

УДК 577.152.1.001.57 + 541.515:57.042.2

©Коллектив авторов

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩЕЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Ю.А. Григоренко^{1*}, Д.И. Метелица¹, Н.В. Пивень², Л.Н. Лухверчик², О.И. Шадыро¹

¹НИИ физико-химических проблем Белорусского государственного университета, 220050, Минск, ул. Ленинградская, 14; факс: 375-172-09-5464;

эл. почта: grigorenko_yulia@tut.by

²Институт биоорганической химии НАН Беларуси, 220141, Минск, ул. акад. Купревича, 5/2; факс: 375-172-63-7274; эл. почта: piven@iboch.bas-net.by

Разработана и испытана в лабораторных условиях высокоэффективная тест-система для количественной характеристики общей антиоксидантной активности (ОАА) сыворотки крови человека (СКЧ), включающая метгемальбумин (MetHa) в качестве биокатализатора, H₂O₂ – окислитель, *o*-фенилендиамин (ФДА) – акцептор активных радикалов и 2,2,5,7,8-пентаметилхроман-6-ол (РМС) в качестве ингибитора-калибратора. Тест-система оптимизирована по концентрациям всех компонентов, условиям проведения реакций и мониторинга расходования ФДА при 37°C в среде забуференного физиологического раствора, pH 7,4, содержащего 5% ДМФ и 0,5% ДМСО. В строго стандартных условиях по сопоставлению ингибирующего действия СКЧ и калибратора РМС при 37°C определены количественные показатели ОАА СКЧ, выраженные в мкг РМС, эквивалентных 1 мг СКЧ или в виде обратной величины – в мг СКЧ, эквивалентных действию 1 мкг РМС. Изучены показатели ОАА СКЧ в группе здоровых лиц и в группах больных с патологией щитовидной железы. Выявленные нарушения показателей ОАА при патологии щитовидной железы обосновывают целесообразность проведения антиоксидантной терапии.

Ключевые слова: антиоксидантная активность, тест-система, сыворотка крови, количественные параметры активности.

ВВЕДЕНИЕ. Количественная характеристика общей антиоксидантной активности (ОАА) биологических жидкостей человека и животных и общего антиоксидантного статуса природных биопрепаратов, продуктов питания, соков, вин и напитков до сих пор остается важной проблемой современной биомедицинской химии и биотехнологии, так как антиоксидантный статус биологических жидкостей человека и других объектов определяет их общую сопротивляемость токсическому воздействию активных свободных радикалов [1-6].

Принятые сокращения: АВТС - диаммонийная соль 2,2'-азино-бис(3-этил-2,3-дигидробензтиазолин-6-сульфоновой кислоты), АДТБФ - 2-амино-4,6-ди-трет.бутилфенол, АТБФ - 2-амино-4-трет.бутилфенол, ЗФР - забуференный физиологический раствор (0,01 М фосфатный буфер, pH 7,4, содержащий 0,15 М NaCl), MetHa - метгемальбумин (комплекс гемина с БСА), ОАА - общая антиоксидантная активность, РМС - (2,2,5,7,8-пентаметилхроман-6-ол), СКЧ - сыворотка крови человека, ФДА - *орто*-фенилендиамин, InH - ингибиторы свободно-радикальных процессов.

* - адресат для переписки

Количественная характеристика ОАА биологических жидкостей методом измерения антирадикальной активности всех возможных компонентов антиоксидантного комплекса (ферменты – супероксиддисмутаза, каталаза, глутатион-пероксидаза, витамины А, Е, С и другие низкомолекулярные антиоксиданты) слишком трудоемка, дорогостояща и поэтому малопригодна для массового лабораторного скрининга ОАА. Практика показала, что наиболее перспективны методы интегральной оценки ОАА биологических жидкостей, предложенные фирмой “Randox” (Великобритания) на основе тест-системы “метмиоглобин- H_2O_2 -ABTS-Тролокс” [1], в которой при катализированном метмиоглобином разложении H_2O_2 генерируются активные радикалы, окисляющие хромогенный субстрат ABTS, а аналог токоферола Тролокс ингибирует процесс окисления. СКЧ и другие биологические жидкости также в разной степени замедляют окисление ABTS, что дает возможность выразить их ОАА в виде эквивалентной концентрации ингибитора-калибратора Тролокса [1, 4, 5].

Более 10 лет нами проводятся систематические кинетические исследования инициирования и ингибирования свободнорадикальных процессов в биохимических пероксидных системах, где в качестве биокатализаторов использованы пероксидаза и так называемые “псевдопероксидазы” – метмиоглобин, метгемоглобин и метгемальбумины (MetHa) [4-7]. В работах [4-6] и обзоре [7] проанализированы и сформулированы требования, которым должны удовлетворять компоненты потенциальных тест-систем для определения ОАА биологических жидкостей – биокатализатор, акцептор активных радикалов и ингибитор- “калибратор”. Технологичной может быть только та система, компоненты которой хорошо совмещаются друг с другом, устойчивы во времени и обеспечивают воспроизводимые характеристики окислительного процесса: достаточную начальную скорость окисления акцептора v_0 , прямую связь её уменьшения с ростом концентрации ингибитора, простоту мониторинга расходования акцептора-хромогена, как правило, спектрофотометрического. Практика показала, что для успешного определения ОАА сыворотки крови человека (СКЧ) необходимы ингибиторы-калибраторы умеренной эффективности, константы ингибирования которых K_i должны быть близки к их значениям для Тролокса и находиться в пределах 10^{-5} - 10^{-4} М [4-7].

