждать ДНК *in vitro* и *in vivo*.

Публикации

По теме диссертационной работы было опубликовано 39 работ, из них 10 статей в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией, и 29 тезисов конференций международного и всероссийского уровня.

Степень достоверности результатов

Полученные результаты опубликованы в авторитетных международных изданиях и соответствуют мировому уровню. Достоверность научных результатов данной работы подтверждается корректностью постановки экспериментов, широкой апробацией и надежностью примененных методов. Результаты этого

научного исследования расширяют наши представления, связанные с физико-химическими механизмами воздействия неионизирующих факторов среды на биологические объекты.

Апробация результатов

Основные результаты диссертационного исследования представлены на 14,16,17,18,21-й Международных Школах-конференциях «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2010-2017), на третьем конгрессе «Симбиоз-Россия» (Н. Новгород, 2010), на научной конференции «Медико-биологические проблемы токсикологии и радиологии» (Санкт-Петербург, 2011), на конференциях в г. Пушино «Экспериментальная и теоретическая биофизика» '11, '12, '13» (2011-2013), на десятом симпозиуме «Биологические механизмы старения» (Харьков, 2012), на шестом конгрессе «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине» (Санкт-Петербург, 2012), на восьмой и девятой конференциях «Окислительный стресс и свободнорадикальные патологии» (2012, 2013), на X Международном Симпозиуме «Биологическая подвижность: новые факты и гипотезы» (Пушино, 2014), на VII Съезде по радиационным исследованиям (Радиобиология, радиоз экология, радиационная безопасность) (Москва, 2014), на Международной конференции «Актуальные проблемы радиобиологии и астробиологии. Генетические и эпигенетические эффекты ионизирующих излучений» (Дубна, 2016), на конференциях «Теоретическая и экспериментальная биофизика» '17, '18, '19» (Пушино, 2017, 2018, 2019).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Окисление белков

Биологические системы постоянно подвергаются воздействию эндогенных и экзогенных окислителей. При нормальных условиях образование и реакции этих окислителей ограничены защитными системами внутри клеток и организмов. К ним относятся антиоксиданты с низкой молекулярной массой (например, аскорбиновая кислота, тиолы, хинолы, токоферолы, каротиноиды, полифенолы, ураты), ферменты, которые удаляют либо окислители непосредственно (например, супероксиддисмутаза), либо их предшественники (например, пероксиредоксины, глутатионпероксидазы, каталазы) и ферментные системы, которые восстанавливают повреждение (редуктазы метионинсульфоксида, дисульфидредуктазы / изомеразы, сульфидоксины) или удаляют поврежденный материал (например, протеасомы, лизосомы, протеазы, фосфолипазы, ферменты репарации ДНК).

Несмотря на разнообразие антиоксидантных защитных систем, повышенные уровни маркеров окислительного стресса обнаружены в широком спектре систем организма человека, животных, микроорганизмов и растений [Halliwell, Gutteridge, 2015; Marrocco et al., 2017; Liguori et al., 2018; Cruz-Rojas et al., 2019]. Это может быть связано как с повышенным образованием или воздействием окислителей, так и ослаблением или нарушением функционирования защитных систем. Широко распространено мнение, что старение приводит к общему снижению активности многих ферментов и более низким уровням многих важных микроэлементов и метаболитов. Это снижение может быть ускорено болезнями или внешними факторами [Halliwell, Gutteridge, 2015]. Большая часть этих данных носит ассоциативный характер, и существует лишь ограниченное число случаев, когда установлена причинно-следственная

связь. Вполне вероятно, что большинство примеров повышенного окислительного повреждения возникает в результате совместного влияния многочисленных эффектов.

Обширный спектр различных окислительных продуктов может генерироваться *in vivo*, причем это связано с различными внешними и эндогенными процессами. Эти виды окислителей сильно различаются по своей реакционной способности, а причиненный ущерб может быть весьма многообразным. Некоторые АФК, такие как гидроксильные радикалы ($\cdot\text{OH}$, которые могут образовываться при воздействии ионизирующего излучения и катализируемого катионами металлов разложения пероксида водорода), способны окислять почти все биологические мишени с константами скорости второго порядка вблизи к пределу диффузии (т. е. к $10^9\text{-}10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [Buxton et al., 1988]. Из-за множества мишеней воздействия *in vivo* это приводит к микросекундному времени жизни этих радикалов и весьма ограниченной диффузии из мест их генерации. Поэтому большинство повреждений, вызванных $\cdot\text{OH}$, могут быть сайт-специфичными (например, в местах связывания ионов металлов или в пределах высоко сфокусированных пучков излучения).

Некоторые виды АФК могут диффундировать на большие расстояния *in vivo*, хотя это может быть ограничено физическими барьерами, зарядовыми взаимодействиями и гидрофобностью или гидрофильностью мишеней воздействия. Такая диффузия может приводить к удаленным эффектам, определяющим место и механизм радикального образования комплекса. Кроме того, хорошо известно, что многие из АФК могут взаимно преобразовываться и приводить к генерации вторичных окислителей с различными реакционными способностями и временами жизни. Таким образом, довольно сложно определить и место образования окислителя, и вклад различных окислителей в общую степень повреждения, обнаруженного *in vivo*. Поэтому важно установить природу и реакционную способность потенциальных окислителей, а также характер и масштабы окислительных повреждений, который они вызывают в более простых модельных системах.

Константы скорости реакции различных окислителей с фиксированной концентрацией одной биологической мишени могут изменяться более чем в 10^{10} раз [Davies, 2005]. В отличие от $\cdot\text{OH}$, где имеют место только относительно небольшие изменения в значениях k между мишенями [Buxton et al., 1988], другие окислители, такие как хлорноватистая кислота (HOCl , основной окислитель, образующийся в очагах воспаления нейтрофилами и моноцитами), реагируют с различными боковыми цепочками, присутствующими на белках, со значениями k , которые изменяются в 10^{11} раз [Pattison, Davies, 2006]. Реакционная способность также зависит от расположения окислителя и мишени. Эти данные изменяются в 10^8 раз в результате структурных факторов, в частности некоторые остатки Cys особенно реакционноспособны (например, в пероксиредоксинах) по сравнению с другими белками [Storkey et al., 2015; Trujillo et al., 2016].

1.1.1. Белки – основные мишени для окисления

Величина повреждения биологических молекул обусловлена различными причинами, например константами скорости взаимодействия; концентрациями определенных соединений; локализацией мишени относительно положения окислителя; появлением вторичных повреждений, включая цепные реакции; реакциями внутри- и межмолекулярного переноса; возможностью и степенью восстановления и поглощения окислителя. Относительный вклад этих разных факторов не может быть легко обобщен ввиду многообразия и сложности этих процессов. Поскольку белки являются основными компонентами большинства биологических систем с концентрациями в плазме 1-3 мМ и 5-10 мМ в клетках (рассчитанные с учетом средней молекулярной массы белка 25-50 кДа), они, являются основными мишенями [Davies, 2005]. Сочетание этих данных с константами скоростей позволяет сделать расчеты относительно судьбы окислителей. Например, для лейкоцитов 69 % гидроксильного радикала ($\cdot\text{OH}$),

генерируемого γ -излучением, как полагают, взаимодействуют с белками [Gebicki, 1997], и аналогичное значение было получено для синглетного кислорода ($^1\text{O}_2$) [Davies, 2004].

Радикалы могут подвергаться действию нуклеофилов, реакции переноса электрона, добавления, фрагментации и перегруппировки, димеризации, диспропорционирования и замещения с аминокислотами, пептидами и белками. Данные реакции подробно рассмотрены в ряде работ [Davies, 2004; Davies, 2005; Dalle-Donne et al., 2005].

Поскольку существует 20 основных аминокислот, входящих в состав как боковых цепочек, так и пептидного остова, то возможно образование огромного числа разнообразных белковых радикалов. Кроме того, генерация радикалов может осуществляться и на свободных аминокислотах, но как правило в небольших концентрациях.

Степень реактивности атакующего радикала непосредственно влияет на поведение только что возникающих радикалов. Внутри клетки нуклеофильные радикалы менее встречаются, чем электрофильные радикалы. Это могут быть алкоксильные, гидроксильные и пероксильные радикалы, окисляющие прежде всего соединения, которые богаты e^- . Главной реакцией считается отрыв атома H либо от связи C–H, либо S–H. В случае аминокислот ароматического ряда доминирует реакция присоединения к бензольному кольцу определенной боковой цепочки, для метионина и цистеина характерно образование S. Нуклеофильные радикалы в большей степени атакуют соединения, у которых недостаток e^- . Позиционная селективность радикальной атаки хорошо изучена для свободных аминокислот [Ahmad et al., 2017]. Величины констант скоростей второго порядка, k для $\cdot\text{OH}$ со свободными аминокислотами находятся между 10^7 (Gly) и $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Trp, His и Cys) [Buxton et al., 1988] с преимущественным взаимодействием на участках, удаленных от электроноакцепторной протонированной аминогруппы. Для свободных аминокислот повреждение боковой цепочки преобладает над взаимодействием с α -углеродным атомом. Влияние аминогруппы уменьшается с расстоянием, поэтому для аминокислот с большими боковыми цепочками (Val,

Leu, Ile) повреждение переносится в сторону удаленных участков боковой цепочки. Причем это влияет как на количество доступных связей C-H, так и на стабильность получающихся углерод-центрированных радикалов: третичные ($RR'R''C\cdot$) > вторичные ($RR'CH\cdot$) > первичные ($RCH_2\cdot$) [Watts, Easton, 2009]. Функциональные группы, способные регулировать стабилизацию радикалов, несомненно, определяют протекание реакции по тому или иному пути. В частности, реакция элиминирования атома H протекает по большей части вблизи гидроксильных групп треонина и серина [Hawkins, Davies, 2001]. В случае лизина отщепление атома водорода наблюдается в большинстве случаев на четвертом и пятом атоме углерода, а не на шестом. [Hawkins, Davies, 1997]. Тем не менее, в каждом случае в результате этих реакций образуются α -углерод-центрированные радикалы.

Благодаря наиболее подходящим энергиям активации реакции присоединения H как правило проходят стремительнее, нежели отщепление H. Вследствие этого присоединение к атомам S цистеина и метионина, к фенилаланину, гистидину, триптофану и тирозину наиболее распространено по сравнению с реакциями отщепления атома H [Dizdaroglu, Simic, 1980]. Образовавшиеся соединения вступают в различные реакции, что в итоге приводит к генерации различных продуктов окисления [Carroll et al., 2018].

Первоначальное окисление тиола Cys может приводить к последующему образованию углеродных радикалов как в α - (основной цепи), так и β -углеродной (боковой цепочки) участках одной и той же аминокислоты, а также у соседних аминокислот [Schöneich, 2016]. Последующая реакция этих углерод-центрированных радикалов с молекулярным O_2 (с образованием $ROO\cdot$) может «зафиксировать» повреждение в углеродном центре. Также на связях C-H, примыкающих к центру тиоэфира, происходит ограниченное отщепление атома водорода, в результате чего углерод-центрированные радикалы подвергаются быстрой реакции с O_2 [Schöneich et al., 2003].

В белках и пептидах отщепление атома водорода также встречается при α -углеродных C-H связях. Полученный α -углеродный радикал стабилизируется

делокализацией электронов на амидную и карбонильную группы [Welle et al., 1997], хотя величина этой стабилизации зависит от присоединенной боковой цепочки вследствие стерических и электронных взаимодействий, обусловленных необходимостью соблюдения планарности спиновой делокализации. Это приводит к уменьшению стабилизации α -углеродного радикала, образованного из аминокислот с объемными боковыми цепочками (например, Val) по сравнению с Gly, несмотря на большую присущую стабильность третичного α -углеродного радикала (из Val), над вторичными радикалами, образованными из Gly [Burgess et al., 1989]. Степень окисления основной цепи также зависит от локальной структуры белка (спирали, листа и т. д.). Теоретические расчеты указывают на то, что стабильность радикала α -углерода изменяется в зависимости от вторичной структуры, поскольку это ограничивает геометрию радикалов [Chan, Radom, 2019]. Структурные факторы также ограничивают доступ атакующих радикалов к некоторым сайтам, включая пептидный остов. Поэтому реакции боковой цепочки могут иметь большее значение для глобулярных или белков с β -складчатыми слоями, чем для пептидов с неупорядоченными структурами, где может наблюдаться более обширное повреждение основной цепи.

1.1.2. Судьба исходных аминокислотных, пептидных и белковых радикалов

Известно, что углерод-центрированные радикалы являются основными исходными промежуточными соединениями при радикальном повреждении аминокислот и белков. Подобные радикалы образуются посредством вторичных реакций (например, перегруппировки и фрагментации) алкоксильных [Berdnikov et al., 1972], пероксильных [Alfassi, 1997], тиильных [Schöneich, 2016] и азот-центрированных радикалов [Hawkins, Davies, 1998].

Димеризация и диспропорционирование являются основными путями нейтрализации углеродсодержащих радикалов в отсутствие O_2 . Эти реакции зависят от структуры, но обычно протекают очень быстро из-за их низких энергетических барьеров [Dizdaroglu, Simic, 1983]. У более крупных пептидов наблюдаются поперечные сшивки боковых цепочек, но огромное количество возможных комбинаций, перестановок и стереоизомеров делает анализ этих радикалов весьма сложным. Поскольку такая димеризация или диспропорционирование включает два радикала, степень этих реакций критически зависит от скорости генерации радикалов и их времени жизни. Долгоживущие радикалы (например, феноксильные радикалы из Tyr и индолильные радикалы из Trp) подвергаются димеризации с другими радикалами. $2k$ для самодимеризации феноксильного радикала Tyr составляет $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [Jin et al., 1993], что дает как углерод-углеродные, так и углерод-кислородные соединения, причем преобладают первые. Также были описаны другие радикалы: хинон-нуклеофильные, Trp-Trp и Trp-Cys [Paviani et al., 2015].

Углерод-центрированные радикалы могут вызывать отщепление атома водорода от слабых связей X-H (например, S-H-связи тиолов) и имеют значение в средах с низким содержанием O_2 (например, в опухолях), когда радикал стабилизирован или при димеризации предотвращается стерическими ограничениями (например, в белках). Это приводит к восстановлению углеродных радикалов и образованию вторичных соединений, таких как тиильные радикалы

[Schöneich, 2016]. Восстановление α -углеродных радикалов соседними остатками Cys может привести к L- и D-изомеризации аминокислот [Mozziconacci, Schöneich, 2014] и резкому влиянию на структуру, функцию и иммуногенность белка [Jiskoot et al., 2012]. Несмотря на различные возможные пути удаления углерод-центрированных радикалов, преобладающей реакцией в большинстве случаев является реакция с растворенным кислородом O_2 с образованием пероксильных радикалов ($ROO^\bullet$), так как эти реакции имеют значения k вблизи предела диффузии (10^9 - $10^{10} \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$), а концентрация O_2 обычно превышает концентрацию других радикалов.

Пероксильные радикалы могут подвергаться множественным реакциям. В биологических системах с высокими концентрациями связей C-H и S-H или богатых электронами соединений гидропероксиды являются основными продуктами. Пероксильные радикалы также могут подвергаться радикально-радикальным реакциям, которые непосредственно приводят к образованию спиртов, альдегидов и кетонов. Это может включать два $ROO^\bullet$ или $ROO^\bullet$ с $HO^\bullet$ / $O_2^\bullet$. Для $RCH_2OO^\bullet$ или $RR'CHOO^\bullet$ перекрестная реакция дает спирт и альдегид или кетон [Bennett, 1990]. Для третичных пероксильных радикалов ($RR'R''COO^\bullet$), где диспропорционирование не может происходить, образуются тетроксиды ($RR'R''COO-OOCRR'R''$), которые распадаются с образованием $RO^\bullet$ и O_2 [Bennett, 1990]. Полученный третичный $RO^\bullet$ может проводить отщепление атома водорода (или отщепление электрона с последующим быстрым протонированием) с получением спирта или подвергнуться (особенно в водном растворе) β -расщеплению с образованием кетона и другого $R^\bullet$. Эти реакции представляют собой пути образования белковых карбонилов (широко используемый маркер окисления белков) [Dalle-Donne et al., 2006]. Однако, поскольку это радикально-радикальные реакции, выход карбонила зависит от потока радикалов, поэтому фиксированная концентрация окислителя может давать разные выходы благодаря различной скорости образования окислителя.

Карбонилы также образуются из $ROO^\bullet$, которые содержат α -гетероатомы (α -гидроксильные или α -аминогруппы), так как они подвергаются быстрой

мономолекулярной элиминации $\text{HOO}^\bullet$ или $\text{O}_2^\bullet$ [von Sonntag, Schuchmann, 1997]. Таким образом, $\text{ROO}^\bullet$ в C-6 на боковых цепочках Lys устраняет NH_4^+ и $\text{HOO}^\bullet$ с образованием α -аминоадипат- δ -полуальдегида, известного маркера повреждения белка [Hammer, Bode, 1992]. Подобные реакции происходят с $\text{ROO}^\bullet$, образующимся на β -углероде на Ser и Thr, давая альдегид и кетон соответственно. Аналогичные реакции возникают во время фрагментации основной цепи. При этом фрагментация не разрушает радикал – продукты образуются вместе с новым радикалом, который может подвергаться дальнейшей реакции. Поэтому эти реакции могут способствовать цепным реакциям и распространению повреждений.

1.1.3. Механизмы возникновения гидропероксидов белков

Поскольку большинство углерод-центрированных радикалов быстро реагируют с O_2 , и существует множество мишеней, с которыми может реагировать полученный $\text{ROO}^\bullet$, неудивительно, что гидропероксиды являются основными продуктами окисления белков. Первые данные об образовании пероксида белка, по-видимому, относятся к 1942 году [Latarjet, Loiseleur, 1942]. Более поздние исследования [Alexander et al., 1956] показали, что облученный ионизирующим излучением БСА может индуцировать полимеризацию метакрилата, вероятно, в результате образования пероксидов в облученном белке. Периодические сообщения о белковых пероксидах появлялись в литературе по радиационной химии и биологии вплоть до 1980-х годов, но углубленные исследования начали появляться только в 1990-х годах [Gebicki, 1997].

Методы стационарного облучения предоставили убедительные доказательства образования аминокислотных, пептидных и белковых гидропероксидов, так как этот метод позволяет четко генерировать определенное количество радикалов [Gebicki, 1997]. Изменение реакционной газовой среды

позволило доказать критическую роль O_2 . Ранние исследования были озадачены присутствием как H_2O_2 , так и гидропероксидов в облученных смесях, но демонстрация высокой специфичности каталазы к пероксиду водорода и отсутствие реакции с аминокислотами и гидропероксидами аминокислот и белков привели к более легкой количественной оценке [Simpson et al., 1992; Gebicki, 1997]. Известно, что большое количество различных окислительных систем, включающих радикалы и некоторые двухэлектронные окислители (например, 1O_2), дают аминокислотные, пептидные и белковые гидропероксиды. Выход гидропероксида с различными окислителями является переменным из-за других конкурирующих реакций, но имеются ограниченные примеры, когда они не обнаруживаются, если система детально исследуется с использованием соответствующих методов и включает реакции, в которых присутствует O_2 .

Свободные аминокислоты, подвергнутые γ -облучению (например, ^{60}Co) в присутствии O_2 , могут давать высокие выходы гидропероксидов в зависимости от дозы облучения [Robinson et al., 1998]. Удаление O_2 предотвращает их образование. Некоторые аминокислоты (Cys, цистин, Ser, Thr) дают очень низкий выход гидропероксидов [Gebicki, Gebicki, 1993]. Это легко объясняется для Cys и цистина, так как реакция происходит преимущественно в серных центрах. Ароматические аминокислоты дают умеренный выход из-за возникновения альтернативных реакций в ароматических кольцах, хотя это зависит от радикалов и условий реакции. Высокие выходы гидропероксида обнаруживаются при реакциях с $\cdot OH$ и аминокислот с большим количеством алифатических связей C-H (Val, Leu, Ile, Glu, Lys, Pro), из которых может происходить отщепление атома водорода и последующее образование $ROO\cdot$ [Gebicki, Gebicki, 1993]. На свободном Gly наблюдаются низкие выходы гидропероксидов, что согласуется с относительно медленной скоростью отщепления водорода от участка α -углерода. Гидропероксиды, образующиеся в Leu, Val и Lys, были подробно охарактеризованы ранее [Morin et al., 1998].

Для Tyr основным механизмом образования гидропероксида является реакция исходного феноксильного радикала с $O_2\cdot^-$. Эта димеризация имеет низкий

энергетический барьер, приводящий к константам скорости около предела диффузии, и является эффективной из-за относительно долгоживущего характера исходных радикалов, который увеличивает их стационарную концентрацию и, следовательно, вероятность реакции. Эти гидропероксиды образуются преимущественно в C1 (место присоединения $-\text{CH}_2$) и C3 (в орто-положении к ОН-группе), так как они имеют самую высокую спиновую плотность, причем преобладают виды C1, так как этот третичный гидропероксид обладает большей стабильностью, чем вторичный гидропероксид, образующийся при C3 [Das et al., 2014]. Гидропероксид C1 также был обнаружен с помощью $\cdot\text{OH}$ в системе из $\text{Fe}^{2+} / \text{H}_2\text{O}_2$ [Möller et al., 2012]. Эти гидропероксиды могут реагировать с другими нуклеофилами из-за присутствия карбонильных конъюгированных двойных связей, которые являются хорошими акцепторами Михаэля [Das et al., 2014].

Окисление аминокислот и пептидов синглетным кислородом также может приводить к высоким выходам эндо- и гидропероксидов [Pattison et al., 2012]. $^1\text{O}_2$ образуется в результате многочисленных химических и физических процессов, включая свето-опосредованные реакции (фотохимические процессы типа 2), ферментативные (пероксидазо-, липоксигеназо- и циклооксигеназо- и гем-опосредованные реакции), клеточные (например, из активированных лейкоцитов) и химические процессы (например, реакция H_2O_2 с HOCl , озон-опосредованные реакции, в ограниченной степени в реакциях $\text{ONOO}^- / \text{ONOOH}$, реакции терминции пероксильных радикалов).

Для Cys и Met образование аддукта с помощью $^1\text{O}_2$ происходит быстро и приводит к цвиттерионам с пероксидоподобным характером [Gu et al., 1981]. Последующие реакции этих соединений изучены не полностью, особенно в случае белков. В случае Cys соединения RS^+-OO^- могут приводить к образованию дисульфидов (цистин, RSSR) в качестве основного продукта, но также происходит образование тиосульфатов и оксикислот [Foote, Peters, 1971]. Выход этих различных видов зависит от условий и концентрации тиола, факторов, которые могут оказать значительное влияние на судьбу этих соединений, когда они образуются в изолированных участках белков. Для Met

исходный аддукт $R_2S^+-OO^-$ подвергается pH-зависимым реакциям, в результате которых образуются две молекулы сульфоксида с другой молекулой-родителем или одна молекула сульфоксида и H_2O_2 в результате сложных реакций [Sysak et al., 1977].

Для Tyr, Trp и His присоединение 1O_2 дает короткоживущие эндопероксиды, которые могут раскрыться в кольцо с образованием гидропероксидов в положениях кольца. К ним относятся гидропероксиды в C1 и C4 для Tyr, C3 для Trp и C2, C4 и C5 для His [Ronsein et al., 2009]. Структуры некоторых из этих соединений были выяснены с помощью масс-спектрометрии и ядерного магнитного резонанса [Pattison et al., 2012]. Поскольку реакции 1O_2 с этими боковыми цепочками являются быстрыми и селективными (по сравнению с $\cdot OH$ или O_2), образование гидропероксида может быть очень эффективным (т.е. высокие скорости превращения 1O_2 в гидропероксид), при этом концентрация гидропероксидов достигает миллимолярных значений.

С небольшими пептидами, по-видимому, наблюдается аналогичная картина образования гидропероксида боковой цепочки аминокислоты (т.е. высокий выход гидропероксида на боковых цепочках с большим числом алифатических связей C-H). Однако обнаруживается повышенный выход гидропероксидов основной цепи, что согласуется с внутримолекулярным преобразованием исходных структур в сторону повышенного образования α -углеродных радикалов. Воздействие окислителей на большинство белков приводит к образованию пероксидов на разных уровнях. Основными источниками являются перенос водорода или электрона и последующие реакции протонирования $ROO\cdot$, реакция белковых радикалов с $O_2\cdot^-$ и 1O_2 -опосредованные реакции. Реакции $ROO\cdot$, по-видимому, преобладают для алифатических радикалов боковой цепочки, а реакции с $O_2\cdot^-$ и 1O_2 для ароматических боковых цепочек.

Хотя такая АФК, как $\cdot OH$, даёт пероксиды в нескольких участках на белке, известно несколько примеров, где образование гидропероксида является высокоспецифичным как в отношении типа, так и в отношении местоположения аминокислоты. Сайт-специфическое образование фенольных радикалов Tyr

может привести к образованию гидропероксидов на конкретных остатках в результате реакции с $O_2^{\bullet -}$ [Das et al., 2010]. Это создает возможности для изучения химии отдельных четко определенных видов пероксидов на белках. Показано, что образование гидропероксида Trp эффективно конкурирует с другими реакциями феноксильного радикала, такими как его димеризация с получением дитирозина, когда радикал изолирован или электронно-затруднен [Das et al., 2014].

Хотя многие гидропероксиды или эндопероксиды, образованные на белках, аналогичны тем, которые образуются на аминокислотах, уменьшенная скорость радикально-радикальных (терминальных) и радикально-молекулярных (восстановительных) реакций с белками из-за стерических и электронных эффектов, по-видимому, увеличивает выход гидропероксида. Хотя радикально-радикальное взаимодействие происходит с $k \approx 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ для низкомолекулярных радикалов и, следовательно, может быть основным способом удаления, эти процессы часто значительно медленнее для белковых радикалов [Stubbe, 2003], что приводит к увеличенной степени присоединения O_2 к углерод-центрированным радикалам с образованием $ROO^{\bullet}$ и, следовательно, гидропероксидов и добавлению $O_2^{\bullet -}$ к Trp-феноксильным и Trp-индолильным радикалам. Аналогичные аргументы применимы к некоторым видам, генерируемым 1O_2 (например, Cys и Met). Диспропорционирование и димеризация пар $ROO^{\bullet}$ также могут быть более ограничены белками, а скорость реакций отщепления водорода (или электрона) дает более высокий выход гидропероксидов из-за высокой концентрации доступных связей C – H внутри белков.

В то время как вышеуказанные факторы могут повысить выход и время жизни гидропероксида, другие факторы могут иметь обратный эффект, включая усиленную реакцию, например, с соседними остатками Cys и Met, которые могут восстанавливать гидропероксиды до спиртов или образовывать аддукты (например, глутатион) [Das et al., 2014].

1.1.4. Обнаружение и количественное определение аминокислотных, пептидных и белковых гидропероксидов

Гидропероксиды могут быть количественно определены классическим титрованием (например, с использованием KMnO_4 , йодометрия или Ti^{3+}), и, хотя этот подход можно использовать с изолированными аминокислотами и пептидами, эти методы меньше подходят для сложных систем из-за конкурирующих реакций. Считается, что йодометрическое титрование является наиболее точным [Jesup et al., 1994], но технически сложным из-за требований к анаэробным условиям, которые могут быть труднодостижимы для клеточных и других сложных систем.

Широко используемым и технически простым методом является анализ FOX (трехвалентное железо - ксиленоловый оранжевый), где гидропероксид окисляет Fe^{2+} до Fe^{3+} , а образующий комплекс с ксиленоловым оранжевым сильно поглощается при 560 нм [Gay et al., 1999]. В исходном анализе [Wolff, 1994] добавляли сорбит, чтобы улучшить показатели поглощения с помощью цепных реакций, но поскольку длина цепи, по-видимому, является переменной, этот метод анализа больше не используется [Gay, Gebicki, 2000]. Этот подход был разработан для разделения гидропероксидов методом ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография) и может дать данные о приблизительных концентрациях отдельных видов с пределом чувствительности 10-25 пмоль [Morgan et al., 2008]. Одним из ограничений этого анализа является неизвестная стехиометрия реакции Fe^{2+} - пероксид. Хотя она должна быть 2 : 1, сообщалось и о более высоких значениях, зависит от пероксида и белка [Gay et al., 1999]. Поскольку эти значения неизвестны и их нелегко определить, выходы пероксида обычно указываются в виде эквивалентов H_2O_2 [Gay et al., 1999]. Хотя это не является серьезной проблемой в сравнительных исследованиях, точный баланс массы становится невозможным. Кроме того, как и в других подходах, подразумевается предположение об одинаковом доступе ко всем

присутствующим гидропероксидам, а это не всегда может быть правильным, особенно в отношении белков; поскольку погруженные в структуру белка гидропероксиды могут реагировать медленно (или вообще не реагировать), что приводит к недооценке уровней пероксида.

Хемилюминесценция с использованием микропероксидазы и люминола была использована для количественного определения пероксидов [Robinson et al., 1998]. Хотя этот метод является чувствительным (предел обнаружения 50 пмоль), эта технология страдает недостатками из тех же проблем, что и анализ FOX в отношении ограниченного понимания стехиометрии реакций, генерирующих свет. Следовательно, полученные значения могут быть не абсолютными концентрациями, а погруженные пероксиды не могут быстро реагировать с микропероксидазой, которая значительно более стерически объемна, чем Fe^{3+} , используемый в анализе FOX.

Гидропероксиды могут быть обнаружены с помощью масс-спектрометрии, поскольку они дают отличительные пики $m/z + 32$ [Agon et al., 2006]. Однако пероксидная неустойчивость в условиях масс-спектроскопии (особенно при повышенных температурах) усложняет абсолютную количественную оценку. Тем не менее, масс-спектроскопия весьма ценна при определении участков и идентичности пероксидов на сложных молекулах, хотя для определения абсолютных концентраций в определенных местах потребуется значительное развитие и усовершенствование метода. Подходы масс-спектроскопии также используются для измерения участков (и выходов) спиртов ($m/z + 16$) от разложения гидропероксида [Möller et al., 2012]. Эта возможность в сочетании с немедленным восстановлением образца для превращения любых гидропероксидов в соответствующие спирты позволила получить информацию о выходах гидропероксида в сочетании с информацией об их местоположении [Morgan et al., 2012]. Хотя это потенциально ценный метод, он ограничен предположением, что гидропероксиды являются первичными предшественниками обнаруженных спиртов. Это вряд ли будет полностью оправданным, так как реакции дисмутации $\text{ROO}^\bullet$ и отщепления водорода $\text{RO}^\bullet$ также могут генерировать

эти соединения. Однако, поскольку $RO^{\bullet}$ может возникнуть в результате восстановления гидропероксидов (посредством одного электрона), эти данные могут быть не столь значительными, как первоначально предполагалось.

Реакция гидропероксидов с (не флуоресцентными) кумариновыми борнокислотными зондами с выделением флуоресцентных продуктов (например, 7-гидроксикумарина) может быть альтернативным и полезным способом полуколичественного определения гидропероксидов в сочетании со стандартной кривой, построенной с использованием аутентичного флуорофора [Michalski et al., 2014]. Этот подход может быть использован для исследований с высокой производительностью, а также позволяет исследовать кинетику окисления [Michalski et al., 2014]. Однако, как и в большинстве иных методах, описанных выше, отсутствуют достоверные стандарты гидропероксидов и существует неопределенность относительно того, все ли присутствующие пероксиды подвергаются реакции.

Аминокислотные, пептидные и белковые гидропероксиды могут иметь продолжительность жизни от часов до недель при хранении при комнатной температуре в темноте и в отсутствии ионов металлов, восстановителей и других активных веществ (например, ферментов) [Simpson et al., 1992]. Например, было установлено, что для некоторых белков при инкубации в течение 1 недели при комнатной температуре в растворе оставалось около 30 % исходного гидропероксида [Simpson et al., 1992], но для некоторых других белковых гидропероксидов период полураспада был равен 1,5 дня [Gebicki, Gebicki, 1993]. Более низкие температуры увеличивают продолжительность жизни, и период полураспада гидропероксидов, который может составлять месяцы и годы при -20 или -80 °C. Повышенные температуры, окислительно-восстановительные активные ионы металлов (например, Cu^{+} , Fe^{2+} (Davies et al., 1995)), УФ-свет [Robinson et al., 1998] или восстановители (например, дитионит, трифенилфосфин, аскорбиновая кислота, глутатион, боргидрид натрия [Gebicki, Gebicki, 1993] могут вызывать быстрый распад гидропероксидов. При этом НАДН и НАДФН не эффективны при отсутствии ассоциированных ферментов [Simpson et al., 1992].

Наиболее стабильными пероксидами являются те, которые присутствуют на третичных углеродных центрах или стерически изолированы на белках [Gebicki, 1997]. Некоторые гидропероксиды, полученные из белков, могут выдержать ферментативное расщепление протеолитическими ферментами, такими как проназа [Morgan et al., 2004], что позволяет преобразовывать исходные высокомолекулярные соединения в более мелкие фрагменты или свободные аминокислоты для анализа. Такие реакции имеют потенциально важное значение для исследования клеточного процессинга поврежденных белков.

Одним из методов исследования гидропероксидов на белках, пептидах и свободных аминокислотах является метод индуцированной хемилюминесценции (ХЛ) [Владимиров, Проскурнина, 2009]. Метод индуцированной ХЛ базируется на физических принципах, в основе метода лежит регистрация квантов света при рекомбинации двух радикалов. Явными преимуществами данного метода являются: простота, быстрота получения результатов и высокая чувствительность. Существенными минусами метода индуцированной ХЛ является необходимость наличия высокочувствительного хемилюминометра и возможность работы только с оптически прозрачными растворами.

1.1.5. Доказательство образования аминокислотных, пептидных и белковых гидропероксидов *in vitro* и *in vivo*

В настоящее время известно большое количество примеров образования гидропероксидов в сложных системах, однако точная их идентификация бывает проблематичной. Количественное определение гидропероксидов также может вызывать трудности из-за их высокой реакционной активности. Сообщалось, что воздействие изолированных липопротеинов низкой плотности на $O_2^{\bullet-}$ -генерирующие системы [Babiş et al., 1992] или на макрофагоподобные клетки ТНР-1 человека приводит к образованию гидропероксидов на белке

аполипопротеина В100, а также гидропероксидов липидов [Firth et al., 2008]. Образование этих видов ингибировалось антиоксидантом 7,8-дигидронеоптерином, поглощающим радикалы [Firth et al., 2008].

Воздействие окислителей на интактные клетки приводит к образованию гидропероксидов белков, хотя их выход варьирует в зависимости от типа клеток. Воздействие $\cdot\text{OH}$, генерируемого γ -облучением, на клетки миеломы мыши (Sp2/0-Ag14), U937 (клеток, полученных из моноцитов) и клеток HL-60, продуцирует гидропероксиды белка [Du, Gebicki, 2004; Liu, Gebicki, 2012]. Сообщалось, что концентрация гидропероксидов в этих клетках варьирует от 1-2 мкМ (в 2×10^6 Sp2/0 клеток [Du, Gebicki, 2004]) до 1-2 мМ в клетках HL-60 [Liu, Gebicki, 2012]. Эти белковые гидропероксиды были обнаружены в условиях облучения, при которых не удалось определить повреждение липидов или ДНК. Эти данные интерпретировались как указывающие на то, что белки являются основными исходными мишенями для радиационно-генерируемых радикалов и что перекисное окисление белков предшествует значительному повреждению липидов и ДНК [Du, Gebicki, 2004]. Выход соединений, полученных из белков, не зависел от используемой культуральной среды. Это позволяет предположить, что только радикалы, образующиеся в непосредственной близости или внутри клеток, являются соединениями, генерирующими затем пероксид водорода [Du, Gebicki, 2004]. Это согласуется с ограниченной диффузией $\cdot\text{OH}$ в результате их рекомбинации с образованием H_2O_2 . В исследованиях с использованием клеток HL-60 [Liu, Gebicki, 2012] образование белковых гидропероксидов показало наличие лаг-фазы, приписываемую действию эндогенных антиоксидантов и, в частности, восстановлению глутатионом. Эта интерпретация подтверждается исследованиями, где добавляли N-ацетилцистеин (который снижает уровни гидропероксида) и L-бутионин сульфоксिमин (который истощает пул глутатиона и повышает концентрации гидропероксида) [Liu, Gebicki, 2012]. Сообщалось также, что повышение внутриклеточного уровня аскорбиновой кислоты снижает образование гидропероксида [Liu, Gebicki, 2012].

Фотолитические реакции могут генерировать белковые пероксиды в клетках и интактных клетках [Rahmanto et al., 2010б]. Освещение мышинных макрофагоподобных (J774A.1) культур клеток или моноцитов человека (THP-1) видимым светом в присутствии фотосенсибилизатора Rose Bengal и O_2 , генерирует многочисленные гидропероксиды белков. Установлено, что концентрация этих пероксидов составляет до 1,5 нмоль на 10^6 клеток, или 10 нмоль/мг клеточного белка [Wright et al., 2003]. В работе [Morgan et al., 2008] гидропероксиды были отделены с помощью ВЭЖХ перед обнаружением (с использованием реакции FOX) и показано, что они присутствуют на нескольких белках, хотя они не были идентифицированы. Эти эксперименты вместе с исследованиями на клетках THP-1 указывают на то, что белковые гидропероксиды могут образовываться в условиях, когда клетки остаются жизнеспособными, что определяется с помощью связывания бромида этидия с высвобождающейся ДНК (поздний маркер повреждения) [Wright et al., 2003] или высвобождения лактатдегидрогеназы (маркер повреждения мембраны) [Rahmanto et al., 2010б]. Пероксиды преимущественно присутствовали в продукте, осаждаемом трихлоруксусной кислотой (т.е. полученном из белка), и не уменьшались при экстракции гексаном-метанолом (то есть не растворимы в органических растворителях, как пероксиды липидов). Выходы пероксида усиливались в D_2O и уменьшались в присутствии азиды натрия, что согласуется с механизмом их образования путем реакции с 1O_2 [Rahmanto et al., 2010б]. Добавление аскорбата не влияло на уровни образования белковых пероксидов, обнаруженных в этих экспериментах. Это позволяет предположить, что этот антиоксидант никак не проявляет видимого воздействия на концентрации гидропероксида белка, генерируемого 1O_2 в этих условиях, в отличие от исследований при γ -облучении / $\cdot OH$, рассмотренных выше [Liu, Gebicki, 2012]. В клеточными лизатах, полученных из клеток THP-1, были обнаружены идентичные выходы пероксидов белков при коротком времени освещения, как это наблюдалось для интактных клеток, но более высокие выходы – при более

длительном времени воздействия, что согласуется с ограничивающими факторами в интактных клетках [Wright et al., 2003].

Были получены доказательства образования пероксида водорода на эндогенных или экзогенных белках посредством клеточно-опосредованных реакций. Стимулированные нейтрофилы могут генерировать гидропероксиды при добавленном свободном Tyr [Winterbourn et al., 1997] или энкефалинов [Nagy et al., 2010] посредством реакций, опосредованных миелопероксидазой, включая образование феноксильных радикалов из Tyr и последующую перекрестную реакцию с $O_2^{\cdot -}$ с получением гидропероксида, образованного из Tyr [Nagy et al., 2010].

Образование гидропероксида обнаружено и в плазме крови человека, при этом пероксиды обнаруживались на свежих белках плазмы, освещенных видимым светом в присутствии O_2 и фотосенсибилизатора Rose Bengal [Morgan et al., 2008]. В данном исследовании обнаруженные концентрации гидропероксидов составляли до 75 мкМ в плазме крови, которая была разведена до концентрации белка 10 мг/мл [Morgan et al., 2008]. ВЭЖХ фракционирование фотоокисленной плазмы показало, что большинство пероксидов совместно элюировалось с человеческим сывороточным альбумином, что согласуется с высоким содержанием этого белка в плазме и связыванием с ним сенсибилизатора и локализованным образованием пероксида водорода. Последнее объяснение подтверждается исследованиями с другими сенсибилизаторами, которые связываются с сывороточными альбуминами [Silvester et al., 1998; Giménez et al., 2016].

Выявлено наличие высоких уровней карбониллов и спиртов в образцах как нормальной, так и пораженной ткани [Dalle-Donne et al., 2006]. Эти результаты согласуются с образованием гидропероксидов, причем выход этих соединений обычно находится в диапазоне низких величин нмоль / мг белка, хотя также известно и о более высоких их значениях [Weber et al., 2015]. Получены убедительные доказательства того, что разложение гидропероксида приводит к образованию этих продуктов, однако количественное значение каждого пути

неизвестно, хотя в некоторых системах *in vitro* было показано, что оно может быть определено [Fu et al., 1995]. Поскольку димеризация белка ROO[•], вероятно, будет медленной, то некоторый белок ROO[•], образованный *in vivo*, будет давать гидропероксиды, которые впоследствии разлагаются на спирты и карбонилы. Очевидно, что эта область требует дальнейшего изучения, но стоит отметить, что имеются убедительные доказательства того, что спирты являются основными продуктами, которые образуются из гидропероксидов биологическими восстановителями [Morin et al., 1998]. Доказательства и обнаружение карбонильных продуктов белков в образцах здоровых и пораженных тканей являются предметом многочисленных обзоров [Winterbourn et al., 2003; Dalle-Donne et al., 2006; Halliwell, Gutteridge, 2015]. Повышенный уровень спиртов также обнаружен в ряде образцов тканей, включая атеросклеротические поражения [Fu et al., 1998a], катаракту и нормальный хрусталик [Fu et al., 1998b], а также в образцах, полученных от людей с диабетом [Fu et al., 1998b].

Сообщалось, что абсолютные уровни спиртов Val и Leu составляют от 50 до 100 мкмоль на моль исходной аминокислоты в атеросклеротических поражениях человека (что соответствует 1-4 пмоль / мг сырой массы ткани интимы) [Fu et al., 1998a] и 200–400 мкмоль окисленной аминокислоты на моль исходной аминокислоты при прогрессирующей катаракте хрусталика человека (60–120 пмоль окисленной аминокислоты / мг высушенной ткани хрусталика) [Fu et al., 1998b].

