

## СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ И КЛЕТОЧНАЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ

©2009 г. Ю. А. ВЛАДИМИРОВ, Е. В. ПРОСКУРНИНА

*Факультет фундаментальной медицины  
МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва*

I. Введение. II. Собственная хемилюминесценция клеток. III. Люминол-зависимая ХЛ клеток. IV. Люцигенин-зависимая ХЛ клеток. V. Другие ХЛ-зонды на активные формы кислорода. VI. Кумарин-активируемая ХЛ. VII. Применение клеточной ХЛ в медицине. VIII. Заключение.

### I. ВВЕДЕНИЕ

#### МИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЛУЧИ И СВЕРХСЛАБОЕ СВЕЧЕНИЕ

Представление о том, что живые клетки человека и животных могут излучать слабый свет в ультрафиолетовой области спектра, было впервые сформулировано русским ученым Александром Гавриловичем Гурвичем и названо им митогенетическим излучением [1, 2]. Опыты Гурвича были основаны на регистрации излучения по его действию на биологические объекты, названные *биологическими детекторами*, к числу которых относятся почкующиеся дрожжи и делящиеся клетки. Использование чувствительного *физического*

---

*Принятые сокращения:* АФК – активные формы кислорода; Кум-ХЛ – хемилюминесценция, усиленная изохинолизиновым кумарином С-525; ЛХЛ – хемилюминесценция в присутствии люминола; Люц-ХЛ – хемилюминесценция в присутствии люцигенина; ПОЛ – свободнорадикальное цепное (перекисное) окисление липидов; САР – супероксид анион-радикал ( $\cdot\text{OO}^-$ ); СХЛ – собственная хемилюминесценция (сверхслабое свечение); ХЛ – хемилюминесценция; ХЛ-зонд – хемилюминесцентный зонд – химическое соединение, которое вступает в ХЛ-реакцию с активными молекулами: свободными радикалами, пероксидами, гипохлоритом и т.д.; ХЛ-реакция – хемилюминесцентная реакция – химическая реакция, сопровождаемая излучением света (в видимой, УФ или ближней ИК-области спектра); ЭПР – спектроскопия электронного парамагнитного резонанса; ТАР – общая антиоксидантная активность (*total antioxidant reactivity*); ТРАР – общая антиоксидантная емкость (*total reactive antioxidant potentials*).

*Адрес для корреспонденции:* yuvlad@mail.ru.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 08-04-01074-а и 09-04-07075-д.

детектора, фотоумножителя, охлажденного твердой углекислотой [3–5] или жидким азотом [6], позволило обнаружить свечение проростков растений [3–5], а также клеток и тканей животных [6–9], измельченных кусочков тканей и изолированных митохондрий [10–13]. Свечение всех этих объектов было названо *сверхслабым свечением* [6] или *ultraweak chemiluminescence* [14]. Важным этапом в этой серии исследований были работы Роберта Эллана, открывшего в 1973 г. сверхслабое свечение стимулированных бактериями лейкоцитов крови человека [15, 16] и предложившего люминол в качестве активатора хемилюминесценции макрофагов [17].

#### СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ

Во всех приведенных случаях свечение было связано с образованием и превращением свободных радикалов [11, 18, 19], о которых уместно сказать несколько слов.

#### *Первичные и вторичные радикалы*

Главным источником всех радикалов в нормально функционирующих клетках животных и человека служит реакция одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода, приводящая к образованию супероксид анион-радикала  $\cdot\text{OO}^-$  (САР). Этот радикал образуется либо НАДФН-оксидазным комплексом цитоплазматической мембраны или мембран эндоплазматического ретикула [20, 21], либо дыхательной цепью внутренней мембраны митохондрий [22]. Второй радикал, имеющий не меньшее значение в жизни клетки, – это монооксид азота, NO, образуемый NO-синтазами. Оба радикала образуются ферментными системами и были названы *первичными радикалами* [23].

Все радикалы весьма реактивны, и первичные радикалы быстро переходят в молекулярные продукты (см. схему на рис. 1). Специальный фермент супероксиддисмутаза (СОД) превращает САР в пероксид водорода  $\text{HOOH}$  (реакция 1). NO в присутствии САР реагирует с ним с образованием токсичного иона пероксинитрита  $\text{ONOO}^-$  (реакция 2). Супероксид обладает способностью восстанавливать трехвалентное железо, хранимое в ферритине или входящее в состав железно-серных комплексов цепей переноса электронов, до двухвалентного (реакция 3), что и происходит в неблагоприятных для клетки условиях [24, 25]. Двухвалентное железо охотно реагирует с  $\text{HOOH}$  или гипохлоритом с образованием чрезвычайно активного радикала гидроксила  $\cdot\text{OH}$  (реакции 4–5) [26], а также способно разветвлять цепи окисления липидов, реагируя с липогидропероксидами (реакция 6). Гидроксил-радикал может запускать процесс перекисного окисления

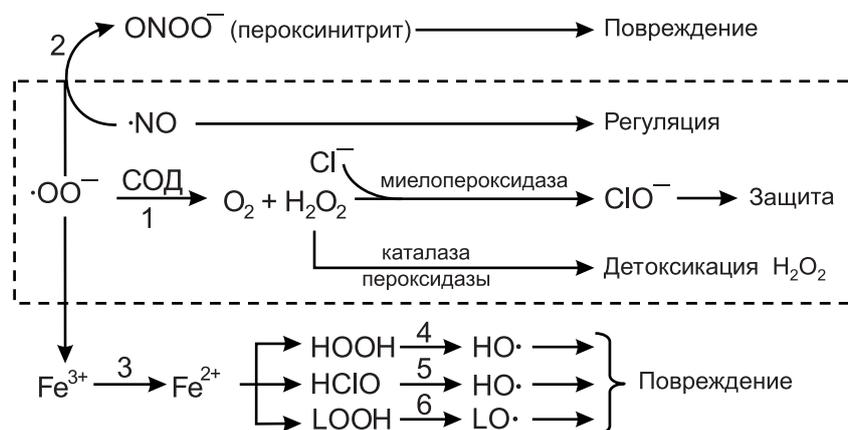


Рис. 1. Метаболизм первичных радикалов (объяснения в тексте).

липидов с образованием липидных радикалов. В результате всех этих реакций в клетках образуется совокупность весьма агрессивных соединений ( $\cdot\text{OO}^-$ ,  $\text{HOON}$ ,  $\cdot\text{OH}$  и другие), которые были названы *активными формами кислорода* (АФК) [27], к числу которых иногда относят также гипохлорит  $\text{ClO}^-$  и *активные формы азота*, связанные с превращением  $\text{NO}$ , прежде всего высшие окислы азота и пероксинитрит. Радикалы гидроксила и липидов мы назвали *вторичными* [23].

#### *Активные формы кислорода и оксидативный стресс*

Термины «активные формы кислорода» (АФК) и «оксидативный стресс», если говорить о числе статей, в которых упоминается этот термин в международном ресурсе PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>), употребляются в научной медицинской литературе так же часто, как слова «радикалы» и «хемилюминесценция» (число статей на 3 декабря 2008 года составляло, соответственно 40112, 60470, 37014 и 44951), но не обладают той же степенью определенности.

В понятие АФК разные исследователи включают разное число соединений, так или иначе связанных с первичным образованием супероксидного радикала. В известной монографии Халливелла и Гаттериджа в качестве АФК приводятся следующие соединения: супероксидный анион-радикал  $\cdot\text{OO}^-$ , пероксид водорода  $\text{HOON}$ , гидроксил радикал  $\cdot\text{OH}$ , пероксил радикалы  $\text{ROO}\cdot$ , алкоксил радикалы  $\text{RO}\cdot$ , гидропероксил радикал  $\text{HOO}\cdot$ , гипохлорит  $\text{ClO}^-$ ,  $\text{O}_3$ , синглетный

кислород  $^1\text{O}_2$ , пероксинитрит  $\text{ONOO}^-$  [28]. Такой перечень нам не кажется идеальным. Супероксид, гидроксил радикал, пероксид водорода, синглетный кислород и озон, несомненно, могут считаться АФК. Гипохлорит может с равным успехом называться *активной формой хлора*. Пероксинитрит, равно как и исходный радикал – монооксид азота, а также многочисленные радикальные и нерадикальные формы высших окислов азота, правильнее назвать не активными формами кислорода, а *активными формами азота*. Наконец, участники и продукты цепного окисления липидов, алкильные радикалы  $\text{L}\cdot$ , алкоксильные  $\text{LO}\cdot$  и пероксильные  $\text{LOO}\cdot$  по локализации, механизму образования и действия заметно отличаются от группы чисто кислородных АФК и скорее заслуживают названия «активных форм липидов», хотя нам кажется предпочтительнее термин *липидные радикалы*. В любом случае, обобщенное понятие АФК, хоть и удобно, но весьма расплывчато и затушевывает тот факт, что разные представители этой группы обладают далеко не одинаковыми свойствами, выполняют разные функции в клетке, а их соотношение в различных ситуациях может быть совершенно различным.

Термин *оксидативный стресс (oxidative stress)* был введен Хельмутом Зисом в 1991 г. и официально вошел в словарь Mesh Pubmed в 1995 г. Согласно определению, данному в PubMed, оксидативный стресс – это нарушение баланса про- и антиоксидантов в пользу первых, которое может привести к повреждению. Оксидативный стресс проявляется в накоплении поврежденных оснований ДНК, продуктов окисления белков и перекисидации липидов, а также в снижении уровня антиоксидантов и связанной с этим повышенной восприимчивостью липидов мембран и липопротеинов к действию прооксидантов, включая ионы  $\text{Fe}^{2+}$  или  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Неопределенность термина «оксидативный стресс» связана как с тем, что оба понятия – *прооксиданты* и *антиоксиданты* – весьма расплывчаты, так и с тем, что неясно, где кончается баланс и начинается дисбаланс.

В конкретных ситуациях понятия АФК и оксидативный стресс могут, однако, описывать ситуацию более четко. Например, при стимулировании фагоцитов под АФК обычно подразумевают все выделяемые при этом активные формы кислорода, азота, хлора, липидные радикалы и гидропероксиды, а под оксидативным стрессом – повреждение других клеток этими продуктами.

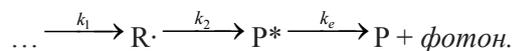
#### ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ КАК МЕТОД ОБНАРУЖЕНИЯ РАДИКАЛОВ

Непосредственный химический анализ радикалов невозможен, т. к. в отличие от обычных молекул их нельзя ни выделить, ни очистить

вследствие огромной реакционной способности. Обычно определяют устойчивые молекулярные продукты реакций, в которых участвовали радикалы. В настоящем обзоре мы не будем рассматривать ни методы определения этих *маркеров*, ни методы, основанные на ингибировании процессов перехватчиками радикалов, например, такими как фенольные *антиоксиданты* (для радикалов гидроксила, липидов и других органических молекул) или *антиоксидантные ферменты* (супероксиддисмутаза для САР и каталаза для  $H_2O_2$ ) [29]. Эти методы зачастую весьма эффективны, но не позволяют определять концентрацию или природу радикалов непосредственно.

Прямой метод анализа радикалов – метод электронного парамагнитного резонанса, или ЭПР. В принципе он позволяет не только обнаруживать, но и идентифицировать многие радикалы путем анализа сверхтонкой структуры сигналов ЭПР. Однако в биологических системах он часто оказывается недостаточно чувствительным из-за крайне низкой стационарной концентрации радикалов в клетках и тканях. Например, обнаружить непосредственно методом ЭПР радикалы, образующиеся при взаимодействии ионов  $Fe^{2+}$  с гидропероксидами липидов, удалось только в проточной системе с большим расходом реактивов [30] или с использованием спиновых ловушек [31]. Последние могут, однако, влиять на протекающие в системе биохимические реакции или разрушаться в ходе некоторых из них. Метод хемилюминесценции (ХЛ) обладает тем преимуществом, что, во-первых, он обычно не связан с изменением хода процессов в растворах, клетках или даже целых тканях, где регистрируется свечение, а во-вторых, весьма чувствителен при обнаружении именно высокореакционных радикалов.

Дело в том, что методом ХЛ непосредственно определяется не *концентрация* радикалов, а *скорость реакции*, в которой они образуются. В самом общем случае реакция, в которой образование радикалов приводит к ХЛ, может быть представлена схемой:



Интенсивность свечения пропорциональна скорости последней реакции

$$I_{CL} = K \cdot k_e [P^*], \quad (1)$$

где  $K$  – коэффициент, который характеризует чувствительность прибора к излучению с данным квантовым выходом и спектром. Из-за высокой скорости реакций превращения радикалов  $[R\cdot]$ , в системе мгновенно устанавливается стационарное состояние, при котором

скорости всех последовательных реакций одинаковы. Отсюда ясно, что интенсивность ХЛ пропорциональна скорости образования радикалов  $v_1$

$$I_{CL} = K \cdot k_e [P^*] = K \cdot v_1. \quad (2)$$

Мы видим, что при прочих равных условиях между скоростью образования радикалов и их стационарной концентрацией имеется прямая зависимость, т.к.

$$I_{CL} = K \cdot v_1 = K \cdot k_2 [R\cdot]. \quad (3)$$

Таким образом, метод ХЛ отражает концентрацию радикалов в системе, как и методы спектрофотометрии или ЭПР. Но в отличие от ЭПР, показания хемиллюминиметра не зависят от того, какова реакционность радикалов.

В нашей схеме эта величина определяется константой  $k_2$  скорости реакции исчезновения радикалов  $R\cdot$ . Стационарная концентрация радикалов определяется уравнением:

$$K \cdot v_1 = K \cdot k_2 [R\cdot] \text{ откуда } [R\cdot] = v_1 / k_2. \quad (4)$$

Методом ЭПР (как и другими методами спектроскопии или флуориметрии) определяется именно стационарная концентрация вещества, в нашем случае радикалов  $[R\cdot]$ . При увеличении реактивности радикалов, т. е. с ростом  $k_2$  величина  $[R\cdot]$  падает, а вместе с тем уменьшается регистрируемый сигнал. Даже если активных радикалов образуется много, их будет не видно из-за высоких значений  $k_2$ . Интенсивность ХЛ, напротив, *не зависит* от реакционной способности радикалов, т.к. при увеличении реактивности радикалов одновременно и в той же мере снижается стационарная концентрация радикалов, их произведение остается постоянным, а вместе с тем не происходит и изменения интенсивности ХЛ (уравнение 3). Иными словами, метод ХЛ регистрирует даже самые активные радикалы, концентрация которых в изучаемой системе может быть исчезающе мала, и в этом – его уникальность и преимущество перед другими методами обнаружения радикалов в химических и биологических системах. Чем активнее радикал, тем труднее его непосредственно обнаружить методом ЭПР, но для ХЛ этого ограничения не существует.

#### ПРИБОРЫ ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

Время, когда для измерения слабого свечения приходилось охлаждать фотоумножитель жидким азотом [6–12] или твердой углекислотой [3–5], вероятно, ушло безвозвратно. Современные фотоумножители и методы компьютерной обработки сигналов позволяют проводить

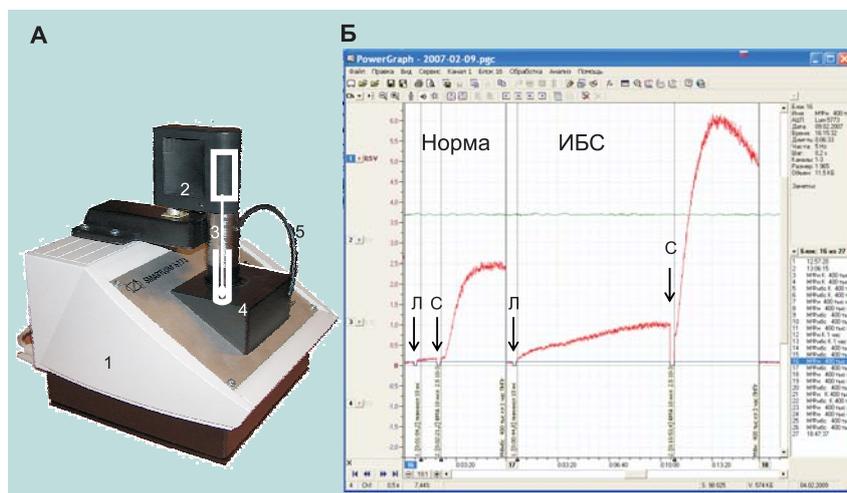


Рис. 2. Портативный хемилюминесцентметр Lum-5773 (<http://www.powergraph.ru/hard/lum.asp>).

А – внешний вид прибора: 1 – корпус, 2 – электромотор для мешалки, 3 – мешалка, 4 – кювета, помещенная внутрь светоизолированного термостата, 5 – светоизолированная трубочка для добавки растворов по ходу измерения. Приемное устройство расположено под кюветой.