По совокупности кинетических параметров и полезных свойств среди многочисленных замещённых фенолов, многоатомных фенолов и их полидисульфидов в качестве ингибиторов-калибраторов в системе MetHa- H_2O_2 -*o*-фенилендиамин (ФДА) выбраны (2,3-дигидрокси-4,6-ди-трет.бутилфенил)-S-тиосульфат натрия (InH1) [5], 2-амино-4,6-ди-трет.бутилфенол (АДТБФ), 2-амино-4-трет.бутилфенол (АТБФ) и 2,2,5,7,8-пентаметилхроман-6-ол (РМС) [6-8].

Цель данной работы - оптимизация тест-системы для ОАА сыворотки крови человека MetHa- H_2O_2 -ФДА-InH, в которой *o*-фенилендиамин – акцептор активных радикалов, а РМС, АДТБФ и АТБФ – ингибиторы-калибраторы, а также использование тест-системы MetHa- H_2O_2 -ФДА-РМС для определения в лабораторных условиях ОАА сыворотки крови здоровых лиц и пациентов с различными патологиями (заболевание щитовидной железы).

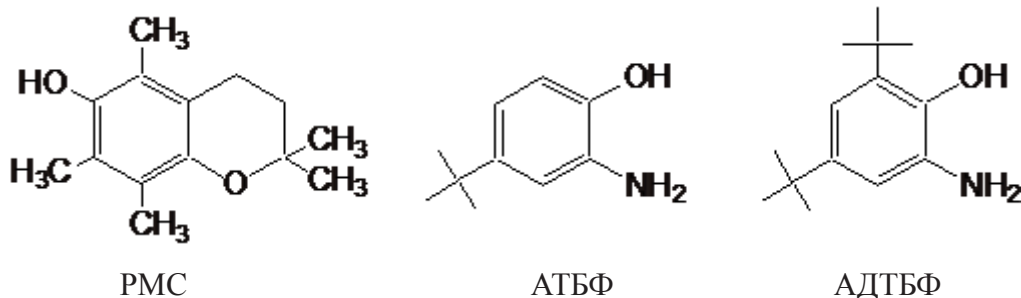
МЕТОДИКА.

Реагенты. Использовали гемин фирмы “Serva” (Германия), раствор которого готовили в ДМСО. Для получения метгемальбумина по методике, описанной в работе [5], применяли бычий сывороточный альбумин (БСА) (“Sigma”, США) без дополнительной очистки, используя для его спектрофотометрического определения молярный коэффициент поглощения ϵ (280 нм) $35000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$.

В качестве субстрата “псевдопероксидазной” системы применяли ФДА квалификации ч.д.а. производства Харьковского химико-фармацевтического завода (Украина) после очистки возгонкой в вакууме или ФДА фирмы “Fluka” (Швейцария) без дополнительной очистки. В качестве окислителя использовали

разбавленный пергидроль, определяя концентрацию H_2O_2 спектрофотометрически (ϵ (230 нм) = $72,4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$). Для приготовления буферных растворов применяли соли и основания производства “Реахим” (Россия). Органические соразтворители ДМФ и ДМСО перед употреблением перегоняли.

Ингибиторы-калибраторы. Использовали РМС фирмы “Aldrich” (Великобритания) без дополнительной очистки и аминофенолы АТБФ и АДТБФ, синтезированные по описанным ранее методикам [9, 10]. Ниже представлены структурные формулы использованных ингибиторов:



Окисление ФДА в системе MetHa (комплекс гемин-БСА (1:3)) - H_2O_2 проводили при 20°C на спектрофотометре “Specol-211” (“Carl Zeiss”, Германия) с термостатируемым кюветным отделением в среде ЗФР, pH 7,4, содержащей 5,25% ДМФ при использовании ингибитора РМС или 5,0% этанола и 0,25% ДМФ при использовании ингибиторов АТБФ и АДТБФ. Как правило, конечные концентрации реагентов составляли: 10 мкМ гемина, 30 мкМ БСА, 6 мМ H_2O_2 , 0,8 мМ ФДА и разные концентрации ингибиторов.

Во всех случаях реакции начинали добавлением к смесям H_2O_2 и следили за окислением ФДА по образованию продукта реакции с максимумом поглощения на 455 нм, используя при расчетах начальной скорости реакции молярный коэффициент поглощения продукта ϵ (455 нм) $16200 \text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$, определенный нами ранее при pH 7,4. При определении начальных скоростей реакции использовали только начальные строго линейные участки кинетических кривых роста оптической плотности продукта окисления ФДА.

Эффективность ингибиторов характеризовали величинами констант ингибирования K_i , M , которые определяли по методу Диксона [11] или в случае его неприменимости – по методу Корниш-Боуден [12] в координатах $[\text{ФДА}]_0/\nu_0 - [\text{InH}]$, где ν_0 – начальная скорость окисления ФДА, а $[\text{InH}]$ – начальная концентрация ингибитора.

Определение ОАА сыворотки крови человека с использованием тест-системы MetHa- H_2O_2 -ФДА-РМС.

Приготовление рабочих растворов реагентов.

1. Исходный раствор гемина (4 мМ) готовили, растворяя 0,2607 г гемина в 100 мл ДМСО, а исходный раствор БСА (0,222 мМ) – растворением 1,4874 г БСА в 100 мл ЗФР, pH 7,4. Для приготовления раствора биокатализатора MetHa смешивали 110 мкл раствора гемина и 100 мкл раствора БСА и выдерживали смесь 10 мин, что достаточно для достижения равновесия и полного образования комплекса гемин-БСА (MetHa). Исходные растворы MetHa могут сохраняться в замороженном состоянии в течение 1 месяца без потери функциональной активности биокатализатора.

