

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«УРАЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ЭКОНОМИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»**

На правах рукописи

Варзакова Дарья Павловна

**НЕИНВАЗИВНЫЕ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ
ОЦЕНКИ АНТИОКСИДАНТ/ОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ
БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ**

Специальность 1.4.2. Аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
Профессор, доктор химических
наук,
Заслуженный деятель науки РФ,
Брайнина Хьена Залмановна

Екатеринбург – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	13
1.1 Активные формы кислорода, образующиеся в организме	13
1.2 Система антиоксидантной защиты организма	14
1.3 Окислительный стресс и его роль в патогенезе ряда заболеваний.....	18
1.3.1 Болезни системы кровообращения.....	19
1.3.2 Окислительный стресс и репродуктивная функция мужчин	19
1.3.3 Окислительный стресс и слюна человека.....	20
1.3.4 Окислительный стресс и кожа человека.....	22
1.4 Методы мониторинга окислительного стресса.....	24
1.4.1 Методы определения оксидантов.....	24
1.4.2 Методы определения антиоксидантов	27
1.4.3 Электрохимические методы определения АОА/ОА	30
1.4.4 Методы оценки АОА слюны.....	32
1.4.5 Методы оценки АОА/ОА семенной жидкости	33
1.4.6 Методы оценки АОА кожи человека	36
1.5 Заключение	40
1.6 Постановка задачи.....	41
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	43
2.1 Оборудование и средства измерения	43
2.2 Реактивы и объекты исследования	43
2.3. Методы исследования.....	45
ГЛАВА 3. ХРОНОАМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИОКСИДАНТОЙ АКТИВНОСТИ	48
3.1 Выбор условий анализа	48
3.2 Определение АОА плазмы крови	56
3.2.1 Исследование раствора, моделирующего состав плазмы крови	56

3.2.2	Выбор степени разбавления пробы	57
3.2.3	Определение АОА плазмы крови в присутствии модельного АО	58
ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАННОЙ АКТИВНОСТИ СЛЮНЫ ХРОНОАМПЕРОМЕТРИЧЕСКИМ И ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДАМИ.....		
4.1	Хроноамперометрический метод исследования АОА слюны.....	62
4.1.1	Выбор степени разбавления пробы	62
4.1.2	Выбор способа подготовки слюны к анализу	63
4.1.3	Определение АОА слюны в присутствии модельного АО.....	65
4.2	Потенциометрический метод исследования АОА слюны	66
4.2.1	Выбор состава медиаторной системы и степени разбавления пробы ...	66
4.2.2	Выбор способа подготовки слюны к анализу	68
ГЛАВА 5. ОЦЕНКА АНТИОКСИДАНТ/ОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ СЕМЕННОЙ ЖИДКОСТИ ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ.....		
5.1	Определение АОА семенной жидкости в присутствии модельного АО ..	72
5.2	Исследование возможности одновременного обнаружения антиоксидантов и оксидантов	73
5.3	Оценка АОА/ОА образцов семенной жидкости с оксидантной активностью	79
5.4	Оценка АОА/ОА семенной жидкости пациентов с нормо- и патоспермией	82
ГЛАВА 6. НЕИНВАЗИВНЫЙ ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОЦЕНКИ АНТИОКСИДАННОЙ АКТИВНОСТИ КОЖИ		
6.1	Обоснование выбора электрода.....	85
6.2	Исследование антиоксидантной активности модельных систем антиоксидантов.....	89
6.3	Исследование АОА кожи	90
6.4	Исследование действия косметических кремов на АОА кожи.	91
6.5	Исследование действия напитков на АОА кожи и фракций крови	93
6.6	Предварительные клинические исследования АОА кожи	101

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	104
СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ.....	107
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	109

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Окислительный стресс (ОС) – дисбаланс между избыточной продукцией оксидантов, инициирующих процессы химического, в том числе свободнорадикального окисления, и активностью системы антиоксидантной защиты организма (АОС), нейтрализующей избыток активных форм кислорода и азота (АФК и АФА-оксиданты), участвующих в указанных выше реакциях. Компоненты АОС - антиоксиданты (АО) – прерывают и ингибируют процессы химического и свободнорадикального окисления. ОС является важным патогенетическим звеном при возникновении и развитии широкого круга болезней, что объясняется универсальностью и ключевой ролью окислительно-восстановительных реакций, происходящих в клетках организма при патологических процессах.

Мониторинг ОС является необходимым условием подбора правильной терапии, диеты и оценки состояния здоровья. Источником информации о степени реализации ОС является антиоксидант/оксидантная активность биологических жидкостей и тканей человека. Разнообразие содержащихся в биологических объектах соединений, обладающих антиоксидантными свойствами, делает задачу определения АО достаточно сложной. Оценить вклад всех отдельных компонентов в деятельность АОС практически невозможно из-за трудоемкости, технической сложности, высокой стоимости анализов, с одной стороны, а с другой, из-за различной природы соединений и синергизма их действия. Перспективным является применение методов, позволяющих определить интегральную антиоксидантную активность (АОА), характеризующую потенциальную возможность антиоксидантного действия всех компонентов, находящихся в образце, в совокупности их взаимодействия между собой, синергизма их кооперативного антиоксидантного действия.

Общая антиоксидантная активность биологического объекта как интегральный параметр отражает антиоксидант/оксидантный статус организма в

целом и может являться показателем степени выраженности ОС. Окислительно-восстановительные реакции, определяющие антиоксидант/оксидантный статус организма, имеют электрохимическую природу, поэтому наиболее перспективно использование для определения АОА электрохимических методов, позволяющих оценить донорно-акцепторные свойства исследуемой системы и отличающихся достаточной чувствительностью, простотой аналитической процедуры, экспрессностью, невысокой стоимостью аппаратуры и реактивов, простотой автоматизации измерений. Весьма важным является отсутствие необходимости использовать метод добавок.

В представленной работе, в качестве методов исследования общей антиоксидант/оксидантной активности (АОА/ОА) биологических объектов (слюна, эякулят, кожа), использованы хроноамперометрический и потенциометрический методы. Их модернизация и адаптация к анализу ряда биологических объектов создаёт условия для внедрения мониторинга ОС в клиническую практику.

Диссертационная работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований № 12-00-14037-Ир «Доступ к электронным научным информационным ресурсам зарубежных издательств» (2012 г.) и № 13-08-96050-р_урал_а «Научные основы разработки автоматизированных средств оценки состояния антиоксидантной защиты (оксидантного стресса) организма человека» (2013-2015 гг.).

Степень научной разработанности темы

В настоящее время распространены два основных подхода к оценке антиоксидантного статуса организма. Первый заключается в прямом определении содержания отдельных высокомолекулярных и низкомолекулярных антиоксидантов. Второй основан на оценке общей антиоксидантной активности. Принимая во внимание большое количество разнообразных АО, различие механизмов и синергизм их действия в организме, следует считать второй подход предпочтительным и более информативным. Проблема оценки антиоксидантного статуса организма заключается в том, что из-за отсутствия единства подходов и

терминологии, данные, полученные разными методами, как правило, несопоставимы.

Для мониторинга ОС используют показатель антиоксидантной активности крови или её фракций, что требует забора крови и делает метод инвазивным. К неинвазивным методам можно отнести определение АОА/ОА слюны, семенной жидкости и кожи человека. Снижение АОА слюны свидетельствует о наличии болезней ротовой полости, а также некоторых внутренних процессов в организме. АОА/ОА семенной жидкости связано с состоянием репродуктивной системы мужчин. Существование взаимосвязи между состоянием организма и кожи дает основания полагать, что показатель АОА/ОА кожи может служить источником информации о проблемах со здоровьем и основой для создания новых аналитических методов мониторинга состояния здоровья человека и скрининга населения с целью выявления, в частности, групп риска и заболеваний в начальных стадиях.

Другой весьма важной проблемой является определение оксидантной активности. Сложности мониторинга оксидантов (Ох) связаны как с крайне малым временем жизни АФК, так и со сложностью и высокой стоимостью оборудования.

Развитие представленных в диссертационной работе методов аналитической химии позволит получить прямую информацию об интегральной величине антиоксидант/оксидантной активности биологических объектов простым доступным способом. Эта информация будет полезна в оценке состояния здоровья, эффективности терапии и скрининге населения.

Цель работы: создание гибридного варианта хроноамперометрического метода и развитие потенциометрического метода для неинвазивного мониторинга антиоксидант/оксидантного состояния биологических объектов (слюна, семенная жидкость, кожа человека).

Для реализации поставленной цели потребовалось решение следующих задач:

1. Исследовать возможность количественной оценки результата взаимодействия АО с $K_3[Fe(CN)_6]$ хроноамперометрическим методом и

разработать алгоритмы определения АОА гибридным хроноамперометрическим методом, в котором в качестве сигналообразующей используется предшествующая реакция АО с $K_3[Fe(CN)_6]$.

2. Исследовать закономерности изменения потенциала медиаторной системы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ в присутствии образцов, содержащих оксиданты и антиоксиданты, и разработать алгоритмы определения АОА/ОА гибридным потенциометрическим методом.

3. Разработать методики определения общей АОА слюны, кожи, АОА/ОА семенной жидкости гибридными хроноамперометрическим и потенциометрическим методами.

4. Исследовать взаимосвязь АОА/ОА семенной жидкости с состоянием репродуктивной функции мужчин, а также влияние косметических кремов и потребляемых напитков на величину общей АОА кожи.

Научная новизна

1. Предложен гибридный хроноамперометрический вариант определения АОА раствора, включающий предшествующую химическую реакцию взаимодействия $K_3[Fe(CN)_6]$ с АО в качестве сигналообразующей и регистрацию тока окисления продукта реакции ($K_4[Fe(CN)_6]$). Разработан неинвазивный способ определения АОА слюны гибридным хроноамперометрическим методом.

2. Интерпретированы результаты исследования процессов, происходящих при взаимодействии медиаторной системы с оксидантами и антиоксидантами, совместно присутствующими в пробе. Установлено, что взаимодействие оксидантов с восстановленной формой компонента медиаторной системы сопровождается сдвигом потенциала в сторону положительных значений, а взаимодействие антиоксидантов с окисленной формой компонента медиаторной системы сопровождается последующим сдвигом потенциала в сторону отрицательных значений.

3. Предложен новый подход к исследованию АОА/ОА семенной жидкости, заключающийся в обнаружении оксидантов и антиоксидантов в семенной жидкости в одном измерении.

4. Установлена взаимосвязь показателя АОА/ОА семенной жидкости с состоянием репродуктивной функции мужчин.

5. Впервые исследовано влияние косметических кремов и потребляемых напитков на АОА кожи. Показана взаимосвязь состава косметической продукции и напитков с величиной АОА кожи, измеренной с использованием неинвазивного потенциометрического метода.

Теоретическая и практическая значимость

Исследовано взаимодействие АО с $K_3[Fe(CN)_6]$ в качестве предшествующей реакции с последующей регистрацией тока окисления продукта ($K_4[Fe(CN)_6]$) хроноамперометрическим методом. Показана возможность количественной оценки результата этого взаимодействия.

Разработана методика определения АОА слюны хроноамперометрическим методом, не требующая пробоподготовки.

Впервые показано наличие оксидантов и антиоксидантов в семенной жидкости при патологических состояниях и предложен механизм их взаимодействия с медиаторной системой.

Разработана и аттестована методика определения общей антиоксидант/оксидантной активности семенной жидкости мужчин методом потенциометрии. Свидетельство об аттестации № 222.0067/01.00258/2014 выдано ФГУП «УНИИМ».

Разработанные методики и алгоритмы использованы в интерфейсах новых потенциометрических анализаторов:

- «Антиоксидант», предназначенном для определения АОА/ОА растворов;
- «ПА-S», предназначенном для определения АОА/ОА кожи.

Показана возможность использования разработанных подходов и методик определения АОА/ОА семенной жидкости в диагностических целях для выявления патологии репродуктивной функции мужчин.

Результаты исследований воздействия косметических средств на антиоксидантную активность кожи позволяют рекомендовать использование неинвазивного варианта гибридного потенциометрического метода в косметической промышленности для оптимизации состава и технологии получения продукта с антиоксидантными свойствами для конкретной возрастной категории потребителей.

Методология и методы исследования

Основными методами исследования общей АОА в данной работе являлись потенциометрия и хроноамперометрия, как наиболее простые, информативные, более полно отвечающие природе окислительно-восстановительных процессов. Методология исследования состояла в сочетании предшествующей сигналообразующей окислительно-восстановительной реакции окисленной формы медиаторной системы с последующей потенциометрической или хроноамперометрической регистрацией аналитического сигнала. Выбор условий регистрации хроноамперограмм осуществляли при помощи метода циклической вольтамперометрии.

Антиоксидант/оксидантную активность семенной жидкости и антиоксидантную активность кожи определяли гибридным потенциометрическим методом. Результаты определения АОА слюны развитым в настоящей работе гибридным хроноамперометрическим методом сравнивали с результатами, полученными стандартизированным потенциометрическим методом.

Положения, выносимые на защиту:

1. Результаты исследования взаимодействия АО с $K_3[Fe(CN)_6]$ в качестве предшествующей реакции с последующей регистрацией тока окисления продукта ($K_4[Fe(CN)_6]$) хроноамперометрическим методом.

2. Способ обнаружения антиоксидантов и оксидантов при совместном присутствии в семенной жидкости гибридным потенциометрическим методом.

3. Алгоритмы определения АОА слюны гибридным хроноамперометрическим и потенциометрическим методами; АОА кожи, АОА/ОА семенной жидкости гибридным потенциометрическим методом с использованием медиаторной системы.

4. Результаты неинвазивного анализа реальных объектов (слюны, семенной жидкости и кожи человека) гибридными хроноамперометрическим и потенциометрическим методами.

5. Результаты, указывающие на взаимосвязь АОА/ОА семенной жидкости с состоянием репродуктивной функции мужчин, а также влияние косметических кремов и потребляемых напитков на величину общей АОА кожи.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных в диссертации результатов подтверждается использованием современных методов измерений, и данными метрологической оценки, проведённой службой аттестации и сертификации (ФГУП «Уральский научно-исследовательский институт метрологии»).

Основные результаты работы представлены на VIII Международной конференции «Биоантиоксидант» (Москва, 2010 г.); Съезде аналитиков «Аналитическая химия – новые методы и возможности» (Москва, 2010 г.); Симпозиуме с международным участием «Теория и практика электроаналитической химии» (Томск, 2010 г.); Третьем международном конкурсе научных работ молодых ученых в области нанотехнологий (Москва, 2010 г.); VIII Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа с международным участием «Электрохимические методы анализа» (Уфа-Абзаково, 2012 г.); IV Международной научно-практической конференции «Адаптация биологических систем к естественным и экстремальным факторам среды» (Челябинск, 2012 г.); VII всероссийской конференции Молодых учёных, аспирантов и студентов с международным участием по химии и наноматериалам

(Санкт-Петербург, 2013 г.); IX Всероссийской конференции «Химия и медицина» с Молодежной научной школой по органической химии (УФА, 2013 г.); Втором съезде аналитиков России (Москва 2013 г.).

Личный вклад соискателя состоял в постановке и решении основных задач, планировании и проведении экспериментальных исследований, обработке, интерпретации и систематизации полученных результатов.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных ВАК РФ и Аттестационным советом УрФУ и 10 тезисов докладов, представленных на различных конференциях.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, пяти глав, заключения, списка литературы, включающего 165 ссылок на отечественные и зарубежные работы и приложения. Работа изложена на 129 страницах машинописного текста, содержит 42 рисунка и 20 таблиц.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

Аэробная энергетика всех живых существ обеспечивается свободной энергией окислительно-восстановительной реакции между восстановителем (внутриклеточная среда) и окислителем – кислородом [1]. Более 90% потребляемого млекопитающими кислорода восстанавливается цитохромоксидазой митохондрий до воды, однако незначительная его часть, как побочный продукт клеточного дыхания, в последовательных реакциях одно-, двух- и трехэлектронного восстановления в клетке превращается в активные кислородные формы -АФК.

1.1 Активные формы кислорода, образующиеся в организме

АФК, образующиеся в организме, имеют радикальную и нерадикальную природу. Наиболее важные из них представлены на рисунке 1.1.



Рисунок 1.1 - АФК, образующиеся в организме

Окислительные процессы активно протекают в организме человека. Общая картина генерации и инактивации АФК в организме достаточно подробно представлена в работах [1,2,3].

АФК играют двойственную роль. На физиологическом уровне они являются необходимым элементом фагоцитоза, а также выполняют важную компенсаторную контрольную функцию внутриклеточных трансдьюсеров [4].

Недостаток АФК в организме приводит к накоплению токсичных продуктов неполного окисления органических веществ в клетках.

Избыточное содержание АФК приводит к окислительной модификации макромолекул:

- перекисное окисление липидов (ПОЛ);
- повреждение ДНК и РНК;
- окислительное повреждение белков.

Эти три процесса составляют молекулярную основу окислительного стресса (ОС).

1.2 Система антиоксидантной защиты организма

Окислительно-восстановительные реакции, проходящие в организме, поддерживаются на физиологическом уровне благодаря действию антиоксидантной системы защиты организма (АОС). АОС - система, осуществляющая регуляцию баланса между производством и уничтожением АФК, которая действует на всех уровнях: от клеточных мембран до организма в целом.

АОС включает антиоксиданты различной природы, которые могут действовать в качестве “ловушек свободных радикалов” (рисунок 1.2), прерывая процессы окисления. АО могут быть ферментативными и неферментативными.



Рисунок 1.2 – Нейтрализация свободного радикала антиоксидантом

Ферментсодержащими АО являются:

- супероксиддисмутаза (СОД) представляет собой группу металлоферментов, катализирующих реакцию дисмутации супероксидных анион-радикалов в кислород и пероксид водорода, поддерживая их концентрацию в клетке на низком уровне, и уменьшающих вероятность образования еще более активного синглетного кислорода [5,6,7];

- каталаза (cat), гемосодержащий фермент из группы гидропероксидаз, который катализирует разложение пероксид водорода на воду и молекулярный кислород, а также окисляет в присутствии пероксида водорода низкомолекулярные спирты и нитриты [2,8,9];

- глутатионпероксидаза (ГПО), глутатионредуктаза (ГР), глутатионтрансфераза (ГТ) - катализирующие окислительно-восстановительные превращения глутатиона и аскорбата;

- Peroксидаза - расщепляющая перекись [2,8].

Ферментсодержащие АО выполняют свою функцию внутри клетки, т.к. их большая молекулярная масса препятствует свободному выходу из внутриклеточного пространства.

В то время как ферментативные антиоксиданты в основном содержатся внутри клеток, неферментативные антиоксиданты играют роль перехватчиков радикалов в водной и липидной фазах организма.

Жирорастворимые антиоксиданты освобождают клеточные мембраны от свободных радикалов и имеют решающее значение в предотвращении перекисного окисления липидов.

Наиболее важным жирорастворимым антиоксидантом является *Витамин E (α-Токоферол)* (рисунок 1.3) [10]. Он встраивается в клеточную мембрану и таким образом, препятствует атаке свободных радикалов и разрушению клеток. Также он обрывает цепные реакции с участием свободных радикалов.

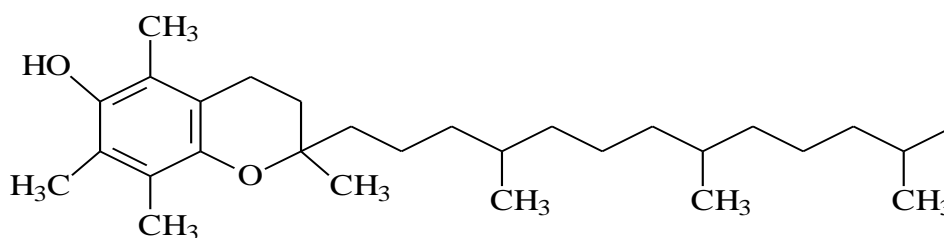


Рисунок 1.3 – Структурная формула α-токоферола.

Среди жирорастворимых антиоксидантов также выделяют *каротиноиды*. Наиболее важным из них является *β-каротин*. Они являются эффективными поглотителями синглетного кислорода и способны нейтрализовывать перекисные радикалы. По причине того, что каротиноиды преобладают во многих биологических тканях, они могут играть определенную роль в предотвращении перекисного окисления липидов [11]. *Витамин A (ретинол)* также обладает антиоксидантными свойствами [12].

Убихинон (кофермента Q10) (рисунок 1.4) является эффективным жирорастворимым антиоксидантом [13]. Хотя он встречается в более низких концентрациях, чем α-токоферол, при этом он может обезвреживать липидные

радикалы с более высокой эффективностью, чем α -токоферол или каротиноиды.

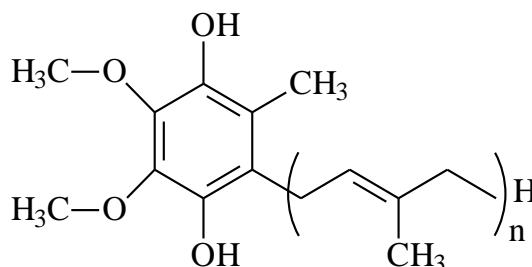


Рисунок 1.4 – Структурная формула убихинона (восстановленная форма)

Наиболее важным *водорастворимым АО* является *аскорбиновая кислота (Витамин С)*. В организме человека аскорбиновая кислота (АК) действует как кофактор активизации реакций гидроксилирования ряда ферментов. Другой основной функцией АК является ее взаимодействие в качестве восстановителя с супероксидом, перекисью водорода, гидроксильным радикалом, хлорноватистой кислотой и синглетным кислородом, при этом АК отдает два электрона, окисляясь до дегидроаскорбата [14].

Мочевая кислота (МК), являясь мощным антиоксидантом, эффективно взаимодействует с радикалами, может взаимодействовать с α -токоферолом или аскорбиновой кислотой, усиливая их антиоксидантное действие [15].

Глутатион является низкомолекулярным антиоксидантом и может участвовать в функционировании неферментативной антиоксидантной защиты, выступая в роли перехватчика свободных радикалов [16,17].

Цистеин - один из самых мощных антиоксидантов. Его антиоксидантные свойства усиливаются при одновременном приеме АК и селена [18]. Цистеин является предшественником глутатиона.

Таким образом, система антиоксидантной защиты организма включает ряд компонентов, защищающих организм от окислительных повреждений.

1.3 Окислительный стресс и его роль в патогенезе ряда заболеваний

Окислительный стресс (ОС) – патологическое состояние организма, вызванное повышенным содержанием АФК. Причины избыточной генерации АФК - воздействие на организм неблагоприятных эндогенных (патологии) и экзогенных (загрязнение окружающей среды и пищи, физические нагрузки, курение) факторов [19,20].

Вклад ОС в патогенез всех органов [2] человеческого тела объясняется универсальностью и ключевой ролью окислительно-восстановительных реакций, происходящих в клетках организма при патологических процессах. Клетки живого организма способны генерировать оксиданты, поэтому развитие окислительного стресса может происходить в любых органах и тканях. Поэтому трудно выделить отдельную группу патологий, вызванных окислительным стрессом.

Многообещающим методом борьбы с нежелательными последствиями окислительного стресса может являться повышение роли АОС, активности как эндогенных, так и экзогенных антиоксидантов [21]. В частности, увеличение потребления пищевых антиоксидантов способствует нормальному функционированию физиологических систем [22].

В связи с этим актуальна разработка производительных и точных методов оценки содержания антиоксидантов и оксидантов в продуктах питания, напитках, лекарственных средствах, воде, биологических жидкостях и тканях. Разработка этих методов имеет жизненно важное значение, поскольку АОА/ОА является показателем:

- качества, в случае пищевых продуктов и напитков;
- уровня окислительного стресса и связанных с ним заболеваний в случае биологических жидкостей (таких, как кровь или её фракции, семенная жидкость и др.).

1.3.1 Болезни системы кровообращения

Окислительный стресс – важный патогенетический элемент патологии системы кровообращения [23,24].

При гиперпродукции эндотелием оксида азота и супероксида зафиксирована предрасположенность к тромбозам, инфаркту миокарда и инсульту [25].

Интенсификации свободнорадикального окисления является одной из причин нарушения липидного метаболизма, приводящего к прогрессированию атеросклероза [26].

Сердечная недостаточность вызвана повреждением АФК кардиомиоцитов и эндотелий, приводящим к развитию депрессии сократительной функции миокарда и возрастающей вазоконстрикцией [27]. ОС также стимулирует активацию клеток воспаления и мутации митохондриальной ДНК при сердечной недостаточности.

Превышение физиологического уровня АФК приводит к ишемической болезни сердца [28]. Снижение сократительной способности миокарда вызывает циркуляторную гипоксемию и активацию ПОЛ.

1.3.2 Окислительный стресс и репродуктивная функция мужчин

Генерация активных форм кислорода в семенной жидкости может приводить к перекисному повреждению клеточных мембран, а также деформации сперматозоидов и в итоге, к мужскому бесплодию [29]. Причинами бесплодия являются анатомические дефекты, эндокринопатия, иммунологические проблемы, мутации гена, радиотерапия, химиотерапия и воздействие окружающей среды. Поскольку полиненасыщенные жирные кислоты и фосфолипиды содержащиеся, в сперматозоидах очень восприимчивы к перекисному окислению, свободные радикалы могут участвовать в

производстве спермицидных цитотоксических конечных продуктов [30]. Физиологический уровень АФК необходим для реакции капацитации, акросомальной реакции и самих процессов оплодотворения [31]. Однако большие концентрации АФК оказывают негативное влияние на функции эякулята и на жизнеспособность сперматозоидов.

Семенная жидкость является важным источником антиоксидантов, которые в свою очередь играют ключевую роль в защите от окислительного повреждения сперматозоидов [32]. Дисбаланс между избыточным содержанием АФК и снижением антиоксидантной защиты приводит к окислительному стрессу. Некоторые исследования показывают, что у бесплодных мужчин концентрация антиоксидантов находится на более низком уровне, чем у фертильных мужчин [33].

Таким образом, ОС, вызванный избыточной генерацией АФК, играет существенную роль в патогенезе мужского бесплодия. Поэтому необходима разработка простых и оперативных методов определения АОА/ОА семенной жидкости и выявление референтных значений этого диагностического критерия крайне актуальны для уточнения этиологии мужского бесплодия и оптимизации его терапии.

1.3.3 Окислительный стресс и слюна человека

Слюна человека, являясь прозрачной бесцветной жидкостью, выделяется в полость рта подчелюстной, околоушной и подъязычной слюнными железами, а также множеством мелких слюнных желез. Она играет важную роль в поддержании здоровья полости рта (рисунок 1.5) [37].

Слюна обладает различными защитными механизмами, такими как иммунологические и ферментативные защитные системы, направленные на борьбу с бактериями, вирусами и грибами, защита слизистой оболочки и ее заживление [38,39]. Одним из важных механизмов защиты является система

антиоксидантов [38]. Антиоксидантная система слюны включает в себя как ферменты (пероксидаза, каталаза, супероксиддисмутаза), так и молекулярные антиоксиданты (аскорбиновая и мочевая кислоты, витамин Е, глутатион) [39,40].

Функции слюны



Рисунок 1.5 – Функции слюны

Слюна обладает различными защитными механизмами, такими как иммунологические и ферментативные защитные системы, направленные на борьбу с бактериями, вирусами и грибами, защита слизистой оболочки и ее заживление [38,39]. Одним из важных механизмов защиты является система антиоксидантов [38]. Антиоксидантная система слюны включает в себя как ферменты (пероксидаза, каталаза, супероксиддисмутаза), так и молекулярные антиоксиданты (аскорбиновая и мочевая кислоты, витамин Е, глутатион) [39,40].

Многие заболевания полости рта, такие как кариес, пародонтоз и т.д. связаны с окислительным стрессом [41]. Воспалительные заболевания пародонта отличаются затяжным течением и сопровождаются уменьшением

физиологического резерва АОС [42]. Под воздействием АФК ткани пародонта повреждаются [43-46]. В результате ОС гибнут клетки эпителия и соединительной ткани, разрушается связочный аппарат зубов, нарушается процесс регенерации и формирования пародонтальных карманов [47]. У пациентов с заболеваниями пародонта значения АОА слюны значительно ниже, чем значения у здоровых пациентов [42]. Однако в случае кариеса, отмечается обратная картина, АОА слюны выше у пациентов с кариесом [48]. Авторами [49] показано, что АОА слюны зависит от ежедневной чистки зубов и приема витамина С.

Наблюдается связь между пониженным уровнем АОА слюны и острым коронарным синдромом [50]. Так же обнаружены изменения АОА слюны у пациентов с деменцией [51]. Уровень антиоксидантной активности слюны у пациентов с сахарным диабетом ниже, чем у здоровых респондентов [52]. АОА слюны у больных серповидноклеточной анемией так же снижена [53].

Таким образом, слюна, как объект анализа имеет ряд преимуществ по сравнению с кровью, такими, как неинвазивный и простой сбор, а также возможность повторной выборки. Наличие взаимосвязи между заболеваниями ротовой полости и внутренним состоянием организма даёт основания полагать, что АОА слюны может служить источником информации об общих проблемах со здоровьем.

1.3.4 Окислительный стресс и кожа человека

Свободные радикалы являются угрозой для различных тканей и приводят к развитию многих патологических состояний и заболеваний. Кожа в большей мере, чем другие ткани, подвергается воздействию химических, физических агентов, а также агентов окружающей среды, которые способны индуцировать формирование свободных радикалов, вызывающих окислительный стресс. Она является органом, функционирующим как физический барьер, защищающий организм от опасностей окружающей среды. Активные формы кислорода, такие

как гидроксильные радикалы, супероксид-анион радикал и синглетный кислород, играют важную роль в патогенезе некоторых заболеваний [54], в том числе, некоторых кожных заболеваниях [55,56].

