

ДОЛГОЖИВУЩИЕ РАДИКАЛЫ АМИНОКИСЛОТ, ИНДУЦИРУЕМЫЕ РЕНТГЕНОВСКИМ ИЗЛУЧЕНИЕМ, ЯВЛЯЮТСЯ ИСТОЧНИКОМ ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА В ВОДНОЙ СРЕДЕ

© 2010 г. С.В. Гудков* **, С.А. Гармаш* **, О.Э. Карп*, В.С. Смирнова*,
А.В. Черников*, В.И. Брусков* **

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, Пущино Московской области;

**Пущинский государственный университет, 142290, Пущино Московской области

E-mail: bruskov_vi@rambler.ru

Поступила в редакцию 13.05.10 г.

Методом измерения люминесценции, индуцированной рентгеновским излучением, проведено сравнение образования долгоживущих радикалов в растворе казеина и его гидролизата с эквимоллярной смесью аминокислот и показано, что свободные аминокислоты, входящие в состав белка, образуют долгоживущие радикалы. Выявлено длительное свечение в видимой области спектра ряда аминокислот (Leu, Ile, Val, Ser, Trp, Met, Pro, Arg, Gly, Phe), индуцированное воздействием рентгеновского излучения, как свидетельство образования долгоживущих радикалов этими аминокислотами. Времена полужизни аминокислотных радикалов составляют несколько часов. Растворение облученных сухих аминокислот, обладающих длительной люминесценцией, приводит к образованию перекиси водорода в водной среде.

Ключевые слова: долгоживущие радикалы аминокислот, рентгеновское излучение, люминесценция, перекись водорода.

Значительная часть повреждений в клетке, индуцированных ионизирующей радиацией, образуется в результате окислительного стресса. Он обусловлен образованием активных форм кислорода (АФК) в результате радиолиза воды. Так как АФК (кроме перекиси водорода) являются короткоживущими продуктами, то этот процесс происходит непосредственно во время облучения. АФК вызывают окислительную модификацию и повреждение различных биологических молекул, включая нуклеиновые кислоты, белки, липиды и др. В настоящее время установлено, что белки являются главной и более чувствительной мишенью, чем ДНК и липиды, при воздействии гидроксильного радикала (ОН[•]) – наиболее реакционно-способной из АФК [1]. Следует учесть также, что содержание белка, составляющего около 15% массы клетки, является наибольшим среди других компонентов клетки после воды.

Повреждение белков ионизирующей радиацией в присутствии кислорода приводит к воз-

никновению ряда окисленных продуктов [2]. Среди них важную роль отводят образованию в белке гидропероксидов [3]. Методом ЭПР-спектроскопии установлено, что при воздействии высоких доз ионизирующей радиации (кГр) в клетках и в растворах различных белков образуются долгоживущие радикалы белков (ДЖРБ), времена полужизни которых превышают 20 ч [4–6]. Для регистрации этих радикалов нами был использован более чувствительный подход – метод измерения собственной хемилюминесценции белка [7]. Этот метод дал возможность зарегистрировать ДЖРБ при дозах облучения от 1 до 10 Гр. Время полужизни радикалов белков (овальбумина, бычьего сывороточного альбумина (БСА), казеина), установленное этим методом при данных дозах облучения, составляло около 3–5 ч.

Долгоживущие радикалы белков *in vitro* осуществляют перенос окислительных повреждений с белка на ДНК с образованием в ней 8-оксогуанина [7–9], а *in vivo* они вызывают мутации и приводят к трансформации клеток [4,5]. Эти радикалы в небольших количествах образуются в клетках животных и растений при нормальной жизнедеятельности [10]. Не исключено, что ДЖБР вовлечены в процесс кле-

Сокращения: АФК – активные формы кислорода, ДЖРБ – долгоживущие радикалы белков, БСА – бычий сывороточный альбумин, ДЖРА – долгоживущие радикалы аминокислот.