1.1.6. Вторичные реакции гидропероксидов

Алкоксильные радикалы (RO[•]) могут образовываться при одноэлектронном восстановлении гидропероксидов или посредством фотолитического (например, коротковолнового УФ-излучения) или термического распада гидропероксидов. RO[•] подвергаются быстрым реакциям присоединения и отщепления водорода, а

также поверхностным мономолекулярным реакциям фрагментации и перегруппировки, которые могут усиливать или распространять повреждение [Berdnikov et al., 1972].

Первичные и вторичные $RO^\bullet$ образовавшиеся из гидропероксидов подвергаются быстрым реакциям водородной перегруппировки в водном растворе ($k \ 10^6\text{--}10^7 \text{ c}^{-1}$) с образованием α -гидроксиалкильных радикалов [Berdnikov et al., 1972]. Было показано, что $RO^\bullet$ с боковой цепочкой (β -углерод), образованный в результате разложения соответствующего гидропероксида, может фрагментироваться, давая как основной α -углеродный радикал, так и низкомолекулярный карбонил из боковой цепочки [Headlam, Davies, 2002]. Эти реакции приводят к модификации начальной боковой цепочки и высвобождению еще одного радикала. Таким образом, эти реакции приводят к распространению повреждения. β -деление $RO^\bullet$, образованного из гидропероксида у C-4 на боковых цепочках Glu, приводит к потере соседней карбоксигруппы боковой цепочки в виде $CO_2^\bullet$ и образованию альдегида [Davies et al., 1995]. $CO_2^\bullet$ является сильно восстанавливающим радикалом и быстро реагирует с O_2 с образованием $O_2^\bullet$, тем самым потенциально распространяя радикальные цепи. Другие реакции сдвига атома водорода могут потенциально переносить повреждение на сайт α -углерода или другие места в белках. $RO^\bullet$, образованный в C-5 на Lys, Arg, Ile и Leu, может отщеплять атом водорода α -углерода посредством внутримолекулярного сдвига атома 1,5-водорода, хотя прямые доказательства этого процесса в белках отсутствуют. Однако, такие реакции происходят в модельных соединениях ($k \sim 8 \times 10^6 \text{ c}^{-1}$) [Davies, Gilbert, 1991]. 1,6-сдвиг реакции менее благоприятны, а 1,4- и 1,3-сдвиги редки, если не помогают растворители; однако такие реакции известны для тиольных радикалов [Nauser et al., 2015].

В случае Gly-содержащих пептидов отщепление атома водорода с помощью $^\bullet OH$ из α -положения (т.е. основной цепи $-CH_2-$) является основным процессом [Hawkins, Davies, 1998]. С небольшими Ala-содержащими гомопептидами перенос атома водорода α -углерода может составлять $> 90 \%$ реакции $^\bullet OH$ из-за большей стабильности α -углеродного радикала по сравнению с первичными алкильными

радикалами, образующимися из боковой метильной цепочки [Hawkins, Davies, 1998]. У более крупных пептидов выход углерод-центрированных радикалов основной цепи ниже, особенно когда присутствуют реакционноспособные боковые цепочки [Morgan et al., 2012]. Последующая реакция этих α -углеродных радикалов с O_2 приводит к образованию $ROO^\bullet$ и гидропероксидов. Оба вида подвергаются дальнейшим реакциям, сопровождающимся расщеплением полипептидной цепи [Davies, 2005]. От радикала $ROO^\bullet$ может отщепляться $HOO^\bullet$ с образованием иминов, которые затем подвергаются гидролизу до соответствующих амидов и карбонильных соединений.

Разложение гидропероксидов α -углерода (основной цепи) (например, катализируемых ионами металлов или УФ-излучением) приводит к $RO^\bullet$ [Davies et al., 1995; Davies, 1996], который подвергается β -расщеплению с образованием карбонильной группы и вторичного ацильного радикала ($^\bullet C(O)NHR$), когда гидропероксид присутствует в пептидной цепи (т. е. удален от любого конца основной цепи) [Davies, 1996]. Это приводит к расщеплению основной цепи. Карбоксильные концевые гидропероксиды дают алкоксильные радикалы, которые выделяют $CO_2^\bullet$ (или $^\bullet C(O)NH_2$ в случае С-концевого амида). Этот путь гидропероксида / $RO^\bullet$, по-видимому, конкурирует с путем гидролиза имиона для фрагментации основной цепи [Davies, 2005]. Таким образом, гидропероксиды основной цепи, по-видимому, являются важными промежуточными соединениями, участвующими в фрагментации пептидов, но количественный вклад этих двух путей неизвестен.

Количественная оценка начальных выходов радикалов и потери аминокислот в исследованиях гамма-излучения доказала большую потерю аминокислот, чем образовавшихся исходных радикалов [Neuzil et al., 1993]. Это согласуется с существованием цепных реакций – каждый исходным радикал приводит к вторичным соединениям, которые затрагивают дополнительные аминокислоты. Сообщалось, что длина цепей до 15 аминокислот рассчитывается на основе начальных выходов $^\bullet OH$ для изолированных облученных белков [Neuzil et al., 1993] и до 10 гидропероксидных групп на исходный радикал в клетках HL-

60 [Liu, Gebicki, 2012]. Хотя эти длины цепей меньше по сравнению с перекисным окислением липидов (где встречаются значения > 100), реакции окисления белковых цепей могут происходить, как с изолированными белками, так и в интактных клетках. Они могут включать некоторые реакции фрагментации и отщепления атомов водорода $ROO^{\bullet}$, $RO^{\bullet}$ и гидропероксидов, которые обсуждались выше. Хотя отщепление водорода также может происходить с образованием $R^{\bullet}$, это не может привести к дополнительной потере аминокислот, поскольку эти реакции только переносят повреждение и могут регенерировать родительскую аминокислоту. Однако, если реакция переноса приводит к изменению стереохимии исходной аминокислоты, это может привести к значительным изменениям конформации структуры белка и нарушению его функционирования. Эта возможность имеет большое потенциальное значение для α -углеродных радикалов основной цепи, где инверсия L-стереохимии в D- может происходить в результате переноса атома водорода на одну из сторон промежуточного радикала. Такая инверсия может оказать существенное влияние на вторичную и третичную структуру. Подобные процессы могут происходить с ограниченным числом стереохимических центров боковых цепочек. Показано, что стереохимическая инверсия содержится в небольшом числе исследований [Mozziconacci, Schöneich, 2014; Bommana et al., 2018], но может быть обычным процессом, поскольку чувствительные методы, позволяющие исследовать эти реакции, были разработаны недавно. Низкая степень потребления O_2 , обнаруженная в ходе исследований цепных процессов на изолированных белках (≈ 2 моль на моль атакующего радикала [Neuzil et al., 1993]), может учитывать только модификацию четырех аминокислотных остатков в спиртах или карбонилах на начальный радикал. Это подтверждает ключевую роль реакций фрагментации, так как эти процессы могут привести к изменению аминокислот без реакции присоединения кислорода.

Хотя установлено, что гидропероксиды могут разлагаться с образованием дополнительных радикалов, важность этого пути относительно двухэлектронных реакций неясна. Получены доказательства быстрой реакции аминокислотных,

пептидных и белковых гидропероксидов с тиолами (RSH) и тиолат-анионами (RS⁻), причем последние являются более быстрыми. Реакция со свободным Cys и GSH [Morgan et al., 2004] предлагается в качестве основного пути детоксикации в клетках и *in vivo* [Fu et al., 1995; Peskin et al., 2010]. Дисульфиды реагируют менее быстро, с небольшим потреблением пероксидов, обнаруживаемых при длительной инкубации, за исключением липоевой кислоты, которая, по-видимому, намного более реакционна из-за присутствия напряженного пятичленного кольца [Morgan et al., 2004]. Межмолекулярная реакция со свободным Met оказалась неэффективной, но некоторое снижение оставшейся концентрации пероксидов БСА было обнаружено у родственных видов 3,3'-тиодипропионовой кислоты [Morgan et al., 2004]. Напротив, значительное окисление Met обнаружено, когда гидропероксид и Met находятся в одном и том же пептиде или в непосредственной физической близости [Nagy et al., 2010]. Таким образом, гидропероксиды Tyr, присутствующие в энкефалинах, легко окисляют остатки Met до сульфоксида, а остаток Tyr превращается в бициклические соединения путем присоединения N-концевого амина к ароматическому кольцу [Nagy et al., 2010]. Это может быть связано с различиями в реакционной способности гидропероксида или с повышенной скоростью реакции из-за внутримолекулярной реакции, которая является более благоприятной энтропийно.

Аскорбат является эффективным гидропероксидным восстановителем [Liu, Gebicki, 2012]. Селеносодержащие соединения (эбселен и селенометионин) также являются высокоэффективными реагентами для удаления гидропероксидов [Suryo Rahmanto, Davies, 2011]. В случае селенометионина, который окисляется до селеноксида, удаление гидропероксидов оказывается каталитическим, когда GSH и различные ферменты также присутствуют благодаря эффективному последующему восстановлению селеноксида [Suryo Rahmanto, Davies, 2011].

При использовании пептидных гидропероксидов получены доказательства одновременной потери как гидропероксидов, так и тиолов в клеточных лизатах [Morgan et al., 2004], что согласуется с тем, что GSH является основным агентом

удаления этих соединений в клетках [Liu, Gebicki, 2012]. Гораздо менее быстрое и менее эффективное удаление гидропероксида и сопутствующее окисление тиола обнаружено в случае гидропероксидов БСА, возможно по стерическим причинам [Morgan et al., 2004]. Это подтверждается данными о гидропероксидах БСА, предварительно обработанных проназой, для разложения белка до более мелких пептидов. При этом происходит более быстрое удаление гидропероксида и увеличение потери тиола [Morgan et al., 2004]. Таким образом, предполагается, что долгоживущие гидропероксиды, обнаруженные в интактных клетках, могут присутствовать в больших белках или быть недоступными для низкомолекулярных восстановителей, таких как GSH и аскорбат, в результате того, что они частично находятся в структуре белка.

Фенольные антиоксиданты (например, Тролокс-С, пробукол, бутилированный гидрокситолуол) не обладают какой-либо значительной способностью непосредственно удалять гидропероксиды, хотя они могут поглощать производные от них радикалы [Morgan et al., 2004].

Показано, что низкомолекулярные восстановители могут потенциально удалять некоторые гидропероксиды аминокислот и пептидов в биологических системах, причем самые медленные и наименее эффективные реакции происходят с гидропероксидами белков. Похожая ситуация возникает при удалении, опосредованном ферментами, но с более заметными различиями. Существует мало результатов реакции аминокислотных, пептидных или белковых гидропероксидов с каталазой, что создает полезный способ разграничения этих видов и H_2O_2 [Simpson et al., 1992]. Никакой реакции не происходит с супероксиддисмутазами или пероксидазами, такими как пероксидаза хрена, лактопероксидаза и миелопероксидаза, вероятно, в результате стерических помех [Gebicki et al., 2002]. С миоглобином и гемоглобином реакция медленная [Morgan et al., 2004], но более быстрая реакция происходит с оксиформой [Morgan et al., 2004]. Значительная реакция происходит с оксигемоглобином из эритроцитов [Soszynski et al., 1996], причем реакция включает полное превращение оксиформы в мет-форму. Эти реакции умеренно быстрые с гидропероксидами

аминокислот, медленнее с гидропероксидами пептидов, а крупные гидропероксиды белков (производные БСА и лизоцима), по существу, инертны. Сообщалось, что окси-мет конверсия гемоглобина, вызванная гидропероксидами аминокислот, происходит быстрее, чем при использовании H_2O_2 . Первоначально это было связано с возможными следовыми уровнями каталазы в препаратах гемоглобина [Soszynski et al., 1996]. Более поздние исследования показали, что это несущественный фактор и что это общее явление: многие гидропероксиды аминокислот и пептидов более реакционноспособны, чем H_2O_2 , и плохо удаляются защитными системами [Morgan et al., 2004]. Данные результаты доказывают, что гидропероксиды аминокислот и пептидов могут накапливаться в клетках до гораздо более высоких уровней, чем H_2O_2 , и, возможно, оказывать более существенное влияние на биохимические процессы.

Селеноцистеин-зависимый фермент глутатионпероксидаза (ГП) обладает сходной активностью. При использовании гидропероксидов БСА и лизоцима скорость потери пероксида не повышается в присутствии ГП и GSH, по сравнению только при взаимодействии с GSH [Morgan et al., 2004]. Напротив, гидропероксиды аминокислот, некоторых пептидов и белков могут быть каталитически удалены смесью ГП и GSH с потерями большего количества пероксида, чем с одним только GSH [Gebicki et al., 2002]. Исследования с фосфолипидной глутатионпероксидазой (ГП4) показали, что это не стимулирует распад гидропероксида, по сравнению с одним только GSH, ни с одним из протестированных гидропероксидов [Gebicki et al., 2002].

Для селенометионина (SeMet) сообщалось как о прямом, так и о ферментативноусиленном удалении гидропероксида [Suryo Rahmanto, Davies, 2011]. Прямая реакция дает селеноксид, который может быть легко преобразован обратно в исходный SeMet с помощью GSH, а также ферментных систем с несколькими редуктазами, включая НАДФН / тиоредоксинредуктазу и НАДФН / тиоредоксин / тиоредоксинредуктазу [Suryo Rahmanto, Davies, 2011]. Удаление гидропероксида происходило быстрее с ферментными системами по сравнению только с одним SeMet, и было почти стехиометрическим в отношении

потребления НАДФН и удаления гидропероксида, что свидетельствует об эффективном ферментативном восстановлении [Suryo Rahmanto, Davies, 2011]. Дополнение к клеткам SeMet также предоставило доказательства увеличения удаления гидропероксида по сравнению с клетками без добавок, что согласуется с каталитическим ферментативным удалением гидропероксидов аминокислот и пептидов для небольших гидропероксидов белков [Suryo Rahmanto, Davies, 2011].

Пероксиредоксины 2 и 3, которые являются богатыми Cys-содержащими цитозольными и митохондриальными ферментами, поддерживаются в своем восстановленном состоянии системой НАДФН / тиоредоксин / тиоредоксинредуктаза, быстро восстанавливают гидропероксиды. Установлено, что ряд гидропероксидов (образующихся в результате воздействия γ -излучения или фотоокисления) быстро реагирует с Prx2 с k между $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (для гидропероксидов белков) и $4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (для низкомолекулярных видов) с сопутствующим образованием дисульфид-связанных димеров Prx2 и спиртов из гидропероксидов [Peskin et al., 2010]. Добавление гидропероксидов лейцина и БСА к лизатам эритроцитов приводило к окислению Prx2 без значительной потери GSH. Это подтверждает, что пероксиредоксины являются основными внутриклеточными мишенями для этих гидропероксидов и для детоксикации этих соединений в клетках. Эти реакции не являются реакциями репарации, поскольку они не преобразуют окисленные аминокислоты обратно в исходную форму (продукт восстановления является спиртом), хотя они ограничивают вторичное повреждение.

1.1.7. Долгоживущие активные формы белков

Ранее было установлено, что при воздействии тепла или электромагнитного излучения видимого и ближнего инфракрасного диапазона на растворы, насыщенные атмосферным O_2 , наблюдается генерация активных форм кислорода

[Брусков и др., 2002; Bruskov et al., 2002б; Черников, Брусков, 2002; Брусков и др., 2003; Смирнова и др., 2005; Штаркман и др., 2008б; Gudkov et al., 2011; Гудков и др., 2012; Ahn, Chung, 2012; Chernikov et al., 2013]. Показано, что генерация АФК идет только при воздействии в линиях поглощения молекулярного кислорода, растворенного в воде. При этом часть димолей кислорода переходит из триплетного в синглетное состояние. Установлено, что образование синглетного кислорода является ключевым элементом генерации АФК при данных воздействиях. Имеются весовые доказательства того, что генерация H_2O_2 , может быть, одним из факторов терапевтического действия тепла и оптических излучений [Chernov et al., 2018]. Белки считаются главными, а также более чувствительными мишенями для активных форм кислорода в сравнении с другими биомакромолекулами, так как быстро вступают в реакции окисления и широко распространены в организме [Cecarini et al., 2007; Rahmanto et al., 2010a; Gracanin et al., 2011; Avery, 2011]. Белки составляют около 15 % от массы клеток (≈ 70 % от сухой массы клетки). Окисление с помощью АФК приводит к потере специфических функций белков в нормальных и патологических процессах и ускоряет старение [Cecarini et al., 2007; Giorgio et al., 2007; Rahmanto et al., 2010a; Avery, 2011; Gracanin et al., 2011].

Повреждающие эффекты АФК исследованы в биологических системах, подвергшихся воздействию ионизирующего излучения. Радиационные повреждения в клетке образуются преимущественно короткоживущими активными формами кислорода из-за процесса разложения воды. Показано, что в кислородной среде, активные формы кислорода генерируют долгоживущие активные формы белков (ДАФБ). Эта группа активных форм содержит как долгоживущие радикалы, так и гидропероксиды белков [Каюшин и др., 1976; Davies et al., 1995; Gebicki, 1997; Koyama et al., 1998; Kumagai et al., 2003a; Gracanin et al., 2011; Bruskov et al., 2012; Davies, 2016]. Образование долгоживущих радикалов продемонстрировано для многих белков, в том числе и белков плазмы крови [Miyazaki et al., 2002; Garmash et al., 2014]. Плазма крови сложная по составу жидкость, контактирующая со всеми тканями организма,

вследствие чего именно плазма крови является одной из наиболее уязвимых мишеней, которая подвергается пагубным воздействиям при развитии в организме окислительного стресса [Shamsi et al., 2010; Tripathi, Pandey, 2013]. Эти виды ДАФБ формируются не только под действием гамма- [Koyama et al., 1998; Wang et al., 2004], рентгеновского [Koyama et al., 1998; Гудков и др., 2007], но и УФ-излучения [Kumagai et al., 1999; Østdal et al., 2002], а также пероксинитрита [Pietraforte, Minetti, 1997a], ионов уранила [Garmash et al., 2014], продуктов разложения пероксида водорода иммобилизованной пероксидазой [Kumagai et al., 2003b] и гипертермии [Bruskov et al., 2014].

Образование долгоживущих радикалов установлено в растворах различных белков: альфа-кератина [Wang et al., 2004], лизоцима [Gebicki, Gebicki, 1993; Neuzil et al., 1993], миоглобина [Giulivi, Cadenas, 1998], БСА [Gebicki, Gebicki, 1993; Neuzil et al., 1993]. Подразумевается, что сложная и упорядоченная структура биополимеров затрудняет образование радикалов в молекулярных полимерных цепях. Тем не менее, данные долгоживущие радикалы имеют длительный период полужизни, поэтому способны проявлять свои свойства продолжительное время после действия фактора, вызывающего окисление [Kumagai et al., 2003a]. Показано, что долгоживущие активные формы белков инициируют модификации различных клеток и изменения генома, но также продуцируются в малых концентрациях и в процессе нормальной жизнедеятельности [Miyazaki et al., 2002].

Раньше было продемонстрировано, что ДАФБ – это источник вторичных радикалов, приводящих к последующим окислительным повреждениям главным образом белковых структур, а также дезоксирибонуклеиновой кислоты [Davies et al., 1995; Gebicki, Gebicki, 1999; Luxford et al., 2000; Østdal et al., 2002; Waldren et al., 2004; Гудков и др., 2010; Karp et al., 2010; Rahmanto et al., 2010a; Bruskov et al., 2012]. Долгоживущие активные формы белков, индуцированные ионизирующим излучением, способны долговременно продуцировать активные формы кислорода, приводя к опасным воздействиям на клеточный генетический материал [Karp et al., 2010; Bruskov et al., 2012]. Нейтрализация ДАФБ и

производимыми ими АФК некоторыми природными антиоксидантами, вводимыми после облучения, может в существенной мере нейтрализовать этот окислительный стресс и его последствия [Pietraforte, Minetti, 1997a; Kumagai et al., 2003a; Гудков и др., 2007; Karp et al., 2010; Bruskov et al., 2012; Mansour et al., 2018; Mohan et al., 2018; Shireen et al., 2018].

1.1.8. Биологические последствия образования долгоживущих активных форм белков

Поскольку гидропероксиды быстро реагируют со многими остатками Cys, в ряде исследований изучалось ингибирование ферментов, которые содержат остатки Cys, и особенно тех, которые имеют низкие значения pK_a . Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФДГ) быстро инактивируется рядом гидропероксидов аминокислот и белков с потерей активности, связанной с исчезновением белковых тиолов [Morgan et al., 2002]. Окисление ключевых остатков Cys гидропероксидами аминокислот и белков в сочетании с утратой активности зарегистрировано для папаина и некоторых изоформ фермента катепсина (В и L), но не для других (D и G), которые не являются Cys-зависимыми ферментами [Headlam et al., 2006]. Клеточные каспазы также чувствительны к инактивации пероксидами, полученными из Tyr и Trp, но не пероксидами овальбумина, при этом значения концентрации полумаксимального ингибирования составляют 10 мкМ по сравнению с 300 мкМ для H_2O_2 [Hampton et al., 2002].

Ингибирование активности фермента и связанного с ним окисления Cys обнаружено как для выделенных протеин-тирозин-фосфатаз, так и для этих ферментов, содержащихся в клеточных лизатах [Stoker, 2005]. Инактивация ферментов легко происходила гидропероксидами белков и, в частности, видами, образующимися на остатках Tyr [Gracanin, Davies, 2007]. Таким образом, эти

белковые пероксиды могут оказывать существенное влияние на передачу сигналов клетками и процессы, зависящие от фосфорилирования белка.

Важнейший Ca^{2+} насос SERCA (Ca-АТФаза сарко / эндоплазматического ретикулума) также модифицируется аминокислотными и пептидными гидропероксидами с изменением подмножества 22 восстановленных присутствующих остатков Cys, включая Cys674 и Cys675 [Dremina et al., 2007]. Очевидная общность выше рассмотренных данных предполагает, что другие Cys-зависимые ферменты также будут чувствительны к гидропероксидам аминокислот и белков. Это позволяет полагать, что белковые гидропероксиды могут вносить существенный вклад в окислительно-восстановительные изменения и его гомеостаз в клетках.

Окисление белка ранее было предложено в качестве маркера деградации белка клеточными механизмами [Davies, 1990] и неполного метаболизма, приводящего к накоплению в клетке поврежденных белков. Это связано с многочисленными патологиями у людей. Наиболее хорошо известны нейродегенеративные патологии (например, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Крейтцфельда-Якоба) [Grimm et al., 2011]. Низкие уровни модификации белка, по-видимому, приводят к ускорению метаболизма удаления поврежденных белков, тогда как экстенсивная модификация приводит к снижению этого процесса [Friguet, 2006]. Метаболизм может происходить по нескольким цитозольным путям (20S протеасома и лизосомная активность), в ядрах и в митохондриях (Lon и Clp протеазы) [Hamon et al., 2015], с возможным перекрестным взаимодействием между этими системами [Chondrogianni et al., 2014]. Меньше известно о метаболизме модифицированных внеклеточных белков, хотя возможен некоторый эндоцитоз и лизосомальная деградация [Nowotny, Grune, 2014]. Низкая скорость метаболизма больших (и часто сильно сшитых) матричных белков приводит к длительному периоду их полураспада [Nowotny, Grune, 2014].

Современные данные согласуются с катаболизмом большинства модифицированных белков, проходящих через (АТФ-независимые) 20S и

иммунопротеасомы [Demasi, da Cunha, 2018], с метаболизмом нативных белков, которые взаимодействуют с АТФ-зависимой 26S протеасомой [Chondrogianni et al., 2014; Wolf, Menssen, 2018]. Эти системы могут регулироваться и подавляться окислительно-восстановительными процессами, которые снижаются с возрастом и ускоряют возникновение различных заболеваний [Ott, Grune, 2014]. Аминокислотные, пептидные и белковые гидропероксиды могут снижать химотриптическую и триптическую (а также, вероятно, каспазоподобную) активность 26S протеасомы как в изолированных системах, так и в препаратах клеточных лизатов [Gracanin et al., 2011]. Для очищенных 26S протеасом человека ингибирование, по-видимому, связано отчасти с окислением критического Cys на контрольных субъединицах S6-АТФазы [Gracanin et al., 2011]. Инактивация происходит при низких микромолярных концентрациях пероксидов и при гораздо более низких концентрациях, чем при использовании H_2O_2 [Gracanin et al., 2011]. Продукты деградации гидропероксида (вероятно, альдегиды) также играют определенную роль, поскольку разложившиеся гидропероксиды также вызывают некоторое ингибирование [Gracanin et al., 2011]. Ингибирование 26S может модифицировать метаболизм белков (например, NF- κ B и Nrf2), критически важных для путей передачи сигналов и окислительного ответа клетки, так что низкие уровни модификации белка и образования гидропероксида могут оказывать влияние на нормальный клеточный метаболизм. Как рассмотрено выше, гидропероксиды аминокислот и белков также являются эффективными ингибиторами некоторых лизосомальных тиолзависимых катепсинов (B, L и S) [Headlam et al., 2006], предполагая, что гидропероксиды могут ингибировать большинство основных катаболических путей, которые, как предполагается, удаляют модифицированные белки. Однако, это привело к предположению, что этот процесс может представлять собой порочный цикл, в котором образование гидропероксида белка приводит к повреждению и систем их удаления. В результате этот процесс способен привести к увеличению накопления модифицированных или поврежденных белков, увеличению скорости и степени вторичного повреждения [Headlam et al., 2006; Gracanin et al., 2011].

Воздействие γ -облучения на гистоновые белки в присутствии O_2 приводит к высоким концентрациям гидропероксида (до 70 % исходных радикалов) [Luxford et al., 2000], возможно, в результате высокого содержания Lys и Arg в этих белках и низких уровней Cys, Met и ароматических остатков, которые могут выступать в качестве альтернативных мишеней, или (в случае Cys и Met) восстановителями для этих соединений. Реакция этих пероксидов с Cu^+ и Fe^{2+} приводит к образованию белковых радикалов [Luxford et al., 2000], которые реагируют с пиримидиновыми основаниями и нуклеозидами с образованием аддуктов белок-ДНК [Gebicki, Gebicki, 1999], а также мутагенного продукта - 7,8-дигидро-8-оксо-2'-дезоксигуанозина [Luxford et al., 2000]. Расщепление цепи ДНК было обнаружено с помощью плазмидной ДНК [Luxford et al., 2002]. Исследования по радиомаркировке продуктов реакции и анализу их сдвигов в гелевом электрофорезе позволили предположить значительную роль гидропероксидов, и в особенности видов, полученных из лизина, в реакциях образования сшивок ДНК-белок [Gebicki, Gebicki, 1999]. Поскольку гистоны тесно связаны с ДНК в ядре и, как известно, связывают ионы меди, которые могут катализировать разложение гидропероксида до радикалов, эти реакции могут способствовать перекрестным связям ДНК-белок в поврежденных клетках [Luxford et al., 2000; Gebicki, Gebicki, 1999].

До настоящего времени выполнено мало работ по индукции окисления липидов аминокислотными, пептидными или белковыми гидропероксидами, хотя в некоторых случаях показано, что образование гидропероксида белка может предшествовать окислению липидов. Поэтому возможно, что радикалы, образованные из гидропероксидов аминокислот, пептидов и белков, могут способствовать инициации окисления липидов [Giese et al., 2000].

Когда гидропероксиды генерировались *in situ* в клетках путем ограниченного фотоокисления, был обнаружен широкий спектр эффектов, которые могут возникнуть в результате прямых реакций переходных промежуточных соединений или пероксидов. Эти эффекты включали потерю GSH и общих тиолов, ингибирование множества Cys-зависимых ферментов

(например, ГАФДГ, тиоредоксина, протеинтирозинфосфатаз, креатинкиназы и катепсинов В и L), повышение уровней НАДФН и повышение активности глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы и тиоредоксинредуктазы. Каждый из этих ферментов связан с защитой от окислительных повреждений [Rahmanto et al., 2010б; Ланкин и др., 2017]. После прекращения освещения видимым светом в присутствии фотосенсибилизатора Rose Bengal (то есть во время распада гидропероксида) обнаружено ограниченное начальное восстановление уровней тиола по сравнению с концентрациями, обнаруженными сразу после прекращения освещения, но они уменьшались при дальнейшей инкубации. Также установлено увеличение активности ГАФДГ и протеинтирозинфосфатаз, наряду с заметным увеличением активности каспазы 3/7 и потерей жизнеспособности клеток. Эти наблюдения объясняли ограниченной репарацией и регенерацией, но, в конечном итоге, индукцией апоптоза [Rahmanto et al., 2010б].

Рассмотренные выше данные согласуются с тем, что белки считаются важнейшими участниками в окислительно-восстановительных реакциях. В отдельных случаях до 70 % исходного окислителя приводит к образованию гидропероксида. Данные значения могут быть недооценены из-за нестабильности этих соединений и проблем, связанных с быстрой и точной количественной оценкой. Высокие концентрации гидропероксидов могут также генерироваться $^1\text{O}_2$. Существующие результаты подтверждают то, что эти соединения могут присутствовать на микромолярном уровне или выше как в интактных клетках, так и в пораженных тканях, и что общая совокупная концентрация гидропероксидов, которым подвергались белки в пораженных тканях, может составлять, по меньшей мере, 400 мкмоль. Эти гидропероксиды могут быть долгоживущими в отсутствие других реагентов и легко обнаруживаются на изолированных белках, липопротеинах, в плазме, в клеточных лизатах и некоторых интактных клетках. Многие из этих гидропероксидов плохо удаляются хорошо зарекомендовавшими себя клеточными защитными системами, которые удаляют другие окислители, такие как H_2O_2 , в соответствии с их более длительным временем жизни по сравнению с H_2O_2 в интактных клетках. Эти соединения реагируют с различными

скоростями, в зависимости от их структуры и размера, с одно- и двухэлектронными восстановителями. Одноэлектронное восстановление приводит к появлению дополнительных радикалов, которые участвуют в реакциях окисления белковых цепей, расщепления белковой цепи и модификации боковых цепочек посредством сложной серии реакций отщепления водорода, переноса электрона, фрагментации и присоединения O_2 . Некоторые из них генерируют карбонилы и спирты, хорошо известные продукты окисления белков, которые накапливаются со временем в пораженных тканях. Межмолекулярные реакции гидропероксидных радикалов могут привести к повреждению ДНК, включая образование 8-оксогуанина, аддуктов белка-ДНК и поперечных сшивок, а также вызывать расщепление полинуклеотидной цепи. Двухэлектронные реакции происходят преимущественно с Cys, селеном и в меньшей степени с Met. Эти реакции часто бывают более быстрыми, чем с H_2O_2 , и могут привести к быстрой и эффективной инактивации множества клеточных ферментов, включая те, которые участвуют в регуляции содержания кальция, фосфорилировании, метаболизме энергии, апоптозе и обмене белков. Несмотря на полученные обширные сведения о белковых гидропероксидах и радикалах, необходимы дальнейшие исследования, чтобы понять роль этих распространенных интермедиатов в модификации и повреждении белков.

1.2. Пероксид водорода и его роль в клеточной сигнализации

В биологии и медицине пероксид водорода часто используется в качестве противомикробного агента, например, для очистки ран, из-за его сильных окислительных способностей, которые позволяют убивать микроорганизмы и клетки [Linley et al., 2012]. H_2O_2 играет центральную роль в гомеостазе, являясь ключевой молекулой в регуляции клеточного метаболизма. Пероксид водорода фактически признан одной из основных молекул в считывании, модуляции и передаче сигналов окислительно-восстановительного метаболизма, выступая в качестве основного вторичного мессенджера [Sies et al., 2017]. Вторичные мессенджеры, в свою очередь, активируют каскад сигнально-регуляторных белков посредством специфического окисления, что приводит к метаболическому ответу клетки. Мы можем обозначить этот процесс как окислительно-восстановительную сигнализацию [Lorenzen et al., 2017]. Один из основных биологических источников H_2O_2 – это дисмутация супероксид анион-радикалов ($O_2^{\bullet-}$), образующихся при частичном восстановлении кислорода во время аэробного дыхания или при помощи некоторых оксидаз, посредством супероксиддисмутаза, которые находятся в митохондриях, цитозоле или во внеклеточном пространстве [Veal et al., 2007]. Пероксид водорода диффундирует через клеточные мембраны с помощью аквапориновых водных каналов [Tong et al., 2019], передавая окислительно-восстановительный сигнал от места, где он возникает до функциональной мишени. H_2O_2 активирует несколько факторов транскрипции в бактериях, низших эукариотах и клетках млекопитающих [Marinho et al., 2014]. Эта активация в конечном итоге приводит к метаболическому ответу клетки на исходные стимулы. В данном разделе обобщены исследования роли H_2O_2 в сигнальных путях эукариотических клеток и передаче сигналов, приводящих к гомеостатическим или патологическим ответам.

1.2.1. Источники пероксида водорода

Окислительно-восстановительная сигнализация связана с путями передачи сигнала, которые происходят из-за связывания внутриклеточных или мембранных рецепторов со своими специфическими лигандами [Lennicke et al., 2015; Lorenzen et al., 2017]. Этот механизм может привести к активации специфических белков-мишеней, включая транскрипционные факторы, в ответ на физиологический окислительный стресс. H_2O_2 вовлечен во внутриклеточную передачу сигналов как медиатор некоторых физиологических процессов, таких как дифференцировка и пролиферация клеток, клеточный метаболизм, выживание и иммунный ответ. Благодаря этому пероксид водорода, обладающий как восстанавливающими, так и окислительными свойствами, классифицируется как вторичный мессенджер клеточного метаболизма [Holmström, Finkel, 2014].

Несколько реакций одно- или двухэлектронного восстановления могут выступать в качестве источников H_2O_2 , при этом основными являются НАДФН, оксидазы и митохондриальная дыхательная цепь [Sies et al., 2017]. В аэробных организмах источники $\text{O}_2^{\bullet -}$, дисмутация которых является основным источником образования пероксида водорода, существуют как во внеклеточном пространстве, так и в некоторых клеточных компартментах. Его продуцируют многие ферменты: в плазматической мембране или фагосомах (оксидаза), в митохондриях (комплекс I и III дыхательной цепи) или в эндоплазматическом ретикулуме (цитохром P450) [Lorenzen et al., 2017; Wang et al., 2018]. У млекопитающих один из основных процессов синтеза H_2O_2 представлен ферментативной реакцией, катализируемой СОД: $2\text{O}_2^{\bullet -} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$. Присутствие трех изоформ СОД поддерживает гомеостаз и координирует сигналы между клеточными компартментами. Эти изоформы взаимодействуют со специфическими кофакторами (ионами металлов) и имеют различную субклеточную локализацию: СОД1 расположена в цитоплазме, СОД2 - в митохондриях, тогда как СОД3 имеет внеклеточную локализацию [Miller, 2012].

В плазматической мембране с помощью НАДФН-оксидазы образуются АФК, которые затем участвуют во внутри- и внеклеточной передаче сигналов [Wang et al., 2018]. Представители семейства НАДФН-оксидаз представляют собой трансмембранные белки, сходные по своим свойствам с фагоцитирующими NOX2. Их наиболее важной функцией является перенос электронов через мембраны, превращая кислород в супероксид [Panday et al., 2015]. Молекулярный кислород, продуцируемый комплексом NOX2, может выделяться во внеклеточное пространство, где он превращается в H_2O_2 ферментом СОД3, или проникать через хлоридные каналы [Wang et al., 2018]. H_2O_2 также может пересекать клеточную мембрану посредством простой диффузии через аквапорины и, таким образом, участвует в различных сигнальных каскадах [Lennicke et al., 2015; Tong et al., 2019; Gunawardena et al., 2019].

1.2.2. H_2O_2 как молекулярный медиатор клеточной сигнализации

Наиболее важным механизмом, посредством которого молекула пероксида водорода действует в качестве медиатора клеточной передачи сигналов, является обратимое окисление определенных остатков цистеина (Cys). Этот процесс в основном включает те редокс-чувствительные белки, которые имеют метаболические регуляторные функции [Paulsen, Carroll, 2013]. Генерация АФК инициируется увеличением фосфорилирования тирозина (Tyr), которое обычно происходит, когда факторы роста (например, эпидермальный фактор роста или фактор роста тромбоцитов) связываются со своими рецепторами. В этом случае основными мишенями, участвующими в окислительно-восстановительной регуляции, являются протеин-тирозин фосфатазы, которые вместе с протеин-тирозин киназами поддерживают гомеостатический статус фосфорилирования Tyr для регуляции сигнальных событий в ответ на стимулы, опосредованные цитокинами и факторами роста [Woo et al., 2010]. Ферментативная активность

протеин-тирозин фосфатаз является относительно по отношению к консервативному реакционноспособному остатку Cys их активного сайта. У всех белков протеин-тирозин фосфатаз есть активный сайт с жизненно важным Cys, который существует в виде тиолат-аниона (Cys-S^-), чувствительного к окислению. Если Cys окисляется, то происходит инактивация протеин-тирозин фосфатаз. Обычно эта инактивация может быть отменена глутатионом (GSH), который действует в качестве восстанавливающего соединения, что позволяет регулировать сигнальный ответ [Lorenzen et al., 2017; Wang et al., 2018]. Инактивация протеин-тирозин фосфатаз смещает баланс в сторону активности тирозинкиназы с последующим увеличением стимулируемого лигандом фосфорилирования Tyr, при этом концентрация H_2O_2 для окисления остатка Cys должна возрасти [Miller, 2012; Holmström, Finkel, 2014; Wang et al., 2018]. Тиольные (RSH) группы Cys имеют различные окислительно-восстановительные состояния и, поскольку их реакционная способность может быть обусловлена белковым компонентом, они обладают селективностью в окислительно-восстановительной сигнализации [Wang et al., 2018]. В частности, содержание и положение Cys высоко консервативны, особенно потому, что он не так широко распространен в белках. Одними из ключевых факторов окислительной активности остатков Cys являются низкие значения pK_a , на которые влияет их ближайшее окружение. Реакционноспособные тиольные группы Cys существуют в виде тиолатного аниона (S^-) при физиологическом pH. Первая стадия H_2O_2 -опосредованного окисления Cys приводит к образованию сульфоната или сульфеновой кислоты (R-SOH). Это является обратимым окислительным состоянием, которое приводит к изменениям активности и конформации белка-мишени. Поскольку сульфеновая кислота является довольно реакционноспособной, возможно в присутствии соседнего тиола происходит другая реакция с образованием дисульфидной связи. Если сульфеновая кислота реагирует с белком тиолом или глутатионом, то может образовываться меж- или внутримолекулярный дисульфидный мостик или белок-S-GSH дисульфид соответственно [Paulsen, Carroll, 2013; Lennicke et al., 2015; Reczek, Chandel,

2015]. Данный механизм способен вызывать окисление белков-мишеней, инактивирующих ферменты-нейтрализаторы H_2O_2 . Локальное увеличение пероксида водорода позволяет ингибировать пероксиредоксины. Обратимая инактивация пероксиредоксина с помощью модификации сульффиновой (SO_2^-) кислоты делает возможным накопление эндогенного пероксида водорода, что способствует передаче сигнала [Reczek, Chandel, 2015]. При высоких концентрациях H_2O_2 , вследствие гипероксидирования $R-SOH$, образуются сульффиновые (RSO_2H), сульфокислоты (RSO_3H) или их анионы. Эти необратимые модификации являются показателями окислительного стресса.

1.2.3. Концентрация пероксида водорода в клетке

Концентрация H_2O_2 во внеклеточном и внутриклеточном пространстве имеет решающее значение для метаболизма и выживания клеток. Хотя точный диапазон может варьировать в зависимости от типа клеток, внутриклеточная гомеостатическая концентрация составляет приблизительно от 1 до 100 нМ H_2O_2 . При более высоких концентрациях могут быть активированы воспалительные реакции, остановка роста и гибель клеток [Sies et al., 2017]. Для поддержания гомеостатической концентрации АФК, которая зависит от баланса между образованием АФК и антиоксидантными системами, клетки разработали защитные механизмы, как ферментативные, так и неферментативные. Системы защиты ферментов от АФК включают в себя: три изоформы СОД (внеклеточную, цитозольную и митохондриальную), чья дисмутазная активность приводит к образованию H_2O_2 и воды; каталазу, которая в основном присутствует в пероксисомах; глутатионпероксидазы и пероксиредоксины. Каталаза осуществляет разложение H_2O_2 на H_2O и O_2 и модулирует свои эффекты в двух направлениях на основе клеточных концентраций H_2O_2 . Низкие концентрации пероксида водорода запускают пероксидатический путь, способствующий

окислению доноров водорода, таких как фенолы и спирты. И, наоборот, в присутствии высоких концентраций H_2O_2 каталитический путь (разложение пероксида водорода) является предпочтительным [Sepasi Tehrani H., Moosavi-Movahed, 2018]. Семейства пероксиредоксинов и глутатионпероксидаз расположены в различных клеточных компартментах. Это разное расположение необходимо для обеспечения того, чтобы в определенном месте клетки не происходило увеличения или накопления пероксида водорода. Глутатионпероксидаза является селенсодержащим ферментом, который осуществляет каталитическое восстановление H_2O_2 и пероксидов липидов до воды и спиртов липидов соответственно [Veal et al., 2007]. Пероксиредоксины и глутатионпероксидазы участвуют в механизме окисления или восстановления остатков Cys или селеноцистеина. Например, когда H_2O_2 реагирует с пероксиредоксином, может передавать окисление белку-мишени, такому как фосфатазы или факторы транскрипции [Netto, Antunes, 2016]. Более того, системы тиоредоксин / тиоредоксинредуктаза или глутатион / глутатионредуктаза взаимодействуют для того, чтобы сделать доступной активную и восстановленную форму пероксиредоксинов и глутатионпероксидаз, обеспечивая обратимость окислительно-восстановительных модификаций, полученных из H_2O_2 [Paulsen, Carroll, 2013]. Пероксиредоксины подразделяются на шесть представителей, которые имеют разные аминокислотные последовательности и, по меньшей мере, один Cys, который присутствует в активном сайте. Эти важные антиоксидантные ферменты расположены в нескольких клеточных компартментах, таких как мембрана, цитозоль, митохондрии, эндоплазматический ретикулум, ядро и пероксисомы [Lennicke et al., 2015; Netto, Antunes, 2016]. Другие системы детоксикации клеток от АФК – это неферментативные системы, которые включают некоторые молекулы с антиоксидантной активностью: витамин А (β -каротин), витамин Е (α -токоферол), витамин С (аскорбиновая кислота), урат, коэнзим Q и глутатион [Kanta, 2011].

