

УДК 577.152.1.001.57 + 541.515:57.042.2

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ОЦЕНКИ ОБЩЕЙ АНТИ-ОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ ЧЕЛОВЕКА**Д.И. Метелица¹, Н.В. Пивень², О.И. Шадыро¹, Ю.А. Григоренко¹,
Л.Н. Лухверчик², Н.П. Денисевич³**¹ *НИИ физико-химических проблем Белорусского государственного университета, Минск*² *Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск*³ *Спецполиклиника РУП «ПО «Беларуськалий», Солигорск***Введение**

Реакции свободнорадикального окисления являются важной составной частью нормального клеточного метаболизма и постоянно протекают в организме человека и животных. В биохимических процессах образуются и играют важную роль кислородсодержащие радикалы $O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} (RO^{\cdot}), HO_2^{\cdot} (RO_2^{\cdot}) [1-10]. Образующиеся продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ) участвуют в регуляции ионного транспорта и обновлении мембран клеток, биосинтезе гормонов, простагландинов, окислительном фосфорилировании и разрушении ксенобиотиков (чужеродных веществ и лекарств). В физиологических условиях клетки и ткани имеют вполне адекватную внутри- и внеклеточную защиту, противостоящую повышенному генерированию и разрушающему действию активных радикалов.

Ухудшение экологической обстановки в Беларуси, как и в других странах, химизация различных отраслей промышленности, сельского хозяйства и быта, пролонгированные стрессовые ситуации, злоупотребление алкоголем и курением приводят к тому, что в организме человека под влиянием этих факторов и радиоактивных загрязнений в несравненно большем количестве, чем в нормальных условиях, образуются активные радикалы и другие реакционноспособные вещества, существенно нарушающие нормальный ход обменных процессов [1-3, 9, 10].

При ослаблении антиоксидантной защиты (АОЗ) организма продукты свободнорадикального окисления (прежде всего ПОЛ) проявляют вместо физиологического – патогенный эффект [7, 9]. Патологические состояния, характеризующиеся повышенным образованием свободных радикалов и активацией ПОЛ, могут быть самостоятельными заболеваниями с характерной клинической картиной (лучевое поражение, химические отравления, авитаминоз Е), а также выступать в качестве одного из патогенетических звеньев самых различных заболеваний (ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, церебральная ишемия, сахарный диабет, воспалительные заболевания легких, печени, желчного пузыря, язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, ревматоидный артрит, катаракта, СПИД, болезнь Альцгеймера, злокачественные новообразования, патология беременности)[1, 2, 7, 9].

В связи с вышеизложенными актуальными проблемами современной биомедицинской химии и биотехнологии остаются следующие направления: оценка и измерение концентрации активных радикалов и скорости их инициирования *in vivo* и в адекватных модельных системах *in vitro*; количественная характеристика антиоксидантного статуса организма человека и животных, в частности общей антиоксидантной активности (ОАА) биологических жидкостей (плазмы и сыворотки крови, мочи, слюны и др.); синтез новых высокоэффективных ингибиторов свободнорадикальных процессов, включающих не только функциональные группы, ответственные за антирадикальную активность, но и группы с направленным специфическим действием на мембраны, межфазные переходы в них, на

клеточные рецепторы; установление связи структуры природных и синтетических антиоксидантов (ингибиторов) с их активностью в широком интервале концентраций от 10^{-18} до 10^{-2} М, часто определяющих механизм действия ингибиторов. Решением перечисленных задач мы с коллегами занимаемся более 15 лет.

ИНИЦИИРОВАНИЕ И ИНГИБИРОВАНИЕ РАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В СИСТЕМАХ «ГЕМСОДЕРЖАЩИЙ БИОКАТАЛИЗАТОР– H_2O_2 (ROOH)»

Прямое измерение концентрации свободных радикалов *in vitro* (и особенно *in vivo*), как правило, сильно затруднено [5, 8]. По этой причине до сих пор главным инструментом изучения инициирования свободнорадикальных процессов остается метод ингибиторов, основы которого созданы академиком Н.М. Эмануэлем и его учениками в 50-60-х годах [11-17]. Использование метода ингибиторов даже в сравнительно простых химических системах осложнено сольватацией радикалов и самих молекул ингибиторов [12]; трудности еще более возрастают при изучении количественных аспектов действия ингибиторов в биохимических системах [1-8, 16, 17]. Необходимость количественной характеристики инициирования радикалов в реальных условиях и потребность в быстром скрининге потенциальных ингибиторов (антиоксидантов) в сравнительно простых реакциях, генерирующих в мягких условиях (20-36°C, водные растворы) активные кислородсодержащие радикалы, обусловили интенсивное изучение *in vitro* многочисленных пар «гемсодержащий биокатализатор– H_2O_2 (ROOH)», где ROOH – органические гидропероксиды или гидроперекиси липидов [18-37]. В качестве биокатализаторов использованы гемин (железопроtopорфирин IX) [18-24], метмиоглобин и метгемоглобин [25, 26], пероксидаза из корней хрена (ПХ) [27-35] и метгемальбумины (комплексы гемина с бычьим сывороточным альбумином или сывороточным альбумином человека) [18-24, 36, 37].

В качестве акцепторов радикальных частиц, образующихся в перечисленных выше системах, применяли типичные субстраты пероксидаз – АБТС [25, 26], тетраметилбензидин (ТМБ) [18-22], *o*-фенилендиамин (ФДА) (рис.1) [24, 27-32] и другие ароматические амины [33]. Выбор в качестве субстратов-акцепторов радикалов АБТС, ТМБ и ФДА связан с тем, что окрашенные продукты их окисления имеют интенсивные полосы поглощения в видимой области спектра, которые не перекрываются с полосами поглощения биокатализаторов и других компонентов реакционных смесей (например, многочисленных ингибиторов), что обеспечивает надежный спектрофотометрический мониторинг скоростей окисления этих субстратов радикалами. В результате больших по объему, систематических кинетических исследований нами показано, что системы гемин– H_2O_2 , метмиоглобин– H_2O_2 , метгемоглобин– H_2O_2 , метгемальбумины– H_2O_2 (или ROOH) и ПХ– H_2O_2 при 20-37°C в водных растворах, содержащих органические соразтворители ДМФ, ДМСО или этанол, обеспечивают в оптимальных условиях высокие скорости инициирования радикалов порядка 10^{-7} - 10^{-6} М·с⁻¹, измеренные по накоплению продуктов окисления хромогенных субстратов АБТС, ТМБ и ФДА [18-37].

В пероксидазных системах ПХ– H_2O_2 при окислении АБТС, ТМБ и ФДА образуются катион-радикалы АБТС^{•+}, ТМБ^{•+} и радикал ФДА[•] в результате реакций субстратов с активными формами ПХ – PFe⁵⁺O²⁻ (соединение I) и PFe⁴⁺OH (соединение II), где P – порфириновое кольцо гема. В «псевдопероксидазных» системах метмиоглобин– H_2O_2 , метгемоглобин– H_2O_2 и метгемальбумин (MetHa)– H_2O_2 процесс окисления иницирует

оксиферрильное производное гемового железа $PFe^{4+}O$ по гомолитическому механизму [4, 32, 33, 38] и кислородсодержащие радикалы $HO\cdot$ и $HO_2\cdot$ [18, 19, 33].