2. Рабочий раствор пероксида водорода (120 мМ) готовили непосредственно перед употреблением, разбавляя пергидроль в ЗФР, pH 7,4 и хранили при -18°C . В реакции использовали по 50 мкл исходного раствора H_2O_2 , что соответствовало конечной концентрации окислителя 6 мМ.

3. Рабочий раствор ФДА (20 мМ) готовили непосредственно перед употреблением, внося 0,0216 мг ФДА в 10 мл 3ФР, pH 7,4. Для измерений использовали по 50 мкл рабочего раствора ФДА, что соответствовало его конечной концентрации в пробах 1 мМ.

4. Раствор РМС (2 мМ) готовили ежедневно, внося 0,1102 г РМС в 250 мл ДМФ. 2 мМ раствор РМС разбавляли ДМФ до концентрации 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 1,2 и 1,6 мМ. Рабочий раствор РМС (2 мМ) стабилен и может сохраняться при +4°C в течение 2 мес.

5. Для приготовления рабочего раствора СКЧ 100 мкл размороженной сыворотки разводили в 900 мкл 3ФР, pH 7,4. При измерениях использовали по 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 и 100 мкл разбавленной СКЧ на 1 мл общего объема реакционной смеси. Общее содержание белка в СКЧ в мг/мл определяли биуретовым методом [13].

Определение ОАА сыворотки крови человека. Для построения калибровочной зависимости в координатах Диксона [11] $1/v_0$ - [РМС] в 9 анализируемых пробах, содержащих 50 мкл биокатализатора MetHa в 3ФР, pH 7,4, 5% ДМФ и 0,5% ДМСО, добавляли одновременно 50 мкл раствора ФДА до конечной концентрации 1 мМ и в 8 проб – растворы РМС с разной концентрацией – 44,09; 88,12; 132,18; 176,24; 220,3; 264,36; 352,48; 440,6 мкг/мл. Первая проба РМС не содержала. Во все пробы вносили раствор H_2O_2 до конечной концентрации 6 мМ и следили за реакцией при 37°C в термостатируемой кювете фотометра КФК-3 (Россия) по росту оптической плотности A_{455} в течение 1 мин, фиксируя её на цифровом индикаторе через каждые 5 сек.

Для построения зависимостей в координатах Диксона [11] $1/v_0$ - [СКЧ] в мг/мл в 11 анализируемых проб, содержащих 50 мкл биокатализатора в 3ФР, pH 7,4, 5% ДМФ и 0,5% ДМСО, добавляли одновременно 50 мкл раствора ФДА до конечной концентрации 1 мМ и в 10 проб – аликвоты объемом 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 и 100 мкл сыворотки, разведенной в 10 раз в 3ФР, pH 7,4. Первая проба СКЧ не содержала. Во все пробы вносили раствор H_2O_2 до конечной концентрации 6 мМ и следили за реакцией при 37°C, как описано выше. Для каждой из проб вычисляли начальную скорость окисления ФДА v_0 , а затем строили зависимость $1/v_0$ - [СКЧ], мг/мл.

Для количественного выражения ОАА СКЧ на одном графике сопоставляли две зависимости $1/v_0$ - [РМС], мкг/мл и $1/v_0$ - [СКЧ], мг/мл и определяли **величину ОАА в виде концентрации СКЧ в мг/мл, соответствующей действию 1 эквивалента РМС в мкг/мл**. Вычисляли также обратную величину в виде концентрации РМС в мкг/мл, соответствующей ингибирующему действию 1 мг/мл СКЧ. Максимальная ошибка в определении количественных показателей ОАА СКЧ не превышала 7%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Ингибированное окисление ФДА в “псевдопероксидазной” системе. На рисунке 1а в терминах оптической плотности продукта окисления ФДА (A_{455}) представлены кинетические зависимости его роста в отсутствие ингибитора (1) и в присутствии РМС в концентрациях 0,03-0,5 мМ (2-9). Как видно, кинетические зависимости его роста характеризуются отсутствием лаг-периодов при всех концентрациях РМС, который сильно снижал скорость окисления ФДА. На рисунке 1б показаны зависимости в координатах Корниш-Боуден [12] при разных концентрациях ФДА, которые во всех случаях линейны и пересекаются в одной точке в левом квадранте, что характерно для **ингибирования смешанного типа**. По данным рисунка 1б определена константа ингибирования K_i , равная при 20°C $(0,88 \pm 0,11) \cdot 10^{-4}$ М, что свидетельствует о высокой ингибирующей эффективности РМС в окислении ФДА в “псевдопероксидазной” системе.