точного старения и инициируют ряд болезней человека [11]. Были получены данные о том, что ДЖРБ могут длительное время осуществлять генерацию АФК ($^1\text{O}_2$, HO_2^\cdot , H_2O_2 и OH^\cdot) в водном окружении *in vitro* [12]. Именно этот процесс может быть причиной достаточно длительного протекания окислительного стресса после воздействия ионизирующей радиацией.

В данной работе исследована возможность образования долгоживущих радикалов свободных аминокислот и показано, что сами аминокислоты образуют долгоживущие радикалы, которые, как и ДЖРБ, длительное время продвигаются в растворе перекись водорода.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Аминокислоты Arg, Cys, Phe, Val, Thr (Ajinomoto, Япония), His (Matrix, Германия), Pro (Fluka, Япония), Gly (Panreac, Испания), Met, Ile, Ser, Leu (Sigma, США) использовали в экспериментах без дополнительной очистки. Также использовали трис, 4-йодофенол, казеин (Sigma, США), гидролизат казеина солянокислый (Федеральный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии (ФНЦ ПМБиБ), Оболенск, Россия), NaCl, люминол (AppliChem, Германия) и H_2O_2 (Химмед, Россия). Все растворы готовили с использованием бидистиллированной воды, насыщенной атмосферными газами в течение 1 сут, с рН 5,6 и удельной проводимостью 120 мкСм/м.

Облучение растворов объемом 10 мл проводили во флаконах из бескальевого стекла на рентгеновской установке РУТ-15 (Мосрентген, Россия) при мощности дозы 1 Гр/мин (фокусное расстояние 0,375 м, сила тока 20 мА, напряжение 200 кВ).

Исследование долгоживущих радикалов аминокислот (ДЖРА) казеина и его гидролизата осуществляли методом измерения хемиллюминесценции растворов аминокислот, индуцированной рентгеновским излучением, с использованием высокочувствительного хемиллюминометра «Биотокс-7АМ» (Россия) [7]. Измерения проводили в темноте, при комнатной температуре, в 20-миллилитровых полипропиленовых флаконах для жидкостного сцинтилляционного счета (Beckman, США). Казеин и солянокислый гидролизат казеина растворяли до конечной концентрации 0,4 г/л в водном растворе 0,9% NaCl, при этом значение рН раствора было близко к нейтральному значению. Эквивалентность растворов казеина и его гидролизата контролировали по поглощению ароматических аминокислот при 280 нм. L-аминокислоты рас-

творяли в 20 мМ трис-HCl буфере, рН 8,5, в концентрациях 1; 5 и 10 мМ. После воздействия рентгеновским излучением все образцы выдерживали в темноте при комнатной температуре в течение 1 ч, а затем измеряли люминесценцию образцов через 1; 3; 5 и 7 ч после облучения. В качестве контроля использовали аминокислоты, казеин и его гидролизат, не подвергавшиеся воздействию рентгеновского излучения, а также облученные в дозах 10, 20 Гр и необлученные среды для растворения данных соединений.

Для количественного определения H_2O_2 использовали высокочувствительный метод усиленной хемиллюминесценции в системе люминол-*p*-йодофенол-пероксидаза [13,14]. В качестве хемиллюминометра использовали жидкостный сцинтилляционный счетчик «Бета-1» (Украина) для измерения β -излучения, работающий в режиме счета одиночных фотонов (без схемы совпадений). Чувствительность метода позволяла определять H_2O_2 в концентрации $< 1\text{нМ}$. Содержание H_2O_2 рассчитывали используя калибровочные графики зависимости интенсивности хемиллюминесценции от известной концентрации перекиси водорода в растворе. Исходную концентрацию H_2O_2 , используемую для калибровки, определяли спектрофотометрически при длине волны 240 нм с использованием коэффициента молярного поглощения $43,6\text{ М}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$.