Инициирование радикалов в системах биокатализатор– H_2O_2 ($ROOH$) может быть замедлено многочисленными ингибиторами, среди которых природные – флавоноиды [33, 34], α -токоферол [16, 17], его водорастворимый аналог – тролокс [25, 26] и синтетические соединения из ряда замещенных фенолов и пирокатехинов, производных замещенных *o*-аминофенолов, многоатомных фенолов, полифенолы и антиоксиданты нового поколения – полидисульфиды замещенных фенолов [18-33].

В наших работах [18-37] проведено сравнительное кинетическое исследование ингибирования окисления АБТС, ТМБ и ФДА в системах $PX-H_2O_2$ и $MetHa-H_2O_2$ с целью скрининга многочисленных антиоксидантов фенольной природы и отбора потенциальных ингибиторов-калибраторов из их числа для использования в тест-системах ОАА биологических жидкостей. Окисление трех субстратов в обеих системах в присутствии разных ингибиторов существенно различается: в накоплении продукта окисления ФДА не обнаружено периодов индукции независимо от природы использованного ингибитора, в то время как при окислении АБТС и ТМБ периоды индукции в присутствии одних ингибиторов не наблюдаются, а в присутствии других проявляются и по своей продолжительности зависят от начальной концентрации антиоксиданта. Характер ингибирования в системах $PX-H_2O_2$ и $MetHa-H_2O_2$ зависит от природы субстрата и ингибитора и, как следует из представления данных в координатах Лайнуивера-Берка, может быть конкурентным, неконкурентным, бесконкурентным или смешанным [32, 33]. Это означает, что в одних случаях субстрат и ингибитор конкурируют за связывание в активном центре биокатализатора и за активные радикальные частицы, в то время как в других конкуренция за место в активном центре реализуется лишь частично или отсутствует совсем, а субстрат и ингибитор конкурируют только за активные радикалы.

Независимо от типа ингибирования во всех случаях определены константы ингибирования K_i , в мкМ по методу Диксона или в случае его неприменимости по методу Корниш-Боудена [39]. Величины K_i отражают эффективность ингибиторов и меняются в широких пределах от нескольких мкМ до сотен мкМ в зависимости от субстрата и природы ингибитора. Следует помнить, что K_i по своей природе – эффективная величина, так как отражает не только реакционную способность ингибитора по отношению к активным радикалам, но и силу его взаимодействия с белковой глобулой биокатализатора, влияние на нее условий среды (рН, наличие и концентрация органических соразтворителей) и других факторов. Однако наша практика показала, что величины K_i во всех случаях являются адекватными количественными характеристиками эффективности изученных антиоксидантов. В тех случаях, когда в эксперименте наблюдали периоды индукции в образовании продуктов окисления АБТС и ТМБ в присутствии фенольных ингибиторов, были определены стехиометрические коэффициенты ингибирования f , означающие число радикалов, гибнущих на одной молекуле ингибитора (использован инструментарий теории метода ингибирования свободнорадикальных реакций [13, 14]).

В наших работах [18-37] определены величины K_i для многих пар АБТС–InH, ТМБ–InH и ФДА–InH в системах $PX-H_2O_2$ и $MetHa-H_2O_2$, которые сравнены между собой и обсуждены с позиций практической пригодности для использования в тест-системах ОАА биологических жидкостей в обзоре [33]. Практика показала, что для успешного определения ОАА сыворотки крови человека (СКЧ) необходимы ингибиторы-калибраторы умеренной эффективности, константы ингибирования которых K_i должны быть близки к их значениям для тролокса и находиться в пределах 10^{-5} - 10^{-4} М [24, 25, 33]. Нами проанализированы и

сформулированы требования, которым должны удовлетворять компоненты потенциальных тест-систем – биокатализатор, акцептор активных радикалов [18, 20, 23] и ингибитор-калибратор [25, 33]. Технологичной может быть только та тест-система ОАА, компоненты которой хорошо совмещаются друг с другом, устойчивы во времени и обеспечивают воспроизводимые характеристики окислительного процесса: достаточную начальную скорость окисления акцептора радикалов v_0 , прямую связь ее уменьшения с ростом концентрации ингибитора InH , простоту мониторинга расходования акцептора-хромогена, как правило, спектрофотометрического.

По совокупности кинетических параметров (величина K_i , наличие и продолжительность периодов индукции $\Delta\tau$) и полезных свойств, среди многочисленных замещенных фенолов, многоатомных фенолов, замещенных аминифенолов, полидисульфидов фенольных соединений в качестве ингибиторов-калибраторов в системе $MetNa-H_2O_2$ -ФДА нами выбраны (2,3-дигидрокси-4,6-ди-трет.бутилфенил)-S-тиосульфат натрия ($InH1$) [24], 2-амино-4-трет.бутилфенол (АТБФ), 2-амино-4,6-ди-трет.бутилфенол (АДТБФ) и 2,2,5,7,8-пентаметилхроман-6-ол (РМС) [35,37]. Структурные формулы изученных ингибиторов-калибраторов показаны на рис. 1.

Субстраты-акцепторы радикалов

Ингибиторы-калибраторы

Рисунок 1 – Структурные формулы субстратов-акцепторов радикалов и ингибиторов калибраторов

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОАА СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Традиционно об антиоксидантном статусе организма человека и животных судят по содержанию в плазме и сыворотке крови продуктов ПОЛ (малоновый диальдегид, дикетоны, диеновые конъюгаты и основания Шиффа), низкомолекулярных антиоксидантов (α -токоферол, ретинол, глутатион, витамин С) и ферментов антиоксидантного комплекса (глутатион-пероксидаза, супероксиддисмутаза, каталаза, церулоплазмин) [40]. Совершенно очевидно, что этот способ слишком трудоемкий, дорогостоящий, продолжительный по времени и поэтому мало пригоден для массового лабораторного скрининга ОАА биологических жидкостей. По этой причине в последние 15 лет предложены самые разнообразные методы интегральной оценки общего антиоксидантного статуса биологических жидкостей, часть которых мы перечислим ниже.

TRAP (Total radical-trapping parameter)-метод [41] состоит в том, что при 37°C в водной среде инициируют радикалы при термораспаде 2,2'-азо-бис(2-амидинопропан)гидрохлорида, взаимодействующие с кислородом с образованием RO_2^{\cdot} . Перекисные радикалы RO_2^{\cdot} реагируют с их акцепторами – ингибитором-калибратором тролоксом или с СКЧ и другими биологическими жидкостями. Мониторинг реакции осуществляется электрохимически с использованием кислородного электрода, что является большим недостатком метода. Получен ряд активности некоторых антиоксидантных компонентов СКЧ: аскорбат>SH/группы белков>урат>витамин Е.

TOSC (Total oxyradical scavenging capacity)-метод [42] основан на окислении α -кето- γ -метилтиобутировой кислоты до этилена радикалами RO_2^{\cdot} , которые генерируются

при термораспаде использованного в предыдущем методе инициатора. За образованием этилена, которое частично подавляется присутствующими антиоксидантами, следят методом газовой хроматографии, что является главным недостатком этого способа определения ОАА биологических объектов.