Б – изображение экрана компьютера с записью кривой хемилюминесценции фагоцитов, приготовленных из моноцитов здорового донора (слева) и большого ишемической болезнью сердца (справа). Стрелками показаны моменты добавки люминола (Л) и стимула ФМА (С). Запись и обработка кривых осуществлена с помощью программы PowerGraph (<http://www.powergraph.ru/hard/lum.asp>). Измерения проведены совместно с М.В.Биленко и С.А.Павловой [225].

регистрацию даже собственного свечения клеток и тканей, не говоря уже об активированной ХЛ. Однако специализированных приборов, непосредственно приспособленных для регистрации кинетики слабой ХЛ, сопровождающей образование свободных радикалов, выпускается мало. Недавно в нашей лаборатории совместно с малым предприятием ИнтерОптика был разработан портативный хемилюминесцентметр, обладающий достаточной чувствительностью и снабженный современной программой обработки данных PowerGraph (рис. 2).

#### СОБСТВЕННАЯ И АКТИВИРОВАННАЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ

Открытие сверхслабого, или лучше сказать, собственного свечения клеток и тканей (СХЛ) [6–9] инициировало серию исследований как в СССР (см. монографии [11, 32, 33], так и за рубежом [14, 34–46], пос-

кольку ее использование дало новый импульс изучению свободных радикалов в жизни клеток и развитии патологических состояний [33]. Но метод этот имеет два недостатка [47, 48]. Во-первых, из-за низкой интенсивности свечения измерение СХЛ требует не только применения весьма чувствительной, а следовательно дорогой, аппаратуры, но и большого количества материала для анализа, что для биологии и медицины весьма нежелательно, а часто просто невозможно. Во-вторых, метод малоспецифичен, т.к. за сверхслабое свечение в биологических объектах могут отвечать реакции многих активных частиц: радикалов и пероксидов [11, 33, 49].

Выход заключается в использовании определенных веществ, получивших название *активаторов* ХЛ (по-английски, *enhancers* – усилителей). По механизму действия активаторы распадаются на две четко различающиеся группы, которые можно назвать *химическими* и *физическими* активаторами [50].

Химические активаторы ХЛ, называемые также ХЛ-зондами, – это соединения, вступающие в реакции с АФК или органическими свободными радикалами, в ходе которых образуются молекулы продуктов в возбужденном электронном состоянии. Наблюдаемое при этом свечение связано с переходом молекул в основное состояние, что приводит к высвечиванию фотонов [51]

Активатор + радикалы → продукт\* → продукт + *фотон*.

Хорошо известными представителями таких активаторов могут служить люминол (5-амино-1,2,3,4-тетрагидро-1,4-фталазиндион, гидразид 3-аминофталево́й кислоты) и люцигенин (динитрат 10,10'-диметил-9,9'-биакридиния). Схемы их превращений, приводящих к свечению, будут рассмотрены ниже.

*Физические активаторы* не вступают в химические реакции и не влияют на ход реакций, сопровождающихся свечением, но, тем не менее, многократно усиливают интенсивность ХЛ. В основе их действия лежит физический процесс переноса (миграции) энергии с молекулы продукта хемилюминесцентной реакции на активатор:

Радикалы → продукт\* → продукт + фотон 1 (*неактивированная ХЛ*)

Продукт\* + активатор → продукт + активатор\* →  
→ фотон 2 (*активированная ХЛ*).

Усиление свечения активатором происходит в том случае, если квантовый выход излучательного перехода (люминесценции) во втором случае выше, чем в первом. Наиболее эффективным физическим активатором ХЛ при перекисном окислении липидов служит

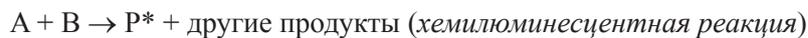
производное кумарина С-525; его добавление к системе, где идет реакция липидной пероксидации, усиливает свечение более, чем в 1500 раз [52].

## II. СОБСТВЕННАЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ КЛЕТОК

При взаимодействии между собой АФК (см. литературу в [11]), в реакции гипохлорита с НООН, при взаимодействии пероксинитрита с белками [53–55], а также при цепном (перекисном) окислении липидов [33] наблюдается очень слабое («сверхслабое») свечение [6, 47].

### МЕХАНИЗМ ОБРАЗОВАНИЯ МОЛЕКУЛ В ЭЛЕКТРОННО-ВОЗБУЖДЕННОМ СОСТОЯНИИ

Как известно, ХЛ называют свечение, сопровождающее химические реакции. Наличие такого свечения означает, что энергия, которая выделяется на одной из стадий химического процесса, протекающего в системе, оказывается достаточной для образования одного из продуктов реакции в электронно-возбужденном состоянии:



Спектр ХЛ и квантовый выход  $Q_{lum}$  второй из этих реакций – это спектр и квантовый выход обычной фотолюминесценции продукта. В большинстве биохимических реакций продукты обладают очень низким квантовым выходом фотолюминесценции, близким к нулю. Однако и образование возбужденных молекул в ХЛ реакции  $Q_{ex}$  тоже обладает низким выходом, поскольку большая часть молекул в химических реакциях, протекающих в водной среде при обычных температурах сопровождается образованием молекул не в возбужденном, а в основном электронном состоянии:  $A + B \rightarrow P$ . Общий квантовый выход ХЛ  $Q_{CL} = Q_{ex} \cdot D_{lum}$  в таких реакциях, как цепное окисление органических молекул (включая, по-видимому, перекисное окисление липидов) имеет порядок величины  $Q_{CL} = 10^{-4} \cdot 10^{-4} = 10^{-8}$ , т.е. очень мал (сверхслабое свечение) [11].

Причина низкого выхода образования возбужденных молекул продукта в ХЛ-реакции становится ясной из рассмотрения схемы излучательных и безызлучательных электронных переходов в молекуле ароматической аминокислоты при простейшей ХЛ-реакции: рекомбинации катион-радикала  $AN^+$  и сольватированного электрона  $e^-$ , образующихся при фотоионизации ароматических аминокислот под действием УФ облучения. Приведенная на рис. 3 схема электронных переходов, построенная на основании исследований термо- и фото-

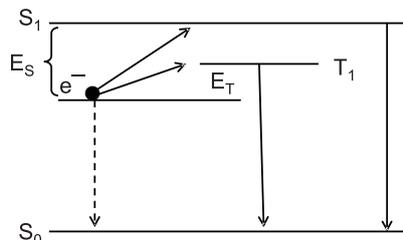


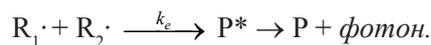
Рис. 3. Схема электронных уровней и электронных переходов в ароматических аминокислотах, облученных при 77 К УФ-радиацией.

$S_0$  – аминокислота в основном состоянии;  $S_1$  – в возбужденном синглетном состоянии;  $T_1$  – в триплетном состоянии;  $e^-$  – сольватированный электрон, появляющийся при фотоионизации аминокислоты при УФ-облучении. Электронные переходы  $e^- \rightarrow S_1 \rightarrow S_0$  и  $e^- \rightarrow T_1 \rightarrow S_0$  сопровождаются высвечиванием фотона. Прямой переход  $e^- \rightarrow S_0$  свечением не сопровождается. Отношение вероятности излучательных переходов к вероятности перехода безызлучательного равно квантовому выходу (хеми)люминесценции. Разница уровней  $e^-$  и  $T_1$  (или  $S_1$ ) равна энергии активации люминесценции при рекомбинации сольватированного электрона и катион-радикала. Видно, что энергия активации для излучения фотона с триплетного состояния ( $T_1$ ) существенно ниже энергии активации для излучения при переходе через синглетное возбужденное состояние. По этой причине вероятность излучательного перехода, т.е. квантовый выход хемилюминесценции, через триплетное состояние примерно в 100 000 раз выше, чем при переходе через синглетное состояние. Эта схема показывает также, что энергия фотона равна сумме энергии активации и теплоты реакции рекомбинации сольватированного электрона и катион-радикала (т.е. реакции перехода  $e^- \rightarrow S_0$ ). Подробнее см. [11], стр. 54–62.

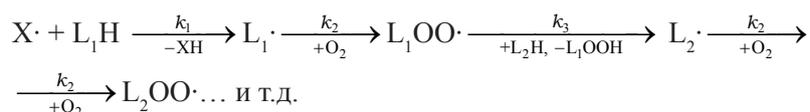
индуцированной люминесценции УФ-облученных образцов [11], позволяет объяснить основные закономерности, типичные для реакций ХЛ: низкий квантовый выход ХЛ, суммирование тепловой энергии хемилюминесцентной реакции и энергии активации свечения (правило Одюбера) и то обстоятельство, что в большинстве ХЛ-реакций спектр ХЛ совпадает со спектром фосфоресценции, а не флуоресценции продукта реакции [56] (подробнее см. в [11] и [49]).

#### СОБСТВЕННАЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ПРИ ПЕРЕКИСНОМ ОКИСЛЕНИИ ЛИПИДОВ

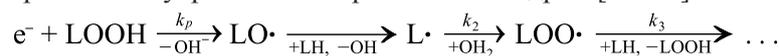
Образование возбужденного состояния при взаимодействии свободных радикалов в самом общем виде может быть описано уравнением реакции:



Однако в разных случаях процесс различается в деталях. Наиболее распространенная реакция, сопровождающаяся ХЛ в клетках и тканях животных и человека, это реакция перекисного окисления липидов (ПОЛ), которая представляет собой частный случай реакций цепного окисления органических соединений молекулярным кислородом. Цепное окисление представляет собой реакцию, субстратами которой служат полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), входящие в состав липидов биологических мембран и липопротеинов (обозначим молекулу ЛН), и молекулярный кислород, а продуктом – гидропероксиды ПНЖК (LOOH). Реакция начинается при появлении в среде активного радикала X·, которым может быть липидный радикал, т.е. радикал ПНЖК, такой как алкил L·, алкоксил LO· или диоксил (пероксил) LOO·, другие органические радикалы и радикал гидроксила HO·:



Продукты цепного окисления, гидропероксиды липидов LOOH, могут стать источником новых радикалов, а следовательно – источником новых цепей окисления, при реакции одноэлектронного восстановления, например, в присутствии ионов Fe<sup>2+</sup> [33, 57, 58], либо при пероксидазной реакции, катализируемой гемовыми белками, в том числе цитохромом c, связанным с кислыми фосфолипидами на поверхности внутренней мембраны митохондрий [59–62]



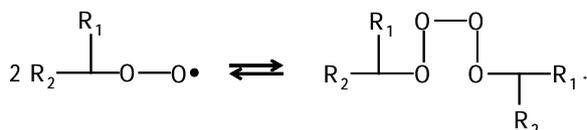
При этом происходит разветвление цепи окисления и скорость ПОЛ в системе резко возрастает.

В этих реакциях возбужденные молекулы образуются при взаимодействии двух пероксидных радикалов. В специальных опытах с растворами, не содержащими кислорода, было показано, что образование одних только радикалов L· и LO· недостаточно для возникновения ХЛ, нужны радикалы LOO·, которые образуются в присутствии кислорода [63]. Наиболее вероятно, что ХЛ при липопероксидации связана с диспропорционированием радикалов LOO·:

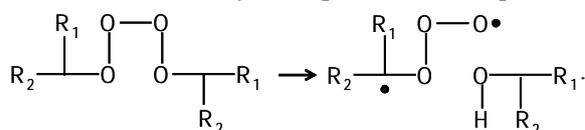


Здесь  $k_6$  – константа скорости реакции.

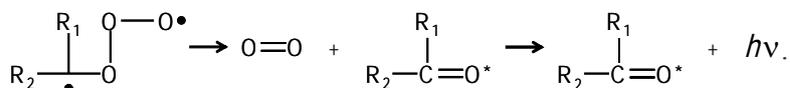
Этот механизм был доказан в реакциях цепного окисления углеводов, также сопровождающихся ХЛ (библиографию см. в [11]). По-видимому, сначала образуется тетроксид



Затем происходит связанное с развитием механического напряжения в скелете молекулы образование спирта и бирадикала



Эту стадию мы можем рассматривать как момент разделения электронов в молекуле. Как и в случае фотоионизации, рассмотренной выше, образованию возбужденной молекулы продукта предшествует *разделение электронов*, но в данном случае это внутримолекулярный, а не межмолекулярный процесс. Последующая химическая стадия приводит к выделению молекулы кислорода и образованию кетона в триплетном возбужденном состоянии [64–66]



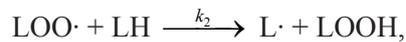
Выход образования возбужденных молекул кетона, как и квантовый выход его люминесценции (фосфоресценции в данном случае), очень малы, благодаря чему общий квантовый выход ХЛ тоже весьма низок (порядка  $10^{-8}$ ). В работе [66] рассмотрен детальный механизм образования возбужденной молекулы формальдегида при термическом разложении диоксетана как примера простейшей реакции ХЛ подобного типа.

Регистрация ХЛ при цепном окислении позволяет измерять кинетику изменения стационарной концентрации свободных радикалов в системе во времени, а вместе с тем – измерять скорость реакции ПОЛ в каждый данный момент времени. Найдем связь между концентрацией радикалов  $\text{LOO}\cdot$  и интенсивностью свечения  $I_{\text{CL}}$ . Она следует из уравнения реакции (см. выше)

$$I_{\text{CL}} = Q_{\text{CL}} k_6 [\text{LOO}\cdot]^2 \quad (5)$$

Здесь  $I_{\text{CL}}$  – общий световой поток ХЛ во всех направлениях и при всех длинах волн, Эйнштейн/с;  $Q_{\text{CL}}$  – квантовый выход ХЛ.

Скорость процесса пероксидного окисления – это скорость образования продуктов окисления гидропероксидов в реакции



где  $k_2$  – константа скорости этой реакции.

$$d[\text{LOOH}]/dt = k_2[\text{RH}][\text{LOO}\cdot] = k_2[\text{RH}]\sqrt{I_{\text{CL}}/(Q_{\text{CL}}k_6)}. \quad (6)$$

Следовательно, скорость пероксидного окисления пропорциональна стационарной концентрации свободных радикалов в системе и связана с интенсивностью ХЛ уравнением (6). Поэтому, регистрируя интенсивность ХЛ, можно следить за изменениями во времени скорости пероксидного окисления липидов, т.е. изучать кинетику этого процесса, а тем самым и его механизм [33, 58, 67, 68]. Сочетание анализа кинетики с математическим моделированием процесса позволило, кроме того, исследовать этим методом активность и содержание антиоксидантов в исследуемых системах [23, 69–76].

#### КИНЕТИКА ЖЕЛЕЗО-ИНДУЦИРОВАННОЙ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

Описанный выше параллелизм между интенсивностью собственной ХЛ, сопровождающей цепное окисление липидов, и скоростью цепного окисления четко проявляется при изучении довольно сложной кинетики ХЛ в липид-содержащих системах, включая липосомы и митохондрии, к суспензии которых добавлено некоторое количество солей  $\text{Fe}^{2+}$ . Типичная кинетика ХЛ при реакции цепного окисления липидов, инициированной добавлением к исследуемой системе солей двухвалентного железа, показана на рис. 4 и включает в себя ряд последовательных стадий [77, 78]. Непосредственно после добавления ионов  $\text{Fe}^{2+}$  наблюдается *быстрая вспышка* свечения, связанная с разложением гидропероксидов липидов, если они содержались в объекте, которая сменяется фазой *угнетения свечения*. Эта стадия обусловлена антиоксидантными свойствами  $\text{Fe}^{2+}$  при его достаточно высоких концентрациях (порядка 50 мкМ в суспензиях митохондрий и липосом). При снижении концентрации  $\text{Fe}^{2+}$  ниже этого *критического значения* ионы  $\text{Fe}^{2+}$  начинают работать как прооксиданты за счет реакции разветвления цепей, в результате чего развивается так называемая *медленная вспышка* свечения. Она затухает после полного окисления  $\text{Fe}^{2+}$  до  $\text{Fe}^{3+}$ . Однако процесс на этом не заканчивается, т.к. вслед за этим в суспензии липосом, митохондрий и в плазме крови постепенно развивается так называемое *стационарное свечение* (см. рис. 4) [57].