На графиках и в таблице представлены средние значения и их стандартные ошибки для трех-пяти независимых экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Роль пространственной структуры белка в образовании долгоживущих радикалов. Для исследования роли пространственной структуры белка в образовании долгоживущих радикалов проведено сравнение долгоживущих радикалов, индуцированных рентгеновским облучением, для раствора казеина и его гидролизата с эквивалентной смесью аминокислот. Рентгеновское облучение этих растворов в дозе 50 Гр приводило к уменьшению поглощения растворов при 280 нм на 20–40% для казеина и его гидролизата через трое суток, свидетельствуя о частичном разрушении триптофана. При исследовании кинетики уменьшения хемиллюминесценции гидролизата казеина при облучении в дозе 50 Гр было обнаружено существование долгоживущих радикалов с временем полужизни около 3,5 часов. При этом интенсивность хемиллюминесценции в облученном гидролизате казеина была приблизительно в пять раз выше, чем в казеине.

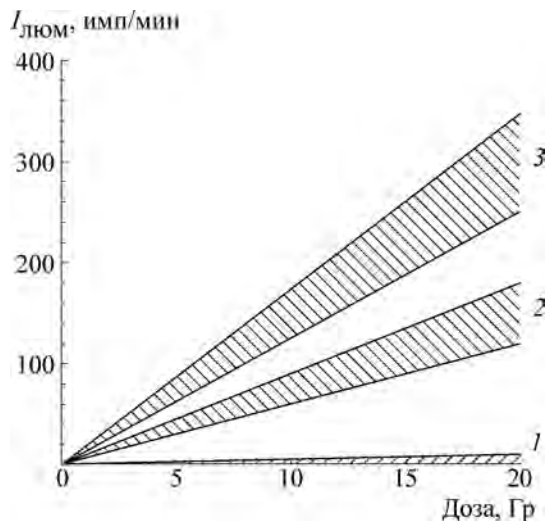


Рис. 1. Пределы изменения интенсивности люминесценции ($I_{\text{люм}}$, имп/мин), вызванной рентгеновским облучением водных растворов свободных аминокислот, в зависимости от дозы облучения. Группы облученных аминокислот в зависимости от степени их люминесценции: 1 – Cys; 2 – Arg, Met, Pro, Gly, Phe; 3 – Leu, Ile, Val, Ser, Thr.

Люминесценция аминокислот, индуцированная воздействием рентгеновского излучения. Долгоживущие радикалы аминокислот. Полученные для гидролизата казеина данные свидетельствовали об образовании долгоживущих радикалов в растворе, состоящем из смеси аминокислот. Поэтому с помощью хемилюминесценции была исследована возможность образования долгоживущих радикалов в растворе отдельных облученных аминокислот. Были исследованы следующие аминокислоты: Gly, Cys, Arg, Met, Pro, Ser, Thr, Phe, Leu, Ile, Val. По величине индуцированной рентгеновским излучением люминесценции эти аминокислоты можно разделить на три группы (рис. 1). Группа 1 – Cys, крайне слабо люминесцирующая аминокислота. Группа 2 – умеренно люминесцирующие аминокислоты (Arg, Met, Pro, Gly, Phe). Группа 3 – аминокислоты, обладающие наиболее интенсивной люминесценцией (гидроксилсодержащие аминокислоты (Ser, Thr) и аминокислоты с наиболее массивными гидрофобными алифатическими группами (Leu, Ile, Val)).

Для всех исследованных аминокислот наблюдалась линейная зависимость люминесценции от поглощенной дозы ионизирующего излучения. При этом величина индуцированной люминесценции аминокислот уменьшалась с течением времени. На рис. 2 приведены отдельные примеры такой зависимости, которая позволяет оценить времена полужизни долгоживущих радикалов аминокислот. Времена полужизни этих