ORAC (Oxygen radical absorbance capacity)-метод [43] основан на генерировании радикалов $RO_2\cdot$ при распаде того же инициатора, что в двух предыдущих случаях, или радикалов $HO\cdot$ в системе $Cu^{2+}-H_2O_2$. Активные радикалы взаимодействуют с фикоэритрином, флуоресценция которого в результате резко снижается. По интенсивности флуоресценции на волне с длиной 565 нм в присутствии антиоксидантов судят об их ОАА, используя в качестве ингибитора-калибратора тролокс. Добавление СКЧ ингибирует снижение интенсивности флуоресценции пропорционально ОАА исследуемой пробы.

FRAP (Ferric reducing/antioxidant power)-метод [44] основан на восстановлении Fe^{3+} -трипиридилтриазинового комплекса при низких рН, за которым можно следить спектрально на длине волны 593 нм. Суть метода состоит в конкуренции антиоксидантов и активных радикалов за взаимодействие с окисленной формой комплекса. Круг исследуемых антиоксидантов весьма ограничен (аскорбиновая и мочевая кислота и др.).

Метод циклической вольтамперометрии (вольтамметрии) [45, 46] позволяет оценить общую восстанавливающую способность низкомолекулярных антиоксидантов биологических жидкостей или тканевых гомогенатов. Важно отметить, что не все антиоксиданты с приемлемой скоростью донируют электроны стеклянному угольному электроду (например, многие тиолы и глутатион). Интересная комбинация амперометрической характеристики ОАА биологических объектов с хроматографическим определением их компонентов предложена в работе [46], где в качестве стандарта использован флавоноид – кверцетин. Метод оказался очень информативным для растительных объектов.

TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity)-метод [47, 48] основан на удачной модельной системе «метмиоглобин– H_2O_2 –АБТС–тролокс», в которой метмиоглобин (2,5 мкМ) генерирует в реакции с H_2O_2 (75 мкМ) феррилмиоглобин и активные радикалы $HO\cdot$ и $HO_2\cdot$, окисляющие хромогенный субстрат АБТС с образованием катион-радикала $ABTS^{\cdot+}$ с максимумами поглощения 660, 734 и 820 нм [48]. Присутствие антиоксидантов сильно снижает скорость окисления АБТС. В качестве ингибитора-калибратора использован тролокс. Метод запатентован [48] и поставлен на коммерческую основу фирмой «Randox Laboratories» (Великобритания), выпускающей наборы реагентов «TAS-Kit» (Total Antioxidants Status – Klinical investigation test) для пробирочного определения ОАА СКЧ больных и здоровых лиц.

Объем статьи не позволяет дать детальную оценку достоинств и недостатков методов определения ОАА, предложенных в работах [40-48]. Однако отметим, что большинство методик требуют дорогого приборного оснащения, не являются универсальными и не дают возможности одновременного анализа большого количества проб. Лишь недавно метод TEAC [47, 48] был удачно модифицирован [25, 26] и внедрен в клиничко-диагностическую практику в виде тест-системы для интегрального скринингового определения ОАА сыворотки крови здоровых и больных лиц, отличительной особенностью которого является одновременный анализ большой серии проб с использованием обычной измерительной фотометрической аппаратуры отечественного производства [49].

По нашему мнению, наиболее перспективны методы интегральной оценки ОАА биологических жидкостей, предложенные фирмой «Randox» на основе тест-системы «метмиоглобин– H_2O_2 –АБТС–тролокс» [47, 48], в которой метмиоглобин при разложении H_2O_2 генерирует активные радикалы, окисляющие АБТС, а аналог токоферола тролокс

ингибирует процесс окисления. СКЧ и другие биологические жидкости также в разной степени замедляют окисление АБТС, что дает возможность выразить их ОАА в виде эквивалентной концентрации ингибитора-калибратора тролокса [47].

Нами предложены системы, в которых метмиоглобин из сердца лошади заменен более дешевым метгемальбумином (MetHa), дорогой АБТС – доступным и дешевым *o*-фенилендиамином (ФДА), а тролокс – более эффективными ингибиторами-калибраторами – InH1 [24] и PMS (см. рис. 1): MetHa–H₂O₂–ФДА– InH1 (ТС-1) и MetHa–H₂O₂–ФДА–PMS (ТС-2).

Оптимизация ТС-1 и ТС-2 была проведена по всем параметрам – составу биокатализатора, условиям реакции (среда, температура), концентрациям реагентов и выбору ингибитора-калибратора. В ТС-1 в качестве катализатора использован комплекс гемин–САЧ (10 мкМ:10 мкМ), а в ТС-2 – комплекс гемин–БСА (20 мкМ:10 мкМ). В обоих случаях реакции проводили при 37°C в среде забуференного физиологического раствора, pH 7,4, содержавшего в системе ТС-1 2% ДМСО и в системе ТС-2 – 5% ДМФ и 0,5% ДМСО. Оптимальные концентрации составляли 2 мМ H₂O₂ и 1 мМ ФДА в ТС-1 и 6 мМ H₂O₂ и 1 мМ ФДА – в ТС-2.

На рис. 2а представлена кинетика роста поглощения продукта окисления ФДА (A₄₅₅) в системе ТС-1 в отсутствие СКЧ (1) и в присутствии возрастающих концентраций СКЧ (2-6). Как видно, СКЧ сильно тормозит окисление ФДА. По начальным линейным участкам кинетических кривых вычисляли начальные скорости реакции v_0 , обратные величины которых представлены в виде зависимостей от растущих концентраций СКЧ (1-3) и концентраций ингибитора-калибратора (4) на рис. 2б. Из сопоставления зависимостей рис. 2б в координатах Диксона определяли величину ОАА в виде концентрации InH1 в мкг/мл, эквивалентной по ингибирующему действию 1 мг/мл СКЧ для каждой из трех сывороток; вычисляли также обратную величину ОАА в виде концентрации СКЧ в мг/мл, эквивалентной по ингибирующему действию 1 мкг/мл InH1: таким образом, в первом случае размерность ОАА – мкг InH1/мг СКЧ, а во втором – мг СКЧ/мкг InH1. Увеличение ОАА СКЧ отражается ростом величины в мкг InH1/мг СКЧ или снижением величины в мг СКЧ/мкг InH1. При использовании ТС-2 в качестве эквивалента выступают мкг PMS вместо мкг InH1. Сопоставление тролокса и InH1 показало большое преимущество InH1 в ингибирующей активности, что позволяет применять InH1 в более низких концентрациях, чем тролокс, т.е. существенно снизить расходование ингибитора калибратора.

Обе системы «MetHa–H₂O₂–ФДА–InH1» и «MetHa–H₂O₂–ФДА–PMS» испытаны в лабораторных условиях в пробирочном варианте для количественной характеристики ОАА сывороток крови здоровых лиц и больных с разными патологиями в терминах мкг InH1/мг СКЧ или мкг PMS/мг СКЧ.