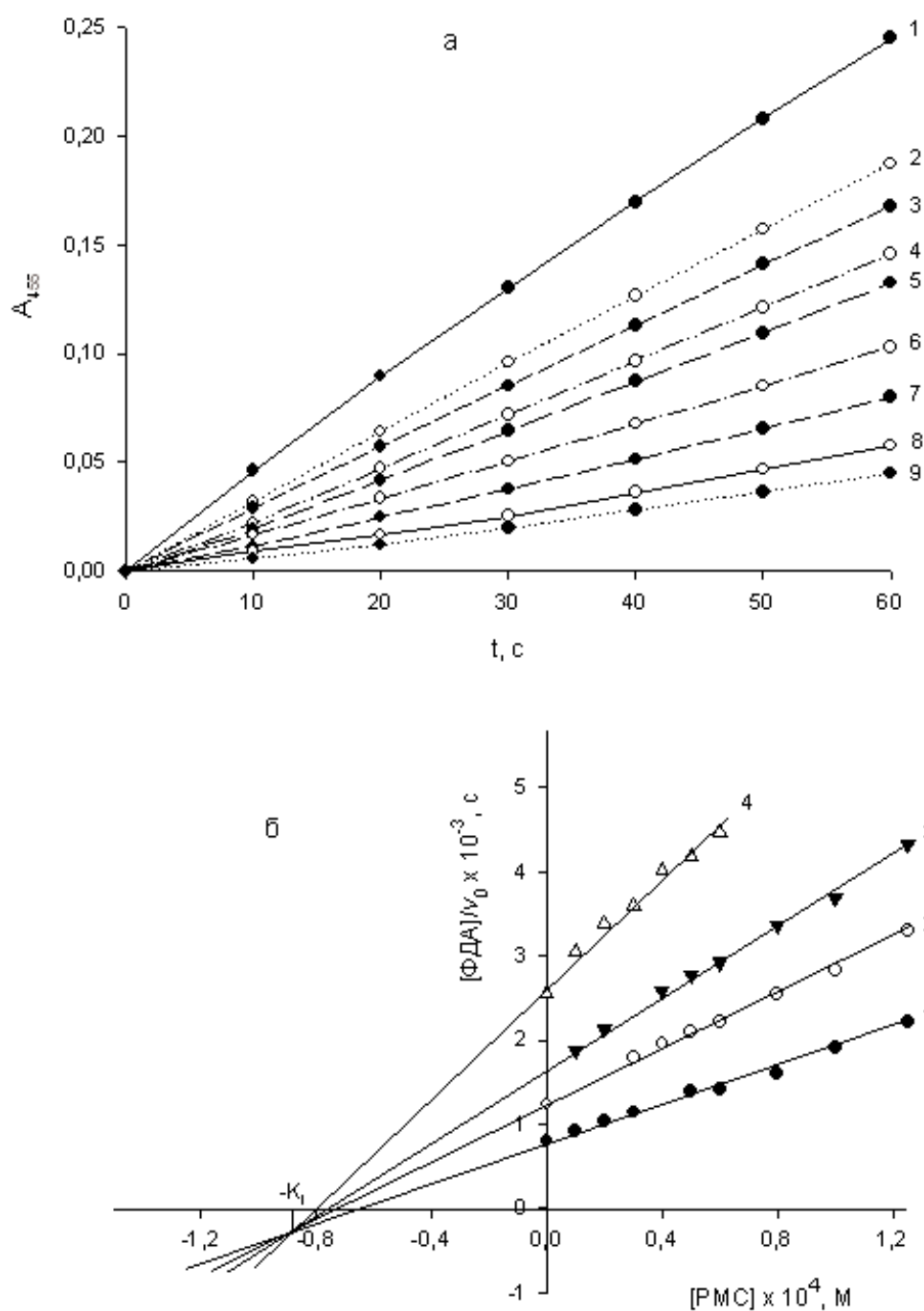


Рисунок 1.

а – Кинетика роста оптической плотности продукта окисления ФДА (0,8 мМ) в “псевдопероксидазной” системе при 20°C в отсутствие РМС (1) и в присутствии 0,03 (2), 0,05 (3), 0,08 (4), 0,1 (5), 0,2 (6), 0,3 (7), 0,4 (8) и 0,5 (9) мМ РМС в стандартных условиях (методическая часть).
б – Зависимость величины $[FAD]/v_0$ от концентрации РМС при растущих начальных концентрациях ФДА: 1 – 0,2, 2 – 0,35, 3 – 0,5 и 4 – 0,75 мМ.

На рисунке 2а представлены кинетические зависимости роста продукта окисления ФДА в отсутствие ингибитора (1) и в присутствии АДТБФ в концентрациях от 1 до 50 мкМ (2-8). Как видно, АДТБФ сильно снижал скорость окисления ФДА с ростом концентрации этого аминифенола. Зависимости начальной скорости

ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ КРОВИ

окисления ФДА от его начальной концентрации в координатах Лайнуивера-Берка [11] при возрастающих концентрациях АДТБФ подтверждают **смешанный тип ингибирования** (данные не представлены). На рисунке 2б показаны зависимости в координатах Корниш-Боуден [12] $[\text{ФДА}]_0/\nu_0 - [\text{АДТБФ}]$, которые во всех случаях пересекаются в одной точке в левом квадранте. По данным рисунка 2б определена константа ингибирования K_i , равная при 20°C $(0,67 \pm 0,11) \cdot 10^{-4}$ М.

