

АКТИВНЫЕ ФОРМЫ ГАЛОГЕНОВ: РОЛЬ В ЖИВЫХ СИСТЕМАХ И СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ИХ ИССЛЕДОВАНИЮ

©2024 г. Ю. В. ХРАМОВА^{1,2*}, В. А. КАТРУХА^{1,2},
В. В. ЧЕБАНЕНКО^{1,2}, А. И. КОСТЮК^{2,3},
Н. П. ГОРБУНОВ⁴, О. М. ПАНАСЕНКО⁵,
А. В. СОКОЛОВ^{4,5*}, Д. С. БИЛАН^{2,3*}

1 – Московский государственный университет имени
М.В.Ломоносова, Москва,

2 – Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва,

3 – Центр высокоточного редактирования и генетических
технологий для биомедицины РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва,

4 – Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург,

5 – Федеральный научно-клинический центр физико-химической
медицины имени Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва

I. Введение. II. Основные типы биологически значимых активных
форм галогенов: HOCl, HOBr, HOClN. III. Подходы к исследо-
ванию активных форм галогенов. IV. Классификация флуорес-
центных синтетических индикаторов активных форм галогенов.
V. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

В данном обзоре будут изложены современные представления о
подходах к детекции в живых системах активных форм галогенов

Принятые сокращения: RSH – активные формы галогенов; Mpo – миело-
пероксидаза; Lpo – лактопероксидаза; Epo – пероксидаза эозинофилов; Tro –
тиреоидная пероксидаза; Pxdp – пероксидазин; Hal⁻ – галогенид-ион; HOHal –
гипогалогенные кислоты; SCN⁻ – тиоцианат-ионы; HOClN – гипотиоциановая
кислота; NCT – N-хлорогатаурин; TMB – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин; LDL –
липопротеины низкой плотности; HDL – липопротеины высокой плотности;
окончание принятых сокращений см. на сл. стр.

*Адрес для корреспонденции: yul.khramova@gmail.com, d.s.bilan@gmail.com,
biochemsokolov@gmail.com.

Работа выполнена при поддержке грантов Российского Научного Фонда
№20-15-00390 (часть II, посвященная основным типам активных форм галогенов
и современному представлению их роли в биологии) и № 22-15-00299 (части
III, IV, в которых проанализированы и систематизированы доступные подходы
для исследования активных форм галогенов).

(RSH). Последние образуются при катализе ферментами, входящими в пероксидазно-циклооксигеназное суперсемейство гем-содержащих пероксидаз, к которым относятся миелопероксидаза (Mpo), лактопероксидаза (Lpo), пероксидаза эозинофилов (Epo), тиреоидная пероксидаза (Tpo) и васкулярная пероксидаза, для которой более предпочтительно название – пероксидазин (Pxdn). После взаимодействия с пероксидом водорода перечисленные ферменты переходят в высокоактивное Соединение I, которое помимо пероксидазной активности способно катализировать двух-электронное окисление галогенид-ионов (Hal^-) с образованием соответствующих гипогалоидных кислот (HOHal). Учитывая, что именно атом галогена несет степень окисления (+1), то такие соединения называют активными формами галогенов, а не активными формами кислорода. Учитывая, что для всех гем-содержащих пероксидаз, предпочтительным субстратом (наименьшее значение K_M), являются тиоцианат-ионы (SCN^-) окисляемые до гипотиоциановой кислоты (HOSCN), актуальной задачей является разработка подходов к детекции не только HOHal , но и HOSCN . Галопероксидазы водорослей и лишайников, содержащие ванадий в активном центре, также способны катализировать образование RHS (HOBr и HOCl), однако, в данном обзоре основное внимание будет уделено реакциям, катализируемым гем-содержащими пероксидазами, поскольку они вовлечены в ряд физиологических и патологических процессов, в том числе в развитие галогенирующего стресса.

II. ОСНОВНЫЕ ТИПЫ БИОЛОГИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ АКТИВНЫХ ФОРМ ГАЛОГЕНОВ: HOCl , HOBr , HOSCN

ФЕРМЕНТЫ, СИНТЕЗИРУЮЩИЕ АКТИВНЫЕ ФОРМЫ ГАЛОГЕНОВ

Среди синтезирующих RHS гем-содержащих пероксидаз наибольшее внимание исследователей традиционно уделялось Mpo и Epo, которые локализованы в гранулярном аппарате лейкоцитов крови. Mpo составляет до 5% от общего белка нейтрофилов и 0,9% – моноцитов [1, 2],

окончание принятых сокращений

MRI – магнитно-резонансная томография; PET – позитронно-эмиссионная томография; FRET – Фёрстеровский резонансный перенос энергии; TBET – безизлучательный перенос энергии через связь, PeT – фотоиндуцированный перенос электронов; ICT – внутримолекулярный перенос заряда; ESIPТ – внутримолекулярный перенос протона; GFP – зеленый флуоресцентный белок; srGFPs – круговые пермутанты флуоресцентных белков, YFP – желтый флуоресцентный белок.

а Еро – до 5% от общего белка эозинофилов [3]. При воспалительных процессах перечисленные выше типы лейкоцитов рекрутируются и активируются в очаге воспаления, где Мро и Еро участвуют в инактивации и уничтожении патогенов [4, 5], а при хроническом воспалении приводят к развитию галогенирующего стресса, лежащего в основе патогенеза ряда социально-значимых заболеваний [6]. Наследственная недостаточность Мро, как правило, связана с мутациями, влияющими на процессинг белка и связывание с ним гема, при этом уровень синтеза Мро может не отличаться от нормы. Приобретенный дефект связан с нейтрофильной недостаточностью различной этиологии. Пациенты с недостаточностью Мро особенно чувствительны к патогенным грибкам *Candida albicans*, и у них гораздо чаще наблюдаются злокачественные опухоли [7]. Исследования на мышах с нокаутом гена Мро также показали их гиперчувствительность к *Candida albicans* [8]. Эпителиальные клетки на поверхности слизистых и секреторные железы секретируют Lpo (синоним – слюнная пероксидаза), которая подавляет рост микроорганизмов на слизистых и в секретах желез [9]. Любопытно, что при нокаутировании гена Lpo у мышей развивается воспаление миокарда, сердечных клапанов, аорты и коронарных артерий, дыхательной и пищеварительной систем, развивается гломерулонефрит и рост опухолей [10]. Физиологической функцией Tro является синтез иод-содержащих тиреоидных гормонов в щитовидной железе [11]. Любопытно, что SCN⁺ двойко влияет на образование гормонов в щитовидной железе, вмешиваясь как в транспорт иодид-ионов, так и иодирование остатков тирозина в тиреоглобулине, катализируемое Tro [12–14]. Позже всех был открыт Rxdn, катализирующий бромид-зависимый процессинг коллагена IV в соединительных тканях, являющийся основой базальной мембраны эпителиальных клеток [15–17]. Значение этой реакции сложно переоценить, поскольку наследственный дефицит Rxdn ведет к врожденной катаракте, помутнению роговицы и развитию глаукомы [18]. Более того, Rxdn усиливает ангиогенез, а экспрессия Rxdn на уровне мРНК, его ферментативная активность и образование 3-бромтирозина, как биомаркера его активности, ассоциирована с инвазивностью метастазирующих меланом [19, 20].

Несмотря на высокую гомологию последовательностей пероксидазного домена представителей семейства гем-содержащих пероксидаз [21] гены, кодирующие данные ферменты, экспрессируются в разных типах клеток, а после трансляции и процессинга зрелые ферменты характеризуются существенными отличиями трехмерной структуры, включая количество ковалентных связей аминокислотных остатков с гемом и изогнутость его конформации (Таблица 1). Последняя отра-

Таблица 1. Физико-химические свойства представителей семейства гем-содержащих пероксидаз

Фермент	Мро	Еро	Лро	Тро	Рхдп
Молекулярная масса (отдельных цепей), кДа	145 (14,5+58,5)	70 (11,9+57,9)	79 и 100	95 и 105	400 (135)
Олигомерное состояние	димер	мономер	мономер	мономер димер	тример
pI	10	11	9,6	6,4 и 7,1	
Число ковалентных связей гема	3	2	2	2	
Полоса Сорс, нм	430	413	412	411	410
Восстановительный потенциал Fe(III)/Fe(II), В	0,005	-0,176	-0,183	-	-0,128
Ссылки	[22–24]	[25–27]	[28–32]	[33–36]	[37–39]

жается на положении максимумов поглощения света, полоса Сорс, и на окислительно-восстановительном потенциале Соединения I, который определяет способность ферментов катализировать двух-электронное окисление различных Hal⁻. Среди гем-содержащих пероксидаз Лро и Еро являют мономерами, последняя, как и Мро, при созревании подвергается протеолитическому процессингу с образованием легкой и тяжелой цепи. Мро формирует димер за счет образования дисульфидной связи между протомерами. Хотя гомологичный остаток цистеина присутствует и в последовательности Тро, вопрос об олигомерном состоянии зрелого фермента остается дискуссионным. Так, в недавней работе, посвященной успешному структурному анализу комплекса Тро с антителами, фермент был получен в мономерном состоянии, хотя авторы не исключают, что димеризации препятствовали особенности экспрессии белка [34].

ОБРАЗОВАНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ ГАЛОГЕНОВ

Концентрации субстратов, из которых образуются гипогалоидные кислоты (НОHal) и НОSCN, в плазме крови определены, как 0,11 М для хлорида [40], 40–110 мкМ для бромиды [41], менее 0,1 мкМ для иодида [42], 20–120 мкМ для тиоцианата [43,44]. В слюнной жидкости концентрация тиоцианата составляет около 0,5–4 мМ, а иодида – 5–22 мкМ. Высокие микромолярные концентрации SCN⁻ обнаружены в слезной жидкости (150 мкМ), в жидкостях носовых (300–450 мкМ) и легочных (270–650 мкМ) дыхательных путей [45]. При этом сродство гем-содержащих пероксидаз к субстратам существенно отличается и зависит от

Таблица 2. Кажущиеся константы скорости второго порядка ($10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{c}^{-1}$) реакции между Соединением I Mpo, Epo и Lpo с NaI и SCN^- при pH 7 и pH 5 [22, 39]

Фермент (окислительно-восстановительный потенциал Соединение I/нативный фермент, В)	Mpo (1,16)		Epo (1,10)		Lpo (1,09)	Pxdn
	pH 7	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7	pH 7
Субстрат (X^-) и кислотность среды (окислительно-восстановительный потенциал HOX/X^- , В)						
Хлорид (1,08)	2,5	390	0,31	2,6	–	–
Бромид (0,93)	110	3000	1900	11000	4,1	560
Иодид (0,57)	720	6300	9300	>11000	12000	1680
Тиоцианат (0,56)	960	7600	10000	>11000	20000	1830

pH среды [22]. Например, при 0,1 M Cl^- , 100 мкM SCN^- и pH 7 оба иона окисляются Mpo практически в одинаковой степени [46]. Под действием пероксида водорода ион Fe^{3+} , находящийся в составе гема пероксидаз, быстро окисляется до Соединения I с образованием феррил р-катион радикала с формальной степенью окисления железа (+5). Этот интермедиат имеет окислительно-восстановительный потенциал, подходящий для окисления широкого круга субстратов с одно- и двухэлектронным переносом (Таблица 2). Галогенид- и тиоцианат-ионы являются предпочтительными субстратами для окисления, но именно SCN^- имеет самый низкий окислительный потенциал и может избирательно окисляться пероксидазами. В нейтральной среде Соединение I Mpo характеризуется наибольшей константой скорости второго порядка для реакции с SCN^- , затем следуют иодид, бромид и хлорид, а при pH 5 константы скорости реакций значительно выше. Соединение I Epo окисляет Br^- , I^- и SCN^- в нейтральной и слабокислой среде быстрее, чем Mpo. Однако, в отличие от Mpo, окисление хлорида под действием Epo происходит гораздо менее эффективно. Соединение I Lpo быстро

окисляет иодид и тиоцианат и гораздо медленнее бромид [22, 39]. В отличие от M_{ro} , E_{ro} эффективно окисляет хлорид только при кислых значениях pH среды. При физиологических концентрациях хлорида (100–140 мМ) и тиоцианата (20–120 мкМ) M_{ro} далека от насыщения. Добавление даже небольших доз тиоцианата в присутствии физиологических концентраций хлорида увеличивает утилизацию пероксида водорода вплоть до соотношения $Cl^-/SCN^- = 100/1$ (моль/моль). При двухэлектронном переносе образуется гипогалогенид (гипотиоцианат), а ион железа в пероксидазе восстанавливается до Fe^{3+} . Этот цикл принято называть галогенирующим. Образующиеся при этом соединения – $HOCl$, $HOBr$ и $HOSCN$ – являются мощными цитотоксическими агентами, способными быстро реагировать с нуклеофильными группами типа аминов и тиолов, которые, в свою очередь, сохраняют окислительный потенциал [46]. Сравнительно малоизученной является возможность образования соединений между галогенами и тиоцианатом, между тем не исключено образование $BrCl$ в системе, содержащей M_{ro} , пероксид водорода, хлорид и бромид ионы [47], доказано образование иодистого цианогена (ICN) в системе, содержащей M_{ro} либо L_{ro} , пероксид водорода, при избытке иодида над тиоцианат ионами [48, 49].

К пероксидазным субстратам рассматриваемых ферментов также относится широкий спектр органических соединений, включая тирозин, серотонин, адреналин, аскорбат, урат и множество ксенобиотиков ароматической природы [50–52]. Окисление этих субстратов идет по одноэлектронному механизму и приводит к образованию промежуточного ароматического радикала и Соединения II ($Fe(IV)=O$). В этом соединении ион железа имеет степень окисления (+4), и окислительно-восстановительный потенциал ниже, чем у Соединения I. Однако оно может быть восстановлено до исходного Fe^{3+} различными субстратами для завершения пероксидазного цикла. Под действием супероксидного анион-радикала $O_2^{\cdot -}$ ($k = 2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \times \text{с}^{-1}$) образуется соединение III. Основное количество M_{ro} в фаголизосоме преобразуется в соединение III во время активации фагоцитов [53, 54]. Любопытно, что пероксидазные субстраты, например тирозин, могут регулировать хлорирующую активность M_{ro} , поскольку способствует конверсии M_{ro} из Соединения II в нативную форму, благоприятствуя образованию Соединения I, проявляющего хлорирующую активность [55].