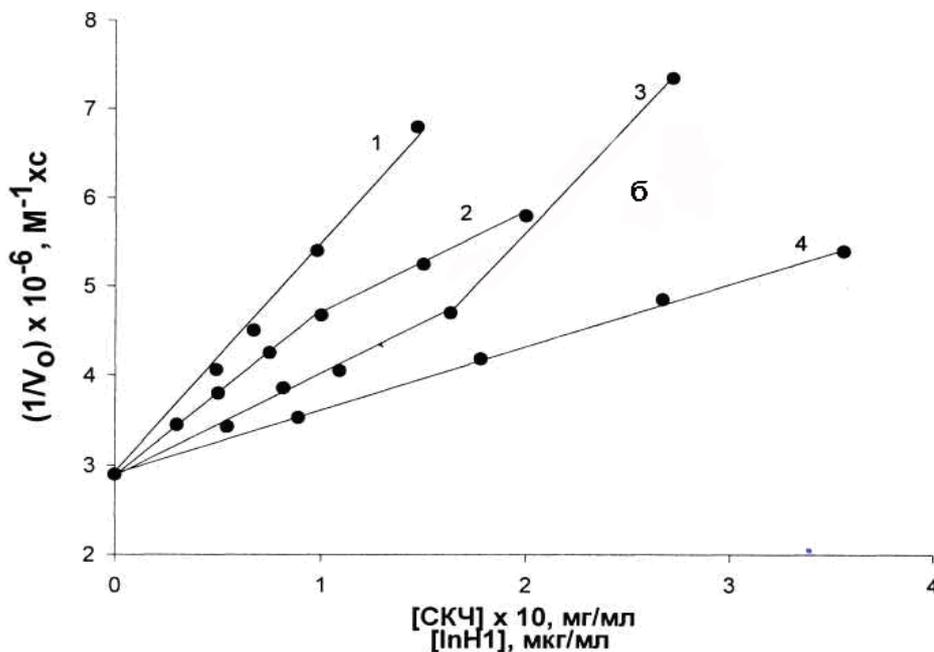
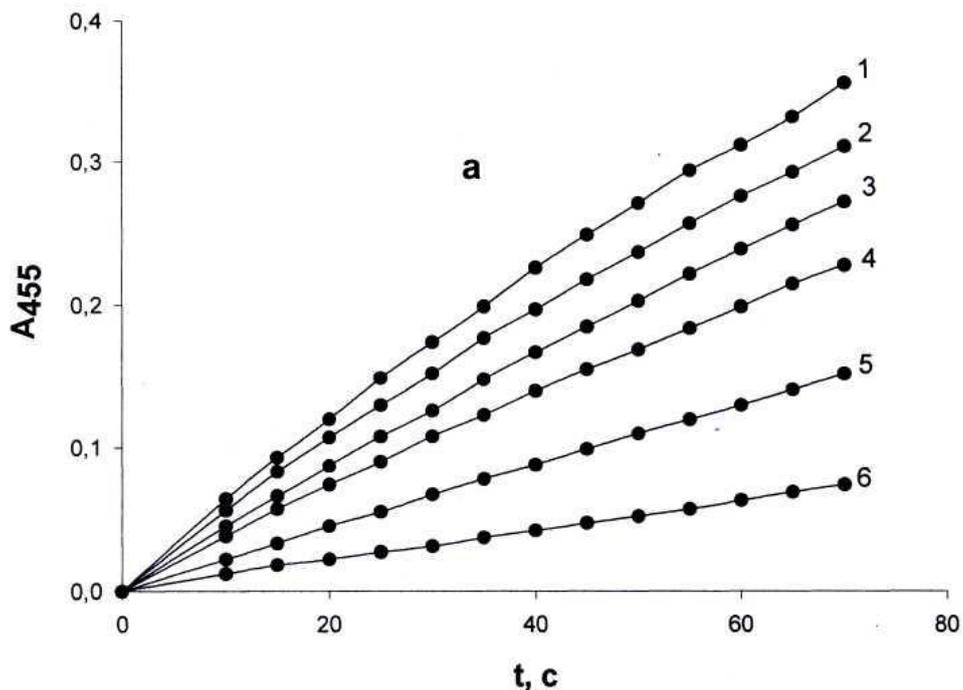


Рисунок 2 – а
– Кинетика
роста
поглощения
(A_{455})
продукта
окисления
ФДА (1мМ)
пероксидом
водорода
(2мМ) с
участием
метгемальбум
ина (10мкМ) в

отсутствии СКЧ (1) и в присутствии 0,054 (2), 0,08 (3), 0,16 (4), 0,27 (5) и 0,54 (6) мг/мл СКЧ в среде ЗФР, рН 7,4 с 2% ДМСО при 37°C

б – Зависимости обратной начальной скорости окисления ФДА пероксидом водорода в системе ТС-1 от концентрации сывороток крови (1-3) и ингибитора-калибратора InH1 (4): условия приведены выше

ОБЩАЯ АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ СКЧ ЗДОРОВЫХ И БОЛЬНЫХ ЛИЦ, ОПРЕДЕЛЕННАЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕСТ-СИСТЕМ

MetHa–H₂O₂–ФДА–InH1 И MetHa–H₂O₂–ФДА–PMS

В табл. 1 представлены величины ОАА сывороток крови 6 групп лиц с разными патологиями в терминах мкг InH1/мг СКЧ. Показатели ОАА значительно меняются внутри каждой из групп и сильно различаются для разных групп, отражая антиоксидантный статус каждого индивидуума.

Таблица 1 – Общая антиоксидантная активность (ОАА) сыворотки крови человека (СКЧ), определенная с использованием тест-системы MetHa–H₂O₂–ФДА–InH1 [24]

Группы пациентов по патологиям	Среднее значение ОАА в группе в мкг InH1/мг СКЧ
1. Кардиопатология после реанимации (n = 5)	7,40±0,52
2. Инфаркт миокарда (n = 8)	9,43±0,66
3. Ревматология (n = 7)	9,09±0,63
4. Оперативная гинекология (n = 3)	11,10±0,77
5. Гастропатология (n = 7)	8,13±0,57
6. Гастропатология (выздоровливающие), группа сравнения (n = 5)	25,64±1,80

Наиболее «благополучными» являются представители группы сравнения – выздоравливающие пациенты с гастропатологией – средняя величина ОАА 25,64 мкг InH1/мг СКЧ, а наименее «благополучными» – пациенты с кардиопатологией после реанимации – средняя величина ОАА 7,40 мкг InH1/мг СКЧ. Как следует из табл. 1, полученные количественные показатели ОАА отражают состояние антиоксидантной защиты у разных групп пациентов и показывают необходимость проведения антиоксидантной терапии больных пяти групп из шести обследованных.

Система ТС-1 для определения ОАА СКЧ надежно зарекомендовала себя на практике и обнаружила целый ряд несомненных преимуществ перед известными методиками [40-48]:

- ТС-1 обеспечивает достаточный уровень инициирования свободных радикалов и начальной скорости окисления их акцепторов ФДА, что позволяет использовать довольно низкие концентрации биокатализатора MetHa (10 мкМ), окислителя (H₂O₂) – 2 мМ и акцептора радикалов (ФДА) – 1 мМ;

- высокая ингибирующая эффективность InH1 (в сравнении с тролоксом) позволяет применять InH1 в более низких концентрациях (до 0,4 мкг/мл и ниже);

- малые количества СКЧ для анализа (менее 10 мкл неразведенной сыворотки);

- доступность всех реагентов ТС-1 и их высокая растворимость в среде ЗФР, рН 7,4;

- использование органического соразтворителя в минимальной концентрации (2% ДМСО) и стабильность большинства реагентов при хранении;

- использование простейшей фотометрической аппаратуры для мониторинга расходования акцептора радикалов – ФДА, доступной любой клинической лаборатории.