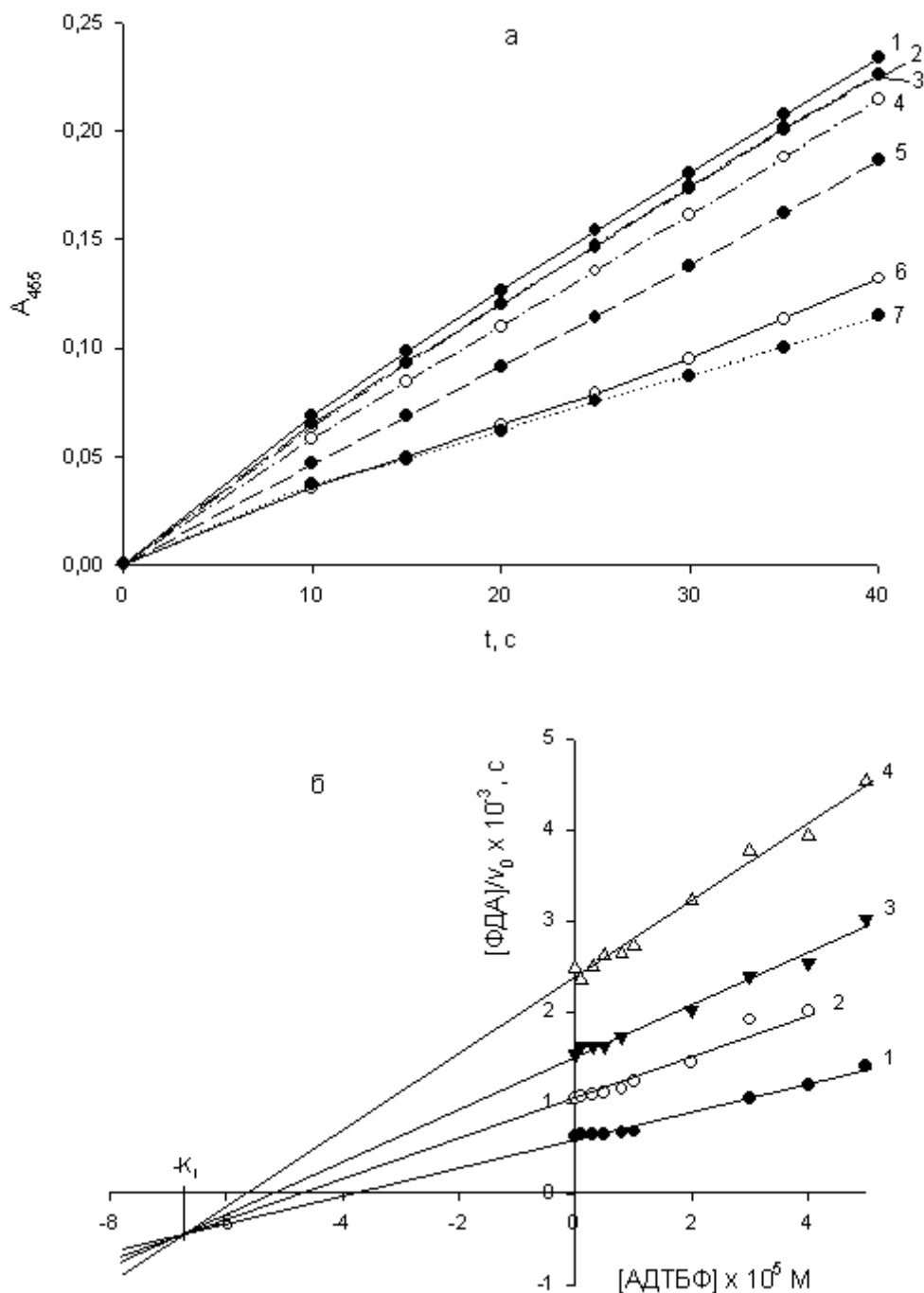


Рисунок 2.

а - Кинетика роста оптической плотности продукта окисления ФДА (0,8 мМ) в отсутствие АДТБФ (1) и в присутствии 0,003 (2), 0,005 (3), 0,008 (4), 0,01 (5), 0,03 (6) и 0,05 (7) мМ АДТБФ при 20°C в стандартных условиях (методическая часть).

б - Зависимость величины $[\text{ФДА}]/\nu_0$ от концентрации АДТБФ при разных начальных концентрациях ФДА: 1 – 0,2, 2 – 0,35, 3 – 0,5 и 4 – 0,8 мМ.

Ингибирующее действие АТБФ на окисление ФДА в “псевдопероксидазной” системе изучено нами ранее [6]: при 20°C определена величина K_i , равная $(1,26 \pm 0,11) \cdot 10^{-4}$ М. Все три ингибитора обнаружили **смешанный тип** ингибирующего действия, что свидетельствует об их частичной конкуренции с ФДА за связывание с MetHa в области активного центра и безусловной конкуренции субстрата и ингибиторов за активные радикалы, главным из которых является HO^\bullet [7]. Из сравнения K_i следует, что по эффективности ингибирующего действия в порядке его уменьшения ингибиторы располагаются в ряд: АДТБФ > РМС > АТБФ.

Оптимизация тест-системы ОАА СКЧ MetHa-H₂O₂-ФДА-InH была проведена по всем параметрам – условиям реакции (среда, температура), концентрациям реагентов (MetHa, H₂O₂, ФДА), составу биокатализатора и выбору ингибитора-калибратора.

Варьирование соотношений гемин/БСА показало, что максимальные скорости инициирования радикалов обеспечивает комплекс гемин-БСА (2:1): поэтому использовали конечные концентрации гемина 20 мкМ и БСА – 10 мкМ. Изучение влияния температуры на процесс окисления в интервале 20-37°C определило выбор температуры – 37°C. Реакцию проводили в среде ЗФР, pH 7,4, содержащей 5% ДМФ и 0,5% ДМСО, что обеспечивало полную гомогенность среды и растворимость всех компонентов системы.

Изучение кинетики ингибированного окисления ФДА в системе MetHa-H₂O₂ позволило выбрать оптимальные концентрации ФДА – 1 мМ и избыток окислителя H₂O₂ – 6 мМ. В качестве ингибитора-калибратора был выбран РМС ($K_i = 0,88 \cdot 10^{-4}$ М), отличающийся от АДТБФ ($K_i = 0,67 \cdot 10^{-4}$ М) большей устойчивостью при хранении растворов.

Общая антиоксидантная активность СКЧ, определённая с использованием тест-системы MetHa-H₂O₂-ФДА-РМС при 37°C.