Исследование кинетики такой ХЛ в сочетании с определением окисления  $\text{Fe}^{2+}$ , потребления кислорода и математическим моделированием реакций [79] позволило расшифровать систему уравнений

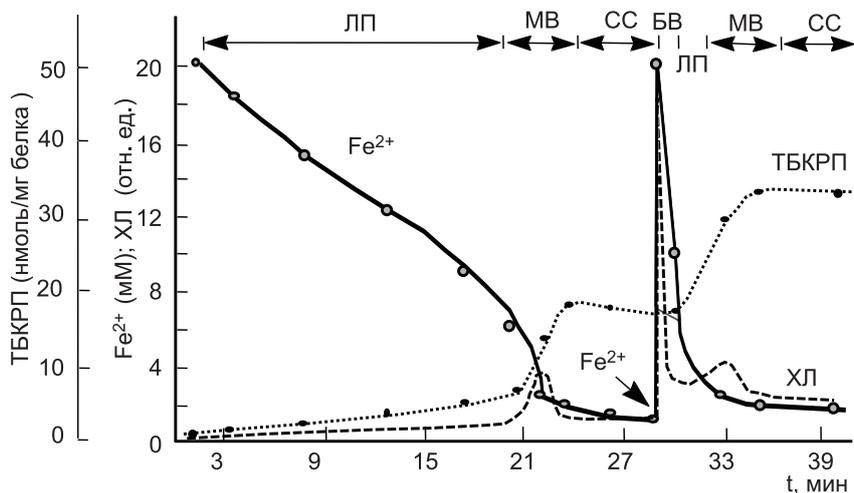


Рис.4. Кинетика окисления ионов  $\text{Fe}^{2+}$  (сплошная линия), образования продуктов перекисного окисления липидов (реактивные продукты тиобарбитуровой кислоты, ТБКРП) (точечная линия) и хемилюминесценции (пунктирная линия) в суспензии митохондрий, к которой добавлены  $0,2 \text{ мМ Fe}^{2+}$  (момент введения показан стрелкой) [57].

Состав инкубационной смеси: 1 мл суспензии митохондрий в 10 мл  $10^5 \text{ мМ NaCl}$  и  $20 \text{ мМ}$  трис-буфера,  $\text{pH } 7,5$ ;  $t=20^\circ\text{C}$ . ЛП – латентный период, БВ – быстрая вспышка, MB – медленная вспышка, СС – стационарное свечение.

разветвленного цепного окисления липидов, определить константы скоростей основных реакций, а также изучить механизм действия и активность различных антиоксидантов, как природных [74, 80–82], так и синтетических [71]. Эти результаты подробно рассмотрены в обзорах [33, 47, 48, 58, 67, 68, 76] и здесь мы не будем на них останавливаться.

#### СОБСТВЕННАЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ (СВЕРХСЛАБОЕ СВЕЧЕНИЕ) ТКАНЕЙ И КЛЕТОК

Как уже говорилось, сверхслабое свечение клеток и ткани было впервые описано в 1959–61 гг. [7, 8, 11].

В 1964–66 гг. была проведена серия исследований по СХЛ митохондрий, гомогенатов и кашиц печени крысы, в которых была выявлена четкая корреляция между уровнем собственного свечения и накоплением продуктов липидной перекисидации, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой [10, 12, 83–85]. Было показано также, что присутствие примесей ионов железа резко стимулирует свечение

и липопероксидацию, тогда как комплексон ЭДТА полностью их снимает. В то же время была выявлена связь между метаболизмом и СХЛ: последнее угнеталось амиталом и цианидом. Все эти данные, обобщенные в монографии 1972 г. [33], говорили о том, что свечение связано с липидной пероксидацией в клетках и изолированных митохондриях и что решающую роль в активации этого процесса играют ионы  $Fe^{2+}$  (см. также [57]).

Однако, цепное окисление липидов – не единственная возможная причина собственной ХЛ клеток и тканей животных. В большой серии работ было показано, что реакции с участием радикалов кислорода также сопровождаются ХЛ, возможно, в результате образования синглетного кислорода (см. библиографию в [11]). Но интенсивность этого свечения обычно много ниже, чем при реакциях липопероксидации. Еще одна составляющая «сверхслабого свечения» клеток и тканей была описана в опытах группы Тёрренса на перфузируемом легком и в модельных системах [53, 86], связанная с биосинтезом NO. С другой стороны, в работе [87] было показано, что при взаимодействии белка с пероксинитритом наблюдается ХЛ. При действии пероксинитрита на индивидуальные аминокислоты наиболее интенсивная ХЛ была получена с триптофаном, несколько меньшая – с фенилаланином [86]. Можно думать, что при окислении триптофана имеет место образование возбужденных молекул. В опытах на перфузируемом легком NO-зависимая СХЛ наблюдалась в норме, тогда как при воспалительных процессах в легком основной составляющей становилась ХЛ, связанная с липидной пероксидацией [88].

В 1972 г. было обнаружено собственное свечение стимулированных фагоцитов [15, 16]. Динамика развития ХЛ в суспензии макрофагов показана на рис. 2б. При помещении в кювету суспензии фагоцитирующих клеток наблюдается относительно слабая фоновая ХЛ, однако после добавления стимула, вызывающего продукцию супероксидного радикала и других АФК, наблюдается развитие вспышки ХЛ (ХЛ-ответ, *CL-response*).

Следует признать, что собственная ХЛ для изучения образования радикалов клетками в настоящее время используется редко по причине слабости свечения. После работ Эллана и Луза 1976 г. [17], в которых в качестве активатора ХЛ фагоцитов использовался люминол, метод ЛХЛ практически вытеснил метод анализа СХЛ. Обычно добавление люминола увеличивает интенсивность ХЛ клеток более, чем в 1000 раз, а это означает, что для анализа можно брать в 1000 раз меньше биологического материала.

Однако надо помнить, что информация, даваемая собственной ХЛ и ЛХЛ, не идентична, поскольку интенсивность ЛХЛ определяется в основном концентрацией гипохлорит +  $\text{H}_2\text{O}_2$  или радикалов гидроксид + супероксид, тогда как СХЛ зависит обычно от скорости липидной пероксидации в системе. В качестве работы, где собственная ХЛ была с успехом использована, можно упомянуть о публикациях Г.И.Клебанова и сотр., в которых методами анализа ТБКРП (реактивных продуктов тиобарбитуровой кислоты) липидной пероксидации [89] и собственной ХЛ [90] была показана активация пероксидации липидов липопротеинов низкой плотности плазмы крови стимулированными нейтрофилами. Эта активация осуществлялась водорастворимыми АФК, проникающими через диализную мембрану, но только в присутствии ионов  $\text{Fe}^{3+}$  в водорастворимой форме (в комплексе с АДФ). Последовательность событий при этом можно представить таким образом:

- 1) Стимулирование клеток зимозаном  $\rightarrow$  выделение  $\cdot\text{OO}^- \rightarrow$   
 $\rightarrow$  образование  $\text{HOON}$
- 2)  $\text{Fe}^{3+} + \cdot\text{OO}^- \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$
- 3)  $\text{HOON} + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^- + \cdot\text{OH} \rightarrow$  цепное окисление липидов.

В пользу такой схемы говорит то, что активация ПОЛ снималась как супероксид дисмутазой (подавление стадии 2), так и каталазой (подавление реакции 3).

Имеется много данных о том, что описанные события имеют важное значение для образования окисленных форм липопротеинов плазмы крови, что, в свою очередь, существенно для развития атеросклероза (см. обзоры [91–94]).

### III. ЛЮМИНОЛ-ЗАВИСИМАЯ ХЛ КЛЕТОК

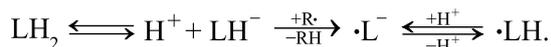
Измерение люминол-зависимой ХЛ клеток крови широко используется для изучения функционального состояния фагоцитарного звена иммунитета.

Появление и взаимодействие чужеродного материала с фагоцитирующей клеткой запускает сложный каскад физиологических и метаболических процессов, начало которого – взаимодействие рецепторов на поверхности клетки с разного рода лигандами, включая иммунные комплексы, а конец – образование супероксидных радикалов при переносе электрона с НАДФН на  $\text{O}_2$ , метаболизм этих радикалов, разрушение бактериальной клетки и запуск биосинтеза множества физиологически-активных соединений в клетке-фагоците (см. обзоры

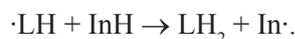
[20, 21, 95, 96]). ЛХЛ вызывается окислением люминола активными формами кислорода и хлора и взаимодействием окисленных форм люминола с супероксидным радикалом или пероксидом водорода. Для понимания информации, которую дают исследования ЛХЛ, остановимся несколько подробнее на механизме этих реакций.

#### МЕХАНИЗМ РЕАКЦИЙ, ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА СВЕЧЕНИЕ ЛЮМИНОЛА

Литературные данные о механизме реакций, ответственных за свечение люминола, обобщены в статье Д.И.Рощупкина и соотр., которые предложили также схемы соответствующих реакций ([97], рис. 5). В упрощенном виде процесс протекает в три этапа. Первая стадия – это окисление люминола каким-либо сильным окислителем, например, радикалом или окисленной формой металла переменной валентности (рис. 5, реакции 1 и 2).



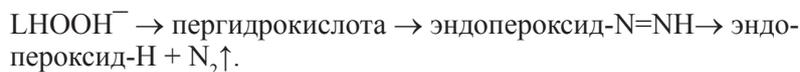
Образовавшийся окисленный радикал люминола может вступать в различные реакции, которые не приведут к ХЛ: взаимодействовать с другим радикалом люминола или с одноэлектронным окислителем  $\text{R}\cdot$ , подвергаться дальнейшему окислению или взаимодействовать с молекулой антиоксиданта  $\text{InH}$ :



Второй, и весьма важный этап в развитии ХЛ-реакции – появление ключевого гидропероксидного продукта (4-гидроперокси-1-окси-5-аминофталазин-4-олата), которое в биохимических системах обычно происходит при взаимодействии радикала люминола с супероксидом (рис. 5, реакция 3).



Собственно ХЛ-реакция начинается с превращения гидропероксида (LOOH) в соединение, содержащее эндопероксидную химическую группу (2,3-перокси-ди[гидрокси-метиленил]фениламин) (реакции 4 – 6 на рис. 5):



На заключительном этапе в эндопероксидной группе разрывается связь между атомами кислорода и образуется молекула моно-протонированной аминфталевой кислоты в электронно-возбужденном состоянии с последующим испусканием кванта света (реакции 7 и 8 на рис. 5).

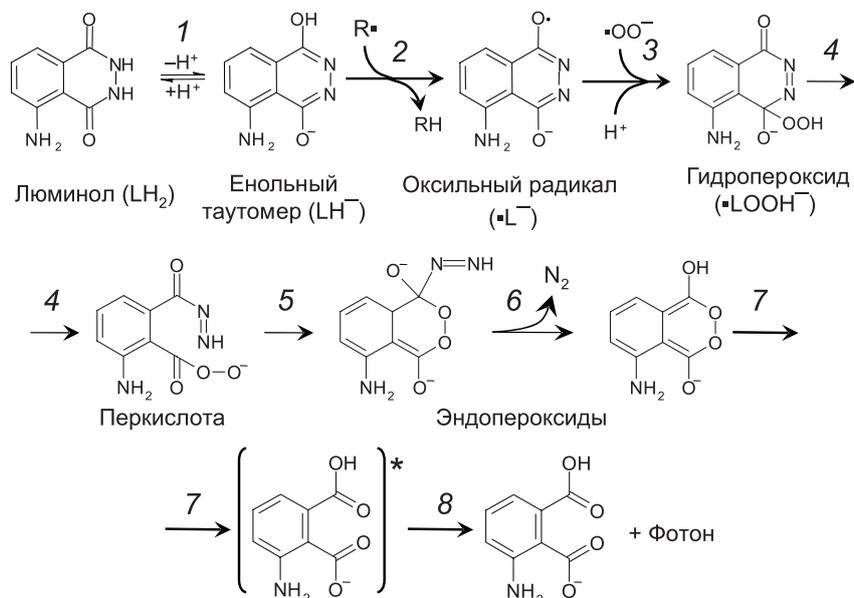


Рис. 5. Одноэлектронное окисление люминола (объяснение в тексте).

Путь превращения гидропероксидного ключевого продукта до электронно-возбужденной аминфталевой кислоты (реакции 4–8 на рис. 5) – один и тот же при действии многих оксидантов [97, 98]. Но само образование гидропероксида может идти разными способами, на чем мы подробнее остановимся чуть позже.

#### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛЮМИНОЛ-ЗАВИСИМОЙ ХЛ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩЕЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ

Антиоксиданты оказывают влияние на интенсивность люминол-зависимой ХЛ. На этом основан хорошо известный метод анализа общего содержания антиоксидантов в опытах *in vitro* с использованием таких источников радикалов, как 2,2'-азо-бис(амидинопропан) дигидрохлорид (АВАР) [99–102] для водорастворимых или 2,2'-азо-бис(2,4-диметил-валеронитрил) (АМВН) для гидрофобных антиоксидантов [103]. В этих исследованиях действие антиоксидантов проявляется либо в снижении интенсивности хемилюминесценции на определенном этапе ХЛ-ответа, либо в задержке развития ХЛ, мерой чего может служить *латентный период*, или *период индукции*. В присутствии кислорода наиболее вероятная цепь реакций, приводящих к ХЛ, выглядит следующим образом:

Источник радикалов (например, АВАР)  $\rightarrow R\cdot \xrightarrow{O_2} ROO\cdot$

$ROO\cdot + LH_2 \xrightarrow[-H^+]{-ROOH} \cdot L^- \rightarrow \text{реакции 4-7 (рис. 5)} \rightarrow h\nu$ .

Ловушки (перехватчики) радикалов, могут прерывать эту цепь на разных этапах, ликвидируя либо ранние, алкильные и пероксильные радикалы ( $R\cdot$  и  $ROO\cdot$ ), либо более поздние – радикалы люминола ( $\cdot L^-$  или  $\cdot LH$ ). Без детального анализа нестационарной кинетики реакций непросто различить эти два механизма, но в ряде случаев это и не нужно. Детали методов оценки общей антиоксидантной емкости образца (*total reactive antioxidant potentials* (TRAP)) и общей антиоксидантной активности (*total antioxidant reactivity* (TAR)) описаны в работах [99] и [104], см. также обзор [105].

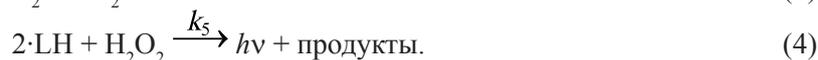
Схема реакций, приводящих к ХЛ в подобных системах, не до конца известна. Поскольку как супероксид анион-радикал, так и анион гидропероксида люминола, участвующие в цепи превращений люминола (рис. 5), устойчивы только в щелочной среде, неудивительно, что квантовый выход люминол-зависимой ХЛ резко увеличивается при возрастании рН [99]. По-видимому, в нейтральной и кислой среде возрастает доля побочных реакций, не сопровождающихся хемилюминесценцией. В модельных опытах обычно используют среды с рН от 8,3 до 9 и выше, что далеко от физиологического стандарта. В этом состоит довольно серьезное ограничение применения метода ЛХЛ в биологии.

#### ЛЮМИНОЛ КАК МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ПЕРОКСИДАЗ

При взаимодействии люминола с пероксидазами в присутствии пероксида водорода наблюдается довольно яркая ХЛ, механизм которой исследовался многими методами, включая метод остановленного потока (stop-flow) [106].

Известно, что при смешивании  $HO_2\cdot$  с пероксидазой хрена (ЕС I .П. I. 7) образуется Соединение I (Complex I), которое при стоянии переходит в Соединение II (литературу см. [107]). Литературные данные о стехиометрии этих превращений, а также собственные измерения быстрой кинетики ХЛ и поглощения света в системе пероксидаза (E), пероксид водорода и люминол (L) при концентрациях, близких к стехиометрическим, позволили Кормье составить схему реакций, которую мы приводим с некоторыми изменениями в обозначениях [106]:





Как уже было сказано, последняя реакция идет через стадию образования 3-аминофталата в электронно-возбужденном состоянии.

Были определены константы скорости второго порядка реакций (2) и (3), которые оказались равными  $2,3 \times 10^6$  моль<sup>-1</sup>с<sup>-1</sup> и  $7,2 \times 10^4$  моль<sup>-1</sup>с<sup>-1</sup>, соответственно.

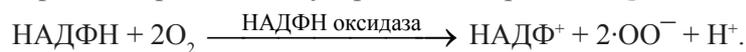
В наших исследованиях ЛХЛ использовалась для определения пероксидазной активности комплексов цитохрома *c* с кардиолипином. Была показана зависимость активности комплексов от содержания кардиолипина [59, 61, 62, 108], присутствия антиоксидантов [109, 110] и монооксида азота и восстановление активности комплексов, ингибированных NO, при действия лазерного облучения [111].

#### ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ЛЮМИНОЛА В ПРИСУТСТВИИ ГИПОХЛОРИТА

Гипохлорит – природное соединение, образуемое в реакции, катализируемой ферментом миелопероксидазой (МПО):



Этот процесс происходит при контакте гранулоцитов крови с чужеродными клетками, например, бактериями. Активация рецепторов на поверхности клеток запускает процесс сборки элементов НАДФН-оксидазного комплекса и усиленное образование НАДФН в клетках, а затем к дыхательному взрыву, т.е. резкому потреблению кислорода и образованию супероксидного радикала [20, 21, 95]:

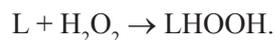


В присутствии супероксиддисмутазы (СОД) супероксид превращается в  $H_2O_2$ , которая и служит субстратом МПО.

Гипохлорит окисляет люминол ( $LH_2$ ), возможно через стадию его хлорпроизводного ( $LHCl$ ) [97], до аминобензодиазахинона (ABDC) (рис. 6)



В присутствии  $H_2O_2$  может образоваться гидропероксид люминола – ключевое звено ХЛ-реакции [97]:



В биологических системах гипохлорит образуется в реакции с

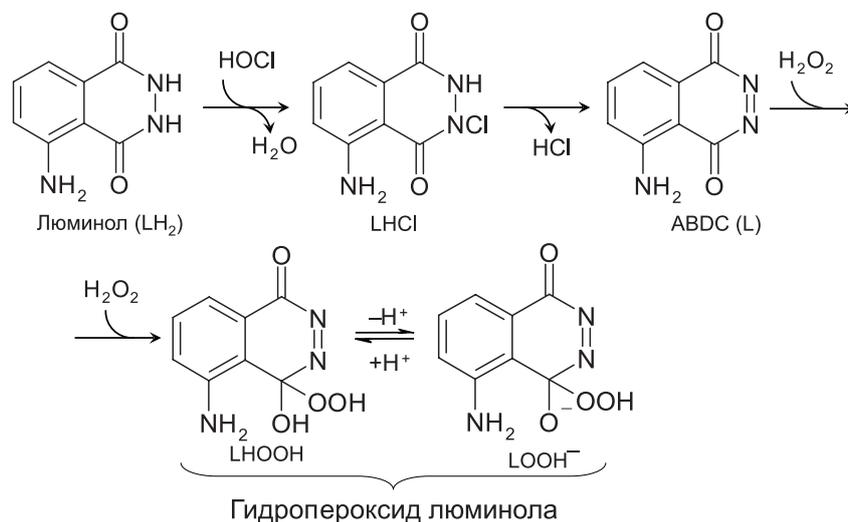


Рис. 6. Окисление люминола гипохлоритом (объяснение в тексте).

участием H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, и таким образом, его появление обязательно приводит к ХЛ, интенсивность которой, однако, будет уменьшаться как в присутствии веществ, реагирующих с гипохлоритом (например, соединений, содержащих аминогруппу), так и под действием каталазы (удаляющей H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Таким образом, между «гипохлоритным» и «радикальным» путями инициирования люминол-зависимой ХЛ имеется важное различие: для формирования ключевого соединения – гидропероксида люминола – в первом случае нужен H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (не ингибируемая СОД, каталаза-чувствительная ЛХЛ), а во втором – супероксидный радикал (ингибируемая СОД, или СОД-чувствительная, каталаза-нечувствительная ЛХЛ). Применить на практике эти критерии непросто, т.к., например, удаление H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> каталазой может иметь следствием прекращение образования радикалов, запускающих реакцию с люминолом, и тогда этот путь ХЛ тоже окажется чувствительным к действию каталазы.

Известная независимость двух путей окисления люминола подтверждается данными о действии различных биохимических веществ на ХЛ, наблюдаемую в модельной системе, содержащей люминол и гипохлорит [112]. Было показано, что наибольшей ингибирующей активностью обладали тиоловые соединения: тиомочевина > цистеин > сывороточный альбумин человека > восстановленный глутатион > N-ацетил- L-цистеин (половинное угнетение в концентрациях

$1,2 \times 10^{-7}$ – $8,5 \times 10^{-7}$  моль/л. Существенно менее активными были аминокислоты и окисленный глутатион, т.е. соединения, содержащие аминогруппы ( $2,5 \times 10^{-6}$ – $3,2 \times 10^{-5}$  моль/л). Метионин, аскорбат, таурин и десферал обладали промежуточной активностью ( $1,1 \times 10^{-6}$ – $5,3 \times 10^{-5}$  моль/л) [112]. Этот порядок активностей соответствует способности перечисленных соединений связывать гипохлорит (концентрация которого в опытах составляла  $2,5 \times 10^{-6}$  моль/л). С другой стороны, в цитированной и других работах было показано, что перехватчики синглетного кислорода, гидроксильного и органических радикалов, такие как маннитол, глюкоза и диметилмочевина практически не влияли на ЛХЛ, вызванную гипохлоритом. Это подтверждает тот факт, что «гипохлоритный путь» ХЛ-реакции люминола не требует участия радикалов. С другой стороны, весьма эффективным ингибитором ЛХЛ в данной системе была каталаза [112]. В другой работе той же группы авторов было показано, что в системе, содержащей гипохлорит ( $10^{-6}$  моль/л) и люминол ( $5 \times 10^{-5}$  моль/л) интенсивность ХЛ была прямо пропорциональна количеству  $H_2O_2$ , добавленной в концентрациях от  $3 \times 10^{-9}$  до  $3 \times 10^{-6}$  моль/л [113].

#### ОТНОСИТЕЛЬНЫЙ ВКЛАД ДВУХ ПУТЕЙ ОКИСЛЕНИЯ ЛЮМИНОЛА В КЛЕТочНУЮ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ

Вопрос об относительной роли двух механизмов ЛХЛ не прост, т.к. вклад каждого механизма зависит от концентраций всех участников процесса: супероксида,  $H_2O_2$ , радикалов гидроксила и других соединений, металлов переменной валентности, соединений, реагирующих с гипохлоритом и антиоксидантов, а также от активности пероксидаз в исследуемой биологической системе.

Один из наиболее часто исследуемых объектов – полиморфно-ядерные лейкоциты (ПМЯЛ). Изучение физико-химических основ усиленной люминолом ХЛ стимулированных (активированных) ПМЯЛ проводилось в работе Д.И.Рощупкина и соавторов [97]. В частности, при исследовании природы первичного окислителя люминола, было показано, что активированная 20 мкМ люминолом ХЛ лейкоцитов, стимулированных форболмиристатацетатом (ФМА), не изменяется в присутствии диметилсульфоксида (ДМСО) в концентрациях 0,02–2,6 мМ, при которых он должен проявлять специфическую способность перехватывать гидроксильные радикалы. Это свидетельствует о том, что при стимуляции полиморфноядерных лейкоцитов не происходит генерация гидроксильных радикалов с участием супероксид-аниона и гипохлорита, синтезируемого миелопероксидазой. При высоких концентрациях ДМСО (260 мМ)

наблюдалось значительное ослабление ХЛ, обусловленное прямой реакцией ДМСО с гипохлоритом. С другой стороны, экзогенные аминокислоты и таурин в значительных концентрациях (3–15 мМ) ослабляли ХЛ. Был сделан вывод, что в исследованной системе ХЛ в основном обусловлена начальной реакцией гипохлорита с люминолом; интенсивность свечения увеличивается в результате окисления  $H_2O_2$  продуктов превращения люминола.

Любопытно, что не только гипохлорит, но и хлорамины, например, такие как N-хлорфенилаланин, вызывают ХЛ люминола в присутствии  $H_2O_2$  [114]. Это говорит о том, что начальную стадию окисления люминола по механизму двухэлектронного окисления (см. схему на рис. 6) может осуществлять не только гипохлорит, но и хлорамины, которые образуются в живых системах при появлении гипохлорита. При добавлении в ПМЯЛ хлорамины вызывали вспышку свечения нестимулированных клеток (там же).

#### ВНУТРИ- И ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ПУЛЫ АФК

Считается, что при активации клеток (т.е. в результате действия того или иного стимула) образование АФК имеет место как внутри, так и вне клетки. Признаться, доказать это методами ХЛ нелегко, если АФК проникает через клеточные мембраны, и таким образом перераспределяется между внутри- и внеклеточными пулами в ходе измерения ХЛ. В сущности, мы можем измерять стационарные концентрации АФК, а не место их возникновения. С этой оговоркой следует остановиться на работе [115], где исследовалось действие нескольких SH-соединений, которые, как известно, активно перехватывают АФК и гипохлорит [112], на хемилюминесценцию ПМЯЛ, усиленную люминолом. Было показано, что источником примерно половины свечения являются сами клетки, и это свечение тушат проникающие сульфгидрильные соединения, такие как дитиотреитол и N-ацетилцистеин. Другая половина свечения люминола полностью подавляется непроникающим восстановленным глутатионом. Этот подход представляется нам весьма перспективным в подобных исследованиях.

#### ЛХЛ КАК МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ

С точки зрения применимости метода ЛХЛ особое место среди пероксидаз занимает миелопероксидаза, при работе которой люминол подвергается химической атаке не столько самим ферментом, сколько его субстратом – гипохлоритом. Миелопероксидаза – это гемсодержащий фермент, выбрасываемый стимулированными гранулоцитами

крови в зонах воспаления. Генерируемый этим ферментом гипохлорит призван разрушать стенки бактерий, но одновременно может повредить и собственные ткани. В обзоре [116] рассмотрены свойства и механизм работы этого фермента, а также методы ХЛ, используемые для определения его активности.

В 1999 г. был предложен метод специфического анализа МПО по люминол-зависимой ХЛ в присутствии бромидов [117]. В присутствии 0,1 мМ люминола, 10 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 10 мМ ДТРА (диэтилентриаминпентаацетат) наблюдалась ХЛ в среде, содержащей экстракт нейтрофилов, а также 5 мМ КВг; свечение отсутствовало в среде с КСl. Метод, разработанный авторами, позволял обнаруживать МПО при содержании в образце больше 100 клеток нейтрофилов и был специфичен, т.к. присутствие других пероксидаз и гемопротеинов не влияло на результаты анализа.

#### IV. ЛЮЦИГЕНИН-ЗАВИСИМАЯ ХЛ КЛЕТОК

##### ЛЮЦИГЕНИН КАК МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУПЕРОКСИДНЫХ РАДИКАЛОВ

Обнаружение супероксидного радикала в живых клетках – чрезвычайно важно из-за ведущей роли этого радикала в редокс-сигналикации внутри клетки и в развитии большого числа патологических состояний. В силу высокой чувствительности люцигенина в качестве ХЛ-зонда на супероксидный радикал [118], люцигенин-активируемая ХЛ (Люц-ХЛ) использовалась для обнаружения  $\cdot\text{OO}^-$  при окислении ксантина или гипоксантина ксантиноксидазой [119], НАДФН цитохром редуктазой микросом [119], НАДФН-оксидазой клеток-фагоцитов [120, 121], и чувствительными к дифенилениодониуму НАДФН-оксидазами клеток эндотелия, фибробластов [122] и гладкомышечных клеток стенок кровеносных сосудов [123, 124]. Было также предложено использовать Люц-ХЛ для изучения образования  $\cdot\text{OO}^-$  митохондриями в интактных клетках [125, 126]. Такая популярность метода понятна: количество биологического материала, необходимого для того, чтобы сигнал, вызванный  $\cdot\text{OO}^-$ , превышал фон в 10 раз при использовании Люц-ХЛ было в 3750 раз меньше, чем при использовании предложенного Фридовичем метода, основанного на восстановлении супероксидом ацетилированного цитохрома с ( $\text{Fe}^{3+}$ ) [119].

Однако, в 1993 г. Фолкнер и Фридович [127], а затем в 1997 г. Лёчев и Фридович [128] высказали сомнение в возможности использовать люцигенин в качестве адекватного метода определения  $\cdot\text{OO}^-$

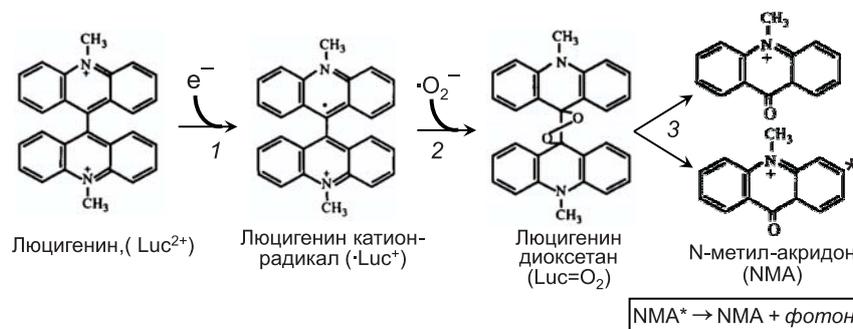
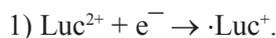


Рис. 7. Хемилюминесцентная реакция люцигерина (взято из [129] с небольшими изменениями).

на том основании, что в определенных условиях люцигерин может сам быть источником супероксидных радикалов в реакции его одноэлектронного окисления кислородом воздуха. Чтобы понять суть развернувшейся дискуссии, следует обратиться к схеме реакций, ответственных за хемилюминесценцию люцигерина [129]. Первая из этих реакций – образование катион-радикала ( $\cdot\text{Luc}^+$ ) из люцигерина, который в нейтральном водном растворе представляет собой двухвалентный катион ( $\text{Luc}^{2+}$ ) (см. также рис. 7).



Взаимодействие катион-радикала люцигерина с супероксидом приводит к образованию нестойкого соединения – люцигерин диоксетана ( $\text{Luc}=\text{O}$ )



При спонтанной реакции распада  $\text{Luc}=\text{O}$  образуются две молекулы N-метилакридона, одна из которых оказывается в элетронно-возбужденном состоянии:



Из этой схемы следует, что скорость хемилюминесцентной реакции (3) зависит не только от концентрации  $\cdot\text{OO}^-$ , но и от скорости реакции одноэлектронного восстановления люцигерина (1).

В стационарных условиях скорости всех стадий равны:

$$k_1[\text{Luc}^{2+}][e^-] = k_2[\cdot\text{Luc}^+][\cdot\text{OO}^-] = k_3[\text{Luc}=\text{O}] = \nu \quad (7)$$

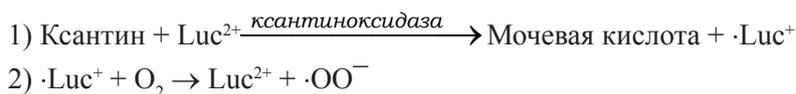
При этом

$$I_{\text{CL}} = \eta_{\text{CL}} \cdot \nu \quad (8)$$

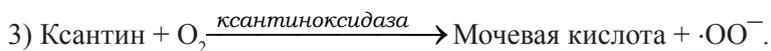
Таким образом, интенсивность Люц-ХЛ пропорциональна не только концентрации люцигенина  $[\text{Luc}^{2+}]$  и супероксидного радикала  $[\cdot\text{OO}^-]$ , но и скорости восстановления люцигенина  $k_1[e^-]$ , где  $e^-$  – концентрация одноэлектронных восстановителей в системе, а  $k_1$  – константа скорости реакции.

Критика Люц-ХЛ как метода определения концентрации  $\cdot\text{OO}^-$  основана на том, что автоокисление катион-радикала люцигенина кислородом воздуха может само по себе давать супероксидные радикалы [128, 130].

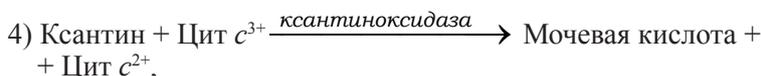
Основной аргумент в пользу такого предположения заключался в том, что восстановление цитохрома *c* в системе ксантин/ксантиноксидаза ускорялось люцигенином, причем это ускорение снималось СОД. Развитие событий можно представить в виде схемы [118, 128]:



Эта реакция, по мнению авторов, давала дополнительное (до 70%) образование супероксидного радикала по сравнению с основной реакцией:



Одновременно идет реакция



которая конкурирует с реакцией (3), снижая продукцию супероксида.

Если бы не было этой конкуренции с цитохромом *c*, «должно было бы наблюдаться еще большее увеличение продукции супероксида, обеспечиваемое люцигенином», пишут авторы [130].

Однако вывод о том, что реакция (2) может вносить заметный вклад в общую скорость образования супероксидных радикалов (а следовательно, Люц-ХЛ) стал, в свою очередь, предметом жесткой критики [129, 131]. Прежде всего было показано, что при низких концентрациях люцигенина (менее 20 мкМ), при которых вклад реакции (2) был незаметным (менее 20 мкМ), в различных биохимических системах наблюдалось образование супероксидных радикалов. При этом был отмечен параллелизм между тремя показателями образования супероксида: (1) интенсивность Люц-ХЛ, (2) скорость потребления кислорода, оцененная методом полярографии и (3) образование специфического спинового аддукта при реакции

$\cdot\text{OO}^-$  с ловушкой 5-(диэтоксифосфорил)-5-метил-1-пироллин-N-оксидом [129]. Концентрации люцигенина варьировали от 1 до 5 мкМ, объектами служили ксантин + ксантиноксидаза, липоамиддегидрогеназа + НАДН, изолированные митохондрии, митохондрии в интактных клетках и НАДФН-оксидаза фагоцитов. Между интенсивностью ХЛ и зависимым от СОД восстановлением феррицитохрома наблюдалась прямая пропорциональная зависимость в системе ксантин + ксантиноксидаза и НАДФН-оксидазной системе фагоцитов. В двух ферментативных окислительных системах, продуцирующих  $\text{H}_2\text{O}_2$ , а не супероксид (глюкозооксидаза + глюкоза и ксантиноксидаза + НАДН) Люц-ХЛ практически не имела места.