Тест-система MetHa–H₂O₂–ФДА–PMS была успешно использована нами для количественной оценки ОАА СКЧ, позволяющей контролировать уровень антиоксидантной защиты организма у лиц в сформированных группах риска с доклиническими формами тиреоидной патологии до и после проведения соответствующих лечебно-профилактических мероприятий, направленных на повышение адаптационных и реабилитационных возможностей организма. Эта работа стала важной частью внедренной нами в практику научно-обоснованной методологии сочетанного использования средств иммунохимического анализа для оценки функционирования иммуноэндокринной системы «гипофиз–щитовидная железа» с количественной оценкой общей антиоксидантной активности СКЧ.

Выбор различных форм патологии щитовидной железы (ЩЖ) обусловлен экологической ситуацией на территории Беларуси, сложившейся спустя 20 лет после аварии на ЧАЭС: наличие йодного дефицита в воде, возрастающий экологический прессинг, рост числа заболеваний и состояний, связанных со снижением реактивности основных регуляторных систем организма определяют развитие различных форм патологий, и в первую очередь – патологии ЩЖ. В последние годы среди населения Беларуси, как и в других странах, наблюдается рост числа заболеваний ЩЖ: за последние 5 лет заболеваемость взрослых гипотиреозом возросла в 2 раза, гипертиреозом – в 1,8 раза, а тиреоидитом – в 1,5 раза.

Учитывая специфическую зависимость ментальных процессов от уровня тиреоидных гормонов в крови, даже трудно оценить вред, наносимый тиреоидной патологией интеллектуальному потенциалу общества и здоровью нации в целом. В этой проблеме особое место принадлежит донозологическим, т.е. скрытым, субклиническим формам нарушений функций ЩЖ, которые часто остаются вне поля зрения специалистов из-за отсутствия клинически выраженных проявлений патологии.

Для решения этой проблемы нами разработана научно-обоснованная методология оценки функции ЩЖ и «Автоматизированная информационная система комплексной оценки функции ЩЖ (АИС-ЩЖ)», основанная на сочетании средств современной информатики и вычислительной техники и иммунохимического анализа регуляторов тиреоидного статуса [50]. В рамках этой программы обследовано более 3000 здоровых лиц: у 49,7% выявлены донозологические (скрытые), субклинические и клинически выраженные формы нарушений функции ЩЖ; у 13,4% обследованных лиц – гипертиреоз; у 12,5% – гипотиреоз; у 17,4% – риск развития аутоиммунного тиреоидита и у 6,4% – риск развития злообразования (онкопатологии). 50,3% всех обследованных не обнаружили каких-либо изменений тиреоидного статуса и отнесены к группе здоровых лиц.

На основе выявленных нарушений сформированы группы риска, для которых были разработаны соответствующие индивидуальные медицинские рекомендации и организовано последующее динамическое слежение за состоянием здоровья обследуемых лиц.

Острые и отдаленные воздействия неблагоприятных факторов на организм человека сопровождаются вторичными эффектами накопления продуктов окислительной дегградации мембранных клеточных структур и радиолита воды (активные кислород-содержащие радикалы и гидропероксиды). Токсины, образующиеся в реакциях ПОЛ, вызывают повреждение клеток и организма в целом. Система АОЗ организма действует по нескольким направлениям [2, 3, 5, 7, 9, 10]:

- взаимодействие с перекисными радикалами и удаление их из клетки;
- дезактивация пероксидных продуктов ПОЛ;
- взаимодействие с другими активными формами кислорода;
- стабилизация мембранных структур – мишеней разрушительного действия продуктов ПОЛ [17];
- активация гипотизарно-адреналовой системы.

Антиоксидантный статус организма определяется балансом образования и утилизации токсических продуктов свободно-радикальных процессов. Доказано, что доклинические нарушения функций ЩЖ у лиц трудоспособного возраста под воздействием активных форм кислорода и продуктов ПОЛ могут привести к развитию клинически выраженных форм патологии ЩЖ: аутоиммунному тиреоидиту, тиреоидной недостаточности, гипо- и гипертиреозу, раку щитовидной железы, злообразованию и иммунодефицитам, что часто сопровождается потерей трудоспособности, инвалидизацией и требует значительных финансовых затрат на лечение.

С использованием тест-системы ОАА СКЧ $\text{MetHa-H}_2\text{O}_2\text{-FDA-PMC}$ нами была проведена оценка ОАА СКЧ здоровых лиц и лиц, отнесенных в различные группы риска.

Количественные показатели ОАА СКЧ в терминах мкг РМС/мг СКЧ в группах обследованных лиц приведены в табл. 2, из которой видно, что уровень ОАА у лиц с субклиническим гипотиреозом снижен по сравнению с контрольной группой, а по мере прогрессирования этой патологии и перехода ее в стадию клинически выраженного

Таблица 2 – Общая антиоксидантная активность (ОАА) сыворотки крови человека (СКЧ), определенная с использованием тест-системы MetNa–H₂O₂–ФДА–РМС

Группы обследованных лиц	Среднее значение ОАА в группе в мкг РМС/мг СКЧ, (M±m)
Здоровые лица (n = 32)	9,55±0,72
Гипотиреоз, в том числе субклинический (n = 23)	6,15±0,69*
Клинически выраженный гипотиреоз (n = 7)	5,29±0,95*
Гипертиреоз, в том числе субклинический (n = 13)	9,98±0,72*
Риск развития аутоиммунного тиреоидита (n = 25)	8,29±0,70
Риск развитие узлообразования (онкопатологии) (n = 28)	8,50±0,43

* достоверность различий с контрольной группой $p < 0,05$

гипотиреоза происходит еще большее снижение ОАА СКЧ. У лиц с угрозой развития аутоиммунного тиреоидита (АИТ) и узлообразования (онкопатология) очевидна тенденция к снижению ОАА СКЧ. У лиц с гипертиреозом с учетом погрешности определения ОАА не проявилось разницы показателей по сравнению с контролем, а в случае субклинического гипертиреоза отмечена тенденция к небольшому увеличению ОАА, что можно объяснить повышенным уровнем тиреоидных гормонов, активирующих метаболические процессы в организме и вызывающих повышение ОАА.

В последние годы появились и используются современные лечебно-профилактические препараты природного происхождения, повышающие адаптационные и реабилитационные возможности организма и позволяющие корректировать и/или предупреждать различные нарушения его регуляторных механизмов. Среди таких препаратов видное место принадлежит разнообразным антиоксидантам [3, 7, 9], большинство которых относится к природным адаптогенам растительного происхождения, витаминам и неспецифическим иммуномодуляторам. Разработка и оптимизация высокоэффективных схем проведения лечебно-профилактических мероприятий с использованием новых средств и применение для контроля их эффективности количественных критериев, какими являются показатели тиреоидного статуса - иммунохимически определенные концентрации тиреоидных гормонов, белков и аутоантител, с одной стороны [50], и количественные показатели ОАА СКЧ, установленные с помощью разработанного нами метода, – с другой стороны, позволили в результате лечебно-профилактических мероприятий устранить целый ряд расстройств уже на доклинических стадиях заболеваний ЩЖ. Следует особо отметить, что использованные при этом препараты выпускаются отечественной фармацевтической промышленностью, адаптированы к условиям Республики Беларусь и доступны для широкого применения в медицинской практике.

