

## ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ В ОЦЕНКЕ АНТИОКСИДАНТНОГО ПОТЕНЦИАЛА ОРГАНИЗМА (ОБЗОР)

Н. М. Литвинко

УДК 543.42;577.158

<https://doi.org/10.47612/0514-7506-2022-89-3-297-308>

Институт биоорганической химии НАН Беларуси,  
Минск, Беларусь; e-mail: al\_h@mail.ru

(Поступила 15 марта 2022)

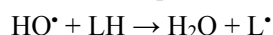
*Рассмотрены методы определения оксидант/антиоксидантной активности свободных радикалов, соединений-антиоксидантов и продуктов свободнорадикального окисления в биологических жидкостях. Представлены общие подходы к анализу антиоксидантного потенциала сложных природных объектов с использованием дифференциальной спектроскопии.*

**Ключевые слова:** дифференциальная спектроскопия, антиоксидантная активность (способность), фосфолиплиз, окислительный стресс.

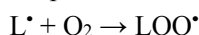
*Methods for determining the oxidant/antioxidant activity of free radicals, antioxidant compounds, and free radical oxidation products in biological fluids are discussed. General approaches toward the analysis of the antioxidant potential of complex natural objects using differential spectroscopy are presented.*

**Keywords:** differential spectroscopy, antioxidant activity (capacity), phospholipolysis, oxidative stress.

**Введение.** Живые организмы существуют в среде, насыщенной кислородом (O<sub>2</sub>), который в физиологических условиях способен образовывать активные частицы — активные формы кислорода (АФК), и вызывать окисление биологических субстратов, поэтому процессы свободнорадикального окисления (СРО) играют чрезвычайно важную роль в жизнедеятельности клеток [1]. При достижении количества АФК критической точки по причине высокой реакционной способности они становятся достаточно опасными соединениями, пагубно влияющими на клетку. В ответной реакции в организме включаются механизмы их обезвреживания, связанные с защитным действием антиоксидантов. На фоне дисбаланса про- и антиоксидантных систем клетки наблюдается развитие окислительного (оксидативного) стресса — массивного образования свободных радикалов (R<sup>•</sup>), повреждающего клеточные структурные элементы и нарушающего обмен веществ и энергии. Доказано, что окислительный стресс вовлекается в патофизиологию многих заболеваний человека [2], в том числе при инфицировании SARS-CoV-2 [3, 4]. Развитие лучевой болезни также вызвано индукцией АФК цепной разветвленной реакции окисления липидов клеточных мембран, продукты которой токсичны для клетки [5]. Наиболее предрасположены к реакциям окисления под действием АФК фосфолипиды клеточных мембран с образованием гидроперекисей по остаткам ненасыщенных жирных кислот, входящих в их состав. Механизм перекисного окисления липидов (ПОЛ) хорошо изучен [6]. В липидном слое биологических мембран образуются липидные радикалы



Липидный радикал (L<sup>•</sup>) вступает в реакцию с растворенным в среде молекулярным кислородом, при этом образуется новый свободный радикал — радикал липоперекиси (LOO<sup>•</sup>):

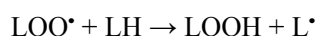


---

## DIFFERENTIAL SPECTROSCOPY IN THE ASSESSMENT OF THE ORGANISM ANTIOXIDANT POTENTIAL (REVIEW)

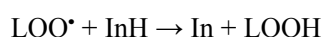
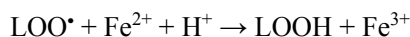
N. M. Litvinko (Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus; e-mail: al\_h@mail.ru)

который атакует одну из соседних молекул фосфолипида с образованием гидроперекиси липида LOOH (Ок-ФЛ) и нового радикала L<sup>•</sup>:



Чередование двух последних реакций представляет собой цепную реакцию ПОЛ.

Цепь обрывается в результате взаимодействия свободных радикалов с антиоксидантами (InH), ионами металлов переменной валентности (например, Fe<sup>2+</sup>) или друг с другом:



В нормальном состоянии концентрация АФК в тканях незначительна (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10<sup>-8</sup>—10<sup>-11</sup> М, HO<sup>•</sup> < 10<sup>-11</sup> М), поскольку их регуляция в организме человека осуществляется с помощью антиоксидантной системы [7].

Таким образом, процессы ПОЛ играют важную роль в нормальном функционировании клетки и выступают в качестве ранних ключевых звеньев ответной реакции организма на окислительный стресс [8]. В связи с этим большое внимание уделяется разработке способов определения антиоксидантного потенциала организма человека для характеристики его возможностей функционального восстановления после окислительного стресса [9].

Цель данного обзора — обобщение и анализ современных методов оценки антиоксидантного потенциала организма и возможностей дифференциальной спектроскопии в его характеристике.

**Антиоксидантная система защиты клетки и ПОЛ.** Нарушение баланса между реакциями СРО, среди которых основная доля приходится на ПОЛ, и действием антиоксидантных систем организма способствует развитию таких патологий, как атеросклероз, инфаркт миокарда, рак, нейродегенеративные процессы и др. [10—13]. Абсолютное большинство заболеваний в острый период и период обострения сопровождается интенсификацией окисления полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) и развитием антиоксидантной недостаточности, выраженной в различной степени и приводящей к патологическим состояниям организма. Возникающий дефицит биоантиоксидантов требует проведения соответствующей коррекции. Под биоантиоксидантами принято понимать вещества, которые при моделировании СРО проявляют свойства ингибиторов реакций и сохраняют эти свойства при введении в живой организм [14].