МИШЕНИ И ЭФФЕКТЫ АКТИВНЫХ ФОРМ ГАЛОГЕНОВ

Среди мишеней активных форм галогенов, в частности, хлорноватистой кислоты, выявляются как низкомолекулярные неорганические соединения, так и функциональные группы белков, пептидов, липидов и т.д. При этом при взаимодействии HOCl с неорганическими соединениями образуются активные формы кислорода, в частности гидроксил-радикал ($\cdot\text{OH}$), который обладает очень высокой окислительной способностью и кратким временем жизни. Так в реакции хлорноватистой кислоты с ионами металлов с переменной валентностью, например, с Fe^{2+} , образуется гидроксил-радикал [56] по тому же механизму, который описан для реакции Фентона, в которой в результате взаимодействия двухвалентного иона железа с пероксидом водорода также происходит генерация $\cdot\text{OH}$ [57, 58]. Исследование механизмов реакции Фентона и подобных ей не теряет своей актуальности более 140 лет, так как они тесно связаны с различными процессами, протекающими в живом организме, в частности с таким способом программируемой клеточной гибели, как ферроптоз. Также принципы подобных реакций реализуются при разработке подходов к терапии онкологических заболеваний, в частности, в такой области, как наномедицина, где используются наночастицы, повышающие эффективность образования гидроксил-радикала, обладающего цитотоксическим действием на раковые клетки [59]. Образующиеся в реакции Фентона и в реакциях RHS с ионами металлов активные формы кислорода вступают в дальнейшие взаимодействия, например, с ненасыщенными липидами, преобразуя их в алкильный радикал, инициирующий перекисное окисление липидов [60]. Кроме того, сами активные формы галогенов вступают в реакции с различными органическими соединениями. Так, например, таурин, присутствующий в высокой концентрации в плазме крови и в нейтрофилах реагирует с HOCl с образованием N-хлорамина таурина, проявляющего антимикробные и иммуномодулирующие свойства. Любопытно, что хлорирование таурина под действием MPO происходит без образования свободной HOCl . Небольшие субстраты, такие как таурин, могут непосредственно хлорироваться через комплекс хлорид-Соединение I в полости гемового кармана MPO . Более громоздкие субстраты, такие как трипептид Pro-Gly-Gly , хлорируются только вне гемового кармана через HOCl [61,62]. Недавно при исследовании механизма ингибирования активности MPO антимикробными пептидами была показана возможность окисления терминальных остатков цистеина, а также тирозина с формированием дитиозиновых сшивок между пептидами [63].

Галогенирующая активность Мро и Еро находится под контролем эндогенного ингибитора их активности, церулоплазмينا [64]. При расшифровке механизма ингибирования была решена трехмерная структура комплекса Мро с церулоплазмином и было показано, что подавление активности обусловлено контактом петли, соединяющей 5 и 6 домены церулоплазмينا, с входом в гемовый карман Мро [65]. Данная петля расщепляется сериновыми протеиназами, участвующими в воспалительных процессах, например, при ревматоидном артрите ингибирование активности тромбина с помощью гирудина способствовало сохранению целостности полипептидной цепи церулоплазмينا и эффективно подавлению активности Мро в синовиальной жидкости [66, 67]. Любопытно, что церулоплазмин эффективно подавляет только хлорирующую активность Мро [68], но не окисление бромида и тиоцианата [69]. Заметим, что Мро и церулоплазмин могут образовывать и более сложные комплексы, включающие апо-В-100-содержащие липопротеины [70], при этом тиоцианат может выступать вместе с церулоплазмином, в качестве агента, снижающего опосредованную Мро проатерогенную модификацию липопротеинов низкой плотности [71]. Важно отметить, что как церулоплазмин, так и мажорный белок плазмы крови альбумин могут подвергаться окислительной модификации под действием Мро [72], а в присутствии цистеина церулоплазмин может обеспечивать генерацию пероксида водорода, необходимого для проявления галогенирующей активности Мро [73]. Учитывая, что альбумин, модифицированный НОС1 либо НОВг, является праймирующим агентом, вызывающим экзоцитоз Мро из нейтрофилов [74], перспективным направлением исследований является изучение последствий окислительных и других видов модификаций белков на активность нейтрофилов. Недавно было показано, что альбумин, модифицированный метилглицалем, продуктом неферментативного окисления глюкозы, образует чрезвычайно прочный комплекс с Мро, экранируя ее антигенные эпитопы и таким образом приводя к артефактно низкому результату определения Мро при иммуноферментном анализе [75]. С учетом возможности регистрации ферментативной активности Мро с помощью флуоресцирующих хемосенсоров [76] и тем обстоятельством, что ее активность в отношении бромида и тиоцианата практически не подавляется эндогенным ингибитором, требуют разработки подходы, которые бы комбинировали иммуносорбцию Мро с последующим выявлением (псевдо)галогенирующей активности фермента.

III. ПОДХОДЫ К ИССЛЕДОВАНИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ ГАЛОГЕНОВ

МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ МПО И АКТИВНЫХ ФОРМ ГАЛОГЕНОВ В СИСТЕМАХ *IN VITRO*

Активные формы галогенов – короткоживущие и чрезвычайно реакционноспособные соединения, что существенно осложняет их детекцию в живых системах. Считается, что количество миелопероксидазы в исследуемых образцах отражает активность данного фермента. В связи с этим предположением разработано достаточно большое количество методов оценки именно этого параметра в условиях *in vitro*. Самыми широко применяемыми являются оптические методы, в которых используются низкомолекулярные вещества, являющиеся мишенями активных форм галогенов. Так, например, взаимодействие хлорноватистой кислоты с таурином с образованием N-хлоротаурина (NCT), используют для определения хлорирующей активности миелопероксидазы и, следовательно, для определения продукции хлорноватистой кислоты [77]. Концентрацию полученного соединения оценивают колориметрически, так как при взаимодействии NCT с анионом иода происходит образование иодноватистой кислоты, которая окисляет 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМВ) до продукта голубого цвета, который поглощает свет на длине волны 650 нм. Дополнительным преимуществом применения ТМВ является то, что данное соединение напрямую окисляется бромаминами в отсутствие ионов иода [78], следовательно, с его помощью можно оценивать не только хлорирующую, но и бромлирующую активность Мро.

Помимо колориметрических методов на практике также применяют флуориметрические подходы к измерению продукции активных форм хлора. Для этого используют два соединения – 2-[6-(4-гидрокси)фенокси-3Н-ксантен-3-он-9-ил]бензойной кислоты (НРФ) и 2-[6-(4-амино)фенокси-3Н-ксантен-3-он-9-ил]бензойной кислоты (АРФ), которые чувствительны к ряду окислителей, в частности, к гидроксил-радикалу и пероксинитриту, но только АРФ взаимодействует с HOCl , превращаясь в флуоресцеин, имеющий пик эмиссии при длине волны 520 нм [79]. Для того оценки продукции хлорноватистой кислоты используют отношение эмиссии АРФ/НРФ.

Активно применяемым на практике методом выявления галогенирующей (или функциональной) миелопероксидазы является регистрация хемилюминесценции. Чаще всего для этих целей используют люминол и подобные ему соединения. Хемилюминесценция возникает в результате взаимодействия люминола с продуктами активности Мро

[80, 81]. Однако существенным недостатком данного метода в контексте изучения именно галогенирующего стресса является то, что кроме RHS люминол взаимодействует и с другими сильными окислителями – активными формами кислорода и азота, которые также образуются в результате работы MPO [81, 82]. Однако в медицинской практике, например, для диагностики активности миелопероксидазы в плазме крови, активно используют подобную технику и усовершенствуют применяемые вещества. Так предлагается использовать L-012, являющийся аналогом люминола, но более чувствительным субстратом, обеспечивающим более интенсивное свечение [83]. Кроме того, для повышения интенсивности регистрируемого сигнала рекомендуют использовать молекулы, участвующие в резонансном хемилюминесцентном переносе энергии в качестве акцепторов. Одним из таких веществ является флоксин В, добавление которого в систему люминол-гипохлорит сдвигает максимум эмиссии хемилюминесценции с 431 до 595 нм [84]. Авторы исследования предлагают использовать данный метод для регистрации гипохлорита в водных растворах.

Альтернативным способом измерения активности MPO и концентрации активных форм галогенов является использование электрохимических методов. Например, описано применение платинового электрода для определения количества $HOCl$ [85] в воде. Также активно разрабатываются электрохимические молекулярные платформы, которые применяют не только в растворах, но и в живых клетках, например, на основе тиокарбамата аминокферроцена [86], который представляет собой редокс-репортер аминокферроцен (AF), соединенный через гидроксibenзиловый спирт с диметилтиокарбаматным триггером. Вследствие специфического взаимодействия диметилтиокарбамата с $HOCl$ происходит демаскировка AF. Данный инструмент продемонстрировал высокую селективность для лабораторных образцов, а также был протестирован на макрофагах.

Однако несмотря на то, что существует довольно большое количество различных методов детекции активности MPO и продуктов ее работы, демонстрирующие достаточно высокую селективность и чувствительность, примеры которых были приведены выше, применение большинства из них для биологических систем оказалось весьма затруднительным. В первую очередь это связано со сложной организацией живых организмов и большим количеством конкурирующих биохимических взаимодействий. Так как было описано выше, показано ингибирование активности миелопероксидазы, причем как галогенирующей, так и пероксидазной, церулоплазмином [87]. Кроме того, сами циклы фермента конкурируют друг с другом,

и в физиологических условиях образуются не только активные формы галогенов, но и активные формы кислорода и азота [88]. Таким образом, для работы с живыми системами и эффективного исследования участия активных форм галогенов в норме и патологии необходимо разрабатывать альтернативные способы их детекции.

МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ МРО И АКТИВНЫХ ФОРМ ГАЛОГЕНОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ

Одним из методов, позволившим установить роль гипогалоидных кислот в патогенезе ряда заболеваний, например, атеросклероза [89], является хроматография с масс-спектрометрией. При развитии галогенирующего стресса возникает большое количество галогенаминов белков, которые, как и сами активные формы галогенов, обладают малым временем жизни. Однако остатки хлортирозина могут быть идентифицированы в белковой фракции исследуемых образцов тканей [90]. Несмотря на широкую распространенность данного метода, он не может являться универсальным, так как в живых клетках существуют соединения, которые также являются мишенями для HOCl , причем они подвергаются модификации с более высокими скоростями, например, остатки метионина, цистеина и аминокислоты белков [91], что существенно снижает чувствительность метода. Кроме того, хлортирозин может подвергаться дальнейшим превращениям: дегалогенироваться и переходить в другие соединения, например, в дихлортирозин [92,93]. Чтобы нивелировать недостатки метода, описанного выше, в ряде работ использовали такой синтетический субстрат HOCl , как гидроэтидин, так как он обладает более высокой константой скорости реакции с активными формами хлора, чем иные мишени, присутствующие в клетке. Кроме того, продукт взаимодействия гидроэтидина с хлорноватистой кислотой – 2-хлорэтидий, не возникает в результате никаких иных реакций, следовательно, может быть использован для оценки образования HOCl в ткани [94, 95]. Так было показано, что животные модели могут быть успешно применены для исследования развития атеросклероза, хотя ранее было выдвинуто обратное предположение на основании того, что у модельных животных не получалось зарегистрировать остатки хлортирозина. К маркерам галогенирующего стресса, которые могут быть обнаружены масс-спектрометрическим методом, также относятся продукты окисления плазмалогенов – хлорированные и бромированные длинноцепочечные альдегиды, образующиеся в результате реакции по винил эфирной связи в $sn-1$ положении, в последствии превращающиеся в соответствующие спирты и карбоновые кислоты

[96, 97]. Плазмалогены широко представлены в мембранах лейкоцитов, эндотелиальных клеток, гладкомышечных и сердечных клетках, а также в нейронах, а их галогенированные производные обнаруживают во время развития различных патологических состояний, например, в активированных нейтрофилах и моноцитах человека, в сердечной мышце после инфаркта миокарда и в атеросклеротических бляшках [98]. Методы масс-спектрометрии обладают несомненными преимуществами, например, легкостью масштабирования и, следовательно, возможностью исследовать большое количество образцов, но не дают информации о локализации процессов на клеточном уровне.

Другим методом детекции активных форм галогенов в биологических образцах является применение антител, способных распознавать модифицированные галогенами белки. К настоящему времени разработан ряд белков, способных выполнять данные функции. Первым разработанным моноклональным антителом, способным распознавать липопротеины низкой плотности (LDL), модифицированные НОС1, стал белок НОР-1 [99]. Другим коммерчески доступным и применяемым в исследованиях является антитело 2D10G9 [100]. С его помощью было установлено, что во время беременности в норме в плаценте синтезируются активные формы хлора, что приводит к появлению модифицированных белков, однако не во время первого триместра [101], было показано модифицирование внеклеточного матрикса в гладкой мышечной ткани продуктами активности миелопероксидазы [102], а также установлено влияние Мро и появление галогенированных белков в глимфатической системе мышечной при моделировании болезни Паркинсона [103]. Кроме модифицированных LDL выявляют также и галогенированные липопротеины высокой плотности (HDL), так как считается, что именно HDL обладают кардиопротекторными свойствами. Так, например, активно ведутся разработки моноклональных антител против хлортирозина в положении 192 в белке ApoA1 [104, 105]. Авторы предполагают, что они могут быть использованы для диагностики сердечно-сосудистых заболеваний, однако пока они коммерчески недоступны. Для детекции хлорпроизводных создано больше инструментов, чем для выявления продуктов взаимодействия с другими активными формами галогенов, например, НОВг. Однако ведутся разработки и в этом направлении. Основной целью является создание антител, специфичных для выявления монобромтирозина и дибромтирозина – основных производных, образующихся *in vivo* [106], являющихся маркерами активности эозинофилов [107]. Определенные успехи достигнуты в производстве антител только

против 3,5-дибромтирозина [108, 109], в то время как инструмента, способного выявлять только 3-бромтирозин, на данный момент еще не существует. Так, например, коммерчески доступное антитело ВТК-94С с большей эффективностью связывается с моно- и дибромтирозинами и в меньшей степени с хлортирозинами, и может быть использовано для исследования активности эозинофильной пероксидазы эозинофилов и окислительных реакций, протекающих с участием НОВг, в образцах пациентов, страдающих от астмы [110].