Для включения в систему лечебно-профилактических мероприятий нами были выбраны комплексные препараты отечественного производства «Антиоксикапс», «Антиоксикапс с селеном» и «Эхингин».

«Антиоксикапс» содержит в своем составе 75 мг витамина С (аскорбиновая кислота), 15 мг витамина Е (ацетат α -токоферола) и 6 мг провитамина А (β -каротин). Аскорбиновая кислота, как известно, участвует в регулировании многих окислительно-восстановительных процессов, активирует углеводно-белковый обмен, усиливает регенерацию тканей, синтез стероидных, тиреоидных и других гормонов, является сильным антиоксидантом и повышает адаптационные возможности организма. α -Токоферол ингибирует окисление жиров в организме и образование пероксидов, нормализует структуру и функцию мембран эритроцитов и энтероцитов, активирует пролиферацию клеток, функцию тканевого дыхания и других процессов клеточного метаболизма [16, 17]. Витамин Е – сильнейший природный антиоксидант, замедляющий процесс старения клеток за счет нейтрализации активных свободных радикалов. Установлена тесная связь токоферолов с функцией и состоянием эндокринных систем – половых желез, гипофиза, надпочечников и щитовидной железы. β -Каротин (провитамин А) обладает антиоксидантным, иммуномодулирующим и противовоспалительным действием за счет его способности связывать активные формы кислорода и тем самым предохранять клетки от разрушения активными свободными радикалами.

«Антиоксикапс с селеном» содержит в своем составе 100 мг витамина С, 30 мг ацетата α -токоферола, 6 мг β -каротина и 30 мкг селена.

Селен замедляет процесс старения, обладает цитопротекторными свойствами, способствует задержке распространения в организме вирусов и развития вторичных инфекций у больных. Селен входит в состав одного из компонентов антиоксидантного комплекса - глутатион-пероксидазы. Селен обладает многоплановым влиянием на различные звенья иммунной защиты, в частности, на функцию нейтрофилов.

«Эхингин» - общетонизирующее средство и иммуноадаптоген, содержащий в одной таблетке 15 мг корней женьшеня и 200 мг травы эхинацеи пурпурной. Биологическое действие препарата обусловлено панаксозидами и полисахаридами женьшеня, производными кофейной кислоты и ненасыщенных алкамов эхинацеи, а также дубильных веществ, стероидов и других компонентов женьшеня и эхинацеи. Препарат оказывает стресспротекторное и ноотропное действие, способствует сохранению иммунитета и восстановлению работоспособности. Препарат используют с профилактическими целями при проведении антибиотикотерапии, лучевой и химиотерапии.

При проведении комплекса лечебно-профилактических мероприятий с использованием препаратов антиоксидантного ряда, описанных выше, осуществляли контроль эффективности лечения, оценивая тиреоидный статус методами иммунохимического анализа (ИФА и РИА) тиреоидных гормонов, белков и аутоантител и ОАА СКЧ с применением тест-системы MetNa–H₂O₂–ФДА–PMS. В табл.3 представлены показатели ОАА СКЧ групп обследованных лиц в терминах мкг PMS/мг СКЧ до и после лечебно-профилактических мероприятий. Анализ полученных результатов показывает, что у лиц с субклиническим гипотиреозом ОАА СКЧ повысилась почти в 2 раза, у лиц с угрозой развития АИТ – в 1,4 раза и угрозой развития УЗЛ – в 1,2 раза. В результате приема препаратов антиоксидантного ряда заметно повысилась ОАА СКЧ в группе здоровых лиц.

Таблица 3 – Общая антиоксидантная активность (ОАА) сыворотки крови человека (СКЧ), определенная с использованием тест-системы MetNa–H₂O₂–ФДА–PMS до и после лечебнопрофилактических мероприятий

Группы обследованных лиц	ОАА в мкг PMS/мг СКЧ до приема препаратов (M±m)	ОАА в мкг PMS/мг СКЧ после приема препаратов (M±m)
Здоровые лица (n = 32)	9,55±0,72	11,90±0,63
Гипотиреоз (n = 30)	5,39±0,23	10,47±0,49*

Угроза развития аутоиммунного тиреоидита (n = 23)	8,29±0,70	9,90±0,55*
Угроза развития злообразования (n = 20)	8,50±0,43	11,48±0,36

* достоверность различий с контрольной группой $p < 0,05$

Заключение

Полученные результаты позволили оптимизировать схемы индивидуальных медицинских рекомендаций для каждой группы обследуемых с выявленными нарушениями функции щитовидной железы и рекомендовать конкретные схемы приема препаратов, повышающих адаптационные и реабилитационные способности организма.

Таким образом, преимущества разработанной научно-обоснованной системы лечебно-профилактических мероприятий, направленных на повышение адаптационных и реабилитационных возможностей организма, определяются следующими положениями:

- использование специфичных, высокочувствительных и информативных количественных критериев оценки показателей иммуноэндокринного гомеостаза и общей антиоксидантной активности сыворотки крови здоровых лиц и лиц с патологией щитовидной железы;

- применение отечественных, серийно выпускаемых и широко доступных высокоэффективных антиоксидантных и витаминных препаратов, повышающих адаптационные и реабилитационные возможности организма;

- контроль состояния иммуноэндокринного гомеостаза в динамике наблюдения, что способствует устранению целого ряда расстройств на доклинических стадиях патологии щитовидной железы;

- возможности практического использования разработанной методологии в работе медицинских лечебных учреждений (поликлиники, диспансеры и др.).

В заключении следует отметить также важнейшие преимущества разработанного нами способа определения ОАА СКЧ в сравнении с аналогом (прототипом) [47, 48]:

- замена дорогого метмиоглобина более дешевым биокатализатором – метгемальбумином;

- использование в качестве акцептора радикалов доступного и дешевого *o*-фенилендиамина вместо дорогого АБТС;

- замена тролокса в качестве калибратора на более эффективный отечественный ингибитор InH1 из числа 5-замещенных 2,4-ди-трет.бутилпирокатехинов;

- снижение количества тестируемой жидкости для анализа;

- возможности для автоматизации определения ОАА СКЧ с использованием планшетных спектрофотометров отечественного производства (АИФ-М/340, АИФ-Ц-01 С завода «Витязь», Витебск; АС-8К завода «Оптрон», Минск) и микропланшетов, состоящих из двенадцати восьмилучных полосок («стрипов»).

Литература

1. Эмануэль, Н.М. Кинетика экспериментальных опухолевых процессов / Н.М. Эмануэль. – М.: Наука, 1977. – С. 257-372.
2. Бурлакова, Е.Б. Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте / Е.Б. Бурлакова, А.В. Алесенко, Е.М. Молочкина, Н.П. Пальмина, Н.Г. Храпова. – М.: Наука, 1975. – 213 с.