Кожа, являясь естественной границей между внутренними системами организма и внешним миром, подвергается воздействию эндогенных и экзогенных факторов (рисунок 1.6) [57-59].

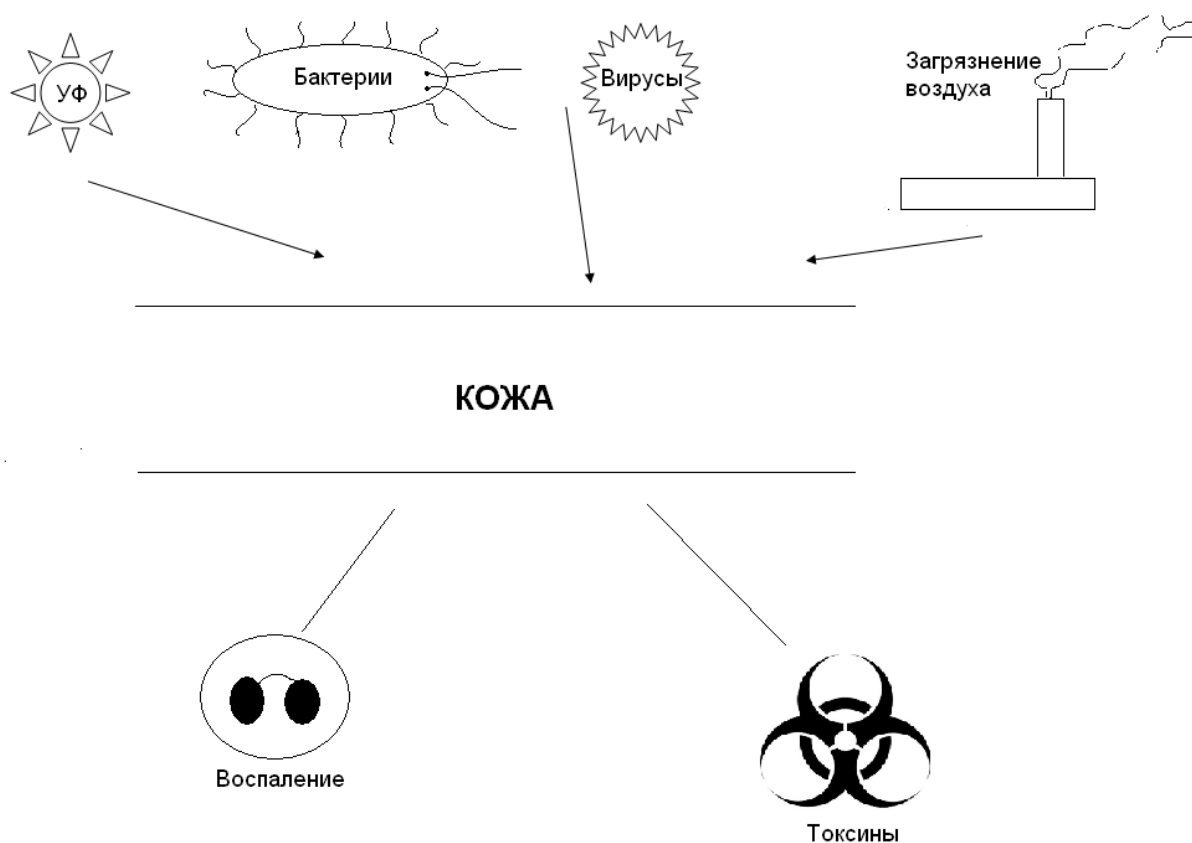


Рисунок 1.6 – Факторы, действующие на кожу человека

АОС кожи включает ферментативные (глутатионпероксидаза, супероксиддисмутаза, каталаза) и неферментативные АО, такие как α -токоферол, витамин С, глутатион, мочевая кислота и убихинол [60]. Концентрация АО в эпидермисе выше, чем в дерме [61]. В роговом слое содержатся как водорастворимые АО (аскорбиновая и мочевая кислоты, глутатион), так и жирорастворимые - витамин Е [62].

Таким образом, кожа, с одной стороны, является первым барьером на пути вредных внешних воздействий, а, с другой стороны, объектом эндогенного воздействия. Естественно полагать, что её антиоксидантное состояние зависит от этих факторов. Наличие взаимосвязи между внутренним состоянием организма и кожными патологиями даёт основания полагать, что АОА кожи может служить источником информации об общих проблемах со здоровьем.

1.4 Методы мониторинга окислительного стресса

Многообразие объектов различной химической природы, обладающих окислительными и антиоксидантными свойствами, делает задачу их определения крайне нетривиальной. Методы мониторинга ОС представлены на рисунке 1.7.



Рисунок 1.7 – Методы мониторинга ОС

1.4.1 Методы определения оксидантов

Прямое определение свободных радикалов при физиологической температуре трудноосуществимо из-за их высокой реакционной способности и малого времени жизни, вследствие чего их стационарная концентрация в исследуемых объектах очень низка.

Наиболее объективными прямыми методами обнаружения и определения свободных радикалов являются методы электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) и хемилюминесценции.

Метод ЭПР основан на обнаружении и определении концентрации неспаренных электронов в образце по форме и амплитуде спектров [63]. В ряде случаев концентрация свободных радикалов в клетках крайне низкая и чувствительности метода ЭПР недостаточно для их обнаружения. Предложен подход с использованием специфических спиновых ловушек (1-гидрокси-3-метоксикарбонил-2,2,5,5-тетраметилпирролидин), при взаимодействии с которыми, свободные радикалы превращаются в стабильные [64].

Клетки и ткани способны испускать собственное свечение, которое обусловлено реакциями перекисного окисления липидов и радикалов кислорода. Метод хемилюминесценции основан на регистрации свечения, сопровождающего эти химические реакции [65].

Непрямые методы основаны на определении отдельных радикалов. *Супероксид-анион радикал* способен проявлять свойства, как окислителя, так и восстановителя. Так, он восстанавливает цитохром С. Концентрацию радикала определяют спектрофотометрическим методом, измеряя оптическую плотность при 550 нм [66,67].

Гидроксидный радикал определяют регистрацией продуктов их гидроксигирования и окисления методами спектрофотометрии [68], хроматографии [69] и флуоресценции [70].

Существует способ определения гидроксидного радикала, основанном на улавливании его диметилсульфоксидом с образованием формальдегида, который впоследствии реагирует с аммонием и ацетилацетоном.

образовавшийся 3,5-диацетил-1,4-дигидро-2,6-лутидин, определяли при помощи ВЭЖХ с флуоресцентным детектором [71].

Деструкция 2-дезоксид-рибозы сопровождается образованием диальдегидов, которые фиксируют при 532 нм. По степени деструкции судят о скорости образования гидроксидного радикала. [69].

Известен метод, основанный на измерении скорости образования гидроксильных радикалов методом бензольного зонда, в котором фенол, образующийся в результате реакции между бензолом и фотохимически генерируемыми радикалами ОН, анализировался при помощи ВЭЖХ [72].

Широко используется метод оценки суммарного воздействия оксидантов на организм по концентрации продуктов перекисного окисления липидов.

Гидропероксиды определяют титрованием йодид-ионами с фиксацией образующегося йода амперометрически [73] или спектрофотометрически [74].

Существует метод, основанный на реакции между гидропероксидом и двухвалентным железом и измерении образовавшегося в результате образования комплекса с ксиленоловым оранжевым трехвалентного железа при длине волны 560 нм [75].

Малоновый диальдегид образуется в результате метаболизма полиненасыщенных жирных кислот. МДА определяют, используя его реакции (рисунок. 1.8) с тиобарбитуровой кислотой с образованием красного пигмента [76].

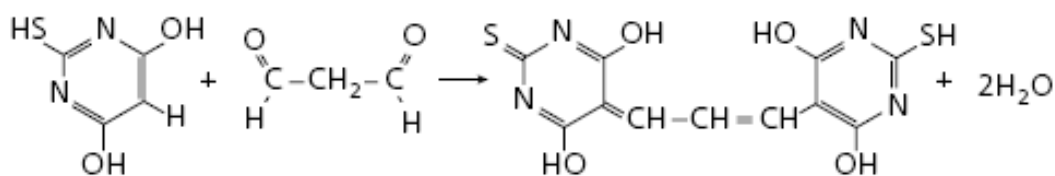


Рисунок 1.8 – Реакция взаимодействия МДА с тиобарбитуровой кислотой

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с фотометрическим детектором в видимой области (длина волны $\lambda=532$ нм) позволяет определять МДА в сыворотке крови [77].

Диеновые конъюгаты (ДК) - молекулы с двойными сопряженными связями. Субстратом для определения ДК выступает любое вещество, содержащее полиненасыщенные жирные кислоты. Уровень диеновых конъюгатов определяют спектрофотометрически при длине волны 233 нм [68].

Карбонильные производные определяют, регистрируя поглощение света в области длин волн 360-390 нм, которое возникает при образовании 2,4-дифенилгидразонов в результате их взаимодействия с 2,4-дифенилгидразинами [78].

Основания Шиффа (азометины) определяют флуоресцентным методом, проводя измерения при $\lambda=450$ нм [79].

Основной недостаток этих методов в применении к мониторингу оксидантного состояния, заключается в том, что они дают информацию о результате воздействия оксидантов, когда вред уже нанесён

Для определения общей оксидантной активности предлагают использовать спектрофотометрический метод, основанный на окислении ионов Fe^{2+} до Fe^{3+} оксидантами образца и регистрации интенсивности окрашивания. Результаты выражают в эквивалентах пероксида водорода [80].

1.4.2 Методы определения антиоксидантов

Методы определения ферментативных АО специфичны и заключаются в оценке их каталитической активности.

Общие принципы определения ферментативных АО, базирующиеся на окислительно-восстановительных реакциях, основаны на прямом или косвенном измерении скорости или полноты реакции и реализуются разными химическими и физико-химическими методами [81-85].

Метод определения АОА *супероксиддисмутазы (СОД)* заключается в ингибировании окисления адреналина при котором образуется аденохромм и измерении оптической плотности среды при 480 нм [81]. Помимо адреналина также используют пирогаллол [82] или кверцетин [84].

Существует метод измерения активности СОД, в основе которого лежит фотосенсибилизированная рибофлавином хемилюминесценция люцигенина [85].

Для определения активности каталазы используют спектрофотометрический метод, предложенный Эби. Метод основан на способности пероксида водорода, образовывать окрашенный комплекс с солями молибдена [86].

Известен количественный метод определения активности каталазы в крови, основанный на эффекте разложения перекиси водорода и последующем титровании остатка перманганатом калия [87].

Глутатионпероксидазы определяют с помощью убыли восстановленного глутатиона, перекиси водорода или по накоплению окисленного глутатиона [88].

Глутатионредуктазу определяют регистрацией снижения оптической плотности среды при восстановлении, окисленного глутатиона, на которое расходуется эквимольное количество никотинамидадениндинуклеотида (НАД•Н) [69].

Традиционно используют два подхода определения антиоксидантов. Главным отличием, которых является применение в качестве окислителя свободных радикалов [89,90], или нерадикальных химических реагентов, которые при взаимодействии с антиоксидантами образца изменяют оптические, электрохимические и другие свойства системы [91]. Основные методы определения можно разделить на оптические и электрохимические.

К оптическим методам относят *хемилюминесценцию* – регистрацию свечения или угнетения свечения веществ при взаимодействии с антиоксидантами [92-94]. Процесс хемилюминесценции двухстадийный, первая стадия — это образование продукта в возбужденном состоянии, вторая – испускание кванта света.

Примером является метод с использованием распада 2,2'-азобис-(2-амидинопропан) дигидрохлорида (AAPH). Люминофоры взаимодействуя с

радикалами дают свечение, которое подавляется при введении в систему антиоксидантов [93].

Метод *ORAC* (*Oxygen radical absorption capacity*). В основе метода лежит регистрация *флуоресценции* субстрата, вызванная его взаимодействием с радикалом и уменьшении ее при введении антиоксидантов [95]. Метод широко используется для определения интегральной АОА биологических жидкостей [26].

Метод *TRAP* (*Total radical trapping parameter*) в основе которого лежит взаимодействие пероксильных радикалов с флуоресцирующими веществами. Пероксильных радикалы образуются в результате термического разложения 2,2'-диазобис(2-амидинопропана) дигидрохлорида (АБАП) при 37⁰С. Радикалы взаимодействуют с раствором белка R-фикоэритрина, что приводит к увеличению флуоресценция белка. Присутствие антиоксидантов увеличивает время флуоресценции [91].

Существует метод «Competition kinetics» (конкуретной кинетики), в основе которого регистрация окисления кроцина радикалами при 450 нм в присутствии антиоксидантов [96]. Метод является вариацией метода TRAP, однако считается более точном, так как во внимание принимается как концентрация антиоксидантов, так и их константу скорости реакции с пероксильным радикалом, что не учитывается в TRAP.

К *фотометрическим* методам относят метод, основанный на подавлении окраски радикала 1,1-дифенил-2-пикрилгидразида (DPPH) при взаимодействии с антиоксидантами [97].

В основе метода *TEAC* (*Trolox equivalent antioxidant capacity*) [89] лежит взаимодействие антиоксидантов с долгоживущим радикалом АВТС (2,2-азинобис(3-этилбензотиазолина-6-сульфоната)) и замедлении абсорбции при длине волны 600 нм. Недостатком метода является необходимость генерации радикала, увеличивающее время анализа.

Метод *FRAP* (*Ferric reducing/antioxidant power*) основан на взаимодействии антиоксидантов с Fe⁺³-трипиридилтриазином с последующим

восстановлением его до Fe^{+2} -трипиридилтриазина, обладающим интенсивной синей окраской (593 нм) [98].

В основе метода *PFRAP* (*potassium ferricyanide reducing power*) лежит взаимодействие антиоксидантов с феррицианидом калия, образуя ферроцианид калия, который реагирует с хлоридом железа (III) с образованием берлинской лазури с максимум абсорбции при 700 нМ [99].

Метод *CUPRAC* (*cupric reducing antioxidant power*) заключается в измерении оптической плотности при 450 нМ хелата Cu(I) -неокупроин (Nc) который образуется в результате окислительно-восстановительной реакции антиоксидантов, разрушающих цепь, с Cu(II) -Nc [100].

1.4.3 Электрохимические методы определения АОА/ОА

Кулонометрический метод. Разработан ряд методов определения антиоксидантов с использованием кулонометрического титрования электрогенерированными титрантами [101-103]. В качестве титрантов используются галогены (Cl_2 , I_2 , Br_2).

Амперометрические методы. В основе амперометрического метода лежит регистрация тока, который возникает в результате окисления антиоксиданта на поверхности электрода при определенном потенциале. Метод, реализованный в приборе «Цвет Яуза-01-АА» [104], позволяет определить суммарное содержание антиоксидантов фенольного типа.

Амперометрические методы анализа обладают низким пределом обнаружения, малым объемом ячейки, высокой селективностью, простотой обслуживания. Амперометрическое определение АО позволяет определять соединения, содержащие гидроксильные группы. Но при использовании амперометрического метода для определения общей АОА могут возникать существенные ошибки измерения [105].

Вольтамперометрический метод. Предложен метод определения активности антиоксидантов, в котором измеряют, ток катодного восстановления кислорода на ртутно-пленочном электроде в апротонных растворителях [106-109]. Авторами предложено использовать кинетический критерий K мкмоль/л-мин в качестве критерия антиоксидантной активности исследуемых образцов. Недостатком метода является высокий разброс показаний, полученных при идентичных измерениях (до 1,5–2,0 раз). Предложенный вольтамперометрический метод использован для исследования антиоксидантных свойств чая и соков [108,109].

Известен ряд методов *циклической вольтамперометрии (ЦВА)* и *хроноамперометрии (ХА)*, сигналообразующими процессами которых являются как прямое окисление антиоксидантов [110-116], так и электрокаталитические реакции [117-119], в которых, как правило, участвует модифицирующий слой органического реагента.

В описанных методах используют различные виды электродов, таких как допированный бором золотой или стеклоуглеродный электроды [112], микроэлектроды из стеклоуглеродного волокна [110], угольно-пастовые электроды [113], толстопленочные (screen-printed) электроды [111]. Поверхность электродов модифицируют органическими реагентами [117] и/или наночастицами металлов [111], оксидов [117], углеродными нанотрубками [118].

Потенциометрический метод. В потенциометрическом методе источником информации об АОА/ОА служит сдвиг потенциала платинового электрода (ТПЭ), который помещают в раствор медиаторной системы, наблюдающийся при введении пробы в раствор [120]. Сдвиг происходит вследствие изменения соотношения восстановленной и окисленной форм компонентов медиаторной системы в результате их взаимодействия с антиоксидантами и оксидантами пробы. Применение медиаторной системы обеспечивает возможность измерения равновесного потенциала вместо стационарного, который является функцией большого количества не

учитываемых параметров. Метод успешно применялся для измерения АОА продуктов и биологических жидкостей (кровь и её фракции, семенная и фолликулярная жидкости) [121-123]. Показана полная сопоставимость результатов измерений АОА плазмы крови спектрофотометрическим методом TAS (Randox) и потенциометрическим методом [122].

1.4.4 Методы оценки АОА слюны

Методы оценки АОА слюны можно разделить на методы, дающие информацию о количественном содержании отдельных антиоксидантов и методы, дающие информацию об общей антиоксидантной активности.

Активность пероксидазы слюны определяют по накоплению окрашенных продуктов реакции АВТS с пероксидом водорода при длине волны 436 нм [42].

Мочевую кислоту разлагают уриказой на аллантаин и пероксид водорода, которые под воздействием пероксидазы окисляются до хромогена обладающего красной окраской, интенсивность цвета которого пропорциональна количеству мочевой кислоты присутствующей в образце. Изменение оптической плотности измеряют при 546 нм [124].

Концентрацию аскорбиновой кислоты определяют в кислой среде с помощью динитрофенилгидразина при 540 нм [125].

Большой интерес представляют методы определения интегральной величины АОА.

АОА слюны определяют по способности антиоксидантов ингибировать окисление АВТS до АВТS⁺ при длине волны 450 нм. В качестве стандарта используют водорастворимый синтетический аналог витамина Е – тролокс [126-129].

Существует метод, основанный на комплексной реакции этилендиаминтетраацетатной кислоты железа (Fe-EDTA) с пероксидом водорода и последующим образованием гидроксильных радикалов. Которые в свою очередь разрушают бензоат, что приводит к высвобождению

реакционноспособных веществ тиобарбитуровой кислоты (TRABS). АО образца приводят к подавлению продуцирования TRABS. АОА оценивают спектрофотометрическим методом [51].

Используют метод FRAP, АО слюны взаимодействуют с Fe^{+3} - трипиридилтриазином с последующим восстановлением его до Fe^{+2} - трипиридилтриазина [130].

Также существует метод, основанный на восстановлении молибдена (VI) антиоксидантами до молибдена (V) (реактив Фолина-Чокальтеу), который далее реагирует с фосфатом, что приводит к образованию комплекса зеленого цвета, интенсивность которого определяется спектрофотометрически при 695 нм [131].

Приведённые методы являются длительным и дорогостоящим, включают несколько стадий. Величины АОА, полученные различными методами различаются на порядок. Поэтому необходима разработка простого и доступного метода определения АОА слюны как интегральной величины.

1.4.5 Методы оценки АОА/ОА семенной жидкости

Оксидант/антиоксидантное состояние семенной жидкости характеризуется тремя показателями: концентрацией малонового диальдегида (МДА) [132,133], АОА [132-136] и ОА [134-137].

АОА дает информацию о состоянии системы антиоксидантной защиты организма, которая нейтрализует избыток АФК.

Избыточное количество оксидантов в пробе, сигнализирует об окислительном стрессе, что крайне важно в диагностике мужского бесплодия. Однако прямые методы мониторинга оксидантов описаны в единичных работах.

Среди большого количества методов определения оксидантного состояния семенной жидкости наиболее распространенными являются методы

определения содержания активных форм кислорода. Люминесцентные методы с использованием люминофоров для определения активных форм кислорода и, в частности, пероксида водорода, приведены в руководстве лаборатории всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) для изучения человеческой семенной жидкости [138]. Эти методы дают прямую информацию о содержании АФК, но являются достаточно трудоемкими и неспецифичными, при этом не учитывается изменение состава образца, извлечённого из организма

Описаны методы определения супероксид-анионов с использованием реакции восстановления нитросинего тетразолия до формазана и восстановления цитохрома с [139]. Эти методы высокочувствительны, но не обеспечивают необходимой специфичности.

Информацию о содержании АФК получают, используя реакцию с дихлорофлуоресцин-диацетатом (DCFH-DA), сопровождающуюся возникновением флуоресценции [140], но метод дорог, трудоемок и требует использования специальной стандартизации.

Известен прямой универсальный метод детектирования АФК, основанный на исследовании электронного парамагнитного резонанса [141]. Метод не находит широкого применения из-за использования дорогой и громоздкой техники.

Общую оксидантную активность определяли методом, основанным на окислении ионов двухвалентного железа до ионов трехвалентного железа в присутствии различных видов окислителей в кислой среде. Изменение цвета ксилоленового оранжевого в присутствии ионов трехвалентного железа регистрируют при 560 нм [142].

Существуют иммуноферментные методы определения косвенных показателей окислительного стресса семенной жидкости [143,144], таких как, фермента миелопероксидазы или воспалительных цитокинов - хемокинов, которые активизируются при генерации АФК. Однако эти методы также не несут прямой информации о состоянии оксидант/антиоксидантной системы.

К косвенным показателям окислительного стресса семенной жидкости относят уровень перекисного окисления липидов, в частности МДА, определяемых оптическими методами по реакции с тиобарбитуровой кислотой [132,133]. Метод специфичен, и определению мешают некоторые аминокислоты. Определение МДА дает ограниченную информацию об ОС, когда вред уже нанесён.

Наиболее объективным маркером апоптоза сперматозоидов является ДНК фрагментация, которую количественно можно определить различными методами [145,146]. Например, методом люминесценции, интенсивность которой пропорциональна числу встроенных в места разрыва ДНК меченых нуклеотидов (TUNEL assay) или по флуоресценции акридинового оранжевого, которая зависит от того, связан ли он с одноцепочечной или двухцепочечной молекулой ДНК (SCSA). Однако повреждение ДНК не обязательно указывает на наличие окислительного стресса в организме.

Для оценки состояния антиоксидантной системы используют методы определения активности ферментов [147,148], концентрации либо отдельных веществ [147,149], либо суммы веществ, проявляющих антиоксидантную активность, как интегрального параметра [150,151].

Антиоксидантные ферменты, такие как каталаза, супероксиддисмутаза и глутатион пероксидаза, составляют ферментную антиоксидантную систему защиты сперматозоидов от АФК [147,148], но определение ферментных антиоксидантов не дает полной картины об антиоксидантной защитной системе сперматозоидов. Теми же недостатками обладают хроматографические методы определения отдельных неферментативных антиоксидантов [143], таких как α -токоферол, β -каротин, ликопин, аскорбиновая кислота и т.д.

Определение антиоксидантной активности как интегрального параметра обеспечивает получение более полной и обоснованной информации, чем определение индивидуальных антиоксидантов, потому что учитывает кумулятивный эффект всех антиоксидантов, содержащихся в семенной

жидкости. Наиболее часто применяемыми методами являются хемилюминесцентный и спекрофотометрический [150,152].

Спектрофотометрический метод основан на подавлении антиоксидантами окраски, возникающей в результате генерирования катион-радикала ABTS^{•+} [153]. Метод является достаточно дорогостоящим и включает несколько стадий.

Существует ряд работ [136,137] в которых для определения АОА/ОА используют окислительно-восстановительный потенциал (ОВП). Этот потенциал зависит от большого количества факторов, которые не учитываются. Биологические объекты исследования содержат обратимые и необратимые редокс-системы. Их вклад в величину ОВП несоизмерим.

Таким образом, необходимо создание метода оценки интегральной оксидант/антиоксидантной активности семенной жидкости в одном измерении.

1.4.6 Методы оценки АОА кожи человека

Информация о способах мониторинга ОС в тканях, в частности в коже, крайне ограничена. Описанные в литературе методы в основном являются инвазивными. Одни из них требуют отбора и культивирования клеток фибробластов кожи человека.

Так образцы фибробластов человека культивируют в среде Игла в модификации Гибса с добавлением пенициллина, стрептомицина, бикарбоната натрия, глутамина и 15% телячьей сыворотки. Далее клетки пересевают с недельными интервалами путем трипсанизации. Перекисное окисление липидов определяют методом, основанным на реакции липидов с 2'-тиобарбитуровой кислотой и последующим определением кислоты при 532нм [154].

Фибробласты кожи человека получают с области плеча со стороны спины. Далее полученные фибробласты культивируют в среде Игла в модификации Дульбекко, содержащей пенициллин, L-глутамин и с

добавлением инактивированной нагреванием фетальной телячьей сыворотки при 37°C в увлажненной атмосфере с составом - 95% воздуха и 5% CO₂. Клетки выращивают до слияния, собирают трипсином при 37°C, промывают культурной средой и ресуспендируют в фосфатном буфере, а затем обрабатывают ультразвуком для получения клеточного гомогената. После чего определяют концентрацию ферментативных антиоксидантов. Каталазу определяют по убыли субстрата (H₂O₂), используя фотометрический метод. Концентрацию СОД определяют при помощи метода, основанного на восстановлении тетразолия-N-синего в присутствии супероксид радикала. Глутатионпероксидазу и глутатионредуктазу определяют по скорости уменьшения концентрации восстановленной формы никотинамидадениндинуклеотида (НАД•Н), необходимого для восстановления глутатиона [155].

Образцы кожи с молочной железы получают во время пластических операций. Берут образец кожи толщиной 10 на 15 мм, после чего удаляют жировую ткань, а оставшиеся части кожи измельчают и помещают в шести-луночные планшеты для культивирования мезенхимальных стволовых клеток. Культуры поддерживаются в инкубаторе с 5% CO₂ при 37°C. После 14 дней культивирования многочисленные сформировавшиеся колонии клеток мигрируют из эксплантов и образуют колонии. Прилипшие клетки и кожная ткань удаляются, а среда изменяется дважды в неделю. ГТ активность измеряют с использованием 1-хлор-2,4-динитробензол в качестве субстрата при 340 нм. ГР активность определяют по скорости уменьшения концентрации НАД•Н, необходимого для восстановления глутатиона. Скорость регистрируют по снижению оптической плотности среды при длине волны 340 нм [156].

Другие методы требуют приготовления гомогената.

В методе, описанном в [157], производится забор кожной ткани. Эта ткань отделяется от остальной части образца биопсии, т.е. жиров, путем рассечения и разделения до гомогенизации. Концентрации витамина Е и β-

каротина в гомогенате определяют методом ВЭЖХ с электрохимической детекцией. Концентрацию МДА измеряют с помощью ВЭЖХ.

Описанные в настоящее время неинвазивные методы решают лишь частные задачи. Так, метод Рамановской спектроскопии [158-164] позволяет оценить содержание каротиноидов. Но антиоксидантная защита кожи включает в себя множество других антиоксидантов, таких как ферментативные и низкомолекулярные неферментативные АО. Таким образом, определение каротиноидов не может дать достаточно информации об АОА как об интегральном параметре. Кроме того, каротиноиды обладают способностью перехватывать только $^1\text{O}_2$, поэтому они полезны лишь для защиты от УФ-индуцированного повреждения.

В методе [165] предлагают определять АОА рогового слоя кожи, полученного путем наклеивания специально липкой ленты на область предплечья. Свободные радикалы определяются по их реакции с хемилуминогенным веществом и измерению излучаемого света до и после введения образца с антиоксидантами.

Как уже отмечалось выше, именно электрохимические методы определения концентрации оксидантов и антиоксидантов являются наиболее перспективными. Одной из первых попыток реализации такого метода в неинвазивном варианте, по-видимому, был метод, описанный в [166], где предлагается анализировать смыв с кожи или [167] раствор, помещённый в открытую ячейку, контактирующую с кожей. Способ основан на введении исследуемого объекта в контакт с электропроводящим раствором, содержащим Fe(III) или систему I_2/NaI , и оценку антиоксидантной активности по изменению потенциалов электродов, введенных в электропроводящий раствор. Для определения используют ячейку, открытую с одной стороны и заполненную тестируемым раствором, в которую погружены рабочий электрод и электрод сравнения. Эти методы имеют два существенных недостатка:

1) искажение результатов вследствие свободного доступа кислорода воздуха в зону реакции;

2) сложность предотвращения протекания раствора между стенками ячейки и кожей, что исключает возможность создания способов массового анализа.

Итак, методы в основном инвазивны и дают лишь косвенные дифференцированные данные, которые часто сложно сопоставить между собой. Наиболее полную картину об антиоксидант/оксидантном состоянии объекта может дать метод оценки антиоксидантной активности как интегрального параметра. Поэтому необходимо создание нового варианта неинвазивного простого и удобного в применении метода оценки АОА состояния кожи.

1.5 Заключение

Использование многочисленных опубликованных результатов затруднительно из-за неоднозначности и несопоставимости данных из-за отсутствия единого терминологического подхода и общепринятых единиц измерения, недостаточно профессионального выбора условий проведения исследований, в частности, случайным выбором реагентов-окислителей [168].

Нет единого термина, определяющего антиоксидантные свойства соединений. Существуют такие термины, как «antioxidant capacity» and «antioxidant activity», понимая под первым «measure of the moles of given free radical scavengers by a test solutions». «Antioxidant activity» - [169] константа скорости действия антиоксиданта против свободных радикалов. Также существуют термины «antioxidant power» [170], «antioxidant ability» [171], принимая во внимание действие антиоксидантов. Таким образом, происходит смешение понятий - кинетических и термодинамических.

