

ОЦЕНКА ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ И АНТИОКСИДАНТНОЙ СПОСОБНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ ПО ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ, ИНДУЦИРОВАННОЙ РЕАКЦИЕЙ ФЕНТОНА

DOI: 10.17691/stm2016.8.3.02

УДК 612.015.11+612.014.464:579.222.01

Поступила 17.11.2015 г.

И.М. Пискарев, к.ф.-м.н., ведущий научный сотрудник¹;И.П. Иванова, д.б.н., зав. отделом физико-химических исследований ЦНИЛ²¹НИИ ядерной физики им. Д.В. Скобельцына Московского государственного университета

им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Ленинские горы, 1–2;

²Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1

Цель исследования — анализ связи между способностью к окислению и антиоксидантной активностью субстрата по результатам расчета кинетики хемилюминесценции, индуцированной реакцией Фентона.

Материалы и методы. Измерения хемилюминесценции, индуцированной реакцией Фентона, осуществляли с помощью био-хемилюминометра БХЛ-07 (Россия) в 10–15 повторях. Время регистрации — 30 с. Для реакции Фентона использовали реактивы: раствор FeSO_4 (10^{-3} моль/л в кислой среде, pH=2), раствор перекиси водорода (10^{-3} и 10^{-1} моль/л).

Исследовали индуцированную реакцией Фентона хемилюминесценцию альбумина, гемоглобина, смеси альбумина и гемоглобина, известных антиоксидантов: фенола $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$, резорцина $\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2$, пиригаллола $\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})_3$, а также смеси антиоксидантов с гемоглобином и альбумином.

Для расчета кинетики процессов хемилюминесценции составляли схему реакций, описывающих процесс. На основе этой схемы составляли систему дифференциальных уравнений, где переменными являлись концентрации участвующих в процессе веществ. Число уравнений равнялось числу веществ, участвующих в реакции.

Результаты. Светосумма хемилюминесценции, индуцированной реакцией Фентона, при концентрации $[\text{H}_2\text{O}_2]=10^{-1}$ моль/л монотонно уменьшается с уменьшением концентрации субстрата (с разведением). Рассчитана зависимость S/S0 от концентраций окисляющихся фрагментов [RH], ингибитора [InH] и окисленного вещества [ROOH]. При $[\text{Fe}^{2+}] < [\text{H}_2\text{O}_2]$ отсутствует линейная зависимость между светосуммой S/S0 и концентрациями [RH], [ROOH] и [InH], поэтому получаемые результаты носят качественный характер.

Заключение. Хемилюминесценция, индуцированная реакцией Фентона, позволяет наблюдать продукты реакции, а не радикалы. Реакция Фентона протекает практически в любом субстрате. Уровень светосуммы хемилюминесценции, инициированной гидроксильными радикалами — реакцией Фентона, — определяется константами скорости реакций инициирования, продолжения и обрыва цепи. Увеличение или уменьшение светосуммы хемилюминесценции свидетельствует о разных значениях этих констант, но не указывает на антиоксидантную активность, т.е. на подавление цепной реакции путем образования неактивных продуктов. Поэтому по уровню хемилюминесценции, индуцированной гидроксильными радикалами, которые образуются в реакции Фентона, можно оценить способность субстрата к окислению в данных условиях.

Ключевые слова: реакция Фентона; кинетика хемилюминесценции; способность субстрата к окислению; антиоксидантная активность.

Как цитировать: Piskarev I.M., Ivanova I.P. Assessment of oxidative and antioxidant capacity of biological substrates by chemiluminescence induced by fenton reaction. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2016; 8(3): 16–26, <http://dx.doi.org/10.17691/stm2016.8.3.02>

English

Assessment of Oxidative and Antioxidant Capacity of Biological Substrates by Chemiluminescence Induced by Fenton Reaction

I.M. Piskarev, PhD, Leading Researcher¹;I.P. Ivanova, DSc, Head of the Department of Physicochemical Researches, Central Scientific Research Laboratory²

Для контактов: Пискарев Игорь Михайлович, e-mail: i.m.piskarev@gmail.com

¹Skobel'syn Institute of Nuclear Physics, Lomonosov Moscow State University, 1–2 Leninskiye Gory, Moscow, 119991, Russian Federation;

²Nizhny Novgorod State Medical Academy, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russian Federation

The aim of the investigation was to analyze the association between the ability of the substrate to oxidation and antioxidant activity according to the results of calculating the kinetics of chemiluminescence induced by Fenton reaction.

Materials and Methods. The chemiluminescence induced by Fenton reaction was measured with the help of BKhL-07 biochemiluminometer (Russia) with 10–15 repetitions. The registration time was 30 s. The following reagents were used for Fenton reaction: solution of FeSO_4 (10^{-3} mol/L in the acid medium, pH=2), solution of hydrogen peroxide (10^{-3} and 10^{-1} mol/L).

The chemiluminescence of albumin, hemoglobin, mixture of albumin and hemoglobin, well-known antioxidants: phenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$), resorcinol ($\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2$), pyrogallol ($\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})_3$), and mixtures of antioxidants with hemoglobin and albumin induced by Fenton reaction was studied.

To calculate the kinetics of chemiluminescence processes, a scheme of reactions describing the process was worked out. On the basis of this scheme a system of differential equations was set up, where concentrations of the substances, participating in the process, were variables. The number of equations was equal to the quantity of the substances, participating in the reaction.

Results. The light sum of the chemiluminescence induced by Fenton reaction monotonically decreases at concentrations of $[\text{H}_2\text{O}_2]=10^{-1}$ mol/L with the reduction of substrate concentration (with dilution). Dependence of S/S0 on the concentration of the fragments [RH] being oxidized, inhibitor [InH] and oxidized substance [ROOH] was calculated. There is no linear dependence between the light sum S/S0 and concentrations of [RH], [ROOH] and [InH] at $[\text{Fe}^{2+}] < [\text{H}_2\text{O}_2]$, therefore the results obtained were of a qualitative character.

Conclusion. The chemiluminescence induced by Fenton reaction enables the investigators to observe the products of reaction rather than radicals. Fenton reaction runs in actually any substrate. The level of the chemiluminescence light sum, initiated by hydroxyl radicals — Fenton reaction — is determined by the rate constants of the initiating, continuing and chain breaking reaction. Increase or decrease of the chemiluminescence light sum speaks of various values of these constants, but does not show an antioxidant activity, i.e. inhibition of the chain reaction due to the formation of inactive products. Therefore, the ability of the substrate to be oxidized under the given conditions can be evaluated according to the level of the chemiluminescence induced by hydroxyl radicals generated in Fenton reaction.

Key words: Fenton reaction; chemiluminescence kinetics; ability of a substrate for oxidation; antioxidant activity.

Реакция Фентона применяется в практике биомедицинских исследований [1–3]. Основное преимущество метода — в его оперативности, с которой он позволяет контролировать изменения окислительной способности биологических субстратов при патологических процессах и физико-химических воздействиях. В 2010 г. разработан прибор, ориентированный на измерение хемилюминесценции, индуцированной реакцией Фентона — БХЛ-07 (Россия), который сейчас выпускается серийно. Общие особенности кинетики хемилюминесценции были рассмотрены нами ранее [4, 5]. Установлено, что в реакции Фентона, инициированной перекисью водорода, светосумма S пропорциональна способности субстрата к окислению гидроксильными радикалами.

При исследовании индуцированной реакцией Фентона хемилюминесценции можно выделить два режима работы, когда $[\text{Fe}^{2+}] \geq [\text{H}_2\text{O}_2]$ и $[\text{Fe}^{2+}] < [\text{H}_2\text{O}_2]$. В первом случае двухвалентное железо окисляется до трехвалентного, двухвалентное железо расходует и время реакции определяется исходной концентрацией железа. Во втором случае окисленное трехвалентное железо регенерируется обратно в двухвалентное. На это расходуется перекись водорода. Время реакции оказывается существенно больше, чем в первом случае, и оно определяется концентрацией $[\text{H}_2\text{O}_2]$ [6, 7].

