

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013121648/15, 08.05.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
08.05.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 08.05.2013

(45) Опубликовано: 20.07.2014 Бюл. № 20

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2200320 C1, 10.03.2003. RU 2194984 C2, 20.12.2002. RU 2146053 C1, 27.02.2000. Н.А.Кривова и др. Состояние слизистой оболочки желудка, про- и антиоксидантной активности и биохимических показателей крови у крыс после скармливания нано- или микрочастиц диоксида титана. Вестник Томского государственного университета. Биология. 2011. N 2 (14). С.81-95. RU 2130181 C1, 10.05.1999

Адрес для переписки:

634050, г.Томск, пр-т Ленина, 36, Томский государственный университет, отдел интеллектуальной собственности, нач. отдела В.Н. Воронину

(72) Автор(ы):

Кривова Наталья Андреевна (RU),
Заева Ольга Борисовна (RU),
Суходоло Ирина Владимировна (RU),
Мильто Иван Васильевич (RU),
Ходанович Марина Юрьевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Национальный исследовательский Томский государственный университет" (ГТУ) (RU)

(54) СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ БАЛАНСА ПРО- И АНТИОКСИДАНТОВ В ОТДЕЛАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЖИВОТНОГО

(57) Реферат:

Изобретение относится к области физиологии, нейрофизиологии, биохимии, в частности к характеристике про- и антиоксидантного статуса головного мозга, и может быть использовано для исследования влияния различных факторов на локализацию и степень нейродегенеративных изменений в головном мозге животного. Способ включает анализ люминолзависимой хемилюминесценции тканей и определение светосуммы разности интенсивностей светимости проб. Состояние баланса В про- и антиоксидантов в каждой пробе определяют по формуле $B = Sm1 / Sm2$, где Sm1 - светосумма хемилюминесценции активных форм кислорода в пробе, Sm2 -

светосумма хемилюминесценции, характеризующая антиоксидантную активность пробы, которую определяют в двухкюветном люминометре, в одну из кювет которого помещают стандартный люминолсодержащий раствор, в другую - стандартный раствор с добавлением расчетного количества исследуемой пробы, и одновременно измеряют разность интенсивностей свечения в течение 5 мин, включая латентный период развития антиоксидантной активности. Изобретение обеспечивает повышение достоверности результатов исследования за счет исключения случайных отклонений измеряемых параметров. 6 ил., 1

прим.

RU 2523403 C 1

RU 2523403 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 523 403** (13) **C1**

(51) Int. Cl.

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2013121648/15, 08.05.2013

(24) Effective date for property rights:
08.05.2013

Priority:

(22) Date of filing: 08.05.2013

(45) Date of publication: 20.07.2014 Bull. № 20

Mail address:

634050, g.Tomsk, pr-t Lenina, 36, Tomskij
gosudarstvennyj universitet, otdel intellektual'noj
sobstvennosti, nach. otdela V.N. Voroninu

(72) Inventor(s):

Krivova Natal'ja Andreevna (RU),
Zaeva Ol'ga Borisovna (RU),
Sukhodolo Irina Vladimirovna (RU),
Mil'to Ivan Vasil'evich (RU),
Khodanovich Marina Jur'evna (RU)

(73) Proprietor(s):

Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe
obrazovatel'noe uchrezhdenie vysshego
professional'nogo obrazovanija "Natsional'nyj
issledovatel'skij Tomskij gosudarstvennyj
universitet" (GTU) (RU)

(54) **METHOD OF QUANTITATIVE ASSESSMENT OF BALANCE OF PRO- AND ANTIOXIDANTS IN BRAIN DIVISIONS OF ANIMAL**

(57) Abstract:

FIELD: veterinary medicine.

SUBSTANCE: method comprises analysis of luminol-dependant chemiluminescence of tissues and definition of the light amount of difference of the intensities of luminosity of the samples. In the state of balance B of pro-and anti-oxidants in each sample is determined by a formula $B = Sm1/Sm2$, where Sm1 is light amount of chemiluminescence of active forms of oxygen in the sample, Sm2 is light amount of chemiluminescence characterising the antioxidant activity of the sample, which is determined in a two-cuvette luminometer, in

one of the cuvettes of which the standard luminol-containing solution is placed, in another - the standard solution with the addition of calculated amount of the test sample, and simultaneously the difference between the luminescence intensity for 5 minutes is measured, including the latent period of antioxidant activity development.

EFFECT: increase in reliability of the results of the study by eliminating the random deviations of the measured parameters.

6 dwg, 1 ex

RU 2 523 403 C1

RU 2 523 403 C1

Изобретение относится к области физиологии, нейрофизиологии, фармакологии, биохимии, в частности к характеристике про- и антиоксидантного статуса головного мозга, и может быть использовано для исследования влияния различных факторов на локализацию и степень нейродегенеративных изменений в головном мозге, для поиска факторов, нарушающих функционирование отделов головного мозга и корректирующих эти нарушения.

Исследование баланса про- и антиоксидантов в различных системах организма, в особенности количественная оценка, важно для понимания его физиологической роли, состояния редокс-гомеостаза, возможности развития оксидативного стресса и степени протекции важнейших структур клеток от оксидативного повреждения. Сдвиг баланса в сторону увеличения образования активных форм кислорода (АФК) способствует развитию дегенеративных повреждений тканей, в частности ткани мозга. Для объективного исследования механизмов развития дегенеративных повреждений тканей мозга или способов их коррекции, характера влияния тех или иных экспериментальных условий на центральную нервную систему необходимы сведения о состоянии баланса про- и антиоксидантов в различных отделах мозга.