Разнообразие низкомолекулярных соединений, обладающих антиоксидантными свойствами, делает задачу определения АО крайне нетривиальной. Оценить вклад всех компонентов АОС практически невозможно, с одной стороны, из-за технической, сложности трудоемкости, высокой стоимости анализов, а с другой — из-за синергизма действия различных АО [171]. По этой причине перспективным является применение методов, позволяющих определить возможное антиоксидантное действие всех компонентов, находящихся в образце, в совокупности их взаимодействия между собой, учитывая их кооперативное антиоксидантное действия и вклад редко встречающихся антиоксидантов.

Поскольку оксидант/антиоксидантная активность (АОА/ОА) отражает свойства системы в целом и определяется комплексом соединений, для её характеристики целесообразно определение АОА/ОА как интегрального параметра.

Электрохимические методы определения АОА/ОА дают возможность непосредственно оценить электронно-донорно-акцепторные свойства исследуемой системы, которые определяют её оксидант/антиоксидантное состояние. Такие преимущества электрохимических методов анализа по отношению к более трудоемким традиционным инструментальным методам, как высокая чувствительность, широкий диапазон определяемых концентраций, простота аналитической процедуры, которая не требует сложной пробоподготовки, быстрота проведения анализа, возможность исследования окрашенных растворов, небольшие объемы образца, простота, возможности автоматизации анализа и относительная ценовая доступность аппаратуры обусловили в последнее десятилетие значительный интерес исследователей к их использованию для определения антиоксидантов и общей АОА [172].

1.6 Постановка задачи

Из литературного обзора, следует, что весьма важной, в частности, для медицины, задачей аналитической химии является развитие простых и доступных неинвазивных электрохимических методов мониторинга ОС и разработка алгоритмов оценки АОА/ОА различных биологических жидкостей и кожи для этой цели.

Для решения проблем, возникающих на этом пути, необходимо:

1. Развить новый высокочувствительный вариант хроноамперометрического метода определения АОА и обосновать возможность его использования для анализа биологических жидкостей путём проведения корреляционных исследований результатов определения хроноамперометрическим и потенциометрическим методами.

2. Выбрать условия определения, разработать алгоритмы анализа и исследовать антиоксидантную активность слюны потенциометрическим и хроноамперометрическим методами.

3. Разработать подход к одновременному обнаружению антиоксидантов и оксидантов потенциометрическим методом с медиаторной системой, для чего исследовать особенности потенциограмм, зарегистрированных в растворах, содержащих медиаторную систему и семенную жидкость инфертильного мужчины. \

4. Выяснить возможность использования особенностей потенциограмм для обнаружения АОА/ОА семенной жидкости и оценки состояния репродуктивной функции.

5. Провести исследование сенсоров и модельных систем и обосновать корректность использования потенциометрического метода оценки АОА кожи.

6. Показать возможности использования метода для неинвазивной оценки АОА кожи в следующих случаях:

- влияние воздействия косметических средств на АОА кожи;
- влияние потребляемых напитков на АОА кожи;
- взаимосвязь гипертонической болезни и АОА кожи.

Решение этих задач позволит внести вклад в развитие неинвазивных электрохимических методов определения АОА/ОА биологических жидкостей и кожи и адаптировать их для использования в качестве контрольных при исследовании воздействия различных препаратов на здоровье человека.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Оборудование и средства измерения

Для хроноамперометрических и вольтамперометрических измерений использовали инверсионный вольтамперометрический анализатор «ИВА-5М» (ООО НПВП «ИВА», г. Екатеринбург, Россия). Использовали трехэлектродные электрохимические ячейки объемом 10 см³.

Потенциометрические измерения проводили с использованием пилотного образца потенциометрического анализатора АОТ-1пс интерфейсом RS232 (ООО НПВП «ИВА»), многофункционального потенциометрического анализатора «МПА-1» (ООО НПВП «ИВА», г. Екатеринбург, Россия) и рН/ион метра модели "ТА-ИОН" (Томьаналит, Россия). Измерения проводили в двухэлектродной ячейке объемом 2 см³.

Индикаторными служил толстопленочный платиновый электрод (ТПЭ) (ООО НПВП «ИВА», Екатеринбург), изготовленный методом трафаретной печати.

Электроды сравнения:

- хлоридсеребряный электрод ($\text{Ag}/\text{AgCl} / 3 \text{ моль/дм}^3 \text{ KCl}$) типа ЭВЛ – 1М («Гомельский ЗИП», г. Гомель, Беларусь);
- электрод типа ECG electrodes Arbo («Kendall», USA).

Вспомогательным электродом служил стеклоуглеродный стержень.

2.2 Реактивы и объекты исследования

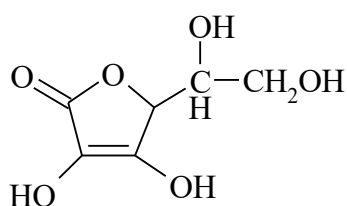
В экспериментах использованы следующие реактивы и материалы:

- Гексацианоферрат(II) калия (Реахим, Россия);

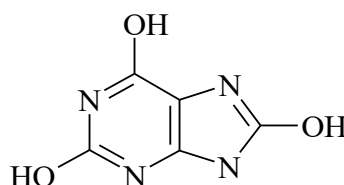
- Гексацианоферрат(III) калия (Реахим, Россия);
- KH_2PO_4 (Реахим, Россия);
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Реахим, Россия);
- NaCl (Реахим, Россия);
- аскорбиновая кислота (Fluka, Германия);
- восстановленный глутатион (Fluka, Германия);
- L-цистеин гидрохлорид (Fluka, Германия);
- мочевая кислота (Sigma-Aldrich, Germany);
- пероксид водорода (Реахим, Россия);
- бычий альбумин сывороточный (Serva, Germany);
- гель электропроводный контактный высокопроводящий («Гельтек-Медика», Россия).

Объектами исследования являлись:

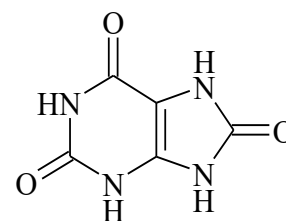
1. Растворы антиоксидантов (рисунок 2.1).



Аскорбиновая кислота

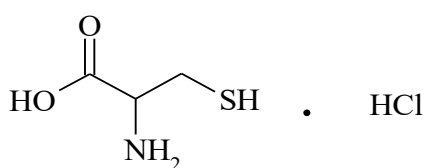


Мочевая кислота

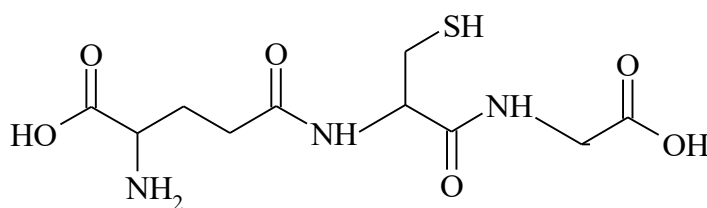


Енольная форма

Кетонная форма



Цистеин гидрохлорид



Глутатион

Рисунок 2.1 – Антиоксиданты, их структурные формулы

2. Раствор пероксида водорода

3. Кровь, полученная из локтевой вены в пробирки с антикоагулянтном.

4. Плазму крови и эритроцитарную массу получали центрифугированием содержимого пробирок с антикоагулянтом при 3000 об/мин в течение 15 мин.

5. Сбор слюны осуществляли в утреннее время с 8:00 до 11:00. Респонденты воздерживались от еды, питья, курения или чистки зубов после полуночи в день отбора проб. Слюну собирали в течение 5 мин.

6. Сбор семенной жидкости осуществляли в утреннее время. Для анализа семенной жидкости использовали разжиженный образец. Разжижение определяли по изменению вязкости спермы, измеренной по длине "нити", тянущейся за каплей, выпущенной из шприца. Эякулят считался разжиженным, если длина "нити" не превышает 2 см. Время разжижения составляет 20-40 минут.

7. Для исследования кожи человека использовали поверхность кожи в области запястья. Исследуемый участок кожи предварительно промывали деионизированной водой.

8. При проведении косметологических исследований воздействия кремов на кожу, перед измерением избыток крема удалялся с кожи стерильной салфеткой, и кожа также промывалась деионизированной водой.

9. Сок и профилактические напитки открывали в день исследования. Перед принятием профилактического напитка и сока, 200 мл выбранного напитка, разбавляли водой до объёма 500 мл.

2.3. Методы исследования

Метод циклической вольтамперометрии использовался для выбора потенциала регистрации хроноамперограмм при разработке гибридного варианта хроноамперометрического метода определения АОА.

Для исследования АОА биологических образцов применяли потенциометрический метод с использованием медиаторной системы. Потенциометрический метод определения АОА основан на взаимодействии

антиоксидантов с окисленным компонентом медиаторной системы. Сдвиг потенциала рабочего электрода, наблюдающийся при введении образца в раствор, содержащий медиаторную систему, служит аналитическим сигналом.

В качестве медиаторной системы использовали смесь Гексацианоферрат(III) калия ($K_3[Fe(CN)_6]$)/Гексацианоферрат(II) калия ($K_4[Fe(CN)_6]$). При этом в системе протекают реакции:



АО и АО_{ox} – антиоксидант и его окисленная форма;

Рабочий электрод - толстоплёночный Pt-электрод.

Равновесие между компонентами медиаторной системы описывается уравнением Нернста:

$$E = E_0 + b \cdot \lg \frac{f_{ox} C_{Ox}}{f_{red} C_{Red}} \quad (2.2), \text{ где}$$

$$b = 2,3 \cdot RT/nF;$$

f - коэффициенты активности, при дальнейшем расчёте ΔE коэффициентами активности можно пренебречь, т.к. при измерениях используются растворы с постоянной ионной силой;

E_0 – стандартный потенциал, В

E – потенциал системы в исходном состоянии, В;

C_{Red} – концентрация восстановленной формы медиаторной системы, М.

C_{Ox} – концентрация окисленной формы медиаторной системы, М;

После введения в раствор образца с АО, потенциал медиаторной системы описывается уравнением:

$$E_1 = E_0 + b \cdot \lg \frac{f_{ox} (C_{Ox} - X)}{f_{red} (C_{Red} + X)} \quad (2.3)$$

где

X – суммарная концентрация антиоксидантов, М-экв.

E_1 – измеряемый потенциал системы после введения образца, В;
 Воспользовавшись величиной $\Delta E = E_1 - E$, легко рассчитать

$$X = AOA = \frac{C_{Ox} - \alpha C_{Red}}{1 + \alpha} \cdot a \quad (2.4)$$

$$f = (V_0 + V_{Al}) / V_{Al} \quad (2.5)$$

$$\alpha = (C_{Ox} / C_{Red}) \cdot 10^{(E_1 - E)nF / 2.3RT} \quad (2.6), \text{ где}$$

a – коэффициент разбавления;

V_0 – объем смеси буферного раствора с медиаторной системой, мл;

V_{Al} – объем аликвоты пробы, помещенной в ячейку, мл.

ГЛАВА 3. ХРОНОАМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИОКСИДАНТОЙ АКТИВНОСТИ

3.1 Выбор условий анализа

Циклическая вольтамперограмма, зарегистрированная с использованием толстопленочного платинового электрода (ТПЭ), погружённого в раствор, содержащий эквимольную смесь $K_3[Fe(CN)_6]$ и $K_4[Fe(CN)_6]$ (0.3 мМ) и фосфатный буфер (рН=7.4), изображена на рисунке 3.1.

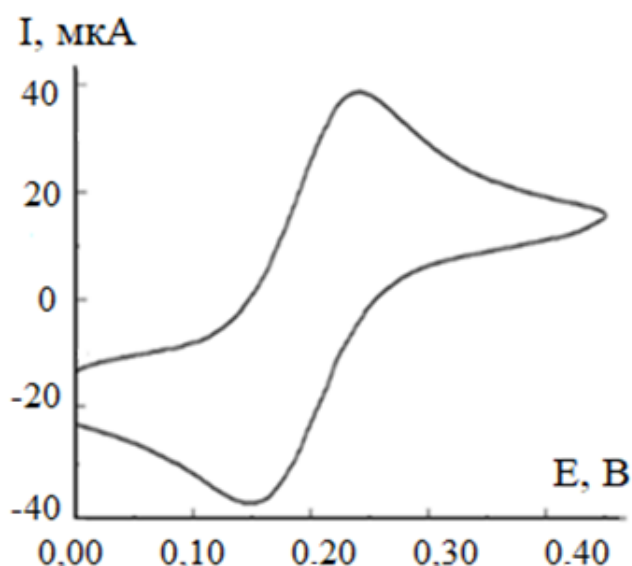
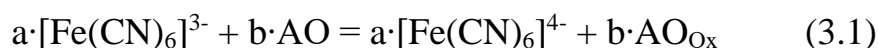


Рисунок 3.1 – Циклическая вольтамперограмма, зарегистрированная с использованием ТПЭ, погружённого в раствор, содержащий 0.5 мМ $K_3[Fe(CN)_6]$, 0.5 мМ $K_4[Fe(CN)_6]$ и фосфатный буфер (рН=7.4). Скорость развертки 0.1 В/с

На вольтамперограмме наблюдаются ярко выраженные анодный и катодный пики, соответствующие окислению $K_4[Fe(CN)_6]$ и восстановлению $K_3[Fe(CN)_6]$ соответственно. Процесс окисления-восстановления на поверхности ТПЭ имеет квазиобратимый характер, что дает возможность зарегистрировать протекание этих процессов отдельно методом

хроноамперометрии. Правильный выбор потенциала дает возможность зарегистрировать протекание этих процессов отдельно независимо от кинетики. Из результатов, представленных на рисунке 3.1, следует, что при потенциалах более положительных, чем 0.3 В, происходит только процесс окисления $K_4[Fe(CN)_6]$, $K_3[Fe(CN)_6]$ не восстанавливается. Это является основным условием возможности выполнения измерений методом хроноамперометрии с использованием в качестве сигналообразующей предшествующей химической реакции:



где AO – антиоксидант, AO_{Ox} – продукт окисления антиоксиданта; a, b – стехиометрические коэффициенты реакции.

В качестве аналитического сигнала предлагается использовать ток окисления $K_4[Fe(CN)_6]$, образующегося в результате реакции 3.1.

На рисунке 3.2 приведены хроноамперограммы, зарегистрированные в фосфатном буфере при введении добавки $K_3[Fe(CN)_6]$ (концентрация в электрохимической ячейке (ЭХЯ) $10^{-4}M$) при различных потенциалах поляризации ТПЭ. При потенциалах 0.4 – 0.5 В ток имеет минимальное значение, это свидетельствует о том, что $K_3[Fe(CN)_6]$ не принимает участия в электродных процессах.

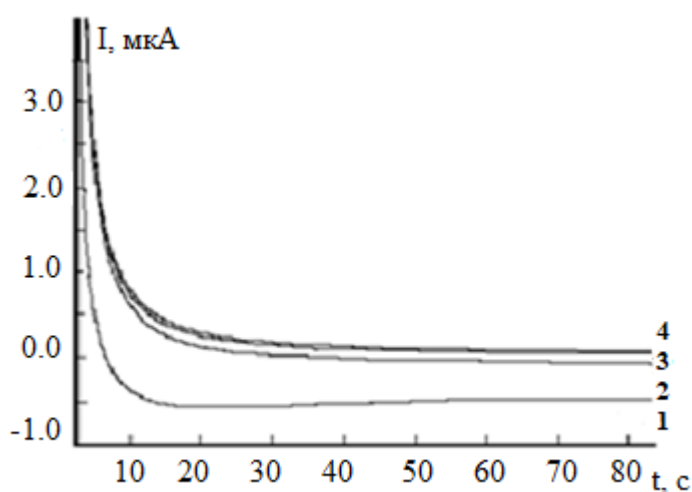


Рисунок 3.2–
Хроноамперограммы,
зарегистрированные в
присутствии $10^{-4} K_3[Fe(CN)_6]$
при потенциалах поляризации
ТПЭ 0.2 (1), 0.3 (2), 0.4 (3), 0.5
(4) В. Фон: Фосфатный буфер
(pH=7.4)

На рисунке 3.3 приведены хроноамперограммы, зарегистрированные в фосфатном буфере при введении добавки $K_4[Fe(CN)_6]$ (концентрация в ЭХЯ 10^{-5} М) при различных потенциалах поляризации ТПЭ. Введение в буферный раствор $K_4[Fe(CN)_6]$ сопровождается ростом анодного тока, обусловленного окислением реагента. При потенциале 0.2 В величина тока минимальна, что может быть связано с достижением состояния динамического равновесия процессов окисления-восстановления, при котором результирующий суммарный ток близок к нулю.

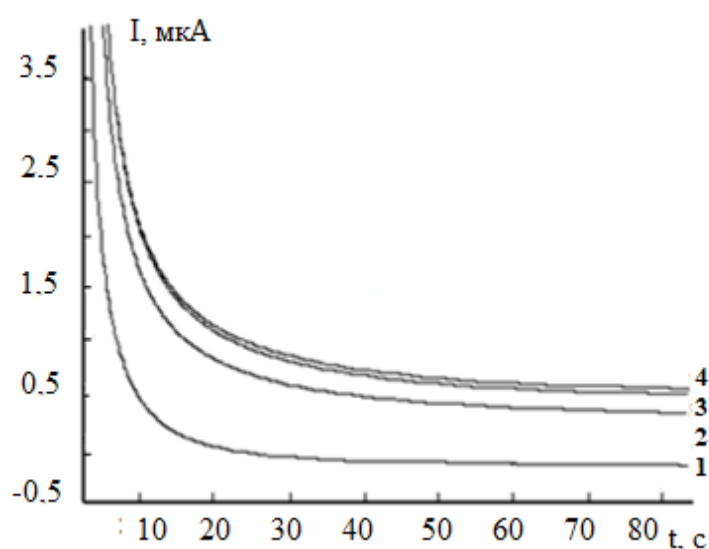


Рисунок 3.3 –
Хроноамперограммы,
зарегистрированные в
присутствии 10^{-5} $K_4[Fe(CN)_6]$
при потенциалах поляризации
ТПЭ 0.2 (1), 0.3 (2), 0.4 (3), 0.5
(4) В. Фон: Фосфатный буфер
(pH=7.4)

Для регистрации тока окисления $K_4[Fe(CN)_6]$ выбран потенциал 0.45 В.

На рисунке 3.4 приведены хроноамперограммы, зарегистрированные в фосфатном буфере при введении добавки $K_3[Fe(CN)_6]$ (концентрация в ЭХЯ 10^{-4} М) при различном времени измерения.

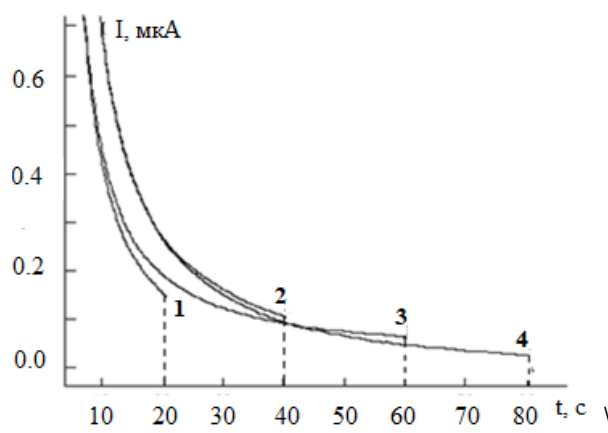


Рисунок 3.4 – Хроноамперограммы, зарегистрированные в присутствии 10^{-4} $K_3[Fe(CN)_6]$. Время измерения 20 (1), 40 (2), 60 (3), 80 с (4). Фон: Фосфатный буфер (pH=7.4)

Из рисунка 3.4 видно, что ток достигает установившегося значения после 70 секунд измерения (хроноамперограмма 4). Далее ток измеряли по истечении 70 секунд (момент измерения).

Хроноамперограммы окисления $K_4[Fe(CN)_6]$ при выбранных потенциале (0.45 В) и времени измерения (80 с), приведены на рисунке 3.5. Приращение тока окисления $K_4[Fe(CN)_6]$ пропорционально концентрации введенного в систему $K_4[Fe(CN)_6]$.

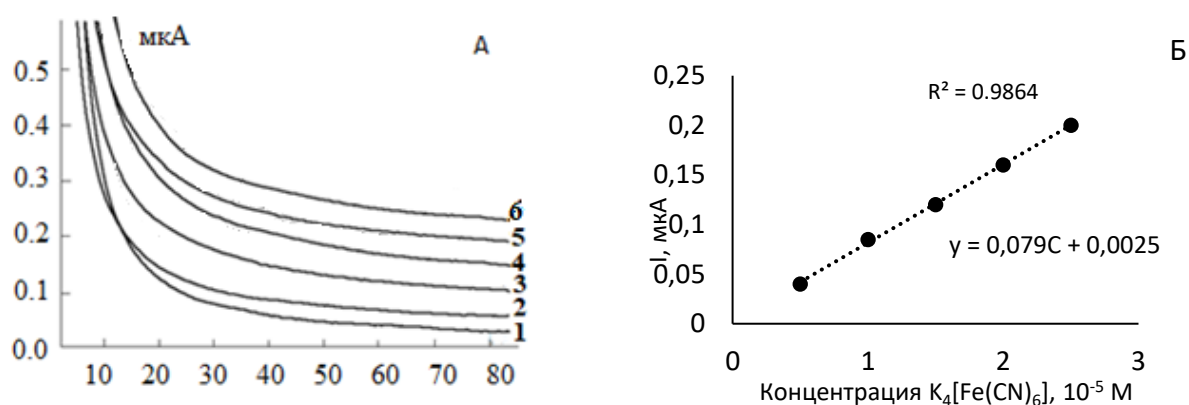


Рисунок 3.5 – Хроноамперограммы окисления $K_4[Fe(CN)_6]$ в присутствии $5 \cdot 10^{-4}$ $K_3[Fe(CN)_6]$ (1). Концентрация $K_4[Fe(CN)_6]$ $5 \cdot 10^{-6}$ М (2), 10^{-5} М (3), $1,5 \cdot 10^{-5}$ М (4), $2 \cdot 10^{-4}$ М (5), $2,5 \cdot 10^{-4}$ М (А); зависимость приращения тока окисления $K_4[Fe(CN)_6]$ (Б). Фон: Фосфатный буфер (pH=7.4)

Концентрацию реагента ($K_3[Fe(CN)_6]$) выбирали таким образом, чтобы его количества было достаточно для протекания реакции окисления антиоксидантов в биологическом образце. Концентрация АО при анализе биологических объектов (плазма крови и фолликулярная жидкость) лежит в диапазоне 0,70-3,5 мМ-экв [122]. В связи с этим для анализа биологических объектов использовали раствор, содержащий $2 \cdot 10^{-4}$ М $K_3[Fe(CN)_6]$ (концентрация в ЭХЯ).

В таблице 3.1 приведены условия хроноамперометрической регистрации аналитического сигнала при определении индивидуальных АО и АОА биологических объектов.

Таблица 3.1 – Условия хроноамперометрической регистрации аналитического сигнала

Концентрация (в ячейке) $K_3[Fe(CN)_6]$, М	Потенциал измерения, В	Момент измерения, с
$2 \cdot 10^{-4}$	0.45	70

На рисунке 3.6 приведены зависимости приращения тока окисления $K_4[Fe(CN)_6]$, образовавшегося в результате реакции АО с $K_3[Fe(CN)_6]$ (реакция 3.1.), от концентрации аскорбиновой кислоты, глутатиона, мочевой кислоты и цистеина. Представленные зависимости имеют линейный характер, что дает возможность использовать приращения тока окисления $K_4[Fe(CN)_6]$ в качестве аналитического сигнала. Уравнения линейной регрессии приведены в табл. 3.2:

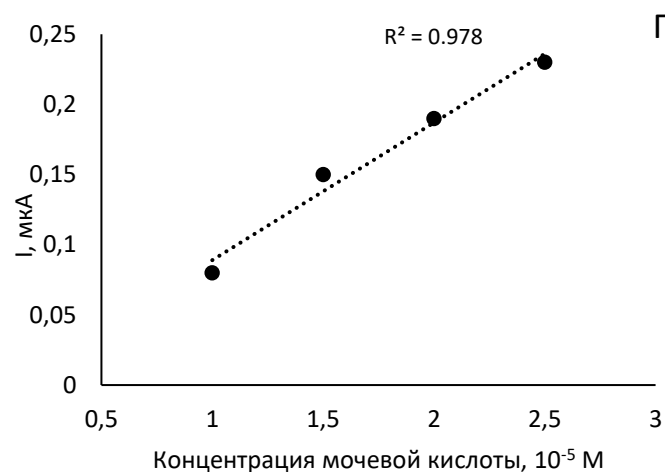
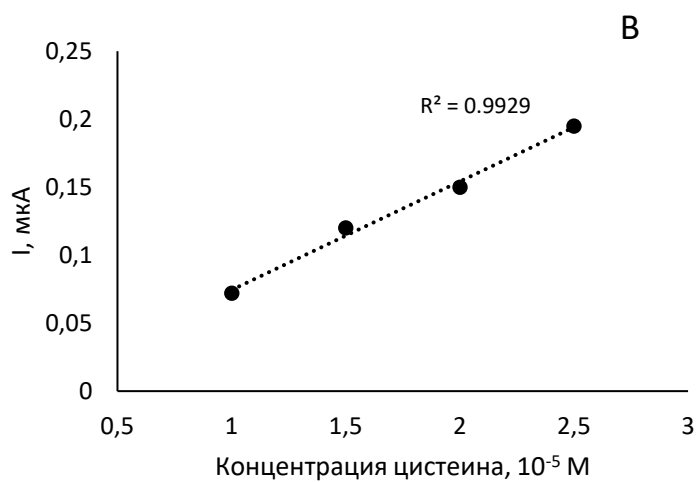
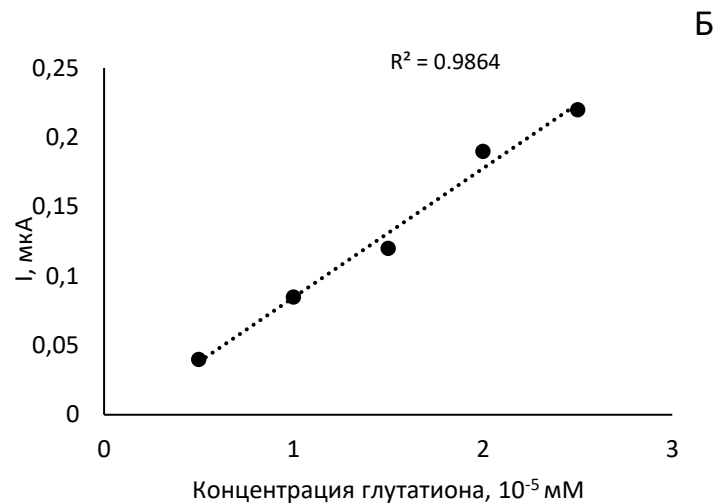
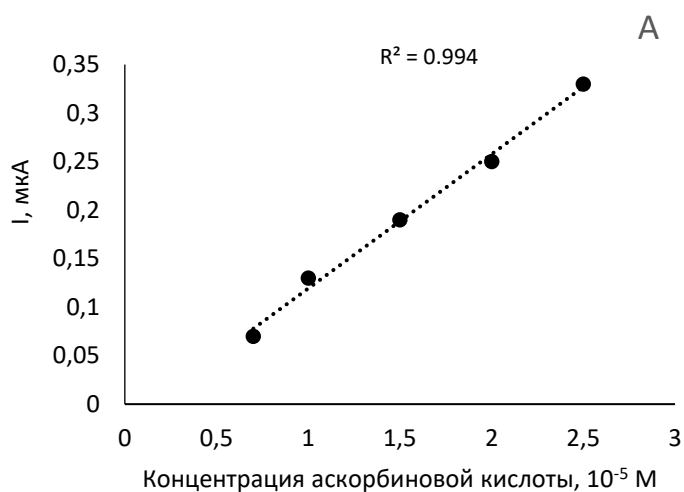


Рисунок 3.6 Зависимость приращения тока окисления $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ от концентрации аскорбиновой кислоты (А); глутатиона (Б); цистеина (В) мочевой кислоты (Г). Потенциал измерения 0.45 В, время измерения 70 с.

Таблица 3.2 – Характеристики результатов хроноамперометрического определения АОА модельных антиоксидантов: аскорбиновой кислоты ($0.7-2.5 \cdot 10^{-5} \text{M}$), мочевой кислоты ($1.0-2.5 \cdot 10^{-5} \text{M}$), цистеина ($1.0-2.5 \cdot 10^{-5} \text{M}$) и глутатиона ($0.5-2.5 \cdot 10^{-5} \text{M}$) ($n=5, P=0.95$)

АО	Уравнение регрессии, $I, \mu\text{A}; C, 10^5 \text{M}$	R^2
Аскорбиновая кислота	$I=0.14C-0.019$	0.994
Мочевая кислота	$I=0.10C-0.054$	0.978
Цистеин	$I=0.08C-0.009$	0.993
Глутатион	$I=0.08C-0.011$	0.979

В уравнениях регрессии приведенных в табл. 3.2 и на рис. 3.5 угловые коэффициенты совпадают в случае $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, глутатиона, цистеина и отличаются в случае аскорбиновой и мочевой кислоты.

Согласно опубликованным в литературе данным [122] стехеометрический коэффициент реакции взаимодействия глутатиона и цистеина с $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ равен 1, в случае с аскорбиновой кислотой – 2, с мочевой кислотой 1.5. Что соответствует величинам угловых коэффициентов уравнений регрессии, полученных для выше рассмотренных АО.

В связи с этим, в дальнейшем, для оценки АОА образцов, использовали концентрацию выраженную в мМ-экв.

Таким образом, данный сигнал является аналитическим и может быть использован в качестве источника информации о концентрации АО в растворе.