ПОЛ основано на взаимодействии АФК с ненасыщенными жирными кислотами в составе липидов с образованием перекисных радикалов: моно- и димерных, циклических, полимерных перекисей, гидроперекисей липидов. Непосредственными предшественниками гидроксильного радикала, инициирующего цепное окисление липидов, служат ионы двухвалентного железа и перекись водорода или образующийся из нее гипохлорит (рис. 1). ПОЛ развивается в виде цепных реакций в липидной фазе мембран и липопротеинов. Однако начальные и промежуточные стадии этой сложной системы реакций протекают в водной фазе клетки. По этой причине образование радикала гидроксила и пероксидация липидов тормозятся веществами, снижающими концентрацию одного из этих двух соединений.

Среди веществ, предотвращающих образование сильных окислителей в человеческом организме, следует выделить SH-содержащую аминокислоту цистеин, некоторые пептиды и белки (глутатион, альбумин), убихинон, аскорбиновую и мочевую кислоты, токоферолы, каротиноиды, флавоноиды и др. Установлено, что ПОЛ и антиокислительная защита представляют собой единую систему, находящуюся в состоянии динамического равновесия, способную к саморегуляции. Механизмы антирадикальной защиты включают в себя как ферментативные, так и неферментативные процессы (рис. 1). Компоненты антиоксидантной системы (антиоксиданты) можно условно разделить на несколько групп соединений, которые предотвращают образование новых свободных радикалов кислорода (супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, церулоплазмин, трансферрин, ферритин), удаляют свободные радикалы прежде, чем они инициируют цепные реакции, повреждающие клетки (*α*-токоферол, аскорбиновая кислота, бета-каротин, мочевая кислота, билирубин, альбумин), удаляют окисленные липиды или восстанавливают клеточные структуры, поврежденные свободными радикалами кислорода (фосфолипаза, ферменты восстановления ДНК, метионин-сульфоксидредуктаза).

Защитная система клеточных структур от повреждающего действия АФК, продуцирующихся внутри клетки (эндогенные АФК) и воздействующих извне (экзогенные АФК), характеризуется как ее общая антиоксидантная способность (АОС) — интегральный показатель антиоксидантного статуса

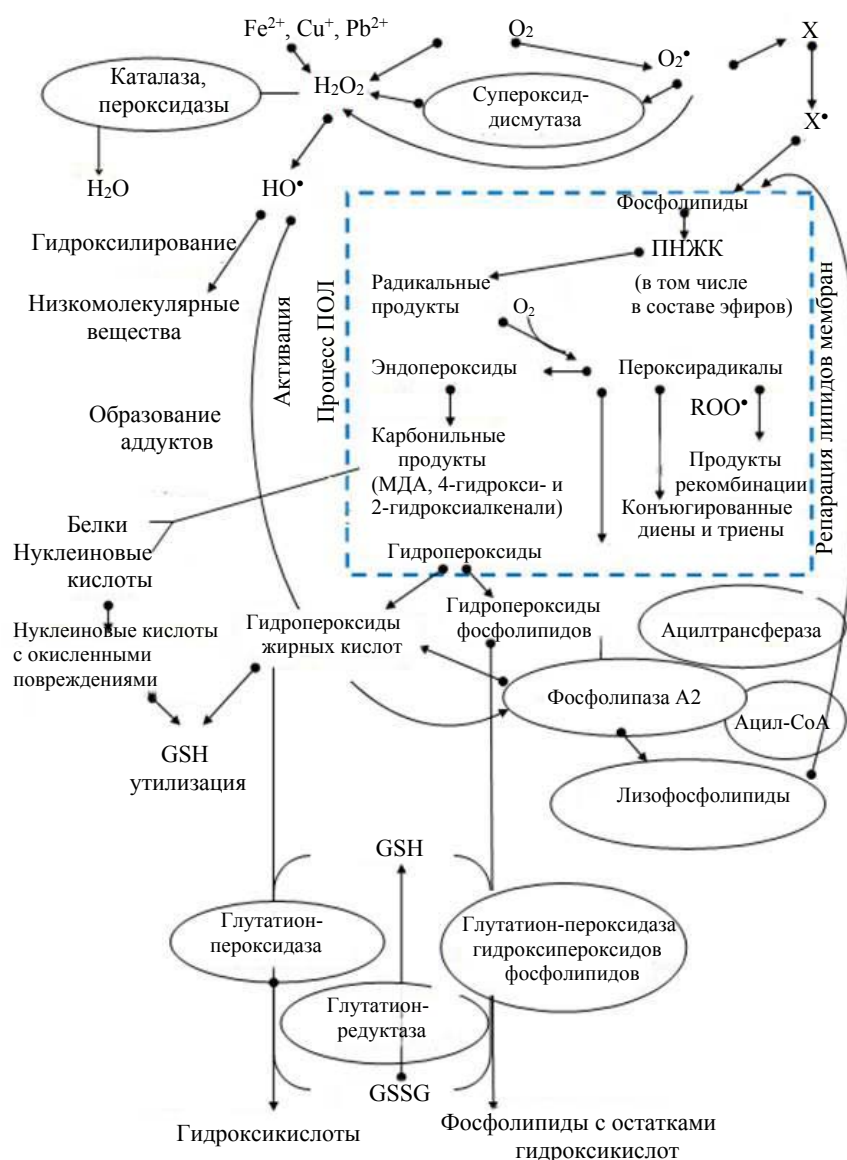


Рис. 1. Схема взаимодействия процессов свободнорадикального окисления и ферментов антиоксидантной защиты: ПНЖК — полиненасыщенные жирные кислоты; ПОЛ — перекисное окисление липидов; CoA — кофермент A; GSH — восстановленный глутатион; GSSG — окисленный глутатион; GST — глутатион-S-трансфераза; MDA — малоновый диальдегид; SOD — супероксид дисмутаза, X — любое вещество, способное к образованию радикалов