1.2.4. Пероксид водорода и апоптоз

Как отмечено выше, клетки находятся в состоянии окислительно-восстановительного равновесия (гомеостаза) между окислительными и восстановительными процессами, которые происходят непрерывно во время сложных биохимических преобразований физиологического метаболизма. Нарушения в окислительно-восстановительном равновесии проявляются, когда свободные радикалы образуются в избытке или, снижается содержание антиоксидантных вещества или они становятся неэффективными, что приводит к окислительным повреждениям [Gaschler, Stockwell, 2017]. Высокие концентрации АФК, превышающие защитные системы клеток, связаны с так называемым окислительным дистрессом [Sies et al., 2017], играют ключевую роль в запрограммированной гибели клеток. Дисбаланс в отношении прооксидантного клеточного состояния вызывает как клеточные, так и субклеточные (например, в митохондриях) повреждения, клеточное старение и гибель клеток. Действительно, АФК, генерируемые в митохондриях, могут повреждать митохондриальную ДНК (мтДНК) и другие митохондриальные компоненты. Накопление окисляющих молекул вызывает окисление ДНК, липидов и белков, изменяя их роль и их физические свойства [Gaschler, Stockwell, 2017]. Наряду с ролью пероксида водорода в регуляции клеточного роста, пролиферации и эндотелиальных воспалительных реакций он также координирует эндотелиальный апоптоз. H_2O_2 может быть либо детоксифицирован антиоксидантами, либо генерировать гидроксильный радикал ($\cdot OH$) по реакции Фентона. $\cdot OH$ вызывает повреждение клеточных белков, липидов и нуклеиновых кислот, что на следующем этапе приводит к апоптозу [Redza-Dutordoir, Averill-Bates, 2016]. Пероксид водорода также может вызывать аутофагию, которая является процессом деградации лизосом [Gibson, 2013]. Временное воздействие H_2O_2 запускает апоптоз через митохондриальный путь: гиперполяризация митохондриальной мембраны приводит к митохондриальной транслокации Bax и Bad (проапоптотических

белков, которые управляют проницаемостью наружной митохондриальной мембраны) с высвобождением цитохрома С из митохондрий. Значительное снижение митохондриальной концентрации цитохрома С еще больше увеличивает выработку АФК из-за разрыва цепи переноса электронов. С другой стороны, значительное увеличение концентрации цитохрома С в цитозоле индуцирует каспазо-9-опосредованную активацию каспазы-3 и окончательное завершение апоптотического процесса [Redza-Dutordoir, Averill-Bates, 2016; Xiang et al., 2016].

Каспазы принадлежат к высококонсервативному семейству Cys-зависимых аспартат-протеаз, участвующих в путях передачи сигналов апоптоза. В частности, каспаза-2 несмотря на то, что находится в цитозоле, обладает определенной последовательностью аминокислот (сигналом ядерной локализации), обеспечивающей ее транспорт в ядро. Активация каспазы-2 зависит от событий, связанных с окислительным стрессом, таких как стресс эндоплазматического ретикулума, повреждение ДНК и воздействие H_2O_2 . Было высказано предположение, что каспаза-2 может быть связана с p53-индуцибельным доменсодержащим белком смерти (PIDD) и адапторной молекулой RIP-ассоциированного гомологичного белка ICH-1 с доменом смерти (RAIDD), чтобы образовать комплекс PIDDosome. Последний важен для активации и процессинга каспазы-2 в ответ на повреждение ДНК: этот путь связывает каспазу-2 с p53-опосредованной гибелью клеток [Redza-Dutordoir, Averill-Bates, 2016]. Проокислительная активность p53 приводит к ингибированию экспрессии антиоксидантных генов, вызывая увеличение окислительного клеточного стресса с последующим апоптозом. Это ингибирование в основном касается экспрессии СОД2 и Nrf2 с последующей индукцией апоптоза [Faraonio et al., 2006]. Кроме того, положительная регуляция, вызванная p53 Mn-СОД и глутатионпероксидазой, увеличивает окислительный стресс и апоптоз, подтверждая, что баланс между антиоксидантным ферментом и окислительным стрессом является фундаментальным для выживания клеток [Liu, Xu, 2011]. Тем не менее, апоптоз, вызванный АФК, требует поддержки некоторых путей

передачи сигналов гибели клеток. Поскольку клеточные компоненты, которые наиболее активно реагируют на окислительный стресс, генерируемый АФК, являются членами семейства митоген-активируемых протеинкиназ. В частности, клеточными путями, которые отвечают на окислительный стресс, являются внеклеточные регулируемые сигналом киназы (ERK1/2), c-Jun N-терминальные киназы (JNKs) и p38-киназа. Семейство ERK участвует в ответе на факторы роста (например, пролиферацию, дифференцировку), но также может активироваться в ответ на АФК. Вместо этого, JNKs и p38 киназы в основном вовлечены при клеточном стрессе и активируются H_2O_2 в клетках гладких мышц [Guyton et al., 1996].

1.2.5. H_2O_2 , бактерии и иммунные клетки

АФК строго контролируются антиоксидантными клеточными системами, чтобы предотвратить окислительный стресс и избежать окислительного повреждения, приводящего к гибели клеток или дисфункции белков. По этой причине важно регулирование клеточных прооксидантных / антиоксидантных систем для облегчения воспалительного состояния. Одна из важных ролей пероксида водорода заключается в том, чтобы действовать как антимикробный агент. Клеточные ферменты, которые продуцируют H_2O_2 , включают семейство НАДФН-оксидаз [Wittmann et al., 2012; van der Vliet, Janssen-Heininger, 2014; Burtenshaw et al., 2017]. Взаимодействие бактерий с пероксидом водорода является сложным, поскольку оно может привести к выработке бактериями H_2O_2 и ферментов, которые выводят токсины. Бактерии нуждаются в тесном взаимодействии с плазматической мембраной клетки-мишени, чтобы воздействовать на белки хозяина и проникать в эукариотические клетки. Взаимодействие бактерий с апикальной клеточной мембраной активирует Толл-подобные рецепторы, которые стимулируют генерацию внеклеточных градиентов

H_2O_2 . Этот механизм приводит к выработке гипотиоциановой кислоты (HOSCN) миелопероксидазой или лактопероксидазой, которая катализируют окисление тиоцианата (SCN^-). Гипотиоциановая кислота, мощное антимикробное соединение, соотносится с гипогалогенными кислотами (например, хлорноватистой кислотой, HOCl и гипобромной кислотой, HOBr), которые вырабатываются во время респираторного взрыва, определяемого как высокое увеличение потребности в кислороде и потребления энергии на клеточном уровне, и вместе с другими иммунными процессами действуют, чтобы остановить распространение патогенов [Chandler, Day, 2015]. Полученные из DUOX градиенты H_2O_2 на люминальной поверхности просвета удаляют бактерии с эпителия и предотвращают инфекционный процесс, поскольку бактерии проявляют отрицательный хемотаксис в градиентах пероксида водорода [van der Vliet, Janssen-Heininger, 2014]. Механизм, посредством которого H_2O_2 вызывает негативный процесс хемотаксиса, может включать активацию внутриклеточной окислительно-восстановительной передачи сигналов (например, активация EGFR / ERK), транскрипционный ядерный фактор (NF- κB), который регулирует несколько генов, участвующих в воспалении, а также окислительные модификации Cys бактериальных белков, ответственных за хемотаксический процесс. Кроме того, полученный из DUOX H_2O_2 направляет нейтрофилы в поврежденную область, тем самым увеличивая высвобождение интерлейкина-8 [van der Vliet, Janssen-Heininger, 2014].

Клетки, которые в основном участвуют в высвобождении АФК во время воспалительного процесса или восстановления тканей, – это нейтрофилы, макрофаги / моноциты и дендритные клетки. Нейтрофилы – это фагоцитарные лейкоциты, действующие как эффекторы врожденной иммунной системы: они привлекаются в место инфекции или воспаления для устранения патогенов и чужеродных веществ в процессе фагоцитоза, во время которого высвобождаются протеолитические ферменты и АФК. Эти клетки поддерживают тесный контакт с естественными киллерами и дендритными клетками, а также В-клетками и Т-клетками [Belikov et al., 2015]. Т-клетки часто обнаруживаются рядом с

фагоцитирующими клетками, которые выделяют АФК во время респираторного взрыва, при этом H_2O_2 является наиболее вовлеченной АФК в этом механизме. H_2O_2 высвобождается НАДФН-оксидазой 2 фагоцитов, а затем способен окислять -SH-группы Т-лимфоцитов. Активированные фагоциты, а также дендритные клетки продуцируют цистеин, которое захватывается Т-клеткой и затем превращается в глутатион. Последний поддерживает тиоловые группы на поверхности Т-клетки в восстановленном состоянии и нейтрализует H_2O_2 внутри клетки, обеспечивая синтез ДНК. Рецептор Т-лимфоцитов (TCR) расположен на поверхности Т-лимфоцитов и отвечает за распознавание антигенов, представленных основным комплексом гистосовместимости (МНС). Связь между TCR и комплексом МНС-антиген приводит к активации Т-лимфоцитов и секреции тиоредоксина из Т-лимфоцитов, дендритных клеток и регуляторных Т-клеток. Основная роль тиоредоксина состоит в том, чтобы поддерживать тиолы, присутствующие на поверхности, в восстановленном состоянии [Belikov et al., 2015].

1.2.6. H_2O_2 и воспаление

Пероксид водорода действует как сигнальная молекула и вторичный мессенджер также и при воспалительном процессе. Воспалительный ответ характеризуется различными медиаторами и определенными типами клеток, которые способствуют поддержанию целостности и функции тканей. Врожденная иммунная система состоит из специализированных клеток, которые вырабатывают цитокины в ответ на различные воспалительные стимулы. Выработка провоспалительных цитокинов является важным требованием для активации клеток адаптивной иммунной системы, таких как Т- и В-лимфоциты. Воспаленные ткани связаны с высоким уровнем АФК, образующихся во время респираторного взрыва из иммунных клеток, играющих важную роль в

антимикробной защите [Wittmann et al., 2012; van der Vliet, Janssen-Heininger, 2014]. Несколько биологически активных провоспалительных медиаторов стимулируют выработку АФК нейтрофилами, макрофагами и дендритными клетками, которые достигают места воспаления, чтобы начать процесс восстановления тканей и предотвратить атаку патогенов на поврежденную область. Во время воспаления и повреждения ткани АФК могут взаимодействовать с белками, липидами, углеводами, нуклеиновыми кислотами и другими метаболитами, чтобы смягчить воспалительный ответ, обеспечивающий клеточную передачу сигналов [Lei et al., 2015]. Во время воспалительного процесса высвобождаются специализированные сигналы повреждения, что позволяет активировать важные пути, которые приводят к транскрипции генов, участвующих в воспалении и раневой реакции. Эти сигналы «чувствуются» как потенциально вредные (дистресс-ассоциированные молекулярные паттерны (ДАМП)) и часто являются компонентами одного и того же патогена, или они могут быть молекулами, которые высвобождаются из поврежденных клеток. Клетка, которая получает эти сигналы, активирует различные типы рецепторов и, следовательно, транскрипционный фактор NF-κB, митоген-активируемую протеинкиназу или сигнальные пути интерферона типа I, которые важны для воспалительных и антимикробных реакций [Wittmann et al., 2012; van der Vliet, Janssen-Heininger, 2014].

1.2.7. H_2O_2 и контроль экспрессии генов

Пероксид водорода, выступая в качестве вторичного мессенджера в окислительно-восстановительном метаболизме, способен активировать реакцию клеток на различные раздражители (например, связывание факторов роста с их рецепторами или апоптотическая гибель клеток). Действие H_2O_2 как молекулы-мессенджера также влияет на транскрипцию ряда генов клеток. Фактически,

редокс-чувствительные факторы транскрипции, такие как NF-κB и Nrf2, считаются редокс-сигнальными мишенями, которые на следующем этапе способны регулировать многие клеточные функции.

NF-κB является регуляторным фактором, участвующим в воспалении, врожденном и адаптивном иммунном ответе, вирусной инфекции, пролиферации и апоптозе [Marinho et al., 2014]. Факторы транскрипции Rel/NF-κB состоят из нескольких белков, которые содержат домен гомологии Rel-1 (RHD), который обеспечивает димеризацию, распознавание и связывание с ДНК. Кроме того, Rel/NF-κB содержит сигнал ядерной локализации, который взаимодействует с ингибирующими белками IκBs, регулируются и экспрессируются тканеспецифическим образом [Karin, 1999]. Окисление цитозольным пероксидом водорода приводит к диссоциации комплекса NF-κB / IκB, так что NF-κB может транслоцироваться в ядро. Кроме того, NF-κB обладает ДНК-связывающей субъединицей с редокс-чувствительными остатками Cys. Активности NF-κB способствует ядерный тиоредоксин-1 (Trx1), участвующий во многих клеточных процессах, включая восстановление окислительно поврежденных белков, фолдинг белков и окислительно-восстановительный гомеостаз. С другой стороны, активность NF-κB ингибируется повышенным ядерным образованием H₂O₂ [Sies et al., 2017].

Другим важным фактором транскрипции является Nrf2, регулятор тех генов, которые кодируют антиоксидантные и детоксифицирующие ферменты в ответ на окислительный стресс. В физиологических условиях белок Keap1 изолирует Nrf2 в цитоплазме. Таким образом, последний не может транслоцироваться в ядро, и его транскрипционная активность подавляется. В этом состоянии Nrf2 может разлагаться двумя путями: быстро (протеасома) или медленно (ядро) [Kobayashi et al., 2004]. Во время окислительного стресса присутствие H₂O₂ приводит к диссоциации комплекса Nrf2/Keap1, и специфические цистеинильные остатки Keap1 модифицируются. Это изменение приводит к тому, что Keap1 теряет способность сдерживать Nrf2: последний

транслоцируется в ядро, что индуцирует экспрессию генов-мишеней, вызывая антиоксидантную сигнализацию [Sies et al., 2017].

Глутатионредуктазы и тиоредоксинредуктазы являются ферментативными системами, способными поддерживать стабильность комплексов Nrf2/Keap1 и NF-κB/IκB. В связи с этим селенопротеин тиоредоксинредуктаза 1 (TrxR1) считается мощным регулятором Nrf2: TrxR1 взаимодействует с Keap1 в обнаружении окислительного стресса и модуляции соответствующих Nrf2-зависимых ответов [Cebula et al., 2015; Sies et al., 2017].

Таким образом, пероксид водорода является центральным звеном в окислительно-восстановительной передаче сигналов в клетках, где он может способствовать гомеостатическому метаболизму или токсическому ответу и повреждениям на основе клеточной локализации, концентрации и восходящих / нисходящих интеракторов. Клетки имеют несколько систем в качестве источника H_2O_2 , но одновременно они также содержат антиоксиданты для строгого контроля его концентрации в различных субклеточных компартментах.

1.3. Влияние видимого света на биологические объекты

1.3.1. Роль света в жизни биологических объектов

Видимый свет – это электромагнитное излучение с длинами волн 380-780 нм и энергиями кванта 1,6-3,2 эВ, воспринимаемое человеческим глазом. Видимый свет очень важен для существования жизни на Земле, для большинства экологических сообществ он является основным источником энергии [Walter, 2003]. Исключением, пожалуй, являются только глубоководные сообщества «черных курильщиков», не способные использовать энергию солнечного излучения и живущие за счет энергии химических соединений, выделяемых на разломах литосферных плит [Weissetal., 2016]. Превращение энергии квантов света в энергию химических связей происходит в процессе фотосинтеза, для этого высшим растениям преимущественно необходим свет с длиной волны 680 и 700 нм, хотя встречаются и исключения [Powles, 1984]. Если рассматривать всю живую природу, то с участием света протекают такие важнейшие процессы, как, фототаксис, фототропизм, фотопериодизм, циркадные ритмы и зрение. Фототаксис характерен в основном для микроорганизмов и растений, выражается в направленном движении по градиенту освещенности [Jekely et al., 2008]. Фототропизм проявляется в изменении направления роста органов растений или положения тела/органов у животных, в зависимости от направления падающего света [Reinert, 1959]. Под фотопериодизмом обычно понимают реакции живых организмов на суточный ритм освещённости – продолжительность светового дня или соотношение между темным и светлым временем суток. Под действием реакции фотопериодизма растения переходят от вегетативного роста к зацветанию, у животных фототропизм регулирует начало брачного периода и перелета у ряда птиц, линьки и зимней спячки у некоторых млекопитающих [Bradshaw, Holzapfel, 2007]. Циркадные ритмы – это циклические колебания

интенсивности разных биологических процессов, связанные со сменой дня и ночи [Saper et al., 2005]. Циркадные ритмы имеют эндогенное происхождение (биологические часы), воздействие света производит лишь их подстройку [Millar, 2016]. Наиболее важным для человека является зрение – физиологический процесс восприятия, источником которого является свет, излучаемый или отражаемый от окружающих нас предметов. Живые объекты могут не только улавливать изменения условий освещенности, но и сами генерировать свет, этот процесс называется биолюминесценцией [Wilson, Hastings, 1998]. Обычно в основе биолюминесценции лежат химические реакции, в которых излишки энергии выделяются в виде квантов света. Известно, что биолюминесценция нужна для привлечения добычи или партнеров, коммуникации и отпугивания хищников. Функция биолюминесценции для многих светящихся организмов до конца не изучена.

1.3.3. Влияние света на физиологические реакции человека

В настоящее время хорошо известно влияние цвета, интенсивности и длительности светового потока на эмоциональное состояние человека. Это психофизиологические явления всегда начинаются с визуального контакта глазами и осмысления. Например, одни цвета нам кажутся теплыми, а другие – холодными. Ярко-красный цвет у большинства людей увеличивает частоту пульса, дыхания, артериальное давление и в целом действует возбуждающе, зеленый наоборот действует освежающе, успокаивающе [Киселева, Кулганов, 2014].

Другим типом физиологических эффектов видимого света являются системные кооперативные эффекты, связанные с воздействием видимого света на какой-либо орган или ткань. В большинстве подобных исследований наблюдаются незначительные (обычно не более 20–30%) эффекты, при этом неизвестна первичная мишень, получаемые данные часто являются противоречивыми и не

имеют физико-химического объяснения. Большинство авторов сходятся во мнении, что кванты синего света обладают цитостатическим и бактерицидным действием, а красного цвета – активируют клеточную репарацию и способствуют восстановлению клеток.

Показано, что под действием видимого света с длиной волны 650 нм на кожу лица наблюдаются уменьшение растяжимости, повышение упругих свойств кожи [Кириянова и др., 2012]. Семидневный курс облучения красным модулированным светом полости рта приводит при хроническом пародонтите к полной ремиссии в 100 % случаев [Беленова, Кобзева, 2014].

Светодиодное излучение красной части спектра оказывает анальгетическое действие при синдроме жжения полости рта [Борисова, 2012]. Светодиодное излучение в красной части спектра положительно влияет на ряд основных показателей при лечении инфицированных кожно-мышечных ран [Ермолаев и др., 2015]. Много аналогичных данных получено в лабораторных экспериментах на животных, так известно о стимулирующем воздействии низкоинтенсивного красного света на сократительную активность изолированного сердца крысы после ишемии [Monich et al., 2011]. Установлено, что воздействие на проекционную область сердца и легких низкоинтенсивным широкополосным красным светом нормализует процессы свободнорадикального окисления белков не только в ткани легких, но и сыворотке крови крыс, подвергнутых гамма-облучению [Баврина и др., 2018]. Исследована дозовая зависимость *in vitro* эффектов низкоинтенсивного лазерного излучения на функциональную активность перитонеальных макрофагов и лимфоцитов селезенки мышей. Если время облучения клеток не превышало 60 с, наблюдали стимуляцию секреторной активности клеток, что выражалось в росте продукции интерлейкина 2, интерферона γ и интерлейкина 6 в лимфоцитах, фактора некроза опухолей- α , оксида азота и интерлейкина 6 в макрофагах и повышении активности естественных киллерных клеток [Черенков и др., 2005; Новоселова и др., 2006]. Низкоинтенсивный лазерный свет индуцировал активность иммунных клеток, когда продолжительность воздействия не превышала 10 дней, тогда как

длительный период лечения вызывал более серьезные изменения в иммунной системе, вплоть до иммуносупрессии [Novoselova et al., 2006].

1.3.4. Влияние света на микрофлору человека

Как отмечалось выше, кванты синего света обладают цитостатическим и бактерицидным действием. Свет синей части спектра способен инактивировать бактерии *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* [Enwemeka et al., 2008], *Porphyromonas gingivalis* [Kotoku et al., 2009], *Propionibacterium acnes* [Ashkenazi et al., 2003], *Staphylococcus epidermidis* [Tuchina, Tuchin, 2009], *Pseudomonas aeruginosa* [Sailer et al., 1997] и других. Способность синего света инактивировать патогенные и условно-патогенные бактерии активно используется при сопутствующей терапии ЛОР заболеваний [Карандашов, 2013] и лечении ран и язв, а также поражений кожи [Gold et al., 2005]. Изучено бактерицидное действие лазерного излучения с помощью системы передачи на основе кварцевого волокна с конвертером с сильным поглощающим покрытием против бактерий, связанных с урологическими камнями [Elagin et al., 2018].

Интересно, что для многих микроорганизмов, синтезирующих аналоги порфиринов, видимый свет красной части спектра также может оказывать ингибирующее действие. Лактобактерии, составляющие значительную часть микрофлоры кишечника, под действием красного света начинают интенсивно расти и размножаться. На основе этого эффекта разработана методика лечения дисбактериоза с помощью «фотонной» таблетки [Дирин и др., 2000]. «Фотонная» таблетка – это небольшая капсула длиной 22 мм и 11 мм в диаметре, внутри капсулы расположены светодиодные источники света, генератор электрических импульсов и источник питания. Клинические исследования показали эффективность «фотонной» таблетки при коррекции дисбактериоза кишечника [Naumov et al., 2000]. Эксперименты *in vitro* другой группы ученых показали, что

при облучении культуры лактобактерий лазером (с длиной волны 0,65 мкм) количество колоний лактобактерий в опыте по сравнению с контролем может достоверно возрасти в 1,3 раза [Чухрай и др., 2012]. Следует помнить, что стимулирующий эффект красного света наблюдается лишь при невысоких интенсивностях, так показано, что при лазерном облучении бактерий (632,8 нм) и энергетической экспозиции $2,5 \text{ Дж/см}^2$ наблюдается стимуляция роста и размножения, тогда как при энергетической экспозиции 10 Дж/см^2 происходит ингибирование жизненных функций [Монич и др., 2010]. В свете выше представленного, представляется перспективным продолжать разработки по фотобиомодуляции микробиоты человека и растений, причем уделять внимание разработке методов и приборов неинвазивного облучения.

1.3.5. Использование световых воздействий в диагностике и терапии

В настоящее время в медицинской диагностике используется большое количество фотокалориметрических, флуоресцентных и турбодиметрических (рассеяние) методов. Основными измеряемыми единицами при использовании этих методов является оптическое поглощение, интенсивность флуоресценции, рассеяние и даже смещение спектра при лазерной доплеровской флуориметрии. Кроме диагностики свет используют также в терапии крайне широко от физиотерапевтических процедур до лечения онкологических заболеваний [Loschenov et al., 2000].

Фотодинамическая терапия (ФДТ) – метод лечения онкологических заболеваний, ряда заболеваний кожи и некоторых инфекционных болезней [Филоненко, Серова, 2016]. Метод основан на применении светочувствительных лекарственных препаратов – фотосенсибилизаторов [Галкин и др., 2016]. Классическими фотосенсибилизаторами являются производные порфиринов и родственные им гетероароматические структуры. Такие фотосенсибилизаторы

способны избирательно накапливаться в высоко пролиферативных тканях, в том числе опухолевых, а также в некоторых микроорганизмах [Isenberg, 1964]. При действии на фотосенсибилизаторы видимым светом, с длинами волн, соответствующими их максимуму поглощения, в водных растворах, насыщенных молекулярным кислородом, наблюдается спин-конверсионная фотохимическая реакция, основным продуктом которой является высокореакционный синглетный кислород [Zhou et al., 2016]. В биологических тканях и жидкостях за счет восстановления и протонирования синглетный кислород способен превращаться в большинство из известных активных форм кислорода [Gudkov et al., 2011]. В качестве источника света обычно используются лазерные установки, позволяющие излучать монохроматичный свет высокой интенсивности. Основными преимуществами ФДТ являются избирательность действия и хорошая переносимость организмом человека. Благодаря этим преимуществам и прогрессу, достигнутому в физике [Banerjee et al., 2016], ФДТ каждый год применяется для лечения все новых и новых заболеваний. Сегодня фотодинамическая терапия применяется в гнойной хирургии, в эндокринологии, в ортопедии, в офтальмологии, в оториноларингологии, папилломавирусной инфекции, первичном и рецидивном раке кожи, при раннем центральном раке легкого, при стенозирующих злокачественных новообразованиях дыхательных путей, при первичном и метастатическом поражении плевры, при раннем раке пищевода и желудка, при метастатическом поражении брюшины, при поверхностном раке мочевого пузыря, при раннем раке шейки матки, при интраэпителиальных неоплазиях и начальном раке вульвы [Филоненко, Серова, 2016].

В настоящее время активно развивается течение альтернативное фотодинамической терапии – светоопосредованная терапия и диагностика. Метод основан на применении светочувствительных лекарственных препаратов, состоящих из молекулы действующего вещества и молекулы переносчика. Функция молекулы переносчика избирательно накапливаться в высокопролиферативных тканях, функция действующего вещества может быть

любая. Находясь в комплексе с молекулой переносчиком, действующее вещество является неактивным. Молекулы переносчика устроены таким образом, что при возбуждении их видимым светом они высвобождают действующее вещество, которое тут же становится активным. В настоящее время для фотоопосредованной терапии в качестве молекул переносчиков используют производные кобаламина (витамина B_{12}) [Shell, Lawrence, 2015] и тритиокарбоната [McKenzie et al., 2015]. Вещества группы витамина B_{12} наиболее удобны, поскольку связь между аксиальным заместителем и кобальтом является довольно слабой (< 30 ккал/моль). Видимый свет в диапазоне 330-560 нм возбуждает коринное кольцо (аналог тетрапорфиринового кольца) и вызывает разрыв связи с аксиальным заместителем. В качестве такого заместителя могут быть противоопухолевые препараты, флуорофоры и т. д. С помощью одних можно проводить терапию, с помощью других диагностику.

Кроме гетероароматических структур в фотоопосредованной терапии используют комплексные соединения некоторых переходных металлов, таких как рутений (Ru) [Leonidova et al., 2014]. Удачным фототерапевтическим агентом оказался $(Ru(tpy)(5CNU)_3)^{2+}$, который высвобождает при действии света 5-цианоуридин (5CNU), который ингибирует синтез пиримидиновых нуклеозидов и репликацию ДНК [(Sgambellone et al., 2013]. Не менее удачными оказались комплексы рутения с полипиридилем [Howerton et al., 2012].

Кроме низкомолекулярных молекул переносчиков в фотоопосредованной терапии предполагается применение различных типов функционализированных наноструктур [Griepenburg et al., 2015]. Ярким примером является использование в качестве переносчиков в фотоопосредованной терапии двухслойных нанотрубок из TiO_2 . Триггерами, запускающимися от видимого света, являются гидрофобные «колпачки» на концах нанотрубки, представляющие собой наночастицы золота. Данные трубки можно снарядить любым препаратом, заткнуть концы, а потом высвободить в нужном месте [Xu et al., 2016]. Есть удачные примеры создания наночастиц для фотоопосредованной терапии с применением плазмонного резонанса [Luo et al., 2011].

Оптические методы активно используются не только в медицине, но и в сельском хозяйстве [Белов и др., 2012]. Более того, по изменению уровней флуоресценции листьев, стебля, накоплению определенных металлов можно эффективно диагностировать большое количество фитопатогенных организмов [Суров и др., 2015]. Фототерапия, которая используется для лечения людей, может пригодиться и для лечения растений. Известны работы, в которых уже сейчас применяются оптические методы лечения растений. Патологическое состояние растений, причиной которых стали возбудители фунгальной, бактериальной природы, в настоящее время вполне могут контролироваться оптическими воздействиями [Bornstein et al., 2009]. В последние десятилетия проблема контроля встает достаточно остро, так как стремительно растет число инвазий [Серая и др., 2015] и ранее неопределяемых нозологий [Glinushkin et al., 2016].

Таким образом, оптические методы диагностики и терапии интенсивно применяются в медицине. Сегодня силы исследователей направлены на создание технологий, совмещающих вместе способность к диагностике и терапии. Данный подход получил название тераностика – подход, заключающийся в комплексном решении терапевтических и диагностических проблем, путем создания препаратов (в том числе для безопасных типов продукции) [Семенов и др., 2016], которые являются одновременно и терапевтическим агентом, и средством ранней диагностики [Gudkov et al., 2016]. Современный уровень медицины еще не реализовал все богатство методического арсенала физики, химии и биологии, хотя для некоторых задач необходимы новые идеи и подходы. В ветеринарии и растениеводстве необходимо активно переносить методы диагностики и терапии из медицины, а также разрабатывать новые методы, учитывающие специфику этих направлений.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

В данном исследовании были использованы различные реактивы и материалы: сыворотка крупного рогатого скота (Innova, Австралия), кумарин-3-карбоновая кислота (ККК), пероксидаза хрена, желатин, бычий сывороточный альбумин (БСА), казеин и гидролизат казеина (ГК), СОД, тирон, 7-ОН-кумарин-3-карбоновая кислота (7-ОН-ККК) (Sigma, США), БГГ (Serva, Германия), фосфат натрия, моно- и двухосновной ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ и $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$) (Amresco, США), хлорид натрия (NaCl) (Solvey, Франция), люминол (AppliChem, Германия), 4-йодфенол, H_2O_2 , азид натрия (NaN_3) (Химмед, Россия), 99,9 % D_2O (Изотоп, Россия). Все вещества использовались без дополнительной очистки. Свежеперегнанная бидистиллированная вода имела pH 5,8 и проводимость 120 мкСм/м. Для изменения концентрации кислорода в растворе применялся 99,5 % O_2 и 99 % Ar.

2.2. Методы

2.2.1. Воздействие тепла и оптического электромагнитного излучения

В качестве источника оптического излучения использовали газовый лазер ЛГН-208А (Россия) (632,8 нм) (1,7 мВт, 0,7 мВт/мм²). Белковые растворы в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) (10 мМ Na_2HPO_4 и 150 мМ NaCl, pH 7,4) облучали в стеклянных флаконах, обернутых алюминиевой фольгой. В ряде экспериментов использовался когерентный диод с длиной волны 650 нм (2 мВт,

плотность потока 1 мВт/мм²). В некоторых опытах использовали узкополосные интерференционные светофильтры с максимумами пропускания 627,8 нм и 662,9 нм. Спектральные характеристики световых потоков измеряли с помощью автоматизированного комплекса МДР-41 в диапазоне 200-1000 нм. Образцы нагревали с помощью жидкостного ультратермостата U-10 (Prüfgeräte-Werk Medingen, Германия) точностью до $\pm 0,1$ градуса. В большинстве экспериментов измерение интенсивности ХЛ проводилось через 60 минут после исследованных воздействий.

2.2.2. Долгоживущие активные формы белков

Образование ДАФБ исследовали с помощью люминесценции растворов сыворотки крови и белков, вызванной воздействием тепла (2 ч при температурах 35–50 °С) или He-Ne излучением лазера с применением хемилюминометра Биотокс высокой чувствительности (Россия). После нагрева или облучения исследуемые образцы в течение 0,5 ч находились в темноте при обычной комнатной температуре помещения. Далее хемилюминесценция образцов измерялась в специальных 20-миллилитровых флаконах из пластика (США). За счет этого чувствительность данного метода повышена примерно в 200 раз [Bruskov et al., 2012]. В контрольных экспериментах показано, что добавление экзогенного пероксида водорода (до 10 мкМ) не оказывает существенного воздействия на интенсивность ХЛ белковых растворов. Эксперименты с добавлением каталазы, иммобилизованной на синтетической подложке, которая удаляет H₂O₂ из раствора, также подтвердили это наблюдение.

2.2.3. Измерение генерации пероксида водорода

Генерацию пероксида водорода, вызываемую долгоживущими активными формами белков в исследуемых растворах при нагревании или воздействии лазерного излучения, измеряли с помощью усиленной хемилюминесценции. Перед началом каждого эксперимента готовился счетный раствор: 0,5 М Трис-НСl pH=8,5, 2 мМ пара-йодфенол, 5 мМ люминол в соотношении 10:3:1 соответственно и пероксидаза хрена. Все измерения проводили на модифицированном жидкостном счетчике, предназначенном для регистрации β -излучения. Данный метод обладает очень большой чувствительностью, что делает возможным измерение концентрации H_2O_2 в 100 пикомоль [Gudkov et al., 2019]. Сначала делали измерения с определенной концентрацией H_2O_2 для каждого раствора, затем измеряли интенсивность люминесценции опытных образцов и далее по калибровке высчитывали значение содержания пероксида водорода.

2.2.4. Измерение продукции гидроксильных радикалов

В качестве детектора ОН-радикалов применялась кумарин-3-карбоновая кислота (ККК). Основным флуоресцентным соединением, которое образуется в результате реакции $\cdot OH$ с ККК, считается 7-гидрокси-ККК. Интенсивность излучения пропорциональна количеству флуоресцентного продукта, то есть степени гидроксирования. Метод ККК/7-ОН-ККК обнаружения ОН-радикалов является высокочувствительным, специфичным, воспроизводимым и, следовательно, точным. Флуоресцентный анализ проводили на спектрофлуориметре при длине волны возбуждения 400 нм и длине волны испускания 450 нм [Manevich et al., 1997].

2.2.5. Измерение содержания кислорода в растворах белков и сыворотки крови

Насыщение исследуемых растворов газами (O_2 или Ar) осуществляли с помощью барботирования на протяжении 15 минут. Измерение концентрации растворенного кислорода проводили с помощью анализатора жидкости Эксперт-001.

2.2.6. Микроядерный тест

Микроядерный анализ создан главным образом для выявления химических соединений, которые способны разрушать хромосомы. Вещества исследуют обычно на мелких млекопитающих и готовят мазки костного мозга. Данный метод был разработан и внедрен швейцарским ученым Вернером Шмидом с коллегами. Микроядерный тест очень пригоден для повседневного токсикологического скрининга, так как является высокочувствительным, точным и гораздо более простым, и быстрым по сравнению с хромосомным анализом.

Метод основан на отставании ацентрических хроматид и хромосомных фрагментов в анафазе. Далее в телофазе происходит образование дочерних ядер, но значительная часть отстающих элементов превращается в микроядро. В препаратах костного мозга животных при воздействии веществ, которые повреждают хромосомы, микроядра выявляются в большинстве клеток в результате мутагенного митоза. Основная масса микроядер находится в молодых эритроцитах. Спустя некоторое время после окончания последнего митоза эритробласты вытесняют ядро, а микроядра остаются в цитоплазме молодого эритроцита. Еще одним преимуществом микроядерного теста оказывается окрашивание молодых эритроцитов с синим оттенком, а не красным цветом как у зрелых форм, то есть они являются полихроматофильными.

Обычно микроядра имеют округлую форму и диаметром около 0,05-0,2 диаметра эритроцита (иногда встречается несколько микроядер в одной клетке). Отдельная ценность данного метода состоит в быстром сравнении полученных результатов для разных видов млекопитающих.

Для микроядерного анализа не характерны проблемы, связанные с очень маленьким количеством клеток, поскольку количество полихроматофильных эритроцитов можно сказать неограниченно. Самопроизвольное образование микроядер является стабильным и довольно низким (около 3 на 1000 клеток). Это позволяет проводить качественные исследования с весьма небольшими дозами разнообразных мутагенных факторов.

Сыворотку крови вводили мышам внутривенно в конечной концентрации 5 мг/г. Одновременно облучали по 5 животных в стеклянном стакане на специальной установке РУТ-15 (15 мА, 200 кВ), мощность дозы составляла 1 грэй в минуту. Генотоксические повреждения оценивали по количеству микроядер в полихроматофильных эритроцитах. Через некоторое время (около 28 ч) после воздействия ионизирующей радиации мышей забивали с помощью такого физического метода эвтаназии, как цервикальная дислокация. Подготовку и окрашивание мазков красного костного мозга производили по обычной методике [Asadullina et al., 2010]. Анализ и подсчет 2000 полихроматофильных эритроцитов на 1 животное, а также выявление и подсчет микроядер осуществляли на световом микроскопе при большом увеличении [Garmash et al., 2014].

2.2.7. Определение 8-оксогуанина в ДНК при помощи неконкурентного твердофазного иммуноферментного анализа

Сначала взвешивали 10,8 мг ДНК, затем растворяли в 18 мл 1 мМ фосфатного буфера (рН = 6,8), помещали приготовленную ДНК на шейкер до полного растворения. Далее измеряли концентрацию ДНК на спектрофотометре.

Разливали раствор ДНК по эппендорфам в соответствии со схемой эксперимента. Затем на протяжении 6 минут осуществляли денатурацию ДНК в эппендорфах на водяной бане. Далее в течение 15 минут охлаждали исследуемые образцы в заранее приготовленных кусочках льда. После чего равномерно наносили 40 мкл ДНК в лунки охлажденных планшетов, предназначенных для иммуноферментного анализа. Через некоторое время помещали планшет в предварительно прогретый сушильный шкаф до 80 °С примерно на 1-2 ч до полного высыхания раствора.

Затем проводили инкубацию ДНК с сывороткой крови, подвергнутой воздействию тепла или лазерного излучения, в течение 2 ч. После этой процедуры многоканальной пипеткой заливали блокирующий раствор по 300 мкл на каждую лунку планшета и инкубировали на шейкере на протяжении 2 ч при температуре 30 °С. Затем выливали блокирующий раствор и наносили первичные антитела (титр 1:1000) к 8-ОГ и инкубировали на планшетном шейкере (37 °С, 2 ч). После чего 2 раза отмывали специальным раствором, содержащим 50 мМ буфер Tris-HCl и 0,15 М хлорид натрия. Затем добавляли вторичные антитела и осуществляли инкубацию на протяжении двух часов при температуре 37 °С. Далее наносили моющий раствор, как указано выше. Через некоторое время проводили покраску. Для этого наносили 100 мкл на каждую лунку специального раствора (18 мМ АБТС, 2,6 мМ H₂O₂ в 50 мМ цитратном буфере). Визуально оценивали степень окрашивания каждые 10 минут, затем добавляли азид натрия для остановки реакции. Затем сразу проводили измерение оптической плотности при 405 нм [Bruskov et al., 2002], загружая 96-ти луночный планшет в спектрофотометр (Thermo Scientific, Финляндия). Чувствительность метода неконкурентного ИФА позволяет определить несколько фемтомолей 8-оксогуанина в 40 мкг ДНК. Проведение одного иммуноферментного анализа в общей сложности занимает около 8 часов.

2.2.8. Статистический анализ

Данные анализировались параметрическими методами. Этот выбор обоснован предварительным анализом характера распределения с помощью критерия Шапиро-Уилка, который не выявил отклонений от нормальности.

На графиках и таблицах представленные данные являются средними значениями выборки $\bar{X}$, а также указана стандартная ошибка среднего арифметического (SEM). Для сравнения с контролем использовался t-критерий Стьюдента, также в качестве поправки на множественные сравнения применялась поправка Бонферрони. Наблюдаемая разница считалась статистически значимой при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Образование долгоживущих активных форм белков под действием тепла и оптического электромагнитного излучения

Ранее показано, что генерация АФК может быть следствием влияния различных факторов малой мощности, например тепла, видимого излучения и других. Необходимо обозначить, что образование активных форм кислорода возможно исключительно при воздействии только на тех длинах волн, при которых наблюдаются максимумы в спектре поглощения O_2 . Однако могут ли такие воздействия приводить к образованию окислительных повреждений белков в виде долгоживущих активных форм белка не было известно. Для определения и анализа долгоживущих активных форм белков самыми подходящими и высокочувствительными считаются методы, в основе которых применяется хемилюминесценция (ХЛ) [Bruskov et al., 2012]. С помощью метода индуцированной ХЛ было изучено влияние воздействия двух источников излучения (633 нм и 650 нм) сопоставимой мощности и с мало отличающимися энергиями 1 моля квантов света (1,91 и 1,96 эВ соответственно). При облучении лазером с $\lambda=632,8$ нм в водных растворах БСА (1 г/л, рН 7,4) происходит образование ДАФБ (максимум в спектре поглощения O_2), при воздействии излучения с $\lambda=650$ нм образования ДАБФ не обнаруживалось (минимум в спектре поглощения O_2). Близкие данные были получены с использованием интерференционных светофильтров с максимумами пропускания 627,8 нм (ДАБФ регистрируются) и 662,9 нм (ДАБФ не регистрируются) при воздействии видимого света от электролампы на растворы БСА. Установлено, что данный процесс зависит от температуры. Таким образом, показано, что генерация ДАФБ происходит только при воздействии с длинами волн, соответствующими линиям поглощения молекулярного кислорода. В дальнейших экспериментах

использовали оптическое излучение лазера с $\lambda=632,8$ нм, соответствующей основной линии поглощения молекулярного кислорода в видимой области спектра.