Расчет концентрации АО, введенного в ЭХЯ проводится по уравнению:

$$AOA = C_{\text{Доб}} \cdot \left(\frac{\Delta I_{\text{Обр}}}{\Delta I_{\text{Доб}}} \right) \cdot \frac{V_{\text{Доб}}}{V_{\text{Обр}}}, \quad (3.2)$$

где

АОА – антиоксидантная активность, М-экв;

$C_{\text{Доб}}$ – концентрация стандартной добавки $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, М;

$\Delta I_{\text{обр}}$ – приращение тока окисления $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, полученного в результате взаимодействия АО с $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, мкА;

$\Delta I_{\text{доб}}$ – приращение тока окисления $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, полученный после введения стандартной добавки $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, мкА;

$V_{\text{обр}}$ – объем образца АО вводимого в ячейку, мл;

$V_{\text{доб}}$ – объем стандартной добавки $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, вводимой в ячейку, мл.

Результаты определения АОА модельных растворов АО представлены в таблице 3.3.

Таблица 3.3 – Результаты определения АОА растворов модельных АО: аскорбиновой кислоты, мочевой кислоты, цистеина и глутатиона ($n=5$, $P=0,95$)

АО	Введено, мМ-экв	Найдено АОА $\pm \Delta$, мМ-экв	Sr, %	R, %
Аскорбиновая кислота	1.0	0.98 \pm 0,02	2.53	98
Мочевая кислота	1.0	0.96 \pm 0,02	1.86	96
Цистеин	1.0	0.94 \pm 0,03	3.23	94
Глутатион	1.0	0.91 \pm 0,02	1.90	91

Предел обнаружения рассчитывали по уравнению:

$$ПО = \frac{3.3 \cdot S}{b} \quad (3.3)$$

где:

S – стандартное отклонение аналитического сигнала;

b – коэффициент чувствительности, представляющий собой отношение аналитического сигнала к определяемой величине (тангенс угла наклона калибровочной кривой).

В качестве калибровочной кривой использовали зависимости приращения тока окисления $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ от концентрации аскорбиновой кислоты.

$$ПО = \frac{3.3 \cdot S}{b} = \frac{(3.3 \cdot 0.029)}{(0.138 \cdot 10^5)} = 6.9 \cdot 10^{-6} M - экв$$

Таким образом, правильность выбора условий определения АОА методом хроноамперометрии с использованием, в качестве сигналообразующей предшествующей химической реакции восстановления антиоксидантом $K_3[Fe(CN)_6]$, и использованием в качестве аналитического сигнала тока окисления, образовавшегося $K_4[Fe(CN)_6]$ подтверждается анализом модельных растворов индивидуальных АО.

3.2 Определение АОА плазмы крови

3.2.1 Исследование раствора, моделирующего состав плазмы крови

Для подтверждения возможности использования предложенного хроноамперометрического метода для анализа сложных биологических матриц проведен анализ плазмы крови. Плазма крови достаточно хорошо изучена с точки зрения ее антиоксидантных свойств. В качестве метода сравнения использовали аттестованную методику определения АОА плазмы крови потенциометрическим методом.

Для моделирования антиоксидантной составляющей плазмы крови использовали раствор, в состав которого входили основные АО, отвечающие за антиоксидантное действие, а также основной белок плазмы крови – альбумин. Состав раствора выбирали по литературным данным [173,174]. Результаты определения АОА модельного раствора приведенный в таблице 3.4.

Полученные результаты демонстрируют хорошую сходимость экспериментальных данных, полученных методом введено-найденно с расчетными.

Таблица 3.4 Результаты хроноамперометрического определения АОА раствора, моделирующего антиоксидантный состав плазмы крови (n=5, P=0,95)

Соединение	Концентрация	АОА расчетная, мМ-экв	АОА измеренная, мМ-экв	S _r , %
Аскорбиновая кислота	$0.08 \cdot 10^{-3}$ М	0.80	$0.82 \pm 0,02$	4.64
Мочевая кислота	$0.40 \cdot 10^{-3}$ М			
Цистеин	$0.01 \cdot 10^{-3}$ М			
Глутатион	$0.03 \cdot 10^{-3}$ М			
Альбумин	45 г/л			

3.2.2 Выбор степени разбавления пробы

На рисунке 3.7 приведены хроноамперограммы окисления $K_4[Fe(CN)_6]$, образующегося при взаимодействии $K_3[Fe(CN)_6]$ с плазмой крови, вводимой раствор в разных количествах.

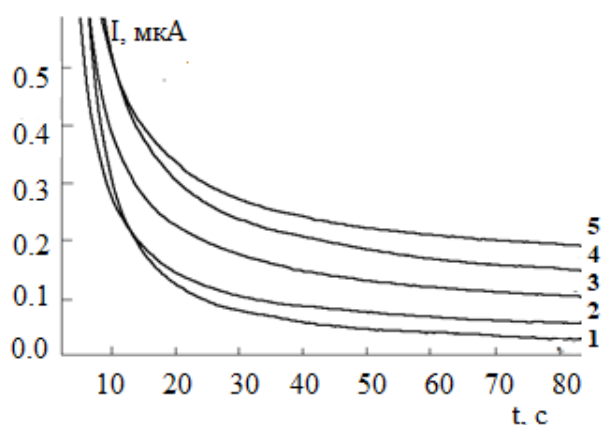


Рисунок 3.7 – Хроноамперограммы окисления $K_4[Fe(CN)_6]$ в присутствии $2 \cdot 10^{-4}$ М $K_3[Fe(CN)_6]$ (1), 0.05 (2), 0.1 (3), 0.15 (4), 10^{-5} М $K_4[Fe(CN)_6]$ (5) Фон: Фосфатный буфер (pH=7.4)

На рисунке 3.8 приведена зависимость найденной величины АОА, от объёма плазмы, введенной в 5 мл раствора, содержащего $2 \cdot 10^{-4}$ М $K_3[Fe(CN)_6]$.

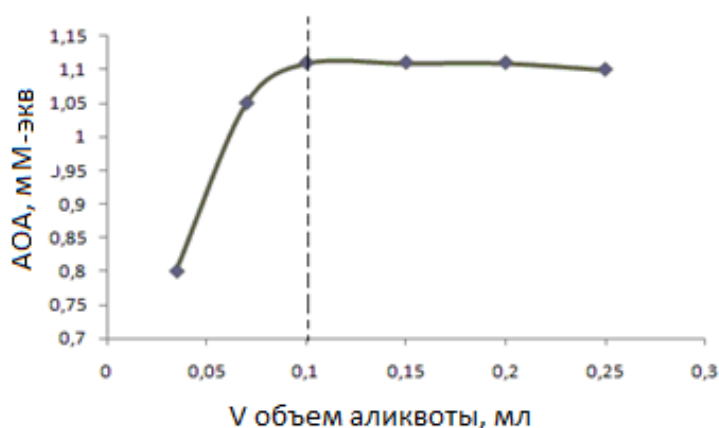


Рисунок 3.8 Зависимость найденной величины АОА плазмы крови от аликвоты, введённой в 5 мл раствора, содержащего $2 \cdot 10^{-4}$ М $K_3[Fe(CN)_6]$

Полученные экспериментальные данные показали, что при малых аликвотах (≤ 0.1 мл), найденная величина АОА мала. По-видимому, в малом количестве введённой в исследуемый раствор плазмы крови содержащихся в ней антиоксидантов недостаточно для формирования корректного аналитического сигнала. При увеличении аликвоты (≥ 0.1 мм) найденное значение АОА не растёт, что может быть связано с возрастающим влиянием матрицы плазмы крови на протекание сигналообразующей реакции и формирование аналитического отклика.

Для дальнейшего анализа плазмы крови выбрали объем аликвоты равный 0.1 мл, что соответствует разбавлению пробы в ЭХЯ не более чем в 51 раз (при условии фона в количестве 5 мл).

3.2.3 Определение АОА плазмы крови в присутствии модельного АО

Для оценки правильности определения АОА плазмы использовали метод стандартных добавок.

В таблице 3.5 приведены результаты определения АОА плазмы, введенной в раствор, содержащий $2 \cdot 10^{-4}$ $K_3[Fe(CN)_6]$, до и после введения аскорбиновой кислоты.

Таблица 3.5 – Результаты оценки правильности определения АОА нативной плазмы крови с использованием метода стандартных добавок аскорбиновой кислоты (АК) ($n=3$, $P=0.95$). Раствор: фосфатный буфер + $2 \cdot 10^{-4}$ М $K_3[Fe(CN)]_6$, рН=7.4

Проба	АОА пробы, мМ-экв	Введено АК, мМ-экв	Найдено АОА в пробе с добавкой АК, мМ-экв	Найдено АОА АК, мМ-экв	Степень извлечения, % (Recovery)
1	1.25±0.09	0.5	1.68±0.03	0.43±0.03	86.0
2	0.99±0.09	1.0	1.87±0.03	0.88±0.03	88.0
3	1.12±0.07	1.5	2.35±0.05	1.23±0.05	82.0

Сравнение полученных данных свидетельствует о приемлемой правильности и воспроизводимости результатов.

В таблице 3.6 приведены результаты определения АОА образцов плазмы крови.

Таблица 3.6 – Результаты определения АОА плазмы крови ($n=3$, $P=0.95$)

Образец №	АОА, мМ-экв	S_r , %
1	0.76±0.02	2.59
2	1.09±0.09	8.33
3	1.21±0.02	1.65
4	1.11±0.08	7.57
5	1.65±0.05	3.04
6	0.63±0.03	4.82
7	0.87±0.03	3.68
8	0.77±0.03	3.89
9	2.40±0.02	8.79

Для доказательства достоверности результатов определения АОА плазмы крови предлагаемым новым гибридным вариантом метода хроноамперометрии

проведён анализ тех же образцов с использованием аттестованной потенциометрической методики.

Измерения потенциометрическим методом проводили, пользуясь следующим алгоритмом:

- измерение начального потенциала электрода в фоновом растворе (фосфатный буфер, $\text{pH}=7.4$) с медиаторной системой, содержащей 1 мМ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ и 0.05 мМ $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ [123];

- введение в ячейку образца плазмы крови;
- измерение изменения потенциала во времени;
- расчёт АОА по формулам 2.4, 2.6.

Наблюдается высокая степень корреляции результатов определения АОА плазмы крови, полученных этими методами (рис. 3.9). $R=0.87$. Коэффициент корреляции Пирсона превышает критическое значение ($R_{\text{крит}} = 0.67$).

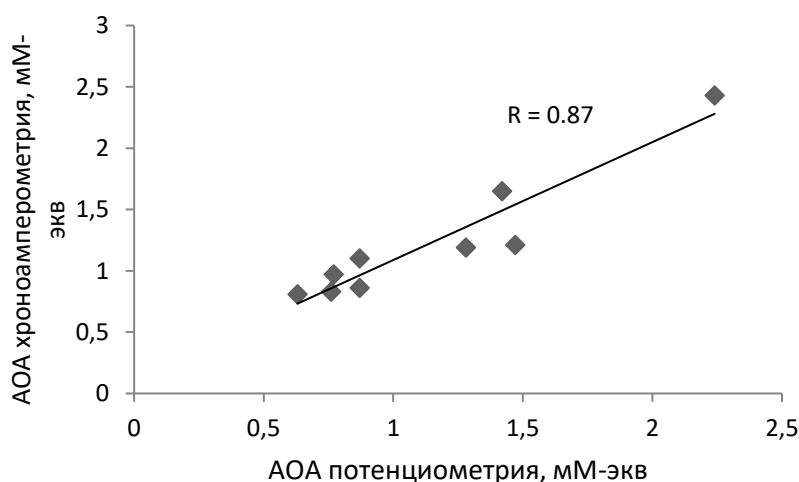


Рисунок 3.9 Корреляция результатов определения АОА плазмы крови потенциометрическим и хроноамперометрическим методами ($n=3$, $P=0,95$)

Полученные значения критериев Стьюдента и Фишера ($t_{\text{эксп}} = 0.32$ и $F_{\text{эксп}} = 1.03$) не превышают критических значений ($t_{\text{табл}} = 2.31$ и $F_{\text{табл}} = 3.44$) для уровня значимости 0.05 при $n=3$), что свидетельствует о незначимом различии

результатов полученных потенциометрическим и хроноамперометрическим методами.

Таким образом, разработан новый гибридный вариант метода хроноамперометрии, включающий предшествующую химическую реакцию. В качестве такой реакции предложено использовать восстановление $K_3[Fe(CN)_6]$ антиоксидантами пробы. Аналитическим сигналом служит ток окисления продукта этой реакции – $K_4[Fe(CN)_6]$.

Показана линейная зависимость сигнала от концентрации модельных АО (АК, МК, глутатион, цистеин), что позволяет использовать приращение тока окисления в качестве аналитического сигнала.

Проведен анализ образцов плазмы крови предложенным вариантом хроноамперометрического метода с использованием предшествующей химической реакции в качестве сигналообразующей. Результаты, полученные разработанным методом, согласуются с результатами определения АОА плазмы крови, полученными с использованием метрологически аттестованной потенциометрической методики. Предел обнаружения АОА составил $6.9 \cdot 10^{-6}$ М-экв.

ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАННОЙ АКТИВНОСТИ СЛЮНЫ ХРОНОАМПЕРОМЕТРИЧЕСКИМ И ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДАМИ

4.1 Хроноамперометрический метод исследования АОА слюны

4.1.1 Выбор степени разбавления пробы

Ниже приведены экспериментальные данные, позволяющие адаптировать описанный в главе 3 хроноамперометрический метод анализа плазмы к анализу слюны. Согласно литературным данными АОА слюны лежит в диапазоне от 0.5 до 2.5 мМ-экв [175], что достаточно близко к диапазону АОА плазмы крови (0.7 – 3.5 мМ-экв). Поэтому при выборе рабочих условий для определения АОА слюны изначально можно отталкиваться от условий (значение потенциала, времени измерения и концентрации $K_3[Fe(CN)_6]$), приведенных в таблице 3.1.

На рисунке 4.1 приведена зависимость найденной величины АОА, от объёма слюны, введенной в 5 мл раствора, содержащего 0.01 М $K_3[Fe(CN)_6]$.

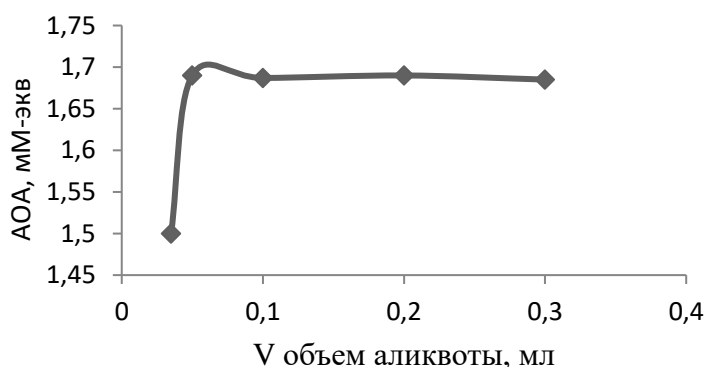


Рисунок 4.1 Зависимость найденной хроноамперометрическим методом величины АОА слюны от аликвоты, введённой в 5 мл раствора, содержащего 0,01 М $K_3[Fe(CN)_6]$

На рисунке 4.2 приведены хроноамперограммы окисления $K_4[Fe(CN)_6]$, образующегося при взаимодействии $K_3[Fe(CN)_6]$ с антиоксидантами слюны, вводимой в раствор в разных количествах.

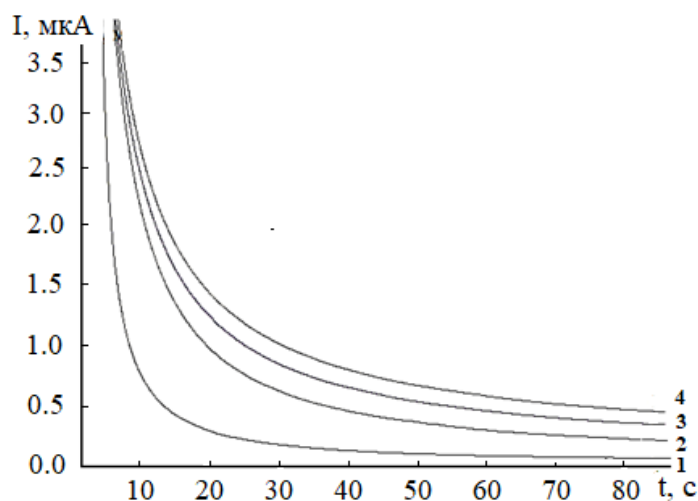


Рисунок 4.2 – Хроноамперограммы окисления $K_4[Fe(CN)_6]$ в растворе, содержащем $2 \cdot 10^{-4} M$ $K_3[Fe(CN)_6]$ (1) и 0.1 мл (2), 0.2 мл (3) слюны, а также в присутствии $10^{-5} M$ $K_4[Fe(CN)_6]$ (4). Фон: Фосфатный буфер (pH=7.4)

Зависимость найденной величины АОА слюны от введенной в раствор аликвоты имеет аналогичный вид, как и при определении АОА плазмы крови. При малых аликвотах (≤ 0.1 мл), найденная величина АОА мала, а при увеличении аликвоты (≥ 0.1 мл) найденное значение АОА не растёт, что может быть связано с возрастающим влиянием матрицы слюны на аналитический сигнал. Таким образом, для определения АОА слюны, выбранный объем аликвоты составил 0.1 мл.

4.1.2 Выбор способа подготовки слюны к анализу

В таблице 4.1 приведены результаты определения АОА нативной слюны и фракции, выделенной центрифугированием при 1500 об/мин, в течение 15 мин.

Таблица 4.1 – Результаты хроноамперометрического определения АОА нативной слюны и слюны после центрифугирования ($n=3$, $P=0.95$)

№	АОА, мМ-экв			
	Нативная слюна	S_r , %	Надосадочная жидкость слюны после центрифугирования	S_r , %
1	1.17±0.08	6.87	1.14±0.08	6.86
2	0.71±0.05	6.40	0.69±0.04	5.80
3	0.88±0.02	1.92	0.85±0.02	2.41

Полученные значения критериев Стьюдента и Фишера ($t_{\text{эксп}} = 0.3$ и $F_{\text{эксп}} = 1.09$) не превышают критических значений ($t_{\text{табл}} = 2.31$ и $F_{\text{табл}} = 3.44$ для уровня значимости 0.05 при $n = 3$), что свидетельствует о незначимом различии величины найденной АОА слюны до центрифугирования и АОА образца, полученного в результате центрифугирования. В дальнейшем в качестве объекта анализа использовали нативную слюну без пробоподготовки.

Для установления влияния условий хранения отобранных образцов на результат анализа была определена АОА слюны до и после замораживания (-18°C). Полученные данные представлены в таблице 4.2.

Таблица 4.2 – Результаты хроноамперометрического определения АОА нативной слюны до и после замораживания ($n=3$, $P=0.95$)

№	АОА, мМ-экв			
	Без замораживания	S_r , %	После замораживания	S_r , %
1	1.18±0.03	2.50	1.17±0.02	1.75
2	1.44±0,06	4.50	1.43±0,05	3.24
3	0.95±0,02	2.58	0.94±0,01	1.81

Полученные значения критериев Стьюдента и Фишера ($t_{\text{эксп}} = 0.24$ и $F_{\text{эксп}} = 1.05$) не превышают критических значений ($t_{\text{табл}} = 2.31$ и $F_{\text{табл}} = 3.44$ для уровня значимости 0.05 при $n = 3$), что свидетельствует о незначимом различии величины найденной антиоксидантной активности свежих и

проанализированных после хранения образцов слюны. Что позволяет использовать для анализа как свежие, так и замороженные образцы.

4.1.3 Определение АОА слюны в присутствии модельного АО

Для оценки правильности предлагаемого метода определения АОА слюны использовали метод стандартных добавок.

В таблице 4.3 приведены результаты определения АОА слюны, хроноамперометрическим методом до и после введения в раствор добавки аскорбиновой кислоты установленной концентрации.

Таблица 4.3 – Результаты определения АОА слюны хроноамперометрическим методом, до и после введения в раствор аскорбиновой кислоты ($n=3$, $P=0.95$). Фон: Фосфатный буфер $pH=7.4$

Проба	АОА пробы, мМ-экв	Введено АК, мМ-экв	Найдено АОА в пробе с добавкой АК, мМ-экв	Найдено АОА АК, мМ-экв	Степень извлечения АК, %
1	1.43±0.07	1.00	2.31±0.06	0.88±0.06	88.0
2	0.82±0.11	1.50	2.10±0.05	1.28±0.05	85.3
3	1.21±0.08	2.00	3.02±0.03	1.81±0.03	90.5

Сравнение полученных данных свидетельствует о приемлемой правильности результатов определения АОА слюны хроноамперометрическим методом.

В таблице 4.4 приведены результаты измерения АОА образцов слюны относительно здоровых респондентов в возрасте 25-30 лет хроноамперометрическим методом. Диапазон найденных значений АОА для данной группы респондентов составил от 0.74 до 2.46 мМ-экв, что соответствует литературным данным.

Таблица 4.4 – Результаты определения АОА слюны ($n=3$, $P=0.95$)

Образец №	АОА, мМ-экв	S_r , %
1	2.43±0.08	3.13
2	0.92±0.07	7.37
3	1.68±0.05	3.19
4	0.74±0.05	6.90
5	1.97±0.02	1.27
6	2.46±0.05	2.09
7	1.39±0.03	1.90
8	1.05±0.04	4.36
9	1.92±0.02	1.31
10	0.96±0.04	4.22

4.2 Потенциометрический метод исследования АОА слюны

Для оценки достоверности полученных результатов хроноамперометрического определения АОА слюны был выбран потенциометрический метод с медиаторной системой, который хорошо себя зарекомендовал при исследовании биологических образцов [123, 177]. Для измерения АОА слюны была проведена адаптация потенциометрической методики определения АОА плазмы крови.

4.2.1 Выбор состава медиаторной системы и степени разбавления пробы

Зависимость потенциала электрода от времени (хронопотенциограммы), наблюдающиеся при использовании растворов, содержащих 0.01М $K_3[Fe(CN)_6]$ + 0.0001М $K_4[Fe(CN)_6]$ и аскорбиновую кислоту (1) и слюну (2) представлены на рисунке 4.3. На обеих кривых наблюдается выход потенциала на постоянную величину соответствующую установлению равновесия между антиоксидантами и окисленным компонентом медиаторной системы.

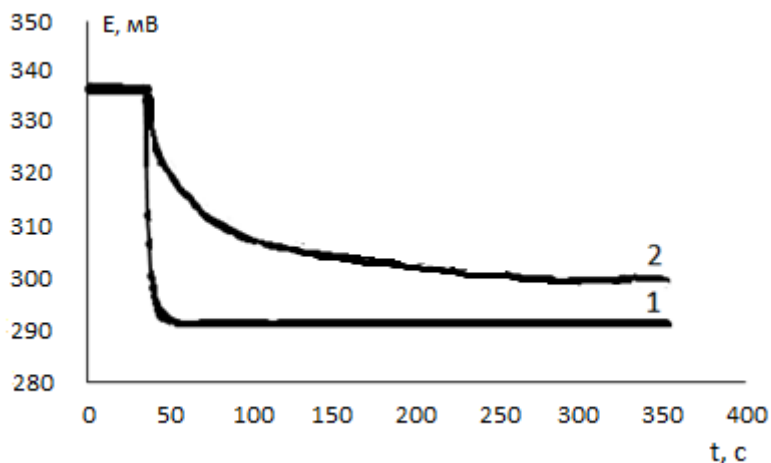


Рисунок 4.3 – Зависимость потенциала электрода от времени, зарегистрированная при исследовании раствора, содержащего медиаторную систему (10^{-2} М $K_3[Fe(CN)_6]$ + 10^{-4} М $K_4[Fe(CN)_6]$), 2,5 мМ-экв аскорбиновой кислоты (1) или слюну (2)

Для анализа слюны была выбрана медиаторная система с соотношением компонентов $C(K_3[Fe(CN)_6])/C(K_4[Fe(CN)_6]) = 0.01/0.0001$. Состав медиаторной системы выбран в соответствии с данными, полученными нами ранее при исследовании биологических объектов [123, 177] и данными об АОА слюны (от 0.5 до 2.5 мМ-экв), что соответствует диапазону сдвига потенциала 17-44 мВ. При использовании выбранной медиаторной системы потенциал устанавливается достаточно быстро и стабилен во времени.

На рисунке 4.4 приведена зависимость найденной АОА слюны от аликвоты пробы, введенной в 1 мл раствора, содержащего медиаторную систему 0.01 М $K_3[Fe(CN)_6]$ / 0.0001 М $K_4[Fe(CN)_6]$.

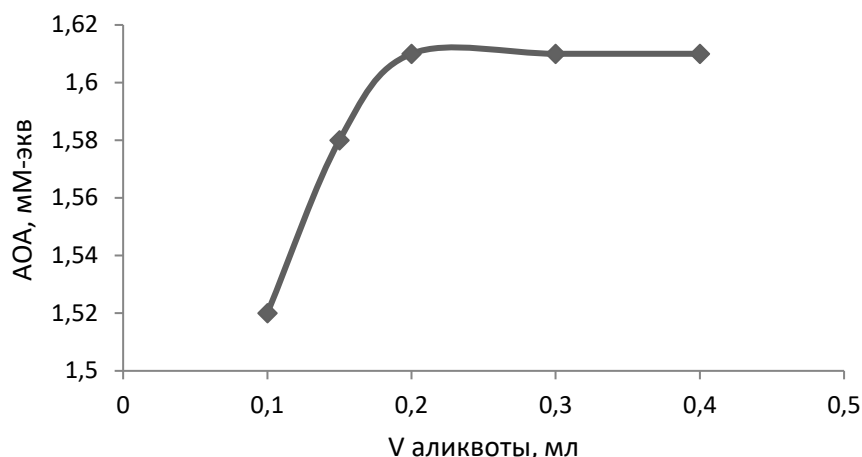


Рисунок 4.4 – Зависимость найденной потенциометрическим методом величины АОА слюны от аликвоты пробы, введённой в 1 мл раствора медиаторной системы (10^{-2} М $K_3[Fe(CN)_6]$ и 10^{-4} М $K_4[Fe(CN)_6]$)

Степень разбавления, очевидно, ограничивается с одной стороны пределом обнаружения, с другой – содержанием окисленной формы медиаторной системы в растворе. Ее должно быть достаточно для протекания сигналообразующей реакции – реакции взаимодействия антиоксидантов с окисленным компонентом медиаторной системы. В рассматриваемом случае аликвота не должна быть меньше 0,2мл.

Анализ проб слюны следует приводить в следующих условиях: медиаторная система $K_3[Fe(CN)_6]$ / $K_4[Fe(CN)_6]$ = 0,01 М / 0,0001 М, объем буферного раствора (фосфатный буфер) составлял 1 мл, объем аликвоты слюны 0,2 мл (что соответствует разбавлению образца в электрохимической ячейке в 6 раз).

4.2.2 Выбор способа подготовки слюны к анализу

В таблице 4.5 приведены результаты определения АОА нативной слюны и фракции, выделенной центрифугированием при 1500 об/мин, в течение 15 мин.

Таблица 4.5 – Результаты потенциометрического определения АОА нативной слюны и слюны после центрифугирования ($n=3$, $P=0.95$)

№	АОА, мМ-экв			
	Нативная слюна	S_r , %	Надосадочная жидкость слюны после центрифугирования	S_r , %
1	0.87±0.03	3.04	0.81±0.03	3.80
2	1.56±0.03	1.69	1.45±0.06	4.22
3	1.13±0.06	4.60	1.06±0.07	6.53

Полученные значения критериев Стьюдента и Фишера ($t_{\text{эксп}} = 0.61$ и $F_{\text{эксп}} = 0.72$) не превышают критических значений ($t_{\text{табл}} = 2.31$ и $F_{\text{табл}} = 3.44$ для уровня значимости 0.05 при $n = 3$), что свидетельствует о незначимом различии величины найденной АОА слюны до центрифугирования и АОА образца, полученного в результате центрифугирования. В дальнейшем в качестве объекта анализа использовали нативную слюну без пробоподготовки.

Для установления влияния условий хранения отобранных образцов на результат анализа была определена АОА слюны до и после замораживания (-18°C). Полученные данные представлены в таблице 4.6.

Таблица 4.6 – Результаты потенциометрического определения АОА нативной слюны до и после замораживания ($n=3$, $P=0.95$)

№	АОА, мМ-экв			
	Без замораживания	S_r , %	После замораживания	S_r , %
1	1.15±0.05	4.39	1.12±0.05	4.09
2	0.95±0.08	8.51	0.94±0.04	3.83
3	1.29±0.05	3.96	1.28±0.02	2.06

Полученные значения критериев Стьюдента и Фишера ($t_{\text{эксп}} = 0.52$ и $F_{\text{эксп}} = 0.99$) не превышают критических значений ($t_{\text{табл}} = 2.31$ и $F_{\text{табл}} = 3.44$ для уровня значимости 0.05 при $n = 3$), что свидетельствует о незначимом различии величины найденной антиоксидантной активности свежих и

проанализированных после хранения образцов слюны. Что позволяет использовать для анализа как свежие, так и замороженные образцы.

