

УДК 57.03; 53.05

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ КОФАКТОРА FAD И NAD(P)H-ОКСИДАЗНЫХ КОМПЛЕКСОВ В СПЛЕНОЦИТАХ МЫШЕЙ И КЛЕТКАХ КАРЦИНОМЫ ЛЬЮИС ПРИ АПОПТОЗЕ МЕТОДОМ КОНФОКАЛЬНОЙ МИКРОСКОПИИ

© 2024 г. Е. М. Миль¹, А. А. Албантова^{1*}, Л. И. Матиенко¹,
А. Н. Голощапов¹, М. А. Коровин¹, В. В. Кувыркова¹

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

*E-mail: albantovaaa@mail.ru

Поступила в редакцию 26.03.2024;

после доработки 24.04.2024;

принята в печать 20.05.2024

В настоящей работе исследовано содержание кофактора FAD и ферментных NAD(P)H-оксидазных комплексов методами флуоресцентной и конфокальной микроскопии (с флуорофорами Appexin V–FITC, 7-AAD (7-Aminoactinomycin D), EtBr) при апоптозе, вызванном анфеном натрия в сочетании с пероксидом водорода в спленоцитах здоровых мышей и в опухолевых клетках карциномы Льюис. Применение этих методов дает возможность наблюдать и количественно оценить апоптотический эффект анфена натрия и пероксида водорода, а также позволяет визуализировать метаболические изменения в клетке, усиление флуоресценции FAD в опухолевых клетках и NAD(P)H-оксидазных комплексов в спленоцитах. Полученные данные свидетельствуют о возможности применения анфена натрия в сочетании с пероксидом водорода в качестве противоопухолевого препарата, действующего на определенные типы клеток.

Ключевые слова: анфен натрия, клетки карциномы Льюис, NAD(P)H-оксидазный комплекс, кофактор FAD.

DOI: 10.31857/S0207401X24110061

1. ВВЕДЕНИЕ

Одной из основных окислительно-восстановительных пар в клетке является пара кофакторов, FAD и NAD(P)H, между которыми постоянно осуществляется обмен электронами в NAD(P)H-оксидажном комплексе. Никотинамидадениндинуклеотид (NAD(P)H) – эндогенный тканевый флуорофор, который поглощает свет в области длины волны $\lambda = 330$ нм, а флавинадениннуклеотид – (FAD) в области $\lambda = 450$ нм. Поскольку они участвуют во многих клеточных процессах, таких как клеточный метаболизм, работа дыхательной цепи митохондрий, появляется возможность использовать их в качестве маркеров клеточного метаболизма в процессах, происходящих в клетке.

Комплекс NAD(P)H способен флуоресцировать только в восстановленной форме, а флавиновые нуклеотиды и FAD – только в окисленной [1]. Кроме того, NAD(P)H-оксидазный комплекс

с белками присутствует практически во всех клетках на поверхности мембраны и имеет обозначение NOX (1–7).

В данный момент хорошо разработанным методом исследования является лазерно-индуцированная флуоресцентная спектроскопия, которая активно используется в диагностике тканевой гипоксии [1]. Важные особенности методов флуоресцентной и конфокальной микроскопии – наблюдение и исследование живых клеток при развитии апоптоза. Это дает возможность получать дополнительную информацию о протекании метаболических процессов по сравнению с методами атомно-силовой микроскопии [2, 3] и электронной микроскопии [4, 5].

Комплексы NAD(P)H-оксидазы семейства NOX на данный момент являются единственной группой ферментов, у которых главная функция – это выработка активных форм кислорода (АФК). Они представляют собой связанные мембраной

ферменты, способные выполнять перенос электрона от NAD(P)H на молекулярный кислород, образуя при этом супероксид [6]. При этом все NAD(P)H-оксидазы семейства NOX представляют собой интегральные белки мембран, которые содержат шесть трансмембранных спиралей и пять петель, локализованных в водной фазе. В активном центре NAD(P)H-оксидазы на С-концевом участке цепи находится редокс-пара кофакторов FAD и NAD(P)H, близко расположенных друг к другу (расстояние между ними составляет 7.8 Å).