Случай $[\text{Fe}^{2+}] \geq [\text{H}_2\text{O}_2]$ рассмотрен в работе [4]. Было предложено измерять хемилюминесценцию при по-

следовательных разбавлениях пробы в 10 раз, начиная с исходной концентрации. Рассмотрена также зависимость светосуммы хемилюминесценции от концентрации (разведения) исходной пробы и от содержания в пробе гидроперекисей и антиоксидантов при концентрации реагентов $[\text{Fe}^{2+}] = [\text{H}_2\text{O}_2] = 10^{-3}$ моль/л. Светосумма достигает максимума при определенном разведении. Показано, что способность субстрата к окислению характеризуют светосумма и концентрация субстрата, когда выход свечения максимален. Недостатком такого режима является необходимость измерения хемилюминесценции при последовательных разведениях пробы, что занимает длительное время, и метод уже нельзя назвать экспресс-методом.

Представляет интерес исследовать характеристики светосуммы хемилюминесценции, индуцированной реакцией Фентона, для случая $[\text{Fe}^{2+}] < [\text{H}_2\text{O}_2]$ и сравнить их с характеристиками при $[\text{Fe}^{2+}] \geq [\text{H}_2\text{O}_2]$.

Цель исследования — анализ связи между способностью к окислению и антиоксидантной активностью субстрата по результатам расчета кинетики хемилюминесценции, индуцированной реакцией Фентона.

Материалы и методы. Измерения хемилюминесценции осуществляли с помощью биохемилуминометра БХЛ-07 (Н. Новгород, Россия) в 10–15 повторях. Чувствительность прибора составляла ~200 фотонов/с. Непосредственно перед началом работы проводили калибровку прибора по эталонному

источнику света [5]. Время измерения светосуммы S — 30 с. Фон (шумовой ток фотоэлектронного умножителя) вычитался автоматически. Прибор регистрировал амплитуду сигнала (интенсивность излучения I) и вычислял светосумму хемилюминесценции $S = \sum I_j$ за весь период измерения. Непосредственно измеряемой прибором величиной хемилюминесценции является напряжение, поэтому показатели S и I измеряли в милливольтгах (относительных единицах).

Состав пробы: 0,1 мл исследуемого субстрата; 0,4 мл растворителя (вода или раствор Хенкса); 0,4 мл раствора Fe^{2+} . Последним реагентом вводили 0,2 мл перекиси водорода, после чего сразу начинали регистрацию излучения — светосуммы S . Холостая проба — светосумма S_0 (реакция Фентона без исследуемого субстрата): 0,5 мл растворителя (вода или раствор Хенкса); 0,4 мл раствора Fe^{2+} и 0,2 мл перекиси водорода. Чтобы исключить влияние нестабильности аппаратуры, при анализе результатов использовали величину относительной светосуммы S/S_0 .

Кювета имела объем 2 мл и диаметр 1 см. Для реакции Фентона использовали следующие реактивы: раствор $FeSO_4$ (10^{-3} моль/л в кислой среде, $pH=2$), раствор перекиси водорода (10^{-3} и 10^{-1} моль/л). Поскольку в нейтральной среде двухвалентное железо нестабильно, для растворов железа готовили кислую среду путем добавления серной кислоты в дистиллированную воду.

Регистрировали индуцированную реакцией Фентона хемилюминесценцию альбумина, гемоглобина, смеси альбумина и гемоглобина, а также известных антиоксидантов: фенола C_6H_5OH , резорцина $C_6H_4(OH)_2$, пирогаллола $C_6H_3(OH)_3$. Кроме того, изучали также хемилюминесценцию смеси антиоксидантов с гемоглобином и альбумином. Концентрации альбумина 50 г/л ($7 \cdot 10^{-4}$ моль/л) и гемоглобина 70 г/л ($1,1 \cdot 10^{-3}$ моль/л) были близки их содержанию в крови. Концентрация антиоксидантов — 50 г/л. Антиоксиданты (фенол, резорцин, пирогаллол) для растворов альбумина и гемоглобина вводили непосредственно в пробу перед добавлением перекиси водорода в количестве 0,1 мл. Использовали бычий сывороточный альбумин, фракция V, молекулярная масса — 69 кДа, и гемоглобин бычий окисленный лиофилизированный, молекулярная масса — 64,5 кДа (BioWest, Франция). В обоих препаратах массовая доля белка составляла не менее 95%, массовая доля жира (липидов) — не более 1%. Остальные реактивы были химически чистые: дважды дистиллированная вода, $pH=6,5$; стерильный раствор Хенкса («БиолоТ», Россия).

Измерения хемилюминесценции начинали с регистрации светосуммы S вещества с исходной концентрацией, далее последовательно разбавляли его раствором Хенкса или водой в 10 раз, получали светосуммы при концентрациях 1, 10^{-1} , 10^{-2} , ..., 10^{-10} от исходной (разведения 0, -1, -2, ..., -10).

Расчет кинетики изучаемых процессов осуществ-

ляли следующим образом [4]. Составляли схему реакций, которая описывает процесс. В схему включали все вещества, участвующие в реакции. Так как константы скорости всех реакций известны, кинетику процесса можно рассчитать. Для этого на основе схемы реакций составляли систему дифференциальных уравнений, где переменными являлись концентрации участвующих в процессе веществ. В каждое уравнение входят скорости накопления и расходования вещества, концентрация которого рассматривается как переменная. Число уравнений равно числу веществ, участвующих в реакции. Задаются начальные условия, т.е. концентрации всех веществ в начальный момент времени. Решением являются концентрации всех участвующих в реакции веществ через заданные интервалы времени после начала реакции. Длительность этих интервалов и полное время реакции задаются как условия. Для решения системы дифференциальных уравнений использовали пакет программ MathCad 14.

Результаты. Зависимость светосуммы хемилюминесценции S/S_0 в реакции Фентона от концентрации (разведения) альбумина и гемоглобина водой (0, -1, -2, -3, -4) рассчитана при концентрации перекиси водорода 10^{-3} моль/л (рис. 1, а) и 10^{-1} моль/л (рис. 1, б). Из рис. 1, а видно, что для обоих испытываемых веществ светосумма при $[H_2O_2]=10^{-3}$ моль/л достигает максимума при определенном разведении: -1 — для альбумина и -2 — для гемоглобина. При $[H_2O_2]=10^{-1}$ моль/л (рис. 1, б) светосумма монотонно уменьшается с уменьшением концентрации пробы.

Изучение зависимости светосуммы хемилюминесценции от концентрации антиоксидантов: фенол, резорцин, пирогаллол при $[H_2O_2]=10^{-3}$ моль/л (рис. 2) показало, что фенол полностью гасит хемилюминесценцию, $S/S_0 < 1$. Два других вещества, которые являются более слабыми антиоксидантами, чем фенол, окисляются гидроксильными радикалами и поддерживают цепную реакцию, для них в максимуме хемилюминесценции $S/S_0 > 1$.

Для повышения статистической точности результатов анализировали средние значения светосумм в районе максимума хемилюминесценции (разведения от 0 до -4) и ниже максимума (разведения от -5 до -10). Средние значения для концентраций разных диапазонов (табл. 1) показывают, что для фенола при разведениях от 0 до -4 $S/S_0=0,78$, т.е. с учетом ошибок измерений заметно меньше 1. Это означает, что фенол не позволяет развиваться цепной реакции перекисного окисления, инициируемой гидроксильными радикалами, образующимися в реакции Фентона. Резорцин и пирогаллол — более слабые антиоксиданты, в них цепная реакция хоть и слабо, но развивается. При больших разведениях (от -5 до -10) средняя светосумма для всех испытанных веществ близка к единице.