3. Журавлев, А.И. Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии / А.И. Журавлев. – М.: Наука, 1982.
4. Метелица, Д.И. Активация кислорода ферментными системами / Д.И. Метелица. – М.: Наука, 1982. – 255 с.
5. Владимиров, Ю.А. Итоги науки и техники. Биофизика. Т. 29. Свободные радикалы в живых системах / Ю.А. Владимиров, О.А. Азизова, А.И. Деев, А.В. Козлов, А.Н. Осипов, Д.И. Рошупкин. – М.: ВИНТИ, 1991. – 249 с.
6. Дубинина, Е.Е. Окислительная модификация белков / Е.Е. Дубинина, И.В. Шугалей // Успехи соврем. биологии. – 1993. – Т. 113, № 1. – С. 71-81.
7. Free Radicals: from Basic Science to Medicine (G. Poli, E. Albano, M.U. Dianzani eds). Basel-Boston-Berlin: Birkhauser Verlag, 1993. – P. 365-523.
8. Свободные радикалы в биологии / под ред. У. Прайора. – Т. 1, 2. – М.: Мир, 1979.
9. Oxygen Radicals and the Diseases Process (C.E. Thomas, Kalyanaraman, eds). Wisconsin: Harwood Academic Publishers, 1998. – 296 pp.
10. Halliwell, B. Free Radicals in Biology and Medicine / B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge. – 3-th Edition. – Oxford: Clarendon Press, 1999.
11. Эмануэль, Н.М. Цепные реакции окисления органических веществ в жидкой фазе / Н.М. Эмануэль, Е.Т. Денисов, З.К. Майзус. – М.: Наука, 1965. – 375 с.
12. Эмануэль, Н.М. Роль среды в радикальноцепных реакциях окисления органических соединений / Н.М. Эмануэль, Г.Е. Зайков, З.К. Майзус. – М.: Наука, 1973. – 279 с.
13. Эмануэль, Н.М. Химическая физика старения и стабилизации полимеров / Н.М. Эмануэль, А.Л. Бучаченко. – М.: Наука, 1982. – 359 с.
14. Денисов, Е.Т. Ингибирование цепных реакций / Е.Т. Денисов. – М.: Наука, 1997. – 420 с.
15. Denisov, E.T. Handbook of Antioxidants: Bond Dissociation Energy, Rate Constants, Activation Energies and Enthalpies of Reactions / E.T. Denisov. – London: Times Mirror Int. Publ., 1995. – 256 pp.
16. Бурлакова, Е.Б. Кинетические особенности токоферолов как антиоксидантов / Е.Б. Бурлакова, С.А. Крашаков, Н.Г. Храпова // Биол. мембраны. – 1998. – Т. 15, № 2. – С. 137-162.
17. Burlakova, E.B. The role of tocopherols in biomembrane lipid peroxidation / E.B. Burlakova, S.A. Krashakov, N.G. Khrapova // Membr. Cell Biol. – 1998. – Vol. 12, N 2. – P. 173-211.
18. Русь, О.Б. Метгемальбумин – биокатализатор окисления ароматических аминов перекисью водорода / О.Б. Русь, А.В. Пучкаев, Д.И. Метелица // Биохимия. – 1996. – Т. 61, № 10. – С. 1813-1824.
19. Метелица, Д.И. Гемсодержащие гидропероксидные тест-системы ингибиторов свободно-радикальных процессов / Д.И. Метелица, О.Б. Русь, А.В. Пучкаев // Ж. прикл. химии. – 1997. – Т. 70, № 10. – С. 1713-1720.
20. Метелица, Д.И. Ингибирование окисления ароматических аминов в гемсодержащих гидроперекисных системах замещенными 4,6-ди-трет.бутил-пирокатехинами / Д.И. Метелица, О.Б. Русь, А.В. Пучкаев, О.И. Шадыро // Биохимия. – 1997. – Т. 62, № 3. – С. 323-333.
21. Русь, О.Б. Полидисульфид галловой кислоты – высокоэффективный ингибитор радикальных процессов в гемсодержащих гидропероксидных системах / О.Б. Русь, А.В. Пучкаев, Ю.П. Лосев, Д.И. Метелица // Ж. прикл. химии. – 1998. – Т. 71, № 5. – С. 842-848.
22. Русь, О.Б. Спектрофотометрическое и флуориметрическое исследование взаимодействия альбуминов и гемина с антиоксидантами ароматического ряда / О.Б. Русь, А.В. Пучкаев, А.И. Иванов, Д.И. Метелица // Прикл. биохимия и микробиол. – 2000. – Т. 36, № 1. – С. 44-54.