Авторы цитируемой работы пришли к выводу, что никакого влияния на ХЛ так называемая рециклизация люцигенина (т.е. реакция 2) в этих случаях не оказывала. Однако они делают оговорку, что это имеет место при невысоких (менее 20 мкМ) концентрациях люцигенина в системе, подразумевая, что при более высоких концентрациях дело может обстоять иначе [129].

Еще более категорические возражения против роли «рециклизации» люцигенина в развитии Люц-ХЛ высказали И.Б.Афанасьев и сотрудники [131]. Прежде всего их расчеты показали, что равновесие в обратимой реакции



резко сдвинуто влево (константа равновесия =  $10^6$ ), и таким образом супероксид в реакции «рециклизации» вряд ли образуется в ощутимых количествах. С другой стороны, были получены данные, которые показали, что объяснение Лёчевым и Фридовичем их собственных результатов ошибочно. Схема обсуждаемых реакций дана на рис. 8. Согласно этой схеме, супероксид-радикал, образуемый в системе ксантиноксидаза (ХО) + ксантин (X) (реакция 1), восстанавливает цитохром *c* до двухвалентного состояния (2), что лежит в основе классического метода определения  $\cdot\text{OO}^-$ . При взаимодействии  $\cdot\text{OO}^-$  с люцигенином ( $\text{Luc}^{2+}$ ), образуется катион-радикал ( $\cdot\text{Luc}^+$ ), стационарная концентрация которого пропорциональна интенсивности Люц-ХЛ (см. уравнение 8). Согласно Лёчеву и Фридовичу, [128, 130],  $\cdot\text{Luc}^+$  способен восстанавливать кислород с образованием катион-радикала (реакция 4), что и приводит к дополнительному СОД-зависимому восстановлению цитохрома<sup>3+</sup> (реакция 2). Афанасьев и сотрудники объяснили данный эффект прямым восстановлением цитохрома катион-радикалом люцигенина (реакция 5) [131]. Их вывод, полученный на основании расчетов и экспериментальных данных, однозначен: люцигенин (в форме катион-радикала) участвует

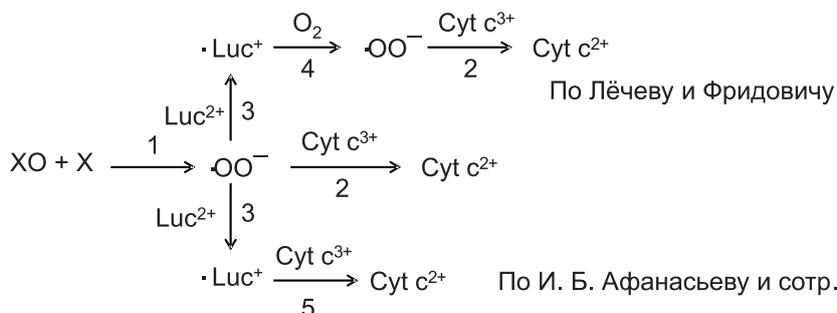


Рис. 8. Реакции в системе ксантин/ксантинооксидаза в присутствии люцигенина и цитохрома *c* (объяснения в тексте).

в восстановлении цитохрома *c*, но не в образовании дополнительного количества супероксид-радикалов. Все эти данные подтверждают адекватность ХЛ метода для определения супероксида в химических и биологических системах.

#### ЛЮЦ-ХЛ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИТОХОНДРИЙ

Вопрос о применимости люц-ХЛ для изучения образования супероксидных радикалов в митохондриях был специально рассмотрен в работе [129]. Добавление люцигенина не приводило к существенному увеличению потребления кислорода митохондриями, цитохромоксидаза в которых была полностью блокирована цианистым калием. Не было, конечно, никакого дополнительного потребления кислорода при добавлении к суспензии таких митохондрий люцигенина в концентрациях от 20 мкМ и меньше. Это исключает дополнительное образование супероксида в системе в результате «рециклизации» люцигенина, по крайней мере при его невысоких концентрациях.

Место образования супероксидных радикалов в дыхательной цепи – предмет особого рассмотрения (см. в частности, работы [22, 132–135]), и мы кратко остановимся лишь на нескольких работах, где этот вопрос решался, в том числе и методом Люц-ХЛ.

При использовании сукцината в качестве источника электронов для цепи переноса электронов в митохондриях, цианид, увеличивая концентрацию электронных переносчиков в восстановленной форме (и, тем самым, вероятность образования супероксида за счет их взаимодействия с растворенным кислородом), значительно увеличивал Люц-ХЛ. Ротенон и микседол, блокирующие перенос электронов от дыхательного Комплекса I на коэнзим Q и от коэнзим Q на Комплекс III, соответственно, полностью снимали развитие Люц-ХЛ [129].

В другой работе той же группы [136] методом Люц-ХЛ было показано, что ингибитор НАДН оксидоредуктаз дифенилениодоний (DPI) не влияет на образование супероксида изолированными митохондриями, если субстратом служит сукцинат (субстрат для восстановления дыхательного Комплекса II), но подавляет Люц-ХЛ, если в качестве субстрата служил пируват или НАДН (способные восстанавливать Комплекс I). Эти данные подтверждают существование по меньшей мере двух участков образования супероксида митохондриями: на уровне дыхательного Комплекса I (DPI-чувствительного, но не чувствительного к ротенону и микседолу) и участка: убихинон-дыхательный Комплекс III (нечувствительного к DPI, но чувствительного к ротенону и микседолу). По данным работы [134], соединением, которое восстанавливает кислород, в этом случае служит убисемихинон. Вероятно, существует возможность образования супероксида и в других звеньях дыхательной цепи.

Имея в виду обширное применение Люц-ХЛ для анализа супероксидных радикалов в митохондриях и целых клетках следует внимательно отнестись к возможным недостаткам этого метода. «Зациклившись» на проблеме рециклизации люцигенина, как возможной (но маловероятной) причине ошибок в количественном определении супероксида по ХЛ, исследователи нередко упускают из виду два других источника возможных ошибок: (1) влияния скорости одноэлектронного восстановления люцигенина на уровень катион-радикала, который и определяет интенсивность Люц-ХЛ, и (2) влияния мембранного потенциала на внутримитохондриальную концентрацию люцигенина и его катион-радикала.

Рассмотрим вначале первый источник ошибок. Путь метаболизма люцигенина в исследуемой системе начинается с его превращения в катион-радикал под действием внутриклеточного восстановителя, например, восстановленной формы дыхательного Комплекса I:

1)  $\text{Luc}^{2+} + e^- \xrightarrow{k_1} \cdot\text{Luc}^+$ . Скорость этой реакции равна

$$v_1 = \frac{d[\cdot\text{Luc}^+]}{dt} = k_1 [\text{Luc}^{2+}] [e^-], \quad (9)$$

где  $[e^-]$  – концентрация восстановленной формы переносчика.

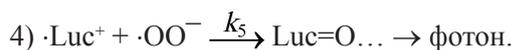
Катион-радикал люцигенина может вступать в несколько реакций, в том числе в реакцию рециклизации:

2)  $\cdot\text{Luc}^+ + \text{O}_2 \xrightarrow{k_7} \text{Luc}^{2+} + \cdot\text{OO}^-$ ,

в темновые реакции с другими окислителями

3)  $\cdot\text{Luc}^+ + \text{Ox} \xrightarrow{k_3} \text{Luc}^{2+} + \cdot\text{Ox}^-$ ,

или, наконец – в хемиллюминесцентную реакцию с супероксидом:



Скорости соответствующих реакций по закону действия масс равны:

$$v_2 = -k_2[\text{O}_2][\cdot\text{Luc}^+],$$

$$v_3 = -k_3[\text{Ox}][\cdot\text{Luc}^+],$$

$$v_4 = -k_4[\cdot\text{OO}^-][\cdot\text{Luc}^+].$$

Общая скорость изменения концентрации катион-радикала люцигенина в системе равна сумме всех этих скоростей

$$\frac{d[\cdot\text{Luc}^+]}{dt} = k_1[\text{Luc}^{2+}][e^-] - k_2[\text{O}_2][\cdot\text{Luc}^+] - k_3[\text{Ox}][\cdot\text{Luc}^+] - k_4[\cdot\text{OO}^-][\cdot\text{Luc}^+]. \quad (10)$$

В условиях стационарного состояния концентрацию катион-радикала можно принять за постоянную величину, тогда

$$k_1[\text{Luc}^{2+}][e^-] = [\cdot\text{Luc}^+](k_4[\cdot\text{OO}^-] + k_2[\text{O}_2] + k_3[\text{Ox}]) \quad (11)$$

и

$$[\cdot\text{Luc}^+] = [\text{Luc}^+] \frac{k_3[e^-]}{k_4[\cdot\text{OO}_2] + k_2[\text{O}_2] + k_3[\text{Ox}]} \quad (12)$$

Памятуя о том, что интенсивность ХЛ равна произведению скорости ХЛ реакции на квантовый выход ХЛ, умножим оба члена уравнения на величину  $\eta_{CL} k_4[\cdot\text{OO}^-]$  и получим, что

$$I_{CL} = \eta_{CL} [\cdot\text{OO}^-][\cdot\text{Luc}^+] \frac{k_1 k_4 [e^-]}{k_4[\cdot\text{OO}_2] + k_2[\text{O}_2] + k_3[\text{Ox}]} \quad (13)$$

При всей грубости сделанных допущений, из уравнения следуют выводы, подкрепляемые экспериментом:

Интенсивность ХЛ линейно возрастает с концентрацией люцигенина  $[\text{Luc}^{2+}]$ .

При низких концентрациях супероксида, когда первое слагаемое в знаменателе незначительно, интенсивность Люц-ХЛ прямо пропорциональна концентрации супероксида  $[\cdot\text{OOO}^-]$ .

При высоких концентрациях, а также при малом вкладе темновых реакций радикала люцигенина по сравнению с ХЛ реакцией (большая доля первого слагаемого в знаменателе) возрастание ХЛ с ростом концентрации супероксида становится менее выраженным.

Интенсивность ХЛ в стационарных условиях прямо пропорциональна скорости одноэлектронного восстановления люцигенина, т.е. величине  $k_1[\text{Luc}^{2+}][e^-]$ .

Последний вывод показывает, что интенсивность ХЛ в системах с низкой скоростью одноэлектронного восстановления люцигенина будет меньше, чем при высокой скорости этой реакции при одних и тех же концентрациях супероксида. И это действительно так. Например, в работе [137] отмечается, что разница между данными о концентрации супероксида, определяемой по калибровке (интенсивность Люц-ХЛ как функция концентрации супероксида), проведенной при образовании супероксида Комплексом I (который способен восстанавливать люцигенин до катион-радикала), и по калибровке с использованием системы ксантиноксидаза/гипоксантин (которая это делать не в состоянии), может достигать одного порядка величины.

Второе обстоятельство — это весьма вероятное влияние электрического поля на Люц-ХЛ в митохондриях. Люцигенин — это двухвалентный катион, проникающий через липидную мембрану митохондрий. Простой расчет по уравнению Нернста показывает, что концентрация  $\text{Luc}^{2+}$  в матриксе митохондрий при мембранном потенциале  $-175$  мВ примерно в 1 миллион раз больше, чем во внемитохондриальном пространстве, поэтому выделение относительно небольшого количества супероксида в матрикс вызовет значительно больший всплеск хемилюминесценции, чем даже значительного количества супероксида, выделенного наружу. Изменение мембранного потенциала может изменить интенсивность Люц-ХЛ совершенно независимо от образования супероксидного радикала дыхательной цепью. Это обстоятельство нужно иметь в виду при интерпретации данных хемилюминесцентных исследований.

#### ИССЛЕДОВАНИЕ ЛЮЦИГЕНИН-ЗАВИСИМОЙ ХЛ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ

В большинстве клеток Люц-ХЛ определяется выделением супероксида дыхательной цепью митохондрий. Отчасти это связано с тем обстоятельством, что люцигенин накапливается в матриксе митохондрий [126], куда попадает  $\cdot\text{OO}^-$ , образуемый дыхательным Комплексом I, но также и с тем, что в нефагоцитирующих клетках митохондрии образуют больше супероксида, чем НАДФН-оксидаза клеточных мембран. В работе [126] было показано, что в суспензии альвеолярных макрофагов крыс ингибиторы дыхательного Комплекса I (ротенон) и III (антимидин) подавляли Люц-ХЛ, тогда как ингибитор Комплекса IV (цианид в концентрации  $<100$  мкМ) слегка усиливал

ХЛ. Это соответствует поведению изолированных митохондрий [129], в которых супероксид образуется дыхательным Комплексом I и в точке, предшествующей Комплексу III (вероятно, на уровне убисемихинона) [134]. Авторы делают вывод, что в макрофагах именно митохондрии служат источником супероксид-радикалов [126].

Нейтрофилы бедны митохондриями, в отличие от тканевых макрофагов и их предшественников – моноцитов крови. В последних основным источником супероксида также служат именно митохондрии. В пользу этого говорят факты, полученные в работе [129], в которых показатели Люц-ХЛ (а именно, зависимость ХЛ от цианида, ротенона и миксотиазола) были совершенно одинаковыми в интактных клетках и в митохондриях, изолированных из этих клеток. При этом основным источником  $\cdot\text{OO}^-$ , судя по измерению Люц-ХЛ и потребления кислорода клетками, был дыхательный комплекс I (НАДН-оксидоредуктаза), поскольку как в изолированных митохондриях, так и в целых клетках – моноцитах – как ХЛ, так и потребление кислорода подавлялась микромолярными концентрациями DPI [136], известного ингибитора ферментов-флавопротеинов, включая Комплекс I.

В наших исследованиях на целых кусочках ткани печени также наблюдалась хемилюминесценция, активируемая люцигенином и зависящая от кислорода, поступающего из раствора. Монооксид азота, связывающий супероксид, подавлял Люц-ХЛ, причем светосумма ХЛ, потушенной NO, была пропорциональна количеству добавленного монооксида [138].

## V. ДРУГИЕ ХЛ-ЗОНДЫ НА АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА

В ряде работ описан в качестве ХЛ зонда на АФК сходное с люминолом соединение 8-амино-5-хлор-7-фенилпиридо[3,4-d]пиридазин-1,4-(2Н, 3Н)дион (L-012), структура которого показана на рис. 9. При физиологических условиях, интенсивность ХЛ нейтрофилов, стимулированных опсонизированным зимозаном, была приблизительно в 100 и 10 раз выше в присутствии L-012, чем в присутствии люминола и аналога люциферина MCLA (2-метил-6-[*p*-метоксифенил]-3,7-дигидроимидазо[1,2-а]пирозин-3-он), соответственно [139].

Супероксидный радикал можно определять по ХЛ с целентеразином (2-(4-гидроксibenзил)-6-(4-гидрофенol)-8-бензил-3,7-дигидроимидазо[1,2-альфа]пирозин-3-он) [140]. В цитированной работе изу-

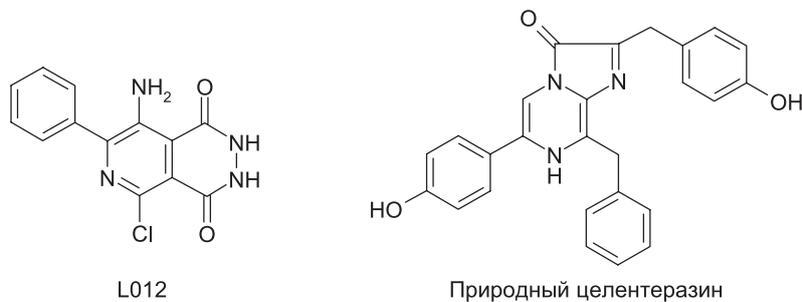
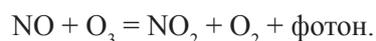


Рис. 9. ХЛ-зонды, чувствительные к супероксиду.

чали вклад внеклеточного компонента в генерацию супероксидного радикала, вызванную эпилептическим приступом, и определяли роль НАДФН-оксидазы как источника этого радикала. Показано, что эпилептический приступ активирует мембранную НАДФН-оксидазу и приводит к увеличению продукции супероксидного радикала.