Гемоглобин и альбумин окисляются гидроксильными радикалами, при этом возникает хемилюминесцен-

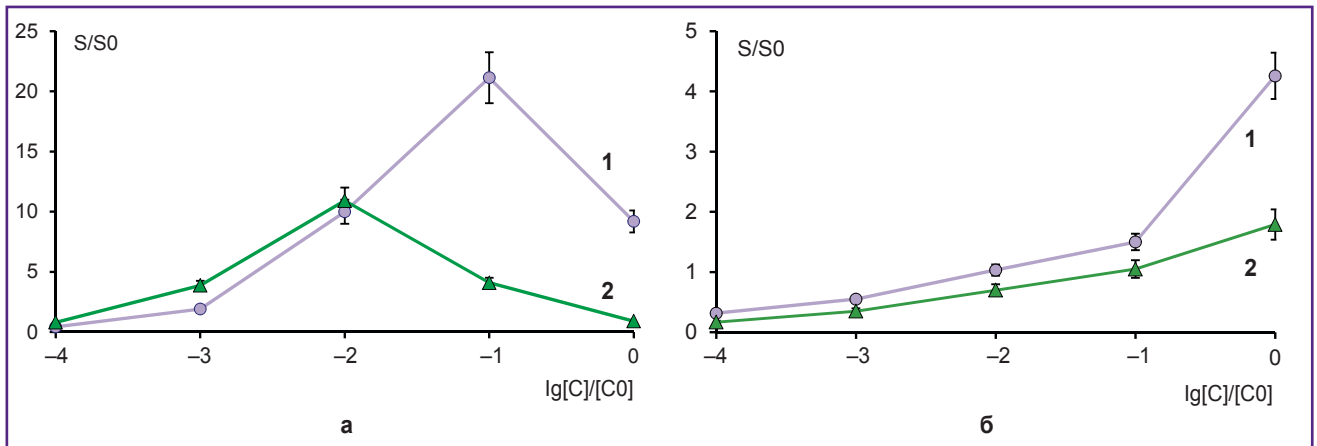
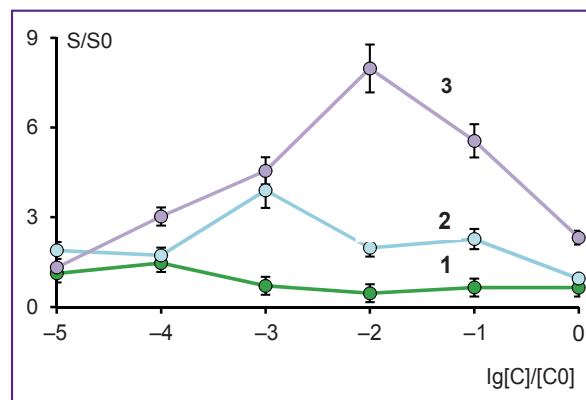


Рис. 1. Зависимость светосуммы хемилюминесценции S/S_0 от концентрации (разведения) пробы $\lg[C]/[C_0]$ для водного раствора альбумина 50 г/л (1) и гемоглобина 70 г/л (2) при концентрации $[Fe^{2+}] = 10^{-3}$ моль/л и $[H_2O_2] = 10^{-3}$ моль/л (а) и 10^{-1} моль/л (б). Эксперимент

Рис. 2. Зависимость светосуммы S/S_0 от разбавления исходного раствора $\lg[C]/[C_0]$ для антиоксидантов: 1 — фенол, 2 — резорцин, 3 — пиригаллол. Начальная концентрация каждого вещества — 50 г/л. $[Fe^{2+}] = [H_2O_2] = 10^{-3}$ моль/л. Эксперимент



ция. Добавление фенола в пробы гемоглобина или альбумина полностью прекращает хемилюминесценцию, $S/S_0 = 1$. Добавление более слабых антиоксидантов уменьшает светосумму хемилюминесценции, но не останавливает хемилюминесценцию полностью.

Любопытен случай, когда смешиваются два вещества, дающие разную светосумму: альбумин и гемоглобин. Средняя светосумма раствора альбумина — $12,4 \pm 2,1$ — существенно превышает светосумму раствора гемоглобина — $4,0 \pm 0,5$. Для их смеси светосумма оказалась равной $4,4 \pm 0,7$ (см. табл. 1).

Светосуммы хемилюминесценции альбумина, гемоглобина и их смеси для разных концентраций перекиси водорода — 10^{-3} и 10^{-1} моль/л (табл. 2) показали, что оба вещества не являются идеальными антиоксидантами, они окисляются гидроксильными радикалами в цепной реакции. Следует отметить, что светосумма в максимуме хемилюминесценции при $[H_2O_2] = 10^{-3}$ моль/л существенно больше, чем максимальная светосумма при $[H_2O_2] = 10^{-1}$ моль/л. Светосумма, регистрируемая при окислении гемоглобина для обеих концентраций перекиси водорода, оказывается меньше, чем при окислении альбумина. В смеси гемоглобина и

Т а б л и ц а 1

Хемилюминесценция S/S_0 в реакции Фентона при $[Fe^{2+}] = [H_2O_2] = 10^{-3}$ моль/л для разных разведений пробы

Вещество	Средняя светосумма S/S_0 при разведениях	
	от 0 до -4	от -5 до -10
Фенол	$0,78 \pm 0,10$	
Резорцин	$2,16 \pm 0,25$	$1,31 \pm 0,30$
Пиригаллол	$4,66 \pm 0,50$	
Гемоглобин	$4,0 \pm 0,5$	$1,03 \pm 0,20$
Гемоглобин + фенол	$1,0 \pm 0,2$	$0,97 \pm 0,20$
Гемоглобин + резорцин	$1,53 \pm 0,30$	$0,75 \pm 0,20$
Гемоглобин + пиригаллол	$3,7 \pm 0,6$	$1,16 \pm 0,20$
Альбумин	$12,4 \pm 2,1$	$1,08 \pm 0,20$
Альбумин + фенол	$1,02 \pm 0,20$	$0,44 \pm 0,20$
Альбумин + резорцин	$1,22 \pm 0,20$	$0,84 \pm 0,20$
Альбумин + пиригаллол	$7,2 \pm 1,3$	$1,05 \pm 0,20$
Альбумин + гемоглобин	$4,4 \pm 0,7$	$1,2 \pm 0,2$

Таблица 2

Светосумма в реакции Фентона для альбумина (50 г/л), гемоглобина (70 г/л) и смеси альбумин + гемоглобин с теми же концентрациями при $[Fe^{2+}] = 10^{-3}$ моль/л и разных концентрациях перекиси водорода

Вещество	Светосумма S/S0	
	$[H_2O_2] = 10^{-3}$ моль/л	$[H_2O_2] = 10^{-1}$ моль/л
Альбумин	21,1±0,8 (-1)	4,25±0,30
Гемоглобин	10,8±0,5 (-2)	1,79±0,20
Альбумин + гемоглобин	12,04±0,60 (-2)	3,02±0,30

Примечание. В скобках указаны разведения, при которых наблюдается максимум хемиллюминесценции для $[H_2O_2] = 10^{-3}$ моль/л.

альбумина светосумма больше, чем для гемоглобина, но меньше, чем для альбумина.

Обсуждение

Механизм цепного окисления в реакции Фентона в присутствии антиоксидантов и гидроперекисей. Схема реакций, происходящих при цепном окислении органического вещества RH в реакции Фентона, представлена в табл. 3. Константы скорости реакций были проанализированы в работе [8].