организма, который может оцениваться с помощью антиоксидантной активности (АОА) отдельных его компонентов (антиоксидантов) и системы в целом. Имеется четкое различие между этими характеристиками. АОА соответствует константе скорости отдельного антиоксиданта против данного свободного радикала. АОС соответствует числу молей данного свободного радикала, нейтрализованных исследуемым раствором независимо от активности отдельных антиоксидантов, присутствующих в смеси [1]. Следовательно, для плазмы или сыворотки крови, представляющей собой гетерогенный раствор различных антиоксидантов, АОС лучше отражает антиоксидантный статус, чем АОА.

Система антиоксидантной защиты функционирует по разным механизмам. В случае экзогенных АФК, не способных проникать глубоко сквозь мембраны, их действие всегда реализуется опосредованно через стимуляцию СРО в липидной фазе клеточных мембран и характеризуется степенью окисления непредельных жирных кислот в составе фосфолипидов. Часть защитных систем клетки, ее

антиоксидантный потенциал (общая АОА), связана со взаимодействием антиоксидантов непосредственно с липидной фазой, другая часть — с продуктами действия АФК в водной фазе. В водной фазе это соединения, связывающие ионы железа (комплексоны), ферменты супероксиддисмутаза, каталаза, глутатион-пероксидаза и глутатион-S-трансфераза, которые удаляют перекись водорода (рис. 2).



Рис. 2. Распределение продуктов действия АФК на фосфолипиды между липидной и водной фазами

Таким образом, регуляция продукции АФК и  $R^{\bullet}$  в тканях и органах человека осуществляется многоуровневой физиологической антиоксидантной системой, которая включает в себя соединения различной химической природы: витамины, пигменты, гормоны, ферменты [6]. В клинической практике в основном применяются жирорастворимые соединения, способные взаимодействовать с радикалами, локализованными в основном в гидрофобной зоне мембран и липопротеидов. Кроме того, первая острая фаза воспалительных заболеваний проходит в условиях гиперпродукции радикалов, локализованных в водной фазе, где наибольшей эффективностью обладают гидрофильные перехватчики АФК [15].

**Оценка степени развития окислительного стресса.** С физико-химической точки зрения АФК — прежде всего свободные радикалы ( $R^{\bullet}$ ). Большинство  $R^{\bullet}$  генерируются в ходе СРО и претерпевают дальнейшие превращения в более устойчивые частицы. Свободные активные радикалы в норме в клетке постоянно образуются в митохондриях и используются, например, в борьбе с инфекциями или для уничтожения токсичных ксенобиотиков. Изменение баланса между окислительно-восстановительными реакциями и антиоксидантной защитой клетки при образовании избытка АФК, оказывающее негативное воздействие на организм, наблюдается в результате радиационного, лазерного или УФ-облучения, образования токсичных ксенобиотиков (рис. 3). В этом случае жизненно важные функции ДНК, белков, липидов, низкомолекулярных биорегуляторов нарушаются за счет образования органических гидропероксидов, которые модулируют дальнейшее СРО этих биоструктур [16].

В теории радикального окисления различают два механизма: линейный обрыв на ингибиторе радикальных реакций и ингибирование путем создания комплексов активных радикалов с системами с сопряженными  $\pi$ -связями. Установлено, что радикалы вступают с антиоксидантами в обменные реакции, в результате чего неспаренный электрон радикала биополимера ( $R^{\bullet}$ ) переходит на молекулу антиоксиданта (HIn) с образованием неактивного радикала ингибитора ( $In^{\bullet}$ ):  $R^{\bullet} + HIn \rightarrow RH + In^{\bullet}$  [14]. Полагают, что по первому механизму взаимодействуют пространственно экранированные фенолы — токоферолы, а второй чаще реализуется для природных биологических объектов [17].



Продолжение табл. 1

R <sup>•</sup> , АФК, продукты СРО	Способ детекции	Литература
<i>Косвенные методы</i>		
Первичные и вторичные продукты	Реакция с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) ТБК-зависимых продуктов, таких как конъюгированные диены, в частности малоновый диальдегид. В последнем случае образуется красный пигмент (максимум поглощения при 532—535 нм).	[22]
		[23]
R <sup>•</sup> , АФК	“Перехватчики” и “ловушки” свободных радикалов, использование фермента супероксиддисмутазы в сочетании с каталазой для удаления супероксидных радикалов, токоферола — для липидных радикалов.	[24]
Гидроксильные радикалы	Использование спектрофотометрической, хроматографической и флуоресцентной регистрации продуктов реакции окисления и гидроксирования, в частности терефталевой кислоты, окисляющейся при взаимодействии с ОН <sup>•</sup> -радикалами до 2-гидрокситерефталата, который интенсивно флуоресцирует ( $\lambda_{\text{возб}} = 326 \text{ нм}$ , $\lambda_{\text{исп}} = 432 \text{ нм}$ ).	[25, 26]
Супероксид-анион-радикалы	Реакция восстановления цитохрома С, при которой происходит переход от феррицитохрома С к ферроцитохрому С и спектрофотометрическая регистрация при $\lambda = 550 \text{ нм}$ .	[27]
Гидроперекиси липидов	Использование титрования гидропероксидов иодид-ионами с регистрацией образующегося иода амперометрически или спектрофотометрически, использование тиоцианатного метода определения гидроперекисей липидов по изменению оптической плотности при 500 нм в результате образования тиоцианатного комплекса Fe(III).	[28]

В клетках и тканях, в суспензиях и растворах клеточных органелл прямое определение концентрации свободных радикалов осложняется их высокой реакционной способностью и малым временем жизни. В итоге их концентрация в исследуемых объектах очень низка и отличается от концентрации в живом организме. В связи с этим в оценке антиоксидантного потенциала используется определение концентрации всех продуктов СРО (первичных, вторичных и третичных) в системах, моделирующих СРО-процессы.