Перечисленные методы уже доказали свою эффективность и помогли пролить свет на процессы и механизмы, лежащие в основе патогенеза различных заболеваний, однако они обладают очевидным недостатком – невозможностью анализировать образцы *in vivo* в режиме реального времени. Исследование развития галогенирующего стресса в динамике позволит разработать эффективные методы предотвращения повреждений и эффективной терапии связанных с ним заболеваний, следовательно, возникает необходимость создания соответствующих инструментов.

МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ МРО И АКТИВНЫХ ФОРМ ГАЛОГЕНОВ *IN VIVO*

К активно разрабатываемым для клинической практики методам изучения галогенирующего стресса *in vivo* следует отнести технологии, основанные на принципах ядерной физики, – магнитно-резонансной (MRI) и позитронной эмиссионной томографии (PET). Так, например, для неинвазивной визуализации работы Мро при инфаркте миокарда методом MRI предлагают использовать контрастное вещество на основе GdDOTA, ковалентно связанного с серотонином (3-(2-аминоэтил)-5-гидроксииндол), которое эффективно олигомеризуется в присутствии активного фермента, что приводит к увеличению протонной релаксации на 70–100% [111, 112]. На данный момент разработана целая палитра контрастных веществ, работающих по выше описанному принципу, – МРО-Gd (bis-5-НТ-Gd-DТРА) [113], Gd-5-НТ-DOTAGA [114] и heMAMP [115]. Последнее появилось сравнительно недавно и отличается большей стабильностью и меньшей цитотоксичностью по сравнению с применяемыми ранее. Для PET также разработана метка для визуализации активной Мро – ¹⁸F-MAPP [116], плюсом которой является способность проникать через гематоэнцефалический барьер. Ранее считалось, что перечисленные метки не способны проникать в клетки и с их помощью можно зарегистрировать только сигнал от внеклеточной миелопероксидазы. Однако весной 2023 года появи-

лись данные о том, что ^{18}F -МАРР все же может применяться для внутриклеточного обнаружения активной МПО [117]. Основным минусом данных технологий является то, что олигомеризация агентов происходит не исключительно за счет формирования активных форм галогенов, но и во время пероксидазного цикла работы фермента [118], следовательно, они не могут быть использованы для изучения именно галогенирующего стресса. В связи с этим встает вопрос о селективных индикаторах для *in vivo* визуализации активных форм галогенов. Ежегодно появляется информация о создании десятков различных низкомолекулярных флуоресцентных красителей, изменяющих свои оптические свойства при окислении RNS. Такой подход достаточно популярен вследствие небольшого размера молекул и сравнительно низкой цитотоксичности.

IV. КЛАССИФИКАЦИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ СИНТЕТИЧЕСКИХ ИНДИКАТОРОВ АКТИВНЫХ ФОРМ ГАЛОГЕНОВ

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ЗОНДЫ

Применение синтетических низкомолекулярных флуоресцентных красителей в последние десятилетия внесло существенный вклад в развитие методов прижизненного исследования различных физиологических и биохимических процессов. Существуют различные классификации таких инструментов, в том числе и тех, что разработаны специально для визуализации развития галогенирующего стресса. Так, например, их можно разделять по характеру изменения флуоресцентного сигнала:

1. Зонды, флуоресцентный сигнал которых затухает при появлении целевого соединения (аналита) [119];
2. Зонды, флуоресцентный сигнал которых усиливается при появлении целевого аналита [120–122];
3. Зонды, флуоресцентный сигнал которых является ратиометрическим, то есть при появлении целевого вещества происходит сдвиг спектра возбуждения или эмиссии флуоресценции. В данном случае возможны следующие варианты:
 - краситель имеет два пика возбуждения и один пик эмиссии, тогда при появлении аналита происходит изменение соотношения интенсивностей флуоресценции, возбужденной разными длинами волн;
 - краситель имеет один пик возбуждения и два пика эмиссии, тогда при появлении целевого соединения происходит изменение соотношения интенсивностей флуоресценции, регистрируемых на разных длинах волн [123].

Интересно, что большинство разрабатываемых красителей относится ко второму и третьему типу, в то время как зонды для выявления активных форм галогенов с затухающим флуоресцентным сигналом встречаются существенно реже.

Принципы работы флуоресцентных зондов могут быть различными. Достаточно большое количество существующих красителей основано на принципе Фёрстеровского резонансного переноса энергии (FRET), осуществляемого между двумя хромофорами, один из которых является донором, а другой акцептором, без испускания кванта света через диполь-дипольное взаимодействие [124–126]. При этом эффективность данной технологии зависит от степени перекрытия спектров эмиссии донора и поглощения акцептора. Другим применяемым принципом является также безизлучательный перенос энергии через связь (TBET), отличающийся от FRET наличием жесткого электронно-сопряженного π -линкера, в качестве которого могут выступать, например, фенильные группы [123]. Несомненным преимуществом данных зондов является их независимость от степени перекрытия спектров эмиссии и возбуждения донора и акцептора. Фотоиндуцированный перенос электронов (PeT) – еще один вариант, на базе которого разрабатывают зонды для изучения галогенирующего стресса [127]. PeT пробы, как правило, состоят из трех основных компонентов: флуорофора, линкера и распознающей группы. Различают два механизма работы PeT зондов в зависимости от направления переноса электрона – a-PeT и d-PeT. В первом случае электрон переносится от распознающей группы к флуорофору, а во втором случае наоборот. Следовательно, такой подход может быть использован как для разработки красителей с затухающей флуоресценцией, так и с усиливающейся флуоресценцией при появлении исследуемого вещества в системе [128]. Внутримолекулярный перенос заряда (ICT) также применяется в зондах для детекции активных форм галогенов [126, 129]. Принципиальным отличием данного подхода является то, что перенос заряда осуществляется между частями одной молекулы, когда одна является донором, а другая акцептором. В результате переноса происходит существенное изменение дипольного момента и, как следствие, значительный сдвиг спектра флуоресценции относительно поглощения. При этом в большинстве красителей реализован метод фотовозбуждения ICT (FICT), что придает этим соединениям свойство положительного сольватохромизма, в то время как многие красители демонстрируют отрицательный сольватохромизм, что подразумевает наличие обратного переноса заряда (BICT), который исследован

существенно хуже [130]. Кроме того, важным оказывается не только направление переноса заряда, но и конфигурация самой молекулы. Уже более полувека назад описано явление внутримолекулярного переноса заряда с изменением конфигурации (ТИСТ), на базе которого начинают создавать красители для выявления гипохлорита [131]. Зонд ВСу-S синтезирован на основе бензогемицианинового хромофора и тиоморфолиновой группы. В качестве распознающего НОСІ домена выступает аминоксодержащий хромофор, донором заряда служит тиоморфолиновая группа, а акцептором – бензогемицианиновая часть молекулы. В отсутствие аналита наблюдается слабая флуоресценция, в то время как при его появлении происходит окисление атома серы до сульфоксида, что вызывает конформационную перестройку, усиление оттягивания электронной плотности, повышение эффективности излучения флуорофора и появлению интенсивного красного флуоресцентного сигнала. Однако помимо переноса отрицательного заряда существует механизм внутримолекулярного переноса протона (ESIPT), на базе которого также разработаны флуоресцентные инструменты для изучения активных форм галогенов [132]. Такой перенос может быть реализован, если в молекуле возможно взаимодействие между донором ($-\text{OH}$ и NH_2) и акцептором водородной связи ($=\text{N}-$ и $\text{C}=\text{O}$) [133]. Упомянутые выше механизмы могут быть использованы и в различных сочетаниях друг с другом, что открывает дополнительные возможности для создания палитры индикаторов.

Другой вариант классификации низкомолекулярных синтетических зондов учитывает тип флуорофора, на базе которого создан инструмент. Среди всех биологически значимых активных форм галогенов наиболее изученным является НОСІ. Именно для нее и ее производных создано наибольшее количество флуоресцентных красителей. Флуоресцентным ядром для них служат флуоресцеин, кумарин, феноксазин, родамин, BODIPY, 1,8-нафталимид и другие соединения. Подробный разбор таких красителей и принципов их работы был представлен в 2022 году в обзорной статье Реут и соавторов [134], поэтому мы не будем останавливаться на данной классификации.

Для других активных форм галогенов также существуют зонды, применяемые для изучения процессов, протекающих в живых системах. Так, например, для исследования гипобромита разработан индикатор ВРР [135], синтезированный из о-броманилина и о-(метилтио)-фенилбороновой кислоты. В присутствии НОВг происходит быстрая реакция циклизации между аминогруппой и S-метильной группой

молекулы зонда, что приводит к возникновению флуоресценции в красной области спектра. Также совсем свежий зонд – PVE–NOBr на основе бензотиазолина, работающий по принципу PeT, был протестирован на культуре клеток и на излюбленном лабораторном объекте *Danio rerio* [136]. Интересная классификация красителей для выявления гипобромита предложена в обзорной статье Fang и Dehaen [137]. Она основана на типе химической реакции, которые протекают с участием NOBr.

Отдельный интерес представляет не просто интегральная регистрация присутствия активных форм галогенов в живой системе, а исследование их появления и распространения по компартментам клетки. К настоящему моменту разработаны зонды, локализующиеся практически во всех органеллах. Коммерчески доступный индикатор – FHZ, синтезированный на основе флуоресцеина, имеет цитоплазматическую локализацию, однако способен не специфически проникать в митохондрии (HY-U00440, MedChemExpress). Кроме того, данный зонд способен визуализировать еще и гидроксильный радикал ($\cdot\text{OH}$), так как обладает двумя пиками возбуждения – 410 нм для пробы, в которой присутствует гидроксильный радикал, и 490 нм для проб с гипохлоритом. Данное свойство является уникальным, так как обычно продукты взаимодействия неселективных зондов с различными веществами обладают неотличимыми оптическими свойствами. Так как активные формы галогенов, например, NOCl и NOBr, синтезируются преимущественно в клетках, способных к фагоцитозу, то локализация красителей в лизосомах является закономерной. Существуют не только зонды, являющиеся разработками исключительно лабораторий, такие как ратиометрический краситель на основе родамина и имидазо-[1,5- α]-пиридина, работающий по принципу FRET [125], но и коммерчески доступные, например, BioTracker LYSO-TP Live Cell Dye (SCT044, Sigma Aldrich) на основе ацедана. При взаимодействии с NOCl происходит реакция с оксатиолановой/меркапталльной группой и демаскировка кетона, что приводит к усилению флуоресцентного сигнала [138]. BioTracker TP-NOCl1 Live Cell Dye (SCT043, Sigma Aldrich) стал прародителем не только выше упомянутого инструмента, но и красителя, визуализирующего активные формы хлора в митохондриях [138]. В контексте активных форм кислорода митохондрии являются областью повышенного интереса, не стали исключением и зонды, разработанные для детекции галогенирующего стресса. Например, PMN–TRP – колориметрический и ратиометрический флуоресцентный зонд, таргетирующий митохондрии [139], или интересная пара

интенсиометрических флуоресцентных зондов на основе кумарина – L1 и L2 (контрольный зонд для молекулы L1). Для данной пары зондов интересно то, что они работают по разным механизмам: зонд L1 по механизму затухания флуоресценции в голубом диапазоне спектра, а L2 – возникновения флуоресценции в красном диапазоне спектра [140]. Так же на основе смеси кумарина, родамина и имидазола создан зонд RIC, способный реагировать на наномолярные концентрации гипохлорита в митохондриях в режиме реального времени, а также не чувствительный к колебаниям pH в пределах физиологического диапазона, описанного для этих органелл [141]. Также существуют зонды с локализацией в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР), например, RHE [142] и ER-NPA [143]. RHE синтезирован на основе родамина и 2-(2-гидроксифенил) бензотиазола (НВТ) и работает по принципу ESIPT. В то время как в дизайне ER-NPA использовали 4-гидрокси-1,8-нафталимида в качестве флуорофора, п-аминофениловый эфир в качестве распознающего рецептора и метилсульфон-амид в качестве сигнала импорта в ЭПР. С помощью этого зонда удалось визуализировать экзогенный и эндогенный гипохлорит в ЭПР *Danio rerio*.