В реакции с перекисью водорода (реакция 1, табл. 3) образуется гидроксильный радикал, имеющий наибольший окислительный потенциал $E_{ox}(OH^{\cdot}) = 2,8$ В. Этот потенциал относится к реакции $OH^{\cdot} + H^+ + e^- \rightarrow H_2O$, в которой предполагается, что концентрация ионов водорода равна 1 моль/л, что соответствует кислой среде, $pH = 0$. В нейтральной среде окислительный потенциал меньше в соответствии с уравнением Нернста: он уменьшается на 0,059 В с увеличением pH на 1 единицу. Потенциалы других окислителей, относящихся к активным формам кислорода, в кислой среде существенно меньше: $E_{ox}(O^{\cdot}) = 2,42$ В; $E_{ox}(O_3) = 2,07$ В; $E_{ox}(H_2O_2) = 1,76$ В; $E_{ox}(HO_2^{\cdot}) = 1,5$ В; синглетный кислород $E_{ox}(^1O_2) = 0,94$ В [9].

В реакции с гидроперекисью (реакция 2, табл. 3) образуется существенно менее активный органический радикал RO^{\cdot} , окислительный потенциал которого определяется природой радикала R и составляет около 0,7 В. Радикалы OH^{\cdot} и RO^{\cdot} могут инициировать цепной процесс, начало которому дают реакции 3, 4. В обоих случаях цепной процесс развивается при наличии окисляющегося вещества RH.

Хемиллюминесценция, индуцированная реакцией Фентона, обусловлена свечением димера синглетного кислорода, образующегося в процессе реакций, инициируемых гидроксильными радикалами [4]. Кроме синглетного кислорода в реакции Фентона образуются гидроперекиси, которые не дают свечения и не могут быть непосредственно зарегистрированы.

Сами радикалы, образовавшиеся при первичном взаимодействии перекисей с двухвалентным железом,

могут гибнуть во взаимодействиях между собой, образуя неактивные продукты (реакции 5, 6). Продолжение цепи — реакции 7, 8, 9. Скорость цепного процесса определяется константой скорости реакции 8 с окисляющимся веществом RH, величина которой мала и в большинстве случаев составляет от 1 до 60 л(моль·с)⁻¹. В процессе цепной реакции образуются гидроперекиси (реакция 8) и синглетный кислород (реакция 9) [5]. Свечение димера синглетного кислорода регистрируется биохемиллюминиметром, при этом измеряется выход реакции 9. Несмотря на малую константу скорости реакции 8, она может давать решающий вклад, если концентрация $[RH] \gg [ROO^{\cdot}]$. При большой концентрации $[RH]$ свечение в реакции 9 может вообще не возникнуть, так как все радикалы ROO^{\cdot} будут расходоваться в реакции 8. На основании выхода реакции 9 можно судить о скорости цепного окисления гидроксильными радикалами с образованием только светящихся продуктов. Полная скорость цепного окисления определяется выходом реакций 8 и 9, в которых образуется гидроперекись и синглетный кислород.

Обычно в схемах окислительно-восстановительных процессов рассматриваются прооксиданты (вещества, которые поддерживают цепную реакцию) и антиоксиданты (вещества, которые тормозят цепную реакцию). Под действием антиоксидантов свободные радикалы переводятся в неактивную форму, в результате чего иницирование цепной реакции замедляется или полностью прекращается. Особенность цепной реакции заключается в том, что она не ограничивается только первым актом иницирования. В силу закона сохранения свободной валентности, который выполняется в большинстве случаев, один радикал не может погибнуть, радикалы образуются и гибнут парами. В результате первичной реакции с радикалом образуется вторичный радикал, который может снова вступить в реакцию, если его активность достаточно велика. Свободный радикал может инактивироваться только в

Таблица 3

Схема иницирования цепного окисления в реакции Фентона

№ реакции	Реакция	Константа скорости, л(моль·с) ⁻¹ [8]
1	$HO_2H + Fe^{2+} \rightarrow OH^{\cdot} + Fe^{3+} + OH^-$	56
2	$RO_2H + Fe^{2+} \rightarrow RO^{\cdot} + Fe^{3+} + OH^-$	50
3	$RH + OH^{\cdot} \rightarrow R^{\cdot} + H_2O$	10^7
4	$RH + RO^{\cdot} \rightarrow R^{\cdot} + ROH$	$10^3 - 10^4$
5	$RO^{\cdot} + RO^{\cdot} + M \rightarrow ROOR + M$	$10^4 - 10^5$
6	$OH^{\cdot} + OH^{\cdot} \rightarrow H_2O + \frac{1}{2}O_2$	10^9
7	$R^{\cdot} + O_2 + M \rightarrow ROO^{\cdot} + M$	10^5
8	$ROO^{\cdot} + RH \rightarrow ROOH + R^{\cdot}$	1–60
9	$ROO^{\cdot} + ROO^{\cdot} \rightarrow ROOR + ^1O_2$	10^5
10	$OH^{\cdot} + InH \rightarrow H_2O + In^{\cdot}$	10^9
11	$ROO^{\cdot} + InH \rightarrow ROOH + In^{\cdot}$	10^8
12	$ROOH + OH^{\cdot} \rightarrow ROO^{\cdot} + H_2O$	10^7

результате взаимодействия с другим радикалом, либо цепная реакция может замедлиться или практически остановиться, если вторичный радикал окажется малоактивным.

Вещество, которое полностью предотвращает как иницирование, так и развитие цепной реакции, называется ингибитором InH . Ингибирование цепного окисления заключается в том, что применяется вещество, которое с высокой скоростью взаимодействует с радикалом. Взаимодействуя с первичным радикалом (инициатором, например OH^\cdot) или со вторичным радикалом, образующимся в процессе цепной реакции ROO^\cdot , ингибитор InH дает малоактивный вторичный радикал In^\cdot (реакции 10, 11, табл. 3).

В реакции 10 ингибитор перехватывает первичный радикал OH^\cdot , предотвращая начало цепной реакции, а в реакции 11 — вторичный радикал ROO^\cdot , образовавшийся после иницирования реакции гидроксильным радикалом, и предотвращает продолжение цепи. Цепное окисление испытываемого вещества RH иницируется и продолжается в реакциях 3–9.

Анализ схемы цепной реакции с участием ингибитора (реакции 3–11) позволяет сделать вывод, что есть два способа подавлять цепную реакцию: применять ловушку для первичных радикалов, иницирующих реакцию (реакция 10), либо ловушку для вторичных радикалов, образующихся на стадии продолжения цепи (реакция 11). Так как свойства первичных и вторичных радикалов разные (в рассмотренном примере первичным является радикал OH^\cdot , а вторичным — радикал ROO^\cdot), то и ловушки для них в общем случае могут быть разные. Таким образом, можно говорить, что ловушки для первичных радикалов, иницирующих цепную реакцию, обладают антирадикальной активностью, а ловушки для вторичных радикалов, образующихся на стадии продолжения цепи, обладают антиоксидантной активностью.

Однако схема ингибирования на основе реакций 10 и 11 является сильно упрощенной. Каждый ингибитор (антиоксидант) имеет свою, характерную только для него схему превращения в неактивный продукт после первичного взаимодействия с радикалами. Примером служит схема окисления аскорбиновой кислоты, рассмотренная в работе [10]. К тому же ингибитор может взаимодействовать только с определенными радикалами.

Процессы ингибирования цепных реакций детально были изучены для защиты полимерных материалов от термоокислительной деструкции [11]. В этом случае защищается одно определенное соединение от радикалов известной природы. В биологии задача существенно усложняется [12, 13]. Например, в пробах крови присутствуют разные вещества, точный состав которых не известен, поэтому природа первичных радикалов, которые иницируют окисление, также может быть различной.

Когда в составе пробы обнаруживаются несколько веществ, возможны два варианта интерпретации ре-

зультатов. Если одно вещество — антиоксидант и не поддерживает цепную реакцию, то все или большая часть гидроксильных радикалов расходуется на окисление этого вещества и цепная реакция окисления других веществ сильно подавляется. Практически полное подавление хемилюминесценции при добавлении в пробу конкретного вещества может означать, что это вещество обладает сильной антирадикальной активностью и поглощает все гидроксильные радикалы.