Цель настоящего исследования — оценка содержания клеток с кофактором FAD методом флуоресцентной микроскопии и клеток с NADPH-оксидазными комплексами методом конфокальной микроскопии при воздействии анфена натрия (ANa) в сочетании с пероксидом водорода при развитии апоптоза.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Методическая часть

В работе в качестве антиоксиданта использовали ANa, (2-(карбокси)-2-(N-ацетиламино)-3-(3',5'-ди-трет-бутил-4'-гидроксифенил)-пропионат натрия) — один из антиоксидантных препаратов [7–9], некоторые из которых были синтезированы в Институте химической физики и нашли применение в практике. Препарат растворяли в физиологическом растворе и вводили в суспензию клеток в концентрации 10^{-4} М. В исследовании были использованы белые беспородные мыши, а также мыши-гибриды первого поколения F1 (C57BL/6 × DBA/2), (возраст 3–4 мес., масса 22–25 г) из питомника “Столбовая”, у которых из селезенки выделяли спленоциты. Мышей умертвляли методом декапитации под эфирным наркозом.

Клетки карциномы Льюис мышей выделяли из опухоли на 14-е сутки после трансплантации опухолевых клеток (по методике, изложенной в работе [10]). Для получения суспензии клеток, в том числе клеток опухоли и селезенки спленоцитов, готовили согласно методике из работы [11], измельчали в физиологическом растворе, диспергировали многократно и фильтровали через нейлоновую (100 мкм) сетку. Взвесь клеток осаждали при 150g и ресуспендировали осадок для получения суспензии клеток. Затем вводили реципиентам в объеме 0.2 мл в мышцу бедра задней лапы ($7 \cdot 10^6$ клеток/мышь), либо использовали в экспе-

риментах *in vitro*. Число клеток определяли в камере Горяева. Клетки в присутствии исследуемых соединений инкубировали в течение 2 ч при 37 °C в среде 199 в растворе Хенкса (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов РАН) для различных условий: в контрольных образцах, при совместном введении анфена натрия (10^{-4} М) и пероксида водорода (5 мкМ), а также при последовательном введении пероксида водорода (5 мкМ) и анфена натрия (10^{-4} М).

Микрофотографии клеток карциномы Льюис получали с помощью метода флуоресцентной микроскопии (объективы с увеличением 40x и 100x) при возбуждении на длине волны $\lambda = 450$ с фильтром $\lambda = 530$ нм, отсекающим возбуждающий свет. В работе использовали микроскоп, производства компании Carl Zeiss (Germany), Jena, оснащенный системой оптического возбуждения на диодных лазерах и фильтрации, после чего происходила фиксация на камеру (HDCCD). Основным используемым флуорофором является Annexin V-FITC, способный связываться с фосфатидилсеринном в апоптотической клетке, создавая при этом зеленое свечение. Известно, что NAD(P)H-оксидазный комплекс содержит в структуре NOX(1–7) и FAD, и находится на внешней стороне мембраны клетки. Благодаря данному явлению количество клеток, подвергнувшихся запрограммированной гибели, определяли на конфокальном микроскопе как отношение окрашенных флуорофором Annexin V-FITC клеток к их общему числу на микрофотографии.

Конфокальные изображения были получены с использованием микроскопа Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Jena, Germany), оснащенного конфокальным устройством модели CSU-X1 (производства Yokogawa Corporation of America). Расчеты проводились с помощью программы ImageJ. Обнаружено, что в контрольных образцах число нежизнеспособных, мертвых клеток (определяемое по образованию комплекса EtBr с ДНК, красное свечение) составляло около 2–3%. Число клеток с апоптозом (определяемое по флуоресценции Annexin AV-FITC, зеленое свечение) в суспензии спленоцитов составило 1–4%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее методом Western Blotting было установлено, что ANa вызывает апоптоз клеток карциномы Льюис и прекращает размножение клеток