23. Русь, О.Б. Определяющая роль среды в пероксидном окислении антиоксидантов ароматического ряда с участием метгемальбуминов / О.Б. Русь, А.В. Пучкаев, Д.И. Метелица // Прикл. биохимия и микробиол. – 2000. – Т. 36, № 2. – С. 143-152.
24. Русь, О.Б. Новая высокоэффективная тест-система для определения общей антиоксидантной активности сыворотки крови человека / О.Б. Русь, Д.И. Метелица // Весці НАН Беларусі. Сер. хім. навук. – 2001. – № 4. – С. 75-82.
25. Метелица, Д.И. Инициирование и ингибирование радикальных процессов в системах H_2O_2 –метмиоглобин(метгемоглобин)–2,2'-бис-(3-этилбензтиазолин-6-сульфо кислота) / Д.И. Метелица, А.Н. Еремин, Д.О. Свиридов, В.С. Камышников // Биохимия. – 2001. – Т. 66, № 5. – С. 628-639.
26. Свиридов, Д.О. Определение общей антиоксидантной активности биологических жидкостей / Д.О. Свиридов, В.С. Камышников, А.Н. Еремин, Д.И. Метелица // Весці НАН Беларусі. Сер. хім. навук. – 2001. – № 2. – С. 60-63.
27. Наумчик, И.В. Ингибирование пероксидазного окисления тетраметилбензидина замещенными фенолами / И.В. Наумчик, Е.И. Карасева, Д.И. Метелица, Г.И. Полозов, О.И. Шадыро // Весці НАН Беларусі. Сер. хім. навук. – 2002. – № 3. – С. 85-91.
28. Метелица, Д.И. Ингибирование пероксидазного окисления ароматических аминов замещенными фенолами / Д.И. Метелица, И.В. Наумчик, Е.И. Карасева, Г.И. Полозов, О.И. Шадыро // Прикл. биохимия и микробиол.– 2003. – Т. 39, № 3. – С. 401-412
29. Наумчик, И.В. Ингибирование пероксидазного окисления хромогенных субстратов алкилзамещенными дифенолами / И.В. Наумчик, Е.И. Карасева, Д.И. Метелица, Г.И. Полозов, О.И. Шадыро // Биоорган. химия. – 2004. – Т. 30, № 5. – С. 537-546.
30. Наумчик, И.В. Ингибирование пероксидазного окисления тетраметилбензидина аминоксидными фенолами / И.В. Наумчик, Е.И. Карасева, Д.И. Метелица, И.П. Едимечева, В.Л. Сорокин, О.И. Шадыро // Биохимия. – 2005. – Т. 70, № 3. – С. 397-405.
31. Наумчик, И.В. Ингибирование пероксидазного окисления хромогенных субстратов пропилгаллатом и его полидисульфидом / И.В. Наумчик, Е.И. Карасева, Д.И. Метелица // Прикл. биохимия и микробиол. – 2005. – Т. 41, № 4. – С. 376-382.
32. Metelitzka, D.I. Peroxidase-catalyzed co-oxidation of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine in the presence of substituted phenols and their polydisulfides / D.I. Metelitzka, E.I. Karasyova, E.E. Grintsevich, R.N.F. Thorneley // J. Inorg. Biochemistry. – 2004. – Vol. 89, N 1. – P. 1-9.
33. Метелица, Д.И. Инициирование и ингибирование свободнорадикальных процессов в биохимических пероксидных системах (обзор) / Д.И. Метелица, Е.И. Карасева // Прикл. биохимия и микробиол. – 2007. – Т. 43, № 5. – С. 537-564.
34. Григоренко, Ю.А. Сопряженное пероксидазное окисление хромогенных субстратов и флавоноидов / Ю.А. Григоренко, Е.И. Карасева, Д.И. Метелица // Вестник Фонда фундаментальных исследований. – 2007. – № 4. – С. 66-83.
35. Григоренко, Ю.А. Сопряженное пероксидазное окисление тетраметилбензидина с аминоксидными фенолами / Ю.А. Григоренко, Е.И. Карасева, Д.И. Метелица, О.И. Шадыро // Весці НАН Беларусі. Сер. хім. навук. – 2007. – № 3. – С. 64-71.
36. Григоренко, Ю.А. Антиоксидантная активность циклопроизводных метилзамещенных фенолов – аналогов α -токоферола / Ю.А. Григоренко, Е.И. Карасева, Д.И. Метелица, В.Н. Повалишев, О.И. Шадыро // Весці НАН Беларусі. Сер. хім. навук. – 2007. – № 4. – С. 70-77.
37. Григоренко, Ю.А. Замещенные аминоксидные фенолы и флавоноиды – перспективные компоненты тест-систем общей антиоксидантной активности / Ю.А. Григоренко, Е.И. Карасева, Д.И. Метелица, В.Л. Сорокин, Г.А. Ксендзова, О.И. Шадыро // Биомедицинская химия. – 2007. – Т. 53, № 5. – С. 566-576.
38. Метелица, Д.И. Моделирование окислительно-восстановительных ферментов / Д.И. Метелица. – Мн.: Наука и техника, 1984. – 293 с.
39. Келети, Т. Основы ферментативной кинетики / Т. Келети. – М.: Мир, 1990. – С. 183-203.

40. Клебанов, Г.И. Антиоксидантная активность сыворотки крови / Г.И. Клебанов, Ю.О. Теселкин, И.В. Бабенкова, О.Б. Любичкий, Ю.А. Владимиров // Вестник РАМН. – 1999. – № 2. – С. 15-22.
41. Weiner, D.D.M. Quantitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capacity of human blood plasma by controlled peroxidation / D.D.M. Weiner, G.W. Burton, K.U. Ingold, S. Locke // FEBS Letters. – 1985. – Vol. 187, N 1. – P. 33-37.
42. Winston, G.W. A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids / G.W. Winston, F. Regoli, A.J. Dugas, J.H. Fong, K.A. Blanchard // Free Radic. Biol. Med. – 1998. – Vol. 24, N 3. – P. 480-493.
43. Cao, G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants / G. Cao, H.M. Alessio, R.G. Cutler // Free Radic. Biol. Med. – 1993. – Vol. 14, N 3. – P. 303-311.
44. Benzie, I.F.F. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the Frap assay / I.F.F. Benzie, J.J. Strain // Anal. Biochem. – 1996. – Vol. 239, N 1. – P. 70-76.
45. Chevion, S. Evaluation of plasma low molecular weight antioxidant capacity by cyclic voltammetry / S. Chevion, S.M. Berry, N.K. Kitrossky, R. Kohen // Free Radic. Biol. Med. – 1997. – Vol. 22, N 3. – P. 411-421.
46. Яшин, Я.И. Антиоксиданты против болезней / Я.И. Яшин, А.Я. Яшин, Н.И. Черноусова // Химия и жизнь. – 2007. – № 11. – С. 24-27.
47. Rice-Evans, C. Total antioxidant status in plasma and blood fluids / C. Rice-Evans, N.J. Miller // Meth. Enzymol. – 1994. – Vol. 234, N 2. – P. 279-293.
48. C. Rice-Evans, M.J. Davies U.K. Patent 91,242,727 (1991).
49. Способ определения общей антиоксидантной активности сыворотки крови: пат. 5257 Респ. Беларусь, МПК7 G 01 N 33/49, 33/50 / Д.О. Свиридов, В.С. Камышников, Е.С. Пышко; заявл. 19.12.2000 // Афіцыйны бюл. / Дзярж. Пат. Ведамства Рэсп. Беларусь. – 2002. № 2 (33). – С. 57.
50. Пивень, Н.В. Донозологический скрининг и мониторинг – основа профилактики заболеваний щитовидной железы / Н.В.Пивень, Л.Н. Лухверчик, Т.В. Мохорт, В.И. Кузьменкова, Н.П. Денисевич // Наука и инновации. – 2007. – № 4 (50). – С. 32-38.

HIGHLY EFFECTIVE TEST-SYSTEMS FOR DETERMINATION OF THE TOTAL ANTIOXIDANT ACTIVITY OF HUMAN BIOLOGICAL LIQUIDS

D.I. Metelitz¹, N.V. Piven², O.I. Shadyro¹, Yu.A. Grigorenko¹, L.N. Lukhverchyk²
and N.P. Denisevich³

¹Research Institute of Physico-chemical Problems of Belarusian State University, Minsk, Belarus;

²Institute of Bioorganic Chemistry of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus;

³Special Polyclinic of the RUP “PO “Belaruskaliy”, Soligorsk, Minsk, Belarus

The short review is presented on the different modern test-systems for determination of the total antioxidant activity (TAA) of the human biological liquids. A special attention is spared to methods of the quantitative characterization of the TAA of human blood serum (HBS), including methemalbumin (MetHa) as biocatalyst, H₂O₂ – the oxidant, *o*-phenyldiamine (PDA) – the acceptor of active radicals and the InH as inhibitor-calibrator that may be Trolox, 2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-ol (PMC) or sodium(2,3-dihydroxy-4,6-di-tret.butyl-phenyl)-S-thiosulfate (InH1). The test-systems <MetHa–H₂O₂–PDA–InH1> and <MetHa–H₂O₂–PDA–PMC> were successfully used for quantitative determination of the HBS of many healthy individuals and of ill patients having the various pathologies in terms µg InH, equivalent to inhibiting ability of 1 mg HBS. The values of the

HBS TAA are strongly varied for groups of the healthy individuals and ill patients in each of them. The low antioxidant status of HBS was shown for infarct patients, cardio patients after reanimation, patients with gastro pathology and for the large groups of the ill patients having the various forms of the thyroid gland pathology. Data presented are the scientific bases for the antioxidant therapy of all the groups of ill patients.