Известно, что в большинстве биологических жидкостей, включая сыворотку крови, содержится значительное количество антиоксидантов. Предполагается, что развитие окислительного стресса начинается только при превышении емкости антиоксидантных систем. Одной из сред организма с высокой емкостью антиоксидантных систем является сыворотка крови. Регистрация в сыворотке крови окислительных повреждений биологических молекул под действием низкоинтенсивных физических факторов представляет собой актуальную и весьма сложную проблему. Сама возможность образования в сыворотке крови долгоживущих активных форм белков под действием неионизирующих воздействий не является очевидной. На Рисунке 1, А показана зависимость интенсивности ХЛ растворов сыворотки крови, подвергнутых воздействию излучения с длиной волны 632,8 нм или тепла, данные получены с помощью метода индуцированной ХЛ. Зависимость интенсивности ХЛ от степени разведения сыворотки крови имеет двухфазную форму. Люминесценция растворов была максимальна при разведении сыворотки крови примерно в 200 раз. Это разведение использовано для дальнейших опытов.

Что касается времени облучения, то облучение сыворотки крови *He-Ne* лазером в течение 10-30 мин при разведении сыворотки крови 1/200, сопровождается пропорциональным увеличением интенсивности ХЛ, то есть интенсивность люминесценции линейно зависит от времени облучения (Рисунок 1, Б). Что касается действия тепла, то при изменении времени воздействия в диапазоне от 30 мин до 2 ч наблюдалась лишь тенденция к увеличению интенсивности ХЛ. Таким образом, показано, что при воздействии тепла или низкоинтенсивного лазерного излучения с длиной волны, соответствующей линии поглощения O_2 , наблюдается генерация ДАФБ.

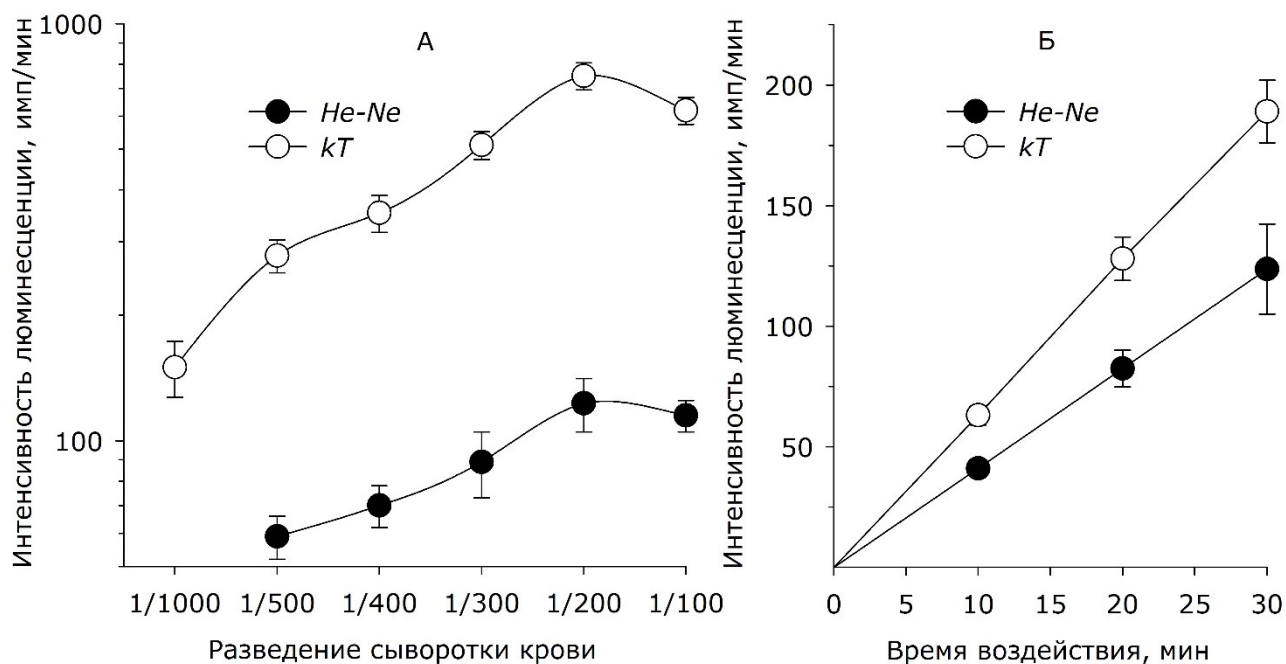


Рисунок 1 – Зависимость интенсивности ХЛ сыворотки крови после воздействия лазерного излучения (*He-Ne*, 632,8 нм, 30 мин) или тепла (*kT*, 45 °С, 2 ч) от разной степени разведения (А). Зависимость интенсивности люминесценции раствора сыворотки крови 1/200 от времени воздействия лазерного излучения или тепла (Б) (n=3)

Показано, что под действием низкоинтенсивных физических факторов может происходить образование ДАФБ. По этой причине необходимо установить время их полужизни. Снижение уровня люминесценции в дальнейшем после воздействия физических факторов делает возможным оценить период полужизни исследуемых долгоживущих активных форм белков сыворотки (Рисунок 2). Основной закон радиоактивного распада имеет вид: $N(t) = N_0 \cdot e^{-\lambda t}$. Средний период полураспада $T_{1/2}$ соответствует двукратному уменьшению интенсивности хемилюминесценции:

$$\frac{N_0}{2} = N_0 \cdot e^{-\lambda T_{1/2}}$$

Следовательно, период полужизни ДАФБ равняется:

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda}$$

Интенсивность ХЛ экспоненциально уменьшается от времени после воздействия. Уравнение экспоненты для *He-Ne* – $y = 151 \cdot e^{-0,1751x}$, для *kT* – $y = 990 \cdot e^{-0,2317x}$. Следовательно, для *He-Ne* $T_{1/2} = \ln 2 / 0,1751 \approx 3,96$; для *kT* $T_{1/2} = \ln 2 / 0,2317 \approx 2,99$.

Таким образом, период полужизни радикалов, образующихся на белках сыворотки крови, составил около 3-4 ч после воздействия.

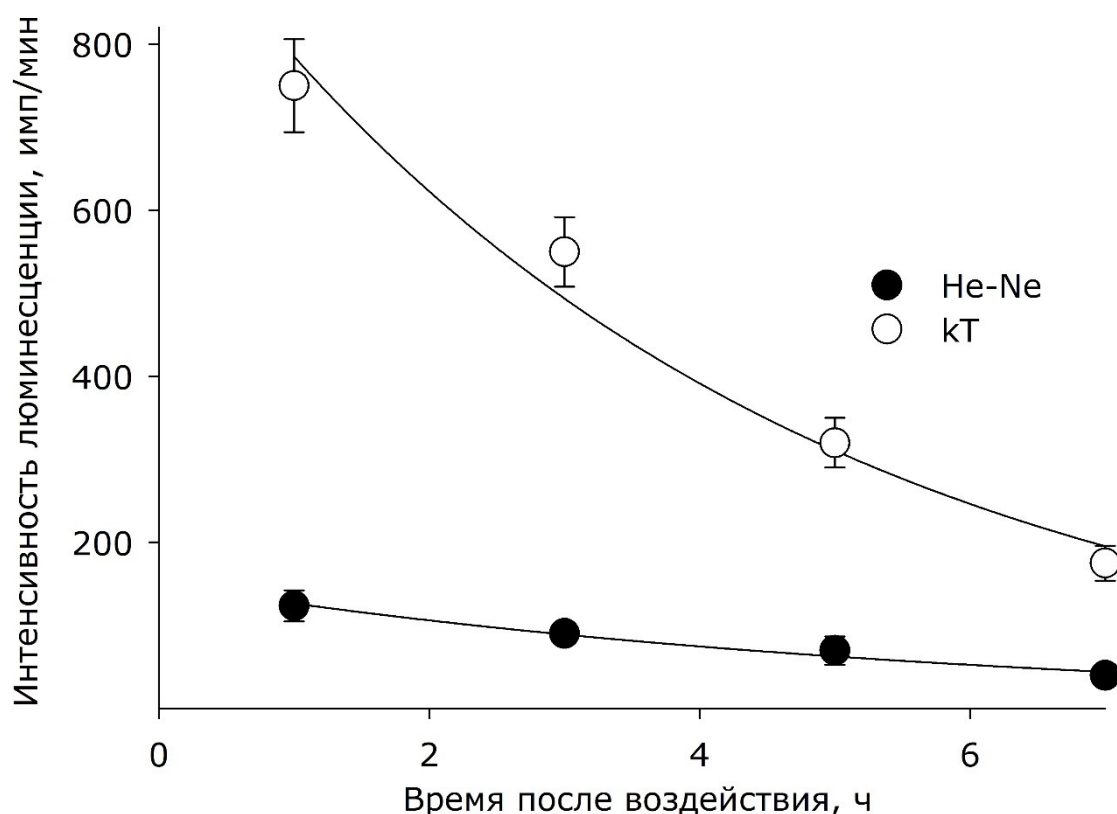


Рисунок 2 – Изменение интенсивности ХЛ при различной продолжительности инкубации после физических воздействий на раствор сыворотки крови. *He-Ne* – воздействие гелий-неоновым лазером в течение 30 мин. *kT* – нагревание (45 °C, 2 ч) (n=3)

Поскольку основными белковыми компонентами сыворотки крови являются сывороточные альбумины и гамма-глобулины, необходимо установить их вклад в процесс образования ДАФБ. Для этого брали коммерческие препараты БСА и общую фракцию БГГ. На Рисунке 3 показана зависимость интенсивности

ХЛ растворов БСА и БГГ, подвергнутых облучению гелий-неонового лазера, от концентрации белков.

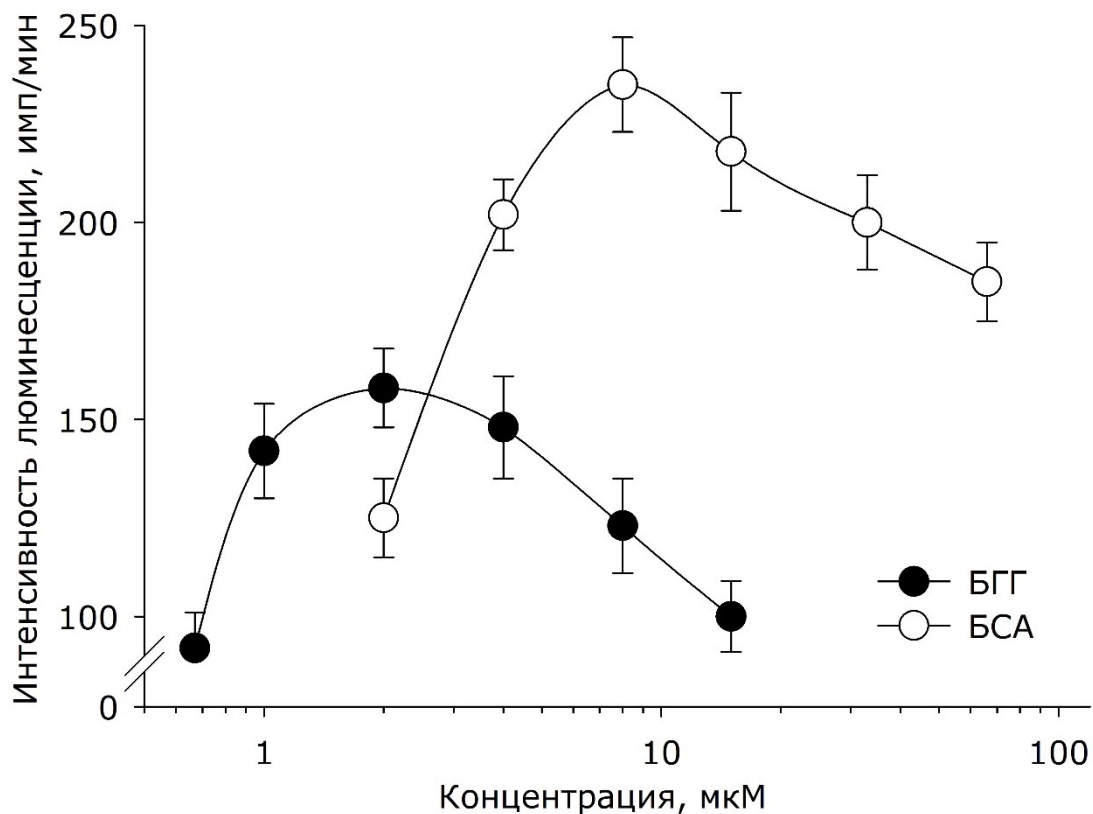


Рисунок 3 — Зависимость интенсивности ХЛ от концентрации растворов БСА и БГГ, подвергнутых воздействию низкоинтенсивного лазерного излучения (632,8 нм) в течение 15 минут (n=3)

Как видно на графике, для данной зависимости характерна двухфазная форма. Значения ХЛ имели максимум при концентрации ≈ 10 мкМ (0,67 г/л) для раствора бычьего сывороточного альбумина и максимум при концентрации ≈ 2 мкМ (0,3 г/л) в случае бычьего гамм-глобулина. Данные концентрации белков использовались в дальнейших экспериментах. Оценка соотношений молекулярных масс и концентраций БСА и БГГ (150 кДа : 67 кДа и 0,3 г/л : 0,67 г/л) позволяет заключить, что в этих белках образуется примерно одинаковое максимальное количество образующихся люминесцентных продуктов, если

рассчитать на единицу массы. Таким образом, установлено, что под действием оптического излучения генерация ДАФБ происходит не только в сыворотке крови, но и в водных растворах белков, причем этот процесс зависит от их концентрации.

Облучение белковых растворов *He-Ne* лазером в течение 10-30 мин при концентрациях БСА и БГГ, соответствующих максимальным уровням ХЛ, приводило к образованию ДАФБ (Рисунок 4 А, Б). Увеличение времени воздействия оптического излучения на белковые растворы как БСА, так и БГГ сопровождается пропорциональным увеличением люминесценции (Рисунок 4 В). Снижение сигнала ХЛ с течением после лазерного воздействия позволяет оценить время полужизни ДАФБ. Интенсивность ХЛ экспоненциально уменьшается от времени после воздействия. Уравнение экспоненты для БСА 30 мин – $y = 538 \cdot e^{-0,1404x}$ ($T_{1/2} \approx 4,94$), 15 мин – $y = 274 \cdot e^{-0,1312x}$ ($T_{1/2} \approx 5,28$), 10 мин – $y = 186 \cdot e^{-0,1477x}$ ($T_{1/2} \approx 4,69$); для БГГ 30 мин – $y = 376 \cdot e^{-0,1360x}$ ($T_{1/2} \approx 5,1$), 15 мин – $y = 183 \cdot e^{-0,1267x}$ ($T_{1/2} \approx 5,47$), 10 мин – $y = 151 \cdot e^{-0,2621x}$ ($T_{1/2} \approx 2,64$). Период полужизни радикалов БСА и БГГ составил около 4-5 ч после действия оптического излучения. Таким образом, показано, что период полужизни ДАФБ БСА и БГГ составляет 4-5 ч, и генерация ДАФБ линейно зависит от времени лазерного воздействия.

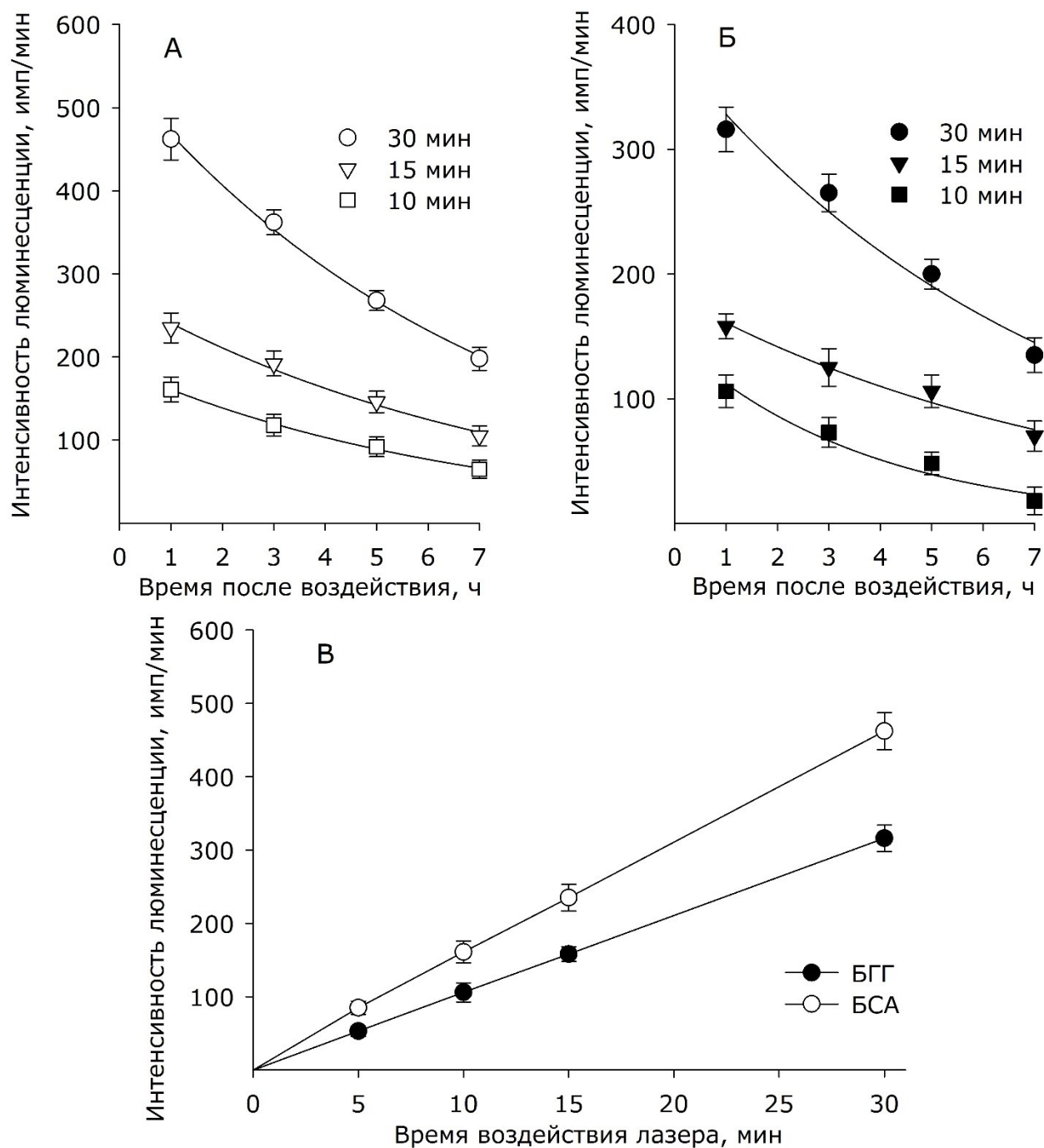


Рисунок 4 – Изменение интенсивности ХЛ растворов (А) БСА (10 мкМ) и (Б) БГГ (2 мкМ) в ФСБ при различной продолжительности инкубации после воздействия лазерного излучения (632,8 нм). (В) - зависимость ХЛ растворов БСА (10 мкМ) и БГГ (2 мкМ) от времени воздействия лазерного излучения (632,8 нм) (n=3)

Как показано в предварительных экспериментах, тепловое воздействие может существенно влиять на генерацию ДАФБ. На Рисунке 5 показана зависимость интенсивности ХЛ бычьего сывороточного альбумина и бычьего

гамма-глобулина, подвергнутых воздействию тепла (40 °С, 2 ч), от концентрации растворенных белков.

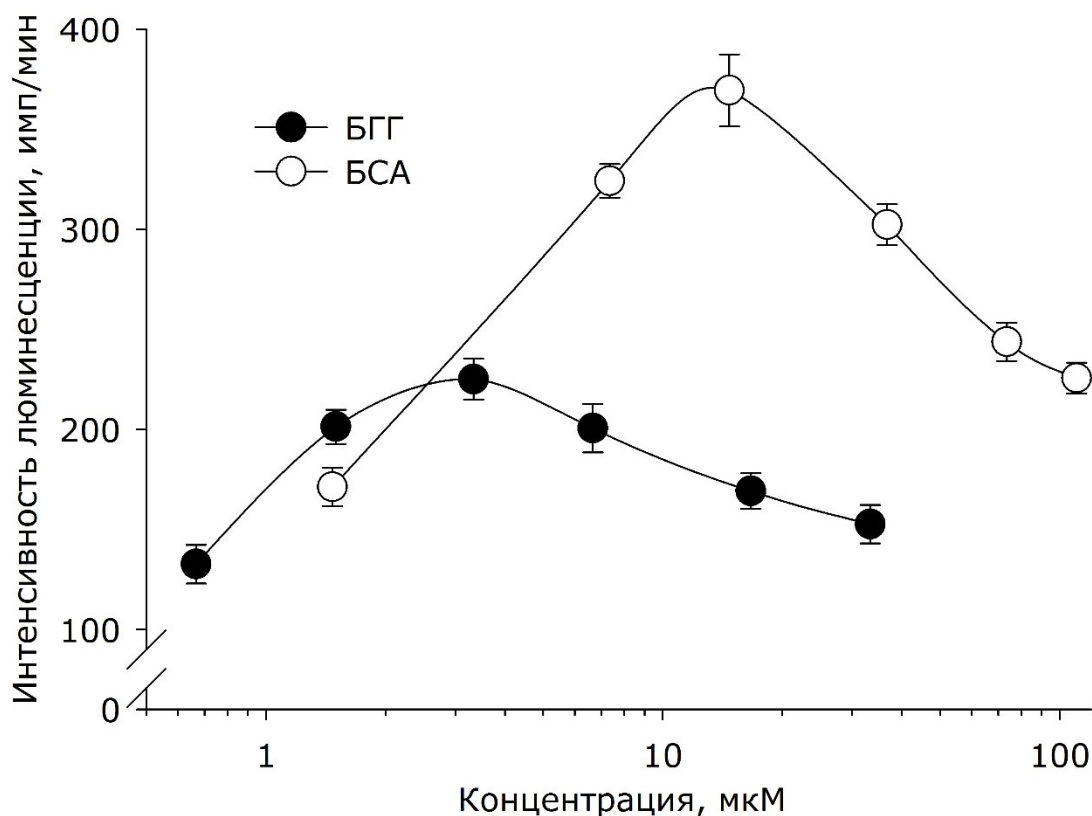


Рисунок 5 – Зависимость интенсивности ХЛ от концентрации БСА и БГГ после нагревания (40 °С, 2 ч) (n=3)

Как показано на графике, для данной зависимости характерна двухфазная форма. Значения ХЛ после нагревания имели максимум при концентрации ≈ 15 мкМ (1 г/л) для раствора бычьего сывороточного альбумина и максимум при концентрации ≈ 3 мкМ (0,45 г/л) в случае бычьего гамма-глобулина. Данные концентрации белков использовались в дальнейших экспериментах. Оценка соотношений молекулярных масс и концентраций БСА и БГГ (67 кДа : 150 кДа и 1 г/л : 0,45 г/л) позволяет заключить, что в этих белках образуется примерно одинаковое максимальное количество образующихся люминесцентных продуктов, если рассчитать на единицу массы.

Прогревание растворов белков при температурах 35–50 °С на протяжении 120 минут при концентрации бычьего сывороточного альбумина в 1 г/л и бычьего гамм-глобулина в 0,45 г/л инициирует генерацию ДАФБ (Рисунок 6 А, Б). Повышение температуры с 35 до 40 °С приводило к двукратному увеличению сигнала люминесценции, а повышение до температуры 50°С – увеличением в 3 раза. Также была исследована зависимость уровня ХЛ от концентрации кислорода, который был в растворе (Рисунок 6, В).

Снижение сигнала люминесценции с течением после воздействия тепла позволяет оценить время полужизни ДАФБ. Интенсивность ХЛ экспоненциально уменьшается от времени после воздействия. Уравнение экспоненты для БСА 50°С – $y = 800 \cdot e^{-0,1813x}$ ($T_{1/2} \approx 3,82$), 40°С – $y = 448 \cdot e^{-0,1848x}$ ($T_{1/2} \approx 3,75$), 35°С – $y = 198 \cdot e^{-0,1490x}$ ($T_{1/2} \approx 4,65$); для БГГ 50°С – $y = 415 \cdot e^{-0,1526x}$ ($T_{1/2} \approx 4,54$), 40°С – $y = 256 \cdot e^{-0,1495x}$ ($T_{1/2} \approx 4,64$), 35°С – $y = 153 \cdot e^{-0,1667x}$ ($T_{1/2} \approx 4,16$). Время полужизни долгоживущих активных форм БСА и БГГ составляло в среднем 4 часа после теплового воздействия. Таким образом, показано, что с увеличением температуры интенсивность генерации ДАФБ возрастает. С увеличением концентрации O_2 в растворе скорость образования ДАФБ растет.

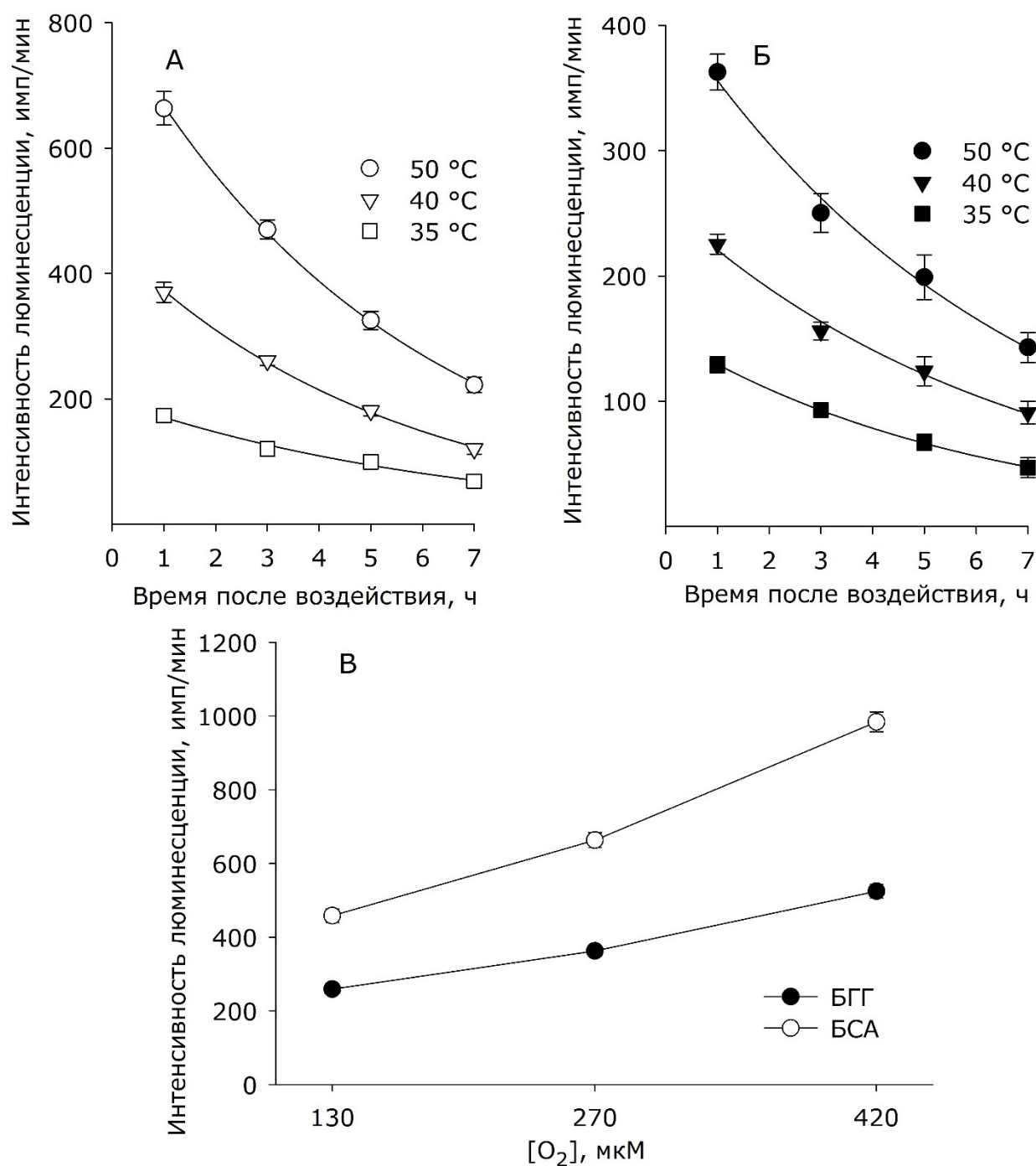


Рисунок 6 – Изменение интенсивности ХЛ растворов (А) БСА (15 мкМ) и (Б) БГГ (3 мкМ) при различной продолжительности инкубации после нагревания (35–50 °С, 2 ч). Зависимость ХЛ БГГ (1 г/л) и БСА (0,45 г/л) после нагревания (40 °С, 2 ч) (В), от концентрации растворенного кислорода (n=3)

Впервые установлено, что под действием тепла и оптического электромагнитного излучения в сыворотке крови и водных растворах

сывороточных белков наблюдается образование ДАФБ. Чтобы выяснить, является ли способность к образованию ДАФБ исключительной только для сывороточных белков или характерна для других белков, проведена серия опытов с белками казеина и желатина. Поскольку в литературе известны примеры образования радикальных продуктов не только на белках, но и на пептидах, нами также исследована способность гидролизата казеина (ГК) к образованию ДАФБ под действием тепла. Исследована возможность образования ДАФБ для таких белковых растворов, как казеин, желатин и ГК при воздействии тепла (Рисунок 7).

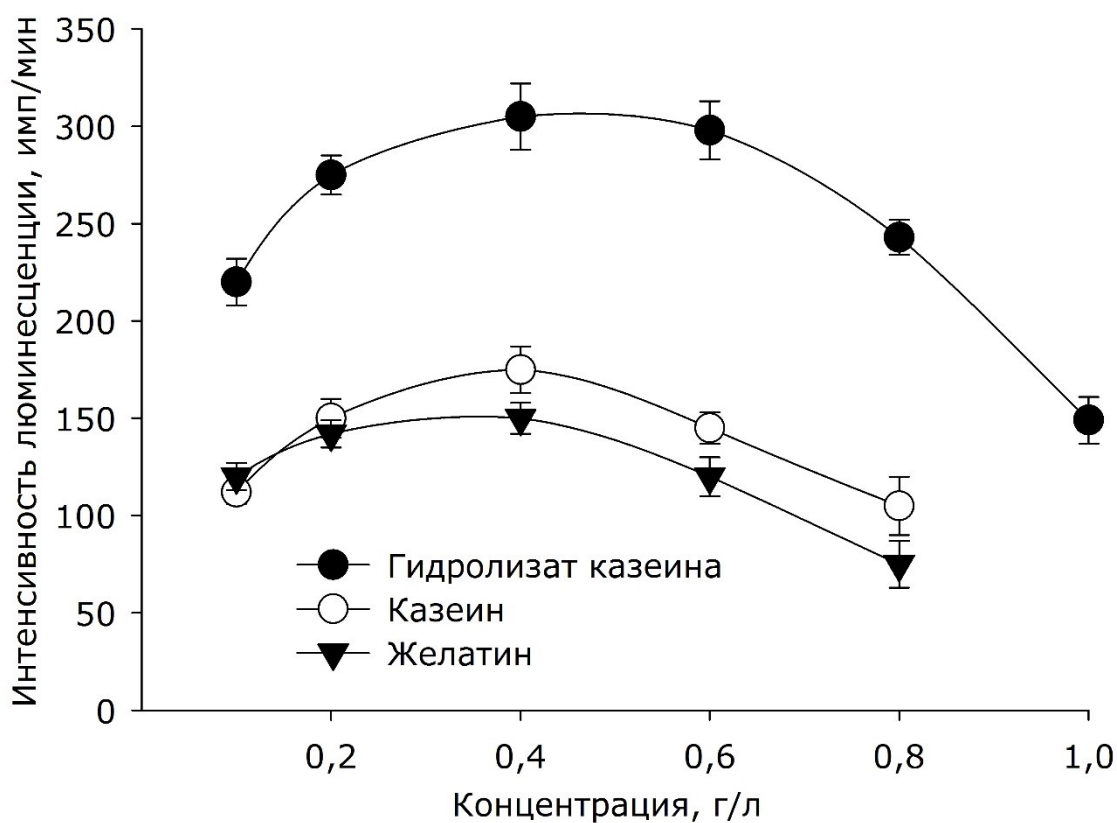


Рисунок 7 – Зависимость интенсивности ХЛ от концентрации растворов белков и гидролизата казеина, подвергнутых воздействию тепла (45 °С, 2 ч) и охлаждения до 25 °С (n=3)

Установлено, что нагревание в умеренном режиме вызывает генерацию ДАФБ в результате окисления белковых молекул, и данный эффект значительно сильнее у ГК по сравнению с казеином и желатином. Из графика видно, что

наблюдается двухфазная зависимость сигнала ХЛ от концентрации исследуемых белковых растворов. Для данных белков максимальная интенсивность ХЛ регистрировалась при одной концентрации, а именно при 0,4 г/л.

Воздействие температуры 45 °С на протяжении 2 часов вызывало генерацию ДАФБ (Рисунок 8).

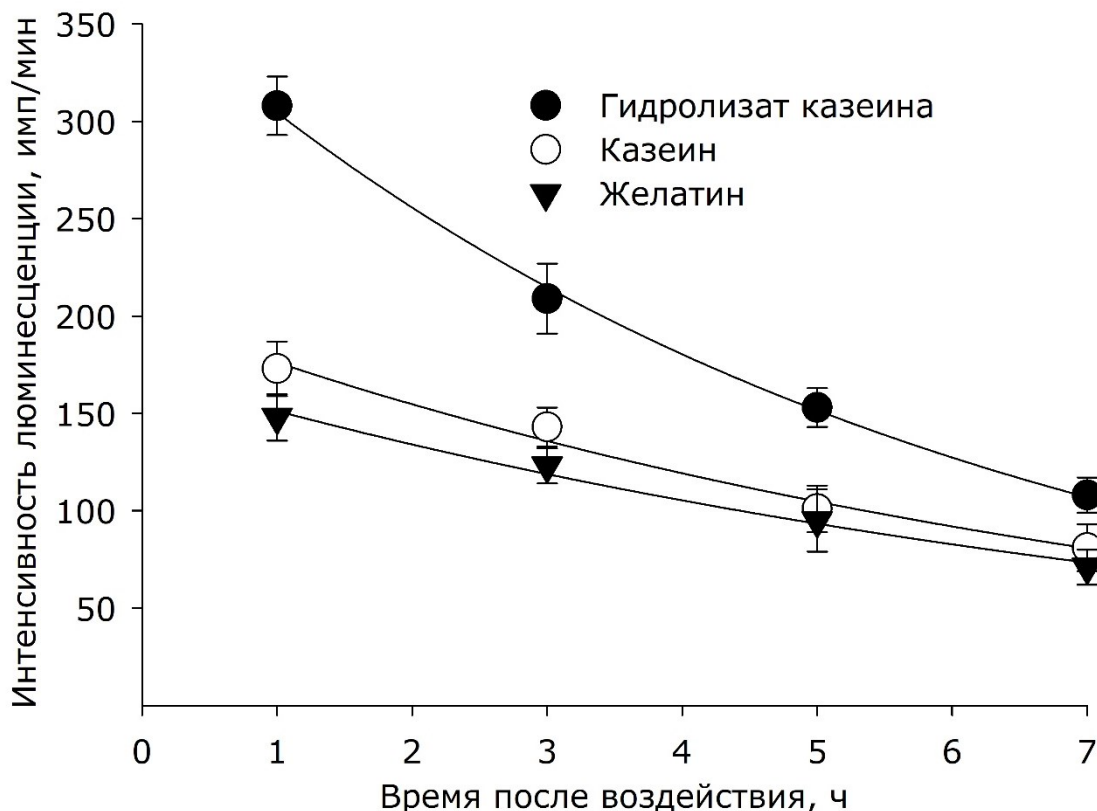


Рисунок 8 - Изменение интенсивности ХЛ растворов белков и гидролизата казеина (0,4 г/л) в ФСБ при различной продолжительности инкубации после теплового воздействия (45 °С, 2 ч) и охлаждения до 25 °С (n=3)

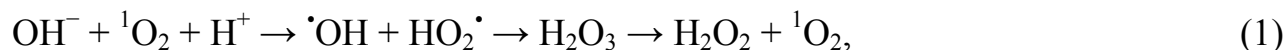
Снижение сигнала ХЛ через некоторое время после умеренного нагревания дает возможность оценить время полужизни ДАФБ. Как видно из графика, период полужизни для этих рассмотренных белков составил порядка 4-5 часов. Уравнение экспоненты для гидролизата казеина – $y = 362 \cdot e^{-0,1744x}$ ($T_{1/2} \approx 3,97$), для казеина – $y = 201 \cdot e^{-0,1301x}$ ($T_{1/2} \approx 5,33$), и для желатина – $y = 171 \cdot e^{-0,1205x}$ ($T_{1/2} \approx 5,75$).

Таким образом, показано, что генерация ДАФБ наблюдается в исследованных растворах сыворотки и белков под действием таких

низкоинтенсивных факторов, как умеренное нагревание и облучение гелий-неонового лазера. Концентрация ДАФБ зависит от времени физических воздействий и концентрации растворенного кислорода. Процесс образования ДАФБ имеет стохастическую природу и связан только с количеством аминокислотных остатков, а не молекул белков.

Далее построили кинетические уравнения генерации активных форм кислорода в белковых растворах под действием He-Ne лазерного излучения, а также проанализировали константы скоростей и порядки протекающих реакций, исходя из результатов измерения продукции H_2O_2 с течением времени после воздействия и при различных концентрациях белка в растворе.

Известно, что электронные переходы в димерах кислорода из основного состояния (триплетного) $^3\Sigma_g^-$ ($^3\Sigma_g^- + ^3\Sigma_g^- \rightarrow ^1\Delta_g + ^1\Delta_g$) с абсорбцией света на $\lambda \approx 630$ нм дают возможность применять He-Ne лазерное излучение для образования синглетного кислорода [Zakharov S.D., Ivanov A.V., 1999]. Далее в реакции взаимодействия $^1\text{O}_2$ с H^+ и OH^- происходит образование АФК:



Химическая реакция гидроксильного радикала с атомом Н при альфа-углеродном атоме белка Р обуславливает генерацию альфа-углеродного радикала [Davies, 2005]:



Вследствие взаимодействия альфа-углеродного радикала с $^1\text{O}_2$ формируется пероксильный белковый радикал [Zakharov et al., 2003]:



а также дополнительная генерация H_2O_2 благодаря реакции дисмутации $\text{HO}_2\cdot$. Одновременно с этими процессами химическая реакция с $^1\text{O}_2$ приводит к

модификации боковых цепочек аминокислот [Davies, 2004]. Таким образом, при сложении (4) и (5) получится формирование пероксильного белкового радикала



Именно $\text{P}_{\text{C}\alpha}\text{OO}\cdot$ и считается ДАФБ. Последующее превращение долгоживущей формы белка сочетается с образованием гидропероксида, что в свою очередь приводит к генерации H_2O_2 :



где P_e – последнее соединение модификации ДАФБ из первоначальной белковой молекулы. Тем не менее, так как зависимость продукции H_2O_2 с течением время под действием ДАФБ является немонотонной, то в дополнение должна быть и реакция разложения H_2O_2 :



Изложенная далее кинетическая схема прогнозирует протекание реакции (9), являющаяся каталазной активностью молекул белка, как описано в данной работе [Hawkins, Davies, 2001].

В итоге кинетика образования H_2O_2 в исследуемых растворах белков может быть представлена в следующем виде:



В результате реакции (10) происходит генерация гидропероксидного радикала, на следующем этапе образуется H_2O_2 (реакция 11). В представленной схеме учитываются два процесса распада пероксида водорода. Это процесс самораспада (реакция 13) и процесс распада H_2O_2 из-за каталазной активности самих белков (реакция 12). Так как для химических реакций процесса распада присуще несоответствие стехиометрических коэффициентов с экспериментальными порядками данных реакций, то уравнения, которые

описывают зависимость скорости реакции от концентраций реагентов для гидроксильного радикала и пероксида водорода распишем в таком виде:

$$\frac{d\text{HO}_2^\bullet}{dt} = k_1 [P] \cdot [^1\text{O}_2] - 2 k_2 \cdot [\text{HO}_2^\bullet]^2 \quad (14)$$

$$\frac{d\text{H}_2\text{O}_2}{dt} = k_2 \cdot [\text{HO}_2^\bullet]^2 - 2 k_3 \cdot [P]^\gamma \cdot [\text{H}_2\text{O}_2]^\beta - 2 k_4 \cdot [\text{H}_2\text{O}_2]^\alpha \quad (15)$$

при этом k_i ($i = 1 \dots 4$) – константы скоростей химических реакций, а γ , β , α – порядки этих реакций разложения H_2O_2 . γ , β , α находятся на основе полученных экспериментальных результатов.