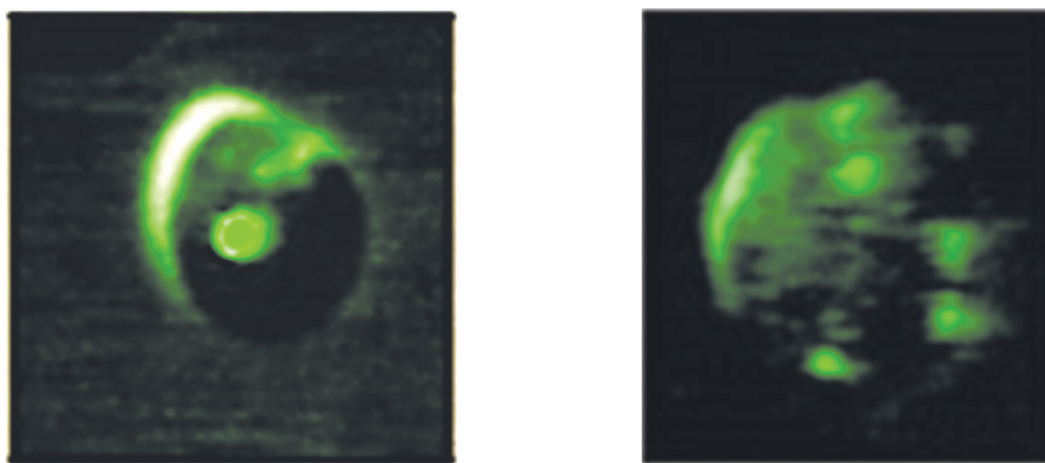


Рис. 1. Флуоресценция FAD в спленоцитах мышей: единичное (слева) и множественное свечение (справа) в клетках при апоптозе.

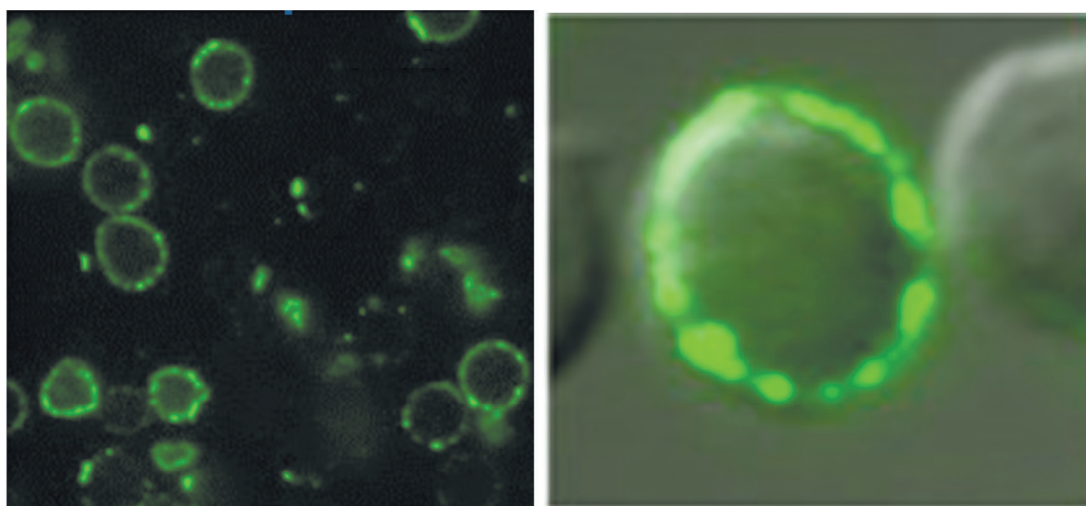


Рис. 2. Микрофотографии спленоцитов при апоптозе, вызванном действием анфена натрия (10^{-4} М), и увеличенное в 6 раз изображение клетки (на мембране видны гранулы NAD(P)H-оксидазных ферментных комплексов NOX). Конфокальный микроскоп с увеличением 100x (флуорофор – Annexin V-FITC).

при трансплантации опухоли. Усиление апоптоза наблюдалось при совместном действии {ANa + H_2O_2 } [12]. В качестве удобной модели здоровых клеток использовали спленоциты мышей.