Разрабатываемые красители чаще всего тестируют на культурах клеток, однако за последние годы накопилось большое количество данных, показывающих, что такая система не является абсолютно репрезентативной и результаты, получаемые в подобных экспериментах, впоследствии могут противоречить данным, полученным в условиях *in vivo* [144, 145]. В связи с этим особый интерес представляют именно зонды, протестированные не только на клетках, но и на живых организмах, таких как *Danio rerio*, *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster* и других [146–149]. Большая часть красителей, так и не проходит проверку в моделях *in vivo*, возможно это связано с трудоемкостью процесса верификации корректной работы вещества в организме животных, в связи с ограниченной способностью проникновения в ткани крупных, как правило, не полярных молекул, а также из-за существенной длительности развития ответа индикатора на появление в среде активных форм галогенов [140, 150]. Дополнительные ограничения на использование низкомолекулярных зондов *in vivo* вносит сильное перекрытие их спектров поглощения и испускания [151], а также помех, которые вносят окружающие ткани. Многие индикаторы представляют собой гидрофобные молекулы, что затрудняет их диффузию в водных растворах и проникновение в ткани. В связи с чем разрабатывают нетривиальные подходы к работе с неполярными пробами. Так, например, основой работы зонда

ТРЕ, созданного на основе тетрафенилэтилена, является эмиссия, индуцированная агрегацией гидрофобных молекул в наночастицах, и для ее функционирования необходимо окружение молекулами поверхностно-активного вещества [152]. Однако при инкубации малька *Danio rerio* в растворе с ТРЕ, краситель не проникает дальше органов пищеварительной системы, видимо, из-за своей природы, вещество не может диффундировать сквозь стенку кишечника в кровеносную систему. Стоит добавить, что набор тестов для исследования работы зондов *in vivo* крайне ограничен. Как правило, используется один из следующих подходов. Эксперименты проводят на прозрачных объектах, например мальках *Danio rerio* на ранних стадиях развития, которые инкубируют в растворе с красителя [135], после чего объект переносят в чистую воду/среду, в которую добавляют агенты, инициирующие воспалительные процессы. Если же исследование проводят на непрозрачных организмах, то чаще всего используют модель воспаления с применением липополисахаридов (LPS), либо лямбда-карагинана, а зонд вводят подкожно/интракарпально/внутрибрюшинно. Нередко работу индикатора проверяют при непосредственной инъекции ClO^- в ткани, в которые ранее был инъецирован зонд [149].

Красители, разрабатываемые для использования в моделях *in vivo*, чаще всего создаются на базе молекул, флуоресценция которых возбуждается светом ближнего инфракрасного диапазона, поскольку именно он обладает большей глубиной проникновения и менее повреждающим действием. Альтернативным подходом, который также достаточно активно реализуется, является разработка индикаторов, которые могут быть исследованы при помощи двухфотонной микроскопии [143].

Несмотря на то, что палитра низкомолекулярных синтетических индикаторов активных форм галогенов пополняется ежегодно, все же такие инструменты обладают рядом недостатков. Так, например, большая часть зондов является интенсификационными, а следовательно, подвержены артефактам, связанным с характером распределения красителя в организме, автофлуоресценцией тканей и т.д. Кроме того, для большинства флуоресцентных красителей не установлены кинетические параметры взаимодействия с активными формами галогенов, поэтому вопрос об их способности конкурировать с биологическими мишенями за аналиты остается открытым. Также в результате взаимодействия зонда и целевых молекул могут образовываться продукты, влияние которых на метаболические пути в живых организмах не изучено [153]. Очень многие красители не

являются абсолютно селективными и реагируют на другие молекулы, например, активные формы кислорода или азота. И даже те индикаторы, которые являются коммерчески доступными, крайне редко используются для решения реальных биологических вопросов. В связи с этим необходимо искать новые подходы для изучения галогенирующего стресса *in vivo*, которые бы не обладали такими недостатками. Применение генетически кодируемых сенсоров на основе флуоресцентных белков представляется одним из возможных способов решения проблемы. Так как данные инструменты являются белковыми молекулами и обладают рядом уникальных свойств: чаще всего характер их ответа на присутствие аналита носит обратимый характер; отличаются высокой селективностью и низкой цитотоксичностью, могут быть локализованы в определенных типах клеток, или органеллах. С помощью генетически кодируемых сенсоров можно получать линии трансгенных организмов и за счет этого повысить воспроизводимость результатов исследования.

ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЕ СЕНСОРЫ

Генетически кодируемые сенсоры – инструменты для визуализации самых разнообразных событий как *in vitro*, так и в живых системах, от колебания концентраций исследуемых химических веществ до изменения физических параметров клетки, созданы на основе белковых молекул и разнообразны в своей архитектуре, а значит, в основных принципах детекции событий и генерации регистрируемого сигнала. По нашему мнению, классификация таких сенсоров с опорой на архитектуру индикатора, является достаточно логичной и полной.

В общем случае генетически кодируемые биосенсоры состоят из репортерного (флуоресцентного белка) и сенсорного модулей, то есть являются белковыми химерами. В частном случае в качестве самостоятельных инструментов могут быть использованы отдельные флуоресцентные белки, чувствительные к некоторым параметрам окружающей среды, например pH, температуре или концентрации определенных ионов. Флуоресцентные белки, представляющие собой полноценный биоиндикатор, можно вынести в отдельную категорию. Примером таких инструментов являются оптимизированные версии классического зеленого флуоресцентного белка (GFP), составляющие семейство pHluorin широко используются в качестве сенсоров pH среды в разных клеточных компартментах [154]. Другой пример такого инструмента, состоящего только из флуоресцентного модуля – CatchER. Этот сенсор разработан для регистрации колебания концентрации кальция в люмене гладкого эндоплазматического рети-

кулума. Он состоит только из молекулы EGFP с модифицированной поверхностью. Непосредственно на поверхности бета-бочонка расположен сайт связывания иона кальция [155]. Этот индикатор открыл возможность мониторинга быстрой динамики кальция в саркоплазматическом ретикулуме возбудимых клеток, значительно углубив представления о физиологии их сокращения [156].

Различные оптимизации поверхности флуоресцентных белков, безусловно, расширяют сферу их применения в качестве биоиндикаторов, однако наибольшего разнообразия событий, которые можно зарегистрировать с их помощью, можно добиться, сочетая флуоресцентные белки с разными свойствами с различными сенсорными модулями. Таким образом, генетически кодируемые сенсоры можно представить как конструктор, при замене элементов которого получаются совершенно новые инструменты. Далее мы рассмотрим примеры именно таких сенсоров, содержащих и сенсорные и репортерные модули. Принцип работы таких инструментов основан на конформационной перестройке сенсорного модуля в ответ на появление целевого события – селективное связывание лиганда или окисление ключевых аминокислотных остатков, которое оказывает влияние на оптические характеристики репортерного модуля. Это может быть реализовано по принципу FRET, как, например, в NADPsof, сенсоре для измерения концентрации NADP⁺ в клетке, представляющем собой кетопантоат-редуктазу, расположенную между FRET-парой – голубым и желтым флуоресцентными белками [157], и в Myo-mCherry, являющемся белковой химерой миоглобина и красного флуоресцентного белка mCherry [158]. Этот инструмент чувствителен к молекулярному кислороду и позволяет визуализировать и картировать оксигенацию единичных клеток [158, 159]. Другой вариант основан на том, что конформационная перестройка сенсорного модуля может индуцировать перестройку в флуоресцентном ядре, сопровождающуюся изменением белкового окружения хромофора, которое в значительной степени влияет на его оптические свойства [160–162]. При создании инструментов, работающих по данному принципу, исследователи сталкиваются со следующими сложностями – хромофор расположен в альфа-спирали, хорошо защищенной окружающими бета-структурами от окружающей среды, и потому демонстрирует высокую стабильность в отношении повреждающих факторов [163, 164], что осложняет использование зависимости оптических свойств флуоресцентных белков от микроокружения хромофора. Однако в 1999 году Doi и Yanagawa обнаружили, что интеграция конформационно-подвижного

полипептида в область GFP, контактирующую с хромофором, может привести к сопряжению оптических свойств конструкции и параметров окружающей среды [165]. Авторы интегрировали TEM1 β -лактамазу (Bla-1), которая способна взаимодействовать с ингибиторным белком (BLIP) и изменять свою пространственную укладку, между 172-им и 173-им остатками. После двух раундов случайного мутагенеза была получена функциональная проба под названием GFP::Bla-1. Это послужило первым доказательством того, что даже небольшие конформационные перестройки могут быть эффективно сопряжены с оптическими параметрами флуоресцентных белков. В том же году на базе данного принципа был создан индикатор ионов кальция Camgargo, который был получен путем интеграции кальмодулина после тирозина 145 в EYFP [166]. Этот сенсор стал родоначальником целого семейства инструментов с подобной топологией: Camgargo-2 для детекции Ca^{2+} [167], Flamindo [168], Flamindo2 [169] и Pink Flamindo [170] для детекции cAMP и многие другие.

Дальнейший толчок к развитию подобных индикаторов дала разработка круговых пермутантов флуоресцентных белков (cpFPs). Круговая пермутация – химическая модификация первичной структуры белка, в рамках которой исходные концы молекулы соединяют линкером достаточной длины, а новые терминальные группы выносят в произвольное положение [171]. Главным преимуществом круговых пермутантов над классическими флуоресцентными белками является «дестабилизированное» состояние, благодаря чему они могут быть напрямую интегрированы в конформационно подвижные регионы белков интереса. Таким образом, микроокружение хромофора становится особенно чувствительным к конформационным перестройкам, происходящим в сенсорном модуле. Индикаторы с такой топологией обладают множеством достоинств: уникальная амплитудность ответа, малый молекулярный вес и достаточно узкие оптические окна. Все это делает их одним из наиболее перспективных классов генетически кодируемых инструментов. Однако и они не лишены ряда существенных недостатков. В частности, многие инструменты из этой группы демонстрируют чувствительность к pH среды, которая является потенциальным источником артефактов во время регистрации сигнала *in vivo*. Более того, дестабилизированная по сравнению с нативными флуоресцентными белками структура cpFP замедляет их созревание [166].

Генетически кодируемые флуоресцентные сенсоры на основе cpFP, несмотря на перечисленные недостатки, активно и плодотворно применяются при исследовании окислительно-восстановительных

процессов *in vivo*. Их изучение является сложной задачей из-за множества факторов, которые могут повлиять на редокс-процессы, включая факторы окружающей среды, метаболические процессы и клеточные сигнальные пути. Кроме того, окислительно-восстановительные процессы включают перенос электронов между молекулами, который трудно измерить и контролировать в режиме реального времени традиционными методами. Биоиндикаторы являются наиболее подходящим инструментом для изучения окислительно-восстановительных событий в живых клетках, так как позволяют отслеживать эти процессы с высоким пространственно-временным разрешением. Одним из ключевых преимуществ использования генетически кодируемых сенсоров является их неинвазивность. В отличие от традиционных методов, которые требуют добавления экзогенных химических веществ или зондов в среду или загрузку непосредственно в клетку, биосенсоры, будучи белковыми молекулами, могут экспрессироваться непосредственно в самой клетке, сводя к минимуму потенциальные артефакты или нарушение нормальных клеточных процессов. Активные формы галогенов, как было описано выше, являются сильными окислителями, следовательно и для их визуализации в живых организмах могут быть успешно применены генетически кодируемые сенсоры.

ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЕ СЕНСОРЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ГАЛОГЕНИРУЮЩЕГО СТРЕССА

Основной проблемой при разработке качественного биоиндикатора является проблема селективности, она также актуальна для сенсоров, визуализирующих окислительно-восстановительные процессы с участием соединений, обладающих высоким редокс потенциалом. В живых системах возможна продукция целого ряда сильных окислителей, способных неспецифически реагировать с аминокислотными остатками, в том числе имитируя целевой ответ сенсора. Проблема селективности, по всей видимости, является одной из причин малого разнообразия белковых индикаторов галогенирующего стресса.

На сегодняшний день в литературе описан лишь один генетически кодируемый сенсор, селективно взаимодействующий с активными формами галогенов [172]. Данный инструмент увидел свет только в 2022 году. Тем не менее, ранее также были предприняты попытки создания белковых инструментов, позволяющих исследовать динамику гипогалоидных кислот. В 2016 году впервые был сконструирован сенсор редокс-статуса пула бациллотиола (BSH), BxH-roGFP2, представляющий собой белковую химеру бациллиредоксина и roGFP2,

зеленого флуоресцентного белка с модифицированной поверхностью, чувствительного к окислению и восстановлению [173]. roGFP2 содержит на поверхности два остатка цистеина, которые способны окисляться с образованием дисульфидной связи, что ведет к изменению конформации и оказывает влияние на оптические свойства хромофора. С помощью Brg-roGFP2 была исследована динамика окислительного стресса в клетках *Staphylococcus aureus*. При этом было обнаружено, что индикатор выражено реагирует на экзогенные добавки как пероксида водорода, так и NaOCl, при этом сопоставимые ответы наблюдаются при гораздо более низких концентрациях последнего соединения. Более того, добавка NaOCl исключает либо значительно задерживает восстановление сигнала. Так, для достижения базовых значений после добавления гипохлорита натрия концентрацией до 20 мкМ требуется не менее двух часов, тогда как после добавления 10 мМ H₂O₂ необходим лишь один час. Также было установлено, что NaOCl вызывает масштабное S-бациллитолирование белков бактерии. В другом эксперименте при визуализации флуоресценции Brg-roGFP2 в клетках *S. aureus* методом конфокальной микроскопии до и после инициирования галогенирующего стресса была зарегистрирована динамика NaOCl- и BSSB-опосредованного окисления индикатора.

В работе, посвященной исследованию редокс-метаболизма *Corynebacterium glutamicum*, микроорганизма, служащего важным промышленным источником L-глутамата и L-лизина [174], был использован инструмент Mrg1-roGFP2 также на основе roGFP2, слитого с микотиолредуктазой (Mrg). В основном была изучена роль антиоксидантных систем в поддержании редокс-статуса микотиола (MSH) как в норме, так и в условиях окислительного стресса [175]. Было установлено, что динамика ответа индикатора на высокие концентрации пероксида водорода в основном зависит от доступности активных каталаз, при этом такой зависимости не наблюдается для MSH-зависимых пероксидаз. Также было продемонстрировано, что даже низкие концентрации NaOCl (0,5 мМ) приводят к необратимому окислению использованного сенсора. В то же самое время сигнал индикатора возвращался в исходное состояние через час после обработки 40 мМ H₂O₂ [175]. Кроме этого, в тестах *in vitro* Mrg1-roGFP2 проявлял даже большую чувствительность к NaOCl, нежели сам roGFP2. Однако в ряде работ, было показано, что roGFP2 и родственные ему инструменты обладают высокой чувствительностью к целому ряду окислителей – гипогалогенным кислотам, полисульфидам и пероксинитриту [173, 176,

177], следовательно, не являются селективными и не подходят для изучения галогенирующего стресса.