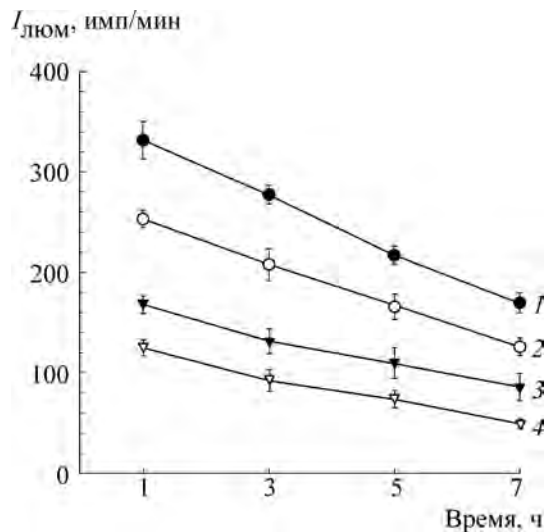


Рис. 2. Зависимости интенсивности люминесценции ($I_{\text{люм}}$, имп/мин) некоторых аминокислот, подвергнутых воздействию рентгеновского излучения в дозе 20 Гр, от времени: 1 – Leu; 2 – Trp; 3 – Arg; 4 – Phe.

радикалов при концентрациях 1–10 мМ были следующими: Phe около 2–4 ч; Pro около 4–5 ч; Arg, Thr, Val около 5–6 ч; Met, Ser, Ile, Leu около 6 ч. Для всех аминокислот, кроме Ser, увеличение их концентрации приводило к более интенсивной люминесценции. Для Ser интенсивность люминесценции увеличивалась в диапазоне концентрации 0,1–1 мМ; при концентрации 1 мМ наблюдали ее максимум, а при дальнейшем увеличении концентрации до 10 мМ происходило уменьшение люминесценции (рис. 3).

Образование перекиси водорода при растворении облученных аминокислот. Чтобы выяснить возможную роль отдельных аминокислот в составе облученного белка в генерации H_2O_2 [12], была исследована способность различных облученных рентгеновскими лучами аминокислот к генерации перекиси водорода.

Аминокислоты в сухом виде (Arg, Val, His, Gly, Ile, Leu, Met, Pro, Ser, Thr, Phe, Cys) облучали рентгеновскими лучами в дозах 10 и 20 Гр. Из них готовили растворы, соответствующие 1, 5 и 10 мМ аминокислоты, и определяли содержание H_2O_2 , как и в случае облученного белка. Результаты проведенного исследования представлены в таблице. По способности к генерации H_2O_2 аминокислоты можно разделить на три группы: 1) не способные к ее генерации (Cys); 2) вызывающие генерацию умеренных количеств перекиси водорода (Gly, Phe, Arg, Met, Pro, Thr); 3) приводящие к наибольшей продукции перекиси водорода (Ile, His,

Образование перекиси водорода в водных растворах под влиянием аминокислот, облученных рентгеновским излучением

Аминокислота	Концентрация аминокислот, мМ		
	1	5	10
	Концентрация H ₂ O ₂ , нМ	Концентрация H ₂ O ₂ , нМ	Концентрация H ₂ O ₂ , нМ
10 Гр			
Arg	0,7 ± 0,2	0,9 ± 0,2	1,0 ± 0,2
Gly	0,9 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,7 ± 0,2
His	2,8 ± 0,3	3,2 ± 0,2	4,3 ± 0,4
Ile	2,4 ± 0,4	3,8 ± 0,4	3,6 ± 0,2
Leu	4,5 ± 0,6	5,6 ± 0,3	5,6 ± 0,4
Met	0,3 ± 0,1	0,8 ± 0,2	1,5 ± 0,2
Phe	0,7 ± 0,2	0,9 ± 0,1	0,6 ± 0,1
Pro	0,9 ± 0,2	0,6 ± 0,1	1,6 ± 0,1
Ser	4,3 ± 0,5	3,6 ± 0,2	2,1 ± 0,2
Thr	1,4 ± 0,2	1,9 ± 0,3	2,4 ± 0,2
Val	6,0 ± 0,5	6,5 ± 0,5	7,3 ± 0,6
20 Гр			
Arg	1,3 ± 0,2	1,8 ± 0,2	2,1 ± 0,2
Gly	1,6 ± 0,3	3,2 ± 0,2	3,5 ± 0,2
His	5,0 ± 0,8	6,9 ± 0,5	8,6 ± 0,4
Ile	4,3 ± 0,4	7,6 ± 0,5	7,1 ± 0,3
Leu	8,5 ± 0,5	9,7 ± 0,6	9,3 ± 0,5
Met	0,5 ± 0,1	1,0 ± 0,2	2,8 ± 0,2
Phe	1,5 ± 0,2	1,6 ± 0,2	1,5 ± 0,2
Pro	0,9 ± 0,2	1,6 ± 0,2	2,9 ± 0,1
Ser	8,6 ± 0,6	5,7 ± 0,3	3,9 ± 0,3
Thr	3,3 ± 0,2	4,0 ± 0,4	5,0 ± 0,3
Val	8,1 ± 0,7	7,8 ± 0,7	6,9 ± 0,4