**Определение антиоксидантного потенциала биологического материала.** Показателем степени выраженности окислительного стресса, как отмечено выше, являются АОА, оцениваемая по отдельному антиоксиданту, и АОС как интегральный параметр, отражающий антиоксидант/оксидантный статус организма в целом или его отдельной системы. В настоящее время не существует метода, дающего полную информацию о состоянии и взаимодействиях сложных систем, в которых образуются АФК и вступают в реакции с антиоксидантами. Отсутствует также единый термин, определяющий антиоксидантные свойства соединения (antioxidant capacity, antioxidant activity, antioxidant power, antioxidant ability) [18]. Имеющиеся методы определения АОА обладают теми или иными недостатками.

Систематизации и анализу методов определения антиоксидантов и АОА биологических объектов в русскоязычной литературе посвящены обзоры [14, 17, 18]. Отмечено, что методы исследования общей АОА различаются по типу источника окисления, окисляемого соединения и способу измерения окисленного соединения. Методы оценки общей АОА, как правило, базируются на реакции взаимодействия с долгоживущими R<sup>•</sup>, которые служат прототипом R<sup>•</sup>, образующихся в живой клетке.

Для определения индивидуальных антиоксидантов применяют методы хроматографии — тонкослойной (ТСХ), высокоэффективной ТСХ, газовой, жидкостной, высокоэффективной жидкостной (ВЭЖХ) [29].

Сравнительное описание основных наиболее используемых интегральных методов ABTS/TEAC, CUPRAC, DPPH, Folin-Ciocalteu и FRAP приведено в работах [30—32]. В основе этих методов лежат процессы переноса электронов (ЕТ) либо атомов водорода (НАТ). В методах ЕТ измеряют способность антиоксидантов восстанавливать окислитель, который сам или специально введенное в систему соединение при реакции с ним меняет цвет. Методы ЕТ включают в себя ABTS/TEAC, CUPRAC, DPPH, Folin-Ciocalteu и FRAP, в каждом используются хромогенные окислительно-восстановительные реагенты с различными стандартными окислительно-восстановительными потенциалами. Боль-

шинство методов НАТ содержат конкурентную схему реакций, в которых антиоксидант и субстрат конкурируют за пероксильные радикалы, термически генерируемые путем разложения азосоединений [18].

Общая АОА может быть установлена также по поглощению кислорода при перекисном окислении липидов, окислению кроцина, ХЛ с люминолом, при окислении R-фикоэритрина, по чувствительности эритроцитов к гемолизу, восстанавливающей железо активности, при генерировании липидных перекисей. В некоторых работах измерена активность антиоксидативных ферментов, таких как аскорбат-пероксидаза, глутатион-редуктаза, дегидроаскорбат-редуктаза и монодегидроаскорбат-редуктаза [17], а также использовано аутоокисление адреналина [33]. Физико-химические методы детектирования АОА: пламенно-ионизационный, по изменению теплопроводности, УФ-видимая спектроскопия, флуоресценция, масс-спектрометрия, электрохимические методы [32], вольтамперометрия [34, 35]; амперометрия и хроноамперометрия (биамперометрия) [36], кулонометрия [37], а также потенциометрический, титриметрический [38, 39] и полярографический методы [40]. При определении АОА и АОС наиболее широко применяются спектрофотометрические методы анализа.

**Методы спектрофотометрии.** Спектрофотометрически характеризуют антиоксидантные свойства, например, растительного сырья по определению соединений фенольного ряда с использованием реактива Фолина—Чикольте [41] на модели окисления униламелярных (одномембранных) липосом кислородом воздуха, катализируемом ионами  $Fe^{2+}$ , с последующим определением диеновых продуктов [42], по суммарному содержанию антиоксидантов без разделения их смеси, при этом результат рассчитывают с помощью хемометрических алгоритмов [43].

Дифференциальная спектроскопия используется для оценки антиоксидантного потенциала. В работах [44—55] предложен оригинальный подход для определения антиоксидантного потенциала, основанный на развитии дифференциального спектра гемопротеинов — миоглобина (Mb) и гемоглобина (Hb) — при образовании его низкоспиновой гексакоординированной формы — гемихрома. Этот простой для воспроизведения метод основан на спектральных изменениях Mb и Hb в области полосы Soret под действием продуктов фосфолиполиза или УФ-облученных фосфолипидов и их производных [44, 45]. Известно, что аутоокисление Hb — самопроизвольный процесс, при котором либо  $O_2$ , связанный с атомом железа ( $Fe^{2+}$ ) гемовой группы, спонтанно диссоциирует в виде супероксидного радикала, либо свободный  $O_2$ , находящийся в растворе, реагирует с гемовой группой с образованием переходного состояния — аквадезоксигема, оставляя полученное железо в трехвалентном ( $Fe^{3+}$ ) состоянии. После этой реакции атом железа гема аксиально координируется, с одной стороны, гистидином (проксимальным или F<sub>8</sub> гистидином), а с другой —  $H_2O$  или  $OH^-$  в зависимости от pH. Если гемовый карман раскрывается из свернутого положения, дистальный гистидин His58 (E7) этого гемсодержащего белка (или другие близлежащие основные аминокислоты на дистальной стороне гемового кольца) может координироваться с трехвалентным атомом железа. Образующийся бигистидильный аддукт называется гемихромом [56]. Превращение гемоглобина в гемихром происходит дозозависимо, что регистрируется по изменению амплитуды дифференциального спектра в видимой области.