Используя условие стационарных концентраций промежуточных веществ к приведенной выше системе уравнений (реакции 10-13), другими словами, условие равенства образования и расхода гидропероксидного радикала и пероксида принимаем

$$k_1 [P] \cdot [^1\text{O}_2] = 2 k_2 \cdot [\text{HO}_2^\bullet]^2 \quad (16)$$

$$k_2 \cdot [\text{HO}_2^\bullet]^2 = 2 k_3 \cdot [P]^\gamma \cdot [\text{H}_2\text{O}_2]^\beta + 2 k_4 \cdot [\text{H}_2\text{O}_2]^\alpha \quad (17)$$

Подставляем уравнение (16) в уравнение (17) и получаем:

$$k_1 [P] \cdot [^1\text{O}_2] = 4 k_3 \cdot [P]^\gamma \cdot [\text{H}_2\text{O}_2]^\beta + 4 k_4 \cdot [\text{H}_2\text{O}_2]^\alpha \quad (18)$$

Показано, что порядок процесса самораспада H_2O_2 лежит в интервале $1 \leq \alpha \leq 2$ (реакция 13) [Панченков Г.М., Лебедев В.П., 1985; Takagi, Ishigure, 1985]. Целесообразно допустить, что белок разлагает H_2O_2 (реакция 12) подобно реакции 13, порядком по пероксиду $1 \leq \beta \leq 2$. Порядок реакции по белковой молекуле (12) предварительно не определен, тем не менее он не должен кардинально превосходить порядок по H_2O_2 , вследствие этого следует стараться обнаружить его в интервале $1 \leq \gamma \leq 3$. Полученные результаты зависимости генерации пероксида водорода от концентраций БСА и БГГ представлены на Рисунке 9.

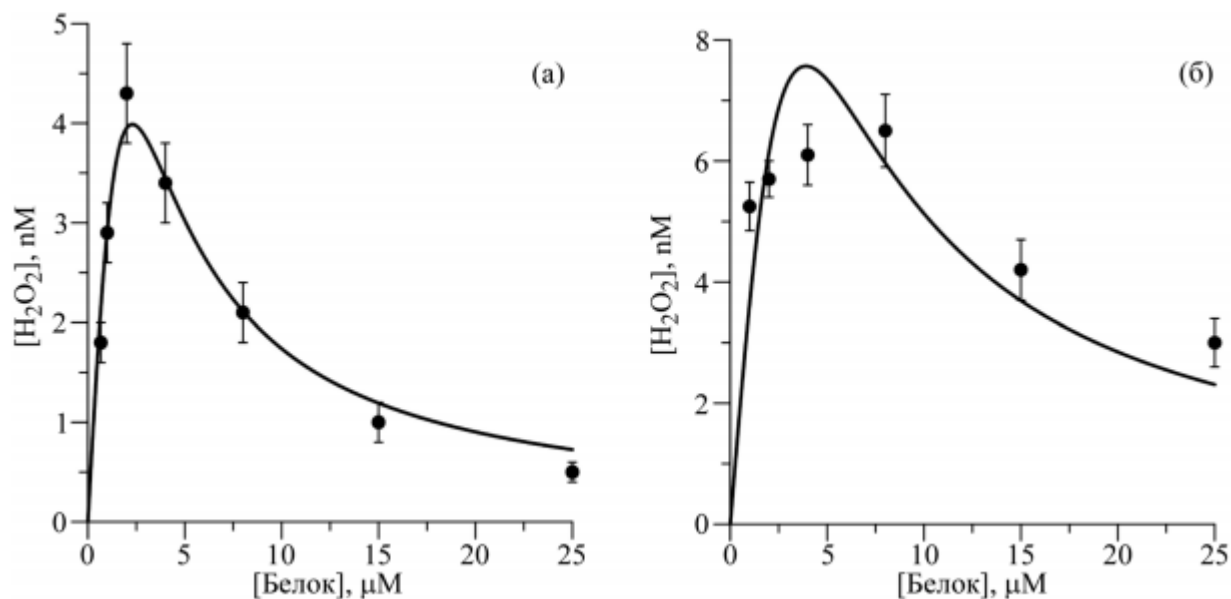


Рисунок 9 – Концентрационная зависимость генерации H_2O_2 в белковых в растворах БГГ (а) и БСА (б), индуцированного низкоинтенсивным лазерным излучением (632,8 нм, 15 мин). Представлены экспериментальные данные и теоретические кривые, построенные с помощью алгоритма Левенберга – Марквардта

Оптимизация значений параметров 18 уравнения на основании проведенных экспериментов (Рисунок 9), выполненная на области целых значений γ , β , α , дает $\alpha = 1$; $\gamma = 2$; $\beta = 1$, при этом зависимость $[\text{H}_2\text{O}_2]$ от концентрации белковых молекул следующая:

$$\text{H}_2\text{O}_2 = \frac{k_1[\text{P}] \cdot [{}^1\text{O}_2]}{4 k_3[\text{P}]^2 + k_4} \quad (19)$$

Данную зависимость запишем в виде

$$y(x) = \frac{x}{ax^2 + b}, \quad a = \frac{4 \cdot k_3}{k_1 \cdot [{}^1\text{O}_2]} ; \quad b = \frac{4 \cdot k_4}{k_1 \cdot [{}^1\text{O}_2]} \quad (20)$$

a и b определялись с помощью минимизации функционала отклонений 20 функции от экспериментальных значений алгоритмом Левенберга – Марквардта [Levenberg, 1944; Marquardt, 1963; Nocedal, Wright, 1999]. Найденные значения (a , b) приведены в Таблице 1.

Таблица 1 – Параметры модельной функции $y(x)$ (20)

Белок	БСА	БГГ
$a, \text{л}^2 \cdot \text{мкмоль}^{-2}$	16,8	54,6
b	259,4	287,7

Принимая во внимание значения порядков соответствующих реакций $\alpha = 1$, $\beta = 1$, $\gamma = 2$, распишем 14 и 15 кинетические уравнения в виде функции со свободными коэффициентами (A, B, C) ($z(t) \equiv [\text{HO}_2^\bullet]$, $y(t) \equiv [\text{H}_2\text{O}_2]$):

$$\frac{d}{dt}z(t) = A - 2Bz(t)^2, \frac{d}{dt}y(t) = Bz(t)^2 - Cy(t), \quad y(0) = y_0, z(0) = z_0 \quad (21)$$

Зависимость от времени $y(t)$ максимальна при соблюдении: $z_0 > \sqrt{\frac{A}{2B}}$

Для данного случая решение 21 системы следующее:

$$z(t) = \sqrt{\frac{A}{2B}} \coth \left(\sqrt{2BA}t + \operatorname{arccoth} \left(z_0 \sqrt{\frac{2B}{A}} \right) \right), \quad (22)$$

$$y(t) = \frac{A}{2} e^{-Ct} \int_0^t \coth \left(\sqrt{2BA}\tau + \operatorname{arccoth} \left(z_0 \sqrt{\frac{2B}{A}} \right) \right)^2 e^{C\tau} d\tau + y_0 e^{-Ct}. \quad (23)$$

Отыскивание коэффициентов A, B, C существенно облегчается, если расписать 23 уравнение с помощью известных функций. В таком случае, когда при $x > 0$ поменять функцию $\coth(x)^2$ выражением

$$\frac{1}{x_2} + 1 - \frac{1}{3}e^{3/2x} - \frac{x}{2}e^{53/60x} \quad (\text{относительная погрешность не более, чем } 0,013), \text{ то 23 интеграл сводится к табличному.}$$

На Рисунке 10 показаны экспериментальные данные зависимости $[\text{H}_2\text{O}_2]$ от времени в белковых растворах бычьего сывороточного альбумина и бычьего гамма-глобулина под действием He-Ne лазерного излучения, в том числе

теоретические кривые, построенные с помощью алгоритма Левенберга – Марквардта.

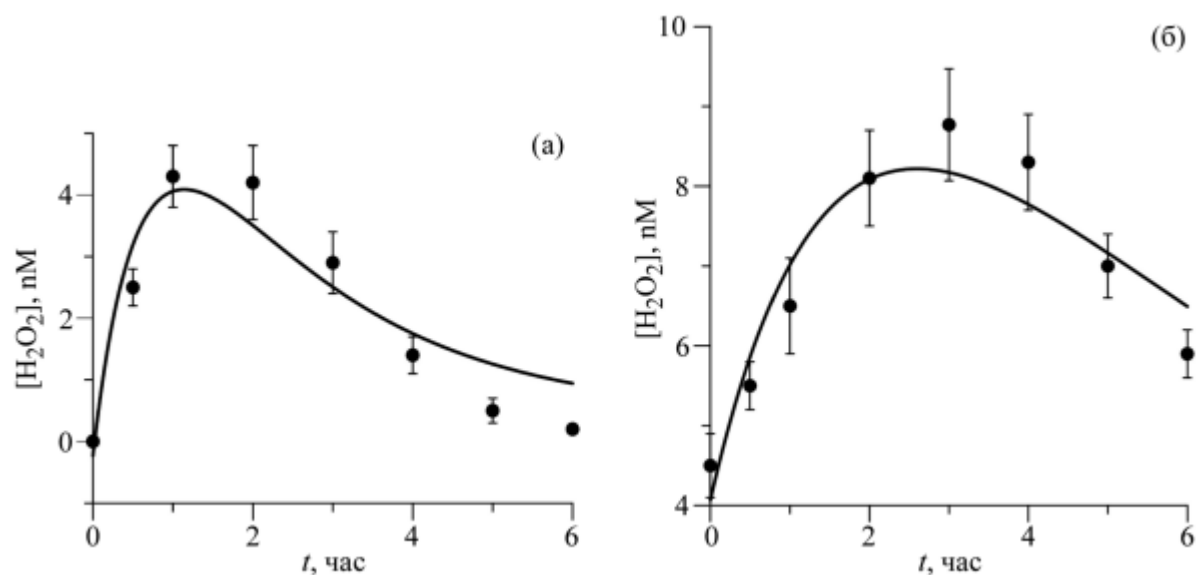


Рисунок 10 – Образование пероксида водорода, индуцированное в растворах БГГ (2 мкМ) (а) и БСА (10 мкМ) (б) через разные промежутки времени после их лазерного облучения (632,8 нм, 15 мин). Представлены экспериментальные данные и теоретические кривые, построенные с помощью алгоритма Левенберга – Марквардта

Обнаруженные значения параметров 22 и 23 функций приведены в Таблице 2.

Здесь $\xi = \sqrt{2AB}$, $\eta_0 = \operatorname{arccoth} \left(z_0 \sqrt{\frac{2B}{A}} \right)$

Таблица 2 – Параметры модельной функции $y(t)$ (23)

Белок	ξ , час ⁻¹	η_0	C , час ⁻¹	y_0 , нмоль·л ⁻¹	A , нмоль·час ⁻¹
БСА	0,044	0,295	0,396	0,00041	$9,77 \cdot 10^{-4}$
БГГ	0,096	0,148	0,939	0,00023	$4,86 \cdot 10^{-4}$

Константы скоростей 10 и 13 химических реакций непосредственно связаны с параметрами 20 и 23 функций, которые объясняют процесс образования H_2O_2 , такими соотношениями:

$$2(k_4 + k_3[\text{P}]^2) = C \quad k_3 = \frac{a}{b}k_4 \quad k_2 = B = \frac{\xi^2}{2A} \quad k_1^{(\text{eff})} = k_1 \cdot [{}^1\text{O}_2] = \frac{4k_4}{b} \quad (24)$$

Анализ удельных скоростей химических реакций k_1 - k_4 , выполненный в соответствии с (27) при определенных концентрациях БСА (10 мкМ) и БГГ (2 мкМ) представлены в Таблице 3.

Таблица 3 – Кинетические константы (27)

Белок	$k_1^{(\text{eff})}$, с^{-1}	k_2 , $\text{л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$	k_3 , $\text{л}^2 \cdot \text{моль}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$	k_4 , с^{-1}
БСА	$1,1 \cdot 10^{-7}$	$2,8 \cdot 10^5$	$4,8 \cdot 10^5$	$7,3 \cdot 10^{-6}$
БГГ	$1,0 \cdot 10^{-6}$	$2,6 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^7$	$7,4 \cdot 10^{-5}$

Необходимо упомянуть, что обнаруженные константы скорости реакции k_4 по порядку значения соответствуют данным по температурному разложению H_2O_2 , полученным с помощью интерполяции [Takagi, Ishigure, 1985].

Таким образом, изучена кинетика генерации активных форм кислорода в белковых растворах при воздействии He-Ne лазерного излучения. Опираясь на фундаментальные закономерности реакций фотохимии, вызывающих модификацию долгоживущих активных форм белков, сформулирована система фотохимических реакций, а также представлены соответствующие уравнения, описывающие зависимости скорости реакции от концентрации реагирующих веществ. Исходя из приблизительного решения уравнений кинетики и экспериментальных значений концентрации пероксида водорода в разнообразных опытных условиях с применением метода Левенберга – Марквардта рассчитаны величины кинетических констант, которые характеризуют светокислородное

воздействие в белковых растворах бычьего сывороточного альбумина и бычьего гамма-глобулина. Сходство зависимостей содержания пероксида водорода от концентрации белковых молекул и времени после воздействия содержания белка и времени дает возможность сделать вывод, что основополагающие механизмы фотохимических процессов, приводящие к генерации пероксида водорода в белковых водных растворах, едины. Это указывает на то, что подобные методы применимы также и к остальным физическим факторам воздействия на растворы белков. В связи с этим предложенные решения и методы в данной работе могут применяться для изучения образования активных форм кислорода в разных модельных системах белков.

3.2. Образование активных форм кислорода под действием долгоживущих активных форм белков

Сгенерированные в клетках активные формы кислорода под действием разнообразных факторов выполняют двойственную функцию. На первый взгляд, их продукция, превышающая емкость антиоксидантной защиты, приводит к окислительному стрессу, который сопровождается многочисленными окислительными повреждениями белков, нуклеиновых кислот, липидов и других клеточных компонентов, что в результате приводит к различным патологическим процессам. С другой стороны, небольшое повышение уровня АФК играет важную сигнально-регуляторную роль, направленную на активацию защитных клеточных систем, препятствующих возникновению окислительного стресса. Ранее в нашем коллективе установлено, что долгоживущие активные формы белков, подверженных воздействию ионизирующей радиации, считаются источником длительной вторичной генерации в водных растворах такой АФК, как пероксид водорода. Сейчас в клинической медицине массово применяется комплекс физиотерапевтических подходов с использованием влияния разнообразных физических воздействий для коррекции ряда патологических процессов. Однако молекулярные и физико-химические механизмы, лежащие в основе этих процедур, остаются недостаточно изученными.

Данная работа направлена на изучение долгоживущих активных форм белков, образующихся в сыворотке крови и водных растворах белков при воздействии тепла или оптического излучения. Предполагается, что ДАФБ способны к длительной генерации пероксида водорода. В небольших количествах и длительная опосредованная ДАФБ генерация АФК, превышающая физиологический уровень, способна играть сигнально-регуляторную роль, направленную на активизацию адаптивных процессов в клетке, препятствующих развитию окислительного стресса. По этой причине изучение роли отдельных

компонентов сыворотки крови, в частности глобулинов и альбуминов в процессах генерации пероксида водорода при изучаемых воздействиях является актуальным.

Исследовано образование пероксида водорода в растворах сыворотки крови после воздействия на нее He-Ne лазерного излучения или тепла. Зависимость генерации H_2O_2 после воздействия лазерного излучения в течение 30 мин или тепла в течение 2 ч от степени разведения сыворотки крови представлена на Рисунке 11. Как при воздействии оптического электромагнитного излучения в спектре поглощения O_2 , так и при действии тепла наблюдалось уменьшение скорости образования пероксида водорода при разведении сыворотки крови.

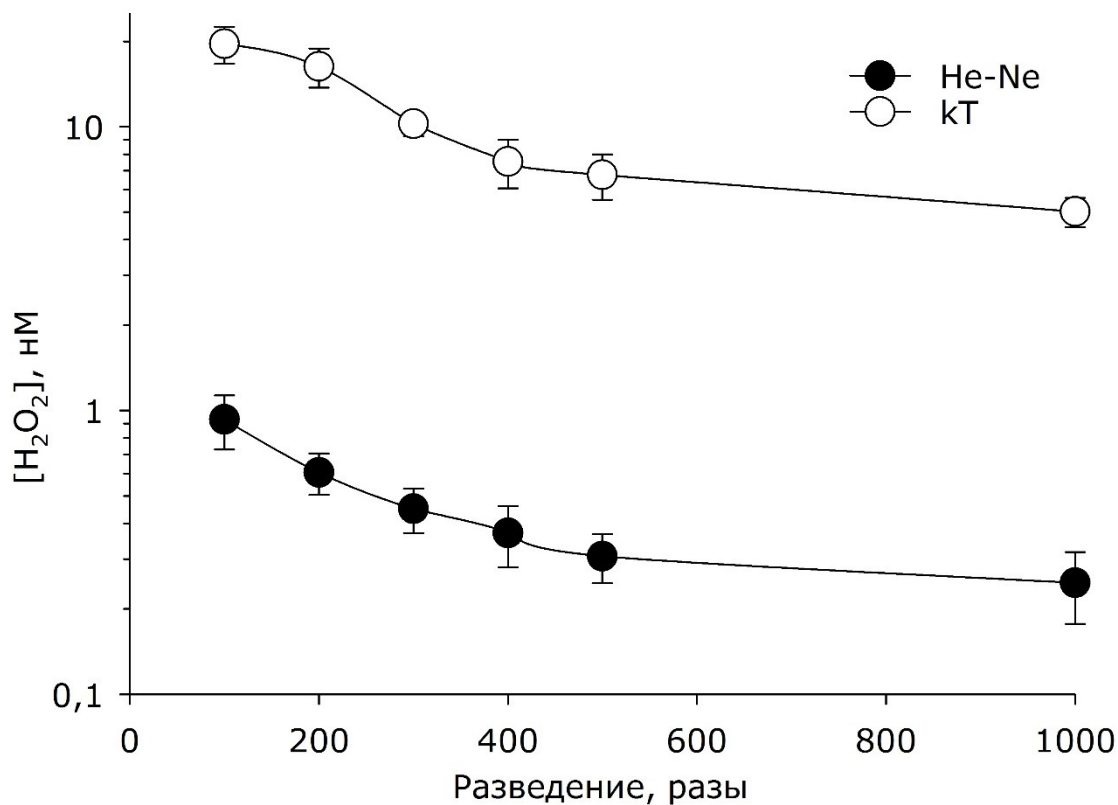


Рисунок 11 – Влияние степени разведения сыворотки крови на продукцию пероксида водорода под действием ДАФБ, индуцированных физическими воздействиями. He-Ne – воздействие лазерного излучения (632,8 нм, 30 мин). kT – нагревание (45 °C, 2 ч) (n=3)

Установлено, что под действием тепла или He-Ne лазерного излучения на сывороточный раствор генерируется H_2O_2 . Показано, что продукция пероксида водорода при воздействии излучения He-Ne лазера линейно зависит от времени воздействия в диапазоне 5–30 мин. При воздействии тепла в течение различных времен скорость образования пероксида водорода изменяется немонотонно. Образование H_2O_2 в растворе сыворотки крови, подвергнутой воздействию физических факторов, через разное время после воздействия представлено на Рисунке 12.

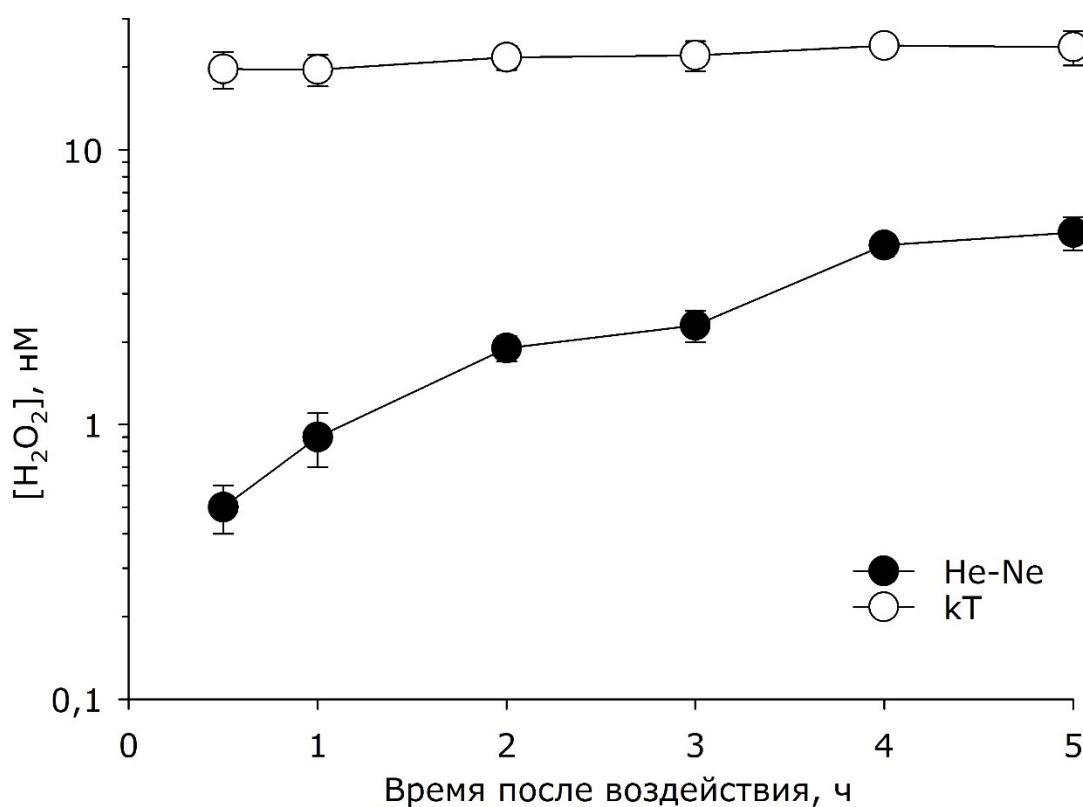


Рисунок 12 – Образование пероксида водорода в растворе сыворотки крови, подвергнутой воздействию физических факторов через разное время после воздействия. *He-Ne* – воздействие лазерного излучения (632,8 нм, 30 мин). *kT* – нагревание (45 °C, 2 ч) (n=3)

Показано, что через длительное время после воздействия физических факторов наблюдалась тенденция к увеличению концентрации пероксида

водорода. Причем в случае действия тепла прирост концентрации H_2O_2 находится на уровне 5 % в час. При действии на раствор сыворотки крови лазерного излучения наблюдается примерно 50 % прирост концентрации пероксида водорода в течение каждого часа.

Используя кумарин-3-карбоновую кислоту (ККК), исследовали генерацию ОН-радикалов после воздействия He-Ne лазерного излучения на раствор сыворотки крови в течение 30 мин или температуры 45 °С в течение 2 ч. При действии лазерного излучения содержание 7-ОН-ККК в растворе сыворотки крови (1/200) составило $1,4 \pm 0,2$ нМ, при действии тепла в 4 раза меньше.

Для выяснения механизма образования пероксида водорода в растворе сыворотки крови под действием лазерного излучения и гипертермии проведен ингибиторный анализ. Ряд соединений, применяемых в данном анализе, существенно уменьшают генерацию пероксида водорода. Это делает невозможным ряд измерений при воздействии лазерного излучения на растворы сыворотки крови. Поэтому для выяснения механизма образования H_2O_2 в растворе сыворотки крови использовали один физический фактор – гипертермию. Полученные данные приведены в Таблице 4. Обнаружен светокислородный эффект – воздействие концентрации O_2 в растворе на генерацию H_2O_2 под влиянием долгоживущих активных форм белков сыворотки. Концентрация H_2O_2 , продуцируемого ДАФБ, в более насыщенном O_2 растворе в 1,6 раза более высокая. В случае барботирования раствора Ar генерация пероксида водорода снижалась примерно на 20 %. Установлено, что при наличии тяжелой воды в растворе время жизни $^1\text{O}_2$ возрастает [Ryter, Tyrrel, 1998]. В сывороточном растворе, который имел в своем составе тяжелую воду 25 % по объему, $[\text{H}_2\text{O}_2]$ под действием нагревания возрастала примерно на 20 %.

Таблица 4 – Влияние различных факторов на образование пероксида водорода в растворах сыворотки крови, подвергнутых воздействию тепла (45 °C, 2 ч) (n=3)

Воздействие	[O ₂], мкМ	Δ[H ₂ O ₂], нМ	К
Контроль	270	19,6 ± 2,4	1
Насыщение O ₂ **	420	30,4 ± 1,4 *	1,6
Насыщение Ar **	130	16,1 ± 1,4 *	0,8
D ₂ O (25 об. %)	270	23,6 ± 1,2 *	1,2
NaN ₃ (0,1 мкМ) **	270	15,7 ± 0,8 *	0,8
Супероксиддисмутаза (0,01 ед./мл)	270	23,1 ± 1,8 *	1,2
Тирон (100 нМ)	270	13,8 ± 0,9*	0,7
Prx2 (10 ⁻² ед./мл)	270	0,0 ± 0,0*	0,0

Образцы содержали разбавленную в 200 раз сыворотку. Измерение производили через 1 ч.

К – изменение концентрации пероксида водорода при воздействии исследуемого агента по отношению к контролю

* – статистически значимые отличия (p < 0,05)

** – раствор сыворотки крови перед нагреванием насыщался с помощью барботирования соответствующим газом на протяжении 15 мин

*** – в данной концентрации NaN₃ не проявлял ощутимого ингибирующего воздействия на пероксидазную активность

NaN₃, перехватчик ¹O₂, примерно на 20 % снижал ДАФБ-индуцированное образование H₂O₂. Эти полученные экспериментальные данные подтверждали, что в генерации пероксида водорода принимал участие синглетный кислород. Применение фермента супероксиддисмутаза (СОД) установило, что также O₂^{•-} вносит свой вклад в процесс генерации H₂O₂ под влиянием долгоживущих активных форм белков. При добавлении супероксиддисмутаза происходило

увеличение продукции пероксида водорода примерно на 20 % благодаря протекающей химической реакции дисмутации супероксид анион радикалов. Тирон, который использовался как спиновая ловушка $O_2^{\bullet-}$, уменьшал $[H_2O_2]$ примерно на 30 %. В качестве абсолютного контроля использовали белок-антиоксидант Prx2, который ожидаемо разлагал весь доступный пероксид водорода. Таким образом, в процессе генерации пероксида водорода под действием ДАФБ в сыворотке крови участвуют такие АФК, как синглетный кислород и супероксид анион-радикалы.

Сыворотка крови содержит большое количество антиоксидантов, поэтому для более точной оценки генерации пероксида водорода использовались модельные системы – водные растворы сывороточных белков (БСА и БГГ). Исследовано образование H_2O_2 при воздействии He-Ne лазерного излучения на белковые растворы БСА и БГГ. Зависимость генерации пероксида водорода после воздействия лазерного излучения в течение 15 мин от концентрации БСА и БГГ представлена на Рисунке 13. В случае БГГ зависимость является двухфазной с четко определенным максимумом при концентрации 2 мкМ. Зависимость для БСА также двухфазная, но более уплощенная с максимумом генерации H_2O_2 при концентрации около 10 мкМ. Максимальная концентрация H_2O_2 , которая образовывалась в белковых растворах под действием лазерного излучения, составляла около 4-6 нМ.

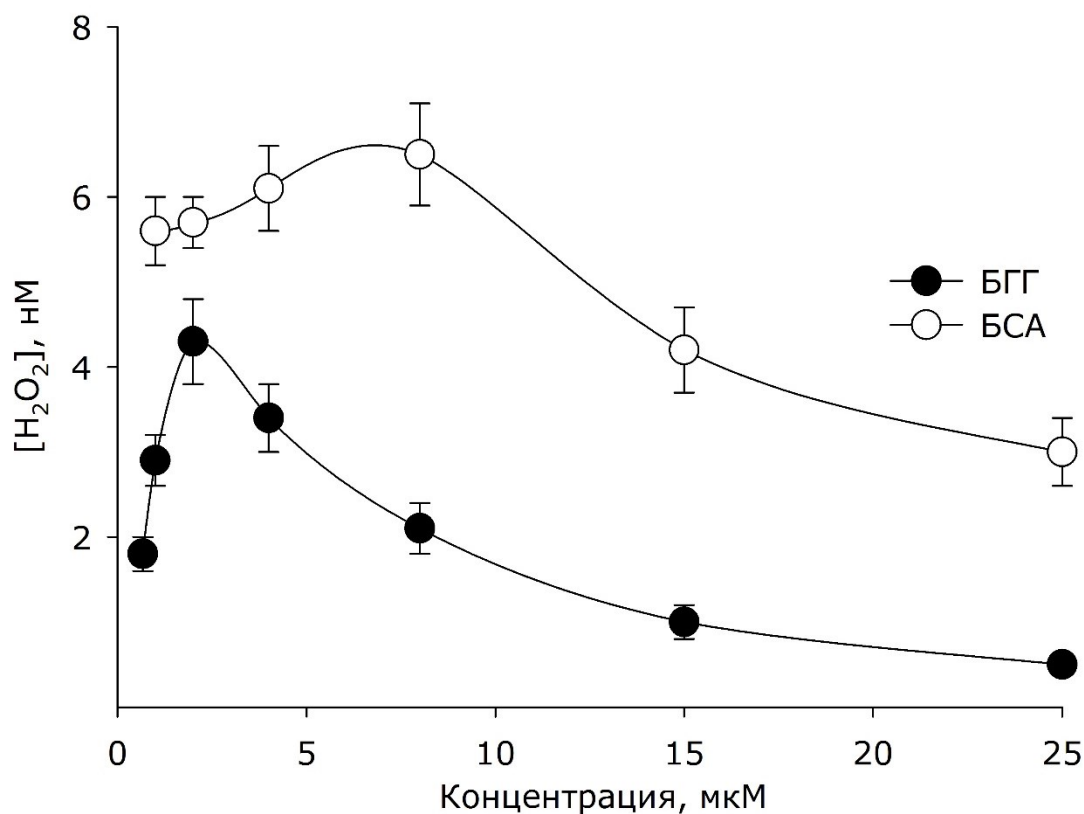


Рисунок 13 – Концентрационная зависимость генерации пероксида водорода в белковых растворах БСА и БГГ, индуцированного низкоинтенсивным лазерным излучением (632,8 нм, 15 мин) (n=3)

Как выше показано, в белковых растворах бычьего сывороточного альбумина и бычьего гамма-глобулина под действием He-Ne лазерного излучения при воздействии на растворы БСА и БГГ лазерного излучения (632,8 нм) генерируется H₂O₂. Доказано, что продукция пероксида водорода при воздействии излучения He-Ne лазера линейно зависит от времени воздействия в интервале от 5 до 30 минут (Рисунок 14). Скорость генерации H₂O₂ в растворах бычьего сывороточного альбумина и бычьего гамма-глобулина составляет примерно 0,4 и 0,3 наномоль в минуту соответственно.

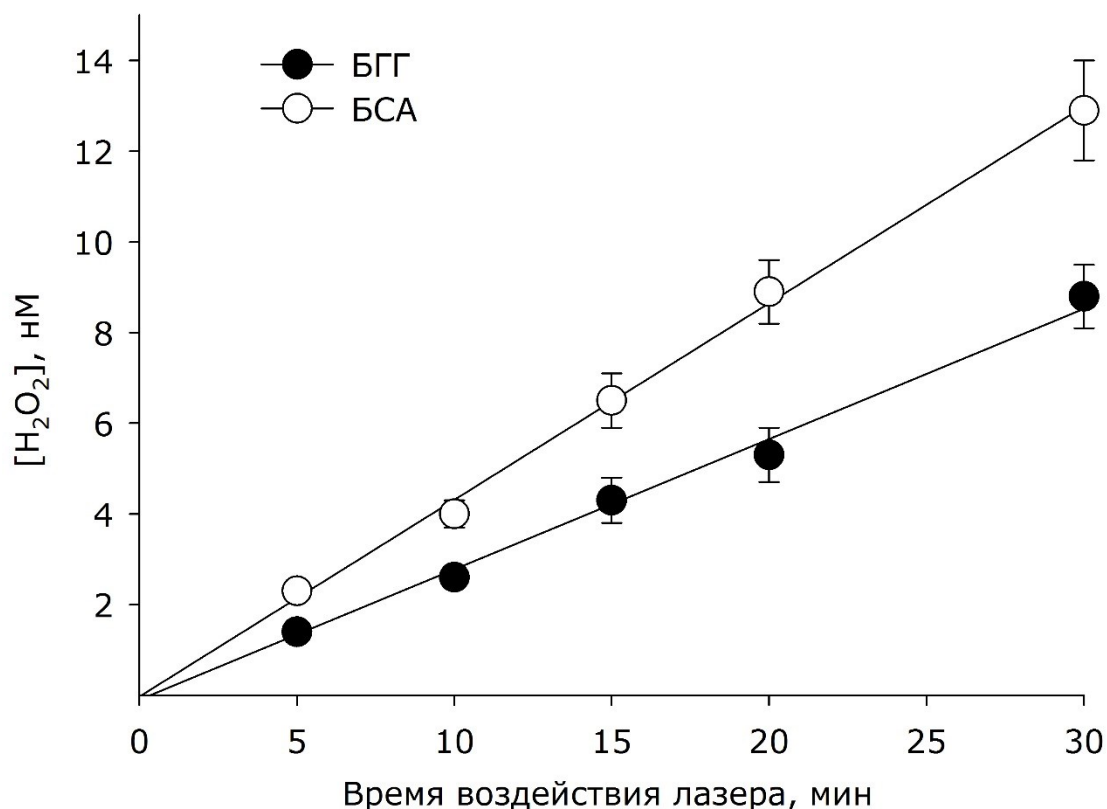


Рисунок 14 – Зависимость генерации пероксида водорода в растворах БСА и БГГ от времени воздействия лазерного излучения (632,8 нМ) (n=3)

Концентрации БСА и БГГ, отвечающие за максимум продукции пероксида водорода, применялись в экспериментах по исследованию концентрации H_2O_2 на протяжении 6 часов после облучения He-Ne лазером (Рисунок 15). Следует отметить, что содержание пероксида водорода в контрольных образцах было максимальным непосредственно после воздействия He-Ne лазерного облучения и затем уменьшалось до показателей фона спустя 6 часов. В случае бычьего сывороточного альбумина отмечалось размеренное повышение содержания пероксида водорода на протяжении 3 часов с дальнейшим его снижением до концентрации 6 нМ. Для раствора бычьего гамма-глобулина продукция пероксида водорода повысилась за 1 ч до концентрации примерно 4 нМ, а затем постепенно уменьшалась.

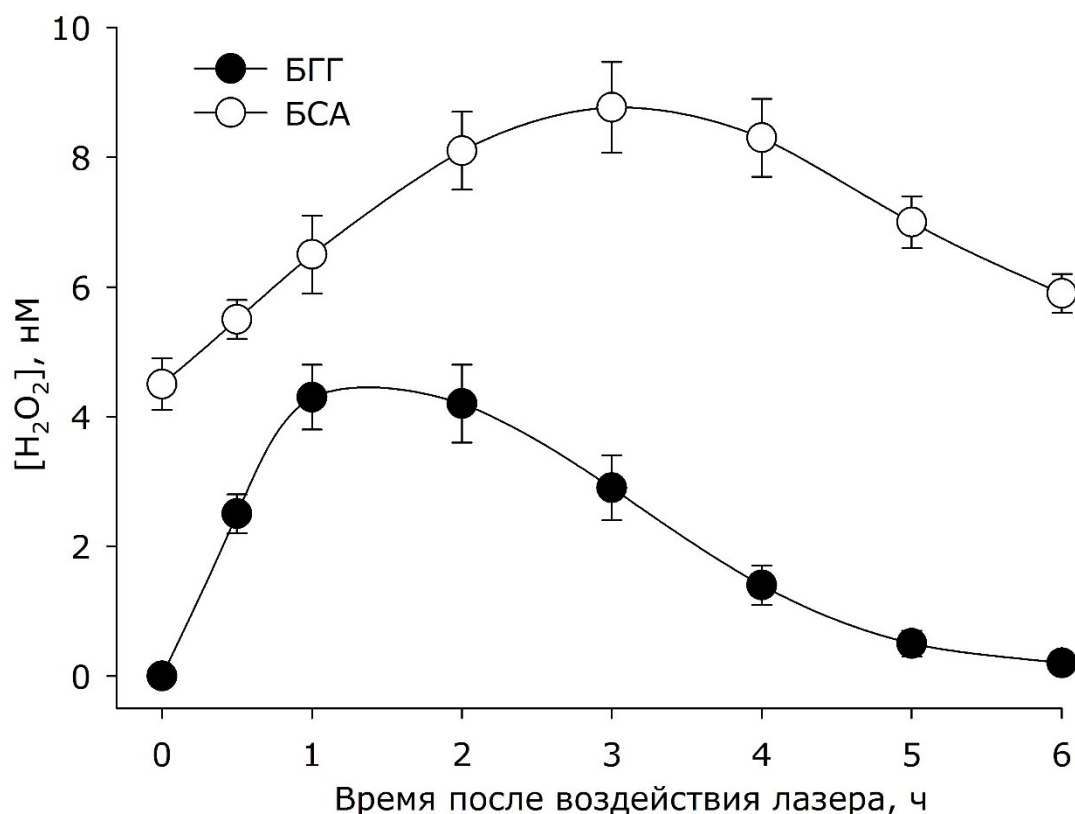


Рисунок 15 – Образование пероксида водорода, индуцированное в растворах БСА (10 мкМ) и БГГ (2 мкМ) через разные промежутки времени после их лазерного облучения (632,8 нм, 15 мин) (n=3)

Используя кумарин-3-карбоновую кислоту (ККК), исследовали генерацию ОН-радикалов после воздействия He-Ne лазерного излучения на растворы бычьего сывороточного альбумина и бычьего гамма-глобулина на протяжении 30 мин. При действии лазерного излучения концентрация 7-ОН-ККК в растворе БСА составляла 3,5 нМ, в растворе БГГ – 5 нМ.

Для исследования процесса генерации H₂O₂ в растворе бычьего сывороточного альбумина при воздействии He-Ne лазера (15 мин) проведен ингибиторный анализ (Таблица 5). Обнаружен светокислородный эффект – воздействие концентрации O₂ в растворе на генерацию H₂O₂ под влиянием долгоживущих активных форм БСА. Концентрация H₂O₂, продуцируемого ДАФБ, в более насыщенном O₂ растворе в 1,6 раза более высокая. В случае барботирования раствора Ag генерация пероксида водорода снижалась примерно

на 40 %. Установлено, что при наличии тяжелой воды в растворе время жизни $^1\text{O}_2$ возрастает [Ryter, Tytgel, 1998]. В белковом растворе, который имел в своем составе тяжелую воду 25 % по объему, $[\text{H}_2\text{O}_2]$ под действием He-Ne лазера возрастала примерно на 30 %.

Таблица 5 – Влияние различных факторов на образование пероксида водорода в растворе БСА с концентрацией 10 мкМ под действием He-Ne лазера (15 мин) (n=3)

Воздействие	$[\text{O}_2]$, мкМ	$\Delta[\text{H}_2\text{O}_2]$, нМ	К
Контроль	270	$6,5 \pm 0,6$	1
Насыщение O_2 **	420	$9,8 \pm 0,8$ *	1,5
Насыщение Ar **	130	$3,8 \pm 0,3$ *	0,6
D_2O (25 об. %)	270	$8,4 \pm 0,6$ *	1,3
NaN_3 (0,1 мкМ) ***	270	$3,8 \pm 0,4$ *	0,6
Тирон (100 нМ)	270	$4,3 \pm 0,2$ *	0,7
Супероксиддисмутаза (0,01 ед./мл)	270	$8,7 \pm 0,6$ *	1,3

Измерение производили через 1 ч.

К – изменение концентрации пероксида водорода при воздействии исследуемого агента по отношению к контролю

* – статистически значимые отличия ($p < 0,05$)

** – раствор БСА перед облучением He-Ne лазером насыщался с помощью барботирования соответствующим газом на протяжении 15 мин

*** – в данной концентрации NaN_3 не проявлял ощутимого ингибирующего воздействия на пероксидазную активность

NaN_3 , перехватчик $^1\text{O}_2$, примерно на 40 % снижал ДАФБ-индуцированное образование пероксида водорода. Эти полученные экспериментальные данные подтверждали, что в генерации H_2O_2 принимал участие синглетный кислород. Применение фермента супероксиддисмутаза (СОД) установило, что также $\text{O}_2^{\bullet-}$

вносит свой вклад в процесс генерации пероксида водорода под влиянием долгоживущих активных форм белков. При добавлении супероксиддисмутазы происходило увеличение продукции H_2O_2 примерно на 30 % благодаря протекающей химической реакции дисмутации супероксид анион радикалов. Тирон, который использовался как спиновая ловушка $\text{O}_2^{\cdot-}$, уменьшал $[\text{H}_2\text{O}_2]$ на 30 %.

Впоследствии изучали образование H_2O_2 , индуцированное ДАФБ в растворах БСА и БГГ под влиянием тепла. Зависимость генерации пероксида водорода после теплового воздействия ($45\text{ }^\circ\text{C}$, 2 ч) от концентрации БСА и БГГ показана на Рисунке 16.