В последнее время большое внимание уделяется редокс-опосредованным модификациям цистеина, так как он является одной из основных мишеней для различных окислителей. Однако часто продукты окисления тиолов обладают достаточно малым сроком жизни, что накладывает определенные ограничения для их детекции. В то же время метионин является привлекательной мишенью, например, для активных форм кислорода и хлора. Образующиеся в результате соединения более стабильны, чем продукты окисления тиолов. В связи с этим есть предположение, что они могут служить более эффективными маркерами окислительного стресса *in vivo* [178]. В клетках метионин присутствует в свободном (fMet) и интегрированном в белок состоянии (pMet). Обе субпопуляции могут окисляться до сульфоксида метионина (MetO), который представляет собой смесь S- и R-диастереомеров [179]. На сегодняшний день известны два типа ферментов – MsrA и MsrB, которые способны взаимодействовать с этими соединениями и восстанавливать их в процессе внутримолекулярного образования дисульфидных связей. Далее окисленные белки распознаются тиоредоксиновой системой (Trx) и возвращаются в исходное состояние [180]. В 2022 году был разработан новый сенсор, визуализирующий окисление метионина в живых системах – GERMO [180]. Этот инструмент создан на основе sEGFP, супер-фолдингового зеленого флуоресцентного белка с усиленной флуоресценцией, из которого удалили цистеин 48 – возможный источник нежелательных окислительно-восстановительных реакций, а в непосредственную близость к хромофору внесли остаток метионина в положение 147. В таком белке окисление метионина хлорамином T действительно приводило к оптическому сдвигу коэффициента возбуждения, однако интенсивность левого максимума была слишком мала для проведения надежных измерений [180]. Эта проблема была решена заменой треонина 65 из триады хромофора на серин с целью увеличения протонированных форм. Интересно, что полученный белок демонстрировал двухфазную кинетику окисления. В частности, наибольшее изменение сигнала происходило в течение 30 секунд, после чего наблюдалось медленное и плавное его снижение. При удалении всех остальных метионинов из молекулы такое поведение полностью исчезало, что указывает на их участие в побочных реакциях. Максимальная амплитуда ответа GERMO составляет около 2 раз, а его сигнал стабилен в физиологическом диапазоне pH. Кроме того, эксперименты с SIN-1 (донором NO- и супероксида)

показали, что зонд относительно не чувствителен к активным формам азота. Образование MetO147 было подтверждено масс-спектрометрическим анализом. GEPMO был успешно использован для визуализации субклеточных различий в протопорфирин-индуцированном окислении метионина. Также были разработаны два контрольных зонда, в которых ключевой метионин 147 был заменен на серин и глутамин [180]. В целом представляется, что в определенных условиях, особенно в экспериментах с короткой экспозицией, GEPMO обладает достаточно высокой селективностью к активным формам галогенов.

В начале 2022 года были опубликованы данные о первом в своем роде генетически кодируемом флуоресцентном сенсоре, селективном к гипогалоиновым кислотам и псевдогипогалоидной гипотиоциановой кислоте и их производным – Нурocrates [172]. Данный инструмент состоит из двух функциональных частей – кругового пермутанта желтого флуоресцентного белка srYFP и транскрипционного фактора NemR. Транскрипционный фактор NemR относится к семейству TetR-подобных регуляторов, чья активность контролируется алкилированием остатков цистеина в его составе [181]. Этот фактор регулирует экспрессию генов nemR, nemA и gloA, объединенных в единый оперон [182]. Белки NemA и GloA являются частью системного ответа бактерий на стресс, вызванный активными электрофилами, поскольку они способны нейтрализовывать окисленные хиноны, а также реакционноспособные карбонильные соединения по типу глиоксаля. Кроме того, известно, что транскрипция генов nemA и gloA усиливается в ответ на HOCl, при этом выживаемость бактерий зависит от возможности экспрессировать соответствующие ферменты [183]. Таким образом NemR является транскрипционным фактором, который обеспечивает способность бактерий детектировать и нейтрализовать как галогенирующий стресс, так и электрофильный стресс, который является его следствием. srYFP, выступивший в качестве репортерного модуля, внедрили в область гибкой петли в составе NemR. Спектр возбуждения флуоресценции srYFP характеризуется двумя пиками, в области 416 и 500 нм, что соответствует возбуждению флуоресценции протонированной и депротонированной форм хромофора. При этом, когда srYFP находится в составе восстановленного сенсора, равновесие смещено в сторону протонированной формы хромофора, то есть интенсивность флуоресценции, возбуждаемой длиной волны 416 нм, сильнее. После взаимодействия с аналитами, то есть окисления сенсора, конформация гибкой петли NemR изменяется таким образом, что микроокружение хромофора в srYFP модулируется и равновесие смещается в сторону его депрото-

нированной формы. Это отражается в виде изменения спектра возбуждения флуоресценции, пик в области 500 нм становится выше. Нурocrates – ратиометрический сенсор, его ответ не зависит от концентрации белка и интенсивности флуоресценции, что можно считать одним из достоинств этого инструмента. Максимальный ответ Нурocrates наступает при молярном соотношении сенсора к окислителю не более, чем 1 : 10, и характеризуется амплитудой около 1,8 раза.

NemR содержит шесть остатков цистеина, но ключевым для взаимодействия с активными формами галогенов оказался один, поэтому для повышения селективности инструмента и избегания реакции сенсорного модуля с активными электрофилами оставшиеся пять остатков цистеина были заменены. Согласно представленной панели селективности для Нурocrates, этот биосенсор регистрирует присутствие в системе хлорноватистой, бромноватистой, гипотиоциановой кислот и их производных галогенаминов, обладающих окислительно-восстановительным потенциалом и также являющихся агентами галогенирующего стресса. Нурocrates не меняет оптические параметры в ответ на присутствие других окислительных агентов, включая супероксид-анион, пероксид водорода и радикал оксида азота. Единственным нецелевым агентом, который вызывает ответ сенсора, является пероксинитрит. По этой причине исследователям, использующим Нурocrates в экспериментальных системах, в которых ожидается продукция пероксинитрита, необходимо использовать соответствующий контроль. Еще одним недостатком Нурocrates является чувствительность к показателю pH среды, что характерно для многих инструментов, имеющих в своем составе $srYFP$. Это налагает существенные ограничения для его использования в субклеточных исследованиях, так как физиологических диапазонов pH живых систем достаточно широк [184]. Чтобы обойти это ограничение была создана контрольная версия индикатора, в которой ключевой остаток цистеина был заменен на серин. Постановка контрольных экспериментов позволит избавиться от артефактов, связанных с возможным изменением pH в системе.

Однако помимо достаточно высокой селективности этот инструмент обладает рядом других достоинств, в частности, обратимостью ответа под действием восстановителей *in vitro* и антиоксидантных систем *in vivo*, высокими кинетическими параметрами и способностью детектировать достаточно низкие концентрации целевых окислителей.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение влияния активных форм галогенов на физиологические и биохимические параметры живых организмов становится все более востребованной областью исследования. Уже установлено их участие в патогенезе различных заболеваний в виду высокой окислительной способности. Однако не только сам факт наличия галогенирующего стресса является важным, но и исследование динамики этого процесса *in vivo*. Для этого необходимо применять инструменты, которые бы сочетали в себе целый ряд качеств: высокую селективность, низкую цитотоксичность, высокие кинетические показатели и чувствительность. Несмотря на обилие подходов к изучению как ферментов, являющихся источниками активных форм галогенов, так и их продуктов, пригодными для исследований *in vivo* являются единицы. Наибольшее количество разработанных на данный момент инструментов являются низкомолекулярными синтетическими красителями, однако они, к сожалению, обладают целым рядом недостатков, о чем свидетельствует тот факт, что один и тот же индикатор крайне редко используется кем-либо, кроме его разработчиков. Поэтому, с нашей точки зрения, генетически кодируемые сенсоры являются более перспективными инструментами, уже доказавшими свою эффективность для изучения различных процессов, в том числе и окислительно-восстановительных, к которым относятся реакции с участием активных форм галогенов [170, 185, 186]. Конечно, и эти индикаторы не лишены определенных недостатков, однако они могут быть преодолены при помощи соответствующих контролей. Так, например, было бы крайне интересно использовать недавно разработанные сенсоры GEPMO и Nurocrates в паре, так как их свойства дополняют друг друга. Так как генетически кодируемые сенсоры по своей природе являются белковыми молекулами, они больше подходят для интеграции в клетки и ткани живых организмов, а, следовательно, и для проведения исследований *in vivo*, в культивируемых клетках *in vitro*.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Schultz, J., Kaminker, K. (1962) Myeloperoxidase of the leucocyte of normal human blood. I. Content and localization, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **96**, 465–467.
2. Deby-Dupont, G., Deby, C., Lamy, M. (1999) Neutrophil myeloperoxidase revisited: It's role in health and disease, *Intensivmedizin Und Notfallmedizin*, **36**, 500–513.
3. Carlson, M.G., Peterson, C.G., Venge, P. (1985) Human eosinophil peroxidase: purification and characterization, *The Journal of Immunology*, **134**, 1875–1879.
4. Arnhold, J., Flemmig, J. (2010) Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **500**, 92–106.
5. Rothenberg, M.E., Hogan, S.P. (2006) The Eosinophil, *Annual Review of Immunology*, **24**, 147–174.
6. Panasenko, O.M., Gorudko, I. V., Sokolov, A. V. (2013) Hypochlorous acid as a precursor of free radicals in living systems, *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 1466–1489.
7. Lanza, F. (1998) Clinical manifestation of myeloperoxidase deficiency, *Journal of Molecular Medicine*, **76**, 676–681.
8. Aratani, Y., Koyama, H., Nyui, S.I., Suzuki, K., Kura, F., Maeda, N. (1999) Severe impairment in early host defense against *Candida albicans* in mice deficient in myeloperoxidase, *Infection and Immunity*, **67**, 1828–1836.
9. Flemmig, J., Gau, J., Schlorke, D., Arnhold, J. (2015) Lactoperoxidase as a potential drug target, *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, **20**, 447–461.
10. Yamakaze, J., Lu, Z. (2021) Deletion of the lactoperoxidase gene causes multisystem inflammation and tumors in mice, *Scientific Reports*, **11**, 12429, 1–16.
11. Taurog, A., Dorris, M.L., Doerge, D.R. (1996) Mechanism of Simultaneous Iodination and Coupling Catalyzed by Thyroid Peroxidase, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **330**, 24–32.
12. Michot, J.-L., Osty, J., Nunez, J. (1980) Regulatory Effects of Iodide and Thiocyanate on Tyrosine Oxidation Catalyzed by Thyroid Peroxidase, *European Journal of Biochemistry*, **107**, 297–301.
13. Virion, A., Deme, D., Pommier, J., Nunez, J. (1980) Opposite Effects of Thiocyanate on Tyrosine Iodination and Thyroid Hormone Synthesis, *European Journal of Biochemistry*, **112**, 1–7.
14. Serrano-Nascimento, C., Nunes, M.T. (2022) Perchlorate, nitrate, and thiocyanate: Environmental relevant NIS-inhibitors pollutants and their impact on thyroid function and human health, *Frontiers in Endocrinology*, **13**, 995503.
15. Bhave, G., Cummings, C.F., Vanacore, R.M., Kumagai-Cresse, C., Ero-Tolliver, I.A., Rafi, M., et al. (2012) Peroxidase forms sulfilimine chemical bonds using hypohalous acids in tissue genesis, *Nature Chemical Biology*, **8**(9), 784–790.
16. Péterfi, Z., Geiszt, M. (2014) Peroxidases: Novel players in tissue genesis, *Trends in Biochemical Sciences*, **39**, 305–307.
17. Colon, S., Page-Mccaw, P., Bhave, G. (2017) Role of Hypohalous Acids in Basement Membrane Homeostasis, *Antioxidants & Redox Signaling*, **27**, 839.
18. Khan, K., Rudkin, A., Parry, D.A., Burdon, K.P., McKibbin, M., Logan, C. V., et al. (2011) Homozygous mutations in PXDN cause congenital cataract, corneal opacity, and developmental glaucoma, *American Journal of Human Genetics*, **89**, 464–473.
19. Medfai, H., Khalil, A., Rousseau, A., Nuyens, V., Paumann-Page, M.,