При сравнительном определении АОА образцов слюны методами потенциометрии с использованием медиаторной системы и хроноамперометрии, была обнаружена высокая корреляция полученных результатов (рисунок 4.5) $R=0.87$. Коэффициент корреляции Пирсона превышает критическое значение ($R_{\text{крит}} = 0.67$)

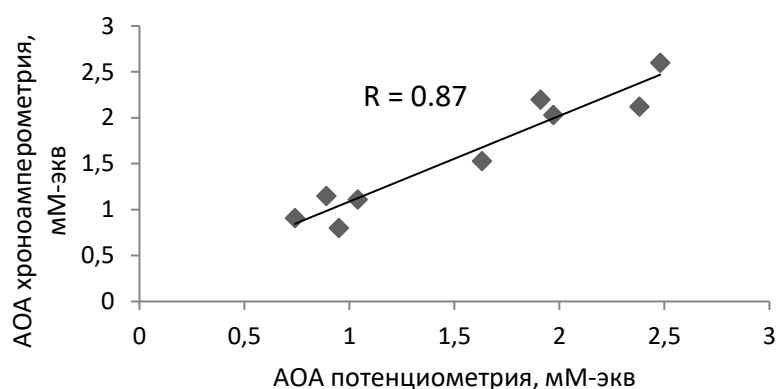


Рисунок 4.5 Корреляция результатов определения АОА слюны потенциометрическим и хроноамперометрическим методами ($n=3$, $P=0.95$)

Полученные значения критериев Стьюдента и Фишера ($t_{\text{эксп}} = 1.48$ и $F_{\text{эксп}} = 1.91$) не превышают критических значений ($t_{\text{табл}} = 2.31$ и $F_{\text{табл}} = 3.44$ для уровня значимости 0.05 при $n = 3$), что свидетельствует о незначимом различии результатов полученных потенциометрическим и хроноамперометрическим методами.

Предложен алгоритм и процедура определения АОА слюны с использованием, разработанного в настоящей диссертации хроноамперометрического метода и определена антиоксидантная активность слюны потенциометрическим и упомянутым хроноамперометрическим методами.

Продемонстрирована правильность результатов определения АОА слюны хроноамперометрическим и потенциометрическим методами. Оба метода могут быть использованы для определения АОА слюны. Показана возможность анализа как замороженных, так и свежих образцов, без специальной пробоподготовки. При этом хроноамперометрический метод имеет преимущества, т.к. в качестве мелиаторной системы используется только восстановленная форма реагента, которая более устойчива в нейтральных средах, меньше подвергается гидролизу, а также метод позволяет использовать меньший объем пробы.

ГЛАВА 5. ОЦЕНКА АНТИОКСИДАНТ/ОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ СЕМЕННОЙ ЖИДКОСТИ ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

5.1 Определение АОА семенной жидкости в присутствии модельного АО

Раствор, моделирующий антиоксидантный состав семенной жидкости, выбирали, пользуясь литературными данными [176] (таблица 5.1).

Таблица 5.1 – Состав раствора, моделирующего антиоксидантный состав семенной жидкости

Соединение	Концентрация АО, мМ-экв	Концентрация АО, %
Аскорбиновая кислота	0.4	54.8
Мочевая кислота	0.2	27.4
Глутатион	0.07	9.6
Цистеин	0.06	8.2

В таблице 5.2 представлены результаты измерений. Они демонстрируют хорошую сходимость данных, полученных методом введено-найдено.

Таблица 5.2 - Результаты определения АОА раствора, моделирующего антиоксидантный состав семенной жидкости (n=3, P=0.95)

Соединение	Концентрация, мМ-экв	АОА расчетная, мМ-экв	АОА измеренная, мМ-экв	S _r
Мочевая кислота	0.19	0.71	0.75±0.03	0.02
Аскорбиновая кислота	0.39			
Тиоловая группа (Глутатион и цистеин)	0.13			

Для оценки правильности определения АОА семенной жидкости предлагаемым потенциометрическим методом использовали метод стандартных добавок известного АО в известной концентрации.

В таблице 5.3 приведены результаты определения АОА семенной жидкости, введенной в раствор медиаторной системы, с добавками модельного антиоксиданта – аскорбиновой кислоты.

Таблица 5.3 – Результаты определения АОА проб семенной жидкости, введенных в раствор медиаторной системы, содержащей 10 мМ $K_3[Fe(CN)]_6$ и 0.1 мМ $K_4[Fe(CN)]_6$, и аскорбиновую кислоту ($n=3$, $P=0.95$), $pH=7.4$

Проба	АОА пробы, мМ-экв	Введено АК, мМ-экв	Найдено АОА в пробе с добавкой АК, мМ-экв	Найдено АОА АК, мМ-экв	Степень извлечения АК, % (Recovery)
1	0.82±0,04	1.0	1.57±0.07	0.75±0.07	75.0
2	0.50±0,01	2.0	2.17±0.05	1.67±0.05	83.5
3	0.57±0,07	3.0	3.13±0.04	2.56±0.04	85.3

Сравнение полученных данных свидетельствует о приемлемой правильности результатов. Несколько заниженное значение найденной величины может быть обусловлено быстрым окислением раствора аскорбиновой кислоты.

5.2 Исследование возможности одновременного обнаружения антиоксидантов и оксидантов

Использование медиаторной системы, содержащей окисленную и восстановленную форму элемента, дает основание полагать, что метод может использоваться как для определения концентрации антиоксидантов, так и оксидантов. Вопрос заключается в том, возможно ли это в реальном объекте,

содержащем и то, и другое. В принципе сложно представить себе пробу, содержащую антиоксиданты и оксиданты вместе. В биологических системах в организме, безусловно, присутствуют оксиданты и антиоксиданты, и равновесие между ними является основным условием жизнедеятельности организма. При извлечении их из организма, равновесие может смещаться, поэтому, в принципе, корректно говорить не о концентрации того и другого, а о детекции (обнаружении) их в пробе.

Простой метод обнаружения оксидантов и антиоксидантов в пробе дал бы ценную информацию о соотношении АОА/ОА в организме и мог бы служить критерием протекания патологических процессов в нем. Из литературных данных известно, что избыточное количество оксидантов в семенной жидкости может напрямую указывать на патологическое состояние, связанное с мужским бесплодием [33, 134, 135]. Это побудило исследовать в данной работе ряд проб семенной жидкости, взятых у пациентов с нарушениями репродуктивной функции, потенциометрическим методом.

На рисунке 5.1 приведена зависимость потенциала электрода в растворе, содержащем медиаторную систему от времени после введения в неё образца семенной жидкости, содержащей антиоксиданты. Кривая имеет обычную, описанную ранее, форму [177].

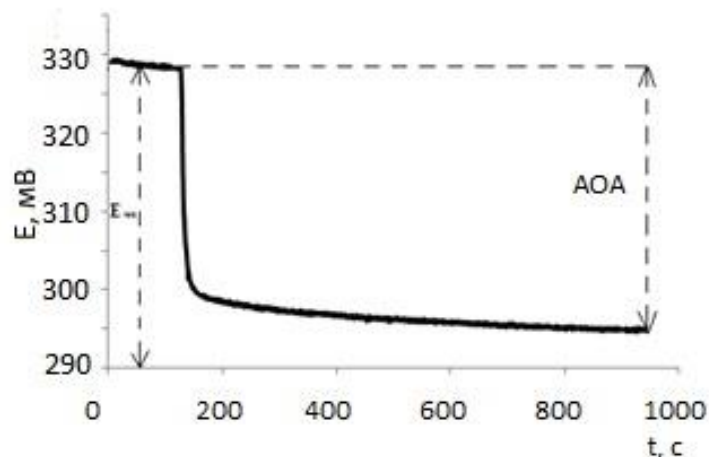


Рисунок 5.1 – Зависимость потенциала электрода от времени, зарегистрированная при исследовании раствора, содержащего медиаторную систему (10^{-2} М $K_3[Fe(CN)_6]$ и 10^{-4} М $K_4[Fe(CN)_6]$) и семенную жидкость фертильного мужчины, pH=7.4

При исследовании некоторых проб семенной жидкости нами были обнаружены сдвиги потенциалов в сторону положительных значений (рисунок 5.2).

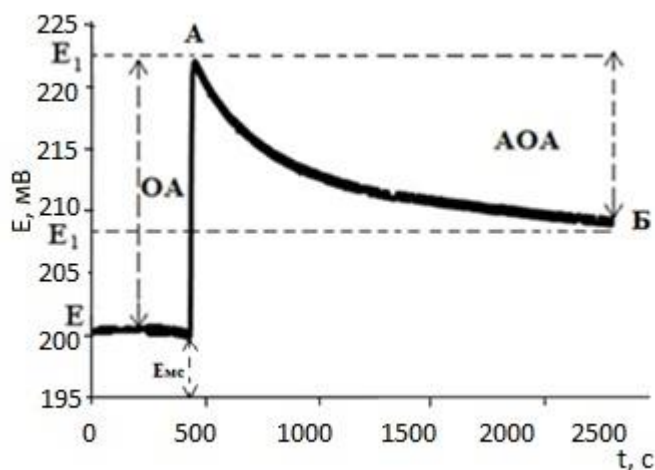
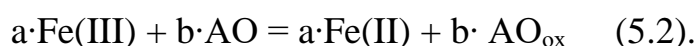
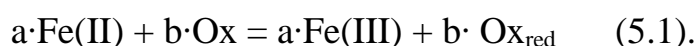


Рисунок 5.2– Зависимость потенциала электрода от времени, зарегистрированная при исследовании раствора, содержащего медиаторную систему (10^{-3} М $K_3[Fe(CN)_6]$ и 10^{-3} М $K_4[Fe(CN)_6]$) и семенную жидкость инфертильного мужчины, pH=7.4

Такая «странная» форма кривой может быть интерпретирована, принимая во внимание тот факт, что АОА спермы инфертильных мужчин понижена. Есть данные, свидетельствующие о присутствии в таких пробах оксидантов [134], содержащихся, возможно, в форме пероксидов и/или других АФК. В таком случае проба может взаимодействовать с обоими компонентами медиаторной системы. При этом взаимодействие антиоксидантов с окисленной формой компонента медиаторной системы будет сопровождаться сдвигом потенциала в сторону отрицательных значений, а взаимодействие оксидантов с восстановленной формой компонента медиаторной системы будет сопровождаться сдвигом потенциала в сторону положительных значений. Появление того и/или другого участка на потенциограмме должно зависеть, кроме других факторов, от соотношения скоростей реакций оксидантов с восстановленной формой медиаторной системы и антиоксидантов с окисленной формой медиаторной системы. Наблюдающаяся в эксперименте кривая, естественно, должна быть суперпозицией двух кривых, отражающих указанные процессы. Степень выраженности того или другого из них, очевидно, определяется концентрацией АО и оксидантов и соотношением скоростей реакций:



Концентрация оксидантов в образцах семенной жидкости сопоставима с концентрацией $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ в медиаторной системе, выбранной для образцов с антиоксидантами, для их определения необходима медиаторная система с другим соотношением компонентов.

Эффекты, приведённые на кривой рис. 5.2, достаточно хорошо выражены при использовании медиаторной системы, содержащей 10^{-3} М $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ и 10^{-3} М $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, что, по-видимому, обеспечивает достаточную концентрацию как окисленной, так и восстановленной формы компонентов медиаторной системы для протекания реакций 5.1 и 5.2.

В качестве вещества, моделирующего оксиданты, использовали пероксид водорода. Введение в электрохимическую ячейку, содержащую медиаторную систему, раствора пероксида водорода приводит к сдвигу потенциала в сторону положительных значений (рисунок 5.3). Это свидетельствует о протекании реакции (5.1).

На рисунках 5.4 и 5.5 приведены зависимости потенциалов электродов от времени при одновременном введении в медиаторную систему растворов пероксида водорода и аскорбиновой кислоты и пероксида водорода и глутатиона.

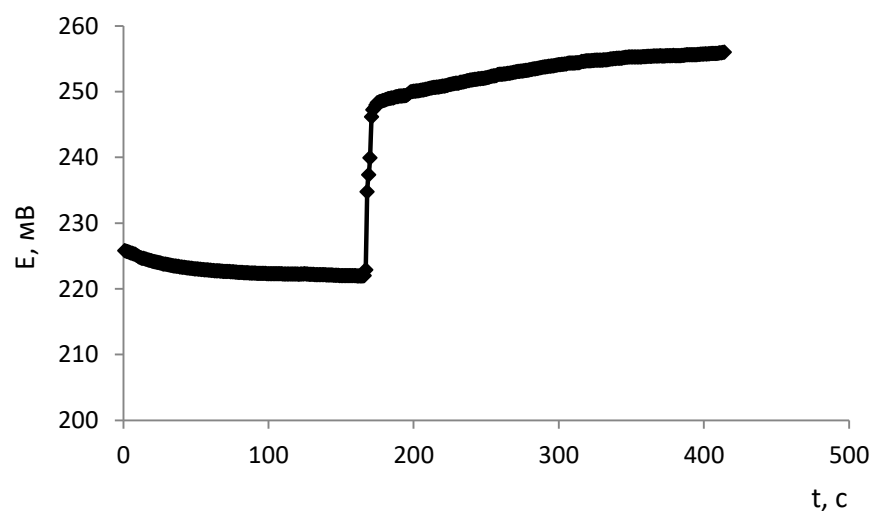


Рисунок 5.3 – Зависимость потенциала электрода от времени при введении в медиаторную систему (10^{-3} Моль $K_3[Fe(CN)_6]$ + 10^{-3} мМоль $K_4[Fe(CN)_6]$ 2.3 мМ-экв раствора H_2O_2 , pH=4.0

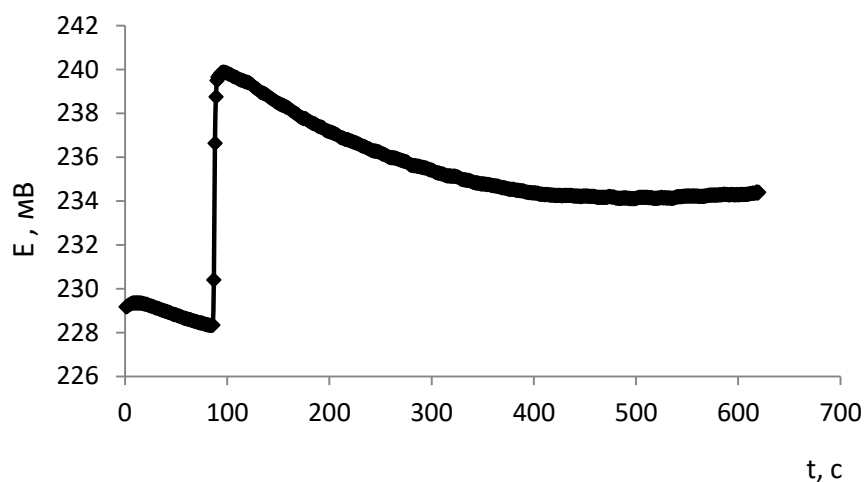


Рисунок 5.4 – Зависимость потенциала электрода от времени при введении в медиаторную систему (10^{-3} Моль $K_3[Fe(CN)_6]$ + 10^{-3} мМоль $K_4[Fe(CN)_6]$) 2.3 мМ-экв раствора H_2O_2 и 3 мМ-экв АК, pH=4.0

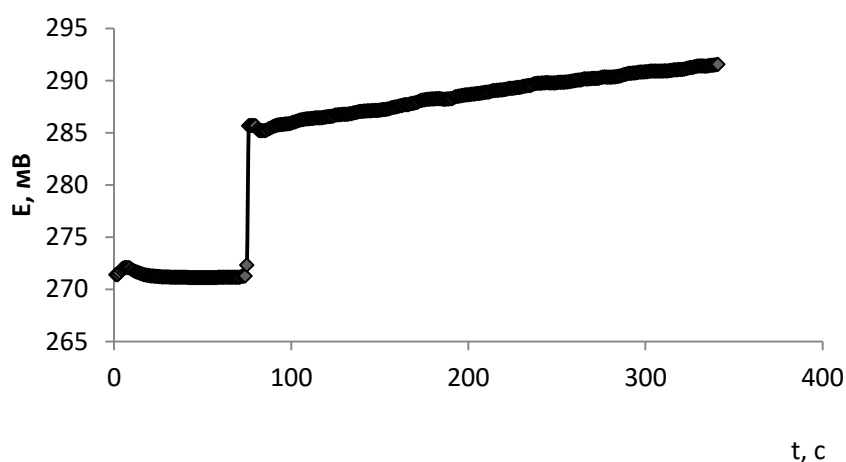
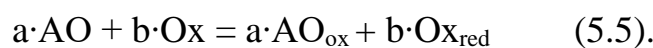
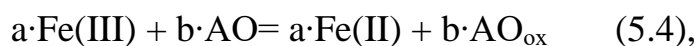


Рисунок 5.5 – Зависимость потенциала электрода от времени при введении в медиаторную систему (10^{-3} Моль $K_3[Fe(CN)_6]$ + 10^{-3} мМоль $K_4[Fe(CN)_6]$) 2.3 мМ-экв раствора H_2O_2 и 3 мМ-экв глутатиона, pH=4.0

Кривая, изображенная, на рисунке 5.2 имеет такую же форму, как и кривая, изображенная, на рисунке 5.4. При одновременном введении АК и H_2O_2 , протекают 3 конкурирующие реакции:



При одновременном введении глутатиона и H_2O_2 , наблюдается только рост потенциала (рисунок 5.5), что обусловлено, по всей видимости, малой скоростью реакции глутатиона с окисленным компонентом медиаторной системы. Принимая во внимание данные, приведённые в таблице 5.1, естественно полагать, что участок АБ кривой (рисунок 5.2) обусловлен именно вкладом аскорбиновой кислоты, т.е. наличие этого участка свидетельствует о присутствии в пробе АО. К сожалению, на основании этой зависимости нельзя сделать количественных расчетов, дающих информацию о концентрации антиоксидантов и оксидантов (АОА и ОА) в пробе. Речь может идти о методе детектирования (обнаружения) антиоксидантов и оксидантов при их совместном присутствии в пробе.

5.3 Оценка АОА/ОА образцов семенной жидкости с оксидантной активностью

Как показано выше, проводить количественные расчеты относительно содержания антиоксидантов и оксидантов исходя из данных, полученных при исследовании образцов семенной жидкости, содержащих оксиданты, было бы не совсем корректно. Однако, принимая во внимание, что кривая является суперпозицией, мы можем обнаружить и оксиданты и антиоксиданты, а также оценить примерный вклад каждого из них.

Оксидантная активность может быть рассчитана по формулам 5.6, 5.7:

$$OA = \frac{\alpha C_{Red} - C_{Ox}}{1 + \alpha} \quad (5.6)$$

$$\alpha = (C_{Ox} / C_{Red}) \cdot 10^{(E_1 - E)nF/2.3RT} \quad (5.7),$$

где E , E_1 - потенциалы электрода до и после взаимодействия медиаторной системы с образцом, мВ; C_{Red} – исходная концентрация восстановленной формы медиаторной системы в ячейке, М; C_{Ox} – исходная концентрация окисленной

формы медиаторной системы в ячейке, М; ОА – оксидантная активность, М-экв.

Если реакция (5.1) успевает пройти до конца или в пробе содержатся только оксиданты, концентрации окисленного и восстановленного компонентов медиаторной системы в момент А выражаются уравнениями:

$$C'_{Ox} = C_{Ox} + X \quad (5.8),$$

$$C'_{Red} = C_{Red} - X \quad (5.9),$$

где X – концентрация оксидантов, М-экв; C'_{Red} – концентрация восстановленной формы медиаторной системы в ячейке после взаимодействия с оксидантами; C'_{Ox} – концентрация окисленной формы медиаторной системы в ячейке после взаимодействия с оксидантами, М.

Затем, с учетом установившихся концентраций компонентов медиаторной системы, рассчитывается антиоксидантная активность по формулам 5.10-5.11.

$$AOA = \frac{C'_{Ox} - \alpha C'_{Red}}{1 + \alpha} \quad (5.10)$$

$$\alpha = (C'_{Ox} / C'_{Red}) \cdot 10^{(E'_1 - E')nF / 2.3RT} \quad (5.11),$$

где E' – потенциал электрода, установившийся после взаимодействия медиаторной системы с оксидантами; E'_1 – потенциал электрода, установившийся после взаимодействия медиаторной системы с оксидантами и антиоксидантами.

Анализ проб семенной жидкости, содержащей оксиданты, приводили при следующих условиях: медиаторная система (1 мМ $K_3[Fe(CN)_6]$ и 1 мМ $K_4[Fe(CN)_6]$), объем буферного раствора (фосфатный буфер) составлял 1 мл, объем аликвоты семенной жидкости 0.2 мл, разбавление образца в 6 раз.

Алгоритм исследования АОА/ОА образцов семенной жидкости, содержащих оксиданты, выглядит следующим образом:

- 1) отбор и подготовка пробы к анализу;

2) измерение начального потенциала электрода в фоновом растворе – фосфатный буфер (pH=7.4), содержащий медиаторную систему (10^{-2} М $K_3[Fe(CN)_6]$ и 10^{-4} $K_4[Fe(CN)_6]$);

3) введение аликвоты пробы в ячейку:

а) в случае сдвига потенциала в сторону отрицательных значений (в пробе присутствуют только антиоксиданты) дальнейшее измерение проводится в соответствии с алгоритмом определения АОА;

б) в случае сдвига потенциала в сторону положительных значений (в пробе присутствуют и оксиданты и антиоксиданты) изменяют состав медиаторной системы (используют медиаторную систему 10^{-3} $K_3[Fe(CN)_6]$ и 10^{-3} $K_3[Fe(CN)_6]$);

4) измерение начального потенциала электрода в фоновом растворе (фосфатный буфер pH=7.0, содержащий медиаторную систему 10^{-3} М $K_3[Fe(CN)_6]$ и 10^{-3} $K_4[Fe(CN)_6]$);

5) внесение аликвоты пробы в ячейку;

б) измерение потенциала во времени;

7) оксидантную активность рассчитывают по формуле 5.3-5.4, антиоксидантную активность рассчитывают по формулам 5.7-5.8.

В соответствии с алгоритмом были проведены исследования 25 образцов семенной жидкости, содержащих оксиданты (таблица 5.4).

Таблица 5.4 – Оценочные содержания АОА/ОА семенной жидкости (n=3, P=0.95)

№ п/п	ОА, мМ-экв	S_r	АОА, мМ-экв	S_r
1	1.59	7.6	0.47	12.0
2	2.03	3.8	0.45	4.5
3	1.14	7.5	0.53	4.1
4	1.23	0.6	1.09	1.3
5	2.90	0.2	0.70	4.0
6	2.95	1.2	1.32	1.1
7	2.60	1.6	1.12	2.5
8	2.56	0.8	0.64	4.4

Продолжение таблицы 5.4

9	2.06	5.1	0.40	1.8
10	0.78	4.6	0.42	1.7
11	2.86	0.7	1.16	1.8
12	1.79	1.6	0.81	1.7
13	1.23	1.7	1.40	1.0
14	1.59	4.0	0.37	7.6
15	1.08	2.6	0.65	2.2
16	2.23	1.0	0.65	1.1
17	0.59	10.7	1.52	1.4
18	2.01	8.8	0.53	2.7
19	0.50	11.3	1.90	0.7
20	1.95	0.4	0.98	0.7
21	1.01	3.6	0.57	4.9
22	1.67	1.3	0.96	5.9
23	2.25	0.9	0.73	5.0
24	1.55	1.4	0.30	9.4

Несмотря на то, что полученные результаты являются оценочными, наблюдается достаточно хорошая воспроизводимость. Стандартное отклонение результатов при анализе 24 образцов не превышает 12%.

5.4 Оценка АОА/ОА семенной жидкости пациентов с нормо- и патоспермией

С использованием предложенного подхода исследованы образцы эякулята мужчин с нормоспермией и патоспермией (олиго-, астено-, терато-, смешанные формы), лейкоцитоспермией. Диагноз ставился на основе спермологического анализа эякулята с оценкой концентрации, подвижности, морфологии сперматозоидов.

Результаты, приведенные в таблице 5.5, демонстрируют, что у пациентов с нормоспермией почти в 90 % случаев наблюдается только антиоксидантная активность семенной жидкости. При патоспермии оксидантная активность семенной жидкости наблюдается почти у 60 % пациентов. Можно предположить, что наличие оксидантной активности семенной жидкости может

быть с определенной долей вероятности использовано в качестве предварительного диагностического критерия для выделения пациентов группы риска, требующих более детального обследования.

Таблица 5.5 – Результаты исследования АОА/ОА образцов семенной жидкости пациентов с нормоспермией и патоспермией

Диагноз	Образцы с АОА, (%)	Образцы с АОА/ОА, (%)
Нормоспермия (54 пациента)	88.9	11.1
Патоспермия (21 пациента)	40.3	59.7

Несмотря на то, что предложенный метод позволяет оценить лишь примерные соотношения АОА и ОА в пробе, информация, полученная потенциометрическим методом, существенна для диагностики, поскольку наличие ОА свидетельствует о патологических процессах в организме.

Предложенный в настоящей работе подход позволяет обнаружить антиоксиданты и оксиданты в пробе, что важно для медицинской диагностики. Вопрос о точном определении концентрации АО и Ох при анализе одной пробы требует проведения дополнительных исследований, в частности, учитывающих изменение пробы при извлечении её из живого организма.

Короткое время жизни кислородсодержащих радикальных соединений, быстрое изменение состава биологической пробы после отбора, не позволяют однозначно утверждать, что результаты определения ОА характеризуют состояние внутренних систем организма. Поэтому представленные в главе 5 результаты, рассматриваются как поиск метода определения ОА, а полученные данные, как предварительные. Тем не менее, они представляют интерес, поскольку указывают путь к развитию метода одновременного определения ОА и АОА в биологической пробе.

Исследована взаимосвязь оксидант/антиоксидантной активности семенной жидкости с состоянием репродуктивной функции мужчин. Показано, что метод с определенной долей вероятности позволяет выделить группу людей, страдающих патологиями репродуктивной функции.

Для использования результатов этих исследований в интересах практической медицины необходимо проведение клинических исследований в медицинских учреждениях, которые запланированы в дальнейшей работе.

ГЛАВА 6. НЕИНВАЗИВНЫЙ ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОЦЕНКИ АНТИОКСИДАННОЙ АКТИВНОСТИ КОЖИ

Разработка неинвазивных методов мониторинга ОС представляет значительный интерес, в первую очередь для медицины катастроф, так как позволит использовать АОА в качестве преддиагностического критерия для скрининга значительных групп населения в особый период, исключая опасность заражения пациентов.

Хотя влияние экзогенных факторов на антиоксидант/оксидантное состояние кожи существенно выше, чем на внутренние системы организма, но постоянное эндогенное воздействие на кожу позволяет предполагать взаимосвязь между состоянием организма в целом и АОА кожи. Следовательно, АОА/ОА кожи может служить диагностическим критерием общего состояния организма. Поэтому при разработке неинвазивного метода мониторинга ОС в качестве объекта анализа была выбрана кожа человека, а диагностического критерия ОС – её АОА.

Для исследования АОА кожи в настоящей работе был развит неинвазивный потенциометрический метод определения АОА/ОА кожи предложенный авторами [178].

6.1 Обоснование выбора электрода

В качестве рабочего электрода был выбран толстоплёночный платиновый электрод, используемый ранее для определения АОА биологических жидкостей [122,123,177]. Электрод имеет простую конструкцию и доступную стоимость, а также возможность изготовления в лабораторных условиях.

Проблему представлял выбор электрода сравнения, поскольку он должен быть конструктивно удобен для помещения на кожу человека, его потенциал должен быть устойчив в растворе, содержащем медиаторную систему. Многочисленные исследования, проведенные в нашей лаборатории, показали,

что потенциал объемного хлоридсеребряного электрода изменяется в присутствии медиаторной системы. Это может быть связано с протеканием конкурирующей реакции с участием компонентов медиаторной системы с образованием малорастворимых ферроцианидов серебра.

Исследования показали, что электрод типа ECG electrodes Arbo («Kendall», USA) защищен мембраной, препятствующей проникновению ферроцианид ионов к поверхности, и, таким образом, его потенциал оказался достаточно устойчивым в течение измерительного цикла.

На рисунке 6.1 изображена схема устройства для измерения АОА кожи [178].

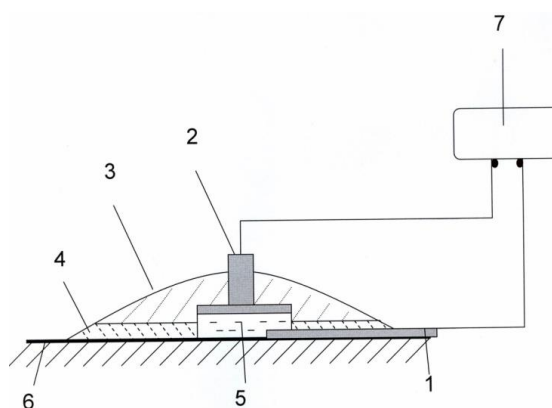


Рисунок 6.1 – Схема устройства для измерения антиоксидантной активности кожи

Устройство включает рабочий электрод (1) в виде пластины, установленной со стороны верхней части электрода (3) и частично перекрывающей ее, электрод сравнения (2). На нижнюю часть (3) нанесен клеящий слой (4), а на саму поверхность нанесен электропроводящий гель, содержащий медиаторную систему (5). Рабочий электрод (1) и гель (5) контактируют с кожей (6). Аналитический сигнал регистрируется прибором для измерения потенциалов (7).

Пластина рабочего электрода выполнена в виде керамической подложки с контактной зоной платиносодержащего слоя. Окислительное действие кислорода воздуха на медиаторную систему исключается за счет её изоляции от внешних воздействий клеем 4 и гелем 5.

В таблице 6.1 представлены результаты измерения потенциала толстопленочного платинового электрода относительно ЕСГ электродов сравнения и предлогарифмический коэффициент в уравнении Нернста, наблюдавшиеся при введении в гель, содержащий медиаторную систему $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ в различных концентрациях и соотношениях компонентов.