*Дифференциальная спектроскопия и активность фосфолипазы  $A_2$  в оценке АОА.* В процессе гидролиза фосфолипидов фосфолипазой  $A_2$  (ФЛА<sub>2</sub>, 3.1.1.4) (фосфолиполиза) в присутствии Mb и Hb под действием одного из продуктов реакции — жирной кислоты — наблюдается возрастание амплитуды между максимумом ( $\lambda_{423}$ ) и минимумом ( $\lambda_{405}$ ) в разностных спектрах поглощения этих гемопротеинов ( $\Delta D$ ). В модельной системе при переходе Hb в гемихром показано [57], что спектральные изменения, возникающие под действием отщепленной в процессе фосфолиполиза жирной кислоты, прямо пропорциональны ее концентрации. Различия в содержании двух форм Hb сопровождаются пропорциональным изменением разностного спектра, который позволяет по сдвигу в области полосы Soret Hb провести измерение активности ФЛА<sub>2</sub> как индикатора изменений при перекисном окислении фосфолипидов. Изменение спектральных свойств Mb и Hb под действием нативного фосфатидилхолина (ФХ) или лизофосфатидилхолина (ЛФХ) в отличие от свободной жирной кислоты незначительно.

ФЛА<sub>2</sub> очень чувствительна к изменению физико-химических свойств мембраны под действием различных факторов, в том числе окисления. Неспособные проникать сквозь мембраны экзогенные АФК всегда воздействуют на клетку только опосредованно, через стимуляцию ПОЛ в плазматической мембране. В связи с этим защита от повреждения экзогенными АФК направлена в первую очередь на утилизацию жирнокислотных и липидных гидропероксидов как продуктов ПОЛ, стимулирующих СРО по принципу цепной реакции. Основная роль в этой защите принадлежит ФЛА<sub>2</sub>, поскольку



иновой кислоты, образуются С9-альдегид (кислота) и 2-азелоилпроизводное ФХ. Поскольку эти продукты способны переводить Нв в гемихром [59], УФ-облученные фосфолипиды впервые [54, 60] были использованы для определения степени их перекисного окисления с применением разностной спектрофотометрии. Действительно, УФ-облучение ФХ в течение длительного времени приводит к вторичному окислению, что в конечном итоге провоцирует переход Нв в гемихром (рис. 4). Это подтверждает корреляция изменений индекса ПОЛ УФ-облученной пленки ФХ с изменениями амплитуд дифференциальных спектров Нв в присутствии мицелл УФ-облученного ФХ-детергента и накоплением вторичных продуктов ПОЛ (малонового диальдегида) [61].

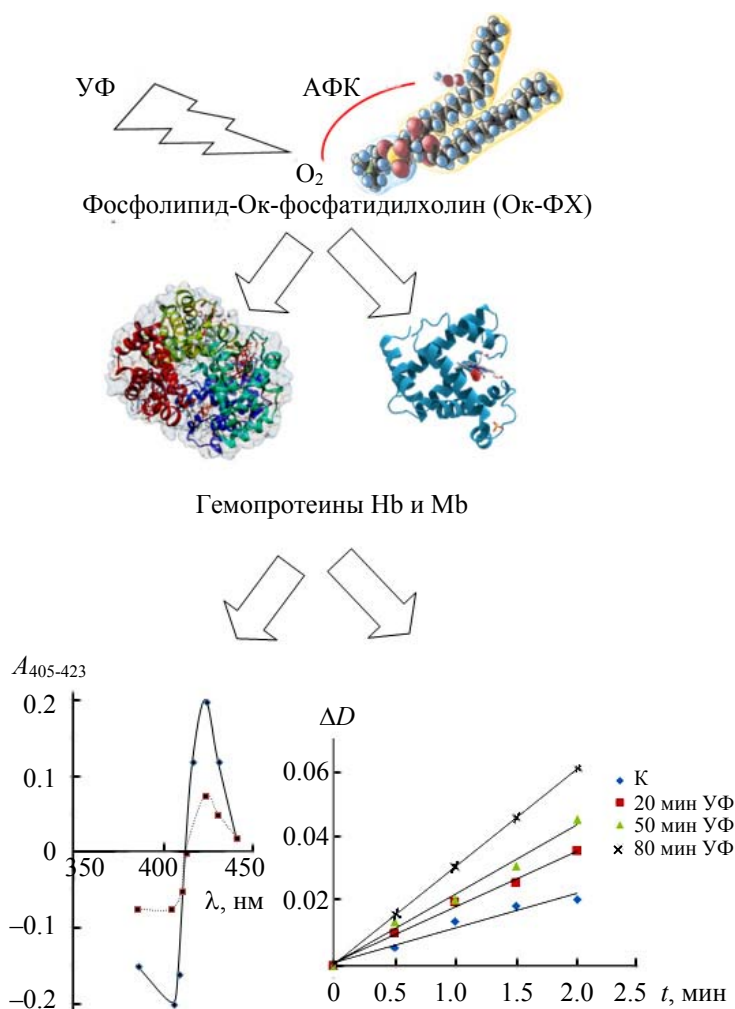


Рис. 4. Взаимодействие Mb и Hb с УФ-облученным (сплошная линия) и необлученным (пунктир) фосфатидилхолином (Ок-ФХ) и его кинетика; пространственная структура Mb построена на основе PDB 1MBO, Hb (3odq)