Val, Leu, Ser). Продукция перекиси водорода линейно зависит от поглощенной дозы в диапазоне 10–20 Гр для исследованных аминокислот: Arg, His, Gly, Ile, Leu, Met, Pro, Ser, Thr, Phe. В случае Val дозовая зависимость близка к линейной при концентрации 1 мМ и не зависит от дозы при концентрациях 5 и 10 мМ.

Концентрационная зависимость образования H₂O₂ различными аминокислотами при концентрациях 1, 5 и 10 мМ была качественно различной. Для Arg, His, Met, Pro и Thr наблюдали слабо выраженное увеличение продукции H₂O₂ с ростом концентрации аминокислот, наиболее существенное в случае метионина. Для Gly и Ile имело место увеличение продукции

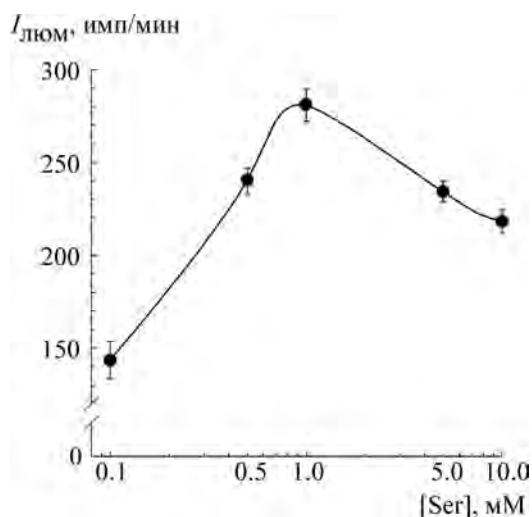


Рис. 3. Зависимость интенсивности люминесценции (I_{люм}, имп/мин) Ser, подвергнутого воздействию рентгеновского излучения в дозе 20 Гр, от его концентрации.

H₂O₂ с насыщением, а для Phe концентрационная зависимость отсутствовала. Для Val при 20 Гр и Ser при дозах 10 и 20 Гр наблюдали уменьшение генерации H₂O₂ при увеличении концентрации этих аминокислот (таблица). В целом эти результаты свидетельствуют о том, что используемые концентрации (1 мМ и выше) являются большими, приводя к насыщению данного процесса и слабой концентрационной зависимости. Линейный рост зависимости продукции H₂O₂ от концентрации Ser можно было ожидать при более низких концентрациях аминокислоты. Действительно, при концентрациях Ser 0,1, 0,5 и 1 мМ наблюдали близкое к линейному увеличению продукции H₂O₂ с ростом концентрации облученной аминокислоты (рис. 3). Таким образом, способность облученного серина к генерации перекиси водорода, в зависимости от концентрации, имеет двухфазный характер – при концентрациях от 0,1 до 1 мМ наблюдается ее увеличение, а при концентрациях от 1 до 10 мМ – уменьшение. Для выяснения такой аномальной концентрационной зависимости при больших концентрациях Ser было исследовано его влияние на распад экзогенной перекиси водорода. К 20 нМ перекиси водорода в бидистиллированной воде добавляли 10 мМ Ser и инкубировали в течение 15, 30 и 60 мин при комнатной температуре. При этом наблюдали двухфазную зависимость содержания перекиси водорода от времени. Через 15 и 30 мин происходило уменьшение ее концентрации примерно на 15%. Однако через 60 мин концентрация H₂O₂ снова увеличивалась по сравнению с начальным значением на 10–