Для определения супероксида используют также MCLA. В работе [141] детально описан механизм действия этого ХЛ-зонда и показано, что с его помощью удастся регистрировать образование супероксида на целых перфузируемых органах лабораторных животных. Недостаток MCLA состоит в том, что он реагирует также с растворенным кислородом, давая фоновую ХЛ. Кроме того, это соединение обладает антиоксидантным действием в результате захвата свободных радикалов [142]. Сопоставление разных ХЛ методов анализа АФК, выделяемых кровеносными сосудами, можно найти в обзоре [143].

Для определения NO используется люминесцентное свечение, выделяющееся в результате реакции с озоном. При смешивании окиси азота и озона наблюдается яркая ХЛ:



Использование ХЛ для анализа NO, образуемого сосудорасширяющими лекарственными препаратами, описано в работе [144]. NO, образованный эндотелиальными клетками сосудов, определяют при изучении механизмов патологии сосудистого эндотелия. Наряду с электрохимическими методами и ЭПР, описаны ХЛ-методы измерения продукции NO культурами клеток, обеспечивающие надежное и чувствительное определение монооксида азота [145].

## VI. КУМАРИН-АКТИВИРУЕМАЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ

Хемилюминесцентные (или хемилюминогенные, *chemiluminogenic*) [46, 146, 147] зонды – химически активные молекулы, мало того – молекулы, связывающие свободные радикалы, а следовательно, влияющие на процессы, протекающие в живой клетке, причем те самые, которые мы изучаем. Дискуссию о роли вмешательства люцигенина в образование супероксидного радикала мы уже рассмотрели выше. Между тем, в случае органических радикалов, в том числе радикалов полиненасыщенных жирных кислот, существует принципиально иной метод усиления свечения, основанные на переносе энергии электронного возбуждения от молекулы продукта свободнорадикальных реакций на молекулу-активатор ХЛ. На сегодняшний день наиболее эффективным физическим активатором свечения можно считать изохинолизиновый кумарин С-525, который усиливает ХЛ, сопровождающую цепное окисление липидов в липосомах, более, чем в 1500 раз, никак не влияя при этом на ХЛ при взаимодействии радикалов кислорода (гидроксила и супероксида) [52]. Немногим менее активными оказались два другие родственные кумарина: С-314 и С-334 [148]. Формулы этих соединений даны на рис.10.

Активированная кумарином С-525 была первоначально обнаружена в опытах с суспензией фосфолипидов (липосом), в которых перекисное окисление было запущено добавлением солей  $Fe^{2+}$ . Позднее было показано, что С-525 в микромолярных концентрациях усиливает также ХЛ в микросомах печени крысы, где липидную перекисидацию вызывали добавлением гидропероксида *трет*-бутила (*t*-ВНР). С-525, как показывают, является более эффективным активатором ХЛ, чем ранее известный хлорофилл *a* [149]. При этом активация имела место только в системах перекисидации, где образуются карбонильные продукты в электронно-возбужденном состоянии, и не наблюдалась при работе пероксидазы хрена.

В работе [150] сравнивали активированную С-525 ХЛ при добавлении ионов  $Fe^{2+}$  к липопротеинам низкой плотности (ЛПНП), окисленным разными методами и в разной степени. Была обнаружена хорошая корреляция (0,97–0,98) между амплитудой быстрой вспышки и количеством гидропероксидов, определенных методом регистрации сопряженных двойных связей (диеновой конъюгации). Сама по себе амплитуда ХЛ в присутствии С-525 была более чем на два порядка выше, чем без активатора.

Детальное исследование активации ХЛ при липидной перекисидации липопротеинов (ЛП) крови было проведено также в работе [151].

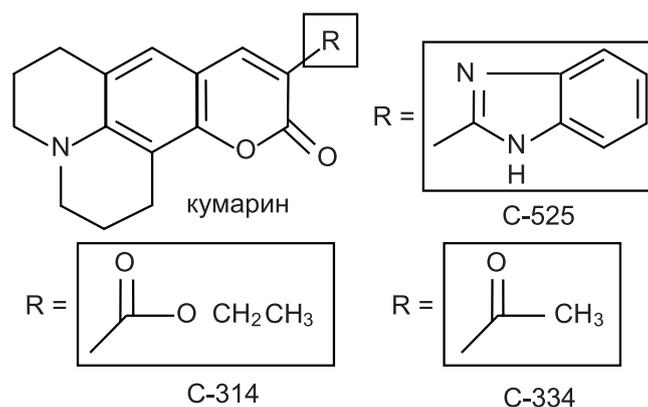


Рис. 10. Хинолизиновые кумарины — физические активаторы ХЛ [148].

В концентрации 4 мкМ С-525 усиливал вспышку ХЛ при добавлении ионов  $\text{Fe}^{2+}$  к окисленным ЛПНП в 2000 раз. Измерения флуоресценции показали, что краситель находился в гидрофобной фазе ЛП, и таким образом реальная концентрация активатора была достаточно высокой для эффективного переноса энергии с возбужденных молекул карбонильных продуктов липопероксидации.

В работе [148] было показано, что окрашивание клеток в культуре кумариновыми красителями С-525 и С-334 позволяет обнаружить ХЛ в этих клетках, вызванную инициатором свободнорадикального окисления АМVN [2,2'-азобис (2,4-диметилвалеронитрил)]. При этом ни жизнеспособность клеток, ни содержание в цитоплазме восстановленного глутатиона не изменялись, а добавленный краситель не подвергался химической деградации. Влияния на уровень липидной пероксидации С-525 в используемых концентрациях тоже не оказывал. Свечение наблюдалось также при пероксидации, вызванной гидропероксидами *трет*-бутила и кумола (изопропилбензола).

Однако попытка усилить ХЛ путем введения С-525 при пероксидации плазмы крови не привела к успеху. Это объясняется связыванием гидрофобного С-525 белками плазмы, прежде всего — сывороточным альбумином.

В самое последнее время ХЛ в присутствии С-525 была использована в нашей группе для изучения образования липидных радикалов при окислении природного кардиолипина (содержащего полиненасыщенные жирные кислоты), катализируемом комплексом кардиолипина с цитохромом *c* [109, 110]. При этом удалось установить, что само по себе образование комплекса цитохрома *c* с кардиолипином и

другими анионными липидами придает этому гемопротейну свойства пероксидазы [59–62]. В присутствии природного кардиолипина происходит образование радикалов липидов, которое проявляется в Кум-ХЛ. Этот процесс может идти в отсутствие  $H_2O_2$ . Если система содержала другие гидропероксиды, включая пероксиды кардиолипина, но дополнительное введение  $H_2O_2$  ускоряло реакцию пероксидации. Антиоксиданты тормозили появление как радикалов люминола в пероксидазной системе цитохром *c* + кардиолипин, так и образование радикалов липидов. Поскольку пероксидация кардиолипина может рассматриваться как ключевая стадия в запуске апоптоза [152], эти данные могут быть использованы при разработке методов регуляции апоптоза медикаментозными средствами.

## VII. ПРИМЕНЕНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ХЛ В МЕДИЦИНЕ

В патогенезе многих болезней и патологических процессов играет важную роль оксидативный стресс [153]. Метод ХЛ оказывается полезным при изучении таких патологий, поскольку дает возможность измерять уровень свободных радикалов (АФК, NO), оценивать параметры антиоксидантной защиты и влияние антиоксидантов. Хемилюминесценцию успешно применяют при изучении иммунных нарушений, нарушений метаболизма, дисфункции эндотелия, ишемии/реперфузии миокарда и мозга, онкологических и воспалительных заболеваний, а также многих других болезней, патогенез которых связан с оксидативным стрессом.

### ИШЕМИЧЕСКОЕ ПОВРЕЖДЕНИЕ МИОКАРДА И МОЗГА

Повреждение клеток при реперфузии ишемизированной ткани опосредовано множеством факторов, ключевым из которых являются свободнорадикальные механизмы: восстановление кровотока резко усиливает оксидантные процессы при сниженной активности антиоксидантной системы. Особую опасность оксидативный стресс представляет для интенсивно потребляющих кислород клеток – кардиомиоцитов и нервных клеток [154–156]. Возможными источниками АФК являются полиморфноядерные лейкоциты, ксантиноксидазная система, митохондрии, метаболизм арахидоновой кислоты и др. Усилению повреждающего действия АФК способствует снижение продукции NO вследствие дисфункции эндотелия и его инактивацией супероксидом. Роль АФК и состояние антиоксидантных ферментов при ишемии/реперфузии миокарда оценивали методом ХЛ в работах [157–166], в том числе при ангиопластике [167–170]. Продукцию NO

измеряли методом озоновой ХЛ [171, 172] в виде продуктов окисления (нитрит и нитрат) [173].

В исследованиях ишемии головного мозга измеряли ХЛ плазмы крови, изолированных фагоцитов, гомогенатов ткани мозга при ишемии и последующей реоксигенации, оценивая уровень АФК, образуемого фагоцитами, влияние длительности ишемии на степень повреждения и роль антиоксидантов [174–177].

#### ДИСФУНКЦИЯ ЭНДОТЕЛИЯ

Эндотелий сосудов в норме выполняет множество метаболических и сигнальных функций, регулируя, в частности, процессы вазодилатации и вазоконстрикции. Положение эндотелия на границе между кровью и тканями делает его наиболее уязвимым для действия свободных радикалов, которые приводят к повреждению клеток и к состоянию *дисфункции эндотелия* и развитию ангиопатий, атеросклероза и пр. [178]. Метод ХЛ позволяет оценивать генерацию супероксидного радикала и NO собственно эндотелием, а также влияние активных форм кислорода нейтрофилов на состояние сосудов. В основном определяют уровень супероксида по люцигениновой ХЛ и, реже, уровень NO [143]. В качестве объектов используют изолированные сосуды и гомогенаты тканей человека [143] и животных [179–181], культуры эндотелиальных клеток пупочной вены человека [182, 183] и коронарных микрососудов [184]. Влияние острого воспаления на эндотелий сосудов изучали авторы [183, 185]. Роль оксидативного стресса в патогенезе атеросклероза показана в также работах [186–188].

#### ЗАБОЛЕВАНИЯ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Исследования последних лет доказали участие АФК и других свободных радикалов в патогенезе различных болезней центральной нервной системы [189, 190] хотя пока неясно, являются ли они причиной или сопутствующим явлением этих патологических процессов. Особенно важную роль оксидативный стресс играет в развитии нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера [191–193], повреждении мозга при эпилептических приступах [140, 194]. Метод ХЛ использовали для измерения уровня АФК, продуцируемых нейтрофилами крови, или непосредственно ХЛ гомогенатов ткани мозга, а также оценивали состояние антиоксидантных систем (Cu–Zn СОД, каталазы, системы глутатиона, общей антиоксидантной емкости крови и т.д.) [195, 196].

### РЕВМАТОИДНЫЙ АРТРИТ

Ревматоидный артрит – системное хроническое воспалительное заболевание иммунного генеза, при котором длительное воспаление приводит к постоянной активности нейтрофилов и повреждению тканей вырабатываемыми ими АФК. В базе данных PubMed процитировано более 150 работ, касающихся этой темы, в которых изучают продукцию АФК, прежде всего супероксидного радикала, измеряя ХЛ изолированных нейтрофилов периферической крови и синовиальной жидкости больных [197–201], ХЛ-отклик нейтрофилов доноров после инкубации с сывороткой крови и синовиальной жидкостью больных [201–206], ХЛ изолированных моноцитов крови [207], изолированных митохондрий [208] и культуры фибробластов [209]. Изучено влияние на ХЛ нейтрофилов некоторых медиаторов и веществ, в частности, гидроксиапатита [210, 211], фосфолипазы А2 [212], фактора активации тромбоцитов [213], кислорода [214], вещества Р [215] и др. По интенсивности ХЛ полиморфноядерных лейкоцитов оценивали развитие болезни [216], эффективность лечения [217, 218].

### ОНКОЛОГИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Полагают, что онкологические заболевания являются результатом нарушения функционирования определенных генов. С этой точки зрения каждый фактор, взаимодействующий с ДНК и модифицирующий ее, является канцерогеном. АФК, такие как гидроксильный радикал, способны напрямую повреждать митохондриальную и ядерную ДНК и, следовательно, обладают мутагенным, канцерогенным действием [219]. Роль свободных радикалов кислорода и азота не ограничивается прямым повреждением ДНК – они могут нарушать процессы апоптоза, редокс-баланс, регуляцию путей клеточного сигналинга и др. [220]. Хемилюминесцентный метод использовали для оценки влияния химиотерапии на пролиферацию и активацию клеток опухоли [221], для изучения параметров прооксидантной и оксидантной активности злокачественных опухолей по сравнению с доброкачественными [222, 223], исследования механизмов метастазирования [224].

### VIII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Свободные радикалы – важные участники регуляторных процессов в живых клетках, но одновременно – причина повреждения клеточных структур и триггер, запускающий каскад реакций самоуничтожения

клеток – апоптоза. Их ведущая роль в развитии практически всех болезней пожилого возраста и старении организма общепризнана и является объектом многочисленных исследований. Однако средняя по времени (стационарная) концентрация этих активных частиц в живой клетке очень мала, и их прямое обнаружение обычными биохимическими методами практически невозможно. Метод хемилюминесценции основан не на анализе веществ, а на измерении скорости реакций, сопровождающихся свечением, а именно такие реакции характерны для свободных радикалов.

Наиболее известные хемилюминесцентные реакции в биохимических системах – собственное (*сверхслабое*) свечение при цепном окислении липидов, реакции люминола с АФК (гидроксильным радикалом и супероксидом) и органическими радикалами, реакции люцигенина и ряда производных люциферинов с супероксидным радикалом, – все они включают в себя на определенном этапе взаимодействие двух радикалов, которое позволяет образовавшейся молекуле накопить такое количество энергии, что его оказывается достаточным для излучения фотона конечным продуктом. Исключением из этого правила могли бы показаться реакции активных молекул с пероксидом водорода, например реакция гипохлорита с люминолом в присутствии  $H_2O_2$  (и некоторые другие, не упомянутые в данном обзоре). Но не следует забывать, что основная масса в наших клетках образуется в результате реакции взаимодействия двух супероксидных радикалов, катализируемой СОД, поскольку именно супероксид – основной природный радикал, образуемый клеточными мембранами и митохондриями.  $H_2O_2$  в рассмотренном случае служит аккумулятором энергии взаимодействия радикалов, которая входит существенной составной частью в энергию возбужденного состояния конечного продукта реакции.

После открытия митогенетического излучения Гурвичем прошло 80 лет, и в этом году исполнилось 50 лет со дня публикации нашей первой статьи по исследованию сверхслабых свечений в биологических системах [6]. С тех пор были разработаны чувствительные и удобные приборы для регистрации ХЛ, предложены вещества – активаторы хемилюминесценции в клеточных системах и растворах, разработаны методы кинетики и математического моделирования ХЛ-реакций и раскрыт механизм большинства из них. Метод ХЛ стал одним из основных методов изучения свободнорадикальных процессов в научных и клинических исследованиях. Нет сомнения, что он будет широко использоваться и в дальнейшем.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гурвич А.Г. Митогенетическое излучение. (1934) Госмедиздат.
2. Гурвич А.Г., Гурвич Л.Д. Митогенетическое излучение. (1945) Изд-во Наркомздрава СССР.
3. Colli, L., Facchini, U. (1954) *Nuovo cimento*, **12**, 150.
4. Colli, L., Facchini, U., Guidotti, G., Lonati, R.D., Arsenigo, M., Sommariva, O. (1955) *Experientia*, **11**, 479–481.
5. Colli, L., Facchini, U., Rossi, A. (1954) *Nuovo Cimento*, **11**, 255.
6. Владимирова Ю.А., Литвин Ф.Ф. (1959) *Биофизика*, **4(5)**, 601–605.
7. Тарусов Б.Н., Поливода А.И., Журавлев А.И. (1961) *Биофизика*, **6**, 490.
8. Тарусов Б.Н., Поливода А.И., Журавлев А.И. (1961) *Радиобиология*, **1**, 150.
9. Тарусов Б.Н., Поливода А.И., Журавлев А.И., Секамова Е.Н. (1962) *Цитология*, **4**, 696.
10. Владимирова Ю.А., Львова О.Ф. (1964) *Биофизика*, **9(4)**, 506–507.
11. Владимирова Ю.А. Сверхслабые свечения при биохимических реакциях. (1966) Москва: Наука, 126 с.
12. Владимирова Ю.А., Львова О.Ф., Черемисина З.П. (1966) *Биохимия*, **31(3)**, 507–514.
13. Владимирова Ю.А., Сулова Т.Б., Черемисина З.П. (1968) *Биохимия*, **33(4)**, 720–723.
14. Boveris, A., Cadenas, E., Chance, B. (1981) *Fed. Proc.*, **40**, 195–198.
15. Allen, R.C., Stjernholm, R.L., Steele, R.H. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 679.
16. Stjernholm, R.L., Allen, R.C., Steele, R.H., Waring, W.W., Harris, J.A. (1973) *Infect. Immun.*, **7**, 313–4.
17. Allen, R.C., Loose, L.D. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **69**, 245–252.
18. Владимирова Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И., Козлов А.В., Осипов А.Н., Рощупкин Д.И. Свободные радикалы в живых системах. Итоги Науки и Техники, сер. Биофизика, том.29. (1992) Москва: ВИНТИ, 250 с.
19. Владимирова Ю.А. (1999) Соросовский образовательный журнал, 25–32.
20. Babior, B.M. (1984) *J. Clin. Invest.*, **73**, 599–601.
21. Babior, B.M. (1992) *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **65**, 49–95.
22. Turrens, J.F. (1997) *Biosci. Rep.*, **17**, 3–8.
23. Владимирова Ю.А. (1998) *Вестн. Рос. Акад. Мед. Наук*, **(7)**, 43–51.
24. Liochev, S.L. (1996) *Free Radic. Res.*, **25**, 369–384.
25. Liochev, S.I., Fridovich, I. (1994) *Free Radic. Biol. Med.*, **16**, 29–33.
26. Осипов А.Н., Якутова Э.Ш., Владимирова Ю.А. (1993) *Биофизика*, **38(3)**, 390–396.
27. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. (1999) Oxford: Unerversity Press, 783 p.
28. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. (1999) Oxford, New York: University Press, 936 p.
29. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З. Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания. (2008) Новосибирск: АРТА, 284 с.
30. Осипов А.Н., Савов В.М., Яхьяев А.В., Зубарев В.Е., Азизова О.А., Каган В.Е., Владимирова Ю.А. (1984) *Биофизика*, **29(4)**, 533–336.
31. Азизова О.А., Осипов А.Н., Савов В.М., Яхьяев А.В., Зубарев В.Е., Каган В.Е., Владимирова Ю.А. (1985) *Биофизика*, **30(1)**, 36–39.