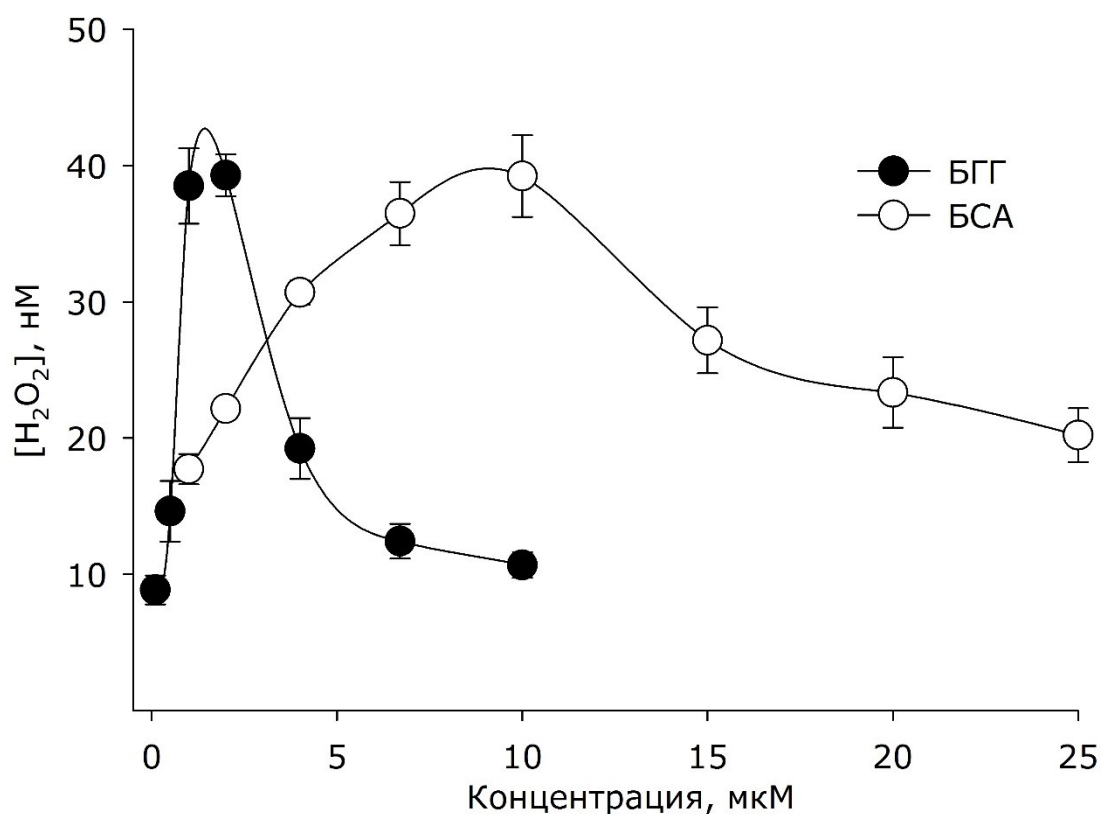


Рисунок 16 – Концентрационная зависимость генерации пероксида водорода в белковых растворах БСА и БГГ, индуцированного нагреванием ($45\text{ }^\circ\text{C}$, 2 ч) ($n=3$)

В растворе бычьего гамма-глобулина отмечалась двухфазная зависимость продукции пероксида водорода, при этом отчетливый максимум был при концентрации БГГ в 1,5 мкМ. Для раствора бычьего сывороточного альбумина двухфазная зависимость являлась менее крутой с предельной генерацией пероксида водорода при концентрации БСА в 10 мкМ. Самая большая концентрация H_2O_2 , которая образовывалась в белковых растворах под действием тепла, составляла около 40 нМ.

Для того чтобы определить механизм образования пероксида водорода в растворе БСА под действием нагревания, был проведен ингибиторный анализ (Таблица 6).

Таблица 6 – Влияние разнообразных факторов на генерацию пероксида водорода в растворе БСА с концентрацией 15 мкМ под действием тепла (45 °С, 2 ч) (n=3)

Воздействие	[O ₂], мкМ	Δ[H ₂ O ₂], нМ	К
Контроль	270	39,2 ± 3,0	1
Насыщение O ₂ **	420	61,7 ± 3,7 *	1,6
Насыщение Ar **	130	23,8 ± 1,6 *	0,6
D ₂ O (25 об. %)	270	47,6 ± 0,8 *	1,2
NaN ₃ (0,1 мкМ) ***	270	28,0 ± 2,6 *	0,7
Тирон (100 нМ)	270	25,5 ± 3,6 *	0,7
Супероксиддисмутаза (0,01 ед./мл)	270	49,3 ± 2,4 *	1,3

Измерение производили через 1 ч.

К – изменение концентрации пероксида водорода при воздействии исследуемого агента по отношению к контролю

* – статистически значимые отличия (p < 0,05)

** – раствор БСА перед нагреванием насыщался с помощью барботирования соответствующим газом на протяжении 15 мин

*** – в данной концентрации NaN₃ не проявлял ощутимого ингибирующего воздействия на пероксидазную активность

Обнаружен светокислородный эффект – воздействие концентрации O_2 в растворе на генерацию H_2O_2 под влиянием долгоживущих активных форм БСА. Концентрация H_2O_2 , продуцируемого ДАФБ, в более насыщенном O_2 растворе в 1,6 раза более высокая. В случае барботирования раствора Ag генерация пероксида водорода снижалась примерно на 40 %. Установлено, что при наличии тяжелой воды в растворе время жизни 1O_2 возрастает [Ryter, Tugtel, 1998]. В белковом растворе, который имел в своем составе тяжелую воду 25 % по объему, $[H_2O_2]$ под действием нагревания возрастала примерно на 20 %. NaN_3 , перехватчик 1O_2 , примерно на 30 % снижал ДАФБ-индуцированное образование пероксида водорода. Эти полученные экспериментальные данные подтверждали, что в генерации H_2O_2 принимал участие синглетный кислород. Применение фермента супероксиддисмутазы (СОД) установило, что также $O_2^{\bullet-}$ вносит свой вклад в процесс генерации пероксида водорода под влиянием долгоживущих активных форм белков. При добавлении супероксиддисмутазы происходило увеличение продукции H_2O_2 примерно на 30 % благодаря протекающей химической реакции дисмутации супероксид анион радикалов. Тирон, который использовался как спиновая ловушка $O_2^{\bullet-}$, уменьшал $[H_2O_2]$ на 30 %.

Найденные концентрации бычьего гамма-глобулина (2 мкМ) и бычьего сывороточного альбумина (10 мкМ), при которых отмечалась наибольшая генерация H_2O_2 , применялись в последующих экспериментах по исследованию генерации H_2O_2 на протяжении 6 часов после нагревания (Рисунок 17). Важно подчеркнуть, что в контрольных образцах (в буфере и воде) содержание пероксида водорода было в среднем 4–5 нМ и снижалось к 6 часам до концентрации 1 нМ. В растворе бычьего сывороточного альбумина прослеживалось размеренное повышение продукции пероксида водорода на протяжении 4 часов и далее стремительное снижение концентрации H_2O_2 до примерно 20 нМ. В растворе бычьего гамма-глобулина увеличение содержания пероксида водорода продолжалось в течение первого часа после нагревания, а дальше постепенно снижалось. Судя по всему, что на протяжении времени полужизни долгоживущих активных форм белков осуществляется значительная

продукция пероксида водорода, вызывающая увеличение концентрации H_2O_2 в исследуемых белковых растворах с дальнейшим процессом распада.

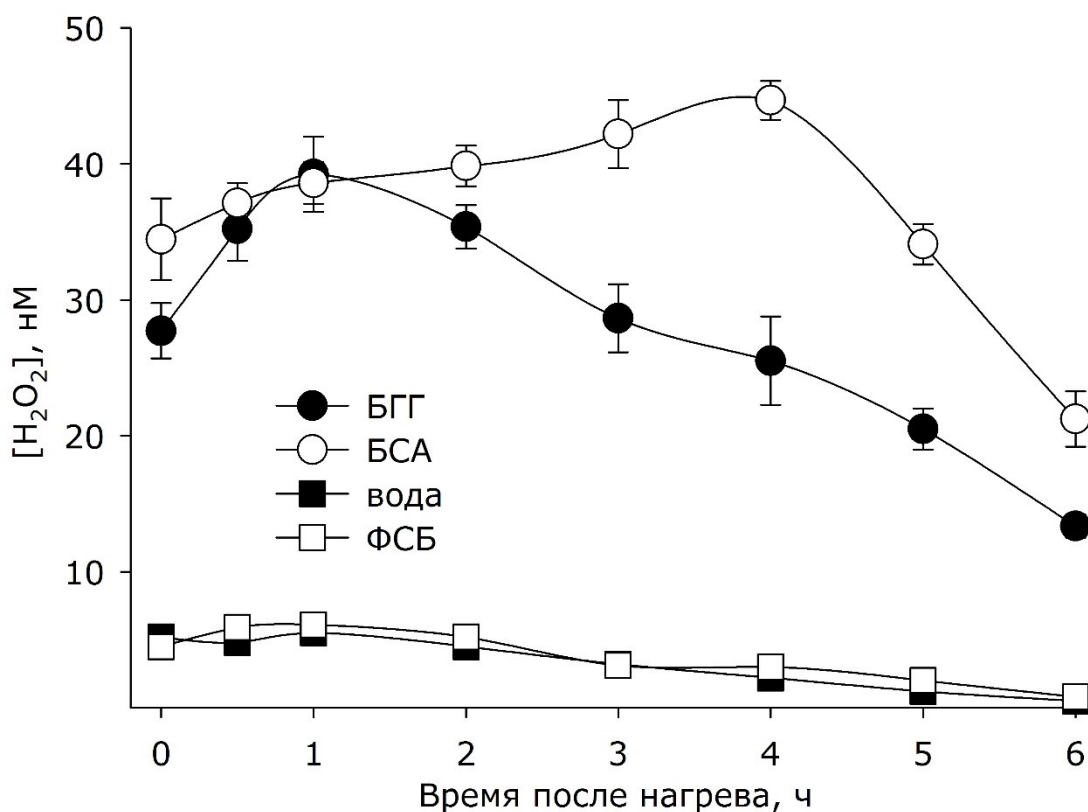


Рисунок 17 – Генерация пероксида водорода, индуцированная в белковых растворах БСА (10 мкМ) и БГГ (2 мкМ) через разные промежутки времени после их нагрева (45 °С, 2 ч) и охлаждения до 25 °С (n=3)

Используя кумарин-3-карбоновую кислоту (ККК), исследовали генерацию ОН-радикалов после воздействия тепла (45 °С) на растворы бычьего сывороточного альбумина и бычьего гамма-глобулина на протяжении 2 ч. После нагревания концентрация 7-ОН-ККК в растворе БСА составляла около 9 нМ, в растворе БГГ – около 15 нМ.

Также была изучена зависимость генерации пероксида водорода в растворах не сывороточных белков (желатин, казеин и его гидролизат) от времени прогревания при температуре 45 °С. Полученные экспериментальные данные представлены на Рисунке 18. На данном графике видно, что с повышением времени прогрева растворов отмечается увеличение генерации H_2O_2 .

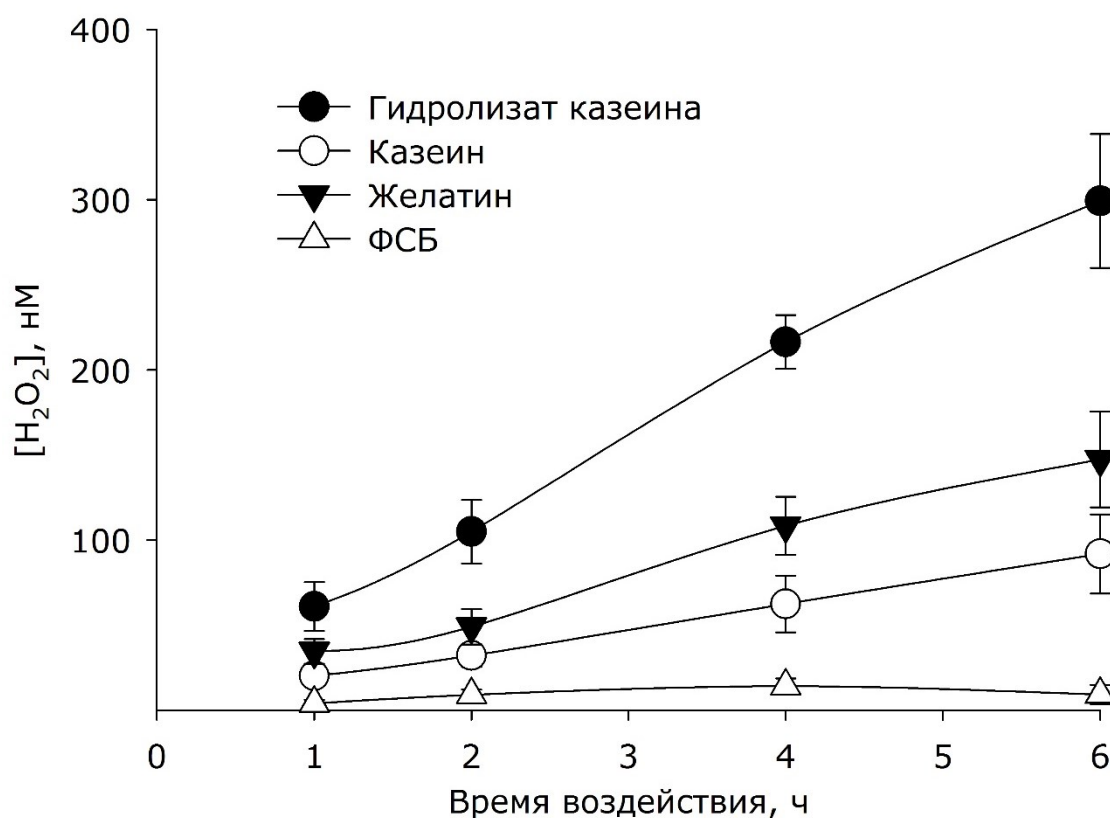


Рисунок 18 – Зависимость образования H_2O_2 в белковых растворах и растворе гидролизата казеина (0,4 г/л) в ФСБ от времени воздействия тепла (45 °С, 1, 2, 4 и 6 ч соответственно). Образцы после нагревания охлаждали до 25 °С (n=4)

Самая большая концентрация пероксида водорода генерировалась при прогревании на протяжении 6 часов. В контрольных образцах содержание H_2O_2 составляло примерно 10 нМ. Скорость генерации H_2O_2 в растворе гидролизата казеина почти 50 нМ/ч, желатина – около 25 нМ/ч и казеина – 15 нМ/ч.

Зависимости продукции пероксида водорода от времени прогрева являются почти линейными.

На Рисунке 19 отображена зависимость генерации пероксида водорода от температуры нагревания в течение 2 часов (30, 37, 40, 45, 50 и 55 °C).

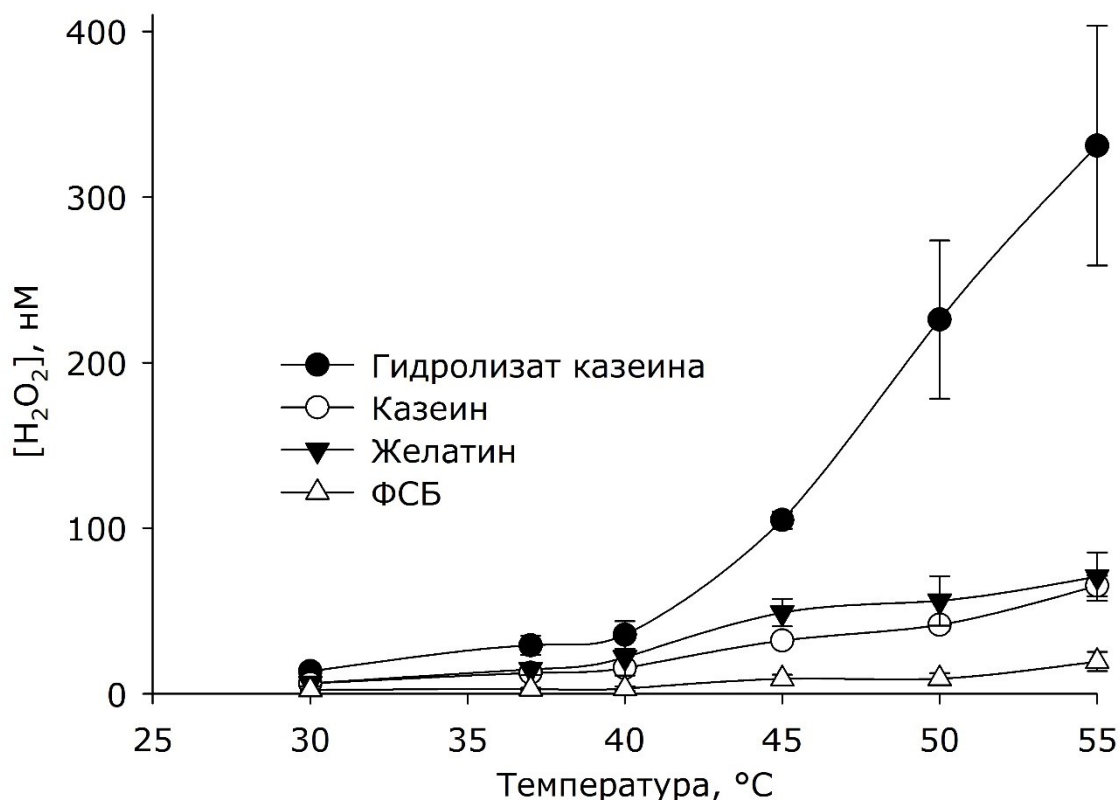


Рисунок 19 – Зависимость образования H₂O₂ в белковых растворах и растворе гидролизата казеина (0,4 г/л) в ФСБ от воздействия тепла (30-55 °C, 2 ч). Образцы после нагревания охлаждали до 25 °C (n=3)

Повышение температуры прогревания в термостате приводит к более активной генерации H₂O₂ в исследованных растворах, наиболее отчетливо выраженная в растворе гидролизата при нагревании более 40 °C. В изученном диапазоне температур содержание пероксида водорода повышалось в растворе гидролизата казеина примерно в 24 раза, в растворе желатина и казеина в 11 раз, а в фосфатно-солевом буфере в среднем в 8 раз.

Для исследования процесса генерации H_2O_2 при прогревании раствора гидролизата казеина и раствора казеина проведен ингибиторный анализ (Таблица 7). Обнаружен светокислородный эффект – воздействие концентрации O_2 в растворе на генерацию H_2O_2 под влиянием долгоживущих активных форм белковых молекул. Концентрация H_2O_2 , продуцируемого ДАФБ, в более насыщенном O_2 растворе в 1,6 раза более высокая. В случае барботирования растворов Ag генерация пероксида водорода снижалась примерно на 40 %. Полученные данные демонстрируют, что изменение продукции H_2O_2 примерно пропорционально концентрации O_2 . Установлено, что при наличии тяжелой воды в растворе время жизни $^1\text{O}_2$ возрастает [Ryter, Tyrrel, 1998]. В изученных растворах, которые имели в своем составе тяжелую воду 25 % по объему, $[\text{H}_2\text{O}_2]$ при прогревании возрастала примерно на 20 %.

NaN_3 , перехватчик $^1\text{O}_2$, примерно на 30-35 % снижал ДАФБ-индуцированное образование пероксида водорода. Эти полученные экспериментальные данные подтверждали, что в генерации H_2O_2 принимал участие синглетный кислород. Применение фермента супероксиддисмутазы (СОД) установило, что также $\text{O}_2^{\cdot-}$ вносит свой вклад в процесс генерации пероксида водорода под влиянием долгоживущих активных форм белков. При добавлении супероксиддисмутазы происходило увеличение продукции H_2O_2 примерно на 20-25 % благодаря протекающей химической реакции дисмутации супероксид анион радикалов. Тирон, который использовался как спиновая ловушка $\text{O}_2^{\cdot-}$, уменьшал $[\text{H}_2\text{O}_2]$ приблизительно на 20 %.

Таблица 7 – Влияние разнообразных факторов на генерацию пероксида водорода в растворе казеина и в растворе гидролизата казеина при нагревании (2 ч, 45 °C) (n=3)

Воздействие	[O ₂], мкМ	Δ[H ₂ O ₂], нМ		К	
		Казеин	Гидролизат казеина	Казеин	Гидролизат казеина
Контроль	270	32,1 ± 1,4	104,9 ± 3,4	1	1
O ₂ **	420	51,6 ± 2,6*	168,0 ± 4,5*	1,61	1,6
Ar**	130	19,8 ± 0,9*	63,8 ± 2,2*	0,62	0,61
D ₂ O (25 об. %)	270	38,4 ± 1,3*	127,6 ± 3,1*	1,2	1,22
NaN ₃ (0,1мМ)***	270	22,8 ± 0,8*	68,9 ± 3,0*	0,71	0,66
Супероксиддисмутаза (0,01 ед./мл)	270	39,9 ± 2,5*	127,3 ± 2,7*	1,24	1,21
Тирон (100 нМ)	270	25,7 ± 1,3*	80,5 ± 2,6*	0,8	0,77
Prx2 (10 ⁻² ед./мл)	270	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	—	

К – изменение концентрации пероксида водорода при воздействии исследуемого агента по отношению к контролю

* – статистически значимые отличия (p < 0,05)

** – растворы казеина и гидролизата казеина перед нагреванием насыщались с помощью барботирования соответствующим газом на протяжении 15 мин

*** – в данной концентрации NaN₃ не проявлял ощутимого ингибирующего воздействия на пероксидазную активность

Найденные концентрации казеина, гидролизата казеина и желатина, а именно 0,4 г/л, при которых отмечалась наибольшая генерация H_2O_2 , применялись в последующих экспериментах по исследованию продукции H_2O_2 на протяжении 23 часов после прогревания (2 ч, 45 °C) (Рисунок 20).

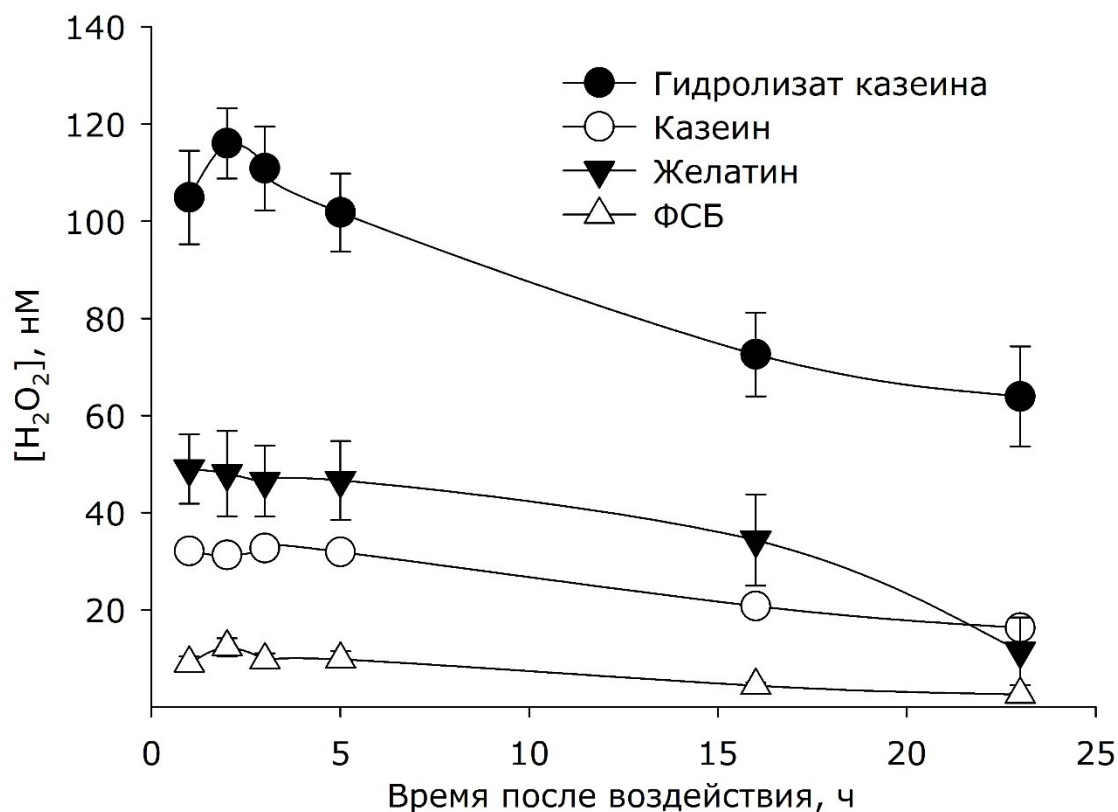


Рисунок 20 – Образование пероксида водорода, индуцированное в растворах белков и гидролизата казеина (0,4 г/л) в ФСБ через разные промежутки времени после их нагрева (45 °C, 2 ч) и охлаждения до 25 °C (n=3-6)

В контрольных образцах (фосфатно-солевом буфере) концентрация пероксида водорода была примерно 10 нМ и снижалась к 23 часам до 2-3 нМ. Для казеина прослеживалось размеренное повышение содержания пероксида водорода на протяжении 3 часов примерно до 33 нМ, после чего плавное его снижение к 23 часам до около 16 нМ. В растворе гидролизата казеина наблюдалось увеличение

продукции пероксида водорода в течение 2 часов примерно до 115 нМ с дальнейшим падением к 23 часам примерно до 65 нМ.

Судя по всему, что на протяжении времени полужизни долгоживущих активных форм белков осуществляется значительная продукция пероксида водорода, вызывающая увеличение концентрации H_2O_2 в исследуемых белковых растворах с дальнейшим процессом распада. Временная зависимость генерации H_2O_2 для желатина кардинально другая. По всем видимости, это может быть объяснено структурой самого желатина. Известно, что желатин представляет из себя частично гидролизированный белок коллаген, принадлежащий к группе склеропотеинов. Данный факт заслуживает последующего более тщательного изучения.

Таким образом, впервые показано, что долгоживущие активные формы белков, индуцированные теплом и оптическим электромагнитным излучением, способны приводить к длительной генерации пероксида водорода и образованию гидроксильного радикала. Как при воздействии He-Ne лазерного излучения, так и при действии тепла, с уменьшением концентрации сыворотки крови и растворов белков отмечалось снижение скорости продукции H_2O_2 . Определено, что скорость генерации H_2O_2 в растворе бычьего сывороточного альбумина примерно 0,4 нМ в минуту и в растворе бычьего гамма-глобулина – 0,3 нМ в минуту. С помощью ингибиторного анализа показано, что в процессе генерации пероксида водорода ДАФБ в сыворотке крови и водных растворах белков участвуют супероксид анион-радикал и синглетный кислород.

3.3. Генотоксическое действие долгоживущих активных форм белков, индуцированных теплом и оптическим электромагнитным излучением

Известно, что ДАФБ способны повреждать другие биомолекулы. При этом для живой системы наиболее существенным является повреждение молекул ДНК. Среди всех повреждений ДНК, 8-оксогуанин является наиболее распространенным, его по праву считают ключевым биомаркером окислительных повреждений ДНК [Bruskov et al., 2002a; Chernikov et al., 2017]. Способность сыворотки крови, подвергнутой воздействию лазерного излучения или тепла, приводить в модельной системе к образованию 8-оксогуанина в ДНК, представлена на Рисунке 21. Показано, что при инкубации сыворотки крови, подвергнутой лазерному воздействию, с ДНК образовалось около 31 молекулы 8-оксогуанина на миллион молекул гуанинов в ДНК (Рисунок 21 А, столбец 2). В случае, когда сыворотку крови подвергали гипертермии, наблюдалось образование порядка 14 молекул 8-оксогуанина на миллион молекул гуанинов в ДНК (Рисунок 21 А, столбец 3). Нужно отметить, что используемая в качестве контролей нативная сыворотка крови не приводила к появлению повреждений ДНК. В качестве сравнения использовали ДНК, подвергнутую воздействию ионизирующей радиации (Рисунок 21 А, столбец 1), в этом случае образовалось порядка 78 молекул 8-оксогуанина на миллион молекул гуанинов в ДНК. Линейная зависимость наблюдалась в диапазоне доз от 5 до 20 Гр (Рисунок 21 Б).

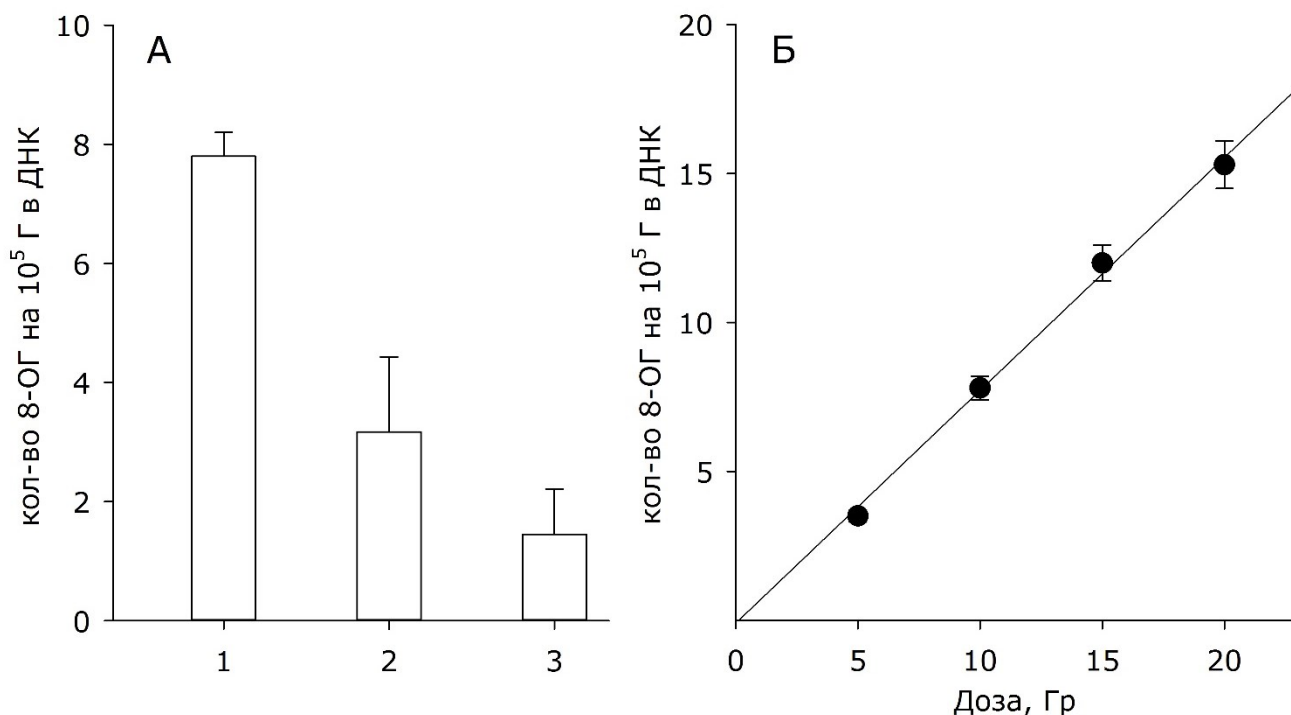


Рисунок 21 – Влияние сыворотки крови, подвергнутой воздействию лазерного излучения (632,8 нм, 30 мин) или тепла (45°C, 2 ч), на образование 8-оксогуанина (8-ОГ) в ДНК *in vitro* (А). 1 – Воздействие на ДНК ионизирующей радиации в дозе 10 Гр. 2 – инкубация ДНК в течение 2 ч с сывороткой крови, подвергнутой воздействию *He-Ne* лазера. 3 – инкубация ДНК в течение 2 ч с сывороткой крови, подвергнутой воздействию тепла. Зависимость генерации 8-оксогуанина в ДНК от поглощенной дозы ионизирующего излучения *in vitro* (Б). Соотношение молекулярных масс белок : ДНК приблизительно 1 : 10 (n=3)

Как мы показали выше, ДАФБ могут повреждать молекулы ДНК в модельных условиях. Однако могут ли ДАФБ сыворотки крови повреждать молекулы ДНК непосредственно в живых системах, остается не выясненным. Система кроветворения является высокочувствительной к действию окислительного стресса. Одним из наиболее изученных и применяемых показателей поврежденности кроветворной системы является образование микроядер в клетках-предшественниках эритроцитов. На Рисунке 22 представлено влияние сыворотки крови, подвергнутой воздействию *He-Ne* лазера или гипертермии, на образование микроядер в полихроматофильных эритроцитах мышей *in vivo*.

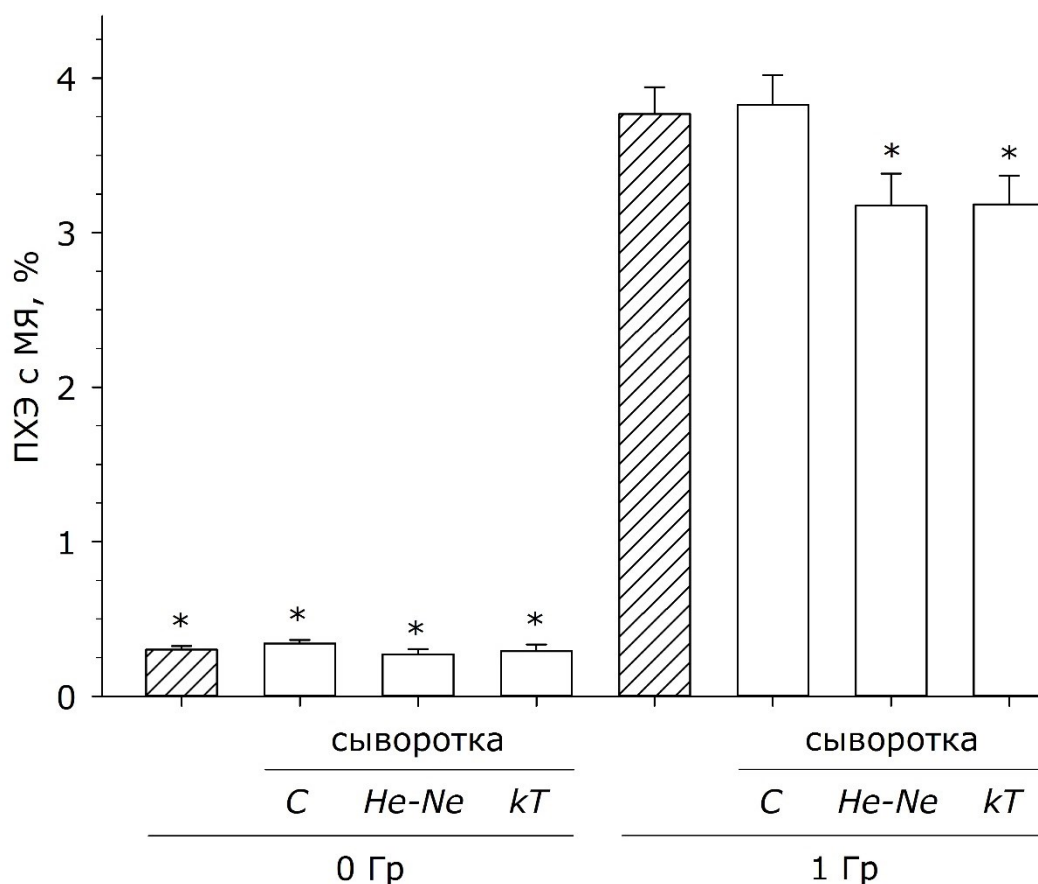


Рисунок 22 – Влияние сыворотки крови, подвергнутой воздействию *He-Ne* лазера (30 мин) и гипертермии (45°C, 2 ч), на образование микроядер в полихроматофильных эритроцитах мышей *in vivo*. Нативную или подвергнутую физическим воздействиям сыворотку крови вводили мышам внутривенно в конечной концентрации 5 мг/г. *C* – мышам вводилась нативная не подвергнутая воздействию сыворотка. *He-Ne* – вводилась сыворотка, на которую воздействовали лазерным излучением (632,8 нм, 30 мин). *kT* – вводилась сыворотка, подвергнутая воздействию тепла (45 °C, 2 ч). Штриховка обозначает группу мышей, не получавших экзогенную сыворотку (n=5)

* – статистически значимые отличия от контроля (1 Gr) ($p < 0,05$)

Сыворотки крови обладают способностью вызывать различные иммунные реакции, поэтому в качестве контроля мы использовали интактную сыворотку крови. Было показано, что введение как интактной, так и обработанной физическими факторами сыворотки не приводит к увеличению количества микроядер в полихроматофильных эритроцитах мышей. Живые организмы обладают способностью к репарации, и поскольку нам не удалось обнаружить

влияние сывороток крови, мы использовали метод «проявляющей дозы». Метод позволяет опосредованно изучать слабые воздействия на биологические системы. Суть заключается в изучении слабого воздействия на фоне более сильного. Обычно вначале на живую систему влияют слабым воздействием, а спустя 5–8 часов сильным. Если слабое воздействие влияет на изучаемый фактор, то через некоторое время развивается устойчивость к поражающему действию сильного воздействия в результате адаптивного эффекта. На Рисунке 22 показано, что облучение мышей в дозе 1 Гр существенно увеличивало количество полихроматофильных эритроцитов, содержащих микроядра. Введение нативной сыворотки крови существенно не изменяло ситуацию, а вот введение мышам сывороток крови, подвергнутых воздействию лазерного излучения или тепла, приводило к развитию адаптивного эффекта, уменьшая количество полихроматофильных эритроцитов с микроядрами в среднем на 15 %.

ОБСУЖДЕНИЕ

В норме сыворотка крови содержит большое количество антиоксидантов. Это и высокомолекулярные соединения, такие ферменты, как экстрацеллюлярная СОД, каталаза и глутатион пероксидаза и т. д. и низкомолекулярные, такие, как глутатион, токоферол, аскорбат, ряд свободных нуклеозидов, серосодержащих аминокислот и т. д. [Zakharova et al., 2018]. Предполагалось, что наличие такого большого количества антиоксидантов в сыворотке крови препятствует образованию ДАФБ в нативных условиях. Нами было показано, что это не так (Рисунок 1, Рисунок 2). В сыворотке крови образуются ДАФБ, причем время их полужизни сопоставимо с временем ДАФБ, зарегистрированных на очищенных белках [Гудков и др., 2007; Гудков и др., 2010; Bruskov et al., 2012; Garmash et al., 2014].

Раньше показано, что продолжительное облучение растворов иммуноглобулинов ультрафиолетовым излучением низкой интенсивности при 312 нм приводит к образованию пероксида водорода из растворенного в белковом растворе молекулярного кислорода [Wentworth et al., 2001]. Авторы предполагали, что ключевым этапом этого процесса является переход O_2 из основного в синглетное состояние [Wentworth et al., 2001]. В этих экспериментах интенсивное образование пероксида водорода под действием ультрафиолета наблюдалось только в растворах гамма-глобулинов, но не наблюдалось в случае других белков. В наших экспериментах растворы белков и растворы сыворотки крови активировали излучением He-Ne лазером ($\lambda \approx 633$ нм) и воздействием повышенных температур. При этом происходило образование H_2O_2 (Рисунки 11-13, 15-17, 19, 20). В наших экспериментах не наблюдалось более выраженной способности бычьего гамма-глобулина генерировать пероксид водорода в сравнении с бычьим сывороточным альбумином (Рисунки 13 и 15). В работе американских и канадских ученых установлено, что активация белковых молекул при воздействии ультрафиолетовых лучей, которая сопровождается образованием

АФК, формируется за счет возбуждения аминокислот ароматического ряда, однако существенных отличий в этом между БГГ и БСА не выявлено [Chin et al., 2008]. Аналогичные данные были получены и при активации белков сыворотки крови теплом [Bruskov et al., 2014].

В данной работе показано, что зависимости сигнала люминесценции растворов белков (Рисунок 3) и образования пероксида водорода (Рисунок 13) под действием лазерного излучения от концентрации белка являются двухфазными с максимумом при определенной концентрации белка. Данный комплексный двухфазный характер зависимостей указывает на существование двух конкурирующих процессов. Такими процессами могут быть как генерация АФК и ДАФБ, так и их нейтрализация, в зависимости от концентрации белка в растворе. Первоначально с увеличением концентрации белка при облучении лазером доминирует процесс генерации АФК за счет образования ДАФБ. Однако, когда превышает определенная концентрация белка, начинают преобладать процессы нейтрализации АФК, в частности пероксида водорода. В случае хемилюминесценции уменьшение интенсивности может быть вызвано дополнительным рассеянием или поглощением оптического излучения. С увеличением концентрации белка в растворе до 10-20 мкМ и более наблюдается значительное рассеяние/поглощение оптического излучения. Этот феномен в растворе БСА при концентрации 50 мкМ уменьшает интенсивность люминесценции примерно на 5–10 % [Bruskov et al., 2012].

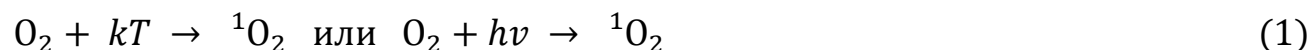
Следует отметить, что кинетика генерации пероксида водорода под действием лазерного излучения, гипертермии и ионизирующей радиации существенно отличается [Гудков и др., 2010; Karp et al., 2010; Bruskov et al., 2012; Bruskov et al., 2014; Ivanov et al., 2017]. У радиационно-индуцированных ДАФБ наблюдается почти экспоненциальное уменьшение скорости генерации пероксида водорода после окончания воздействия. В случае ДАФБ, индуцированных лазерным излучением или теплом, скорость генерации пероксида водорода после окончания воздействия существенным образом не уменьшается в течение нескольких часов и даже в некоторых случаях несколько возрастает (Рисунок 11).

Это вероятно связано с различным соотношением отдельных видов активных форм кислорода, генерируемых с одной стороны при радиоллизе воды [Guryev et al., 2018], а с другой при воздействии оптического излучения с длинами волн, соответствующими линиям поглощения молекулярного кислорода [Gudkov et al., 2011; Гудков и др., 2012] и гипертермии [Ahn, Chung, 2012]. В результате вклады двух возможных способов производства пероксида водорода, вследствие рекомбинации ОН-радикалов и дисмутации гидропероксидных радикалов, могут быть различны [Bruskov et al., 2002б; Черников и др., 2007; Штаркман и др., 2008а; Гудков и др., 2012].