Если все вещества могут участвовать в цепной реакции, то первичные гидроксильные радикалы иницируют окисление всех веществ. Соотношение выходов продуктов окисления этих веществ определяется концентрацией самих веществ и соотношением констант скоростей реакций иницирования, продолжения и обрыва цепи.

Может оказаться, что окисляться будет преимущественно одно из этих веществ. Тогда можно говорить, что это вещество будет обладать антиоксидантным эффектом по отношению к другим. Эффект можно считать установленным, если мы будем наблюдать продукты цепной реакции. На основании только величины светосуммы многокомпонентного субстрата сделать однозначный вывод об антиоксидантных свойствах какого-либо вещества практически невозможно. Такая ситуация иллюстрируется данными по смеси альбумина и гемоглобина (см. табл. 2). Светосумма смеси оказалась больше светосуммы гемоглобина, но меньше — альбумина. Сделать отсюда вывод, что гемоглобин обладает антиоксидантными свойствами по отношению к альбумину, нельзя. Анализ продуктов окисления и расходования исходных веществ показывает, что антиоксидантными свойствами по отношению к другим компонентам крови обладает именно альбумин [14].

Особенности протекания реакции Фентона при разных концентрациях перекиси водорода

Случай 1: $[\text{Fe}^{2+}] \gg [\text{H}_2\text{O}_2]$, $[\text{Fe}^{2+}] = 10^{-3}$ моль/л, концентрация перекиси водорода — 10^{-3} моль/л. Зависимость светосуммы хемилюминесценции при последовательных разведениях пробы в 10 раз исследована экспериментально. Эта зависимость для альбумина (разбавления $\lg[C]/[C_0] = 0, -1, -2, -3, -4$) представлена на рис. 1, кривая 1. Видно, что светосумма достигает максимума при разбавлении -1 , для исходной концентрации (разбавление 0) светосумма меньше, а при более сильных разбавлениях ($-2, -3, -4$) светосумма также уменьшается. Для гемоглобина ситуация аналогична (рис. 1, кривая 2), но максимум хемилюминесценции наблюдается при разбавлении -2 . Эффект уменьшения хемилюминесценции при большой концентрации $[\text{RH}]$ в обоих случаях связан с расходом ROO^\cdot в реакции 8, так что реакция 9 оказывается подавленной [4]. Молекулярная масса альбумина — 69 кДа, гемоглобина — 64,5 кДа, их содержание в исходном растворе — 50 и 70 г/л, что соответствует концентрации $\sim 10^{-3}$ моль/л. Расчеты показали, что подавление хемилюминесценции в реакции 8 возможно при кон-

центрации $[RH] \sim 1$ моль/л и более [5]. Наблюдение эффекта подавления хемилюминесценции может означать, что в реакциях 3 и 8 (табл. 3) участвует не весь белок как целое, а его фрагменты RH. При концентрации белковых молекул $\sim 10^{-3}$ моль/л концентрация окисляющихся фрагментов может быть существенно больше и составлять 1–10 моль/л, поэтому мы наблюдаем подавление свечения при концентрациях белковых молекул $\sim 10^{-3}$ моль/л.

Расчет зависимости параметров хемилюминесценции от концентрации реагентов выполнен в работе [15]. Показано, что концентрация окисляющихся фрагментов $[RH]$ определяет положение максимума хемилюминесценции (разведение пробы). Ингибитор InH и гидроперекиси $ROOH$, которые могут входить в состав пробы, уменьшают светосумму хемилюминесценции, и величина светосуммы в максимуме определяется отношением $[InH]/[RH]$ и $[ROOH]/[RH]$.

Особенность рассмотренного режима заключается в том, что хемилюминесценция определяется только выходом светящихся продуктов в реакции 9. Гидроперекиси, которые также являются продуктом цепной реакции, не дают вклада в хемилюминесценцию, и получаемая информация является не полной.

Случай 2: $[Fe^{2+}] < [H_2O_2]$, $[Fe^{2+}] = 10^{-3}$ моль/л, концентрация перекиси водорода — 10^{-1} моль/л. Когда концентрация перекиси водорода больше концентрации железа, двухвалентное железо, окисленное до трехвалентного в реакции Фентона, регенерируется (восстанавливается) в двухвалентное. При этом расходуется перекись, и процесс будет продолжаться до тех пор, пока перекись полностью не израсходуется [7]. Продолжительность реакции определяется концентрацией перекиси водорода, и она будет превышать 30 с (выбранное время измерения хемилюминесценции). Но основное количество актов реакции происходит в первые доли секунды, после чего хемилюминесценция уменьшается [4]. Накопления органических гидроперекисей не происходит, так как они сразу расходуются в реакции с двухвалентным железом (реакция 2, табл. 3). Возникающее при этом свечение пропорционально выходам реакций 8 и 9. Концентрация двухвалентного железа не падает быстро, как в случае 1, а за счет регенерации поддерживается на почти постоянном уровне [7]. Из-за ограниченного быстродействия регистрирующей аппаратуры часть информации (часть светосуммы, высветившейся во время переднего фронта импульса хемилюминесценции) теряется, но зато зарегистрированная светосумма пропорциональна сумме выходов реакций 8 и 9, т.е. полному выходу продуктов цепной реакции. При стабильном воспроизведении условий эксперимента в разных опытах светосумма будет пропорциональна полной окислительной способности пробы.

Расчет кинетики хемилюминесценции для случая $[Fe^{2+}] < [H_2O_2]$. В рамках схемы из 25 реакций, описанной ранее [4], в которую дополнительно включены реакции с ингибитором и реакция гидроперекиси с ги-

дроксильным радикалом (реакции 10–12, табл. 3), рассчитана зависимость относительной светосуммы S/S_0 от концентрации в пробе окисляющихся фрагментов $[RH]$. Для расчета кинетики решалась система из 15 дифференциальных уравнений. При этом предполагалось, что константа скорости реакции гидроксильных радикалов с ингибитором составляла 10^9 л(моль·с) $^{-1}$, а с веществом RH — 10^7 л(моль·с) $^{-1}$. Константы скорости остальных реакций выбраны наиболее характерными для биологических субстратов [8]. Под концентрацией $[RH]$ в случае высокомолекулярного соединения (белка) подразумевалась концентрация фрагментов этого соединения, способных независимо окисляться. Концентрация белков в крови, также как в рассмотренном выше случае 1 ($[Fe^{2+}] \geq [H_2O_2]$), составляла порядка 10^{-3} моль/л, в то время как концентрация окисляющихся групп $[RH]$ могла достигать 1 моль/л и более. Результаты расчета представлены на рис. 3. Видно, что светосумма S/S_0 монотонно растет с ростом концентрации $[RH]$. Следует подчеркнуть, что эта зависимость — нелинейная. Это видно как из расчета, так и из экспериментальных данных (рис. 1, б).

При концентрации окисляющихся фрагментов $[RH]$, равной 10 моль/л, рассчитана зависимость S/S_0 от концентраций ингибитора $[InH]$ и окисленного вещества $[ROOH]$ (рис. 4). С ростом концентрации ингибитора и гидроперекиси светосумма уменьшается. Видно, что при равных концентрациях ингибитора и гидроперекиси гидроперекись сильнее уменьшает светосумму, чем ингибитор. Связано это с тем, что гидроперекись взаимодействует с железом (реакция 2, табл. 3), расходует его, уменьшая выход радикалов в реакции Фентона. Концентрация железа в реакции 2 больше, чем концентрация радикалов ROO^* , с которыми взаимодействует ингибитор (реакция 11). Поэтому влияние гидроперекисей на величину светосуммы оказывается сильнее, несмотря на большую разницу величины констант реакций 2 и 11.