Показано [57], что необлученный ФХ не вызывает спектральных изменений Нв. Дифференциальный спектр Нв регистрируется в присутствии ФХ уже после 15 мин его облучения. Амплитуда разностного спектра Нв возрастает пропорционально времени облучения ФХ. Через 80 мин интенсивность разностного спектра превышает контрольные величины в 12—15 раз [61]. При этом для количественной оценки антиоксидантной защиты используется один из наиболее распространенных стандартов — водорастворимый аналог токоферола (витамина Е) — тролокс (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота). Совместное облучение ФХ с тролоксом дозозависимо снижает инициирующий эффект УФ-излучения на спектральный ответ гемопротеинов, что позволяет с помощью калибровочных кривых количественно оценить в единицах тролокса АОС сыворотки

крови, которая выступает в качестве ловушки для продуктов свободнорадикальных реакций в липидной фазе, образующихся в процессе УФ-облучения фосфолипида. Показано [44, 53], что биологические жидкости благодаря своему антиоксидантному потенциалу при совместном УФ-облучении с липидной фазой, сформированной ФХ или ненасыщенными жирными кислотами, существенно снижают интенсивность разностных спектров Нb и Mb, которая является мерой воздействия ок-ФХ или ок-ПНЖК на гемопротейн и служит индикатором ПОЛ. Этот феномен положен в основу новых методов количественного определения общей АОС за счет протекторного действия сыворотки крови и других биологических жидкостей.

**Заключение.** Многообразие соединений различной химической природы, обладающих оксидантными и антиоксидантными свойствами, мультикомпонентность биологических объектов и быстрое изменение их состава после отбора пробы делают задачу оценки окислительного стресса и антиоксидантного потенциала крайне нетривиальной. Ситуация осложняется отсутствием единых терминов и сопоставимых единиц выражения концентрации и антиоксидантных свойств соединений или комплекса соединений. В качестве единиц измерения, как правило, используют относительные единицы, выраженные в граммах аскорбиновой кислоты, тролокса, рутина и т. д.

Известны два основных методологических подхода к оценке оксидант/антиоксидантного статуса организма. К первому относится определение содержания и/или активности отдельных антиоксидантов, в том числе высокомолекулярных (ферментные системы глутатиона, супероксиддисмутазы, каталазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, фосфолипазы, декарбоксилирующей малатдегидрогеназы, редокс-чувствительных факторов транскрипции и др.) и низкомолекулярных (глутатион, мочевиная и аскорбиновая кислоты, токоферолы, полифенолы, каротиноиды, ретинол и др.). Второй основан на оценке интегральной антиоксидантной способности с учетом общего антиоксидантного потенциала независимо от отдельных антиоксидантов. Учитывая множественность окислительно-восстановительных реакций в организме, большое количество разнообразных соединений-антиоксидантов, различия механизмов действия, а также возможность синергизма их действия, второй подход считается более информативным и, следовательно, предпочтительным.

При определении антиоксидантной активности и антиоксидантной способности среди физико-химических методов следует выделить спектрофотометрию. Фотометрическая регистрация относится к широко распространенным способам оценки антиоксидантного потенциала, на наш взгляд, как самая удобная и доступная. При этом использование *in vitro* оригинальных систем окисленные фосфолипиды—фосфолипаза А<sub>2</sub>—гемопротейны на основе фосфолиполитической реакции и окисленные фосфолипиды — гемопротейны — в качестве простой модели процесса перекисного окисления фосфолипидов как первичной мишени активных форм кислорода под действием УФ-облучения с применением дифференциальной спектроскопии позволяет достоверно определять антиоксидантную активность и антиоксидантную способность. Использование в обеих системах известного антиоксиданта тролокса в качестве стандарта определения антиоксидантной активности и антиоксидантной способности крови позволяет количественно охарактеризовать *in vitro* прооксидантный и антиоксидантный потенциал биологических жидкостей.

Экспресс-метод с применением разностной спектроскопии и биологических жидкостей в качестве ловушки свободных радикалов [44, 45] имеет явные преимущества, поскольку не требует длительных испытаний на лабораторных животных, не использует токсических реагентов и дорогостоящей техники детекции, что создает благоприятные условия для адекватной характеристики антиоксидантного потенциала среди широкого ассортимента приведенных в обзоре методов.

[1] A. Ghiselli, M. Serafini, F. Natella, C. Scaccini. Free Rad. Biol. Med., **29** (2000) 1106—1114

[2] C. E. Thomas, B. Kalyanaraman. Oxygen Radicals and the Disease Process, Harwood Academic Publishers (1998)

[3] M. M. Rogero, M. C. de Leão, T. M. Santana, M. V. de M. B. Pimentel, G. C. G. Carlini, T. F. F. da Silveira, R. C. Gonçalves, I. A. Castro. Free Rad. Biol. Med., **156** (2020) 190—199, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.07.005

[4] E. Barberis, S. Timo, E. Amede, V. V. Vanella, Ch. Puricelli, G. Cappellano, D. Raineri, M. G. Cittone, E. Rizzi, A. R. Pedrinelli, V. Vassia, F. G. Casciaro, S. Priora, I. Nerici, A. Galbiati, E. Hayden, M. Falasca, R. Vaschetto, P. P. Sainaghi, U. Dianzani, R. Rolla, A. Chiocchetti, G. Baldanzi, E. Marengo, M. Manfredi. Int. J. Mol. Sci., **21** (2020) 8623—8648