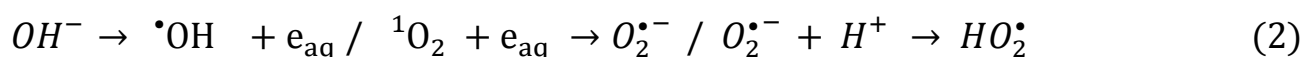
Учитывая данные таблиц 4-7, а также результаты исследования содержания $\cdot\text{OH}$ можно сделать вывод, что в ДАФБ-продуцированном процессе образования H_2O_2 принимают участие гидроксильные радикалы, синглетный кислород и гидропероксидные радикалы. Подразумевается, что генерация активных форм кислорода под действием низкоинтенсивных физических факторов может быть в существенной мере связана с высвобождением лишней энергии в виде поверхностного натяжения воды в пузырьках воздуха размером от 10 до 100 нм [Бункин, Бункин, 2016]. Данная энергия высвобождается посредством нормальных высокоэнергетических реакций вследствие схлопывания нанопузырьков при воздействии различных излучений точно так же, как и под влиянием ультразвука [Didenko, Suslick, 2002]. Имеются основания полагать, что сходные реакции могут протекать и при тепловом воздействии [Bruskov et al., 2002б; Черников, Брусков, 2002]. Стартовым механизмом коллапса нанопузырьков воздуха, по всей видимости, считается возбуждение молекулы O_2 в линиях его перехода из основного триплетного состояния в синглетное состояние, обуславливающее возникновение электромагнитного возмущения местного характера [Zakharov et al., 2014].

Принимая во внимание продукцию АФК в водных растворах при воздействии гипертермии [Gudkov et al., 2011; Брусков и др., 2002; Bruskov et al., 2002б; Черников, Брусков, 2002; Брусков и др., 2003; Смирнова и др., 2005; Черников и др., 2007; Штаркман и др., 2008б] и оптических излучений с длинами

волн, соответствующими линиям поглощения молекулярного кислорода [Гудков и др., 2012; Черников, Брусков, 2002; Смирнова и др., 2005; Штаркман и др., 2008a], возможно представить нижеуказанную цепочку связанных химических реакций, вызывающих генерацию долгоживущих активных форм белковых молекул и H_2O_2 в растворах белков:

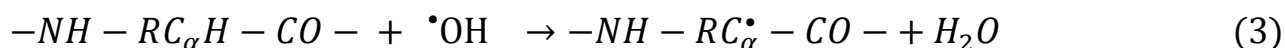


где $h\nu$ – квант энергии электромагнитного излучения, соответствующий переходу кислорода в синглетное состояние [Zakharov et al., 2014], а kT – тепловая энергия [Ahn, Chung, 2012].



где e_{aq} – гидратированный электрон. Механизм диссоциации гидроксильного аниона рассмотрен ранее, как теоретически [Клосс, 1988], так и экспериментально [Фомин и др., 1964].

Взаимодействие гидроксильного радикала с Н альфа-углеродного атома белковой цепочки спровоцирует его отрыв и формирование альфа-углеродного радикала [Hawkins, Davies, 2001]:



Химическая реакция с молекулой кислорода вызывает генерацию белкового пероксильного радикала [Davies, 2005]:



После этого осуществляется реакция элиминации гидропероксидного радикала



и генерация H_2O_2 вследствие реакции дисмутации $HO_2^{\cdot}$:



Пол Вентворт с коллегами установили, что антитела могут выступать в качестве катализаторов химического преобразования 1O_2 в водном растворе с генерацией H_2O_2 через H_2O_3 как центральный промежуточный продукт [Wentworth et al., 2003; Zhu et al., 2004]. В экспериментах, проведенных в рамках

данной диссертационной работы, доказано участие $^1\text{O}_2$, $\cdot\text{OH}$, $\text{HO}_2\cdot$ в генерации H_2O_2 . Установлено, что α -углеродный радикал формируется также при отщеплении H^+ от различных боковых цепей бета-, гамма-и дельта-групп аминокислотных остатков из-за переноса радикала на альфа-углерод белковой молекулы по причине особой стабильности радикала на альфа-углероде вследствие делокализации e^- [Lindquist, Craig, 1988; Davies, 2005].

В результате обнаружено ранее неизвестная основополагающая особенность белков сыворотки: при воздействии излучения He-Ne лазера или при умеренном нагревании с участием O_2 в растворе, они способны трансформироваться в долгоживущие активные формы, в дальнейшем вызывающие продукцию H_2O_2 на протяжении долгого временного промежутка из-за связанных электрон-радикальных химических реакций [Chin et al., 2008; Bruskov et al., 2012]. Не исключено, что продукция ДАФБ, генерированных теплом или оптическим электромагнитным излучением или теплом ДАФБ характерна не только для сывороточных белков, но и свойственна подавляющему большинству различных полипептидов, как и при воздействии ионизирующего излучения [Bruskov et al., 2012]. Однако каждый белок обладает специфическими особенностями в образовании различных окисленных продуктов, которые опосредованы структурой как полипептидной цепи (основной цепи), так и боковых цепочек аминокислот [Davies, 2005]. Наиболее уязвимыми аминокислотными остатками к окислению в белке являются Cys, Tyr, Trp, His и Met [Штаркман и др., 2008a]. Известно, что некоторые из них могут привести к появлению хемилюминесценции с периодом полураспада в несколько минут. Например, с использованием ЭПР-спектроскопии обнаружено образование триптофан- [S. Gebicki, J.M. Gebicki, 1999] и тирозин-центрированных [Pietraforte, Minetti, 1997a] радикалов в белках плазмы крови человека. Период полураспада сигнала ЭПР составлял около 13 мин. В этом исследовании измерения проводились через 1 ч после воздействия, поэтому вклад относительно короткоживущих активных форм белков не рассматривается.

Наряду с окислением наиболее чувствительных аминокислот, таких как цистеин и метионин [Davies, 2016], карбонилирование является наиболее распространенной окислительной модификацией белков, часто используемой в качестве биомаркера для их реакции с АФК при окислительном стрессе. Накопление окислительного повреждения в белках изменяет их свойства и каталитические активности, что приводит к нарушению клеточных функций и может быть причиной некоторых заболеваний, вызванных окислительным стрессом [Dalle-Donne et al., 2006; Requena et al., 2003]. Процесс окисления белковых молекул АФК дает высокореактивные карбонильные производные, получающиеся либо от окисления боковых цепочек лизина, аргинина, пролина и треониновых остатков, либо от расщепления пептидных связей [Ahmad et al., 2017]. Однако основные карбонильные продукты образуются при окислении аргинина, пролина и лизина [Requena et al., 2003].

Известно, что у млекопитающих пероксид водорода выступает в качестве вторичного мессенджера в концентрациях от нескольких единиц до сотен наномоль на литр [Stone, Yang, 2006; Sies et al., 2017]. Если сравнивать концентрации пероксида водорода, образующиеся при действии ДАФБ, индуцированных лазерным излучением и ионизирующей радиацией, то концентрация порядка 20 нМ, показанная в данной работе, образуется при дозе 0,25 Гр ($10 \text{ нМ} \approx 0,15 \text{ Гр}$). Необходимо отметить, что в проведенных исследованиях измеряется среднее содержание H_2O_2 в весьма разбавленных белковых растворах. Одновременно с этим локальная генерация пероксида водорода рядом с белковой молекулой, вероятно, значительно сильнее. Из расчета того, что концентрация сывороточных белков в организме млекопитающих и человека более чем на два порядка выше, чем концентрации БСА и БГГ, использованные в данных экспериментах, оценки, полученные с помощью экстраполяции, показывают, что долговременная генерация H_2O_2 под действием активированных лазерным излучением или теплом сывороточных белков в естественных условиях может достигать даже микромолярных концентраций. В данной работе выявлен повреждающий потенциал ДАФБ, как *in vitro* (Рисунок

21), так и *in vivo* (Рисунок 22). ДАФБ являются одной из форм окисленных модификаций белков, приводящие к их фрагментации и агрегации, а также генерации АФК и продлению окислительного стресса. Таким образом, оптическое воздействие с длинами волн, соответствующими линиям поглощения молекулярного кислорода, и умеренная гипертермия во время физиотерапевтических процедур в медицинской практике может сопровождаться образованием ДАФБ [Gudkov et al., 2017]. В свою очередь пероксид водорода, генерируемый под действием ДАФБ, способен участвовать в сигнальных путях и вызывать адаптивную реакцию у людей [Stone, Yang, 2006; Giorgio et al., 2007; Silachev et al., 2014; Bretón-Romero, Lamas, 2014; van der Vliet, Janssen-Heininger, 2014; Simon et al., 2016; Smirnova et al., 2018; Zakharova et al., 2018]. Считается, что белки являются сенсорами, предупреждающими клетки о начале развития окислительного стресса. Они связаны с различными внутриклеточными сигнальными каскадами, участвующими в регуляции экспрессии про- и антиоксидантных генов, и служат связующим звеном между окислительным повреждением клеток и системами антиоксидантной защиты [Gaitanaki et al., 2003; Nguyen et al., 2009; Durackova, 2010; Done, Traustadottir, 2016].

Таким образом, изменение содержания H_2O_2 и образование ДАФБ под влиянием тепла и низкоинтенсивного лазерного излучения может являться существенным фактором терапевтического результата и адаптивного эффекта из-за возникающих регуляторных механизмов, которые обусловлены образованием пероксида водорода. Несмотря на это, нужно иметь в виду, что индуцируемое оптическим излучением или теплом образование активных форм кислорода, которое превышает уровень антиоксидантной и репарационной систем клеток, может сопровождаться продолжительным окислительным стрессом и риском отдаленных патологических последствий, подобно воздействию ионизирующей радиации. Таким образом, возникает медико-биологическая проблема, связанная с нормализацией уровня локального воздействия такого лазерного излучения для безопасного использования на организм человека, как это реализовано в случае ионизирующего излучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной диссертационной работе представлены полученные результаты исследования возможности генерации долгоживущих активных форм белков, индуцированных теплом и оптическим излучением с длинами волн, соответствующими линиям поглощения молекулярного кислорода, а также их способности к длительной генерации АФК, в том числе пероксида водорода.

В Главе 3.1. работы с помощью метода индуцированной хемилюминесценции в белковых растворах и растворе сыворотки крови под действием лазерного излучения или тепла зарегистрировано образование ДАФБ. Установлено, что время полужизни ДАФБ (в растворах сыворотки крови, БСА, БГГ, желатина, казеина и гидролизата казеина) равняется приблизительно 4-5 часам при воздействии He-Ne лазерного излучения или умеренного нагревания. Также показана зависимость сигнала люминесценции исследованных растворов белков от содержания O_2 (кислородный эффект).

В Главе 3.2. с помощью метода усиленной люминесценции исследована способность индуцированных теплом и лазерным излучением ДАФБ генерировать в растворе активные формы кислорода, в том числе и H_2O_2 как самую стабильную форму АФК. Впервые обнаружено, что при воздействии умеренной гипертермии и He-Ne лазерного излучения на растворы исследованных белков и сыворотки происходит образование пероксида водорода. Установлена зависимость образования пероксида водорода под влиянием ДАФБ при различных временах после воздействия. Используя кумарин-3-карбоновую кислоту (ККК), исследовали генерацию ОН-радикалов в белковых растворах после воздействия на них лазерного излучения или тепла. Полученные данные проведенных экспериментов доказывают, что ДАФБ, продуцированные нагреванием или излучением He-Ne лазера, имеют одинаковый период полураспада в растворе около четырех-пяти часов и способны длительно генерировать АФК.

В Главе 3.3. представлены результаты, полученные методом иммуноферментного анализа с использованием моноклональных антител. Исследована способность сыворотки крови, подвергнутой воздействию *He-Ne* лазера или гипертермии, приводить в модельной системе к образованию 8-оксогуанина в ДНК. Методом микроядерного теста показано, что введение как интактной, так и обработанной физическими факторами сыворотки крови не приводит к увеличению концентрации микроядер в полихроматофильных эритроцитах мышей. Методом «проявляющей дозы» установлено, что введение мышам сывороток крови, подвергнутых воздействию лазерного излучения или гипертермии, приводит развитию адаптивного эффекта, уменьшая количество полихроматофильных эритроцитов с микроядрами в среднем на 15 %.

Таким образом, установлено, что в растворах сыворотки крови и растворах БСА, БГГ, желатина, казеина и его гидролизата при воздействии умеренного нагревания или излучения *He-Ne* лазера осуществляется генерация ДАФБ, которые на следующем этапе продуцируют активные формы кислорода и разобраны возможные биофизические механизмы данного процесса. Результаты проведенных исследований дают право полагать, что это ранее неизвестная фундаментальная особенность подавляющего большинства различных полипептидов.

В настоящее время в медицинской практике широко используется излучение гелий-неонового лазера и умеренная гипертермия при физиотерапевтических лечебных процедурах. Однако молекулярные механизмы их полезного действия остаются не выясненными. Наши результаты позволяют предполагать, что это может быть обусловлено генерацией ДАФБ и сигнальной регуляторной ролью образования пероксида водорода, который вызывает стимуляцию защитных и репарационных систем в клетках организма. Однако, это возможно только при низкоинтенсивных и непродолжительных воздействиях гелий-неонового лазера или теплового воздействия. Поскольку при этом образуются высокореакционные радикальные продукты, как и при ионизирующем излучении, их высокие дозы будут приводить к повреждающим

последствиям, аналогичным радиационному воздействию. В результате возникает новая медико-биологическая проблема выработки научно обоснованных норм безопасности таких воздействий для людей, аналогичных нормам радиационной безопасности. Эта проблема требует продолжения исследований влияния данных излучений на биологические системы и процессы уже на клеточном, тканевом и организменном уровне.

ВЫВОДЫ

На основании проведенной диссертационной работы можно сформулировать следующие выводы:

1. Показано, что в растворах бычьего сывороточного альбумина, гамма-глобулина, желатина, казеина и гидролизата казеина и в растворах сыворотки крови под действием тепла и оптического электромагнитного излучения происходит образование долгоживущих активных форм белков с временами полужизни около 4–5 ч.

2. Установлено, что долгоживущие активные формы белков, индуцированных теплом и оптическим электромагнитным излучением, способны длительно генерировать H_2O_2 . Показано, что в процессе генерации H_2O_2 участвуют синглетный кислород, гидроксильный и супероксид анион-радикалы

3. Долгоживущие активные формы белков, индуцированных теплом и оптическим электромагнитным излучением, приводят к окислительным повреждениям ДНК *in vitro* и *in vivo*.

СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

БГГ – бычий гамма-глобулин

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

Г – гуанин

ГК – гидролизат казеина

ГП – глутатионпероксидаза

ДАФБ – долгоживущие активные формы белков

ИФА – иммуноферментный анализ

ККК – кумарин-3-карбоновая кислота

МЯ – микроядра

АФК – активные формы кислорода

$\text{HO}_2^\bullet$ – гидропероксидный радикал

OH^- – гидроксильный ион

$^\bullet\text{OH}$ – гидроксильный радикал

$\text{O}_2^{\bullet-}$ – супероксид анион-радикал

$^1\text{O}_2$ – синглетный кислород

ПХЭ – полихроматофильные эритроциты

СОД – супероксиддисмутаза

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

ХЛ – хемилюминесценция

ЭПР – электронный парамагнитный резонанс

7-ОН-ККК – 7-гидроксикумарин-3-карбоновая кислота

8-ОГ – 7,8-дигидро-8-оксогуанин

FOX – ксиленоловый оранжевый Fe^{3+}

NOX – НАДФН-оксидаза

Pgx – пероксиредоксин

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баврина А.П., Монич В.А., Малиновская С.Л. Влияние низкоинтенсивного красного света на окислительную модификацию белков при развитии радиационно-индуцированной болезни легких в эксперименте // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2018. № 67. С. 45-49.
2. Беленова И.А., Кобзева Г.Б. Возможности применения LED-технологий для лечения и профилактики хронического пародонтита на стоматологическом приеме // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2014. № 1. С. 147.
3. Белов М.Л., Булло О.А., Городничев В.А. Лазерный флуоресцентный метод обнаружения стрессовых состояний растений, вызванных недостаточным уровнем питательных веществ или наличия загрязнителей в почве // Наука и образование: научное издание МГТУ им. Н.Э. Баумана. 2012. № 12. С. 23.
4. Борисова Э.Г. Немедикаментозная коррекция боли при синдроме жжения полости рта (СЖПР) с использованием фототерапии // Институт стоматологии. 2012. № 1 (54). С. 104-105.
5. Брусков В.И., Масалимов Ж.К., Черников А.В. Образование активных форм кислорода в воде под действием тепла // ДАН. 2002. Т. 384(6). С. 1-4.
6. Брусков В.И., Черников А.В., Гудков С.В., Масалимов Ж.К. Активация восстановительных свойств анионов морской воды под действием тепла // Биофизика. 2003. Т. 48(6). С. 1022-1029.
7. Бункин Н.Ф., Бункин Ф.В. Бабстонная структура воды и водных растворов электролитов // Успехи физических наук. 2016. Т. 186(9). С. 933-952.
8. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция // Успехи биологической химии. 2009. Т. 49. С. 341-388.
9. Галкин В.Н., Романко Ю.С., Каплан М.А., Молочков А.В., Молочков В.А., Кунцевич Ж.С., Сухова Т.Е., Дибирова С.Д. Применение фотодинамической

терапии при лечении кератоакантомы (обзор литературы) // Biomedical Photonics. 2016. Т. 5(2). С. 21–25.

10. Губарькова Е.В., Советский А.А., Елагин В.В., Дуденкова В.В., Зайцев В.Ю., Матвеев Л.А., Матвеев А.Л., Кузнецов С.С., Воронцов Д.А., Воронцов А.Ю., Загайнова Е.В., Гладкова Н.Д., Сироткина М.А. Разработка прижизненного способа обнаружения микроструктурных особенностей рака молочной железы новыми методами: оптическая когерентная томография и многофотонная томография // Злокачественные опухоли. 2017. Т. 7(3-S1). С. 181-182.

11. Гудков С.В., Гармаш С.А., Штаркман И.Н., Черников А.В., Карп О.Э., Брусков В.И. Долгоживущие радикалы белка, индуцируемые рентгеновским облучением, являются источниками активных форм кислорода в водной среде // ДАН. 2010. Т. 430(1). С. 123–126.

12. Гудков С.В., Карп О.Э., Гармаш С.А., Иванов В.Е., Черников А.В., Манохин А.В., Асташев М.Е., Ягужинский Л.С., Брусков В.И. Образование активных форм кислорода в воде под действием видимого и инфракрасного излучений в полосах поглощения молекулярного кислорода // Биофизика. 2012. Т. 57(1). С. 5-13.

13. Гудков С.В., Штаркман И.Н., Черников А.В., Усачева А.М., Брусков В.И. Гаунозин и инозин (рибоксин) элиминируют долгоживущие белковые радикалы, образующиеся при воздействии рентгеновского излучения // ДАН. 2007. Т. 413(2). С. 264–267.

14. Дирин В.Н., Наумов С.А., Удут В.В., Вовк С.М., Гольдберг В.Е. Способ коррекции функционального состояния органов иммунной системы и биологический электростимулятор внутренних органов для его осуществления // Патент на изобретение RUS 2145892. 2000.

15. Ермолаев В.А., Сапожников А.В., Марьин Е.М., Ляшенко П.М., Днекешев А.К., Мурзабаев К.Е., Киреев А.К. Клинико-морфологическая картина кожно-мышечных ран у собак под воздействием светодиодного излучения красного диапазона (СДИКД) // В сборнике: Актуальные вопросы ветеринарной науки Материалы Международной научно-практической конференции. 2015. С. 149-154.

16. Калганова Т.И., Губарькова Е.В., Гамаюнов С.В., Киселева Е.Б., Гребенкина Е.В., Кузнецов С.С., Финагина Е.С., Шахова Н.М., Масленникова А.В., Загайнова Е.В., Vitkin A., Гладкова Н.Д. Кросс-поляризационная ОКТ в оценке динамики состояния патологических и нормальных тканей при проведении лучевой и фотодинамической терапии // Современные технологии в медицине. 2015. Т. 7(3). С. 119-129.
17. Карандашов В.И. Особенности оптического излучения в синем диапазоне спектра и перспективы использования его в практической медицине // Лазерная медицина. 2013. Т. 17(2). С. 49-55.
18. Каюшин Л.П., Пулатова М.К., Кривенко В.Г. Свободные радикалы и их превращения в облученных белках. 1976. Москва, Атомиздат. С. 269.
19. Кирьянова В.В., Королькова Т.Н., Кириллова А.С. Возможности применения светодиодного излучения длиной волны 650 нм (красный свет) в коррекции инволюционных изменений кожи лица // Вестник Авиценны. 2012. № 4(53). С. 141-148.
20. Киселева М.В., Кулганов В.А. Арт-терапия в психологическом консультировании: учебное пособие. Санкт-Петербург: Речь. 2014. С. 62.
21. Клосс А.И. Электрон – радикальная диссоциация и механизмы активации воды // Докл. АН СССР. 1988. Т. 303(6). С. 1403-1407.
22. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Коновалова Г.Г., Одиноква О.А., Дорошук Н.А., Чазова И.Е. Окислительный и карбонильный стресс как фактор модификации белков и деструкции ДНК при сахарном диабете // Терапевтический архив. 2018а. Т. 90(10). С. 46-50.
23. Ланкин В.З., Шумаев К.Б., Тихазе А.К., Курганов Б.И. Влияние дикарбонилов на кинетические характеристики глутатионпероксидазы // Доклады Академии наук. 2017. Т. 475(6). С. 706-709.
24. Монич В.А., Малиновская С.Л., Махрова Т.В., Малиновский Д.С. Особенности воздействия низкоинтенсивных электромагнитных излучений различных диапазонов на микроорганизмы // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. 2010. № 2-2. С. 435-438.

25. Новоселова Е.Г., Черенков Д.А., Глушкова О.В., Новоселова Т.В., Чудновский В.М., Юсупов В.И., Фесенко Е.Е. Действие низкоинтенсивного лазерного излучения (632,8 нм) на изолированные клетки иммунной системы мышей // Биофизика. 2006. Т. 51(3). С. 509-518.
26. Панченков Г.М., Лебедев В.П. Химическая кинетика и катализ. М., Химия, 1985. 592 с.
27. Семенов А.М., Глинушкин А.П., Соколов М.С. Органическое земледелие и здоровье почвенной экосистемы // Достижения науки и техники АПК. 2016. Т. 30(8). С. 5-8.
28. Серая Л.Г., Звягинцев В.Б., Глинушкин А.П., Баранчиков Ю.Н. Вторичный ареал дальневосточных инвайдеров –«связь без границ» // Агробизнес и экология. 2015. Т. 2(2). С. 91-92.
29. Синицына Ю.В., Середнева Я.В., Кальясова Е.А., Веселов А.П. Влияние комбинированного действия низкочастотного переменного магнитного поля и гипертермии на уровень гидропероксидов и ростовые реакции растений гороха // Известия Уфимского научного центра Российской академии наук. 2018. № 3-5. С. 30-35.
30. Смирнова В.С., Гудков С.В., Черников А.В. и Брусков В.И. Образование 8-оксогуанина и его окисленных продуктов в ДНК *in vitro* под действием температуры 37 °С //Биофизика. 2005. Т. 50(2). С. 243-252.
31. Снопова Л.Б., Проданец Н.Н., Баскина О.С., Бредихин В.И., Елагин В.В., Карабут М.М., Шахова М.А., Кузнецова Д.С., Шахов А.В., Каменский В.А. Влияние сильно поглощающего слоя на торце кварцевого волокна лазерного скальпеля на процессы заживления ткани в области разреза // Морфология. 2016. Т. 149(3). С. 193-194.
32. Суров Н.В., Биктеева Р.Ш., Рагулин В.С., Глинушкин А.П., Дускаев Г.К. Влияние норм расхода препарата на развитие болезней и реализацию продуктивного потенциала тыквы // Биотика. 2015. № 2(3). С. 15-23.
33. Филоненко Е.В., Серова Л.Г. Фотодинамическая терапия в клинической практике. Biomedical Photonics. 2016. Т. 5(2). С. 26-37.

34. Фомин Г.В., Блюменфельд Л.А., Сухоруков Б.И. Электронодонорные свойства иона гидроксила // Докл. АН СССР. 1964. Т 157(5). С 1199-1201.
35. Черенков Д.А., Новоселова Е.Г., Глушкова О.В., Синотова О.А., Султанова А.Н., Чудновский В.М., Фесенко Е.Е. Активность естественных киллерных клеток селезенки мышей при действии низкоинтенсивного лазерного излучения в норме и при опухолевом росте // Биофизика. 2005. Т. 50(1). С. 114-118.
36. Черников А.В., Брусков В.И. Генерация гидроксильных радикалов и других редокс-активных соединений в морской воде под действием тепла // Биофизика. 2002. Т. 47(5). С. 773-781.
37. Черников А. В., Гудков С. В., Штаркман И. Н., Брусков В. И. Кислородный эффект при тепловых повреждениях ДНК // Биофизика. 2007. Т. 52(2). С. 244-251.
38. Чухрай И.Г., Марченко Е.И., Бобкова И.Л., Водчиц А. И., Батай Л.Е., Дудко Н.В. Изучение эффективности воздействия низкоинтенсивного инфракрасного и красного лазерного излучения на рост культуры лактобактерий // Научные достижения биологии, химии, физики: сб. ст. по матер. VI междунар. науч.-практ. конф. – Новосибирск: СибАК. 2012. С. 31-40.
39. Штаркман И. Н., Гудков С. В., Черников А. В. и Брусков В. И. Влияние аминокислот на образование перекиси водорода и гидроксильных радикалов в воде и 8-оксогуанина в ДНК при воздействии рентгеновского излучения // Биохимия. 2008а. Т. 73(4). С. 576-586.
40. Штаркман И. Н., Гудков С. В., Черников А. В. и Брусков В. И. Образование перекиси водорода и гидроксильных радикалов в водных растворах L-аминокислот при воздействии рентгеновского излучения и тепла // Биофизика. 2008б. Т. 53(1). С. 1-14.
41. Agon V. V., Bubb W.A., Wright A., Hawkins C.L., Davies M.J. Sensitizer-mediated photooxidation of histidine residues: Evidence for the formation of reactive side-chain peroxides // Free Radic. Biol. Med. 2006. V. 40(4). P. 698–710.
42. Ahmad S., Khan H., Shahab U., Rehman S., Rafi Z., Khan M.Y., Ansari A., Siddiqui Z., Ashraf J.M., Abdullah S.M., Habib S., Uddin M. Protein oxidation: an

overview of metabolism of sulphur containing amino acid, cysteine // *Front. Biosci. (Schol. Ed)*. 2017. V. 9. P. 71–87.

43. Ahn J.C., Chung P.S. The activity of G-ROS and the predominant role of Type II reaction in the photodynamic therapy using 9-hydroxypheophorbide- α for HeLa cell lines // *Gen. Physiol. Biophys.* 2012. V. 31(3). P. 343–350.

44. Alexander P., Fox M., Stacey K.A., Rosen D. Comparison of some direct and indirect effects of ionising radiation in proteins // *Nature*. 1956. V. 178. P. 846–849.

45. Alexandrovskaya Y.M., Baum O.I., Shekhter A.B., Petersen E. V., Tiflova O.A., Dmitriev A.K., Ulyanov V.A., Svistushkin V.M., Selezneva L. V., Sobol E.N. Mechanisms of laser activation of chondrocytes in osteoarthritis healing // *Laser Phys. Lett.* 2018. V. 15(8). P. 085601.

46. Alfassi Z. In *Peroxyl Radicals*, John Wiley and Sons. 1997.

47. Asadullina N.R., Usacheva A.M., Smirnova V.S., Gudkov S. V. Antioxidative and radiation modulating properties of guanosine-5'-monophosphate // *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. 2010. V. 29(10). P. 786–799.

48. Ashkenazi H., Malik Z., Harth Y., Nitzan Y. Eradication of *Propionibacterium acnes* by its endogenic porphyrins after illumination with high intensity blue light // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2003. V. 35(1). P. 17–24.

49. Avery S.V. Molecular targets of oxidative stress // *Biochem. J.* 2011. V. 434(2). P. 201–210.

50. Babiy A.V., Gebicki, S., Gebicki J.M. Protein peroxides: Formation by superoxide-generating systems and during oxidation of low density lipoprotein. In *Free Radicals: From Basic Science to Clinical Medicine* (Poli, G., Albano, E. and Dianzani, M.U., eds), Birkhauser, Basel. 1992.

51. Banerjee S.M., MacRobert A.J., Mosse C.A., Periera B., Bown S.G., Keshtgar M.R.S. Photodynamic therapy: Inception to application in breast cancer // *Breast*. 2017. V. 31. P. 105–113.

52. Belikov A. V., Schraven B., Simeoni L. T cells and reactive oxygen species // *J. Biomed. Sci.* 2015. V. 22(1). P. 85.

53. Bennett J.E. Kinetic electron paramagnetic resonance study of the reactions of t-butylperoxyl radicals in aqueous solution // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1990. V. 86. P. 3247–3252.
54. Berdnikov V.M., Bazhin N.M., Federov V.K., Polyakov O.V. Isomerization of the ethoxyl radical to the α -hydroxyethyl radical in aqueous solution. *Kinet. Catal.* (Engl. Trans.). 1972. 13. P. 986–987.
55. Bommana R., Subelzu N., Mozziconacci O., Sreedhara A., Schöneich C. Identification of D-Amino Acids in Light Exposed mAb Formulations // *Pharm. Res.* 2018. V. 35(11). P. 238-255.
56. Bornstein E., Hermans W., Gridley S., Manni J. Near-infrared photoinactivation of bacteria and fungi at physiologic temperatures // *Photochem. Photobiol.* 2009. V. 85(6). P. 1364–1374.
57. Bradshaw W.E., Holzapfel C.M. Evolution of animal photoperiodism // *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 2007. V. 38(1). P. 1–25.
58. Bretón-Romero R., Lamas S. Hydrogen peroxide signaling in vascular endothelial cells // *Redox Biol.* 2014. V. 2(1). P. 529–534.
59. Bruskov V.I., Karp O.E., Garmash S.A., Shtarkman I.N., Chernikov A. V., Gudkov S. V. Prolongation of oxidative stress by long-lived reactive protein species induced by X-ray radiation and their genotoxic action // *Free Radic. Res.* 2012. V. 46(10). P. 1280–1290.
60. Bruskov V.I., Malakhova L.V., Masalimov Z.K., Chernikov A.V. Heat-induced formation of reactive oxygen species and 8-oxoguanine, a biomarker of damage to DNA // *Nucleic Acids Res.* 2002a. V. 30(6). P. 1354–1363.
61. Bruskov V.I., Masalimov Z.K., Chernikov A.V. Heat-induced generation of reactive oxygen species in water // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2002b. V. 384(1-6). P. 181–184.
62. Bruskov V.I., Popova N.R., Ivanov V.E., Karp O.E., Chernikov A. V., Gudkov S. V. Formation of long-lived reactive species of blood serum proteins by the action of heat // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014. V. 443(3). P. 957–961.

63. Burgess V.A., Easton C.J., Hay M.P. Selective reaction of glycine residues in hydrogen atom transfer from amino acid derivatives // *J. Am. Chem. Soc.* 1989. V. 111(3). P. 1047–1052.
64. Burtenshaw D., Hakimjavadi R., Redmond E.M., Cahill P.A. Nox, Reactive Oxygen Species and Regulation of Vascular Cell Fate // *Antioxidants*. 2017. V. 6(4). P. 90.
65. Buxton G. V., Greenstock C.L., Helman W.P., Ross A.B. Critical Review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}/\cdot\text{O}^-$ in Aqueous Solution // *J. Phys. Chem. Ref. Data*. 1988. V. 17(2). P. 513–886.
66. Carroll L., Pattison D.I., Davies J.B., Anderson R.F., Lopez-Alarcon C., Davies M.J. Superoxide radicals react with peptide-derived tryptophan radicals with very high rate constants to give hydroperoxides as major products // *Free Radic. Biol. Med.* 2018. V. 118. P. 126–136.
67. Cebula M., Schmidt E.E., Arnér E.S.J. TrxR1 as a Potent Regulator of the Nrf2-Keap1 Response System // *Antioxid. Redox Signal.* 2015. V. 23(10). P. 823–853.
68. Cecarini V., Gee J., Fioretti E., Amici M., Angeletti M., Eleuteri A.M., Keller J.N. Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 2007. V. 1773(2). P. 93–104.
69. Chan B., Radom L. An ONIOM investigation of the effect of conformation on bond dissociation energies in peptides // *J. Comput. Chem.* 2019. V. 40(1). P. 82–88.
70. Chandler J.D., Day B.J. Biochemical mechanisms and therapeutic potential of pseudohalide thiocyanate in human health // *Free Radic. Res.* 2015. V. 49(6). P. 695–710.
71. Chernikov A.V., Bruskov V.I., Gudkov S.V. Heat-induced formation of nitrogen oxides in water // *J. Biol. Phys.* 2013. V. 39(4). P. 687–699.
72. Chernikov A.V., Gudkov S.V., Usacheva A.M., Bruskov V.I. Exogenous 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: Biomedical Properties, Mechanisms of Action, and Therapeutic Potential // *Biochem (Mosc) Suppl Ser A Membr Cell Biol.* 2017. V. 82(13). P. 1686-1701.

73. Chernov A.S., Reshetnikov D.A., Kovalitskaya Yu. A., Manokhin A.A., Gudkov S. V. Influence of wideband visible light with an padding red component on the functional state of mice embryos and embryonic stem cells // J. Photochem. Photobiol. B Biol. 2018. V. 188. P. 77–86.
74. Chin K.K., Trevithick-Sutton C.C., McCallum J., Jockusch S., Turro N.J., Scaiano J.C., Foote C.S., Garcia-Garibay M.A. Quantitative determination of singlet oxygen generated by excited state aromatic amino acids, proteins, and immunoglobulins // J. Am. Chem. Soc. 2008. V. 130(22). P. 6912–6913.
75. Chondrogianni N., Petropoulos I., Grimm S., Georgila K., Catalgol B., Friguet B., Grune T., Gonos E.S. Protein damage, repair and proteolysis // Mol. Aspects Med. 2014. V. 35(1). P. 1–71.
76. Cruz-Rojas C., SanJuan-Reyes N., Fuentes-Benites M.P.A.G., Dublan-García O., Galar-Martínez M., Islas-Flores H., Gómez-Oliván L.M. Acesulfame potassium: Its ecotoxicity measured through oxidative stress biomarkers in common carp (*Cyprinus carpio*) // Sci. Total Environ. 2019. V. 647. P. 772–784.
77. Dalle-Donne I., Aldini G., Carini M., Colombo R., Rossi R., Milzani A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression // J. Cell. Mol. Med. 2006. V. 10(2). P. 389–406.
78. Dalle-Donne I., Scaloni A., Giustarini D., Cavarra E., Tell G., Lungarella G., Colombo R., Rossi R., Milzani A. Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: The contribution of redox proteomics // Mass Spectrom. Rev. 2005. V. 24(1). P. 55–99.
79. Das A.B., Nagy P., Abbott H.F., Winterbourn C.C., Kettle A.J. Reactions of superoxide with the myoglobin tyrosyl radical // Free Radic. Biol. Med. 2010. V. 48(11). P. 1540–1547.
80. Das A.B., Nauser T., Koppenol W.H., Kettle A.J., Winterbourn C.C., Nagy P. Rapid reaction of superoxide with insulin-tyrosyl radicals to generate a hydroperoxide with subsequent glutathione addition // Free Radic. Biol. Med. 2014. V. 70. P. 86–95.
81. Davies K.J. Protein oxidation and proteolytic degradation. General aspects and relationship to cataract formation // Adv. Exp. Med. Biol. 1990. V. 264. P. 503–511.

82. Davies M.J. Protein and peptide alkoxyl radicals can give rise to C-terminal decarboxylation and backbone cleavage // *Arch. Biochem. Biophys.* 1996. V. 336(1). P. 163–172.
83. Davies M.J. Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2004. V. 3(1). P. 17–25.
84. Davies M.J. The oxidative environment and protein damage // *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*. 2005. V. 1703(2). P. 93–109.
85. Davies M.J., Fu S., Dean R.T. Protein hydroperoxides can give rise to reactive free radicals // *Biochem. J.* 1995. V. 305(2). P. 643–649.
86. Davies M.J. Protein oxidation and peroxidation // *Biochem. J.* 2016. V. 473(7). P. 805–825.
87. Davies M.J., Gilbert B.C. Free radical reactions. Fragmentation and rearrangements in aqueous solution // *Adv. Detailed React. Mech.* 1991. V. 1. P. 35–81.
88. Demasi M., da Cunha F.M. The physiological role of the free 20S proteasome in protein degradation: A critical review. // *Biochim. Biophys. Acta. Gen. Subj.* 2018. V. 1862(12). P. 2948–2954.
89. Di Marzo N., Chisci E., Giovannoni R. The Role of Hydrogen Peroxide in Redox-Dependent Signaling: Homeostatic and Pathological Responses in Mammalian Cells // *Cells*. 2018. V. 7(10). P. 156.
90. Didenko Y.T., Suslick K.S. The energy efficiency of formation of photons, radicals and ions during single-bubble cavitation // *Nature*. 2002. V. 418(6896). P. 394–397.
91. Dizdaroglu M., Simic M.G. Radiation induced conversion of phenylalanine to tyrosines // *Radiat. Res.* 1980. V. 83. P. 437.
92. Dizdaroglu M., Simic M.G. Isolation and characterization of radiation-induced aliphatic peptide dimers // *Int. J. Radiat. Biol.* 1983. V. 44(3). P. 231–239.
93. Done A.J., Traustadottir T. Nrf2 mediates redox adaptations to exercise // *Redox Biol.* 2016. V. 10. P. 191–199.

94. Dremina E.S., Sharov V.S., Davies M.J., Schöneich C. Oxidation and inactivation of SERCA by selective reaction of cysteine residues with amino acid peroxides // Chem. Res. Toxicol. 2007. V. 20(10). P. 1462–1469.
95. Du J., Gebicki J.M. Proteins are major initial cell targets of hydroxyl free radicals // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2004. V. 36(11). P. 2334–2343.
96. Einor D., Bonisoli-Alquati A., Costantini D., Mousseau T.A., Møller A.P. Ionizing radiation, antioxidant response and oxidative damage: A meta-analysis // Sci. Total Environ. 2016. V. 548–549. P. 463–471.
97. Elagin V., Smirnov A., Yusupov V., Kirillov A., Ignatova N., Streltsova O., Grebenkin E., Kamensky V. The bactericidal effect of continuous wave laser with strongly absorbing coating at the fiber tip // J. Innov. Opt. Health Sci. 2018. V. 11(05). P. 1850029.
98. Enwemeka C.S., Williams D., Hollosi S., Yens D., Enwemeka S.K. Visible 405 nm SLD light photo-destroys methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) *in vitro*. Lasers Surg. Med. 2008. V. 40(10). P. 734–737.
99. Faraonio R., Vergara P., Di Marzo D., Pierantoni M.G., Napolitano M., Russo T., Cimino F. p53 suppresses the Nrf2-dependent transcription of antioxidant response genes // J. Biol. Chem. 2006. V. 281(52). P. 39776–39784.
100. Firth C.A., Crone E.M., Flavall E.A., Roake J.A., Gieseg S.P. Macrophage mediated protein hydroperoxide formation and lipid oxidation in low density lipoprotein are inhibited by the inflammation marker 7,8-dihydroneopterin // Biochim. Biophys. Acta. 2008. V. 1783(6). P. 1095–1101.
101. Foote C.S., Peters J.W. Chemistry of Singlet Oxygen. XIV. A Reactive Intermediate in Sulfide Photooxidation // J. Am. Chem. Soc. 1971. V. 93(15). P. 3795–3796.
102. Forbat E., Ali F.R., Al-Niaimi F. Treatment of keloid scars using light-, laser- and energy-based devices: a contemporary review of the literature // Lasers Med. Sci. 2017. V. 32(9). P. 2145–2154.
103. Friguet B. Oxidized protein degradation and repair in ageing and oxidative stress // FEBS Lett. 2006. V. 580(12). P. 2910–2916.

104. Fu S., Davies M.J., Stocker R., Dean, R.T. (1998a) Evidence for roles of radicals in protein oxidation in advanced human atherosclerotic plaque // *Biochem. J.* 1998a. V. 333(3). P. 519–525.
105. Fu S., Dean R., Southan M., Truscott R. The hydroxyl radical in lens nuclear cataractogenesis // *J. Biol. Chem.* 1998b. V. 273(44). P. 28603–28609.
106. Fu S., Fu M.-X., Baynes J.W., Thorpe S.R., Dean R.T. Presence of dopa and amino acid hydroperoxides in proteins modified with advanced glycation end products: amino acid oxidation products as possible source of oxidative stress induced by age proteins // *Biochem. J.* 1998b. V. 330(1). P. 233–239.
107. Fu S., Gebicki S., Jessup W., Gebicki J.M., Dean R.T. Biological fate of amino acid, peptide and protein hydroperoxides // *Biochem. J.* 1995. V. 311(Pt 3). P. 821–827.
108. Gao X., Chen H. Hyperthermia on skin immune system and its application in the treatment of human papillomavirus-infected skin diseases // *Front. Med. China.* 2014. V. 8(1). P. 1–5.
109. Gapeyev A.B., Lukyanova N.A., Gudkov S. V. Hydrogen peroxide induced by modulated electromagnetic radiation protects the cells from DNA damage // *Cent. Eur. J. Biol.* 2014. V. 9(10). P. 915–921.
110. Garmash S.A., Smirnova V.S., Karp O.E., Usacheva A.M., Berezhnov A. V., Ivanov V.E., Chernikov A. V., Bruskov V.I., Gudkov S. V. Pro-oxidative, genotoxic and cytotoxic properties of uranyl ions // *J. Environ. Radioact.* 2014. V.127. P. 163–170.
111. Gaschler M.M., Stockwell B.R. Lipid peroxidation in cell death // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017. V. 482(3). P. 419–425.
112. Gavrina A.I., Shirmanova M.V., Aksenova N.A., Yuzhakova D.V., Snopova L.B., Solovieva A.B., Timashev P.S., Dudenkova V.V., Zagaynova E.V. Photodynamic therapy of mouse tumor model using chlorin e6- polyvinyl alcohol complex // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2018. V.178. P. 614–622.
113. Gay C., Collins J., Gebicki J.M. Hydroperoxide assay with the ferric-xylenol orange complex // *Anal. Biochem.* 1999. V. 273(2). P. 149–155.