При регистрации спленоцитов с использованием флуоресцентного микроскопа (описание см. выше) наблюдались яркие структуры, обладающие автофлуоресценцией (рис. 1). Они присутствовали в контрольных образцах и при апоптозе. Их число центров варьировало от 1–2 до 8–10 в разных клетках. Количество клеток с автофлуоресценцией увеличивалось с развитием апоптоза, вызванном действием анфена натрия и пероксида водорода. Ряд клеток (менее 1%) имели увеличенные размеры и размытые флуоресцирующие объекты, возможно, липофусциновые образования. Это

точечное свечение, наблюдаемое в зеленой области, как показано в работах [13, 14], обусловлено в основном кофактором FAD в окисленном состоянии. Он присутствует в том числе в NAD(P)H-оксидазном комплексе. В работах [13, 14] также показано, что кофактор FAD участвует в ряде других окислительно-восстановительных систем, например в митохондриях и связан с флавопротеинами, но его флуоресценция в этих комплексах тушится белками электрон-транспортной цепи.

С другой стороны, при апоптозе спленоцитов, наряду со свечением мембраны в условиях добавления Annexin AV-FITC в конфокальном микроскопе на внешней стороне мембраны видны округлые гранулы (рис. 2). Эти гранулы подобны струк-

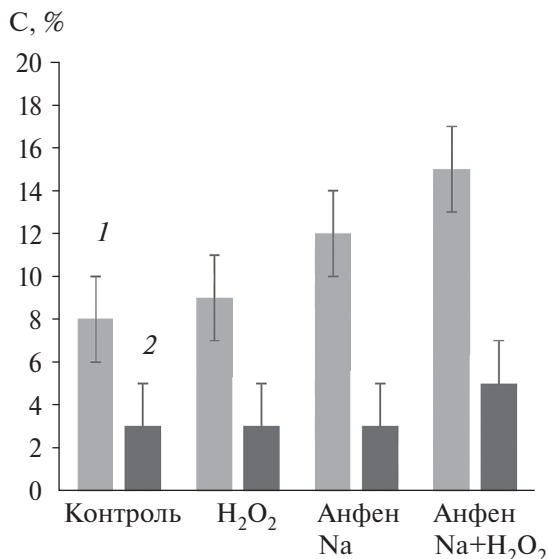


Рис. 3. Диаграмма содержания апоптотических клеток в культуре спленоцитов (флуорофор – AnnexinV-FITC) – 1, количество нежизнеспособных клеток (флуорофор EtBr) – 2. Изменение содержания клеток под действием пероксида водорода (5 мкМ), анфена натрия (10^{-4} М), и при их совместном воздействии.

турам, описанным для многих других клеток [10, 13–15], в частности для нейтрофилов. Наблюдаемые объекты можно отнести к сложным NAD(P)H-оксидазным ферментативным комплексам, называемым NOX(1–7), которые содержатся практически во всех клетках млекопитающих. Основная функция NOX состоит в образовании супероксид-аниона или пероксида водорода. При этом происходит перенос электрона с внутриклеточного NAD(P)H на внеклеточный кислород. Эта система используется клеткой для защиты от бактериального и микробного заражений [14]. Недавно было обнаружено, что комплексы NAD(P)H-оксидазы играют важную роль в ряде патологий, таких как болезнь Альцгеймера и нейродегенеративные заболевания [15, 16]. Оказалось, что экспрессия NOX связана также с канцерогенезом. Например, экспрессия NOX в желудочно-кишечном тракте повышается в аденомах и высоко дифференцированных аденокарциномах [17].

Таблица 1. Процентное содержание апоптотических клеток и клеток с FAD в спленоцитах здоровых животных и опухолевых клеток мышей с карциномой Льюис

Образцы	Клетки в апоптозе, %		Клетки с FAD, %	
	норма	опухоль	норма	опухоль
Контрольный	8	14.8	17	65
Анфен Na	10	31.7	25	60
Анфен Na+H ₂ O ₂	15	73.5	29	73