- Sevcnikar, B., et al. (2019) Human peroxidase 1 promotes angiogenesis through ERK1/2, Akt, and FAK pathways, *Cardiovascular Research*, **115**, 463–475.
20. Paumann-Page, M., Kienzl, N.F., Motwani, J., Bathish, B., Paton, L.N., Magon, N.J., et al. (2021) Peroxidase protein expression and enzymatic activity in metastatic melanoma cell lines are associated with invasive potential, *Redox Biology*, **46**, 102090.
21. Zámocký, M., Hofbauer, S., Schaffner, I., Gasselhuber, B., Nicolussi, A., Soudi, M., et al. (2015) Independent evolution of four heme peroxidase superfamilies, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **574**, 108–119.
22. Furtmüller, P.G., Zederbauer, M., Jantschko, W., Helm, J., Bogner, M., Jakopitsch, C., et al. (2006) Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **445**, 199–213.
23. Arnhold, J., Furtmüller, P.G., Obinger, C. (2013) Redox properties of myeloperoxidase, *Redox Report*, **8**, 179–186.
24. Fiedler, T.J., Davey, C.A., Fenna, R.E. (2000) X-ray crystal structure and characterization of halide-binding sites of human myeloperoxidase at 1.8 Å resolution, *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 11964–11971.
25. Furtmüller, P.G., Burner, U., Regelsberger, G., Obinger, C. (2000) Spectral and Kinetic Studies on the Formation of Eosinophil Peroxidase Compound I and Its Reaction with Halides and Thiocyanate, *Biochemistry*, **39**, 15578–15584.
26. Arnhold, J., Furtmüller, P.G., Regelsberger, G., Obinger, C. (2001) Redox properties of the couple compound I/native enzyme of myeloperoxidase and eosinophil peroxidase, *European Journal of Biochemistry*, **268**, 5142–5148.
27. Bolscher, B.G.J.M., Plat, H., Wever, R. (1984) Some properties of human eosinophil peroxidase, a comparison with other peroxidases, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology*, **784**, 177–186.
28. Pruitt, K. (2003) Lactoperoxidase, *Advanced Dairy Chemistry–I Proteins*, 563–570.
29. Kussendrager, K.D., Van Hooijdonk, A.C.M. (2000) Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications, *British Journal of Nutrition*, **84**, 19–25.
30. Singh, A.K., Singh, N., Sharma, S., Singh, S.B., Kaur, P., Bhushan, A., et al. (2008) Crystal Structure of Lactoperoxidase at 2.4 Å Resolution, *Journal of Molecular Biology*, **376**, 1060–1075.
31. Shin, K., Hayasawa, H., Lönnnerdal, B. (2001) Purification and quantification of lactoperoxidase in human milk with use of immunoabsorbents with antibodies against recombinant human lactoperoxidase, *American Journal of Clinical Nutrition*, **73**, 984–989.
32. Furtmüller, P.G., Arnhold, J., Jantschko, W., Zederbauer, M., Jakopitsch, C., Obinger, C. (2005) Standard reduction potentials of all couples of the peroxidase cycle of lactoperoxidase, *Journal of Inorganic Biochemistry*, **99**, 1220–1229.
33. Guo, J., McLachlan, S.M., Hutchison, S., Rapoport, B. (1998) The Greater Glycan Content of Recombinant Human Thyroid Peroxidase of Mammalian Than of Insect Cell Origin Facilitates Purification to Homogeneity of Enzymatically Protein Remaining Soluble at High Concentration, *Endocrinology*, **139**, 999–1005.
34. Baker, S., Miguel, R.N., Thomas, D., Powell, M., Furmaniak, J., Smith, B.R. (2023) Cryo-electron microscopy structures of human thyroid peroxidase (TPO) in complex with TPO antibodies, *Journal of Molecular Endocrinology*, **70**, 220149.
35. Hendry, E., Taylor, G., Ziemińska, K., Grennan Jones, F., Furmaniak, J., Rees Smith, B. (1999) Recombinant human thyroid peroxidase expressed

- in insect cells is soluble at high concentrations and forms diffracting crystals, *Journal of Endocrinology*, **160**, R13–R15.
36. Godlewska, M., Krasuska, W., Czarnecka, B. (2018) Biochemical properties of thyroid peroxidase (TPO) expressed in human breast and mammary-derived cell lines, *PLOS One*, **13**, e0193624.
37. Nicolussi, A., Auer, M., Sevcnikar, B., Paumann-Page, M., Pfanzagl, V., Zámocký, M., et al. (2018) Post-translational modification of heme in peroxidases – Impact on structure and catalysis, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **643**, 14–23.
38. Paumann-Page, M., Tscheliessnig, R., Sevcnikar, B., Katz, R.S., Schwartz, I., Hofbauer, S., et al. (2020) Monomeric and homotrimeric solution structures of truncated human peroxidase 1 variants, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, **1868**, 140249.
39. Paumann-Page, M., Katz, R.S., Bellei, M., Schwartz, I., Edenhofer, E., Sevcnikar, B., et al. (2017) Pre-steady-state Kinetics Reveal the Substrate Specificity and Mechanism of Halide Oxidation of Truncated Human Peroxidase 1, *The Journal of Biological Chemistry*, **292**, 4583–4592.
40. Oka, S., Sibazaki, Y., Tahara, S. (1981) Direct Potentiometric Determination of Chloride Ion in Whole Blood, *Analytical Chemistry*, **53**, 588–593.
41. Olszowy, H.A., Rossiter, J., Hegarty, J., Geoghegan, P., Haswell-Elkins, M. (1998) Background Levels of Bromide in Human Blood, *Journal of Analytical Toxicology*, **22**, 225–230.
42. Rendl, J., Luster, M., Reiners, C. (2006) Serum Inorganic Iodide Determined by Paired-Ion Reversed-Phase Hplc with Electrochemical Detection, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **20**, 1445–1459.
43. Dastur, D.K., Quadros, E. V., Wadia, N.H., Desai, M.M., Bharucha, E.P. (1972) Effect of vegetarianism and smoking on vitamin b12, thiocyanate, and folate levels in the blood of normal subjects, *British Medical Journal*, **3**, 260–263.
44. Rehak, N.N., Cecco, S.A., Niemela, J.E., Elin, R.J. (1997) Thiocyanate in smokers interferes with the Nova magnesium ion-selective electrode, *Clinical Chemistry*, **43**, 1595–1600.
45. Arnhold, J. (2021) Heme Peroxidases at Unperturbed and Inflamed Mucous Surfaces, *Antioxidants*, **10**, 1805.
46. Van Dalen, C.J., Whitehouse, M.W., Winterbourn, C.C., Kettle, A.J. (1997) Thiocyanate and chloride as competing substrates for myeloperoxidase, *Biochemical Journal*, **327**, 487–492.
47. Henderson, J.P., Byun, J., Williams, M. V., Mueller, D.M., McCormick, M.L., Heinecke, J.W. (2001) Production of Brominating Intermediates by Myeloperoxidase, *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 7867–7875.
48. Schlorke, D., Flemmig, J., Birkenmeyer, C., Arnhold, J. (2016) Formation of cyanogen iodide by lactoperoxidase, *Journal of Inorganic Biochemistry*, **154**, 35–41.
49. Schlorke, D., Atosuo, J., Flemmig, J., Lilius, E.M., Arnhold, J. (2016) Impact of cyanogen iodide in killing of *Escherichia coli* by the lactoperoxidase-hydrogen peroxide-(pseudo)halide system, *Free Radical Research*, **50**, 1287–1295.
50. Ghibaudi, E., Laurenti, E., Pacchiardo, C., Suriano, G., Moguilevsky, N., Ferrari, R.P. (2003) Organic and inorganic substrates as probes for comparing native bovine lactoperoxidase and recombinant human myeloperoxidase, *Journal of Inorganic Biochemistry*, **94**, 146–154.
51. Ghibaudi, E., Laurenti, E. (2003) Unraveling the catalytic mechanism of lactoperoxidase and myeloperoxidase, *European Journal of Biochemistry*, **270**, 4403–4412.
52. Dempsey, B., Cruz, L.C., Mineiro, M.F., da Silva, R.P., Meotti, F.C. (2022) Uric Acid Reacts with Peroxi-

- dasin, Decreases Collagen IV Cross-link, and Impairs Human Endothelial Cell Migration and Adhesion, *Antioxidants*, **11**, 1117.
53. Kettle, A.J., Maroz, A., Woodroffe, G., Winterbourn, C.C., Anderson, R.F. (2011) Spectral and kinetic evidence for reaction of superoxide with compound I of myeloperoxidase, *Free Radical Biology and Medicine*, **51**, 2190–2194.
 54. Winterbourn, C.C., Hampton, M.B., Livesey, J.H., Kettle, A.J. (2006) Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome: Implications for microbial killing, *Journal of Biological Chemistry*, **281**, 39860–39869.
 55. Vlasova, I.I., Sokolov, A. V., Arnhold, J. (2012) The free amino acid tyrosine enhances the chlorinating activity of human myeloperoxidase, *Journal of Inorganic Biochemistry*, **106**, 76–83.
 56. Candeias, L.P., Stratford, M.R.L., Wardman, P. (1994) Formation of Hydroxyl Radicals on Reaction of Hypochlorous Acid with Ferrocyanide, a Model IRON(II) Complex, *Free Radical Research*, **20**, 241–249.
 57. Fenton, H.J.H. (1894) LXXIII. Oxidation of tartaric acid in presence of iron, *Journal of the Chemical Society, Transactions*, **65**, 899–910.
 58. Lu, C., Deng, K., Hu, C., Lyu, L. (2020) Dual-reaction-center catalytic process continues Fenton's story, *Frontiers of Environmental Science and Engineering*, **14**, 1–9.
 59. Abe, C., Miyazawa, T., Miyazawa, T. (2022) Current Use of Fenton Reaction in Drugs and Food, *Molecules*, **27**, 5451.
 60. Panasenko, O.M., Gorudko, I. V., Sokolov, A. V. (2013) Hypochlorous acid as a precursor of free radicals in living systems, *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 1466–1489.
 61. Marquez, L.A., Dunford, H.B. (1994) Chlorination of taurine by myeloperoxidase. Kinetic evidence for an enzyme-bound intermediate., *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 7950–7956.
 62. Ramos, D.R., Victoria García, M., Canle L., M., Arturo Santaballa, J., Furtmüller, P.G., Obinger, C. (2007) Myeloperoxidase-catalyzed taurine chlorination: Initial versus equilibrium rate, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **466**, 221–233.
 63. Vakhrusheva, T. V., Sokolov, A. V., Moroz, G.D., Kostevich, V.A., Gorbunov, N.P., Smirnov, I.P., et al. (2022) Effects of Synthetic Short Cationic Antimicrobial Peptides on the Catalytic Activity of Myeloperoxidase, Reducing Its Oxidative Capacity, *Antioxidants*, **11**, 2419.
 64. Sokolov, A.V., Kostevich, V.A., Zakharova, E.T., Samygina, V.R., Panasenko, O.M., Vasilyev, V.B. (2015) Interaction of ceruloplasmin with eosinophil peroxidase as compared to its interplay with myeloperoxidase: Reciprocal effect on enzymatic properties, *Free Radical Research*, **49**, 800–811.
 65. Samygina, V.R., Sokolov, A. V., Bourenkov, G., Petoukhov, M. V., Pulina, M.O., Zakharova, E.T., et al. (2013) Ceruloplasmin: Macromolecular Assemblies with Iron-Containing Acute Phase Proteins, *PLOS One*, **8**, e67145.
 66. Sokolov, A. V., Acquasaliente, L., Kostevich, V.A., Frasson, R., Zakharova, E.T., Pontarollo, G., et al. (2015) Thrombin inhibits the anti-myeloperoxidase and ferroxidase functions of ceruloplasmin: relevance in rheumatoid arthritis, *Free Radical Biology and Medicine*, **86**, 279–294.
 67. Zabrodskaya, Y.A., Egorov, V. V., Sokolov, A. V., Shvetsov, A. V., Gorskova, Y.E., Ivankov, O.I., et al. (2022) Caught red handed: modeling and confirmation of the myeloperoxidase ceruloplasmin alpha-thrombin complex, *BioMetals*, **35**, 1157–1168.
 68. Sokolov, A. V., Kostevich, V.A., Kozlov, S.O., Donskyi, I.S., Vlasova, I.I., Rudenko, A.O., et al. (2015) Kinetic method for assaying the halogenating activity of myeloperoxidase based on reaction of celestine

- blue B with taurine halogenamines, *Free Radical Biology and Medicine*, **49**, 777–789.
69. Sokolov, A. V., Zakahrova, E.T., Kostevich, V.A., Samygina, V.R., Vasilyev, V.B. (2014) Lactoferrin, myeloperoxidase, and ceruloplasmin: Complementary gearwheels cranking physiological and pathological processes, *BioMetals*, **27**, 815–828.
70. Sokolov, A. V., Kostevich, V.A., Runova, O.L., Gorudko, I. V., Vasilyev, V.B., Cherenkevich, S.N., et al. (2014) Proatherogenic modification of LDL by surface-bound myeloperoxidase, *Chemistry and Physics of Lipids*, **180**, 72–80.
71. Panasenko, O.M., Torkhovskaya, T.I., Gorudko, I. V., Sokolov, A. V. (2020) The Role of Halogenative Stress in Atherogenic Modification of Low-Density Lipoproteins, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 34–55.
72. Vlasova, I.I., Sokolov, A. V., Kostevich, V.A., Mikhailchik, E. V., Vasilyev, V.B. (2019) Myeloperoxidase-Induced Oxidation of Albumin and Ceruloplasmin: Role of Tyrosines, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 652–662.
73. Kostevich, V.A., Sokolov, A.V. (2018) Oxidation of cysteine by ceruloplasmin leads to formation of hydrogen peroxide, which can be utilized by myeloperoxidase, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **503**, 2146–2151.
74. Gorudko, I. V., Grigorieva, D. V., Shamova, E. V., Kostevich, V.A., Sokolov, A. V., Mikhailchik, E. V., et al. (2014) Hypohalous acid-modified human serum albumin induces neutrophil NADPH oxidase activation, degranulation, and shape change, *Free Radical Biology and Medicine*, **68**, 326–334.
75. Panasenko, O.M., Ivanov, V.A., Mikhailchik, E. V., Gorudko, I. V., Grigorieva, D. V., Basyreva, L.Y., et al. (2022) Methylglyoxal-Modified Human Serum Albumin Binds to Leukocyte Myeloperoxidase and Inhibits its Enzymatic Activity, *Antioxidants*, **11**, 2263.
76. Reut, V.E., Kozlov, S.O., Kudryavtsev, I. V., Grudinina, N.A., Kostevich, V.A., Gorbunov, N.P., et al. (2022) New Application of the Commercially Available Dye Celestine Blue B as a Sensitive and Selective Fluorescent «Turn-On» Probe for Endogenous Detection of HOCl and Reactive Halogenated Species, *Antioxidants*, **11**, 1719.
77. Dybbukt, J.M., Bishop, C., Brooks, W.M., Thong, B., Eriksson, H., Kettle, A.J. (2005) A sensitive and selective assay for chloramine production by myeloperoxidase, *Free Radical Biology and Medicine*, **39**, 1468–1477.
78. Senthilmohan, R., Kettle, A.J. (2006) Bromination and chlorination reactions of myeloperoxidase at physiological concentrations of bromide and chloride, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **445**, 235–244.
79. Setsukinai, K. ichi, Urano, Y., Kakinuma, K., Majima, H.J., Nagano, T. (2003) Development of Novel Fluorescence Probes That Can Reliably Detect Reactive Oxygen Species and Distinguish Specific Species, *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 3170–3175.
80. Seltz, W.R. (1975) Chemiluminescence from the reaction between hypochlorite and luminol, *The Journal of Physical Chemistry*, **79**, 101–106.
81. Gross, S., Gammon, S.T., Moss, B.L., Rauch, D., Harding, J., Heinecke, J.W., et al. (2009) Bioluminescence imaging of myeloperoxidase activity *in vivo*, *Nature Medicine*, **15**, 455–461.
82. Bedouhène, S., Moulti-Mati, F., Hurtado-Nedelec, M., Dang, P.M.-C., El-Benna, J. (2017) Luminol-amplified chemiluminescence detects mainly superoxide anion produced by human neutrophils., *American Journal of Blood Research*, **7**, 41–48.
83. Goiffon, R.J., Martinez, S.C., Piwnicka-Worms, D. (2015) A rapid bioluminescence assay for measuring myeloperoxidase activity in human plasma, *Nature Communications*, **6**, 6271.