Таким образом, при наличии в пробе гидроперекиси она будет расходовать двухвалентное железо, уменьшая тем самым выход гидроксильных радикалов и светосумму хемилюминесценции, индуцированной реакцией Фентона. Подчеркнем, что гидроперекись не является антиоксидантом. Взаимодействие гидроперекиси с гидроксильным радикалом (реакция 12) поддерживает цепную реакцию. Однако гидроперекись уменьшает количество первичных гидроксильных радикалов путем снижения концентрации реагентов и тем самым уменьшает светосумму хемилюминесценции. Если в исходной пробе много гидроперекисей, проба сильно окислена, то хемилюминесценция будет подавлена. Уменьшение хемилюминесценции окисленной пробы по сравнению с пробой того же состава, но не окисленной, не будет означать, что в пробе есть антиоксиданты. Это будет только означать, что окислительная способность предварительно окисленной пробы меньше, чем неокисленной. Это является особенностью протекания реакции Фентона, а не свойством субстрата.

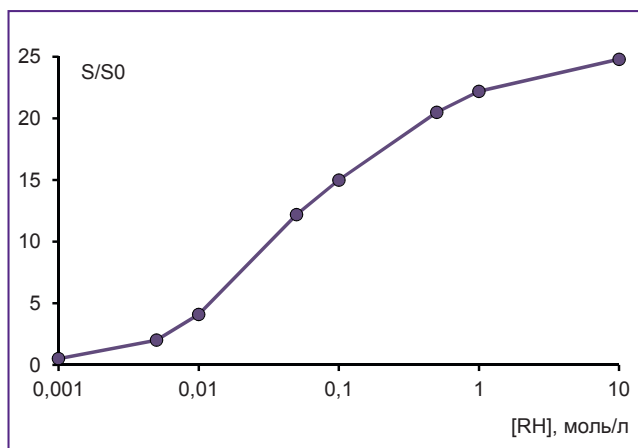


Рис. 3. Зависимость светосуммы хемиллюминесценции S/S0 в реакции Фентона при $[\text{Fe}^{2+}] = 10^{-3}$ моль/л и $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0,1$ моль/л от концентрации окисляющегося вещества [RH]. Расчет

Случай 2 ($[\text{Fe}^{2+}] < [\text{H}_2\text{O}_2]$) позволяет более оперативно оценивать способность субстрата к окислению, но случай 1 ($[\text{Fe}^{2+}] \geq [\text{H}_2\text{O}_2]$) дает возможность получать дополнительную информацию о составе пробы [15].

Линейной зависимости между какой-либо характеристикой испытываемого вещества и регистрируемой светосуммой хемиллюминесценции не существует. Это видно как из экспериментальных данных (см. рис. 1), так и из расчетных (см. рис. 3, 4). Во всех случаях при $[\text{Fe}^{2+}] < [\text{H}_2\text{O}_2]$ светосумма уменьшается с ростом концентрации антиоксиданта [InH], гидроперекиси [ROOH] и увеличивается с ростом [RH]. Линейная зависимость имеется только при $[\text{Fe}^{2+}] = [\text{H}_2\text{O}_2] = 10^{-3}$ моль/л (случай 1) между концентрацией [RH] и разведением, при котором наблюдается максимум хемиллюминесценции. Таким образом, при $[\text{Fe}^{2+}] < [\text{H}_2\text{O}_2]$ отсутствует линейная зависимость между светосуммой S/S0 и концентрациями [RH], [ROOH] и [InH], поэтому получаемые результаты носят качественный характер.

Связь светосуммы в реакции Фентона с антиоксидантной активностью пробы. Реакция перекисного окисления органического вещества RH является цепной, и малое первичное воздействие приводит к большим конечным повреждениям в объекте. Задача антиоксиданта — прервать цепь окисления или не допустить ее возникновения. Снижение скорости развития цепного окисления также имеет большое значение для поддержания равновесия в системе, баланса антиоксидантов и прооксидантов.

В биологии термин «антиоксидант», а в химии полимеров «ингибитор» — это вещество, которое после взаимодействия с радикалом образует малоактивный радикал, который не может участвовать в продолжении цепи. После введения в систему антиоксидант расходуется, и когда он израсходуется, цепная реакция продолжится.

Применительно к биологии термин «антиоксидант»

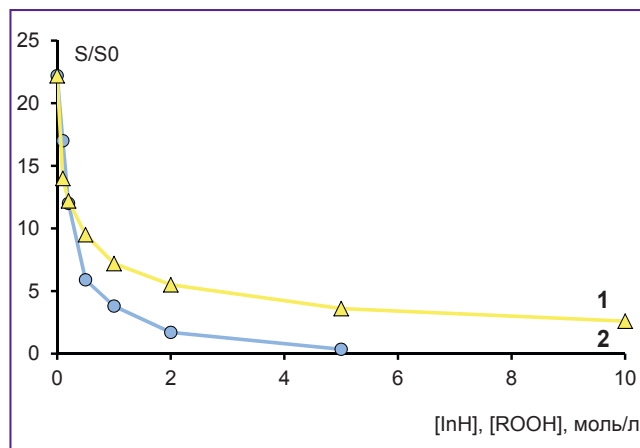


Рис. 4. Зависимость светосуммы S/S0 от концентрации (моль/л) гидроперекиси ROOH (1) и ингибитора InH (2) при концентрации окисляющегося вещества [RH], равной 10 моль/л; $[\text{Fe}^{2+}] = 10^{-3}$ моль/л; $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10^{-1}$ моль/л. Расчет

можно определить следующим образом: это вещество, которое, присутствуя в малых концентрациях относительно окисляющегося субстрата, значительно замедляет или предотвращает окисление последнего. Окислителями являются активные формы кислорода и азота, в большинстве случаев это радикалы. Однако существуют активные частицы разного типа. Они могут не быть радикалами, к таким частицам относятся пероксинитрит, азотистая и пероксиазотистая кислота. Антиоксидант может перехватывать активную частицу (взаимодействовать в первую очередь с ней) либо предотвращать ее образование. Таким образом, антиоксидант должен быть ориентирован на объект, который необходимо защищать.

Для характеристики антиоксидантной способности используют разные понятия [16–18]: полная антиокислительная способность (total antioxidant capacity, TAC), полная реакция антиоксидантов (total antioxidant response, TAR). Поскольку антиоксиданты ориентированы на определенный вид радикалов, то используют понятия, ориентированные на вид поглощаемых радикалов: способность поглощать кислородные радикалы (oxygen radical absorbance capacity, ORAC). Характеристики испытываемых веществ связывают с характеристиками известных антиоксидантов, например эквивалентная Тролоксу антиокислительная способность (Trolox-equivalent antioxidant capacity, TEAC). Наиболее общим является параметр, характеризующий способность антиоксиданта поглощать все радикалы (total radical trapping antioxidant parameter, TRAP). Величина TRAP равна сумме концентраций всех антиоксидантов, умноженной на стехиометрический коэффициент каждой реакции. При этом содержание каждого антиоксиданта определяется отдельно. Характеристики радикалов, возникающих в биологических объектах, и их реакции рассмотрены в работах [19, 20].

Для биологических субстратов важным является баланс «прооксидант–антиоксидант» (prooxidant anti-oxidant balance, PAB). Были выполнены работы, в которых такой баланс определялся в одном опыте [21, 22]. Для оценки баланса использовалась способность реагента ТМВ (3,3'.5,5'-tetramethylbenzidine.2HCl, T-3405) в водном растворе менять цвет: при окислении ТМВ раствор окрашивается, измеряется оптическая плотность при $\lambda=450$ нм относительно оптической плотности линий 620 или 570 нм. При восстановлении раствор обесцвечивается. Метод не работает, если восстановительная способность пробы превышает окислительную способность, раствор будет все время бесцветным.