15%. Таким образом, Ser вначале обладает каталазной активностью, приводящей к уменьшению концентрации перекиси водорода в воде, в то время как дальнейший рост ее содержания, возможно, обусловлен обнаруженной нами ранее тепловой генерацией H_2O_2 в водных растворах [13,15–18].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Опубликованные данные свидетельствуют о том, что под воздействием активных форм кислорода, индуцируемых различными факторами среды, происходит образование долгоживущих радикалов белков, которые играют важную роль в продлении внутриклеточного окислительного стресса [1–12]. При этом установлено, что окислительная модификация свободных аминокислот ионизирующей радиацией включает механизмы, аналогичные окислению аминокислот в белках [19]. Установлено, что образование долгоживущих радикалов сывороточного альбумина быка, индуцированное рентгеновским облучением сухих образцов, приводит к длительной генерации H_2O_2 в водном окружении *in vitro* при растворении белка [12].

Результаты, полученные для казеина и его гидролизата, свидетельствуют о том, что способностью образовывать долгоживущие радикалы обладают сами аминокислоты, входящие в состав белка, а пространственная структура белка, по-видимому, не сказывается существенным образом на их времени жизни. Более того, не исключено, что пространственная структура белка защищает значительную часть аминокислот, вероятно, входящих в интерьер белковой молекулы, от воздействия рентгеновского излучения, и окисляются преимущественно аминокислоты, находящиеся на поверхности белка, поскольку интенсивность люминесценции гидролизата казеина в несколько раз превышает интенсивность люминесценции этого белка. Об этом могут свидетельствовать и полученные методом ЭПР данные о значительном увеличении количества свободных радикалов при γ -облучении денатурированного белка [20]. Этот результат частично может быть обусловлен большей доступностью аминокислот для образования радикалов при нарушении глобулярной структуры в результате денатурации белка.

Образование долгоживущих радикалов аминокислот (определяемое по их люминесценции) не коррелирует с данными об образовании H_2O_2 и OH-радикалов в водных растворах аминокислот под воздействием ретгеновского излучения [18,21]. Люминесценция долгоживущих аминокислотных радикалов и генерация ими

H_2O_2 не связана с образованием гидропероксидов, так как, согласно опубликованным данным, Met, Ser, Thr не образуют гидропероксиды [22]. Однако эти аминокислоты находятся в группе и наиболее люминесцирующих, и генерирующих перекись водорода в наибольшей степени.

В результате проведенного исследования выяснено, что не только белковые молекулы, но и ряд изученных аминокислот (все, кроме Cys) способны к образованию долгоживущих радикалов, которые продуцируют в растворе активные формы кислорода, регистрируемые по образованию перекиси водорода. Возможно, образование аминокислотных радикалов происходит, главным образом, в результате отрыва протона от α -углеродного атома [12]. Однако на этот процесс может влиять боковой аминокислотный остаток, особенно в алифатических аминокислотах Leu, Val, в меньшей степени в Ile, а также в Ser, His. Не исключено, что в случае аминокислот Leu, Ile, Ser, Val, His происходит дополнительное образование радикалов за счет отрыва протонов непосредственно от бокового остатка аминокислоты (β -, γ - и δ -групп). Полученные данные соответствуют закономерностям, согласно которым отрыв протона от боковых остатков аминокислот изменяется в порядке: $CH > CH_2 > CH_3$, и чем эти группы ближе к аминокислотному остову, тем они менее реакционно-способны [23]. Поскольку Ser при облучении продуцирует наибольшее количество H_2O_2 и гидроксильных радикалов при нагревании [18], не исключено, что происходит также отрыв гидроксильной группы.

Таким образом, полученные данные позволяют предполагать, что долгоживущие радикалы аминокислот, наряду с долгоживущими радикалами белка, могут оказывать влияние на процесс развития радиационного поражения в организме животных и способствовать длительному протеканию окислительного стресса *in vivo*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, гранты 07-04-00406-а, 10-04-00800-а; 10-04-00949-а и Программы президента Российской Федерации для поддержки молодых российских ученых (МК-108.2010.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. Du and M. Gebicki, Int. J. Biochem. Cell Biol. **36**, 2334 (2004).
2. E. R. Stadtman, Annu. Rev. Biochem. **62**, 797 (1993).
3. M. J. Davies, S. Fu, and R. N. Dean, Biochem. J. **305**, 643 (1995).