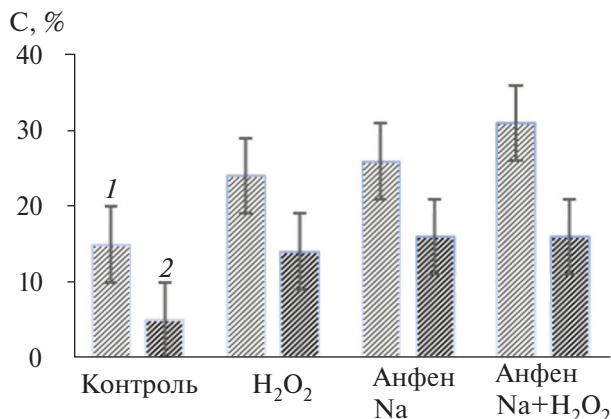


Рис. 4. Процент клеток с флуоресценцией FAD – 1 и иммунофлуоресценцией гранул NAD(P)H-оксидазных комплексов – 2 в культуре спленоцитов под действием пероксида водорода (5 мкМ), анфена натрия (10^{-4} М) и при их совместном воздействии.

В настоящей работе было определено число апоптотических клеток, а также число нежизнеспособных клеток при апоптозе спленоцитов, вызванном препаратами. Из рис. 3 видно, что при введении антиоксиданта ANa вместе с пероксидом водорода увеличивается число апоптотических клеток в спленоцитах мышей. Содержание нежизнеспособных клеток остается на невысоком уровне. Это означает, что клетки находятся на начальной стадии апоптоза, и апоптоз в спленоцитах составляет 15% от общего количества клеток. В этих же условиях апоптоз может составлять более 70% в опухолевых клетках (см. табл. 1).

Далее было определено процентное содержание клеток с NAD(P)H-оксидазным комплексом и сопоставлено с содержанием клеток с флуоресценцией FAD. На рис. 4 можно видеть корреляцию между исследуемыми объектами. Это означает, что FAD действительно является частью NAD(P)H-оксидазного комплекса.

Как видно из табл. 1, содержание FAD и число апоптотических клеток при апоптозе, вызванном ANa и {ANa + H₂O₂} в несколько раз больше, чем в спленоцитах здоровых мышей. То есть окисли-

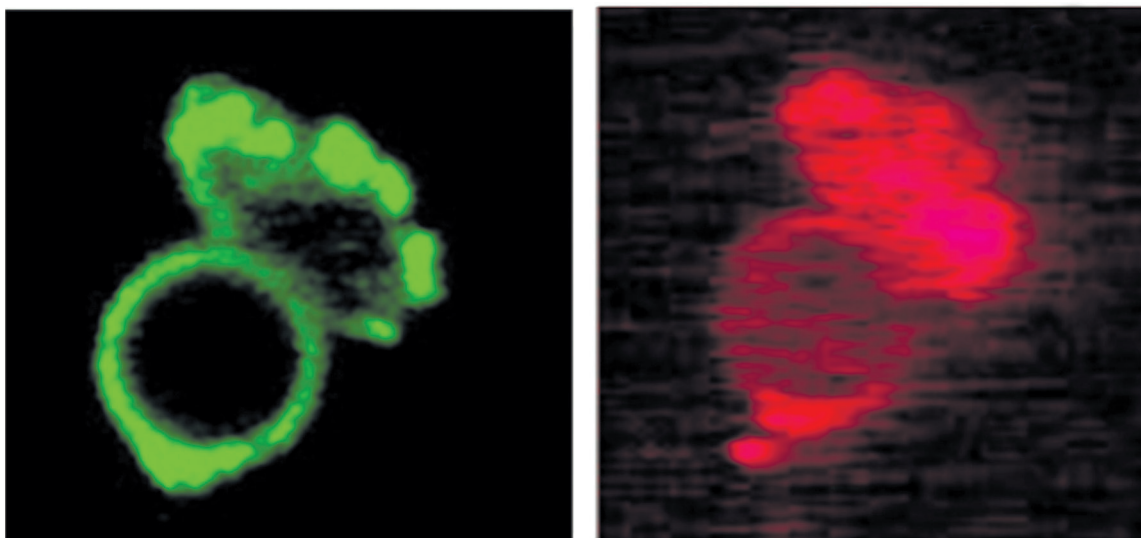


Рис. 5. Микрофотографии нейтрофила в культуре спленоцитов, который находится в стадии нетоза – выброса сети ДНК, окруженной NAD(P)H-оксидазными комплексами – (флуорофор – AnnexinV-FITC(*а*) и 7AAD (*б*)). Конфокальный микроскоп с увеличением 100х.