На рисунках 3а, б и 4 представлены в сравнении зависимости в координатах Диксона $1/\nu_0$ - [РМС], мкг/мл и $1/\nu_0$ - [СКЧ], мг/мл для разных сывороток, из которых определяли количественные показатели ОАА в мг СКЧ/мкг РМС и в мкг РМС/мг СКЧ. Из рисунков 3 а, б и 4 следует, что калибровочные зависимости для РМС всегда строго линейны во всем диапазоне концентраций этого ингибитора-калибратора, в то время как зависимости для всех СКЧ характеризуются наличием излома с ростом концентрации сывороток, приходящегося на 0,5 мг/мл. При определении ОАА СКЧ использовали прямолинейные зависимости $1/\nu_0$ - [СКЧ] только до точек их излома, что связано с влиянием высоких концентраций СКЧ на каталитическую активность MetHa и объясняет резкое снижение скорости окисления ФДА с ростом концентрации белков СКЧ в среде.

В нижеприведенной таблице и рисунке 5 представлены сведения о показателях величин ОАА СКЧ в группе здоровых лиц и в группах пациентов с различной патологией щитовидной железы (ЩЖ). Как видно, показатели ОАА различаются для разных групп, отражая состояние антиоксидантной активности крови каждого индивидуума. Наиболее “благополучными” являются здоровые лица, у которых показатель ОАА меняется в интервале 23,81 – 3,85 мкг РМС/мг СКЧ и составляет в среднем $10,48 \pm 0,97$. У лиц с доклиническими нарушениями функции ЩЖ, отнесенных в различные группы риска (субклинический гипо- и гипертиреоз, угроза развития аутоиммунного тиреоидита и узлообразования) обнаружено снижение уровня ОАА. При клинически выраженном гипотиреозе происходит еще большее снижение ОАА.

Полученные результаты указывают на наличие тенденции к понижению ОАА у лиц с доклиническими и клинически выраженными формами тиреоидной патологии, что диктует необходимость детального изучения антиоксидантного статуса и обоснования целесообразности проведения антиоксидантной терапии.

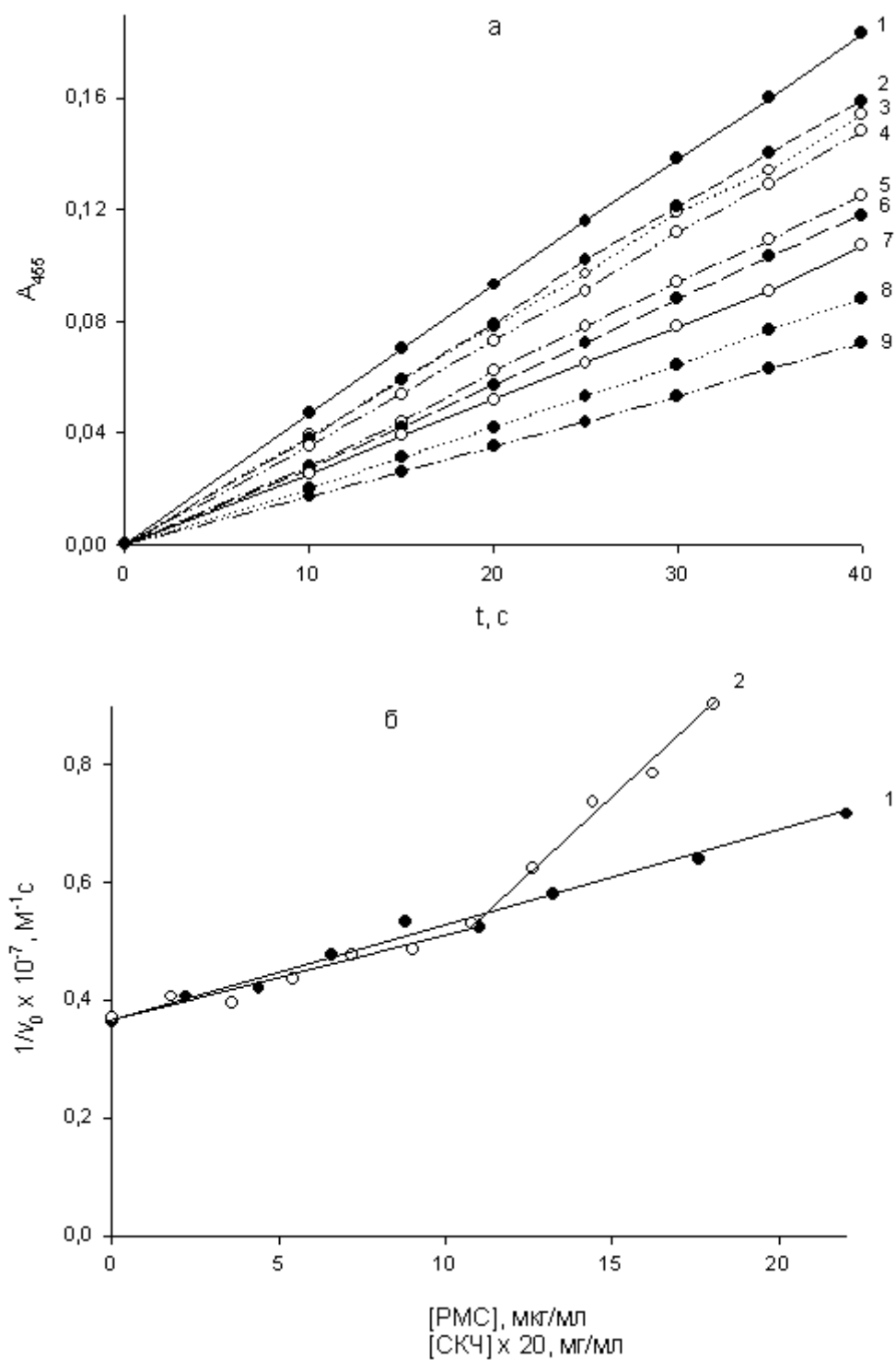


Рисунок 3.