114. Gay C., Gebicki J.M. A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xynlenol orange hydroperoxide assay // *Anal. Biochem.* 2000. V. 284(2). P. 217–220.
115. Gebicki S., Gebicki J.M. Crosslinking of DNA and proteins induced by protein hydroperoxides // *Biochem. J.* 1999. V. 338(3). P. 629–636.
116. Gebicki S., Gebicki J.M. Formation of peroxides in amino acids and proteins exposed to oxygen free radicals // *Biochem. J.* 1993. V. 289(3). P. 743–749.
117. Gebicki J.M. Protein hydroperoxides as new reactive oxygen species // *Redox Rep.* 1997. V. 3(2). P. 99–110.
118. Gebicki S., Gill K.H., Dean R.T., Gebicki J.M. Action of peroxidases on protein hydroperoxides // *Redox Rep.* 2002. V. 7(4). P. 235–242.
119. Gibson S.B. Investigating the role of reactive oxygen species in regulating autophagy // *Methods Enzymol.* 2013. V. 528. P. 217–235.
120. Giese S., Duggan S., Gebicki J.M. Peroxidation of proteins before lipids in U937 cells exposed to peroxy radicals // *Biochem. J.* 2000. V. 350. P. 215–218.
121. Giménez R.E., Vargová V., Rey V., Turbay M.B., Abatedaga I., Morán Vieyra F.E., Paz Zanini V.I., Mecchia Ortiz J.H., Katz N.E., Ostatná V., Borsarelli C.D. Interaction of singlet oxygen with bovine serum albumin and the role of the protein nano-compartmentalization // *Free Radic. Biol. Med.* 2016. V. 94. P. 99–109.
122. Giorgio M., Trinei M., Migliaccio E., Pelicci P.G. Hydrogen peroxide: A metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007. V. 8(9). P. 722–728.
123. Giulivi C., Cadenas E. Heme protein radicals: Formation, fate, and biological consequences // *Free Radic. Biol. Med.* 1998. V. 24(2). P. 269–279.
124. Glinushkin A.P., Beloshapkina O.O., Solovykh A.A., Lukyantsev V.S., Batmanova A.A., Sudarenkov G. V., Molnár J. Bacterial diseases of wheat caused by *Xanthomonas* sp. in the Southern Ural: Identification issues // *Acta Phytopathol. Entomol. Hungarica.* 2016. V. 51(2). P. 171–181.
125. Gold M.H., Rao J., Goldman M.P., Bridges T.M., Bradshaw V.L., Boring M.M., Guider A.N. A multicenter clinical evaluation of the treatment of mild to moderate

- inflammatory acne vulgaris of the face with visible blue light in comparison to topical 1 % clindamycin antibiotic solution // *J. Drugs. Dermatol.* 2005. V 4(1). P. 64-70.
126. Gracanin M., Davies M.J. Inhibition of protein tyrosine phosphatases by amino acid, peptide, and protein hydroperoxides: Potential modulation of cell signaling by protein oxidation products // *Free Radic. Biol. Med.* 2007. V. 42(10). P. 1543–1551.
127. Gracanin M., Lam M.A., Morgan P.E., Rodgers K.J., Hawkins C.L., Davies M.J. Amino acid, peptide, and protein hydroperoxides and their decomposition products modify the activity of the 26S proteasome // *Free Radic. Biol. Med.* 2011. V. 50(2). P. 389–399.
128. Gripenburg J.C., Sood N., Vargo K.B., Williams D., Rawson J., Therien M.J., Hammer D.A., Dmochowski I.J. Caging metal ions with visible light-responsive nanopolymersomes // *Langmuir*. 2015. V. 31(2). P. 799–807.
129. Grimm S., Hoehn A., Davies K.J., Grune T. Protein oxidative modifications in the ageing brain: Consequence for the onset of neurodegenerative disease // *Free Radic. Res.* 2011. V. 45(1). P. 73–88.
130. Gu C.L., Foote C.S., Kacher M.L. Chemistry of singlet oxygen 35. Nature of intermediates in the photooxygenation of sulfides // *J. Am. Chem. Soc.* 1981. V. 103(19). P. 5949–5951.
131. Gudkov S.V., Andreev S.N., Barmina E.V., Bunkin N.F., Kartabaeva B.B., Nesvat A.P., Stepanov E.V., Taranda N.I., Khramov R.N., Glinushkin A.P. Effect of visible light on biological objects: Physiological and pathophysiological aspects // *Phys. Wave Phenom.* 2017. V. 25(3). P. 207–213.
132. Gudkov S. V., Bruskov V.I., Astashev M.E., Chernikov A. V., Yaguzhinsky L.S., Zakharov S.D. Oxygen-dependent auto-oscillations of water luminescence triggered by the 1264 nm radiation // *J. Phys. Chem. B.* 2011. V. 115(23). P. 7693–7698.
133. Gudkov S.V., Chernikov A.V., Bruskov V.I. Chemical and radiological toxicity of uranium compounds // *Russ. J. Gen. Chem.* 2016. V. 86(6) P. 1531–1538.
134. Gudkov S. V., Gudkova O.Y., Chernikov A. V., Bruskov V.I. Protection of mice against X-ray injuries by the post-irradiation administration of guanosine and inosine // *Int. J. Radiat. Biol.* 2009. V. 85(2). P. 116–125.

135. Gudkov S. V., Guryev E.L., Gapeyev A.B., Sharapov M.G., Bunkin N.F., Shkirin A. V., Zabelina T.S., Glinushkin A.P., Sevost'yanov M.A., Belosludtsev K.N., Chernikov A. V., Bruskov V.I., Zvyagin A. V. Unmodified hydrated C₆₀ fullerene molecules exhibit antioxidant properties, prevent damage to DNA and proteins induced by reactive oxygen species and protect mice against injuries caused by radiation-induced oxidative stress // *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 2019. V. 15(1). P. 37–46.
136. Gudkov S. V., Shilyagina N.Y., Vodeneev V.A., Zvyagin A. V. Targeted radionuclide therapy of human tumors // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. V. 17(1). P. 33
137. Gudkov S. V., Shtarkman I.N., Smirnova V.S., Chernikov A. V., Bruskov V.I. Guanosine and inosine display antioxidant activity, protect DNA *in vitro* from oxidative damage induced by reactive oxygen species, and serve as radioprotectors in mice // *Radiat. Res.* 2006. V. 165(5). P. 538–545.
138. Gunawardena D., Raju R., Münch G. Hydrogen peroxide mediates pro-inflammatory cell-to-cell signaling: a new therapeutic target for inflammation? // *Neural. Regen. Res.* 2019. V. 14(8). P. 1430-1437.
139. Guryev E.L., Volodina N.O., Shilyagina N.Y., Gudkov S. V., Balalaeva I. V., Volovetskiy A.B., Lyubeshkin A. V., Sen' A. V., Ermilov S.A., Vodeneev V.A., Petrov R. V., Zvyagin A. V., Alferov Z.I., Deyev S.M. Radioactive (90 Y) upconversion nanoparticles conjugated with recombinant targeted toxin for synergistic nanotheranostics of cancer // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2018. V. 115(39). P. 9690–9695.
140. Guyton K.Z., Liu Y., Gorospe M., Xu Q., Holbrook N.J. Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂: Role in cell survival following oxidant injury // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271(8). P. 4138–4142.
141. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. *Free Radicals in Biology & Medicine* // Oxford University Press, Oxford. 2015. P. 905
142. Hammer T., Bode R. Enzymatic production of α -amino adipate- δ -semialdehyde and related compounds by lysine ϵ -dehydrogenase from *Candida albicans* // *Zentralbl. Mikrobiol.* 1992. V. 147(1–2). P. 65–70.

143. Hamon M.P., Bulteau A.L., Friguet B. Mitochondrial proteases and protein quality control in ageing and longevity // *Ageing Res. Rev.* 2015. V. 23. P. 56–66.
144. Hampton M.B., Morgan P.E., Davies M.J. Inactivation of cellular caspases by peptide-derived tryptophan and tyrosine peroxides // *FEBS Lett.* 2002. V. 527(1–3). P. 289–292.
145. Hawkins C.L., Davies M.J. Oxidative damage to collagen and related substrates by metal ion/hydrogen peroxide systems: Random attack or site-specific damage? // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1997. V. 1360(1). P. 84–96.
146. Hawkins C.L., Davies M.J. EPR studies on the selectivity of hydroxyl radical attack on amino acids and peptides // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* 1998. (12). P. 2617–2622.
147. Hawkins C.L., Davies M.J. Generation and propagation of radical reactions on proteins // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 2001. V. 1504(2–3). P. 196–219.
148. Headlam H.A., Davies M.J. Beta-scission of side-chain alkoxyl radicals on peptides and proteins results in the loss of side-chains as aldehydes and ketones // *Free Radic. Biol. Med.* 2002. V. 32(11). P. 1171–1184.
149. Headlam H.A., Gracanin M., Rodgers K.J., Davies M.J. Inhibition of cathepsins and related proteases by amino acid, peptide, and protein hydroperoxides // *Free Radic. Biol. Med.* 2006. V. 40(9). P. 1539–1548.
150. Holmström K.M., Finkel T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014. V. 15(6). P. 411–21.
151. Howerton B.S., Heidary D.K., Glazer E.C. Strained ruthenium complexes are potent light-activated anticancer agents // *J. Am. Chem. Soc.* 2012. V. 134(20). P. 8324–8327.
152. Isenberg I. Free Radicals in Tissue // *Physiol. Rev.* 1964. V. 44(3). P. 487-517.
153. Ivanov V.E., Usacheva A.M., Chernikov A. V., Bruskov V.I., Gudkov S. V. Formation of long-lived reactive species of blood serum proteins induced by low-intensity irradiation of helium-neon laser and their involvement in the generation of reactive oxygen species // *J. Photochem. Photobiol. B.* 2017. V. 176. P. 36–43.

154. Jekely G., Colombelli J., Hausen H., Guy K., Stelzer E., Nedelec F., Arendt D. Mechanism of phototaxis in marine zooplankton // *Nature*. 2008. V. 456(7220). P. 395–399.
155. Jessup W., Dean R.T., Gebicki J.M. Iodometric determination of hydroperoxides in lipids and proteins // *Methods Enzymol.* 1994. V. 233. P. 289–303.
156. Jin F., Leitich J., von Sonntag C. The superoxide radical reacts with tyrosine-derived phenoxyl radicals by addition rather than by electron transfer // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*. 1993. (9). P. 1583-1588.
157. Jiskoot W., Randolph T.W., Volkin D.B., Middaugh C.R., Schöneich C., Winter G., Friess W., Crommelin D.J., Carpenter J.F. Protein instability and immunogenicity: Roadblocks to clinical application of injectable protein delivery systems for sustained release // *J. Pharm. Sci.* 2012. V. 101(3). P. 946–954.
158. Kanta J. The role of hydrogen peroxide and other reactive oxygen species in wound healing // *Acta Medica (Hradec Kral.)*. 2011. V. 54(3). P. 97–101.
159. Karin M. How NF- κ B is activated: The role of the I κ B kinase (IKK) complex // *Oncogene*. 1999. V. 18(49). P. 6867–6874.
160. Karp O.E., Gudkov S. V., Garmash S.A., Shtarkman I.N., Chernikov A. V., Bruskov V.I. Genotoxic effect of long-lived protein radicals *in vivo* generated by X-ray irradiation // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2010. V. 434(1). P. 250–253.
161. Kobayashi A., Kang M.-I., Okawa H., Ohtsuji M., Zenke Y., Chiba T., Igarashi K., Yamamoto M. Oxidative Stress Sensor Keap1 Functions as an Adaptor for Cul3-Based E3 Ligase To Regulate Proteasomal Degradation of Nrf2 // *Mol. Cell. Biol.* 2004. V. 24(16). P. 7130–7139.
162. Kotoku Y., Kato J., Akashi G., Hirai Y., Ishihara K. Bactericidal effect of a 405-nm diode laser on *Porphyromonas gingivalis* // *Laser Phys. Lett.* 2009. V. 6(5). P. 388–392.
163. Koyama S., Kodama S., Suzuki K., Matsumoto T., Miyazaki T., Watanabe M. Radiation-induced long-lived radicals which cause mutation and transformation // *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 1998. V. 421(1). P. 45–54.

164. Kumagai J., Katon H., Miyazaki T., Hidema J., Kumaga T. Differences in the sensitivity to UVB radiation of two cultivars of rice (*Oryza sativa* L.) based on observation of long-lived radicals // *J. Radiat. Res.* 1999. V.40 (4). P. 303–310.
165. Kumagai J., Kawaura T., Miyazaki T., Prost M., Prost E., Watanabe M., Quetin-Leclercq J. Test for antioxidant ability by scavenging long-lived mutagenic radicals in mammalian cells and by blood test with intentional radicals: An application of gallic acid // *Radiat. Phys. Chem.* 2003a. V. 66(1). P. 17–25.
166. Kumagai J., Masui K., Itagaki Y., Shiotani M., Kodama S., Watanabe M., Miyazaki T. Long-lived mutagenic radicals induced in mammalian cells by ionizing radiation are mainly localized to proteins // *Radiat. Res.* 2003b. V. 160(1). P. 95–102.
167. Latarjet R., Loiseleur J. Modalit es de la Fixation de L'Oxyg ne en Radiobiologie // *Soc. Biologie Comptes Rendue.* 1942. V. 136. P. 60–63.
168. Lei Y., Wang K., Deng L., Chen Y., Nice E.C., Huang C. Redox regulation of inflammation: Old elements, a new story // *Med. Res. Rev.* 2015. V. 35(2). P. 306–340.
169. Lennicke C., Rahn J., Lichtenfels R., Wessjohann L.A., Seliger B. Hydrogen peroxide - Production, fate and role in redox signaling of tumor cells // *Cell Commun. Signal.* 2015. V. 13(1). P. 39-57.
170. Liguori I., Russo G., Curcio F., Bulli G., Aran L., Della-Morte D., Gargiulo G., Testa G., Cacciatore F., Bonaduce D., Abete P. Oxidative stress, aging, and diseases // *Clin. Interv. Aging.* 2018. V. 13. P. 757–772.
171. Lima A.L., Goetze S., Illing T., Elsner P. Light and laser modalities in the treatment of cutaneous sarcoidosis: A systematic review // *Acta Derm. Venereol.* 2018. V. 98(5). P. 481–483.
172. Lindquist S., Craig E.A. The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 1988. V. 22. P. 631-677.
173. Linley E., Denyer S.P., McDonnell G., Simons C., Maillard J.Y. Use of hydrogen peroxide as a biocide: New consideration of its mechanisms of biocidal action // *J. Antimicrob. Chemother.* 2012. V. 67(7). P. 1589–1596.

174. Liu C.C., Gebicki J.M. Intracellular GSH and ascorbate inhibit radical-induced protein chain peroxidation in HL-60 cells // *Free Radic. Biol. Med.* 2012. V. 52(2). P. 420–426.
175. Liu D., Xu Y. p53, Oxidative Stress, and Aging // *Antioxid. Redox Signal.* 2011. V. 15(6). P. 1669–1678.
176. Leonidova A., Pierroz V., Rubbiani R., Lan Y., Schmitz A.G., Kaech A., Sigel R.K.O., Ferrari S., Gasser G. Photo-induced uncaging of a specific Re(I) organometallic complex in living cells // *Chem. Sci.* 2014. V. 5(10). P. 4044–4056.
177. Levenberg K. A method for the solution of certain non-linear problems in least squares // *Quart. Appl. Math.* 1944. V. 2(2). P. 164–168.
178. Lorenzen I., Mullen L., Bekeschus S., Hanschmann E.-M. Redox Regulation of Inflammatory Processes Is Enzymatically Controlled // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017. V. 2017. P. 1–23.
179. Loschenov V.B., Konov V.I., Prokhorov A.M. Photodynamic therapy and fluorescence diagnostics // *Laser Physics.* 2000. V. 10(6). P. 1188–1207.
180. Luo Y.L., Shiao Y.S., Huang Y.F. Release of photoactivatable drugs from plasmonic nanoparticles for targeted cancer therapy // *ACS Nano.* 2011. V. 5(10). P. 7796–7804.
181. Luxford C., Dean R.T., Davies M.J. Radicals derived from histone hydroperoxides damage nucleobases in RNA and DNA // *Chem. Res. Toxicol.* 2000. V. 13(7). P. 665–672.
182. Luxford C., Dean R.T., Davies M.J. Induction of DNA damage by oxidised amino acids and proteins // *Biogerontology.* 2002. V. 3(1–2). P. 95–102.
183. Mallory M., Gogineni E., Jones G.C., Greer L., Simone C.B. Therapeutic hyperthermia: The old, the new, and the upcoming. // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2016. V. 97. P. 56–64.
184. Manevich Y., Held K.D., Biaglow J.E. Coumarin-3-carboxylic acid as a detector for hydroxyl radicals generated chemically and by gamma radiation // *Radiat. Res.* 1997. V. 148(6). P. 580–591.

185. Mansour H.H., Elkady A.A., Elrefaei A.H., Hafez H.F. Radioprotective, antioxidant and antitumor efficacy of *Annona muricata* L. leaf extract // *Indian J. Biochem. Biophys.* 2018. V. 55(3). P. 205–214.
186. Marinho H.S., Real C., Cyrne L., Soares H., Antunes F. Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors // *Redox Biol.* 2014. V. 2(1). P. 535–562.
187. Marquardt D., An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters // *SIAM J. Appl. Math.* 1963. V. 11(2). P. 431–441
188. Marrocco I., Altieri F., Peluso I. Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017. V. 2017. P. 1–32.
189. McKenzie T.G., Fu Q., Wong E.H.H., Dunstan D.E., Qiao G.G. Visible light mediated controlled radical polymerization in the absence of exogenous radical sources or catalysts // *Macromolecules.* 2015. V. 48(12). P. 3864–3872.
190. Michalski R., Zielonka J., Gapys E., Marcinek A., Joseph J., Kalyanaraman B. Real-time measurements of amino acid and protein hydroperoxides using coumarin boronic acid // *J. Biol. Chem.* 2014. V. 289(32). P. 22536–22553.
191. Miller A.F. Superoxide dismutases: Ancient enzymes and new insights // *FEBS Lett.* 2012. V. 586(5). P. 585–595.
192. Möller M.N., Hatch D.M., Kim H.Y.H., Porter N.A. Superoxide reaction with tyrosyl radicals generates para -hydroperoxy and para-hydroxy derivatives of tyrosine // *J. Am. Chem. Soc.* 2012. V. 134(40). P. 16773–16780.
193. Morgan P.E., Dean R.T., Davies M.J. Inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by peptide and protein peroxides generated by singlet oxygen attack // *Eur. J. Biochem.* 2002. V. 269(7). P. 1916–1925.
194. Morgan P.E., Dean R.T., Davies M.J. Protective mechanisms against peptide and protein peroxides generated by singlet oxygen // *Free Radic. Biol. Med.* 2004. V. 36(4). P. 484–496.

195. Morgan P.E., Pattison D.I., Davies M.J. Quantification of hydroxyl radical-derived oxidation products in peptides containing glycine, alanine, valine, and proline // *Free Radic. Biol. Med.* 2012. V. 52(2). P. 328–339.
196. Morgan P.E., Pattison D.I., Hawkins C.L., Davies M.J. Separation, detection, and quantification of hydroperoxides formed at side-chain and backbone sites on amino acids, peptides, and proteins // *Free Radic. Biol. Med.* 2008. V. 45(9). P. 1279–1289.
197. Morin B., Bubb W.A., Davies M.J., Dean R.T., Fu S. 3-Hydroxylysine, a potential marker for studying radical-induced protein oxidation // *Chem. Res. Toxicol.* 1998. V. 11(11). P. 1265–1273.
198. Mozziconacci O., Schöneich C. Sequence-specific formation of D-amino acids in a monoclonal antibody during light exposure // *Mol. Pharm.* 2014. V. 11(11). P. 4291–4297.
199. Millar A.J. The intracellular dynamics of circadian clocks reach for the light of ecology and evolution // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2016. V. 67(1). P. 595–618.
200. Miyazaki T., Morikawa A., Kumagai J., Ikehata M., T. Koana, Kikuchi S. Long-lived radicals produced by γ -irradiation or vital activity in plants, animals, cells, and protein solution: their observation and inhomogeneous decay dynamics // *Radiat. Phys. Chem.* 2002. V. 65(2). P. 151–157.
201. Mohan M.S.G., Ramakrishnan T., Mani V., Achary A. Protective effect of crude sulphated polysaccharide from *Turbinaria ornata* on isoniazid rifampicin induced hepatotoxicity and oxidative stress in the liver, kidney and brain of adult Swiss albino rats // *Indian J. Biochem. Biophys.* 2018. V. 55(4). P. 237–244.
202. Monich V.A., Bavrina A.P., Malinovskaya S.L. Modification in oxidative processes in muscle tissues exposed to laser- and light-emitting diode radiation // *Lasers Med. Sci.* 2018. V. 33(1). P. 159–164.
203. Monich V., Drugova O., Lazukin V., Bavrina A. Low-power light and isolated rat hearts after ischemia of myocardium // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2011. V. 105(1). P. 21–24.

204. Nagy P., Kettle A.J., Winterbourn C.C. Neutrophil-mediated oxidation of enkephalins via myeloperoxidase-dependent addition of superoxide // *Free Radic. Biol. Med.* 2010. V. 49(5). P. 792–799.
205. Naumov S.A., Dyrin V.N., Vovk S.M., Petrov E.Y., Udut V. V., Borodulina E. V. Autonomous device for photostimulation of the gastrointestinal tract immunity // *Proceedings of SPIE*. 2000. V. 3907. P. 433-439.
206. Nauser T., Koppenol W.H., Schöneich C. Protein thiyl radical reactions and product formation: A kinetic simulation // *Free Radic. Biol. Med.* 2015. V. 80. P. 158–163.
207. Netto L.E., Antunes F. The Roles of Peroxiredoxin and Thioredoxin in Hydrogen Peroxide Sensing and in Signal Transduction // *Mol. Cells*. 2016. V. 39(1). P. 65–71.
208. Neuzil J., Gebicki J.M., Stocker R. Radical-induced chain oxidation of proteins and its inhibition by chain-breaking antioxidants // *Biochem. J.* 1993. V. 293(3). P. 601–606.
209. Nocedal J., Wright S.J. *Numerical Optimization* (New York, Springer, 1999).
210. Novoselova E.G., Glushkova O.V., Cherenkov D.A., Chudnovsky V.M., Fesenko E.E. Effects of low-power laser radiation on mice immunity // *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 2006. V. 22(1). P. 33–38.
211. Nowotny K., Grune T. Degradation of oxidized and glycoxidized collagen: Role of collagen cross-linking // *Arch. Biochem. Biophys.* 2014. V. 542. P. 56–64.
212. Østdal H., Davies M.J., Andersen H.J. Reaction between protein radicals and other biomolecules // *Free Radic. Biol. Med.* 2002. V. 33(2). P. 201–209.
213. Ott C., Grune T. Protein Oxidation and Proteolytic Signalling in Aging // *Curr. Pharm. Des.* 2014. V. 20(18). P. 3040–3051.
214. Panday A., Sahoo M.K., Osorio D., Batra S. NADPH oxidases: An overview from structure to innate immunity-associated pathologies // *Cell. Mol. Immunol.* 2015. V. 12(1). P. 5–23.
215. Pattison D., Davies M. Reactions of myeloperoxidase-derived oxidants with biological substrates: gaining insight into human inflammatory disease // *Curr. Med. Chem.* 2006. V. 13(27). P. 3271–3290.

216. Pattison D.I., Rahmanto A.S., Davies M.J. Photo-oxidation of proteins // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2012. V. 11(1). P. 38–53.
217. Paulsen C.E., Carroll K.S. Cysteine-Mediated Redox Signaling: Chemistry, Biology, and Tools for Discovery // *Chem. Rev.* 2013. V. 113(7). P. 4633–4679.
218. Paviani V., Queiroz R.F., Marques E.F., Mascio P. Di, Augusto O. Production of lysozyme and lysozyme-superoxide dismutase dimers bound by a ditryptophan cross-link in carbonate radical-treated lysozyme // *Free Radic. Biol. Med.* 2015. V. 89. P. 72–82.
219. Peskin A.V., Cox A.G., Nagy P., Morgan P.E., Hampton M.B., Davies M.J., Winterbourn C.C. Removal of amino acid, peptide and protein hydroperoxides by reaction with peroxiredoxins 2 and 3 // *Biochem. J.* 2010. V. 432(2). P. 313–321.
220. Pietraforte D., Minetti M. Direct ESR detection of peroxynitrite-induced tyrosine-centred protein radicals in human blood plasma // *Biochem. J.* 1997a. V. 325(3). P. 675–684.
221. Pietraforte D., Minetti M. One-electron oxidation pathway of peroxynitrite decomposition in human blood plasma: evidence for the formation of protein tryptophan-centred radicals // *Biochem. J.* 1997b. V. 321(3). P. 743–750.
222. Piskarev I.M. Hydrogen Peroxide Formation in Aqueous Solutions under UV-C Radiation // *High Energy Chem.* 2018. V. 52(3). P. 212–216.
223. Powles S.B. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light // *Annu. Rev. Plant Physiol.* 1984. V. 35(1). P. 15–44.
224. Rahmanto A.S., Morgan P.E., Hawkins C.L., Davies M.J. Cellular effects of peptide and protein hydroperoxides // *Free Radic. Biol. Med.* 2010a. V. 48(8). P. 1071–1078.
225. Rahmanto A.S., Morgan P.E., Hawkins C.L., Davies M.J. Cellular effects of photogenerated oxidants and long-lived, reactive, hydroperoxide photoproducts // *Free Radic. Biol. Med.* 2010b. V. 49(10). P. 1505–1515.
226. Reczek C.R., Chandel N.S. ROS-dependent signal transduction // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2015. V. 33. P. 8–13.

227. Redza-Dutordoir M., Averill-Bates D.A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species // *Biochim. Biophys. Acta*. 2016. V. 1863(12). P. 2977–2992.
228. Reinert J. Phototropism and Phototaxis // *Annu. Rev. Plant Physiol.* 1959. V. 10(1). P. 441–458.
229. Requena J.R., Levine R.L., Stadtman E.R. Recent advances in the analysis of oxidized proteins // *Amino Acids*. 2003. V. 25(3–4). P. 221–226.
230. Robinson S., Bevan R., Lunec J., Griffiths H. Chemiluminescence determination of hydroperoxides following radiolysis and photolysis of free amino acids // *FEBS Lett.* 1998. V. 430(3). P. 297–300.
231. Ronsein G.E., de Oliveira M.C., de Medeiros M.H., Di Mascio P. Characterization of O₂ (¹Δ_g)-derived oxidation products of tryptophan: A combination of tandem mass spectrometry analyses and isotopic labeling studies // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2009. V. 20(2). P. 188–197.
232. Ryter S.W., Tyrrell R.M. Singlet molecular oxygen (¹O₂): A possible effector of eukaryotic gene expression // *Free Radic. Biol. Med.* 1998. V. 24(9). P. 1520–1534.
233. Sailer R., Strauss W.S.L., König K., Rück A., Steiner R. Correlation between porphyrin biosynthesis and photodynamic inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* after incubation with 5-aminolaevulinic acid // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 1997. V. 39(3). P. 236–242.
234. Saper C.B., Scammell T.E., Lu J. Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms // *Nature*. 2005. V. 437(7063). P. 1257–1263.
235. Schieber M., Chandel N.S. ROS function in redox signaling and oxidative stress // *Curr. Biol.* 2014. V. 24. (10). P. R453-462.
236. Schöneich C. Thiyl radicals and induction of protein degradation // *Free Radic. Res.* 2016. V. 50(2). P. 143–149.
237. Schöneich C., Pogocki D., Hug G.L., Bobrowski K. Free radical reactions of methionine in peptides: mechanisms relevant to beta-amyloid oxidation and Alzheimer's disease // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. V. 125(45). P. 13700–13713.

238. Sepasi Tehrani H., Moosavi-Movahedi A.A. Catalase and its mysteries // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2018. V. 140. P. 5–12.
239. Shamsi M.B., Venkatesh S., Kumar R., Gupta N.P., Malhotra N., Singh N., Mittal S., Arora S., Arya D.S., Talwar P., Sharma R.K., Dada R. Antioxidant levels in blood and seminal plasma and their impact on sperm parameters in infertile men // *Indian J. Biochem. Biophys.* 2010. V. 47(1). P. 38–43.
240. Sgambellone M.A., David A., Garner R.N., Dunbar K.R., Turro C. Cellular toxicity induced by the photorelease of a caged bioactive molecule: Design of a potential dual-action Ru(II) complex // *J. Am. Chem. Soc.* 2013. V. 135(30). P. 11274–11282.
241. Sharapov M.G., Novoselov V.I., Fesenko E.E., Bruskov V.I., Gudkov S. V. The role of peroxiredoxin 6 in neutralization of X-ray mediated oxidative stress: effects on gene expression, preservation of radiosensitive tissues and postradiation survival of animals // *Free Radic. Res.* 2017. V. 51(2). P. 148–166.
242. Shell T.A., Lawrence D.S. Vitamin B₁₂: a tunable, long wavelength, light-responsive platform for launching therapeutic agents // *Acc. Chem. Res.* 2015. V. 48(11). P. 2866–2874.
243. Shireen, Chugtai A., Hasan W., Mahdi A.A., Islam N. Effect of resveratrol on the biomarkers of oxidative stress and inflammation in monocyte cultures from PBMC's of patients with myocardial infarction // *Indian J. Biochem. Biophys.* 2018. V. 55(5). P. 328–333.
244. Sies H. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants // *Exp. Physiol.* 1997. V. 82(2). P. 291–295.
245. Sies H., Berndt C., Jones D.P. Oxidative Stress // *Annu. Rev. Biochem.* 2017. V. 86. P. 715–748.
246. Silachev D.N., Plotnikov E.Y., Pevzner I.B., Zorova L.D., Babenko V.A., Zorov S.D., Popkov V.A., Jankauskas S.S., Zinchenko V.P., Sukhikh G.T., Zorov D.B. The mitochondrion as a key regulator of ischaemic tolerance and injury // *Hear. Lung Circ.* 2014. V. 23(10). P. 897–904.

247. Silvester J.A., Timmins G.S., Davies M.J. Protein hydroperoxides and carbonyl groups generated by porphyrin- induced photo-oxidation of bovine serum albumin // *Arch. Biochem. Biophys.* 1998. V. 350(2). P. 249–258.
248. Simpson J.A., Narita S., Gieseg S., Gebicki S., Gebicki J.M., Dean R.T. Long-lived reactive species on free-radical-damaged proteins // *Biochem. J.* 1992. V. 282(3). P. 621–624.
249. Simon J.N., Ziberna K., Casadei B. Compromised redox homeostasis, altered nitroso-redox balance, and therapeutic possibilities in atrial fibrillation // *Cardiovasc. Res.* 2016. V. 109(4). P. 510–518.
250. Smirnova O.A., Bartosch B., Zakirova N.F., Kochetkov S.N., Ivanov A. V. Polyamine metabolism and oxidative protein folding in the ER as ROS-producing systems neglected in virology // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19(4). P. 1219-1248.
251. Soszynski M., Filipiak A., Bartosz G., Gebicki J.M. Effect of amino acid peroxides on the erythrocyte // *Free Radic. Biol. Med.* 1996. V. 20(1). P. 45–51.
252. Stadtman E.R. Berlett B.S. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease // *Chem. Res. Toxicol.* 1997. V. 10(5). P. 485–494.
253. Stoker A.W. Protein tyrosine phosphatases and signalling // *J. Endocrinol.* 2005. V. 185(1). P. 19–33.
254. Stone J.R., Yang S. Hydrogen peroxide: a signaling messenger // *Antioxid. Redox Signal.* 2006. V. 8(3–4). P. 243–270.
255. Storkey C., Pattison D.I., Ignasiak M.T., Schiesser C.H., Davies M.J. Kinetics of reaction of peroxynitrite with selenium- and sulfur-containing compounds: Absolute rate constants and assessment of biological significance // *Free Radic. Biol. Med.* 2015. V. 89. P. 1049–1056.
256. Stubbe J. Radicals with a controlled lifestyle // *Chem. Commun.* 2003. V. 3(20). P. 2511–2513.
257. Suryo Rahmanto A., Davies M.J. Catalytic activity of selenomethionine in removing amino acid, peptide, and protein hydroperoxides // *Free Radic. Biol. Med.* 2011. V. 51(12). P. 2288–2299.

258. Sysak P.K., Foote C.S., Ching T.-Y. Chemistry of singlet oxygen - XXV. Photooxygenation of methionine // Photochem. Photobiol. 1977. V. 26(1). P. 19–27.
259. Takagi J., Ishigure K. Thermal Decomposition of Hydrogen Peroxide and Its Effect on Reactor Water Monitoring of Boiling Water Reactors. Nuclear Science and Engineering. 1985. V. 89(2). P. 177–186.
260. Tripathi P., Pandey S. L-Arginine attenuates oxidative stress condition during cardiomyopathy // Indian J. Biochem. Biophys. 2013. V. 50(2). P. 99–104.
261. Tharmalingam S., Sreetharan S., Kulesza A. V., Boreham D.R., Tai T.C. Low-Dose Ionizing Radiation Exposure, Oxidative Stress and Epigenetic Programing of Health and Disease // Radiat. Res. 2017. V. 188(4.2). P. 525–538.
262. Tong H., Wang X., Dong Y., Hu Q., Zhao Z., Zhu Y., Dong L., Bai F., Dong X. A *Streptococcus* aquaporin acts as peroxiporin for efflux of cellular hydrogen peroxide and alleviation of oxidative stress // J. Biol. Chem. 2019. V. 294(12). P. 4583–4595.
263. Trujillo M., Alvarez B., Radi R. One- and two-electron oxidation of thiols: Mechanisms, kinetics and biological fates // Free Radic. Res. 2016. V. 50(2). P. 150–171.
264. Tsai S.R., Hamblin M.R. Biological effects and medical applications of infrared radiation // J. Photochem. Photobiol. B Biol. 2017. V. 170. P. 197–207.
265. Tuchina E.S., Tuchin V. V. Low-intensity LED (625 and 405 nm) and laser (805 nm) killing of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis* // Proceedengs of SPIE. 2009. V. 7165. 71650I.
266. van der Vliet A., Janssen-Heininger Y.M. Hydrogen peroxide as a damage signal in tissue injury and inflammation: Murderer, mediator, or messenger? // J. Cell. Biochem. 2014. V. 115(3). P. 427–435.
267. Veal E.A., Day A.M., Morgan B.A. Hydrogen peroxide sensing and signaling // Mol Cell. 2007. V. 26(1). P. 1–14.
268. Vlasova I.I. Peroxidase Activity of Human Hemoproteins: Keeping the Fire under Control // Molecules. 2018. V. 23(10). P. 2561-2587.

269. von Sonntag C., Schuchmann H.-P. Peroxyl radicals in aqueous solution. In Peroxyl Radicals (Alfassi, Z.B., ed.), John Wiley and Sons, Chichester. 1997. P. 173-234.
270. Waldren C.A., Vannais D.B., Ueno A.M. A role for long-lived radicals (LLR) in radiation-induced mutation and persistent chromosomal instability: Counteraction by ascorbate and RibCys but not DMSO // *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 2004. V. 551(1–2). P. 255–265.
271. Walter L. Physiological plant ecology (Ecophysiology and stress physiology of functional groups); Springer: Berlin, Germany. 2003.
272. Wang Y., Branicky R., Noë A., Hekimi S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling // *J. Cell Biol.* 2018. V. 217(6). P. 1915–1928.
273. Wang H., Liu R., Tu T., Xie L., Sheng K., Chen Y., Tang X. Properties of radicals formed by the irradiation of wool fibers // *J. Radiat. Res.* 2004. V. 45 (1). P. 77–81.
274. Wang Z., Cai F., Chen X., Luo M., Hu L., Lu Y. The role of mitochondria-derived reactive oxygen species in hyperthermia-induced platelet apoptosis // *PLoS One.* 2013. V. 8(9). P. e75044.
275. Watts Z.I., Easton C.J. Peculiar stability of amino acids and peptides from a radical perspective // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. V. 131(32). P. 11323–11325.
276. Weber D., Davies M.J., Grune T. Determination of protein carbonyls in plasma, cell extracts, tissue homogenates, isolated proteins: Focus on sample preparation and derivatization conditions // *Redox Biol.* 2015. V. 5. P. 367–380.
277. Weiss M.C., Sousa F.L., Mrnjavac N., Neukirchen S., Roettger M., Nelson-Sathi S., Martin W.F. The physiology and habitat of the last universal common ancestor // *Nat. Microbiol.* 2016. V. 1(9). 16116
278. Welle F.M., Beckhaus H.D., Rüchardt C. Thermochemical stability of α -amino- α -carbonylmethyl radicals and their resonance as measured by ESR // *J. Org. Chem.* 1997. V. 62(3). P. 552–558.

279. Wentworth P. J., Jones L.H., Wentworth A.D., Zhu X., Larsen N.A., Wilson I.A., Xu X., Goddard W.A., Janda K.D., Eschenmoser A., Lerner R.A. Antibody catalysis of the oxidation of water // *Science*. 2001. V. 293(5536). P. 1806–1811.
280. Wentworth P., Wentworth A.D., Zhu X., Wilson I.A., Janda K.D., Eschenmoser A., Lerner R.A. Evidence for the production of trioxxygen species during antibody-catalyzed chemical modification of antigens // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003. V. 100(4). P. 1490–1493.
281. Wilson T., Hastings J.W. Bioluminescence // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1998. V. 14. P. 197–230.
282. Winterbourn C.C., Bonham M.J.D., Buss H., Abu-Zidan F.M., Windsor J.A. Elevated protein carbonyls as plasma markers of oxidative stress in acute pancreatitis // *Pancreatology*. 2003. V. 3(5). P. 375–382.
283. Winterbourn C.C., Pichorner H., Kettle A.J. Myeloperoxidase-dependent generation of a tyrosine peroxide by neutrophils // *Arch. Biochem. Biophys.* 1997. V. 338(1). P. 15–21.
284. Wittmann C., Chockley P., Singh S.K., Pase L., Lieschke G.J., Grabher C. Hydrogen Peroxide in Inflammation: Messenger, Guide, and Assassin // *Adv. Hematol.* 2012. V. 2012. P. 1–6.
285. Wolf D.H., Menssen R. Mechanisms of cell regulation – proteolysis, the big surprise // *FEBS Lett.* 2018. V. 592(15). P. 2515–2524.
286. Wolff S.P. Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides // *Meth. Enzymol.* 1994. V. 233. P. 182–189.
287. Woo H.A., Yim S.H., Shin D.H., Kang D., Yu D.Y., Rhee S.G. Inactivation of peroxiredoxin I by phosphorylation allows localized H₂O₂ accumulation for cell signaling // *Cell*. 2010. V. 140(4). P. 517–528.
288. Wright A., Hawkins C.L., Davies M.J. Photo-oxidation of cells generates long-lived intracellular protein peroxides // *Free Radic. Biol. Med.* 2003. V. 34(6). P. 637–647.
289. Xiang J., Wan C., Guo R., Guo D. Is Hydrogen Peroxide a Suitable Apoptosis Inducer for All Cell Types? // *Biomed Res. Int.* 2016. V. 2016. P. 1–6.

290. Xu J., Zhou X., Gao Z., Song Y.Y., Schmuki P. Visible-light-triggered drug release from TiO₂ nanotube arrays: a controllable antibacterial platform // *Angew. Chemie - Int. Ed.* 2016. V.55. (2). P. 593–597.
291. Zakharov S.D., Ivanov A.V. Light-oxygen effect in cells and its potential applications in tumour therapy (review) // *Quantum Electronics.* 1999. V. 29(12). P. 1031–1053.
292. Zakharov S.D., Ivanov A.V., Wolf E.B., Danilov V.P., Murina T.M., Nguen K.T., Novikov E.G., Panasenko N.A., Perov S.N., Skopinov S.A., Timofeev Y.P. Structural rearrangements in the aqueous phase of cell suspensions and protein solutions induced by a light-oxygen effect // *Quantum Electronics.* 2003. V. 33(2). P. 149–162.
293. Zakharov S.D., Korochkin I.M., Yusupov A.S., Bezotosnyi V. V., Cheshev E.A., Frantzen F. Application of diode lasers in light-oxygen cancer therapy // *Semiconductors.* 2014. V. 48(1). P. 123–128.
294. Zakharova E.T., Sokolov A.V., Pavlichenko N.N., Kostevich V.A., Abdurasulova I.N., Chechushkov A.V., Voynova I.V., Elizarova A.Y., Kolmakov N.N., Bass M.G., Semak I.V., Budevich A.I., Kozhin P.M., Zenkov N.K., Klimenko V.M., Kirik O.V., Korzhevskii D.E., Menshchikova E.B., Vasilyev V.B. Erythropoietin and Nrf2: key factors in the neuroprotection provided by apo-lactoferrin // *BioMetals.* 2018. V. 31(3). P. 425–443.
295. Zhang D.X., Borbouse L., Gebremedhin D., Mendoza S.A., Zinkevich N.S., Li R., Gutterman D.D. H₂O₂-induced dilation in human coronary arterioles: Role of protein kinase G dimerization and large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel activation // *Circ. Res.* 2012. V. 110(3). P. 471–480.
296. Zhou Z., Song J., Nie L., Chen X. Reactive oxygen species generating systems meeting challenges of photodynamic cancer therapy // *Chem. Soc. Rev.* 2016. V. 45(23). P. 6597–6626.
297. Zhu X., Wentworth P., Wentworth A.D., Eschenmoser A., Lerner R.A., Wilson I.A. Probing the antibody-catalyzed water-oxidation pathway at atomic resolution // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004. V. 101(8). P. 2247–2252.