4. S. Koyama, S. Kodama, K. Suzuki, et al., *Mutat. Res.* **421**, 45 (1998).
5. J. Kumagai, M. Nakama, T. Miyazaki, et al., *Radiat. Phys. Chem.* **64**, 293 (2002).
6. J. Kumagai, K. Masui, Y. Itagaki, et al., *Radiat. Res.* **160**, 95 (2003).
7. С. В. Гудков, И. Н. Штаркман, А. В. Черников и др., *Докл. РАН* **413**, 261 (2007).
8. C. Luxford, R. T. Dean, and M. J. Davies, *Chem. Res. Toxicol.* **34**, 44 (2000).
9. A. Furukawa, Y. Hiraku, S. Oikawa, et al., *Biochem. J.* **388**, 813 (2005).
10. T. Miyazaki, A. Morikawa, J. Kumagai, et al., *Radiat. Phys. Chem.* **65**, 151 (2002).
11. C. L. Hawkins and M. J. Davies, *Biochim. Biophys. Acta* **1504**, 196 (2001).
12. С. В. Гудков, С. А. Гармаш, И. Н. Штаркман и др., *Докл. РАН* **430**, 123 (2010).
13. V. I. Bruskov, L. V. Malakhova, Zh. K. Masalimov, and A. V. Chernikov, *Nucl. Acids Res.* **30**, 1354 (2002).
14. S. V. Gudkov, I. N. Shtarkman, V. S. Smirnova, et al., *Radiat. Res.* **165**, 538 (2006).
15. В. И. Брусков, Ж. К. Масалимов и А. В. Черников, *Докл. РАН* **384**, 821 (2002).
16. В. И. Брусков, А. В. Черников, С. В. Гудков и Ж. К. Масалимов, *Биофизика* **48**, 1022 (2003).
17. В. С. Смирнова, С. В. Гудков, А. В. Черников и В. И. Брусков, *Биофизика* **50**, 243 (2005).
18. И. Н. Штаркман, С. В. Гудков, А. В. Черников и В. И. Брусков, *Биофизика* **53**, 5 (2008).
19. E. R. Stadtman and R. L. Levine, *Amino Acids* **25**, 207 (2003).
20. Л. А. Блюменфельд и Э. А. Калмансон, *Биофизика* **3**, 87 (1958).
21. И. Н. Штаркман, С. В. Гудков, А. В. Черников и В. И. Брусков, *Биохимия* **73**, 576 (2008).
22. S. Gebicki and J. M. Gebicki, *Biochem. J.* **289**, 743 (1993).
23. Z. I. Watts and C. J. Eatson, *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 11323 (2009).

Long-lived Radicals of Amino Acids Induced by X-Ray-Radiation Are the Source of Hydrogen Peroxide in Aqueous Medium

S.V. Gudkov^{* **}, S.A. Garmash^{* **}, O.E. Karp^{*}, V.S. Smirnova^{*},
A.V. Chernikov^{*}, and V.I. Bruskov^{* **}

^{*}*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

^{**}*Pushchino State University, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

The formation of long-lived radicals in the solutions of casein and its hydrolysate with an equimolar mixture of amino acids was compared by measuring the X-ray-induced chemiluminescence. It was shown that free amino acids constituting the protein produce long-lived radicals. It was demonstrated that some amino acids (Leu, Ile, Val, Ser, Trp, Met, Pro, Arg, Gly, Phe) emit light of visible spectrum over a long period of time after the irradiation, which indicates the generation of long-lived radicals of these amino acids. The half-life times of these radicals are several hours. Dissolving irradiated dry amino acids capable of luminescing over a long time gives rise to the formation of hydrogen peroxide in aqueous medium.

Key words: long-lived radicals of amino acids, X-ray irradiation, luminescence, hydrogen peroxide