а – Кинетика роста поглощения (A_{455}) продукта окисления ФДА (1 мМ) пероксидом водорода (6 мМ) при 37°C с участием 20 мкМ МетНа в отсутствие СКЧ №1 (1) и в присутствии 0,09 (2), 0,18 (3), 0,27 (4), 0,45 (5), 0,54 (6), 0,63 (7), 0,72 (8) и 0,90 (9) мг/мл СКЧ №1 в стандартных условиях (методическая часть).

б – Зависимость обратной скорости окисления ФДА (1 мМ) пероксидом водорода (6 мМ) при 37°C с участием МетНа (20 мкМ) от концентрации РМС (1) и СКЧ №1 (2).

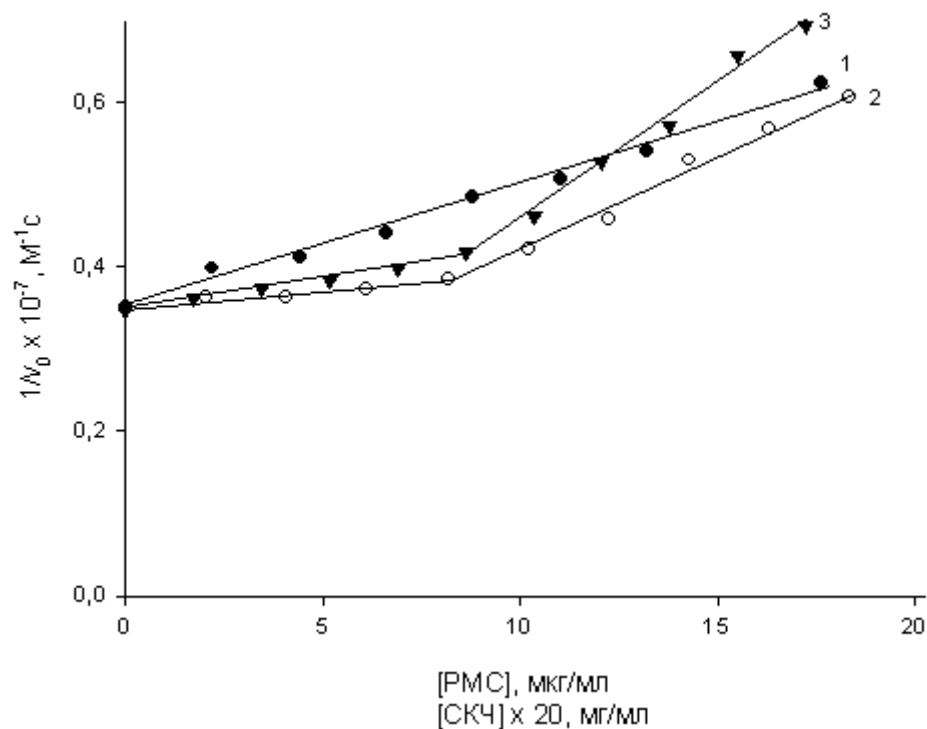


Рисунок 4.

Зависимость обратной скорости окисления ФДА (1 мМ) пероксидом водорода (6 мМ) при 37°C с участием MetHa (20 мкМ) от концентрации РМС (1), СКЧ №22 (2) и СКЧ №13 (3) в стандартных условиях (методическая часть).

Таблица. Общая антиоксидантная активность (ОАА) сывороток крови (СКЧ) здоровых лиц и лиц с различными формами патологии щитовидной железы.

Обследованные группы	Величина ОАА в мкг/мл РМС, эквивалентная 1мг/мл СКЧ
Здоровые лица (n=29)	10,48±0,97
Лица с субклиническим гипотиреозом (n=16)	6,87±0,83
Лица с субклиническим гипертиреозом (n=17)	6,33±0,54
Лица с угрозой развития аутоиммунного тиреоидита – АИТ и узлообразования – УЗЛ (n=20)	7,18±0,54
Лица с клинически выраженным гипотиреозом (n=10)	4,94±0,44

Примечание: представлены средние арифметические ± ошибки средней.

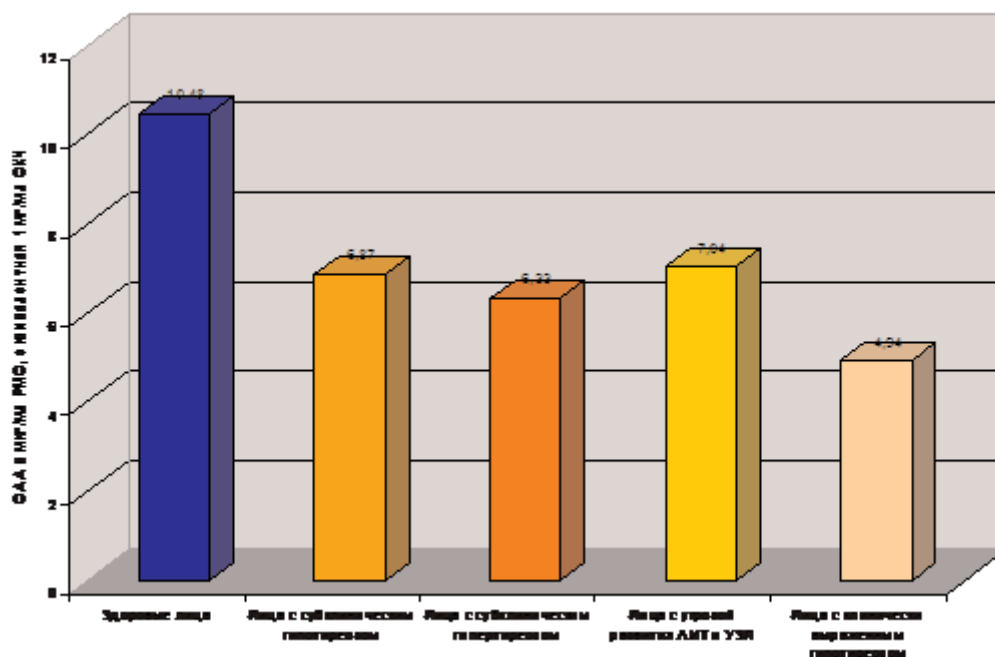


Рисунок 5.