При исследовании антиоксидантной активности всегда используется искусственный источник свободных радикалов (инициатор окисления), воздействию которого подвергается испытываемое вещество. Затем регистрируются либо промежуточные продукты процесса окисления, либо снижение концентрации исходного вещества. Процесс окисления характеризуется также потреблением кислорода, который можно измерять. Для количественной характеристики антиоксидантной активности исследуемой пробы сравнивают антиоксидантные показатели пробы с показателями антиоксиданта, принятого за эталон. Разные инициаторы окисления генерируют разные свободные радикалы. Поэтому для конкретной задачи важно знать, для каких именно радикалов нужно исследовать антиоксидантную активность.

В качестве одного из экспресс-методов оценки антиоксидантной способности применяется наблюдение регистрируемой биохемилюминометром хемилюминесценции при введении в пробу двухвалентного железа [23, 24]. При наличии в пробе гидроперекиси двухвалентное железо позволяет длительное время генерировать радикалы ROO^{\cdot} , которые идентифицируются по образованию синглетного кислорода.

В качестве источника свободных радикалов ROO^{\cdot} в работе [24] использовали 2,2'-азо-бис(2-амидинопропан)дигидрохлорид (АБАПД) или 2,2'-азо-бис(2-амидинопропан) (АБАП), а возникающее при нагревании препарата излучение усиливали люминолом. При $37^{\circ}C$ эти вещества разлагаются с образованием двух радикалов R^{\cdot} и газообразного азота. Период полураспада АБАП составляет 195 ч, поэтому после установления стационарного режима он представляет собой источник радикалов практически постоянной интенсивности. После соединения с кислородом воздуха ($R^{\cdot}+O_2$) образуются радикалы ROO^{\cdot} , которые инициируют свечение люминола. В случае добавления вещества, которое обладает антиоксидантными свойствами, оно перехватывает радикалы ROO^{\cdot} и влияет на свечение: уменьшает, если цепь окисления прерывается, но может и увеличивать свечение, если радикалы ROO^{\cdot} инициируют продолжение цепной реакции. В реакции с радикалами антиоксидант расходуется. Антиоксидантная способность пропорциональна

длительности периода индукции: чем он больше, тем больше антиоксидантная способность. Зависимость периода индукции от концентрации вводимого антиоксиданта оказывается линейной [23–25]. Метод наблюдения периода индукции не работает, если окислительная способность превышает восстановительную, так как свечение будет появляться сразу после введения железа.

Рассмотрим возможности применения реакции Фентона для оценки антиоксидантной активности. Реакция Фентона является источником гидроксильных радикалов, способных окислять практически любые вещества, в том числе и все антиоксиданты. Хемилюминесценцию вызывают продукты взаимодействия гидроксильных радикалов с веществами. Только очень сильные антиоксиданты, такие как фенол, полностью гасят хемилюминесценцию и не поддерживают цепную реакцию. Поэтому в реакции Фентона можно говорить о способности субстрата к окислению гидроксильными радикалами. При этом, в связи с отсутствием строго линейной зависимости между характеристиками пробы (концентрациями $[RH]$, $[InH]$, $[ROOH]$) получаемые результаты являются качественными.

Традиционно применяемые методы определения антиоксидантной активности основаны на том, что в них определяется количество радикалов, вырабатываемых реагентом, генерирующим радикалы. Далее регистрируется уменьшение их концентрации после введения антиоксиданта, связанное с поглощением радикалов. Если антиоксидант сильный и сразу поглощает все радикалы, то радикалы исчезают и наблюдается период индукции, т.е. время, через которое антиоксидант израсходуется, и радикалы снова появятся. В этих методах происходит поглощение радикалов антиоксидантами, что является прямым доказательством наличия антиоксиданта и его активности.

В отличие от этого в реакции Фентона наблюдаются продукты реакции, а не сами радикалы. Притом реакция возникает практически с любым веществом. Выход продуктов реакции, инициированной гидроксильными радикалами, определяется константами скорости реакций инициирования, продолжения и обрыва цепи. Увеличение или уменьшение выхода свидетельствует о разных значениях этих констант, но не указывает на подавление цепной реакции путем образования неактивных продуктов. Поэтому нельзя доказать, как способность субстрата к окислению гидроксильными радикалами связана с антиоксидантной способностью пробы.

Можно указать на возможность определения антиоксидантной активности с использованием реакции двухвалентного железа с гидроперекисью (реакция 2, табл. 3). После реакций 4 и 7 образуется радикал ROO^{\cdot} . Этот радикал идентифицируется в реакции 9 по свечению димера синглетного кислорода. При введении в пробу испытываемого вещества, являющегося антиоксидантом и расходующим радикалы ROO^{\cdot} , све-

чение, возникающее в реакции 9, будет уменьшаться. Если вещество является прооксидантом и поддерживает цепную реакцию, свечение будет увеличиваться. Используемая в такой реакции гидроперекись должна быть сильным окислителем. Например, можно использовать гидропероксид трет-бутила. Поэтому исследование хемилюминесценции, возникающей в реакциях гидроперекисей с двухвалентным железом, может представлять интерес для дальнейших исследований.

Заключение. Гидроксильные радикалы, генерируемые в реакции Фентона, инициируют протекание в субстрате цепной реакции. Продуктами цепной реакции являются гидроперекись и синглетный кислород. Характеристики хемилюминесценции, возникающей в реакции Фентона, определяются соотношением концентраций двухвалентного железа и перекиси водорода.

При $[Fe^{2+}] \gg [H_2O_2]$ двухвалентное железо расходуется, светосумма хемилюминесценции определяется выходом светящихся продуктов (синглетного кислорода). Время реакции определяется концентрацией двухвалентного железа. Образующиеся в цепной реакции гидроперекиси остаются неидентифицированными.

При $[Fe^{2+}] < [H_2O_2]$ окисленное до трехвалентного состояния железо регенерируется в двухвалентное. Время реакции определяется концентрацией перекиси водорода. Светосумма хемилюминесценции пропорциональна суммарному выходу гидроперекиси и синглетного кислорода. Светосумма увеличивается с ростом концентрации окисляющихся групп [RH] и уменьшается с ростом концентрации ингибитора [InH] и гидроперекиси [ROOH], уже накопленной в пробе. Линейной зависимости между светосуммой и характеристиками пробы нет, поэтому получаемые результаты носят качественный характер.

Светосумма в реакции Фентона характеризует способность субстрата к окислению и в общем случае никак не связана с антиоксидантной способностью пробы.

Финансирование исследования и конфликт интересов. Исследование не финансировалось какими-либо источниками, и конфликты интересов, связанные с данным исследованием, отсутствуют.

Литература/References

1. Алясова А.В., Конторщикова К.Н., Терентьев И.Г., Иванова И.П., Кузнецов С.С., Сазанов А.И. Влияние низких терапевтических концентраций озонированного физиологического раствора на терапевтический патоморфоз опухоли в эксперименте. *Современные технологии в медицине* 2010; 4: 27–32. Alyasova A.V., Kontorshickova K.N., Terentiev I.G., Ivanova I.P., Kuznetsov S.S., Sazanov A.I. Influence of the ozonized physiologic salt solution low therapeutic concentrations on a tumor therapeutic pathomorphosis in experiment. *Sovremennyye tehnologii v medicine* 2010; 4: 27–32.
2. Иванова И.П. Изменение эндогенной токсичности

и уровня хемилюминесценции в крови животных-опухоленосителей после воздействия некогерентным световым излучением. *Нижегородский медицинский журнал* 2006; 2: 183–188. Ivanova I.P. Alteration of endogenous toxicity and chemiluminescence level in the blood of tumor bearing animals after incoherent light exposure. *Nizhegorodskiy meditsinskiy zhurnal* 2006; 2: 183–188.

3. Масленикова А.В., Щербатюк Т.Г., Лазарева В.А., Давыденко Д.В. Прогностическое значение параметров прооксидантного–антиоксидантного статуса больных местно-распространенным раком полости рта и глотки. *Медицинский альманах* 2009; 3: 110–113. Maslennikova A.V., Tcherbatyuk T.G., Lazareva V.A., Davyidenko D.V. Prognostic value of parameters of pro-oxidant and antioxidant status among patients with locally advanced intraoral and pharynx cancer. *Meditsinskiy al'manakh* 2009; 3: 110–113.