Таблица 6.1 – Потенциалы ТПЭ и предлогарифмический коэффициент в уравнении Нернста, наблюдающийся при различных концентрациях и соотношениях компонентов медиаторной системы

C_{Ox}/C_{Red} , М/М	ΔE , Мв			
	Электрод 1	Электрод 2	Электрод 3	Электрод 4
0.001/0.0001	-	-	239	234
0.0001/0.000005	235	246	256	252
0.001/0.00001	275	285	-	-
$d(\Delta E)/d(\lg(C_{Ox}/C_{Red}))$	57	56	57	60

Из таблицы видно, что, не смотря, на то, что измеряемый потенциал ТПЭ относительно ЕСГ электродов сравнения не является абсолютно воспроизводимой величиной, предлогарифмический коэффициент $E=f(\lg(C_{Ox}/C_{Red}))$ во всех случаях близок к расчетному. Поскольку источником информации является разность потенциалов между начальным и конечным значениями одной и той же пары электродов, некоторые различия в абсолютных значениях потенциала не препятствуют использованию предложенной системы электродов в качестве измерительной при условии, что потенциал ЕСГ устойчив во времени.

На рисунке 6.2 приведены результаты измерения разности потенциалов, наблюдающиеся при помещении двух электродов в гель, содержащий

медиаторную систему. Гель нанесен на тефлоновую пленку, моделирующую кожу человека. Разность потенциалов, измеренная с использованием разных пар электродов несколько отличается друг от друга, но остается, тем не менее, постоянной во времени.

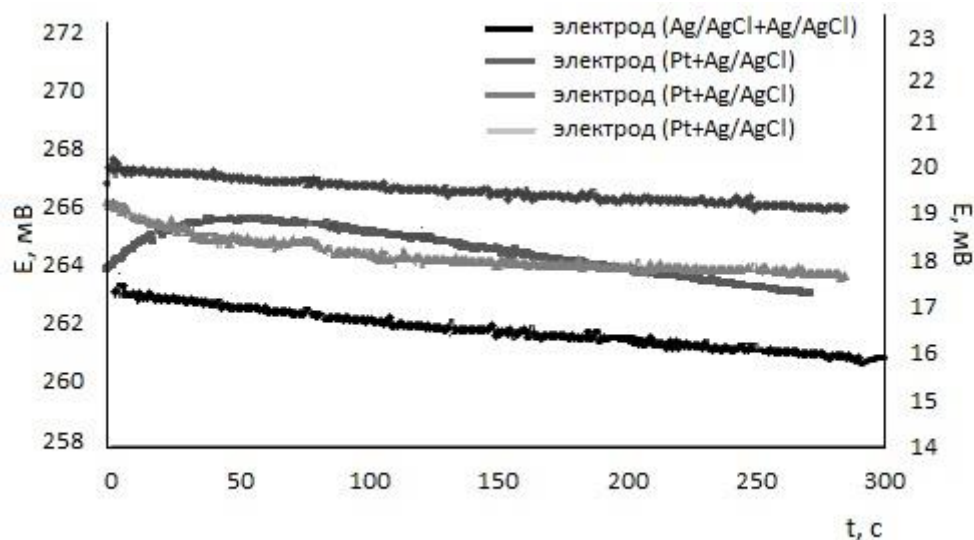


Рисунок 6.2 – Разность потенциалов, наблюдающаяся при помещении двух электродов в гель с медиаторной системой, содержащей 1 мМоль $K_3[Fe(CN)_6]$ и 10 μ Моль $K_4[Fe(CN)_6]$. Разность потенциалов пар электродов 1-3 представлена на главной оси и пары 4 на вспомогательной оси

Устойчивость и малые различия измеряемой разности потенциалов платинового и ЕСГ при использовании нескольких электродных пар позволяют использовать данную электродную систему для проведения потенциометрических измерений.

6.2 Исследование антиоксидантной активности модельных систем антиоксидантов

В качестве модельных систем использовали смеси, содержащие гель, медиаторную систему и антиоксиданты, входящие в состав биологических объектов.

Эксперимент проводился на тефлоновой пленке, моделирующей кожу человека.

Результаты исследования АОА модельных систем методом «введено-найденно» представлены в таблице 6.2.

Таблица 6.2 – Результаты анализа растворов модельных антиоксидантов, введенных в гель с медиаторной системой, содержащей 1 мМоль $K_3[Fe(CN)]_6$ и 10 μ Моль $K_4[Fe(CN)]_6$ ($n=3$, $P=0.95$)

Антиоксидант	Введено, 10^{-5} М-экв	Найдено, 10^{-5} М-экв	S_r , %	Recovery, %
Аскорбиновая кислота	2	1.88 ± 0.10	5.5	94
	4	4.05 ± 0.05	1.2	101
Глутатион	2	1.78 ± 0.10	5.8	89
	4	4.18 ± 0.08	1.8	104
Мочевая кислота	2	2.00 ± 0.03	1.5	99
	4	4.04 ± 0.05	1.2	101

Полученные величины имеют значения, близкие к 100%, S_r не превышает 6%. Результаты показывают соответствие величин «введено-найденно» и возможность их получения с весьма малыми отклонениями от истинных значений.

Результаты определения АОА методом «введено-найденно» на модельных растворах, позволяют сделать вывод о том, что потенциометрический метод с использованием медиаторной системы обеспечивает возможность количественной оценки антиоксидантной активности в геле.

6.3 Исследование АОА кожи

На рисунке 6.3 представлен общий вид устройства для оценки АОА кожи.



Рисунок 6.3 – Общий вид устройства для определения антиоксидантной активности кожи

Зависимость потенциала электрода, погруженного в гель, содержащий медиаторную систему, помещённого на поверхность кожи, от времени, свидетельствующая об антиоксидантной активности кожи приведена на рисунке 6.4.

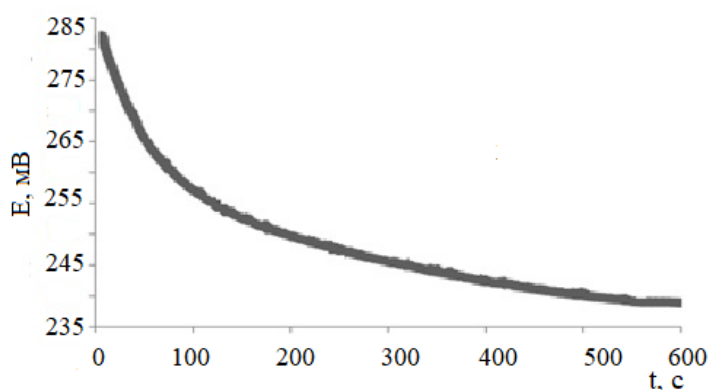


Рисунок 6.4 – Зависимость от времени потенциала электрода, погруженного в гель с медиаторной системой, содержащей 1 мМоль $K_3[Fe(CN)_6]$ и 10 μ Моль $K_4[Fe(CN)_6]$, нанесенный на поверхность кожи

Результаты оценки АОА на разных участках кожи 2-х добровольцев, свидетельствуют, что результаты измерений практически не зависят от выбранного места измерения (табл. 6.3).

Таблица 6.3 – Воспроизводимость результатов оценки АОА на разных участках кожи ($n=3$, $P=0.95$)

№	АОА, 10^5 М-экв	Среднее значение АОА, 10^5 М-экв	Sr, %
Респондент 1	1.15	1.16 ± 0.06	5.2
	1.22		
	1.10		
Респондент 2	2.04	2.04 ± 0.12	6.1
	2.17		
	1.92		

6.4 Исследование действия косметических кремов на АОА кожи.

Исследовано влияние на АОА кожи добровольцев двух косметических кремов, предоставленных производителем – «для рук» и «55+».

Результаты измерения АОА кожи 5 добровольцев до и после нанесения крема «для рук» представлены на рисунке 6.5.

Через 20 мин. После нанесение крема наблюдается увеличение АОА кожи всех респондентов. Наиболее сильно эффект проявляется у респондентов 1 и 2, которых условно отнесли к «старшей возрастной группе».

Через 8 ч после нанесения крема у респондентов 1, 2, 4 и 5 значение АОА кожи было выше, чем до его применения, при этом у респондентов 2, 4 и 5 происходит возрастание этого показателя по сравнению с АОА кожи после 20 мин после нанесения крема.

Через 24 ч после нанесения крема происходит снижение АОА кожи респондентов, но для респондентов «старшей возрастной группы» значение остается заметно выше, чем до использования крема.

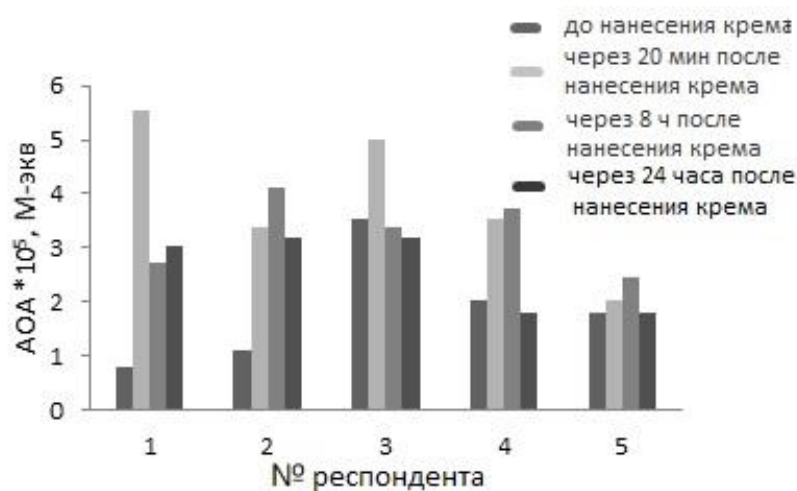


Рисунок 6.5 – Результаты оценки АОА кожи респондентов до и после воздействия крема «для рук»

Результаты исследования воздействия крема «55+» на кожу добровольцев двух возрастных групп: 22-27 лет (респонденты 1 - 3) и старше 45 лет (респонденты 4 – 6) представлены на рисунке 6.6. Измерения проводили до нанесения и через 30 мин после нанесения крема.

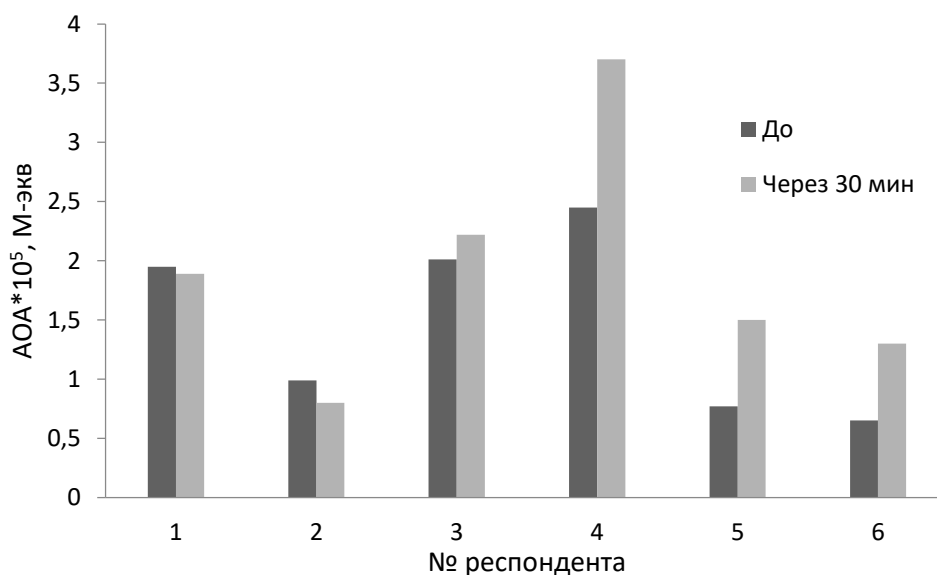


Рисунок 6.6 – АОА кожи респондентов до и после воздействия крема «55+»

Воздействие крема на кожу респондентов в 1-3 практически отсутствует. У респондентов 4-6 прослеживается существенное увеличение АОА кожи. Респонденты 4-6 являются целевой группой воздействия крема.

Полученные результаты показывают, что использование неинвазивного метода оценки АОА кожи позволит производителям косметических средств получать информацию, необходимую для оптимизации состава конечного продукта с учётом целевой аудитории.

6.5 Исследование действия напитков на АОА кожи и фракций крови

Для установления связи АОА кожи и фракций крови (плазма и эритроцитарная масса) проведено исследование влияния на эти показатели апельсинового сока, воды и трёх экспериментальных составов (1-3) разрабатываемого энергетического напитка, предоставленных производителем.

Результаты определения АОА напитков приведены на рисунке 6.7. Максимальная АОА характерна для напитка 1 (в 17 раз выше, чем АОА апельсинового сока). АОА напитков определяли ранее предложенным потенциометрическим методом [121].

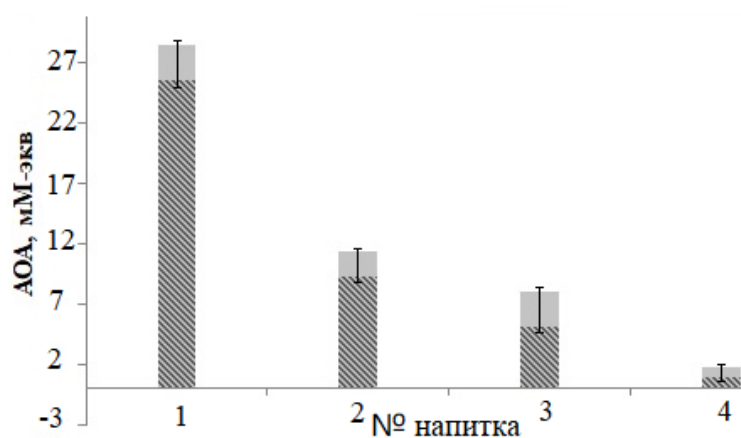


Рисунок 6.7 – АОА напитков 1 - 3 и апельсинового сока (n=5, P=0.95)
Заметно ниже концентрация АО в напитках 2 и 3. АОА воды равна нулю.

Исследовано влияние потребления профилактического напитка №1 на изменение АОА кожи двух респондентов. Респонденты – молодые девушки, возраст 20 лет, не имеющие хронических заболеваний. Кинетика изменения АОА кожи двух респондентов после потребления профилактического напитка №1 приведена на рисунке 6.8.

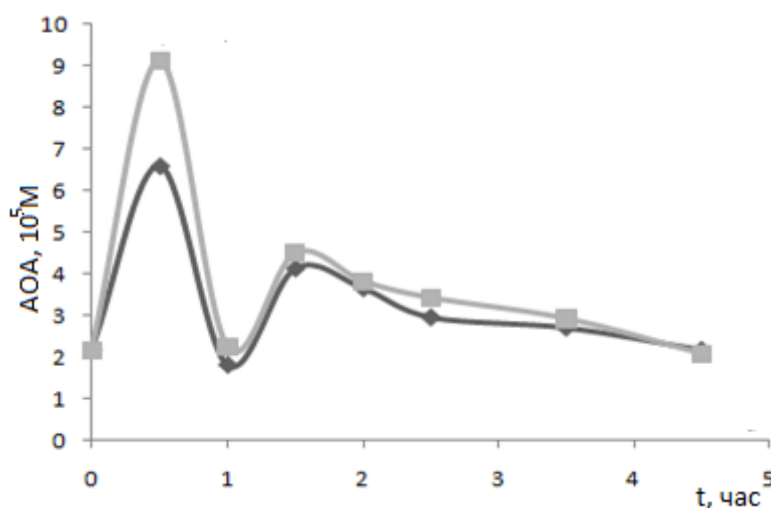


Рисунок 6.8 Кинетика изменения АОА кожи двух респондентов после потребления профилактического напитка №1

Исследования показали, что потребление напитка № 1 вызывает заметное увеличение АОА кожи, свидетельствующее о существенном улучшении АОА/ОА баланса организма респондентов. Зафиксированное через 30 мин резкое увеличение АОА кожи респондентов заметно снижается через 60 минут (рисунок 6.8). Это очевидно связано с влиянием на оксидантное/антиоксидантное состояние кожи двух конкурирующих процессов:

- 1) увеличение АОА кожи, обусловленное потреблением сока;
- 2) снижение АОА кожи, вызванное возникновением оксидантного стресса, связанного с голоданием (у респондентов отмечено дискомфортное состояние, ощущение голода, головокружение).

Чтобы исключить влияние на АОА кожи второго процесса и обеспечить корректную оценку влияния потребления исследуемого напитка, принято решение о приёме пищи респондентами не через 2 часа после потребления напитка, а через час.

В соответствии с результатами исследования кинетики изменения АОА кожи и фракций крови измерения АОА проводили до приёма напитка и через 30 минут (кожа), 40-50 мин. (кровь АОА фракций крови определяли предложенным ранее потенциометрическим методом [123].

В исследовании принимали участие 10 респондентов в возрасте от 18 до 20 лет (5 мужчин и 5 женщин) не имеющие хронических заболеваний. Напитки в количестве 100 мл принимались добровольцами натощак.

Результаты измерения АОА кожи, плазмы крови и эритроцитарной массы добровольцев до и после употребления напитков приведены на рисунках 6.9 - 6.12.

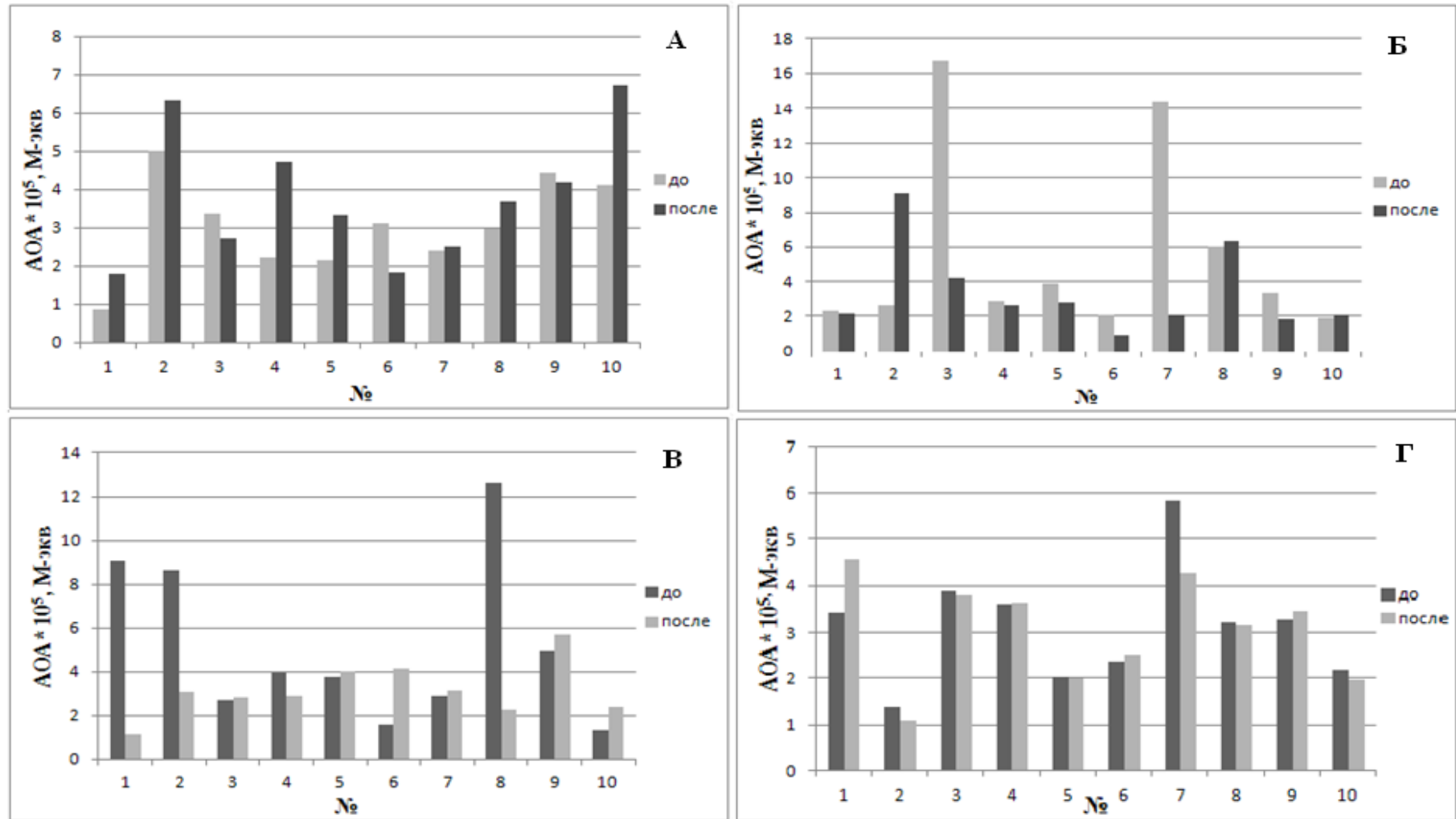


Рисунок 6.9 – АОА кожи респондентов натоцак и через 30 мин после употребления напитков 1 (А), 2 (Б), 3 (В) и апельсинового сока (Г)

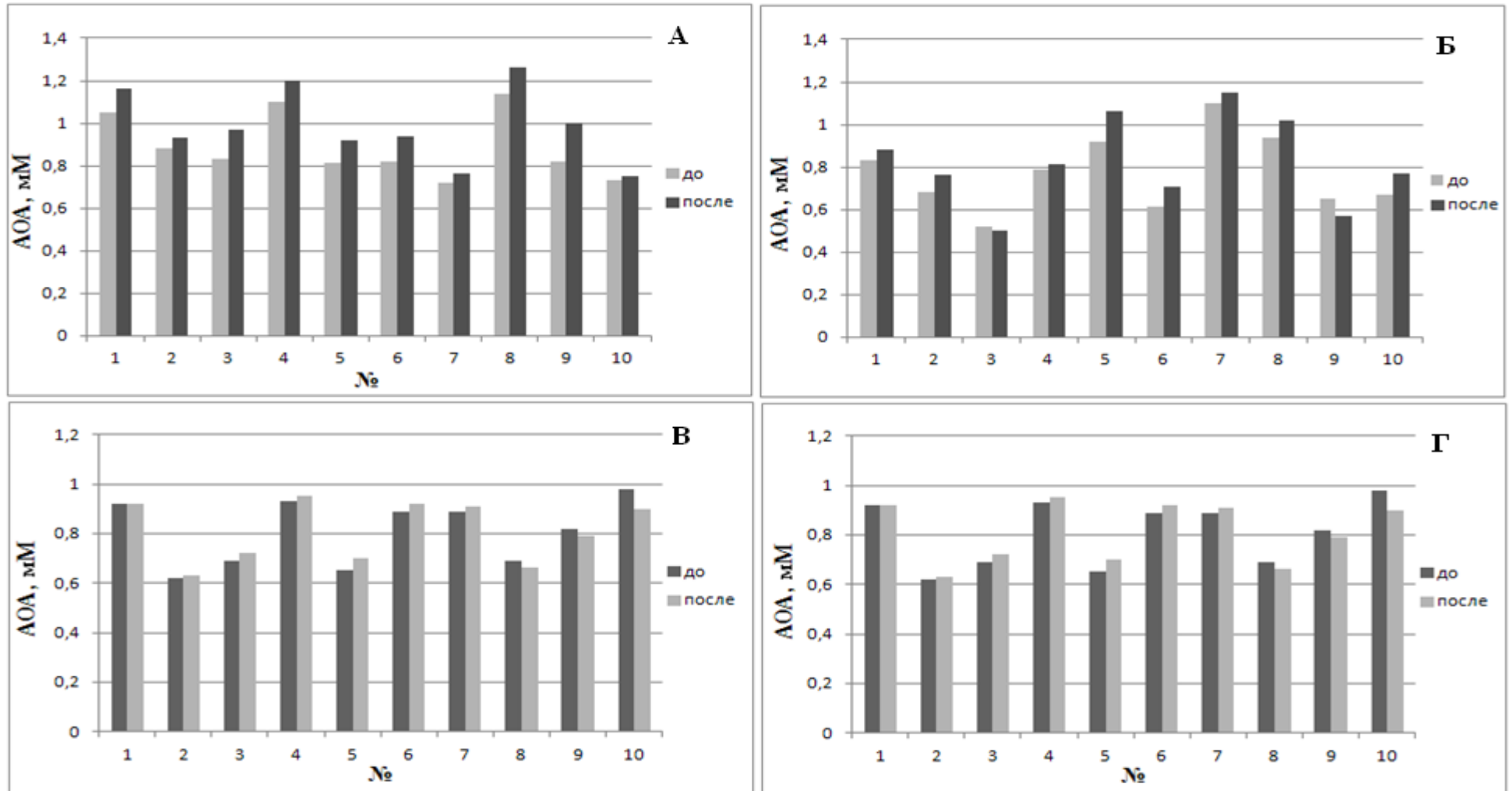


Рисунок 6.10 – АОА плазмы крови респондентов натоцак и через 40 мин после употребления напитков 1 (А), 2 (Б), 3 (В) и апельсинового сока (Г)

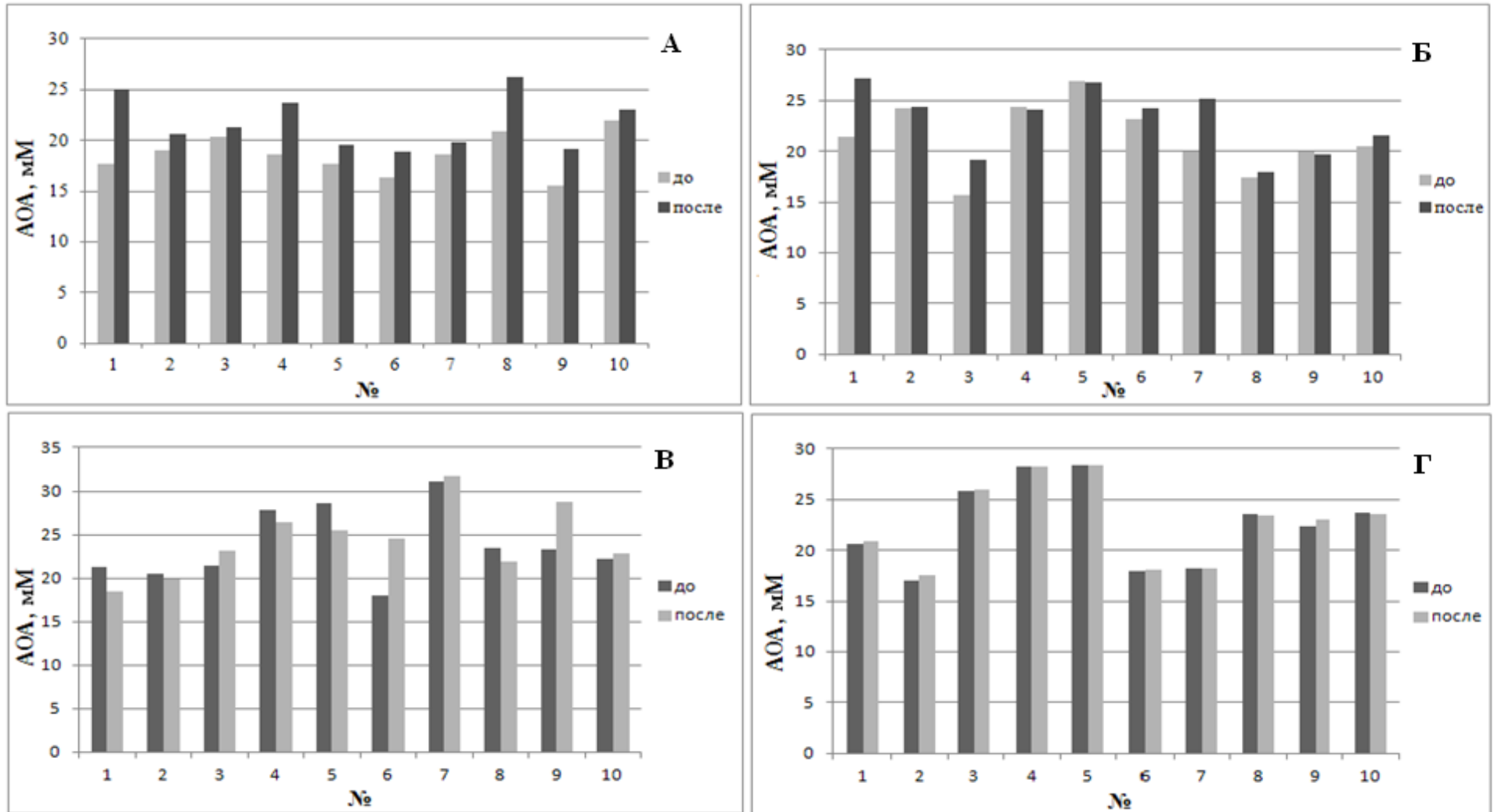


Рисунок 6.11 – АОА эритроцитарной массы респондентов натошак и через 40 мин после употребления напитков 1 (А), 2 (Б), 3 (В) и апельсинового сока (Г)

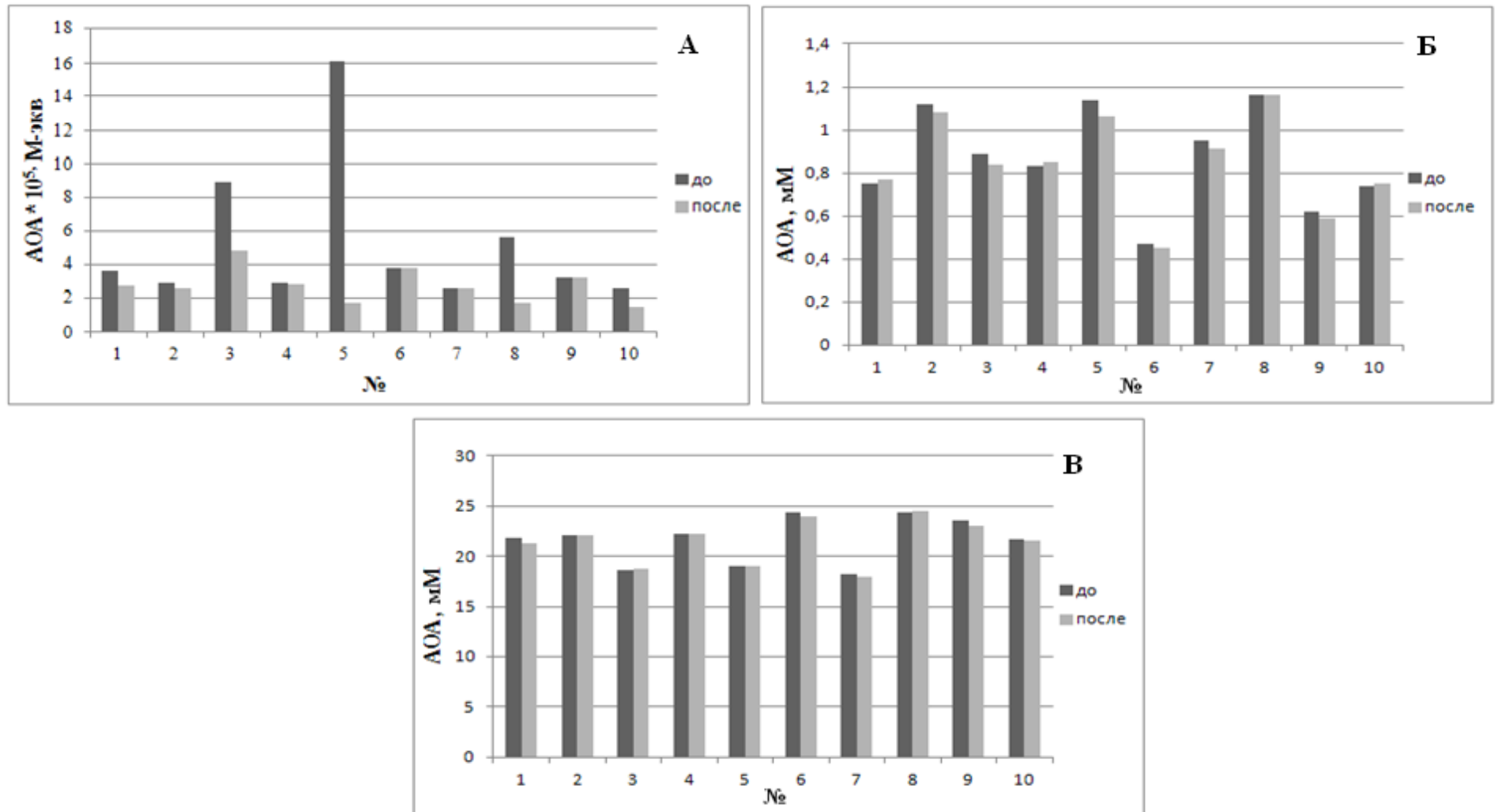


Рисунок 6.12 – АОА кожи (А) респондентов натошак и через 30 мин после употребления воды, плазмы крови (Б) и эритроцитарной массы (В) респондентов натошак и через 40 мин после употребления воды

Употребление напитка 1 приводит к увеличению АОА кожи у 80% респондентов и снижению - у 20% респондентов. Употребление напитков 2, 3 и апельсинового сока, как правило, сопровождается снижением АОА кожи. После употребления напитков 1 и 2 отмечается увеличение АОА фракций крови. Употребление напитка 3 и апельсинового сока приводит к незначительному увеличению АОА эритроцитарной массы и в среднем к снижению АОА плазмы крови. Употребления воды не приводит к значимым изменениям содержания антиоксидантов во всех исследованных биологических объектах.