тельно-восстановительная функция комплекса NADPH увеличивается. В то же время ANa в сочетании с H_2O_2 может рассматриваться в качестве потенциального противоопухолевого препарата, вызывающего быстрый апоптоз (>70%) опухолевых клеток. Ранее было показано, что ANa снижает антиапоптотические белки семейства Bcl-2, воздействуя на митохондриальные пути апоптоза клеток.

В суспензии спленоцитов мышей были обнаружены нейтрофилы, которые находились в стадии нетоза (net – сеть), т.е. связаны с выбросом NAD(P)H-оксидазного комплекса (рис. 5), совместно с обволакиванием микроорганизмов и бактерий сетью ДНК. При этом бактерии, как известно, разрушаются с помощью супероксида или пероксида водорода.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метод флуоресценции в клетках спленоцитов позволил проследить за развитием апоптоза и оценить изменение числа флуоресцирующих клеток с кофактором FAD и клеток с ферментными NAD(P)H-оксидазными комплексами под действием анфена Na и пероксида водорода. Следует отметить, что в клетках мышей с карциномой Льюис было обнаружено многократное увеличение автофлуоресценции FAD как в контрольных образцах, так и при усилении апоптоза, что может быть характерным для животных опухоленосителей. Ранее в работе [18] было показано, что соот-

ношение эндогенных кофакторов FAD и NAD(P)H может рассматриваться в качестве метаболической характеристики раковых заболеваний, а также позволяет оценить воздействие противоопухолевых препаратов. Мы предполагаем, что сложный NAD(P)H-оксидазный комплекс NOX [19–21], может менять локализацию при развитии апоптоза. Так, при начальной стадии апоптоза в ряде клеток наблюдается ровная граница мембраны спленоцита, а при воздействии анфена натрия и пероксида водорода число апоптотических клеток, содержащих гранулы NOX, возрастает. Возможно, что следом за экспозицией фосфадитилсерина, происходит экспозиция NAD(P)H-оксидазного комплекса, вследствие чего наблюдаются выступающие на поверхность мембраны гранулы, окрашенные зеленым цветом (флуорофор Annexin V-FITC).

Наше исследование выполнено по теме, утвержденной Минобрнауки и высшего образования Российской Федерации (minobrnauki.gov.ru), 44.4. “Комплексное изучение механизмов и эффектов действия природных и синтетических антиоксидантов, противоопухолевых препаратов (химические и физические факторы). Изучение биологических механизмов старения”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Beloborodova N.V. // General Reanimatology. 2019. V. 15. № 6. P. 62; doi:10.15360/1813-9779-2019-6-62-79