84. Song, X., Shen, H., Yin, X., Wang, X., Liu, J. (2013) Microflow-injection chemiluminescence of luminol and hypochlorite enhanced by phloxine B, *Luminescence*, **28**, 16–22.
85. Ordeig, O., Mas, R., Gonzalo, J., Del Campo, F.J., Muñoz, F.J., De Haro, C. (2005) Continuous Detection of Hypochlorous Acid/Hypochlorite for Water Quality Monitoring and Control, *Electroanalysis*, **17**, 1641–1648.
86. Kumaravel, S., Balamurugan, T.S.T., Jia, S.H., Lin, H.Y., Huang, S.T. (2020) Ratiometric electrochemical molecular switch for sensing hypochlorous acid: Applicable in food analysis and real-time in-situ monitoring, *Analytica Chimica Acta*, **1106**, 168–175.
87. Chapman, A.L.P., Mocatta, T.J., Shiva, S., Seidel, A., Chen, B., Khalilova, I., et al. (2013) Ceruloplasmin Is an Endogenous Inhibitor of Myeloperoxidase, *Journal of Biological Chemistry*, **288**, 6465–6477.
88. Hawkins, C.L., Davies, M.J. (2021) Role of myeloperoxidase and oxidant formation in the extracellular environment in inflammation-induced tissue damage, *Free Radical Biology and Medicine*, **172**, 633–651.
89. Hazen, S.L., Heinecke, J.W. (1997) 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima, *The Journal of Clinical Investigation*, **99**, 2075–2081.
90. Gaut, J.P., Byun, J., Tran, H.D., Heinecke, J.W. (2002) Artifact-Free Quantification of Free 3-Chlorotyrosine, 3-Bromotyrosine, and 3-Nitrotyrosine in Human Plasma by Electron Capture–Negative Chemical Ionization Gas Chromatography Mass Spectrometry and Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry, *Analytical Biochemistry*, **300**, 252–259.
91. Pattison, D.I., Davies, M.J. (2001) Absolute Rate Constants for the Reaction of Hypochlorous Acid with Protein Side Chains and Peptide Bonds, *Chemical Research in Toxicology*, **14**, 1453–1464.
92. Mani, A.R., Ippolito, S., Moreno, J.C., Visser, T.J., Moore, K.P. (2007) The Metabolism and Dechlorination of Chlorotyrosine in Vivo, *Journal of Biological Chemistry*, **282**, 29114–29121.
93. Curtis, M.P., Hicks, A.J., Neidigh, J.W. (2011) Kinetics of 3-chlorotyrosine formation and loss due to hypochlorous acid and chloramines, *Chemical Research in Toxicology*, **24**, 418–428.
94. Maghzal, G.J., Cergol, K.M., Shengule, S.R., Suarna, C., Newington, D., Kettle, A.J., et al. (2014) Assessment of Myeloperoxidase Activity by the Conversion of Hydroethidine to 2-Chloroethidium, *Journal of Biological Chemistry*, **289**, 5580–5595.
95. Talib, J., Maghzal, G.J., Cheng, D., Stocker, R. (2016) Detailed protocol to assess in vivo and ex vivo myeloperoxidase activity in mouse models of vascular inflammation and disease using hydroethidine, *Free Radical Biology and Medicine*, **97**, 124–135.
96. Albert, C.J., Crowley, J.R., Hsu, F.F., Thukkani, A.K., Ford, D.A. (2001) Reactive Chlorinating Species Produced by Myeloperoxidase Target the Vinyl Ether Bond of Plasmalogens: Identification of 2-chlorohexadecanal, *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 23733–23741.
97. Skaff, O., Pattison, D.I., Davies, M.J. (2008) The vinyl ether linkages of plasmalogens are favored targets for myeloperoxidase-derived oxidants: A kinetic study, *Biochemistry*, **47**, 8237–8245.
98. Palladino, E.N.D., Hartman, C.L., Albert, C.J., Ford, D.A. (2018) The chlorinated lipidome originating from myeloperoxidase-derived HOCl targeting plasmalogens: Me

- tabolism, clearance, and biological properties, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **641**, 31–38.
99. Hazell, L.J., Arnold, L., Flowers, D., Waeg, G., Malle, E., Stocker, R. (1996) Presence of hypochlorite-modified proteins in human atherosclerotic lesions., *The Journal of Clinical Investigation*, **97**, 1535–1544.
100. Malle, E., Hazell, L., Stocker, R., Sattler, W., Esterbauer, H., Waeg, G. (1995) Immunologic Detection and Measurement of Hypochlorite-Modified LDL With Specific Monoclonal Antibodies, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **15**, 982–989.
101. Hammer, A., Desoye, G., Dohr, G., Sattler, W., Malle, E. (2001) Myeloperoxidase-Dependent Generation of Hypochlorite-Modified Proteins in Human Placental Tissues during Normal Pregnancy, *Laboratory Investigation*, **81**, 543–554.
102. Cai, H., Chuang, C.Y., Hawkins, C.L., Davies, M.J. (2020) Binding of myeloperoxidase to the extracellular matrix of smooth muscle cells and subsequent matrix modification, *Scientific Reports*, **10**, 1–13.
103. Reynolds, W.F., Malle, E., Maki, R.A. (2022) Thiocyanate Reduces Motor Impairment in the hMPO-A53T PD Mouse Model While Reducing MPO-Oxidation of Alpha Synuclein in Enlarged LYVE1/AQP4 Positive Periventricular Glymphatic Vessels, *Antioxidants*, **11**, 2342.
104. Lokeshwaran, K., Venkataraman, K. (2016) Development of Monoclonal Antibody Against Chlorinated 192tyrosine Containing ApoAI Peptide to Screen Quality of Human High Density Lipoprotein (HDL), *Protein & Peptide Letters*, **23**, 905–912.
105. Lokeshwaran, K., Hemadou, A., Jayaprakash, N.S., Prasanna, R.R., Jacobin-Valat, M.J., Dieryck, W., et al. (2019) Development of anti-chloro 192 tyrosine HDL apoA-I antibodies for the immunodiagnosis of cardiovascular diseases, *Journal of Immunological Methods*, **474**, 112637.
106. Wu, W., Chen, Y., D'Avignon, A., Hazen, S.L. (1999) 3-bromotyrosine and 3,5-dibromotyrosine are major products of protein oxidation by eosinophil peroxidase: Potential markers for eosinophil-dependent tissue injury in vivo, *Biochemistry*, **38**, 3538–3548.
107. Van Dalen, C.J., Aldridge, R.E., Chan, T., Senthilmohan, R., Hancox, R.J., Cowan, J.O., et al. (2009) Bromotyrosines in sputum proteins and treatment effects of terbutaline and budesonide in asthma, *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, **103**, 348–353.
108. Kato, Y., Kawai, Y., Morinaga, H., Kondo, H., Dozaki, N., Kitamoto, N., et al. (2005) Immunogenicity of a brominated protein and successive establishment of a monoclonal antibody to dihalogenated tyrosine, *Free Radical Biology and Medicine*, **38**, 24–31.
109. Kambayashi, Y., Ogino, K., Takemoto, K., Imagama, T., Takigawa, T., Kimura, S., et al. (2009) Preparation and Characterization of a Polyclonal Antibody against Brominated Protein, *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, **44**, 95–103.
110. Jin, H., Hallstrand, T.S., Daly, D.S., Matzke, M.M., Nair, P., Bigelow, D.J., et al. (2014) A halotyrosine antibody that detects increased protein modifications in asthma patients, *Journal of Immunological Methods*, **403**, 17–25.
111. Chen, J.W., Pham, W., Weissleder, R., Bogdanov, A. (2004) Human myeloperoxidase: A potential target for molecular MR imaging in atherosclerosis, *Magnetic Resonance in Medicine*, **52**, 1021–1028.
112. Rodríguez, E., Nilges, M., Weissleder, R., Chen, J.W. (2010) Activatable magnetic resonance ima-

- ging agents for myeloperoxidase sensing: Mechanism of activation, stability, and toxicity, *Journal of the American Chemical Society*, **132**, 168–177.
113. Nahrendorf, M., Sosnovik, D., Chen, J.W., Panizzi, P., Figueiredo, J.L., Aikawa, E., et al. (2008) Activatable Magnetic Resonance Imaging Agent Reports Myeloperoxidase Activity in Healing Infarcts and Noninvasively Detects the Antiinflammatory Effects of Atorvastatin on Ischemia-Reperfusion Injury, *Circulation*, **117**, 1153–1160.
 114. Rodríguez-Rodríguez, A., Shuvaev, S., Rotile, N., Jones, C.M., Probst, C.K., Dos Santos Ferreira, D., et al. (2019) Peroxidase Sensitive Amplifiable Probe for Molecular Magnetic Resonance Imaging of Pulmonary Inflammation, *ACS Sensors*, **4**, 2412–2419.
 115. Wang, C., Cheng, D., Jalali Motlagh, N., Kuellenberg, E.G., Wojtkiewicz, G.R., Schmidt, S.P., et al. (2021) Highly Efficient Activatable MRI Probe to Sense Myeloperoxidase Activity, *Journal of Medicinal Chemistry*, **64**, 5874–5885.
 116. Wang, C., Keliher, E., Zeller, M.W.G., Wojtkiewicz, G.R., Aguirre, A.D., Buckbinder, L., et al. (2019) An activatable PET imaging radioprobe is a dynamic reporter of myeloperoxidase activity in vivo, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **116**, 11966–11971.
 117. Zeller, M.W.G., Wang, C., Keliher, E.J., Wojtkiewicz, G.R., Aguirre, A., Maresca, K., et al. (2023) Myeloperoxidase PET Imaging Tracks Intracellular and Extracellular Treatment Changes in Experimental Myocardial Infarction, *International Journal of Molecular Sciences*, **24**, 5704.
 118. Ximenes, V.F., Maghzal, G.J., Turner, R., Kato, Y., Winterbourn, C.C., Kettle, A.J. (2010) Serotonin as a physiological substrate for myeloperoxidase and its superoxide-dependent oxidation to cytotoxic tryptamine-4,5-dione, *Biochemical Journal*, **425**, 285–293.
 119. Liu, Z., Li, G., Wang, Y., Li, J., Mi, Y., Guo, L., et al. (2018) A novel fluorescent probe for imaging the process of HOCl oxidation and Cys/Hcy reduction in living cells, *RSC Advances*, **8**, 9519–9523.
 120. Wei, P., Yuan, W., Xue, F., Zhou, W., Li, R., Zhang, D., et al. (2018) Deformylation reaction-based probe for: In vivo imaging of HOCl, *Chemical Science*, **9**, 495.
 121. Bao, X., Cao, X., Yuan, Y., Zhou, B., Huo, C. (2021) A water-soluble, highly sensitive and ultrafast fluorescence probe for imaging of mitochondrial hypochlorous acid, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **344**, 130210.
 122. Zhu, J., Miao, C., Wang, X. (2023) Designing a turn-on ultrasensitive fluorescent probe based on ICT-FRET for detection and bioimaging of Hypochlorous acid, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **294**, 122546.
 123. Song, G.J., Ma, H.L., Luo, J., Cao, X.Q., Zhao, B.X. (2018) A new ratiometric fluorescent probe for sensing HOCl based on TBET in real time, *Dyes and Pigments*, **148**, 206–211.
 124. Yan, Y.H., He, X.Y., Su, L., Miao, J.Y., Zhao, B.X. (2019) A new FRET-based ratiometric fluorescence probe for hypochlorous acid and its imaging in living cells, *Talanta*, **201**, 330–334.
 125. Shen, S.L., Zhang, X.F., Ge, Y.Q., Zhu, Y., Cao, X.Q. (2018) A novel ratiometric fluorescent probe for the detection of HOCl based on FRET strategy, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **254**, 736–741.
 126. Li, L.K., Hou, Y.M., Liu, X.C., Tian, M.J., Ma, Q.J., Zhu, N.N., et al. (2022) An ICT-FRET-based fluorescent probe for the ratiometric