32. Тарусов Б.Н., Иванов И.И., Петрушевич Ю.М. Сверхслабое свечение биологических систем. (1967) Москва: Изд-во Моск. ун-та.
33. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. (1972) Москва: Наука.
34. Boveris, A., Cadenas, E., Reiter, R., Filipkowski, M., Nakase, Y., Chance, B. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**, 347–351.
35. Cadenas, E., Arad, I.D., Fisher, A.B., Boveris, A., Chance, B. (1980) Biochem. J., **192**, 303–309.
36. Cadenas, E., Boveris, A., Chance, B. (1980) Biochem. J., **188**, 577–583.
37. Cadenas, E., Boveris, A., Chance, B. (1980) Biochem. J., **186**, 659–667.
38. Cadenas, E., Boveris, A., Chance, B. (1980) FEBS Lett., **112**, 285–288.
39. Cadenas, E., Boveris, A., Chance, B. (1980) Biochem. J., **187**, 131–40.
40. Cadenas, E., Ginsberg, M., Rabe, U., Sies, H. (1984) Biochem. J., **223**, 755–759.
41. Cadenas, E., Varsavsky, A.I., Boveris, A., Chance, B. (1981) Biochem. J., **198**, 645–654.
42. Kakinuma, K., Cadenas, E., Boveris, A., Chance, B. (1979) FEBS Lett., **102**, 38–42.
43. Cadenas, E., Varsavsky, A.I., Boveris, A., Chance, B. (1980) FEBS Lett., **113**, 141–144.
44. Cadenas, E., Arad, I.D., Boveris, A., Fisher, A.B., Chance, B. (1980) FEBS Lett., **111**, 413–418.
45. Boveris, A., Cadenas, E., Reiter, R., Filipkowski, M., Nakase, Y., Chance, B. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **77**, 347–351.
46. Slawinska, D., Slawinski, J. (1987) Pigment Cell Res., **1**, 171–175.
47. Vladimirov, Y.A., (1994) Free radicals in the environment, medicine and toxicology. / H. Nohl, et al. London: Richelieu Press, 345–373.
48. Vladimirov, Y.A., (1996) Free radicals. A practical approach. / N.A.a.K. PUNCHARD, F.J. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press, 65–82.
49. Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я. Физико-химические основы фото-биологических процессов. (2006) Москва: Дрофа.
50. Vladimirov, Y.A., Sherstnev, M.P. (1991) Soviet Medical Reviews/Section B. Physicochemical Aspects of Medicine. Vol.2, Part 5. / Y.M. Lopukhin London: Harwood Academic Publishers GmbH, 1–43.
51. Владимиров Ю.А., Шерстнев М.П. (1989) Итоги науки и техники: сер. Биофизика, **24**.
52. Vladimirov, Y.A., Sharov, V.S., Driomina, E.S., Reznichenko, A.V., Gashchev, S.B. (1995) Free Rad. Biol. Med., **18**, 739–745.
53. Barnard, M.L., Robertson, B., Watts, B.P., Jr., Turrens, J.F. (1997) Am. J. Physiol., **272**, L262–L267.
54. Turrens, J.F., Giulivi, C., Pinus, C., Roldan, E., Lavagno, C., Boveris, A. (1988) Basic Life Sci., **49**, 239–42.
55. Turrens, J.F., Giulivi, C., Pinus, C.R., Lavagno, C., Boveris, A. (1988) Free Rad. Biol. Med., **5**, 319–323.
56. Владимиров Ю.А., Аксентьев С.Л., Оленев В.И. (1965) Биофизика, **10(4)**, 614–618.
57. Владимиров Ю.А., Суслова Т.Б., Оленев В.И. (1969) Биофизика, **14**, 836–845.
58. Vladimirov, Y.A., Olenov, V.I., Suslova, T.B., Cheremisina, Z.P. (1980) Adv. Lipid Res., **17**, 173–249.
59. Belikova, N.A., Vladimirov, Y.A., Osipov, A.N., Kapralov, A.A., Tyurin, V.A., Potapovich, M.V., Basova, L.V., Peterson, J., Kurnikov, I.V., Kagan, V.E. (2006) Biochemistry, **45**, 4998–5009.
60. Kapralov, A.A., Kurnikov, I.V., Vlasova, I.I., Belikova, N.A., Tyurin, V.A., Basova, L.V., Zhao, Q., Tyurina, Y.Y.,

- Jiang, J., Bayir, H., Vladimirov, Y.A., Kagan, V.E.* (2007) *Biochemistry*, **46**, 14232–14244.
61. *Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Измайлов Д.Ю., Новиков А.А., Брусничкин А.В., Осипов А.Н., Каган В.Е.* (2006) *Биохимия*, **71**, 1225–1233.
62. *Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Измайлов Д.Ю., Новиков А.А., Брусничкин А.А., Осипов А.Н., Каган В.Е.* (2006) *Биохимия*, **71**, 1215–1224.
63. *Владимиров Ю.А., Корчагина М.В., Оленев В.И.* (1971) *Биофизика*, **16(5)**, 953.
64. *Васильев Р.Ф.* (1965) *Оптика и спектроскопия*, **18**, 236–244.
65. *Васильев Р.Ф., Русина И.Ф.* (1964) *Докл. АН СССР*, **156**, 1402–1405.
66. *Vasil'ev R.F.* (1998) *J. Biolum. Chemilum.*, **13**, 69–74.
67. *Vladimirov, Y.A.* (1986) *Free Radicals, Aging, and Degenerative Diseases.* / J.E. Johnson, Jr., et al. New York: Allan R. Liss, Inc., 141–195.
68. *Vladimirov, Y.A.* (1987) *Physicochemical aspects of medicine. Reviews. Soviet Medical Reviews, Section B.* / Y.M. Lopukhin London: Harwood Academic Publishers GmbH, 51–127.
69. *Гукасов В.М., Сергеев П.В., Сейфулло Р.Д., Владимиров Ю.А.* (1974) **11**, 54–56.
70. *Владимиров Ю.А., Петренко Ю.М.* (1976) *Биофизика*, **21(3)**, 424–427.
71. *Рубене Д.Я., Шаров В.С., Оленев В.И., Турзит Дубур Г.Я., Владимиров Ю.А.* (1981) *Журн. Физ. Хим.*, **15(2)**, 511–512.
72. *Владимиров Ю.А., Болдырев А.А., Деев А.И., Северин С.Е., Хо-Ик Л.* (1988) *Биофизика*, **33**, 140–145.
73. *Клебанов Г.И., Бабенкова И.В., Теселкин Ю.О., Комаров О.С., Владимиров Ю.А.* (1988) *Лаб. дело*, **5**, 59–62.
74. *Ли Х.И., Владимиров Ю.А., Деев А.И.* (1990) *Биофизика*, **35**, 82–85.
75. *Епанчицева О.М., Парфенов Э.А., Смирнов Л.Д., Владимиров Ю.А.* (1991) *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.*, **112**, 358–360.
76. *Vladimirov, Y.A.* (1996) *ISNA.* / L. Paker NY: ISNA, 125–241.
77. *Olenev, V.I., Vladimirov, Y.A.* (1973) *Studia Biophysica*, **38(2)**, 131–38.
78. *Sharov, V.S., Driomina, E.S., Vladimirov, Y.A.* (1996) *J. Biolum. Chemilum.*, **11**, 91–98.
79. *Владимиров Ю.А., Гутенев П.И., Кузнецов П.И.* (1973) *Биофизика*, **18**, 1024–1030.
80. *Владимиров Ю.А., Тафельштейн Э.Е., Козлов Ю.П.* (1969) *ДАН СССР*, **188**, 1163–1165.
81. *Владимиров Ю.А., Сергеев П.В., Сейфулло Р.Д., Руднев Ю.Н.* (1973) *Мол. Биол.*, **7**, 247–253.
82. *Владимиров Ю.А., Сергеев П.В., Сейфулло Р.Д., Руднев Ю.Н.* (1973) *Мол. Биол.*, **7**, 247–253.
83. *Владимиров Ю.А., Львова О.Ф.*, (1965) *Биофизика клетки.* / Ред. Г.М. Франк. Москва: Наука, 74–83.
84. *Львова О.Ф., Владимиров Ю.А.* (1964) *Свободнорадикальные процессы в биологических системах.* Симпозиум 2–5 июня. Тезисы докладов, 34.
85. *Львова О.Ф., Владимиров Ю.А.* (1966) *Труды Московского общества испытателей природы*, **16**, 214–217.
86. *Pollet, E., Martinez, J.A., Metha, B., Watts, B.P., Jr., Turrens, J.F.* (1998) *Arch. Biochem. Biophys.*, **349**, 74–80.
87. *Watts, B.P., Jr., Barnard, M., Turrens, J.F.* (1995) *Arch. Biochem. Biophys.*, **317**, 324–330.
88. *Turrens, J.F.* (1994) *International conference on clinical chemiluminescence.* Berlin 25–28 April 1994. / Berlin: Humboldt University.

89. Клебанов Г.И., Владимиров Ю.А., Бенов Л.Ц., Рибаров С.Р. (1988) Бюлл. Эксп. Биол. Мед., **105(6)**, 674–676.
90. Vladimirov, Yu. A., Ribarov, S.R., Bochev, P.G., Benov, L.C., Klebanov, G.I. (1990) Gen. Physiol. Biophys., **9**, 45–54.
91. Boullier, A., Bird, D.A., Chang, M.K., Dennis, E.A., Friedman, P., Gillotre-Taylor, K., Horkko, S., Palinski, W., Quehenberger, O., Shaw, P., Steinberg, D., Terpstra, V., Witztum, J.L. (2001) Ann. N. Y. Acad. Sci., **947**, 214–222; discussion 22–23.
92. Kita, T., Kume, N., Minami, M., Hayashida, K., Murayama, T., Sano, H., Moriwaki, H., Kataoka, H., Nishi, E., Horiuchi, H., Arai, H., Yokode, M. (2001) Ann. N. Y. Acad. Sci., **947**, 199–205; discussion 05–06.
93. Nakajima, K., Nakano, T., Tanaka, A. (2006) Clin. Chim. Acta, **367**, 36–47.
94. Nilsson, J., Nordin Fredrikson, G., Schiopu, A., Shah, P.K., Jansson, B., Carlsson, R. (2007) Curr. Pharm. Des., **13**, 1021–1030.
95. Babior, B.M. (1995) Curr. Opin. Hematol., **2**, 55–60.
96. Клебанов Г.И., Владимиров Ю.А. (1999) Усп. Совр. Биол., **119**, 461–474.
97. Роцупкин Д.И., Белакина Н.С., Мурина М.А. (2006) Биофизика, **51**, 99–107.
98. Merenyi, G., Lind, J., Eriksen, T.E. (1990) J. Biolum. Chemilum., **5**, 53–56.
99. Krasowska, A., Rosiak, D., Szkaplak, K., Oswiecimska, M., Witek, S., Lukaszewicz, M. (2001) Cell Mol. Biol. Lett., **6**, 71–81.
100. Ritov, V.B., Goldman, R., Stoyanovsky, D.A., Menshikova, E.V., Kagan, V.E. (1995) Arch. Biochem. Biophys., **321**, 140–152.
101. Tyurina, Y.Y., Tyurin, V.A., Yalowich, J.C., Quinn, P.J., Claycamp, H.G., Schor, N.F., Pitt, B.R., Kagan, V.E. (1995) Toxicol. Appl. Pharmacol., **131**, 277–288.
102. Maulik, G., Maulik, N., Bhandari, V., Kagan, V.E., Pakrashi, S., Das, D.K. (1997) Free Radic. Res., **27**, 221–228.
103. Kagan, V.E., Tsuchiya, M., Serbinova, E., Packer, L., Sies, H. (1993) Biochem. Pharmacol., **45**, 393–400.
104. Lissi, E., Salim-Hanna, M., Pascual, C., del Castillo, M.D. (1995) Free Radic. Biol. Med., **18**, 153–158.
105. Dotan, Y., Lichtenberg, D., Pinchuk, I. (2004) Progr. Lipid Res., **43**, 200–227.
106. Cormier, M.J., Prichard, P.M. (1968) J. Biol. Chem., **243**, 4706–4714.
107. Lambeir, A.M., Markey, C.M., Dunford, H.B., Marnett, L.J. (1985) J. Biol. Chem., **260**, 14894–14896.
108. Stepanov, G., Gnedenko, O., Mol'nar, A., Ivanov, A., Vladimirov, Y., Osipov, A. (2009) FEBS Lett., **583**, 97–100.
109. Демин Е.М., Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А. (2008) Вестн. Моск. Ун-та. Сер.2: Химия, 354–359.
110. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Демин Е.М., Матвеева Н.С., Любицкий О.Б., Новиков А.А., Измайлов Д.Ю., Осипов А.Н., Тихонов В.П., Каган В.Е. (2009) Биохимия, **74**, 372–379.
111. Осипов А.Н., Степанов Г.О., Владимиров Ю.А., Козлов А.В., Каган В.Е. (2006) Биохимия, **71**, 1392–1398.
112. Arnhold, J., Mueller, S., Arnold, K., Sonntag, K. (1993) J Biolum. Chemilum., **8**, 307–313.
113. Mueller, S., Arnhold, J. (1995) J Biolum. Chemilum., **10**, 229–237.