2. *Binyukov V.I., Mil E.M., Matienko L.I., Albantova A.A., Goloshchapov A.N.* // *Micro (MDPI)*. 2023. V. 3. № 2. P. 382;
<http://doi.org/10.3390/micro3020026>
3. *Матиенко Л.И., Миль Е.М., Бинюков В.И.* // *Хим. физика*. 2020. Т. 39. № 6. С. 87;
doi: 10.31857/S0207401X20060084
4. *Mcintosh J.R.* // *J. Cell Biol.* 2001. V. 153. No 6. P.25;
doi: 10.1083/jcb.153.6.f25
5. *Захаров Н.С., Попова А.Н., Захаров Ю.А., Пугачёв В.М., Руссаков Д.М.* // *Хим. физика*. 2022. Т. 41. № 7. С. 84;
doi: 10.31857/S0207401X22070172
6. *Ткачук В.А., Тюрин-Кузьмин П.А., Белоусов В.В., Воротников А.В.* // *Биол. мембраны*. 2012. Т. 29. № 1–2. С. 21.
7. *Русина И.Ф., Вепринцев Т.Л., Васильев Р.Ф.* // *Хим. физика*. 2022. Т.41. № 2. С. 12;
<http://doi.org/10.31857/S0207401X22020108>
8. *Герасимов Н.Ю., Неврова О.В., Жигачева И.В., Генерозова И.П., Голощапов А.Н.* // *Хим. физика*. 2023. Т. 42. № 1. С. 22;
doi: 10.31857/S0207401X23010041
9. *Садыков Р.А., Хурсан С.Л., Суханов А.А., Кучин А.В.* // *Хим. физика*. 2023. Т. 42. № 12. С. 3;
doi: 10.31857/S0207401X23120099
10. *Миль Е.М., Бинюков В.И., Ерохин В.Н., Албантова А.А., Володькин А.А., Голощапов А.Н.* // *Цитология*. 2020. Т. 62. № 7. С. 503;
doi: 10.31857/S0041377120070032
11. *Ерохин В.Н., Кременцова А.В., Семенов В.А., Бурлакова Е.Б.* // *Изв. АН. Сер. биол.* 2020. № 5. С. 583.
12. *Миль Е.М., Бинюков В.И., Ерохин В.Н.* // *Докл. АН*. 2018. Т. 482. № 5. С. 598.
13. *Becker W.* // *J. Microsc.* 2012. V. 247. No 2. P. 119;
doi: 10.1111/j.1365-2818.2012.03618.x
14. *Druzkova I.N., Shirmanova M.V., Lukina M.M. et al.* // *Cell Cycle*. 2016. V. 15. № 9. P. 1257;
doi: 10.1080/15384101.2016.1160974
15. *Alen L-A.H.* // *Methods Molec. Biol.* 2007. V. 412. P. 273;
doi:10.1007/978-1-59745-467-4_18
16. *Rokutan K., Kawahara T., Kuwano Y. et al.* // *Antioxidants Redox Signaling*. 2006. V. 8. № 9–10. P. 1573;
doi:10.1089/ars.2006.8.1573
17. *Ma M.W., Wang J., Zhang Q. et al.* // *Mol. Neurodegeneration*. 2017. № 12. P. 7;
<https://doi.org/10.1186/s13024-017-0150-7>
18. *Lukina M. M., Dudenkova V. V., Ignatova N. I. et al.* // *Biochim. Biophys. Acta – Genetic Subj.* 2018. V. 1862. № 8. P. 1693;
doi: 10.1016/j.bbagen.2018.04.021
19. *Babkina A.S.* // *General Reanimatology*. 2019. V. 15. № 6. P. 50;
<https://doi.org/10.15360/1813-9779-2019-6-50-61>
20. *Vermot A., Petit-Härtlein I., Smith S.M.E., Fieschi F.* // *Antioxidants (Basel)* 2021. V. 10. № 6: P. 890;
doi: 10.3390/antiox10060890
21. *Bedard K., Krause K.H.* // *Physiol. Rev.* 2007. V. 87. № 1. P. 245;
doi:10.1152/physrev.00044.20

DETERMINATION OF THE CONTENT OF FAD COFACTOR AND NAD(P)H-OXIDASE COMPLEXES IN MOUSE SPLENOCYTES AND LEWIS CARCINOMA CELLS UNDER CONDITIONS OF APOPTOSIS BY CONFOCAL MICROSCOPY METHOD

E. M. Mil¹, A. A. Albantova^{1*}, L. I. Matienko¹,
A. N. Goloshchapov¹, M. A. Korovin¹, V. V. Kuvyrkova¹

¹*Emanuel Institute of Biochemical Physics Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

**E-mail: albantovaaa@mail.ru*

In this work, using fluorescence and confocal microscopy, we studied the content of the cofactor FAD and enzymatic NAD(P)H-oxidase complexes (with fluorophores AnnexinV-FITC, 7-AAD (7-aminoactinomycin D), EtBr) under conditions of apoptosis caused by sodium anphen with hydrogen peroxide in healthy mouse splenocytes and Lewis carcinoma tumor cells. The use of fluorescence microscopy allows observing and quantifying the apoptotic effect of sodium anphen and hydrogen peroxide, and visualization of metabolic changes in the cell, including increased fluorescence of FAD in tumor cells and NAD(P)H-oxidase complexes in splenocytes. The data obtained indicate the possibility of using sodium anphen in combination with hydrogen peroxide as an antitumor drug acting on certain types of cells.