Общая антиоксидантная активность (ОАА) сывороток крови (СКЧ) здоровых лиц и лиц с различными формами патологии щитовидной железы.

Предложенная и испытанная нами в лабораторных условиях новая тест-система для определения ОАА СКЧ имеет целый ряд несомненных преимуществ перед известными методиками [1-5]:

- система MetNa-H₂O₂-ФДА-РМС обеспечивает достаточный уровень инициирования свободных радикалов и начальной скорости окисления их акцептора ФДА, что позволяет использовать довольно низкие концентрации биокатализатора MetNa – 20 мкМ, окислителя H₂O₂ – 6 мМ и ФДА – 1 мМ;
- высокая ингибирующая эффективность РМС позволяет применять его в низких концентрациях (до 2,2 мкг/мл и ниже);
- малые количества СКЧ для анализа (менее 150 мкл неразведённой сыворотки);
- доступность всех реагентов тест-системы и их достаточная растворимость в среде проведения анализа;
- использование органических соразтворителей в минимальных концентрациях (5% ДМФ и 0,5% ДМСО);
- высокая стабильность большинства реагентов при хранении;
- возможность автоматизации анализа СКЧ с использованием отечественных ИФА-анализаторов и полистирольных планшетов с 96-ью лунками.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Международного научно-технического центра (МНТЦ) по проекту В-1206.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rice-Evans C., Miller N. (1994) Meth. Enzymol., **234**, 279-293.
2. Теселкин Д.А., Бабенкова И.В., Любичкий О.Б., Клебанов Г.И., Владимиров Ю.А. (1997) Вopr. мед. химии, **43**, 87-93.

3. Клебанов Г.И., Теселкин Д.А., Бабенкова И.В., Любичкий О.Б., Владимиров Ю.А. (1999) Вестник РАМН, №2, 15-22.
4. Метелица Д.И., Ерёмин А.Н., Свиридов Д.О., Камышников В.С. (2001) Биохимия, **66**, 628-639.
5. Русь О.Б., Метелица Д.И. (2001) Весці НАН Беларусі. Сер. хім. навук, №4, 75-82.
6. Григоренко Ю.А., Карасева Е.И., Метелица Д.И., Сорокин В.Л., Ксендзова Г.А., Шадыро О.И. (2007) Биомед. химия, **53**, 566-576.
7. Метелица Д.И., Карасева Е.И. (2007) Прикл. биохимия и микробиол., **43**, 537-564.
8. Григоренко Ю.А., Карасева Е.И., Метелица Д.И., Павлишиев В.Н., Полозов Г.И., Шадыро О.И. (2007) Весці НАН Беларусі. Сер. хім. навук, №4, 70-77.
9. Albert H.E. (1954) J. Amer. Chem. Soc., **76**, 4985-4988.
10. Вольева В.Б., Прокофьева Т.И., Белостоцкая И.С., Комиссарова Н.Л., Ершов В.В. (1995) Известия РАН, сер. хим. наук, №9, 1789-1793.
11. Келети Т. (1990) Основы ферментативной кинетики, Мир, Москва, с. 183-203.
12. Диксон М., Уэбб Э. (1982) Ферменты, Мир, Москва, Т. 2. С. 507.
13. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. (1991) Справочник биохимика, Мир, Москва, с. 465.

Поступила: 26. 05. 2008.

HIGHLY EFFECTIVE TEST-SYSTEM FOR DETERMINATION OF THE TOTAL ANTIOXIDANT ACTIVITY OF HUMAN BLOOD SERUM

Yu.A. Grigorenko¹, D.I. Metelitsa¹, N.V. Piven², L.N. Lukhverchyk², O.I. Shadyro¹

¹Research Institute of Physico-Chemical problems of Belorussian State University, ul. Leningradskaia, 14, Minsk, 220050 Belorussia; fax: 375-172-09-5464; e-mail: grigorenko_yulia@tut.by

²Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, ul. Kuprevicha, 5/2, Minsk, 220141 Belorussia; fax: 375-172-63-7274; e-mail: piven@iboch.bas-net.by

A highly effective test-system for quantitative characterization of the total antioxidant activity (TAA) of human blood serum (HBS), including methemalbumin (MetHa) as biocatalyst, H₂O₂ as the oxidant, *o*-phenylenediamine (PDA) as the acceptor of radicals and 2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-ol (PMC) as the inhibitor-calibrator, has been developed and proved under the laboratory environments. The test-system has been optimized for the concentrations of all the components, the reaction conditions and the PDA consumption monitoring at 37°C in the medium of buffered physiological solution, pH 7.4 containing 5% DMFA and 0.5% DMSO. Under strongly standardized conditions by a comparison of the inhibiting action of the HBS and the calibrator PMC at 37°C, the quantitative parameters of the HBS TAA were determined in µg of PMC, equivalent to 1 mg of HBS, or as a reverse value in mg of HBS, equivalent to the action of 1 µg of PMC.

The values of the HBS TAA significantly varied for the group of healthy individuals and essentially decreased for the group of patients with thyroid gland pathologies. This underlies necessity of antioxidant therapy in these patients.

Key words: human blood serum, antioxidant activity, test-system, quantitative parameters of activity.