Снижение АОА кожи и фракций крови при употреблении напитков может быть связано с тем, что в условиях эксперимента организм респондента подвергался действию двух разнонаправленных факторов:

1. стрессы, связанные с голоданием и болевыми ощущениями при заборе крови, приводят к снижению антиоксидантной защиты (снижение АОА);
2. воздействие напитка, повышающего антиоксидантную защиту (возрастание АОА).

Снижение АОА кожи отмечается у тех респондентов, которые наиболее остро реагировали на стрессовую ситуацию (дискомфортное состояние от голода и процедуры забора крови). При этом кожа человека, как орган, снабженный большим количеством рецепторов, реагировала на стрессовую ситуацию сильнее, чем кровь.

Реакция антиоксидантного состояния кожи на пероральный приём АО указывает, что измеренный неинвазивным методом показатель АОА кожи может, в первом приближении, быть использован для оценки состояния ОС организма в целом.

6.6 Предварительные клинические исследования АОА кожи

Результаты исследования АОА кожи, полученные в клинических условиях, представлены на рисунке 6.13. В исследовании приняло участие 112 пациентов, условно разделенные на две группы: относительно здоровые испытуемые и испытуемые, имеющие сердечно-сосудистые заболевания различного генеза и/или повышенные параметры артериального давления.

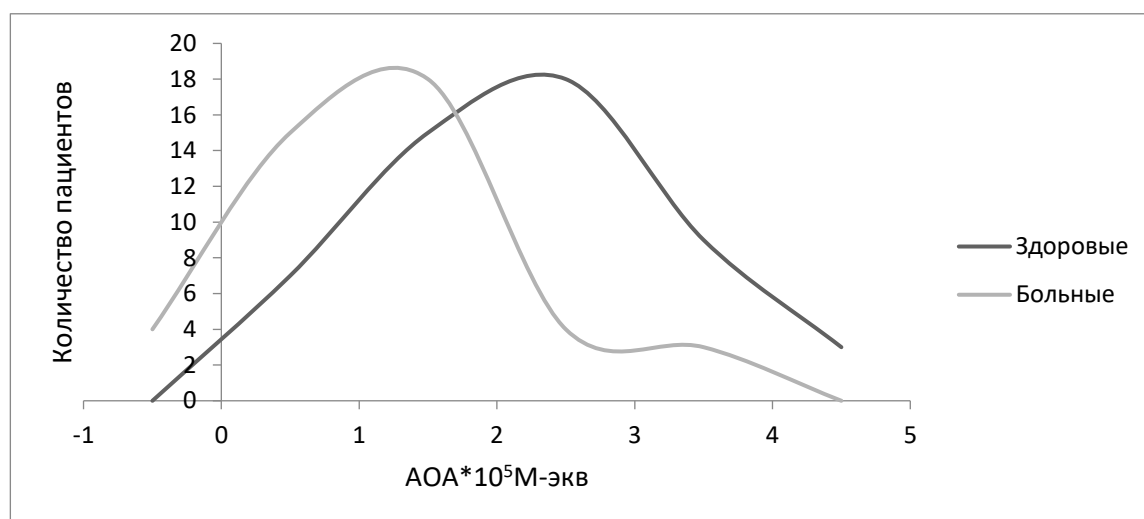


Рисунок 6.13 – Распределение значений АОА кожи пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и здоровых людей

Из рисунка 6.13, следует наличие взаимосвязи между АОА кожи и патологиями сердечно-сосудистой системы. У пациентов, имеющих сердечно-сосудистые заболевания и/или повышенные параметры артериального давления, наблюдается снижение АОА кожи. Данное явление закономерно, поскольку окислительное повреждение клеток и тканей сопровождается развитием многих патологических процессов, в том числе отражается на функционировании сердечно-сосудистой системы.

На основании полученных результатов выработаны предварительные референтные значения показателя АОА кожи (рисунок 6.14).



Рисунок 6.14 – Предварительные референтные значения показателя АОА кожи

Получил дальнейшее развитие неинвазивный способ определения антиоксидантной активности кожи методом потенциометрии с использованием медиаторной системы.

Исследования подтверждают корректность использования выбранной электродной пары, состоящей из платинового электрода и электрода сравнения. Методом «введено-найденно» модельных растворов показана возможность количественной оценки антиоксидантной активности потенциометрическим методом с использованием геля как носителя медиаторной системы. На основании проведенных исследований установлена взаимосвязь величины АОА кожи с составом косметической продукции, потребляемых напитков, с наличием заболеваний сердечно-сосудистой системы.

Получены предварительные результаты, позволяющие рекомендовать применение гибридного потенциометрического метода оценки АОА кожи

- в косметической промышленности для оптимизации состава и технологии получения целевого продукта с антиоксидантными свойствами для конкретной возрастной категории потребителей;

- в пищевой промышленности для оценки эффективности антиоксидантного действия напитков;

-в медицинской практике в качестве преддиагностического критерия состояния здоровья пациента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Предложен и развит новый гибридный вариант хроноамперометрического метода, включающий предшествующую химическую реакцию восстановления $K_3[Fe(CN)_6]$ антиоксидантами пробы. Показана линейная зависимость тока окисления продукта этой реакции – $K_4[Fe(CN)_6]$ от концентрации модельных АО (АК, МК, глутатион, цистеин), что позволяет использовать приращение тока в качестве аналитического сигнала. Предел обнаружения АО равен $6.9 \cdot 10^{-6}$ М.

2. Предложенный подход апробирован при исследовании биологических образцов. Относительное стандартное отклонение результатов анализа плазмы крови не превышало 9%. Степень корреляции результатов определения АОА предложенным гибридным вариантом хроноамперометрического метода в сравнении со стандартизованным потенциометрическим методом составила 0.89 ($R_{крит}=0.67$), рассчитанные значения критериев Стьюдента и Фишера ($t_{эксп} = 0.32$ и $F_{эксп} = 1.03$) не превышают критических значений.

3. Разработана методика определения АОА слюны новым гибридным вариантом хроноамперометрического метода, не требующая специальной пробоподготовки. Относительное стандартное отклонение результатов определения АОА слюны не превышает 8%. Степень корреляции результатов определения АОА предложенным гибридным вариантом хроноамперометрического метода в сравнении со стандартизованным потенциометрическим методом составила 0.92 ($R_{крит}=0.67$), рассчитанные значения критериев Стьюдента и Фишера ($t_{эксп} = 1.48$ и $F_{эксп} = 1.91$) не превышают критических значений.

4. Исследованы закономерности изменения потенциала медиаторной системы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ в присутствии образцов, содержащих оксиданты и антиоксиданты. Разработаны алгоритмы определения АОА/ОА гибридным потенциометрическим методом.

5. Разработана методика определения АОА/ОА семенной жидкости, позволяющая оценить АОА и ОА в одном измерении. Диапазон определяемых концентраций АОА составляет 0.2 – 6 ммоль-экв/дм³. Показатели повторяемости и воспроизводимости составляют 7 и 13 %.

6. Установлена взаимосвязь антиоксидант/оксидантной активности семенной жидкости с состоянием репродуктивной системы. Показано, что наличие оксидантной составляющей при исследовании семенной жидкости может указывать на развитие патологий репродуктивной функции мужчин.

7. Развита неинвазивный способ определения антиоксидантной активности кожи гибридным вариантом метода потенциометрии с использованием медиаторной системы, получены результаты, показывающие взаимосвязь величины АОА кожи с:

- составом используемой косметической продукции;
- составом потребляемых напитков;
- патологиями сердечно-сосудистой системы

8. Разработанные алгоритмы определения АОА/ОА биологических жидкостей и тканей реализованы в потенциометрических анализаторах «Антиоксидант» и «ПА-S», предназначенных для определения АОА/ОА семенной жидкости и кожи.

Перспективы дальнейшей разработки темы исследования заключаются в том, что полученные результаты, развитые подходы и методы, созданные на их базе приборы, будучи использованы в медицине, позволят разработать диагностические показатели и критерии оценки состояния здоровья человека. Для этого, в первую очередь, необходимы: проведение исследования АОА клеток, в частности сперматозоидов, гибридным вариантом хроноамперометрического метода; разработка гибридного варианта метода хроноамперометрии для определения ОА биологических жидкостей; проведение дополнительных исследований для определения концентрации АО

и Ох в семенной жидкости, разработка теоретических основ неинвазивного потенциометрического метода определения АОА кожи; улучшение воспроизводимости результатов исследования кожи; сокращение времени анализа.

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

- АК – аскорбиновая кислота;
- АО – антиоксидант;
- АОА – антиоксидантная активность;
- АОА/ОА – антиоксидант/оксидантная активность;
- АОС – система антиоксидантной защиты организма
- АФА – активные формы азота;
- АФК – активные формы кислорода;
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;
- ГР – глутатионредуктаза;
- ГПО – глутатионпероксидаза;
- ГТ – глутатионтрансфераза;
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;
- ДК – диеновые конъюгаты;
- Кат – каталаза;
- МДА – малоновый диальдегид;
- МК – мочевая кислота;
- ОС – окислительный стресс;
- ОА – оксидантная активность;
- ПОЛ – перекисное окисление липидов;
- СОД – супероксиддисмутаза;
- ТПЭ – толстоплёночный платиновый электрод;
- ТУЭ – толстоплёночный углеродсодержащий электрод;
- ЭПР – электронный парамагнитный резонанс;
- ЭХЯ – электрохимическая ячейка;
- ЦВА – циклическая вольтамперометрия;
- ХА – хроноамперометрия;
- ABTS – 2,2'-азино-бис-(этилбензтиазолино-6-сульфонат);

BDD – допированный бором алмазный электрод;

DCFH-DA – дихлорофлуоресцеин-диацетат;

DPPH – 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил;

FRAP – железо-восстанавливающая антиоксидантная способность (.);

ORAC – способность к абсорбции кислородных радикалов (Oxygen radical absorption capacity);

TEAC – антиоксидантная активность в эквивалентах Тролокса (Trolox equivalent antioxidant capacity);

TRAP – общая способность к улавливанию радикалов (Total radical trapping parameter).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах / Ю.А. Владимиров // Соросовский образовательный журнал, Биология – 2000.
2. Зенков, Н.К. Окислительный стресс / Н. К. Зенков, В.З. Ланкин, Е.Б. Меньщикова // М.: МАИК «Наука/Интерпериодика» – 2001. – 343 с.
3. Донцов, В.И. Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии и естественном старении / Донцов В.И., Крутько В. Н., Мрикаев Б.М., Уханов С.В. // Тр. ИСА РАН. – 2006. – Т. 19. – С. 50-69.
4. Moreno-Loshuertos, R. Differences in reactive oxygen species production explain the phenotypes associated with common mouse mitochondrial DNA variants / R. Moreno-Loshuertos, R. Acín-Pérez, P. Fernández-Silva, N. Movilla, A. Pérez-Martos, S. Rodriguez de Cordoba, M.E. Gallardo, J.A. Enríquez // Nature genetics. – 2006. – V.38. – № 11 – P. 1261–1268.
5. Янковский, О.Ю. Токсичность кислорода и биологические системы (эволюционные, экологические и медико-биологические аспекты) / О.Ю. Янковский // Санкт-Петербург: Изд-во Игра. – 2000. – 294 с.
6. Halliwell, B. Oxygen toxicity, oxygen radicalis, transition metals and disease / B. Halliwell, J.M. Gutteridge // Biochemical journal. – 1984. – Vol. 292. – P. 1-14.
7. Волыхина, В.Е. Супероксиддисмутазы: структура и свойства / В.Е. Волыхина, Е.В. Шафрановская // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2009. – Т. 8. - №4. – С. 6-12.
8. Клячко, Н.Л. Ферменты – биологические катализаторы: основные принципы действия / Н.Л. Клячко // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – № 3. – С. 58–63.
9. Зенков, Н.К. Активированные кислородные метаболиты в биологических системах / Н.К. Зенков, Е.Б. Меньщикова // Успехи современной биологии. – 1993. – Т.113. – №3. – С. 286-296.

10. Esterbauer, H. Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein / H. Esterbauer, M. Dieber-Rotheneder, G. Striegl, et al. // *The American Journal of Clinical Nutrition*. – 1991. – V. 53. – P. 314–321.
11. Fukuzawa, K. Rate constants for quenching singlet oxygen and activities for inhibiting lipid peroxidation of carotenoids and alpha-tocopherol in liposomes / K. Fukuzawa, Y. Inokami, A. Tokumura, et al. // *Lipids*. – 1998. – V. 33. – P. 751–756.
12. Keys, S. A. Antioxidant activity of retinol, glutathione, and taurine in bovine photoreceptor cell membranes / S.A. Keys, W.F. Zimmerman // *Experimental Eye Research*. – 1999. – V. 68. – P. 693–702.
13. Takahashi, T. Antioxidant roles of cellular ubiquinone and related redox cycles / T. Takahashi, T. Honda, N. Sugimoto, S. Misobuchi, T. Okamoto // *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. – 1999. – V. 22 – № 11. – P. 1226 – 1233.
14. Янковский, О.Ю. Токсичность кислорода и биологические системы (эволюционные, экологические и медико-биологические аспекты) / О.Ю. Янковский // Санкт-Петербург: Изд-во Игра м – 2000. – 294 с.
15. Sevanian, A. Serum urate as an antioxidant for ascorbic acid / A. Sevanian, K. J. Davies, P. Hochstein // *The American Journal of Clinical Nutrition*. – 1991. – V. 54. – № 6 – P. 1129–1134.
16. Galano, A. Glutathione: mechanism and kinetics of its non-enzymatic defense action against free radicals / A. Galano, J.R. Alvarez-Idaboy // *RSC Advances*. – 2011. – V.1. – P. 1763–1771.
17. Winterbourn, C.C. Superoxide as an intracellular radical sink / C.C. Winterbourn // *Free Radical Biology and Medicine*. – 1993. – V. 14. – P. 85–90.
18. Sies, H. Strategies of antioxidant defense / H. Sies // *European Journal of Biochemistry*. – 1993. – V. 215. – P. 213-219.
19. Rahman, T. Oxidative stress and human health / T. Rahman, I. Hosen, Islam M.M., Towhidul, H.U. Shekhar // *Advances in Bioscience and Biotechnology*. – 2012. – V. 3. – P. 997-1019.

20. Druge, W. The plasma redox state and ageing / W. Druge // *Ageing Research Reviews*. – 2002. – V. 1. – P. 257–278.
21. Kasote, D.M. Mitochondrial dysfunction in psychiatric and neurological diseases: cause(s), consequence(s), and implications of antioxidant therapy / D.M. Kasote, M.V. Hegde, S.S. Katyare // *BioFactors*. – 2013. – V. 39. – № 4. – P. 392-406.
22. Ou, B. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study / B. Ou, D. Huang, M. Hampsch-Woodill, J.A. Flanagan, E.K. Deemer // *Journal of Agriculture Food Chemistry*. – 2002. – V. 50. – № 11. – P. 3122–3128.
23. Воробьева, Е.Н. Роль свободнорадикального окисления в патогенезе болезней системы кровообращения / Е.Н. Воробьева, Р.И. Воробьев // *Бюллетень СО РАМН*. – 2005. – Т. 118. – № 4. – С. 24–30.
24. Crimia, E. The role of oxidative stress in adult critical / E. Crimia, V. Sica, S. Williams-Ignarro, H. Zhang, A.S. Slutsky, L.J. Ignarro, C. Napoli // *Free Radical Biology & Medicine*. – 2006. – V. 40. – № 3. – P. 398 – 406.
25. Van Deel, E.D. Extracellular superoxide dismutase protects the heart against oxidative stress and hypertrophy after myocardial / E.D. van Deel, Z. Lu, X. Xu, G. Zhu, X. Hu, T.D. Oury, R.J. Bache, D.J. Duncker, Y. Chen // *Free Radical Biology & Medicine*. – 2008. – V. 44. – № 7. – P. 1305–1313.
26. Щукин, Ю.В. Молекулярные механизмы влияния розувастатина на системный окислительный стресс и эндогенное воспаление больных с атеросклерозом / Ю.В. Щукин, В.А. Дьячков, Е.И. Селезнев, Е.А. Данилова, Е.А. Пикатова, Е.А. Медведева // *Кардиология*. – 2008. – № 8. – С. 41-45.
27. Арзамасцева, Н.Е. Окислительный стресс при хронической сердечной недостаточности и сахарном диабете 2 типа / Н.Е. Арзамасцева, В.З. Панкин, Г.Г. Коновалова, А.К. Тихазе, Ф.Т. Агеев, Ю.В. Лапина, О.Ю. Нарусов,

В.Ю. Мареев, Ю.Н. Беленков // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2007. – Т. 143. – № 2. – С. 166-169.

28. Ляхович, В.В. Активированные кислородные метаболиты в монооксигеназных реакциях / В.В. Ляхович, В.А. Вавилин, Н.К. Зенков, Е.Б. Меньщикова // Бюллетень СО РАМН. - 2005. – Т. 118. – № 4. – С. 7–12.

29. Cocuzza, M. Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis / M. Cocuzza, S.C. Sikka, K.S. Athayde, A. Agarwal // International Brazilian Journal of Urology. – 2007. – V. 33. – № 5. – P. 603–621.

30. Быкова, М.В. Про/антиоксидантный статус в сперматозоидах и семенной плазме мужчин при патоспермии / М.В. Быкова, Н.М. Титова, Е.В. Маркова, А.В. Светлаков // Проблемы Репродуктологии. – 2008. – № 3. – С. 63–67.

31. Campbell, A.J. Male infertility and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) / A.J. Campbell, D.S. Irvine // British Medical Bulletin. – 2000. – V. 56. – № 3 – P. 616–629.

32. P.J. Rowe, F.H. Comhaire, T.B. Hargreave, A.M. A. Mahmoud, WHO manual for the Standardized investigations, diagnosis and management of infertile couple. WHO. Cambridge University Press. Cambridge. 2000, 4th Ed, 8–61.

33. Sharma, R. K. The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility / R. K. Sharma, F. F. Pasqualotto, D. R. Nelson, A. J. Thomas, A. Agarwal // Hum Reprod – 1999. – V. 14. – P. 2801–2807.

34. Pasqualotto, F.F. Reactive oxygen species and oocyte fertilization / F.F. Pasqualotto, E.B. Pasqualotto // Human Reproduction. – 2007. – V. 22. – № 3. – P. 901-908.

35. Jancar, N. Effect of apoptosis and reactive oxygen species production in human granulosa cells on oocyte fertilization and blastocyst development / N.

Jancar, A. Kopitar, A. Ihan, I. Klun, E. Bokal // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2007. – V. 24. – № 2. – P. 91–97.

36. Goud, A.P. Reactive oxygen species and oocyte aging: Role of superoxide, hydrogen peroxide, and hypochlorous acid / A.P. Goud, P.T. Goud, M.P. Diamond, B. Gonik, H.M. Abu-Sou // *Free Radical Biology & Medicine*. – 2008. – V. 44. – № 7. – P. 1295–1304.

37. Agarwal, A. Oxidative stress and its implications in female infertility - a clinician's perspective / A. Agarwal, S. Gupta, R. Sharma // *Reproductive Biomedicine Online*. – 2004. – V. 11. – № 5. – P. 641–650.

38. Fatemeh, A. Total antioxidant capacity of saliva and dental caries / A. Fatemeh, T. G. Mohammad, S. H. Seyedeh, K. Shahin, M. Abbas // *Medicina Oral Patologia*. – 2013. – V. 18. - № 4. – P. 553–556.

39. Schipper, R.G. Saliva as research material: biochemical, physicochemical and practical aspects [Text] / R.G. Schipper, E. Silletti, M.H. Vingerhoeds // *Archives of Oral Biology*. – 2007. – V. 52. – P. 1114–1135.

40. Kohen R. The reductive capacity index of saliva obtained from donors of various ages / R. Kohen, O. Tirosh, K. Kopolovich // *Experimental Gerontology*. – 1992. – V. 27. – P. 161–168.

41. Panjamurthy, K. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with periodontitis / K. Panjamurthy, S. Manoharan, C.R. Ramachandran // *Cellular and Molecular Biology Letters*. – 2005. – V. 10. – P.255–264.

42. Youssef, H. Comparison of total antioxidant capacity of salivary, capillary and venous samplings: interest of the salivary total antioxidant capacity on triathletes during training season / H. Youssef, C. Groussard, G. Machefer, O. Minella, A. Couillard, J. Knight // *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*. – 2008. – V. 48. – P. 522–529.

43. Николаев, И.В. Антиоксидантная и пероксидазная активность слюны при воспалительных заболеваниях пародонта и возможность их

коррекции / И.В. Николаев, Л.Н. Колобкова, Е.О. Ландесман, Е.В. Степанова, О.В. Королева // Биомедицинская химия – 2008. – Т. 54. – № 4. – С. 454-462.

44. Белоклицкая, Г.Ф. Возможности антиоксидантной коррекции перекисного окисления липидов при заболеваниях пародонта разной тяжести / Г. Ф. Белоклицкая // Современная стоматология. – 2000. – № 1. – С. 38–41.

45. Бобров, А.П. Клиническая патофизиология для стоматологов: [Учеб. пособие] / А. П. Бобров и др. // Н. Новгород : Изд-во НГМА. – 2002. – 109 с.

46. James, T.J. Evidence of oxidative stress in chronic venous ulcers / T.J. James , M.A. Hughes , G.W. Cherry , R.P. Taylor // Wound Repair and Regeneration. – 2003. – V. 11. - № 3. – P. 172–176.

47. Raha, S. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing / S.Raha, B.H. Robinson // Trends in Biochemical Sciences. –2000. – V. 64. – № 10. – P. 502–508.

48. Tóthová, L. Salivary markers of oxidative stress in oral diseases / L. Tóthová, N. Kamodyová, T. Červenka, P. Celec // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2015. – V. 5. – № 73.

49. Kamodyová, N. Salivary markers of oxidative stress and antioxidant status: Influence of external Factors / N. Kamodyová , L. Tóthová , P. Celec // Disease Markers. – 2013. – V. 34. - № 5. – P. 313-321.

50. Varun, S. N. Salivary and Serum Antioxidant Activity in Patients with Acute Coronary Syndrome / S. N. Varun, K. S. Anil, P. Nigam, A. Basheer // International Medical Journal Malaysia. – 2012. – V. 11. – № 2. – P. 35–38.

51. Choromańska, M. Antioxidant Defence, Oxidative Stress and Oxidative Damage in Saliva, Plasma and Erythrocytes of Dementia Patients. Can Salivary AGE be a Marker of Dementia? / M. Choromańska, A. Klimiuk, P. Kostecka-Sochoń, K. Wilczyńska, M. Kwiatkowski, N. Okuniewska, N.

Waszkiewicz, A. Zalewska, M. Maciejczyk // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2017. – V. 18. – № 10.

52. Pendyala, G. Evaluation of Total Antioxidant Capacity of Saliva in Type 2 Diabetic Patients with and without Periodontal Disease: A Case-Control Study / G. Pendyala, B. Thomas, S.R. Joshi // *North American journal of medical sciences*. – 2013. – V. 5. – № 1. – P. 51–57.

53. Baliga, S. Determination of total antioxidant capacity of saliva in sickle cell anemic patients - A cross-sectional study / S. Baliga, M. Chaudhary, S. S. Bhat, P. Bhatiya, N. Thosar, P. Bhansali // *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*. – 2017. – V. 35. - № 1. – P. 14-18.

54. Ahsan, H. Oxygen free radicals and systemic autoimmunity / H. Ahsan, A. Ali, R. Ali // *Clinical & Experimental Immunology*. – 2003. – № 131 – P. 398–404.

55. Maccarrone, M. A survey of reactive oxygen species and their role in dermatology / M. Maccarrone, M. V. Catani, S. Iraci, G. Melino, A. F. Agro // *JEADV*. – 1997. – № 8 – P. 185–202.

56. Okayama, Y. Oxidative stress in allergic and inflammatory skin diseases / Y. Okayama // *Current Drug Targets – Inflammation & Allergy*. – 2005. – № 4 – P. 517.

57. Friel, H.P. Role of histamine, complement and xanthine oxidase in thermal injury of skin / H.P. Friel, G.O. Till, O. Trentz, P.A. Ward // *Am Pathol*. – 1989. – V. 135. – P. 203–217.

58. Kapp, A. Human granulocyte- macrophage colony stimulated factor: an effective direct activator of human polymorphonuclear neutrophilic granulocytes / A. Kapp, G. Zeck-Kapp, M. Danner, T.A. Luger // *Journal of Investigative Dermatology*. – 1988. – V. 91. – P. 49–55.

59. Gurbuz, V. Oxidative organ damage in a rat model of thermal: the effect of cyclosporin A / V. Gurbuz, A. Corak, B. C. Yagen, H. Kurtel, L. Alican // *Burns*. – 1997. – V. 23. – P. 37-42.

60. Evelson, P. Oxidative stress and in vivo chemiluminescence in mouse skin exposed to UVA radiation / P. Evelson, C.P. Ordonez, S. Llesuy, A. Boveris // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 1997. – V. 38. – P. 215–219.
61. Friel, H.P. Role of histamine, complement and xanthine oxidase in thermal injury of skin / H.P. Friel, G.O. Till, O. Trentz, P.A. Ward // *Am Pathol*. – 1989. – V. 135. – P. 203–217.
62. Deliconstantinos, G. Alteration of nitric oxide synthase and xanthine oxidase activities of human keratinocytes by ultraviolet B radiation. Potential role for peroxynitrite in skin inflammation / G. Deliconstantinos, V. Villicotov, J.C. Stavrides // *Biochemical pharmacology*. – 1996. – V. 51. – P. 1727–1738.
63. Migachi, Y. Erythema multiforme: a possible pathogenic role of increased reactive oxygen species / Y. Migachi, S. Imamura, Y. Niwa // *Journal of Clinical & Laboratory Immunology*. – 1986. – V. 19. – P. 1–4.
64. Valgimigli, L. Measurement of antioxidative stress by EPR radical-probe technique / L. Valgimigli, G.F. Pedulli, M. Paolini // *Free Radical Biology & Medicine*. – 2001. – V. 31. – P. 708–716.
65. Mrakic-Sposta, S. Assessment of a Standardized ROS Production Profile in Humans by Electron Paramagnetic Resonance / S. Mrakic-Sposta, M. Gussoni, M. Montorsi, S. Porcelli, A. Vezzoli // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2012. – P. 1–10.
66. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция / Ю.А. Владимиров, Е.В. Проскурнина. // *Успехи биологической химии*. – 2009. – Т. 49. – С. 341–388.
67. Хасанов, В.В. Методы исследования антиоксидантов / В.В. Хасанов, Г.Л. Рыжова, Е.В. Мальцева // *Химия растительного сырья*. – 2004. – № 3. – С. 63–75.
68. Журавлев, А.И. Свободнорадикальная биология / А.И. Журавлев, В.Т. Пантюшенко // М.: «Московская ветеринарная академия», – 1989. – С. 60.