- [5] **Б. Н. Тарусов.** Основы биологического действия радиоактивных излучений, Москва, Медгиз (1954)
- [6] **B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge.** Free Radicals in Biology and Medicine, 4th ed., Oxford University Press, New York (2007)
- [7] **A. M. Pisoschi, A. Pop.** J. Med. Chem., **97** (2015) 55—74
- [8] **V. Bochkov, B. Gesslbauer, Ch. Mauerhofer, M. Philippova, P. Erne, O. V. Oskolkova.** Free Rad. Biol. Med., **111** (2017) 6—24
- [9] **И. В. Бабенкова, Е. А. Буравлев, К. В. Буравлева, Ю. О. Теселкин.** Евразийский союз ученых, № 13. Сер. биол. науки, № 4 (2015) 1—7
- [10] **J. A. Berliner, N. Leitinger, S. Tsimikas.** J. Lipid Res., **50** (2009) S207—S212, doi: 10.1194/jlr.R800074-JLR200
- [11] **L. Butler, Y. Perone, J. Dehairs, L. E. Lupien, V. de Laat, A. Talebi, M. Loda, W. B. Kinlaw, J. V. Swinnen.** Adv. Drug. Deliv. Rev., **159** (2020) 245—293, Published online 2020 Jul. 23, doi: 10.1016/j.addr.2020.07.013
- [12] **E. Gianazza, M. Brioschi, A. Martinez Fernandez, C. Banfi.** Redox Biol., **23** (2019), doi: 10.1016/j.redox.2019.101119
- [13] **T. S. Anthonymuthu, E. M. Kenny, A. M. Lamade, V. E. Kagan, H. Bayır.** Free Rad. Biol. Med., **124** (2018) 493—503, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.031
- [14] **Е. Б. Бурлакова.** Рос. хим. журн. (Рос. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева), **LI**, № 1 (2007) 3—12
- [15] **В. С. Камышников.** Справочник по клинической лабораторной диагностике, **2**, под ред. В. С. Камышникова, Минск, Беларусь (2000)
- [16] **Ю. А. Владимиров, О. А. Азизова, А. И. Деев.** Итоги науки и техники. Сер. биофиз., **52** (1992) 1—250
- [17] **О. В. Тринеева.** Разработка и регистрация лекарственных средств, **21**, № 4 (2017) 180—197
- [18] **М. Я. Ходос, Я. Е. Казаков, М. Б. Видревич, Х. З. Брайнина.** Вестн. Уральской мед. акад. науки, **14**, № 3 (2017) 262—274, doi: 10.22138/2500-0918-2017-14-3-262-274
- [19] **И. М. Пискарев, И. П. Иванова.** Совр. технол. в медицине, **8**, № 3 (2016) 16—26, doi: 10/17691/stm2016/8/3/02
- [20] **L. Valgimigli, G. F. Pedulli, M. Paolini.** Free Rad. Biol. Med., **31** (2001) 708—716
- [21] **Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурина.** Успехи биол. химии, **49** (2009) 341—388
- [22] **Ю. А. Владимиров, О. А. Азизова, А. И. Деев, А. В. Козлов, А. Н. Осипов, Д. И. Рощупкин.** Итоги науки и техники, Сер. биофиз., **29** (1991) 1—251
- [23] **F. Karaas, M. Karatere.** Analyt. Biochem., **311**, N 1 (2002) 76—79
- [24] **Ю. А. Владимиров.** Вестн. РАМН, **7** (1998) 43—51
- [25] **E. Peralta, G. Roa, J. A. Hernandez-Servin, R. Romero, P. Balderas, R. Natividad.** Electrochim. Acta, **129** (2014) 137—141
- [26] **G. Cao, H. M. Alessio, R. G. Cutler.** Free Rad. Biol. Med., **14**, N 1 (1993) 303—311
- [27] **M. M. Tarpey, I. Fridovich.** Circul. Res., **89** (2001) 224—236
- [28] **В. И. Донцов, В. Н. Крутько, Б. М. Мрикаев, С. В. Уханов.** Тр. ИСА РАН, **19** (2006) 50—69
- [29] **W. Jesionek, B. Majer-Dziedzic, I. M. Choma.** J. Liquid Chromatogr. Related Technol., **38** (2015) 1147—1153
- [30] **R. Apak R., K. Güçlü K., B. Demirata, M. Ozyürek, S. Esin Celik, B. Bektaşoğlu, K I. Berker, D. Ozyurt.** Molecules, **12** (2007) 1496—1547
- [31] **K. Pyrzynska, A. Pełal.** Anal. Methods, **5**, N 17 (2013), doi: 10.1039/C3AY40367J
- [32] **A. M. Pisoschi, A. Pop, C. Cimpeanu, G. Predoi.** Oxidative Medicine and Cellular Longevity, ID 9130976 (2016), <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/9130976/>
- [33] **Е. И. Рябина, Е. Е. Зотова, Е. Н. Ветрова, Н. И. Пономарева, Т. Н. Илюшина.** Химия растит. сырья, № 3 (2011) 117—121
- [34] **Kh. Ghanbari, N. Hajheidari.** Anal. Biochem., **473** (2015) 53—62
- [35] **R. Q. Ferreira, L. A. Avaca.** Electroanalysis, **20**, N 12 (2008) 1323—1329
- [36] **Х. З. Брайнина, Д. П. Варзакова, Е. Л. Герасимова.** Журн. аналит. химии, **67**, № 4 (2012) 409—415
- [37] **G. K. Ziyatdinova, H. C. Budnikov, V. I. Pogorel'tzev, T. S. Ganeev.** Talanta, **68**, N 3 (2006) 800—805
- [38] **A. Agarwal, S. Roychoudhury, R. Sharma, S. Gupta, A. Majzoub, E. Sabanegh.** Reproductive BioMed. Online, **34**, N 1 (2016) 48—57