Keywords: sodium anphen, Lewis Carcinoma cells, NAD(P)H, FAD.

REFERENCES

1. N.V. Beloborodova, General Reanimatology **15**, 62 (2019);
DOI:10.15360/1813-9779-2019-6-62-79
2. V.I. Binyukov, E.M. Mil, L.I. Matienko, et al., Micro (MDPI) **3**, 382 (2023);
<http://doi.org/10.3390/micro3020026>
3. L.I. Matienko, E.M. Mil, V.I. Binyukov, Russ. J. Phys. Chem. B **14**, 559 (2020);
<https://doi.org/10.1134/S1990793120030227>
4. J.R. McIntosh, J. Cell Biol., **153**, 25 (2001);
<https://doi.org/10.1083/jcb.153.6.F25>
5. N.S. Zakharov, A.N. Popova, Yu.A. Zakharov, et al., Russ. J. Phys. Chem. B **16**, 780 (2022);
DOI:10.1134/s1990793122040170
6. V.A. Tkachuk, P.A. Tyurin-Kuzmin, V.V. Belousov, et al., Biological membranes, **29**, 21 (2012) (in Russian).
7. I.F. Rusina, T.L. Veprintsev, R.F. Vasiliev, Russ. J. Phys. Chem. B **16**, 50 (2022);
<https://doi.org/10.1134/S1990793122010274>
8. N.Yu. Gerasimov, O.V. Nevrova, I.V. Zhigacheva, et al., Russ. J. Phys. Chem. B **17**, 135 (2023);
DOI:10.1134/S1990793123010049
9. R.A. Sadykov, S.L. Khursan, A.A. Sukhanov, et al., Russ. J. Phys. Chem. B **17**, 1251 (2023);
DOI:10.1134/S1990793123060209
10. E.M. Mil, V.I. Binyukov, V.N. Erokhin, et al., Cytology **62**, 503 (2020) (in Russian);
DOI:10.31857/S0041377120070032
11. V.N. Erokhin, A.V. Kremontsova, V.A. Semenov, et al., Bull. Russ. Acad. Sci., Biochemistry No 5, 583 (2020) (in Russian).
12. E.M. Mil, V.I. Binyukov, V.N. Erokhin, Dokl. Chem. **482**, 598 (2018) (in Russian).
13. W. Becker, J. Microscopy **247**, 119 (2012);
DOI:10.1111/j.1365-2818.2012.03618.x
14. I.N. Druzhkova, M.M. Lukina, V.V. Dudenkova, et al., Cell Cycle **15**, 1257 (2016);
DOI:10.1080/15384101.2016.1160974
15. N.J. Clifton, Methods in molecular biology **412**, 273 (2007);
DOI:10.1007/978-1-59745-467-4_18
16. K. Rokutan, T. Kawahara, Y. Kuwano, et al., Antioxid. Redox. Signal **8**, 1573 (2006);
DOI:10.1089/ars.2006.8.1573
17. M.W. Ma, Wang J., Zhang Q., et al., Molecular Neurodegeneration No 12, 7 (2017);
<https://doi.org/10.1186/s13024-017-0150-7>
18. M.M. Lukina, V.V. Dudenkova, N.I. Ignatova, et al., Biochim. Biophys. Acta - Genetic Subj. **1862**, 1693 (2018);
DOI:10.1016/j.bbagen.2018.04.021
19. A.S. Babkina, General Reanimatology **15**, 50 (2019);
<https://doi.org/10.15360/1813-9779-2019-6-50-61>
20. A. Vermot, I. Petit-Härtlein, S.M.E. Smith, et al., Antioxidants (Basel) **10**, 890 (2021);
DOI:10.3390/antiox10060890
21. K. Bedard, K.H. Krause, Physiol. Rev. **87**, 245 (2007);
DOI:10.1152/physrev.00044.2005