114. Мурина М.А., Белакина Н.С., Роцупкин Д.И. (2004) *Биофизика*, **49**, 1099–1105.
115. Мурина М.А., Роцупкин Д.И., Белакина Н.С., Филиппов С.В., Халилов Э.М. (2005) *Биофизика*, **50**, 1100–1104.
116. Arnhold, J. (2004) *Biochemistry (Mosc)*, **69**, 4–9.
117. Haqqani, A.S., Sandhu, J.K., Birnboim, H.C. (1999) *Anal. Biochem.*, **273**, 126–132.
118. Greenlee, L., Fridovich, I., Handler, P. (1962) *Biochemistry*, **1**, 779–783.
119. Storch, J., Ferber, E. (1988) *Anal. Biochem.*, **169**, 262–267.
120. Wilson, M.E., Trush, M.A., van Dyke, K., Neal, W. (1978) *FEBS Lett.*, **94**, 387–390.
121. Allen, R.C. (1986) *Methods Enzymol.*, **133**, 449–493.
122. Irani, K., Xia, Y., Zweier, J.L., SolloTT, S.J., Der, C.J., Fearon, E.R., Sundaresan, M., Finkel, T., Goldschmidt-Clermont, P.J. (1997) *Science*, **275**, 1649–1652.
123. Mohazzab, K.M., Kaminski, P.M., Wolin, M.S. (1994) *Am. J. Physiol.*, **266**, H2568–H2572.
124. Bhunia, A.K., Han, H., Snowden, A., Chatterjee, S. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 15642–15649.
125. Rembish, S.J., Yang, Y., Trush, M.A. (1994) *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, **85**, 115–129.
126. Rembish, S.J., Trush, M.A. (1994) *Free Radic. Biol. Med.*, **17**, 117–126.
127. Faulkner, K., Fridovich, I. (1993) *Free Radic. Biol. Med.*, **15**, 447–451.
128. Liochev, S.I., Fridovich, I. (1997) *Arch. Biochem. Biophys.*, **337**, 115–120.
129. Li, Y., Zhu, H., Kuppusamy, P., Roubaud, V., Zweier, J.L., Trush, M.A. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 2015–2023.
130. Liochev, S.I., Fridovich, I. (1998) *Free Radic. Biol. Med.*, **25**, 926–928.
131. Afanas'ev, I.B., Ostrachovitch, E.A., Korkina, L.G. (1999) *Arch. Biochem. Biophys.*, **366**, 267–274.
132. Kowaltowski, A.J., Vercesi, A.E. (1999) *Free Radic. Biol. Med.*, **26**, 463–471.
133. Skulachev, V.P. (1998) *FEBS Lett.*, **423**, 275–280.
134. Turrens, J.F., Alexandre, A., Lehninger, A.L. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.*, **237**, 408–414.
135. Vinogradov, A.D., Grivennikova, V.G. (2005) *Biochemistry (Mosc)*, **70**, 120–127.
136. Li, Y., Trush, M.A. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **253**, 295–299.
137. Kervinen, M., Patsi, J., Finel, M., Hassinen, I.E. (2004) *Anal. Biochem.*, **324**, 45–51.
138. Матвеева Н.С., Любицкий О.Б., Осипов А.Н., Владимиров Ю.А. (2007) *Биофизика*, **52**, 1120–1127.
139. Imada, I., Sato, E.F., Miyamoto, M., Ichimori, Y., Minamiyama, Y., Konaka, R., Inoue, M. (1999) *Anal. Biochem.*, **271**, 53–58.
140. Patel, M., Li, Q.Y., Chang, L.Y., Crapo, J., Liang, L.P. (2005) *J. Neurochem.*, **92**, 123–131.
141. Nakano, M. (1998) *Cell Mol. Neurobiol.*, **18**, 565–579.
142. Tampo, Y., Tsukamoto, M., Yonaha, M. (1998) *FEBS Lett.*, **430**, 348–352.
143. Guzik, T.J., Channon, K.M. (2005) *Methods Mol. Med.*, **108**, 73–89.
144. Brien, J.F., McLaughlin, B.E., Nakatsu, K., Marks, G.S. (1991) *J. Pharmacol. Methods*, **25**, 19–27.
145. Hart, C.M., Kleinhenz, D.J., Dikarov, S.I., Boulden, B.M., Dudley, S.C., Jr. (2005) *Methods Enzymol.*, **396**, 502–514.

146. Dodeigne, C., Thunus, L., Lejeune, R. (2000) *Talanta*, **51**, 415–439.
147. Monig, H., Konermann, G. (1993) *Strahlenther Onkol.*, **169**, 418–426.
148. Vladimirov, Y.A., Arroyo, A., Taylor, J.M., Tyurina, Y.Y., Matsura, T., Tyurin, V.A., Kagan, V.E. (2000) *Arch. Biochem. Biophys.*, **384**, 154–162.
149. Sharov, V.S., Briviba, K., Sies, H. (1996) *Free Radic. Biol. Med.*, **21**, 833–843.
150. Driomina, E., Polnikov, I., Sharov, V., Azizova, O., Vladimirov, Y. (1994) *Free Radic. Res.*, **20**, 279–288.
151. Шаров В.С., Дремина Е.С., Владимиров Ю.А. (1995) *Биофизика*, **40(2)**, 428–433.
152. Kagan, V.E., Tyurin, V.A., Jiang, J., Tyurina, Y.Y., Ritov, V.B., Amoscato, A.A., Osipov, A.N., Belikova, N.A., Kapralov, A.A., Kini, V.V., Vlasova, I.I., Zhao, Q., Zou, M., Di, P., Svishtunenko, D.A., Kurnikov, I.V., Borisenko, G.G. (2005) *Nature Chem. Biol.*, **1**, 223–232.
153. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. (2001) Москва: МАИК «Наука/Интерпериодика», 343 с.
154. Neuzil, J., Rayner, B.S., Lowe, H.C., Witting, P.K. (2005) *Redox Rep*, **10**, 187–197.
155. Siesjo, B.K., Siesjo, P. (1996) *Eur. J. Anaesthesiol.*, **13**, 247–268.
156. Sivonova, M., Kaplan, P., Durackova, Z., Dobrota, D., Drgova, A., Tatarkova, Z., Pavlikova, M., Halasova, E., Lehotsky, J. (2008) *Cell Mol. Neurobiol.*, **28**, 431–441.
157. Prasad, K., Lee, P., Mantha, S.V., Kalra, J., Prasad, M., Gupta, J.B. (1992) *Mol. Cell Biochem.*, **115**, 49–58.
158. Bassenge, E., Sommer, O., Schwemmer, M., Bunger, R. (2000) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **279**, H2431–H2438.
159. Brovkovich, V.M., Nikitchenko, I.U., Lemeshko, V.V. (1987) *Biull Eksp. Biol. Med.*, **104**, 546–548.
160. Wahi, S., Kaul, N., Ganguly, N.K., Varma, S., Sharma, B.K., Wahi, P.L. (1991) *Can. J. Cardiol.*, **7**, 229–233.
161. Hoshida, S., Kuzuya, T., Fuji, H., Oe, H., Hori, M., Kamada, T., Tada, M. (1993) *Cardiovasc. Res.*, **27**, 377–383.
162. Klebanov, G.I., Kreinina, M.V., Pozin, V.M., Skuratovskaia, S.G., Pocheptsova, G.A. (1988) *Biull. Eksp. Biol. Med.*, **106**, 297–299.
163. Klebanov, G.I., Kreinina, M.V., Chukaeva, I.I., Barbarash, O.L., Korochkin, I.M., Vladimirov Iu, A. (1990) *Biull. Eksp. Biol. Med.*, **109**, 334–336.
164. Medvedeva, L.V., Popova, T.N., Artyukhov, V.G., Matasova, L.V., Pinheiro de Carvalho, M.A. (2002) *Biochemistry (Moscow)*, **67**, 696–705.
165. Safonova, O.A., Popova, T.N., Matasova, L.V., Artiukhov, V.G. (2005) *Biomed. Khim.*, **51**, 311–320.
166. Syrkin, A.L., Barsel, V.A., Alliluev, I.G., Kogan, I.G., Aksiutina, M.S., Eliubaeva, I.D., Nesmeianova, M.A., Drozdov, D.V. (1996) *Klin. Med. (Mosk)*, **74**, 24–27.
167. Baj, Z., Kowalski, J., Kantorski, J., Pokoca, L., Kosmider, M., Pawlicki, L., Tchorzewski, H. (1994) *Atherosclerosis*, **106**, 159–168.
168. Giannitsis, E., Tettenborn, I., Schmucker, G., Mitusch, R., Wiegand, U., Potratz, J., Sheikhzadeh, A., Stierle, U. (1997) *Int. J. Cardiol.*, **61**, 229–237.
169. Siminiak, T., O’Gorman, D.J., Shahi, M., Hackett, D., Sheridan, D.J. (1995) *Br. Heart. J.*, **74**, 625–630.
170. Kowalski, J., Kosmider, M., Pasnik, J., Zeman, K., Baj, Z., Janiszewska-Drobinska, B., Czekalska, R. (1999) *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **13**, 237–242.

171. Fukuda, H., Sawa, Y., Kadoba, K., Taniguchi, K., Shimazaki, Y., Matsuda, H. (1995) *Circulation*, **92**, II413–II416.
172. Stevens, R.M., Jahania, M.S., Stivers, J.E., Mentzer, R.M., Jr., Lasley, R.D. (2002) *Ann. Thorac. Surg.*, **73**, 1261–1266.
173. Akiyama, K., Kimura, A., Suzuki, H., Takeyama, Y., Gluckman, T.L., Terhakopian, A., Katagiri, T., Suh, K.Y., Roseto, J., Bing, R.J. (1998) *J. Am. Coll. Cardiol.*, **32**, 373–379.
174. Alexandrova, M.L., Bochev, P.G., Markova, V.I., Bechev, B.G., Popova, M.A., Danovska, M.P., Simeonova, V.K. (2001) *Luminescence*, **16**, 357–365.
175. Frassetto, S.S., Schetinger, M.R., Webber, A., Sarkis, J.J., Netto, C.A. (1999) *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **32**, 1295–1302.
176. Yamaguchi, S., Ogata, H., Hamaguchi, S., Kitajima, T. (1998) *Can. J. Anaesth.*, **45**, 226–232.
177. Xie, H., Ray, P.E., Short, B.L. (2005) *Stroke*, **36**, 1047–1052.
178. Поитберг Г.Е., ред., Метаболический синдром. (2007) Москва: МЕДпресс-информ, 224 с.
179. Florian, M., Freiman, A., Magder, S. (2004) *Steroids*, **69**, 779–787.
180. Kougas, P., Chai, H., Lin, P.H., Lumsden, A.B., Yao, Q., Chen, C. (2005) *J. Vasc. Surg.*, **41**, 691–698.
181. Napoli, C., Aldini, G., Wallace, J.L., de Nigris, F., Maffei, R., Abete, P., Bonaduce, D., Condorelli, G., Rengo, F., Sica, V., D'Armiento, F.P., Mignogna, C., de Rosa, G., Condorelli, M., Lerman, L.O., Ignarro, L.J. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 1689–1694.
182. Jacobi, J., Kristal, B., Chezar, J., Shaul, S.M., Sela, S. (2005) *Free Radic. Biol. Med.*, **39**, 1238–1248.
183. Niwa, Y., Sakane, T., Shingu, M., Yokoyama, M.M. (1983) *J. Clin. Immunol.*, **3**, 228–240.
184. Justice, J.M., Tanner, M.A., Myers, P.R. (2000) *J. Cell. Physiol.*, **182**, 359–365.
185. Zhu, L., Castranova, V., He, P. (2005) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **288**, H1331–H1338.
186. Gamkrelidze, M., Mamamtavrisshvili, N., Bejitasvili, N., Sanikidze, T., Ratiiani, L. (2008) *Georgian Med. News*, 54–57.
187. Zalba, G., Beloqui, O., San Jose, G., Moreno, M.U., Fortuno, A., Diez, J. (2005) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **25**, 1452–1457.
188. Prasad, K., Lee, P. (2003) *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.*, **8**, 61–69.
189. Radwanska-Wala, B., Buszman, E., Druzba, D. (2008) *Wiad. Lek.*, **61**, 67–73.
190. Sayre, L.M., Perry, G., Smith, M.A. (2008) *Chem. Res. Toxicol.*, **21**, 172–188.
191. Shibata, N., Kobayashi, M. (2008) *Brain Nerve*, **60**, 157–170.
192. Repetto, M.G., Reides, C.G., Evelson, P., Kohan, S., de Lustig, E.S., Llesuy, S.F. (1999) *Eur. J. Clin. Invest.*, **29**, 643–649.
193. Licastro, F., Morini, M.C., Davis, L.J., Malpassi, P., Cucinotta, D., Parente, R., Melotti, C., Savorani, G. (1994) *J. Neuroimmunol.*, **51**, 21–26.
194. Layton, M.E., Pazdernik, T.L. (1999) *J. Mol. Neurosci.*, **13**, 63–68.
195. Famulari, A.L., Marschoff, E.R., Llesuy, S.F., Kohan, S., Serra, J.A., Dominguez, R.O., Repetto, M., Reides, C., Sacerdote de Lustig, E. (1996) *J. Neurol. Sci.*, **141**, 69–78.
196. Gatto, E.M., Carreras, M.C., Pargament, G.A., Riobo, N.A., Reides, C., Repetto, M., Fernandez Pardal,

- M.M., Llesuy, S., Poderoso, J.J. (1996) *Mov. Disord.*, **11**, 261–267.
197. Arnhold, J., Sonntag, K., Sauer, H., Hantzschel, H., Arnold, K. (1994) *J. Biolum. Chemilum.*, **9**, 79–86.
198. Bostan, M., Brasoveanu, L.I., Livescu, A., Manda, G., Neagu, M., Iordachescu, D. (2001) *J. Cell Mol. Med.*, **5**, 188–194.
199. Crouch, S.P., Crocker, I.P., Fletcher, J. (1995) *J. Immunol.*, **155**, 5436–5443.
200. Marhoffer, W., Stein, M., Federlin, K. (1993) *Immun. Infekt.*, **21** Suppl 1, 15–16.
201. Bender, J.G., Van Epps, D.E., Searles, R., Williams, R.C., Jr. (1986) *Inflammation*, **10**, 443–453.
202. Gale, R., Bertouch, J.V., Bradley, J., Roberts-Thomson, P.J. (1983) *Ann. Rheum. Dis.*, **42**, 158–162.
203. Nurcombe, H.L., Bucknall, R.C., Edwards, S.W. (1991) *Ann. Rheum. Dis.*, **50**, 147–153.
204. Gale, R., Bertouch, J.V., Gordon, T.P., Bradley, J., Roberts-Thomson, P.J. (1984) *Ann. Rheum. Dis.*, **43**, 34–39.
205. D'Onofrio, C., Maly, F.E., Fischer, H., Maas, D. (1984) *Klin. Wochenschr.*, **62**, 710–716.
206. Bohm, U., Meretey, K., Sesztak, M., Hodinka, L., Koo, E., Zahumenszky, Z. (1988) *Z. Rheumatol.*, **47**, 161–165.
207. Meske, S., Maly, F.E., Estefan, M., Muller, W. (1985) *Z. Rheumatol.*, **44**, 41–45.
208. Miesel, R., Murphy, M.P., Kroger, H. (1996) *Free Radic. Res.*, **25**, 161–169.
209. Meier, B., Radeke, H.H., Selle, S., Raspe, H.H., Sies, H., Resch, K., Habermehl, G.G. (1990) *Free Radic. Res. Commun.*, **8**, 149–160.
210. Hyvonen, P.M., Kowolik, M.J. (1991) *J. Clin. Lab. Immunol.*, **35**, 47–55.
211. Hyvonen, P.M., Kowolik, M.J. (1993) *J. Clin. Lab. Immunol.*, **40**, 69–76.
212. Bostan, M., Galatiuc, C., Hirt, M., Constantin, M.C., Brasoveanu, L.I., Iordachescu, D. (2003) *J. Cell Mol. Med.*, **7**, 57–66.
213. Chou, C.T., Shaio, M.F., Chang, F.Y., Chang, M.L. (1991) *Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi (Chin. J. Microbiol. Immunol.)*, **24**, 281–288.
214. Edwards, S.W., Hallett, M.B., Campbell, A.K. (1984) *Biochem. J.*, **217**, 851–854.
215. Hafstrom, I., Gyllenhammar, H., Palmblad, J., Ringertz, B. (1989) *J. Rheumatol.*, **16**, 1033–1037.
216. Leirisalo-Repo, M., Paimela, L., Koskimies, S., Repo, H. (1993) *Inflammation*, **17**, 427–442.
217. Magaro, M., Altomonte, L., Zoli, A., Mirone, L., De Sole, P., Di Mario, G., Lippa, S., Oradei, A. (1988) *Ann. Rheum. Dis.*, **47**, 793–796.
218. Magaro, M., Zoli, A., Altomonte, L., Mirone, L., De Sole, P., Di Mario, G., De Leo, E. (1992) *Ann. Rheum. Dis.*, **51**, 877–880.
219. Halliwell, B. (2007) *Biochem. J.*, **401**, 1–11.
220. Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006) *Chem. Biol. Interact.*, **160**, 1–40.
221. Chen, C., Liu, F.K., Qi, X.P., Li, J.S. (2003) *World J. Gastroenterol.*, **9**, 242–245.
222. Антонов А.Р., Бабышкина Ю.Г., Киселе А.Б. (2004) *Вестник новых медицинских технологий*, **24**.
223. Tullgren, O., Giscombe, R., Holm, G., Johansson, B., Mellstedt, H., Bjorkholm, M. (1991) *Clin. Exp. Immunol.*, **85**, 436–440.
224. Shaughnessy, S.G., Buchanan, M.R., Turple, S., Richardson, M., Orr, F.W. (1989) *Am. J. Pathol.*, **134**, 787–796.

225. *Bilenko, M.V., Vladimirov, Iu, A., Pavlova, S.A., Thu Thuy, N.T., Hai*

*Yen, T.T.* (2008) *Biomed. Khim.*, **54**, 445–453.