4. Ivanova I.P., Trofimova S.V., Piskarev I.M., Aristova N.A., Burhina O.E., Soshnikova O.O. Mechanism of chemiluminescence in Fenton reaction. *Journal of Biophysical Chemistry* 2012; 3(1): 88–100, <http://dx.doi.org/10.4236/jbpc.2012.31011>.

5. Иванова И.П., Трофимова С.В., Пискарев И.М. Хемилюминесценция, индуцированная реакцией Фентона, — математическое моделирование процесса; особенности, параметры и условия применения для биомедицинских исследований. *Современные технологии в медицине* 2014; 6(4): 14–25. Ivanova I.P., Trofimova S.V., Piskarev I.M. Fenton's reaction induced chemiluminescence is mathematical modeling of the process; characteristics, parameters and application conditions for biomedical studies. *Sovremennyye tehnologii v medicine* 2014; 6(4): 14–25.

6. Ermolin S.V., Ivanova I.P., Knyazev D.I., Trofimova S.V., Piskarev I.M. Mechanism of water luminescence upon radiolysis under the effect of background radiation. *Russian Journal of Physical Chemistry A* 2012; 86(6): 1029–1032, <http://dx.doi.org/10.1134/s003602441206009x>.

7. Аристова Н.А., Иванова И.П., Трофимова С.В., Князев Д.И., Пискарев И.М. Люминол-зависимое свечение, сопровождающее реакцию Фентона. *Электронный научный журнал «Исследовано в России»* 2011; 77–86, <https://istina.msu.ru/publications/article/1108350/>. Aristova N.A., Ivanova I.P., Trofimova S.V., Knyazev D.I., Piskarev I.M. Luminescence accompanying Fenton reaction. *Elektronnyy nauchnyy zhurnal "Issledovano v Rossii"* 2011; 77–86, <https://istina.msu.ru/publications/article/1108350/>.

8. Ivanova I.P., Piskarev I.M., Trofimova S.V. Initial stage of lipid peroxidation with HO₂ radicals. Kinetic study. *American Journal of Physical Chemistry* 2013; 2(2): 44–51, <http://dx.doi.org/10.11648/j.ajpc.20130202.13>.

9. *CRC handbook of chemistry and physics*. 95th edition. Editor-in-Chief Haynes W.M. CRC Press; 2014.

10. Ivanova I.P., Trofimova S.V., Piskarev I.M. Evaluation of prooxidant properties of ascorbic acid. *Biophysics* 2013; 58(4): 453–456, <http://dx.doi.org/10.1134/s0006350913040076>.

11. Музафаров А.М., Кузнецов А.А., Заремский М.Ю., Зеленецкий А.Н. Введение в химию высокомолекулярных соединений. М: Изд. МГУ; 2010. Muzafarov A.M., Kuznetsov A.A., Zaremskiy M.Yu., Zelenetskiy A.N. *Vvedenie v khimiyu vysokomolekulyarnykh soedineniy* [Introduction to the chemistry of high-molecular compounds]. Moscow: Izd. MGU; 2010.

12. Augusto O., Miyamoto S. Chapter II. Oxygen radicals

and related species. In: *Principles of free radical biomedicine*. Vol. 1. Pantopoulos K., Schipper H.M. (editors). Nova Science Publishers; 2011; p. 1–23.

13. Мукменева Н.А., Бухаров С.В., Черезова Е.Н., Нугуманова Г.Н. Фосфорорганические антиоксиданты и цветостабилизаторы полимеров. Казань: КГТУ; 2010; 296 с. Mukmeneva N.A., Bukharov S.V., Cherezova E.N., Nugumanova G.N. *Fosfororganicheskie antioksidanty i tsvetostabilizatory polimerov* [Organophosphorous antioxidants and polymer color stabilizers]. Kazan: KGTU; 2010; 296 p.

14. Taverna M., Marie A.-L., Mira J.P., Guidet B. Specific antioxidant properties of human serum albumin. *Annals of Intensive Care* 2013; 3(1): 4, <http://dx.doi.org/10.1186/2110-5820-3-4>.

15. Piskarev I.M., Trofimova S.V., Ivanova I.P., Burkina O.E. Investigation of the level of free-radical processes in substrates and biological samples using induced chemiluminescence. *Biophysics* 2015; 60(3): 400–408, <http://dx.doi.org/10.1134/s0006350915030148>.

16. Хасанов В.В., Рыжова Г.Л., Мальцева Е.В. Методы исследования антиоксидантов. Химия растительного сырья 2004; 3: 63–75. Khasanov V.V., Ryzhova G.L., Mal'tseva E.V. Methods for antioxidant study. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya* 2004; 3: 63–75.

17. Kusano C., Ferrari B. Total antioxidant capacity: a biomarker in biomedical and nutritional studies. *Journal of Cell and Molecular Biology* 2008; 7(1): 1–15.

18. Huang D., Ou B., Prior R.L. The Chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005; 53(6): 1841–1856, <http://dx.doi.org/10.1021/jf030723c>.

19. Занозина О.В., Боровков Н.Н., Щербатюк Т.Г. Свободно-радикальное окисление при сахарном диабете 2-го типа: источники образования, составляющие, патогенетические механизмы токсичности. Современные технологии в медицине 2010; 3: 104–112. Zanozina O.V., Borovkov N.N., Sherbatyuk T.G. Free-radical oxidation at a diabetes mellitus of the 2nd type: sources of formation,

components, pathogenetic mechanisms of toxicity. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2010; 3: 104–112.

20. Мартусевич А.А., Перетягин С.П., Мартусевич А.К. Молекулярные и клеточные механизмы действия синглетного кислорода на биосистемы. Современные технологии в медицине 2012; 2: 128–134. Martusevich A.A., Peretyagin S.P., Martusevich A.K. Molecular and cell mechanisms of singlet oxygen effect on biosystems. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2012; 2: 128–134.

21. Boskabadi H., Moeini M., Tara F., Tavallaie S., Saber H., Nejati R., Hosseini G., Mostafavi-Toroghi H., Ferns G.A.A., Ghayour-Mobarhan M. Determination of prooxidant–antioxidant balance during uncomplicated pregnancy using a rapid assay. *Journal of Medical Biochemistry* 2013; 32(3): 227–232, <http://dx.doi.org/10.2478/jomb-2013-0018>.

22. Alamdari D.H., Paletas K., Pegiou T., Sarigianni M., Befani C., Koliakos G. A novel assay for the evaluation of the prooxidant–antioxidant balance, before and after antioxidant vitamin administration in type II diabetes patients. *Clinical Biochemistry* 2007; 40(3–4): 248–254, <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2006.10.017>.

23. Vladimirov Y.A., Proskurnina E.V., Izmajlov D.Y. Kinetic chemiluminescence as a method for study of free radical reactions. *Biophysics* 2011; 56(6): 1055–1062, <http://dx.doi.org/10.1134/s0006350911060200>.

24. Владимиров Ю.А., Проскурина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция. Успехи биологической химии 2009; 49: 341–388. Vladimirov Yu.A., Proskurina E.V. Free radicals and cell chemiluminescence. *Uspekhi biologicheskoy khimii* 2009; 49: 341–388.

25. Алексеев А.В., Проскурина Е.В., Владимиров Ю.А. Определение антиоксидантов методом активированной хемилюминесценции с использованием 2,2'-азо-бис(2-амидинопропана). Вестник Московского университета. Серия 2. Химия 2012; 53(3): 187–193. Alexeev A.V., Proskurnina E.V., Vladimirov Yu.A. Determination of antioxidants by sensitized chemiluminescence using 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane). *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 2. Khimiya* 2012; 53(3): 187–193.