69. Арутюнян, А.В. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы / А.В. Арутюнян, Е.Е. Дубинина, Н.Н. Зыбина // СПб.: «Фолиант». – 2000. – С. 104.
70. Floyd, R.A. Use of salicylate with high pressure liquid chromatography and electrochemical detection (LCE) as a sensitive measure of hydroxyl free radicals in adriamycin treated rats / R.A. Floyd, R. Henderson, J.J. Watson, P.K. Wong // *Free Radical Biology & Medicine*. – 1986. – V.2. – № 1. – P. 13–18.
71. Moreno-Loshuertos R. , Differences in reactive oxygen species production explain the phenotypes associated with common mouse mitochondrial DNA variants / R. Moreno-Loshuertos, R. Acín-Pérez, P. Fernández-Silva, N. Movilla, A. Pérez-Martos, S. Rodriguez de Cordoba, M.E. Gallardo, J.A. Enríquez // *Nature genetics*. – 2006. – V.38. – № 11 – P. 1261–1268.
72. Tai, C. Determination of hydroxyl radical photochemically generated in surface waters under sunlight by high performance liquid chromatography with fluorescence detection / C. Tai, C. Xiao, T. Zhao, L. Wua, D. Han // *Analytical methods*. – 2014. – V.6. – № 20 – P. 73–80.
73. Стальная, И.Д. Современные методы в биохимии / И.Д. Стальная, Т.Г. Гаришвили // М.: «Медицина». – 1997. – С. 117.
74. El-Saadani, M. A spectrophotometric assay for lipid peroxides in serum lipoproteins using a commercially available reagen / M. El-Saadani, H. Esterbauer, M. Sayed, M. Goher, A.Y. Nassar, G. Jurgens // *The Journal of Lipid Research*. – 1989. – V. 30. – № 4. – P. 627–630.
75. Takeda K., Determination of hydroxyl radical photoproduction rates in natural waters / K. Takeda, H. Takedoi // *Analytical sciences*. – 2004. – V.20. – № 1 – P. 153–158.
76. Гаврилов, В.Б. Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с тиобарбитуровой кислотой / В.Б. Гаврилов, А.Р. Гаврилова, М.М. Мажуль // *Вопросы медицинской химии*. – 1987. – №1. – С. 118–121.

77. Karatas, F. Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography // F. Karatas, M. Karatepe, A. Baysar // *Analytical Biochemistry*. – 1989. – V. 311. – № 1. – P. 76–79.
78. Levine, R.L. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins / R.L. Levine, D. Garland, C.N. Oliver, A. Amici, I. Climent, A.G. Lenz, B.W. Ahn, S. Shaltiel, E.R. Stadtman // *Methods Enzymology*. – 1990. – V. 186. – № 1 – P. 464–478.
79. Fletcher, B.L. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological system and tissues / B.L. Fletcher, C.J. Dillard, A.Y. Tappel // *Analytical Biochemistry*. – 1973. – V.52. – P. 1–9.
80. Oztas, E. Oxidative stress markers in severe preeclampsia and preeclampsia-related perinatal morbidity — preliminary report / S. Ozler, A. Tokmak, O. Erel, M. Ergin, D. Uygur, N. Danisman // *Ginekologia Polska*. – 2016. – V. 87. – № 6. – P. 436–441.
81. McCord, J.M. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein) / J.M. McCord, I. Fridovich // *J. Biol. Chem.* – 1969. – V. 244. – № 2. – P. 6049–6055.
82. Tho, L.L. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in erythrocytes as indices of oxygen loading in disease: a survey of one hundred cases / L.L. Tho, J.K. Candlish // *Biochem. Med. Metab. Biol.* – 1987. – V. 38 – № 1. – P. 74–80.
83. Костюк, В.А. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина / В.А. Костюк, А.И. Потапович, Ж.В. Ковалева // *Вопр. мед. Химии*. – 1990. – Т. 36 – № 2. – С. 88–91.
84. Bandyopadhyay, U. Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis / U. Bandyopadhyay, D. Das, R. K. Banerjee // *Current Science* – 1999. – V.77. – P. 658–665.
85. Магин, Д.В. Фотохемилюминесценция как метод изучения антиоксидантной активности в биологических системах. Математическое

моделирование / Д.В. Магин, Д.Ю. Измайлов, И.Н. Попов, Г. Левин, Ю.А. Владимиров // *Вопр. мед. химии* – 2000. – Т. 4 – № 2. – С. 62–68.

86. Aebi, H. Catalase in vitro / H. Aebi // *Methods Enzymol.* – 1984. – V. 105. – P. 121–126.

87. Бах А.Н. Сборник избранных трудов // А.Н. Бах, С.А. Зубкова // СПб.: «Наука» 1997. – 415 с.

88. Клячко, Н.Л. Ферменты – биологические катализаторы: основные принципы действия / Н.Л. Клячко // *Соросов. образов. журн.* – 1997. – № 3. – С. 58–63.

89. Pellegrini, N. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay / N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans // *Free Radic. Biol. Med.* – 1999. – V. 26. – № 9 – P. 1231–1237.

90. Wayner, D.D.M. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma / D.D.M. Wayner, G.W. Burton, K.U. Ingold, L.R.C. Barclay, S. Locke // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1987. – V. 924. – № 3 – P. 408–419.

91. Ghiselli, A. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability / A. Ghiselli, M. Serafini, G. Maiani, E. Azzini, A. Ferro-Luzzi // *Free Radic. Biol. Med.* – 1987. – V. 18. – № 1. – P. 29–36.

92. Krasovska, A. Chemiluminescence detection of peroxy radicals and comparison of antioxidant activity of phenolic compounds / A. Krasovska, D. Rosiak, K. Czkapciak, M. Lukaszewicz // *Cur. Topics Biophys.* – 2000. – V. 24. – P. 89–95.

93. Владимиров, Ю.А. Активированная кумарином хемиллюминесценция липопротеидов низкой плотности в присутствии ионов двухвалентного железа / Ю.А. Владимиров, М.П. Шерстнев, Т.К. Азимбаев // *Биофизика.* – 1992. – № 37 – С. 1041–1047.

94. Владимиров, Ю.А. Активированная хемилюминесценция и биолюминесценция как инструмент в медико-биологических исследованиях / Ю.А. Владимиров // Соросов. образов. журн. – 2001. – Т. 7. – № 1 – С. 16–23.
95. Mayer, B. High-Throughput Fluorescence Screening of Antioxidative Capacity in Human Serum / M. Schumacher, H. Brandstätter, F.S. Wagner and A. Hermetter // *Analytical Biochemistry*. – 2001. – V. 297. – № 2 – P. 144–153.
96. Kampa, M. A new automated method for the determination of the Total Antioxidant Capacity (TAC) of human plasma, based on the crocin bleaching assay / M. Kampa, A. Nistikaki, V. Tsaousis, N. Maliaraki, G. Notas, E. Castanas // *BMC Clin. Path.* – 2002. – V. 2. – P. 3–11.
97. Magalhaes, L.M. Automatic method for determination of total antioxidant capacity using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay / L.M. Magalhaes, M.A. Segundo, S. Reis, J.L.F.C. Lima // *Analyt. Chim. Acta.* – 1986. – V. 558. – № 2 – P. 310–318.
98. Benzie, I.F. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay / I.F. Benzie, J.J. Strain // *Analytical Biochemistry*. – 1996. – V. 239. – № 1 – P. 70–76.
99. Vijayalakshmi, M., Ferric reducing anti-oxidant power assay in plant extract / M. Vijayalakshmi, K. Ruckmani // *Bangladesh Journal of Pharmacology*. – 2016. – V. 11. – № 3 – P. 510.
100. Özyürek, M. The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement / M. Özyürek, K. Güçlü, R. Apak // *Trends in Analytical Chemistry*. – 2011. – V. 30. – № 4 – P. 652–664.
101. Абдуллин, И.Ф. Применение электрогенерированного брома для оценки интегральной антиоксидантной способности лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе / И.Ф. Абдуллин, Е.Н. Турова, Г.Х. Гайсина, Г.К. Будников // *Журнал Аналитической Химии*. – 2002. – Т. 57. – № 6. – С. 666–670.

102. Ziyatdinova, G.K. The application of coulometry for total antioxidant capacity determination of human blood / G.K. Ziyatdinova, H.C. Budnikov, V.I. Pogorel'tzev, T.S. Ganeev // *Talanta*. – 2006. – V. 68. – № 3. – P. 800–805.

103. Ziyatdinova, G.K. Application of constant-current coulometry for estimation of plasma total antioxidant capacity and its relationship with transition metal contents / G.K. Ziyatdinova, A.V. Voloshin, A.Kh. Gilmutdinov, H.C. Budnikov, T.S. Ganeev // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2006. – V. 40. – № 4. – P. 958–963.

104. Яшин, А.Я. Инжекционно-проточная система с амперометрическим детектором для селективного определения антиоксидантов в пищевых продуктах и напитках / А.Я. Яшин // *Российский химический журнал*. – 2008. – Т. LI. – №2. – С. 130–135.

105. Бюриков, В.В. Особенности определения концентрации антиоксидантов амперометрическим методом / В.В. Бюриков // *Химия растительного сырья*. – 2013. – №3. – С.169–172.

106. Короткова, Е.И. Новый способ определения активности антиоксидантов / Е.И. Короткова // *Журнал физической химии*. – 2000. – Т. 74. – №9. – С. 1544–1546.

107. Korotkova, E.I. Study of antioxidant properties by voltammetry / E.I. Korotkova, Y.A. Karbainov, A.V. Shevchuk // *J. Electroanalyt. Chem.* – 2002. – V. 518. – №1. – P. 56–60.

108. Мисин, В.М. Измерение антиоксидантной активности экстрактов смесей чая электрохимическими методами / В.М. Мисин, Н.Н. Сажина, Е.И. Короткова // *Химия растительного сырья*. – 2011. – №2. – С. 137–143.

109. Сажина, Н.Н. Сравнительный анализ антиоксидантной активности соков Каланхоэ / Н.Н. Сажина, П.В. Лапшин, Н.В. Загоскина, Е.И. Короткова, В.М. Мисин // *Химия Растительного сырья*. – 2013. – №3. – С. 113–119.

110. Agui, M.L. Analytical Applications of Cylindrical Carbon Fiber Microelectrodes. Simultaneous Voltammetric Determination of Phenolic Antioxidants in Food / M.L. Agui, A.J. Reviejo, P. Yanez-Sedeno, J.M. Pingarron // *Anal. Chem.* – 1995. – V. 67 – № 13. – P. 2195–2200.

111. Liu, J. Antioxidant Redox Sensors Based on DNA Modified Carbon Screen-Printed Electrodes / J. Liu, B. Su, G. Lager, P. Tacchini, H. Girault // *Analytical Chemistry.* – 2006. – V. 78. – P. 6879–6884.

112. Zhang, L. Attachment of gold nanoparticles to glassy carbon electrode and its application for the voltammetric resolution of ascorbic acid and dopamine / Lei Zhang, Xiue Jiang // *Journal of Electroanalytical Chemistry.* – 2005. – V. 583. – № 2 – P. 292–299.

113. Shankar, S. Simultaneous Determination of Dopamine, Uric Acid and Ascorbic Acid with CTAB Modified Carbon Paste Electrode / Sharath shankar, Kumara Swamy, Umesh Chandra, J.G.Manjunatha and B.S. Sherigara // *Int. J. Electrochem. Sci.* – 2009 – V. 4. – № 4 – P. 592–601.

114. Keffous, F. Determination of the antioxidant activity of Limoniastrum feei aqueous extract by chemical and electrochemical methods / Fatah Keffous, Nasser Belboukhari, Khaled Sekkoum, Houria Djeradi, Abdelkrim Cheriti, Hassan Y. Aboul-Enein // *Cogent Chemistry.* – 2016. – V. 2. – № 1.

115. Evseev, A.K. Electrochemical determination of antioxidant activity of blood plasma using glassy carbon modified with cobalt hexacyanoferrate / A.K. Evseev, V.N. Andreev, E.S. Kondratueva, M.M. Goldin // *Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces.* – 2015. – V. 51. – № 2. – P. 310–312.

116. Зиятдинова, Г.К. Хроноамперометрическое определение синтетических фенольных антиоксидантов в мицеллярной среде BRIJ 35 / Г.К. Зиятдинова, К.С. Оськина, Э.Р. Зиганшина, Г.К. Будников // *Журнал Аналитической Химии.* – 2015. – Т. 70. – № 12. – С. 1310-1315.

117. Jahan, B.R. Voltammetric sensor for glutathione determination based on ferrocene-modified carbon paste / Jahan Bakhsh Raouf, Reza Ojani, Mansureh

Kolbadinezhad // *Journal of Solid State Electrochemistry*. – 2009. – V. 13. – № 9. – P. 1411–1416.

118. Murilo, S. An amperometric sensor for L-cysteine based on nanostructured platform modified with 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) / Santiago Murilo, Lima Phabyanno Rodrigues, Rodrigues Santos, Wilney de Jesus, Kubota Lauro T // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2010. – V. 146. – № 1 – P. 213–220.

119. Manjunatha, R. Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid using polystyrene sulfonate wrapped multiwalled carbon nanotubes bound to graphite electrode through layer-by-layer technique / R. Manjunatha, G.S. Suresh, J.S. Melo, S.F. D'Souza, T.V. Venkatesha // *Sensors & Actuators: B. Chemical*. – 2010. – V. 145. – № 2 – P. 643–650.

120. Brainina, Kh.Z. Potentiometry as a method of antioxidant investigation / Kh.Z. Brainina, A.V. Ivanova, E.N. Sharafutdinova, E.L. Lozovskaya, E. Shkarina // *Talanta*. – 2007 – V. 71. – № 1. – P. 13–18.

121. Шарафутдинова, Е.Н. Потенциометрия в исследовании антиоксидантной активности объектов растительного происхождения: диссертация кандидата химических наук: 02.00.02. — Екатеринбург, 2007. — 125 с.

122. Герасимова, Е.Л. Потенциометрия в исследовании антиоксидантной активности биологических объектов: диссертация кандидата химических наук: 02.00.02. — Екатеринбург, 2010. — 151 с.

123. Brainina, Kh.Z. New Electrochemical Method of Determining Blood and Blood Fractions Antioxidant Activity / Kh.Z. Brainina, L.V. Alyoshina, E.L. Gerasimova, Ya.E. Kazakov, A.V. Ivanova, Ya.B. Beykin, S.V. Belyaeva, T.I. Usatova, M.Ya. Khodos // *Electroanalysis*. – 2009. – V. 21. – №3-5. – P. 618–624.

124. Sudhanshu, S. Assessment of plasma and salivary antioxidant status in patients with recurrent aphthous stomatitis / S. Sudhanshu // *The South Brazilian Dentistry Journal*. – 2011. – V. 8. – P. 261–265.

125. Shetty, S.R Salivary ascorbic acid levels in betel quid chewers: A biochemical study / S.R. Shetty, S. Babu, S. Kumari, R. Prasad, S. Bhat, K.A. Fazil // South asian journal cancer. – 2013. – V. 2. – P.142–144.
126. Re, R. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay / R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans // Free Radical Biology & Medicine. – 1999. – V. 9-10. – P.1231–1237.
127. Fatemeh, A. Total antioxidant capacity of saliva and dental caries / A. Fatemeh, T.G. Mohammad, S.H. Seyedeh, K. Shahin, M. Abbas // Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal. – 2013. – V. 18. – P.553–556.
128. Zhang, T. Total Antioxidant Capacity and Total Oxidant Status in Saliva of Periodontitis Patients in Relation to Bacterial Load / T. Zhang, O. Andrukhov, H. Haririan, M. Müller-Kern, S. Liu, Z. Liu, X. Rausch-Fan // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2016. – V. 5. – P.97.
129. Kamodyová, N. Salivary markers of oxidative stress and antioxidant status: Influence of external Factors / N. Kamodyová, L. Tóthová, P. Celec // Disease Markers. – 2013. – V. 34. – P.313–321.
130. Sculley, D.V. Periodontal disease is associated with lower antioxidant capacity in whole saliva and evidence of increased protein oxidation / D.V. Sculley, S.C. Langley-Evans // Clinical Science. – 2003. – V. 105. – P.167–172.
131. Hegde, M.N. Evaluation of total antioxidant capacity of saliva and serum in caries-free and caries-active adults: an in-vivo study [Text] / M.N. Hegde, J. Indian // Dent Res. – 2013. – V. 24. – № 2 – P. 164–167.
132. Colagar, A.H Correlation of Sperm Parameters With Semen Lipid Peroxidation and Total Antioxidants Levels in Astheno- and Oligoasheno-Teratospermic Men / A.H Colagar, K. Fatemeh, S. Jorsaraei // Iran Red Crescent Med J. – 2013. – V.15. – № 9. – P. 780 –785.
133. Salimi, S. Association of Seminal Plasma Total Antioxidant Capacity and Malondialdehyde Levels With Sperm Parameters in Infertile Men With Varicocele / S. Salimi, Faramarz F., Paria K., Sima N. // Avicenna J Med Biochem. – 2016. –V. 4. – № 1. – P. 1–6.

134. Yiğitbaşı, T. The Evaluation of Total Antioxidant and Oxidant Response in Seminal Plasma in Fertile and Infertile Men Using a Novel Automated Method / T. Yiğitbaşı, Y. Baskin, H. Çelik, F. Karaarslan, C. Taheri, G. Afacan, D. Aslan, Ö. Erel // *J Med Sci.* – 2011. – V. 31. – № 1.
135. Gajendra, T. Relationship of antioxidant system and reactive oxygen species with clinical semen parameters in infertile men / T. Gajendra, J. Tulika, V. Alex, S. Suresh, R. K. Moolraj // *J Family Med Prim Care.* – 2017. – V. 6. – №3. – P. 574–577.
136. Agarwal, A. Oxidation-reduction potential of semen: what is its role in the treatment of male infertility / A. Agarwal, S. Roychoudhury, K.B. Bjugstad, C. Cho // *Ther Adv Urol.* – 2016. – V. 8. – №5. – P. 302–318.
137. Agarwal, A. Prevention of oxidative stress injury to sperm / A. Agarwal, S.A. Prabakaran // *Journal of Andrology.* – 2005. – V. 26. – №6.
138. World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*, 5th ed., Department of Reproductive Health and Research, 2010.
139. Esfandiari, N. Utility of the nitroblue tetrazolium reduction test for assessment of reactive oxygen species production by seminal leukocytes and spermatozoa / N. Esfandiari, R.K. Sharma, R.A. Saleh, A.J. Thomas, A. Agarwal // *J Androl.* – 2003 – V. 24. – № 6 – P. 862–870.
140. Guthrie, H.D. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry / H.D. Guthrie, G.R. Welch // *J Anim Sci.* – 2006 – V. 84. – № 8 – P. 2089–2100.
141. Valgimigli, L. Measurement of Oxidative Stress by EPR Radical-Probe Technique / G.F. Pedulli, M. Paolini, // *Free Radic. Biol. Med.* – 2001. – V. 31. – P. 708.
142. Dobrakowski, M. Oxidative stress and motility impairment in the semen of fertile males / M. Dobrakowski, S. Kasperczyk, S. Horak, D. Chyra-Jach, E. Birkner, A. Kasperczyk // *Andrologia.* – 2017. – V. 49. – №10.

143. Rajasekaran, M. Oxidative stress and interleukins in seminal plasma during leukocytospermia / M. Rajasekaran, W.J. Hellstrom, R.K. Naz, C.S. Sikka // *Fertil. Steril.* – 1995. – V. 64. – P. 166.

144. Buch, J.P. Cytokines stimulate lipid membrane peroxidation of human sperm / J.P. Buch, T.F. Kolon, N. Maulik, D.L. Kreutzer, D.K. Daz, // *Fertil. Steril.* – 1994. – V. 62. – P. 186.

145. Aitken, R.J. Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease / R.J. Aitken, M.A. Baker, D. Sawyer // *Reprod. Biomed. Online* – 2003. – V. 7. – P. 65.

146. Aitken, R.J. Oxidative stress and male reproductive biology / R.J. Aitken, M.A. Baker // *Reprod. Fertil. Dev.* – 2004. – V. 16. – P. 581.

147. Micheli, L. Evaluation of enzymatic and non-enzymatic antioxidants in seminal plasma of men with genitourinary infections, varicocele and idiopathic infertility / L. Micheli, D. Cerretani, G. Collodel, A. Menchiari, L. Moltoni, A. I. Fiaschi, E. Moretti // *Andrologia.* – 2016. – V. 4. – №3. – P. 456–464.

148. Kmenta, I. Effects of a lecithin and catalase containing semen extender and a second dilution with different enhancing buffers on the quality of cold-stored canine spermatozoa / I. Kmenta, C. Strohmayer, F. Muller-Schlosser, S. Schafer-Somi // *Theriogenology.* – 2011. – V. 75. – P. 1095.

149. Thiele, J.J. Ascorbic acid and urate in human seminal plasma: determination and interrelationships with chemiluminescence in washed semen / J.J.Thiele, H.J. Friesleben, J. Fuchs, F.R. Ochsendorf // *Hum. Reprod.* – 1995. – V. 10. – P. 110.

150. Said, T.M. Enhanced Chemiluminescence Assay vs Colorimetric Assay for Measurement of the Total Antioxidant Capacity of Human Seminal Plasma / T.M. Said, N. Kattal, R.K. Sharma, S.C. Sikka, A.J. Thomas, E. Mascha, A. Agarwal // *Journal of Andrology.* – 2003. – V. 24. – № 5 – P. 676 – 680.

151. Fingerovaa, H. Antioxidant capacity of seminal plasma measured by TAS Randox® / H. Fingerovaa, J. Novotnyb, J. Barborikc, J. Brezinovaa, M.

Svobodovaa, M. Krskovad, I. Obornaa // *Biomedical papers.* – 2007. – V. 151. – № 1 – P. 37–40.

152. Sharma, R.K. The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility / R.K. Sharma, F.F. Pasqualotto, D.R. Nelson, A.J. Thomas, A. Agarwal // *Hum. Reprod.* – 1999. – V. 14. – P. 2801.

153. Miller, N.J Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS.+ radical cation assay / N.J. Miller, C.A. Rice-Evans // *Free Radic. Res.* – 1997. – V. 26. – P. 195.

154. Vile, G. F. Heme oxygenase 1 mediates an adaptive response to oxidative stress in human skin fibroblasts / G. F. Vile, S. Basu-Modak, C. Waltner, R. M. Tyrrell // *Proc Natl Acad Sci.* – 1994. – V. 91. – № 7. – P 2607–2610.

155. Del Hoyo, P. Oxidative stress in skin fibroblasts cultures from patients with Parkinson's disease / P. del Hoyo, A. García-Redondo, F. de Bustos, J. A. Molina, Y. Sayed, H. Alonso-Navarro, L. Caballero, J. Arenas, J. A. Agúndez, F. J. Jiménez-Jiménez // *BMC Neurol.* – 2010. - № 10.

156. Orciani, M. Oxidative stress defense in human-skin-derived mesenchymal stem cells versus human keratinocytes: Different mechanisms of protection and cell selection / M. Orciani, S. Gorbi, M. Benedetti, G. Di Benedetto, M. Mattioli-Belmonte, F. Regoli, R. Di Primio // *Free Radic Biol Med.* – 2010. – V. 49. – №5 – P 830–838.

157. McArdle, F. Effects of oral vitamin E and beta-carotene supplementation on ultraviolet radiation-induced oxidative stress in human skin / F. McArdle, L.E. Rhodes, R.A. Parslew, G.L. Close, C.I. Jack, P.S. Friedmann, M.J. Jackson // *Am J Clin Nutr.* – 2004. – V. 80. – №5 – P 1270–1275.

158. Meinke, M.C. Bioavailability of natural carotenoids in human skin compared to blood / M.C. Meinke, M.E. Darvin, H. Vollert, J. Lademann // *Eur J Pharm Biopharm.* – 2010. – V. 76. – №2 – P 269–274.

159. Ermakov, I. V. Resonance Raman detection of carotenoid antioxidants in living human tissues / I. V. Ermakov, M. Sharifzadeh, M. Ermakova, W. Gellermann // *J Biomed Opt.* – 2005. – V. 10. – №6.
160. Maxim, E. D. The Role of Carotenoids in Human Skin / M. E. Darvin, W. Sterry, J. Lademann, T. Vergou // *Molecules.* – 2011. – № 16 – P. 10491–10506.
161. Haag, S. F. Determination of the antioxidative capacity of the skin in vivo using resonance Raman and electron paramagnetic resonance spectroscopy / F. S. Haag, B. Taskoparan et al. // *Experimental Dermatology.* – 2011. – V. 20. – P. 483–487.
162. Ermakov, I. V. Noninvasive selective detection of lycopene and β -carotene in human skin using Raman spectroscopy / I. V. Ermakov, M. R. Ermakova, W. Gellermann, J. Lademann // *J. Biomed. Opt.* – 2004. – V. 9. – № 2 – P 332–338.
163. Zidichouski, J. A. Clinical validation of a noninvasive, raman spectroscopic method to assess carotenoid nutritional status in humans / J. A. Zidichouski, A. Mastaloudis, S. J. Poole, J. C. Reading, C. R. Smidt // *J Am Coll Nutr.* – 2009. – V. 28. – №6 – P 687–693.
164. Mayne, S.T. Non-invasive raman spectroscopic detection of carotenoids in human skin / S.T. Mayne, B. Cartmel, S. Scarmo, H. Lin, D.J. Leffell, E. Welch, I. Ermakov, P. Bhosale, P. S. Bernstein, W. Gellermann // *Am J Clin Nutr.* – 2010. – V. 92. – №4 – P 794–800.
165. Ziosi, P. A non-invasive method for the in vivo determination of skin antioxidant capacity (IAC-S) / P. Ziosi, E. Besco, S. Vertuani, N. Solaroli, S. Manfredini // *Skin Res Technol.* – 2006. – V. 12. – №4 – P 303–308.
166. Arbault, S. Electrochemical device and method for measuring the redox state of the skin / S. Arbault, C. Cecile, Ch. Amatore, N. Lachmann-Weber, C. Heusele, I. Renimel // *WO Patent.* – 2007. – 077360 A1.

167. Kohen, R. Non-invasive device and method for quantitative determination of oxidants and/or antioxidants in the skin / R. Kohen, D. Fanberstein, O. Tirosh // Patent 6108570A – 1995.

168. Ivanova, A.V. Potentiometric Study of Antioxidant Activity: Development and Prospects / A.V. Ivanova, E. L. Gerasimova, Kh. Z. Brainina // *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. – 2015. – V. 45. – Issue 4. – P. 311–322.

169. Gizelli, A. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data / A. Gizelli, M. Serafini, F. Natella, C. Scaccini // *Free Radical Biology & Medicine*. – 2000. – V 29. – P. 1106–1114.

170. Ferreira, R. Electrochemical Determination of the Antioxidant Capacity: The Ceric Reducing/Antioxidant Capacity (CRAC) Assay / R. Ferreira, L. Avaca // *Electroanalysis*. – 2008. – V. 20. – № 12 – P. 1323–1329.

171. Müller, L. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay / L. Müller, K. Fröhlich, V Böhm // *Food Chemistry*. – 2011. – V. 129. - Issue 1. – P. 139-148

172. Cortina-Puig, M. Determination of the antioxidants' ability to scavenge free radicals using biosensors / M. Cortina-Puig, B. Prieto-Simón, M. Campàs, C. Calas-Blanchard, J.-L. Marty // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2010. – V. 698. – P. 222–233.

173. Клебанов, Г.И. Антиоксидантная активность сыворотки крови / Г.И. Клебанов, Ю.О. Теселкин, И.В. Бабенкова и др. // *Вест. РАМН*. – 1999. – № 2. – С. 15–22.

174. Zinellu, A. Pre-analytical factors affecting ascorbic and uric acid quantification in human plasma / A. Zinellu, S. Sotgia, L. Deiana, C. Carru // *J. Biochem. Biophys. Methods*. – 2006. – V. 67. – № 2–3. – P. 95–105.

175. Mahmoud, R. Evaluation of Total Antioxidant Capacity of Saliva in High School Students / R. Mahmoud, G. Vahideh, R. Fatemeh., V. Asad., Glob J Health Sci. – 2016. –V. 8. – P. 89–94.

176. Potts, R.J. Antioxidant capacity of the epididymis / R.J. Potts, T.M. Jefferies, L.J. Notarianni // Hum Reprod – 1999. –V. 10. – P. 2513–2516.

177. Brainina, Kh.Z. Potentiometric method for evaluating the oxidant/antioxidant activity of seminal and follicular fluids and clinical significance of this parameter for human reproductive function / Kh.Z. Brainina, D.P. Varzakova, E.L. Gerasimova, S.L. Balezin, I.G. Portnov, V.A. Makutina, E.V. Tyrchaninova // The Open Chemical and Biomedical Methods Journal. – 2012. – № 5. – P. 1–7.

178. Brainina, Kh.Z. Noninvasive Potentiometric Method of Determination of Skin Oxidant/antioxidant Activity / K.Z. Brainina, L.G. Galperin, E.L. Gerasimova, M.Ya. Khodos // Sensors Journal. – 2012. – № 3. – P. 527–532.