- sensing of hypochlorous acid based on a coumarin–naphthalimide derivative, *New Journal of Chemistry*, **46**, 6596–6602.
127. Mulay, S. V., Choi, M., Jang, Y.J., Kim, Y., Jon, S., Churchill, D.G. (2016) Enhanced Fluorescence Turn-on Imaging of Hypochlorous Acid in Living Immune and Cancer Cells, *Chemistry – A European Journal*, **22**, 9642–9648.
128. Niu, H., Liu, J., O'Connor, H.M., Gunnlaugsson, T., James, T.D., Zhang, H. (2023) Photoinduced electron transfer (PeT) based fluorescent probes for cellular imaging and disease therapy, *Chemical Society Reviews*, **52**, 2322–2357.
129. Zheng, Y., Wu, S., Bing, Y., Li, H., Liu, X., Li, W., et al. (2023) A Simple ICT-Based Fluorescent Probe for HOCl and Bioimaging Applications, *Biosensors*, **13**, 744.
130. Hao, M., Chi, W., Wang, C., Xu, Z., Li, Z., Liu, X. (2020) Molecular Origins of Photoinduced Backward Intramolecular Charge Transfer, *Journal of Physical Chemistry C*, **124**, 16820–16826.
131. Shao, S., Yang, T., Han, Y. (2023) A TICT-based fluorescent probe for hypochlorous acid and its application to cellular and zebrafish imaging, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **392**, 134041.
132. Wu, L., Yang, Q., Liu, L., Sedgwick, A.C., Cresswell, A.J., Bull, S.D., et al. (2018) ESIPT-based fluorescence probe for the rapid detection of hypochlorite (HOCl/CIO⁻), *Chemical Communications*, **54**, 8522–8525.
133. Sedgwick, A.C., Wu, L., Han, H.H., Bull, S.D., He, X.P., James, T.D., et al. (2018) Excited-state intramolecular proton-transfer (ESIPT) based fluorescence sensors and imaging agents, *Chemical Society Reviews*, **47**, 8842–8880.
134. Reut, V.E., Gorudko, I. V., Grigorieva, D. V., Sokolov, A. V., Panasenko, O.M. (2022) Fluorescent Probes for HOCl Detection in Living Cells, *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, **48**, 467–490.
135. Xu, K., Luan, D., Wang, X., Hu, B., Liu, X., Kong, F., et al. (2016) An Ultrasensitive Cyclization-Based Fluorescent Probe for Imaging Native HOBr in Live Cells and Zebrafish, *Angewandte Chemie International Edition*, **55**, 12751–12754.
136. Zhang, X., Liu, C., Zhu, H., Wang, K., Liu, M., Li, X., et al. (2024) A novel benzothiazolin-based fluorescent probe for hypobromous acid and its application in environment and biosystems, *Talanta*, **266**, 124969.
137. Fang, Y., Dehaen, W. (2021) Fluorescent Probes for Selective Recognition of Hypobromous Acid: Achievements and Future Perspectives, *Molecules*, **26**, 363.
138. Yuan, L., Wang, L., Agrawalla, B.K., Park, S.J., Zhu, H., Sivaraman, B., et al. (2015) Development of Targetable Two-Photon Fluorescent Probes to Image Hypochlorous Acid in Mitochondria and Lysosome in Live Cell and Inflamed Mouse Model, *Journal of the American Chemical Society*, **137**, 5930–5938.
139. Xiao, H., Li, J., Zhao, J., Yin, G., Quan, Y., Wang, J., et al. (2015) A colorimetric and ratiometric fluorescent probe for ClO⁻ targeting in mitochondria and its application in vivo, *Journal of Materials Chemistry B*, **3**, 1633–1638.
140. Niu, H., Chen, K., Xu, J., Zhu, X., Cao, W., Wang, Z., et al. (2019) Mitochondria-targeted fluorescent probes for oxidative stress imaging, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **299**, 126938.
141. Zhu, N., Guo, X., Chang, Y., Shi, Z., Jin, L.Y., Feng, S. (2022) A mitochondria-tracing fluorescent probe for real-time detection of mitochondrial dynamics and hypochlorous acid in live cells, *Dyes and Pigments*, **201**, 110227.
142. Jiang, C., Xu, X., Yao, C. (2022) A ratiometric fluorescence probe for

- imaging endoplasmic reticulum (ER) hypochlorous acid in living cells undergoing excited state intramolecular proton transfer, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **273**, 121075.
143. Yang, T., Sun, J., Yao, W., Gao, F. (2020) A two-photon fluorescent probe for turn-on monitoring HOCl level in endoplasmic reticulum, *Dyes and Pigments*, **180**, 108435.
144. Kelmanson, I. V., Shokhina, A.G., Kotova, D.A., Pochechuev, M.S., Ivanova, A.D., Kostyuk, A.I., et al. (2021) In vivo dynamics of acidosis and oxidative stress in the acute phase of an ischemic stroke in a rodent model, *Redox Biology*, **48**, 102178.
145. Saeidnia, S., Manayi, A., Abdollahi, M. (2016) From in vitro Experiments to in vivo and Clinical Studies; Pros and Cons, *Current Drug Discovery Technologies*, **12**, 218-224.
146. Shang, Z., Yang, | Xinyi, Meng, Q., Tian, S., Zhang, Z. (2023) A ratiometric near-infrared fluorescent probe for the detection and monitoring of hypochlorous acid in rheumatoid arthritis model and real water samples, *Smart Molecules*, e20220007.
147. Xu, Q., Lee, K.A., Lee, S., Lee, K.M., Lee, W.J., Yoon, J. (2013) A highly specific fluorescent probe for hypochlorous acid and its application in imaging microbe-induced hoCl production, *Journal of the American Chemical Society*, **135**, 9944–9949.
148. Xiong, H., He, L., Zhang, Y., Wang, J., Song, X., Yang, Z. (2019) A ratiometric fluorescent probe for the detection of hypochlorous acid in living cells and zebra fish with a long wavelength emission, *Chinese Chemical Letters*, **30**, 1075–1077.
149. Feng, H., Meng, Q., Wang, Y., Duan, C., Wang, C., Jia, H., et al. (2018) Responsive Fluorescence Probe for Selective and Sensitive Detection of Hypochlorous Acid in Live Cells and Animals, *Chemistry – An Asian Journal*, **13**, 2611–2618.
150. Zhang, Y., Ma, L., Tang, C., Pan, S., Shi, D., Wang, S., et al. (2018) A highly sensitive and rapidly responding fluorescent probe based on a rhodol fluorophore for imaging endogenous hypochlorite in living mice, *Journal of Materials Chemistry B*, **6**, 725–731.
151. Yang, J., Zheng, W., Shen, Y., Xu, Y., Lv, G., Li, C. (2020) A novel near-infrared fluorescent probe based on phenoxazine for the specific detection of HOCl, *Journal of Luminescence*, **226**, 117460.
152. Huang, Y., Zhang, P., Gao, M., Zeng, F., Qin, A., Wu, S., et al. (2016) Ratiometric detection and imaging of endogenous hypochlorite in live cells and in vivo achieved by using an aggregation induced emission (AIE)-based nanoprobe, *Chemical Communications*, **52**, 7288–7291.
153. Teng, H., Tian, J., Sun, D., Xiu, M., Zhang, Y., Qiang, X., et al. (2020) A mitochondria-specific fluorescent probe based on triazolopyridine formation for visualizing endogenous hypochlorous acid in living cells and zebrafish, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **319**, 128288.
154. Miesenböck, G., De Angelis, D.A., Rothman, J.E. (1998) Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins, *Nature*, **394**, 192–195.
155. Tang, S., Wong, H.C., Wang, Z.M., Huang, Y., Zou, J., Zhuo, Y., et al. (2011) Design and application of a class of sensors to monitor Ca²⁺ dynamics in high Ca²⁺ concentration cellular compartments, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 16265–16270.
156. Wang, Z.M., Tang, S., Messi, M.L., Yang, J.J., Delbono, O. (2012) Re-

- sidual sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ concentration after Ca²⁺ release in skeletal myofibers from young adult and old mice, *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*, **463**, 615–624.
157. Zhao, F.L., Zhang, C., Zhang, C., Tang, Y., Ye, B.C. (2016) A genetically encoded biosensor for in vitro and in vivo detection of NADP⁺, *Biosensors and Bioelectronics*, **77**, 901–906.
158. Penjweini, R., Andreoni, A., Rosales, T., Kim, J., Brenner, M.D., Sackett, D.L., et al. (2018) Intracellular oxygen mapping using a myoglobin-mCherry probe with fluorescence lifetime imaging, *Journal of Biomedical Optics*, **23**, 1.
159. Alspaugh, G., Roarke, B., Chand, A., Penjweini, R., Andreoni, A., Knutson, J.R. (2021) Developing Analysis Protocols for Monitoring Intracellular Oxygenation Using Fluorescence Lifetime Imaging of Myoglobin-mCherry, *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, **2304**, 315–337.
160. Yakhnin, A. V., Vinokurov, L.M., Surin, A.K., Alakhov, Y.B. (1998) Green Fluorescent Protein Purification by Organic Extraction, *Protein Expression and Purification*, **14**, 382–386.
161. Tsien, R.Y. (2003) The green fluorescent protein, *Annual Review of Biochemistry*, **67**, 509–544.
162. Barondeau, D.P., Putnam, C.D., Kassmann, C.J., Tainer, J.A., Getzoff, E.D. (2003) Mechanism and energetics of green fluorescent protein chromophore synthesis revealed by trapped intermediate structures, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 12111–12116.
163. Ward, W.W., Bokman, S.H. (1982) Reversible Denaturation of Aequorea Green-Fluorescent Protein: Physical Separation and Characterization of the Renatured Protein, *Biochemistry*, **21**, 4535–4540.
164. Fukuda, H., Arai, M., Kuwajima, K. (2000) Folding of Green Fluorescent Protein and the Cycle3 Mutant, *Biochemistry*, **39**, 12025–12032.
165. Doi, N., Yanagawa, H. (1999) Design of generic biosensors based on green fluorescent proteins with allosteric sites by directed evolution, *FEBS Letters*, **453**, 305–307.
166. Baird, G.S., Zacharias, D.A., Tsien, R.Y. (1999) Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 11241–11246.
167. Griesbeck, O., Baird, G.S., Campbell, R.E., Zacharias, D.A., Tsien, R.Y. (2001) Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications, *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 29188–29194.
168. Kitaguchi, T., Oya, M., Wada, Y., Tsuboi, T., Miyawaki, A. (2013) Extracellular calcium influx activates adenylate cyclase I and potentiates insulin secretion in MIN6 cells, *The Biochemical Journal*, **450**, 365–373.
169. Odaka, H., Arai, S., Inoue, T., Kitaguchi, T. (2014) Genetically-Encoded Yellow Fluorescent cAMP Indicator with an Expanded Dynamic Range for Dual-Color Imaging, *PLOS One*, **9**, e100252.
170. Harada, K., Ito, M., Wang, X., Tanaka, M., Wongso, D., Konno, A., et al. (2017) Red fluorescent protein-based cAMP indicator applicable to optogenetics and in vivo imaging, *Scientific Reports*, **7**, 1–9.
171. Kostyuk, A.I., Demidovich, A.D., Kotova, D.A., Belousov, V. V., Bilan, D.S. (2019) Circularly Permuted Fluorescent Protein-Based Indicators: History, Principles, and Classification, *International Journal of Molecular Sciences*, **20**, 4200.

172. Kostyuk, A.I., Tossounian, M.-A., Panova, A.S., Thauvin, M., Raevskii, R.I., Ezeriņa, D., et al. (2022) Hypocrates is a genetically encoded fluorescent biosensor for (pseudo) hypohalous acids and their derivatives, *Nature Communications*, **13**, 1–17.
173. Loi, V. Van, Harms, M., Müller, M., Huyen, N.T.T., Hamilton, C.J., Hochgräfe, F., et al. (2017) Real-Time Imaging of the Bacillithiol Redox Potential in the Human Pathogen *Staphylococcus aureus* Using a Genetically Encoded Bacilliredoxin-Fused Redox Biosensor, *Antioxidants and Redox Signaling*, **26**, 835–848.
174. Becker, J., Gießelmann, G., Hoffmann, S.L., Wittmann, C. (2018) *Corynebacterium glutamicum* for Sustainable Bioproduction: From Metabolic Physiology to Systems Metabolic Engineering, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, **162**, 217–263.
175. Tung, Q.N., Loi, V. Van, Busche, T., Nerlich, A., Mieth, M., Milse, J., et al. (2019) Stable integration of the Mrx1-roGFP2 biosensor to monitor dynamic changes of the mycothiol redox potential in *Corynebacterium glutamicum*, *Redox Biology*, **20**, 514–525.
176. Shokhina, A.G., Kostyuk, A.I., Ermakova, Y.G., Panova, A.S., Staroverov, D.B., Egorov, E.S., et al. (2019) Red fluorescent redox-sensitive biosensor Grx1-roCherry, *Redox Biology*, **21**, 101071.
177. Müller, A., Schneider, J.F., Degrossoli, A., Lupilova, N., Dick, T.P., Leichert, L.I. (2017) Systematic in vitro assessment of responses of roGFP2-based probes to physiologically relevant oxidant species, *Free Radical Biology & Medicine*, **106**, 329–338.
178. Liang, X., Kaya, A., Zhang, Y., Le, D.T., Hua, D., Gladyshev, V.N. (2012) Characterization of methionine oxidation and methionine sulfoxide reduction using methionine-rich cysteine-free proteins, *BMC Biochemistry*, **13**, 1–10.
179. Sharov, V.S., Ferrington, D.A., Squier, T.C., Schöneich, C. (1999) Diastereoselective reduction of protein-bound methionine sulfoxide by methionine sulfoxide reductase, *FEBS Letters*, **455**, 247–250.
180. Kuldyushev, N., Schönherr, R., Coburger, I., Ahmed, M., Hussein, R.A., Wiesel, E., et al. (2022) A GFP-based ratiometric sensor for cellular methionine oxidation, *Talanta*, **243**, 123332.
181. Umezawa, Y., Shimada, T., Kori, A., Yamada, K., Ishihama, A. (2008) The uncharacterized transcription factor YdhM is the regulator of the *nemA* gene, encoding N-ethylmaleimide reductase, *Journal of Bacteriology*, **190**, 5890–5897.
182. Lee, C., Shin, J., Park, C. (2013) Novel regulatory system *nemRA-gloA* for electrophile reduction in *Escherichia coli* K-12, *Molecular Microbiology*, **88**, 395–412.
183. Gray, M.J., Wholey, W.Y., Parker, B.W., Kim, M., Jakob, U. (2013) *NemR* is a bleach-sensing transcription factor, *The Journal of Biological Chemistry*, **288**, 13789–13798.
184. Waddell, W.J., Bates, R.G. (1969) Intracellular pH, *Physiological Reviews*, **49**, 285–329.
185. Bilan, D.S., Belousov, V.V. (2018) *In Vivo* Imaging of Hydrogen Peroxide with HyPer Probes, *Antioxidants & Redox Signaling*, **29**, 569–584.
186. Niethammer, P., Grabher, C., Look, A.T., Mitchison, T.J. (2009) A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish, *Nature*, **459**, 996–999.