- [39] И. Ф. Абдуллин, Е. Н. Турова, Г. К. Зиятдинова, Г. К. Будников. Журн. аналит. химии, **57**, № 4 (2002) 418—421
- [40] B. D. Atanasova, R. J. Simpson, I. S. Mudway, A. C. Y. Li, K. N. Tzatchev, T. J. Peters. Bulg. Chem. Commun., **35**, N 3 (2003) 167—173
- [41] В. Н. Сорокопудов, Н. А. Лучина, О. А. Мостовой. Науч. ведомости БелГУ. Сер. Медицина. Фармация, **99**, № 4, вып. 13/2 (2011) 196—198
- [42] В. В. Хасанов, Г. Л. Рыжова, Е. В. Мальцева. Химия растит. сырья, № 3 (2004) 63—75
- [43] Т. Г. Цюпко, И. С. Петракова, Н. С. Бриленок, Н. А. Николаева, Д. А. Чупрыкина, З. А. Тердашев, В. И. Вершинин. Аналитика и контроль, **15**, № 3 (2011) 287—298
- [44] Н. М. Литвинко, Л. А. Скоростецкая, Д. О. Герловский. Способ определения общей антиоксидантной способности биологической жидкости с использованием липидной фазы, патент ВУ № 19670, опубл. 30.12.2015 (2015)
- [45] Н. М. Литвинко, Л. А. Скоростецкая, Д. О. Герловский. Композиция и способ для определения общей антиоксидантной активности сыворотки крови, патент ВУ № 19669, опубл. 30.12.2015 (2015)
- [46] Н. М. Литвинко, Л. А. Скоростецкая, Д. О. Герловский. Докл. НАН Беларуси, **61**, № 4 (2017) 60—68
- [47] Н. М. Литвинко. Весці НАН Беларусі. Сер. хім. навук, **56**, № 4 (2020) 115—128
- [48] Н. М. Литвинко, Л. А. Скоростецкая, Д. О. Герловский, Ю. Ш. Ермакович. Наука — инновационному развитию общества, Минск, Беларуская навука (2020) 391—403
- [49] В. С. Камышников, Н. Н. Яковлев-Малых, Н. М. Литвинко, О. В. Свиридов, Л. В. Дубовская, Т. М. Юрага, Т. Д. Борисенко. Лаб. диагностика, Восточная Европа, **9**, № 1-2 (2020) 98—115
- [50] Н. М. Литвинко, Л. А. Скоростецкая, Д. О. Герловский, Ю. Ш. Ермакович, Г. С. Евдокимова. Докл. НАН Беларуси, **63**, № 1 (2019) 44—54, doi: 10.29235/1561-8323-2019-63-1-44-54
- [51] Н. М. Литвинко, Л. А. Скоростецкая, Т. Г. Гудко, М. М. Тимохова, В. С. Камышников, Е. И. Вижинис, В. А. Воробей. Докл. НАН Беларуси, **60**, № 4 (2016) 82—88
- [52] N. M. Litvinko, L. A. Skorostetskaya, D. O. Gerlovsky. Chem. Phys. Lipids, **211** (2018) 44—51, doi: 10.1016/j.chemphyslip
- [53] N. M. Litvinko, L. A. Skorostetskaya, D. O. Gerlovsky. Curr. Res. Bioorg. Org. Chem., **3** (2019) 19, doi: 10.29011/2639-4685-02
- [54] Л. А. Скоростецкая, Н. И. Павлюченко, Ю. Ш. Ермакович, С. П. Конопелько, Н. М. Литвинко. Материалы II межд. конф. “Свободные радикалы в химии и жизни”, 19—20 октября 2017 г., Минск, Бел. гос. ун-т (2017) 124—126
- [55] М. С. Осипчик, Е. А. Ремеева, Н. И. Павлюченко, Л. А. Скоростецкая, Н. М. Литвинко. Материалы III межд. конф. “Свободные радикалы в химии и жизни”, 10—11 октября 2019 г., Минск, Бел. гос. ун-т (2019) 70—71
- [56] A. N. Schechter. Blood, **112** (2008) 3927—3938
- [57] N. M. Litvinko, G. M. Andreyuk, M. A. Kisel. Faseb. J., **11** (9) (Suppl) (Abstr. 17th Int. Congress Bioch. Mol. Biol.) (1997) 2623, CA 1306
- [58] L. R. McLean, K. A. Hagaman, W. S. Davidson. Lipids, **28**, N 6 (1993) 505—509
- [59] Г. М. Андреюк, М. А. Кисель. Биоорг. химия, **23**, № 4 (1997) 290—293
- [60] N. M. Litvinko, Yu. Sh. Yermakovich, L. A. Skorostetskaya, D. O. Gerlovsky. Proc. BIT's 7th Annual Conf. AnalytiX-2019, 12—15 April 2019, Singapore (2018) 59
- [61] Y. Yermakovich, L. A. Skorostetskaya, N. M. Litvinko. Thesis Int. Conf. “Chemistry, Structure and Functional of Biomolecules”, 22—25 May 2018, Minsk, Inst. Bioorg. Chem. NAS Belarus (2018) 185—186