Количественная оценка баланса про- и антиоксидантов представляет собой определенные трудности, которые чаще всего решаются разными авторами с помощью исследования либо количества тех или иных АФК, либо активности тех или иных ферментов с антиоксидантной активностью (АОА), в зависимости от задач исследования. Например, увеличение продуктов реакции перекисного окисления липидов (ПОЛ), которые могут быть выявлены, в частности, с помощью хемилюминесценции (ХЛ), определяется как состояние оксидативного стресса. И наоборот, увеличение активности антиоксидантных ферментов, например супероксиддисмутазы или каталазы, определяется как снижение уровня оксидативного стресса или развитие протективных процессов (Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З. Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания. 2008. Новосибирск: АРТА, 284 с.).

По различным классификациям в число АФК входят не только радикалы кислорода, но и активные формы хлора, азота и липидные радикалы. Методы определения АФК в биологических системах делятся на прямые (метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), метод хемилюминесценции, флуоресцентные методы) и косвенные (анализ продуктов перекисного окисления липидов, активности каталазы, глутатионпероксидазы и других конечных продуктов реакции). Прямые методы имеют свои преимущества и недостатки. Например, метод ЭПР в биологических системах часто бывает недостаточно чувствителен. Флуоресцентные методы определения адсорбционной емкости по отношению к кислородным радикалам требуют разработки соответствующих флуоресцентных зондов для конкретных окислителей. Косвенные же методы недостаточно информативны. В клинических условиях оценить баланс про- и антиоксидантов в тканях мозга прямыми или косвенными методами не представляется возможным. Очевидно, что эти исследования должны проводиться на экспериментальных животных.

Преимущественным инструментом определения всех радикальных форм в биологических системах является люминолзависимая хемилюминесценция, которая позволяет получить представление об уровне физиологически активных про-/и антиоксидантов. Добавление люминола увеличивает интенсивность ХЛ клеток более чем в 1000 раз, а это означает, что для анализа можно брать в 1000 раз меньше биологического материала. В настоящее время люминолзависимая ХЛ имеет ограничение только в том смысле, что не дает возможности исследовать интенсивность

ХЛ какого-либо конкретного биологического окислителя, однако позволяет наиболее достоверно определить интегральную интенсивность ХЛ всех биологических окислителей в исследуемой биологической системе (Владимиров Ю.А. Свечение, сопровождающее биохимические реакции. Соросовский образовательный журнал, 1999, 6: 25-32). Активированная люминолом ХЛ может быть использована также для определения активности различных конкретных антиоксидантов.

Известен фотометрический способ определения количества и/или активности антиоксидантов в исследуемом образце по изменению интенсивности светового излучения реакционной смеси путем сравнения константы скорости реакции взаимодействия антиоксидантов с радикалами и константы скорости реакций образования и элиминирования радикалов из системы в отсутствии антиоксидантов (Евразийский патент ЕА 016868).

Сложность при реализации известного способа заключается в том, что ткани головного мозга могут содержать несколько неизвестных антиоксидантов, которые взаимодействуют не только с радикалами, но и между собой. В результате характер их влияния на кинетику хемилюминесценции имеет преимущественно смешанный тип, а это может привести к возникновению систематических погрешностей при оценке суммарного содержания антиоксидантов.

Использование метода хемилюминесценции для исследования баланса про- и антиоксидантной активности исследуемых отделов мозга предпочтительно с точки зрения функционирования и физиологической активности систем, поддерживающих локальный баланс про- и антиоксидантов.

Известны различные способы косвенной оценки этих показателей исследованием хемилюминесценции крови больного, например «Способ прогнозирования распространенности метастатического поражения головного мозга» по пат. RU 2300104 (2007 г.), согласно которому определяют интенсивность хемилюминесценции плазмы крови и вычисляют суммарный процент изменения данных показателей относительно нормы.

По пат. RU 2200320 (2003 г.) об антиоксидантном статусе судят, определяя показатель значений хемилюминесценции в правой и левой яремных венах.

Известные способы далеко неадекватно отражают баланс про- и антиоксидантов в тканях мозга, поскольку на состояние показателей крови или ее плазмы влияют процессы метаболизма в других системах организма. Кроме того, не учитывается, что локализация очага ишемического повреждения в мозге может быть различной, затрагивая те или иные участки мозга.

Известен «Способ оценки анти-, прооксидантного статуса организма путем определения антиоксидантного потенциала (АОП)» по патенту RU 2194984 (2002 г.). Способ включает измерение показателей защиты и деструкции антиоксидантной системы до и после воздействия экстремальных факторов, с последующей оценкой влияния экстремальных факторов на АОП по специальной формуле, связывающей показатели защиты антиоксидантной системы с показателями повреждения до и после воздействия экстремальных факторов. При этом частное от деления показателя защиты на показатель повреждения $АОП < 1$ оценивают как негативное воздействие, а $АОП \geq 1$ - как позитивное.

Недостатки известного способа заключаются в том, что исследуются далеко не все известные показатели антиоксидантной защиты или повреждения. Не учитывается тот факт, что одни и те же элементы, например макромолекулы, могут выступать и как прооксиданты, и как антиоксиданты, не учитываются возможные последствия

взаимодействий элементов с про- и антиоксидантной активностью между собой, не кажется обоснованной критическая величина АОП=1. Наконец, исследование показателей повреждения и антиоксидантной защиты проводятся в разных условиях.

Наиболее близким техническим решением является способ определения оксидантного потенциала нейтрофилов (Пат. RU 2457488, опубл. 27.07.2012. Выбран за прототип). В качестве исследуемой ткани используют гепаринизированную (из расчета 100 ед/мл) цельную кровь. Согласно прототипу проводят измерение светосуммы спонтанной хемилюминесценции цельной крови в растворе люминола сразу после взятия пробы и через 4 ч после инкубации, проводят расчет разности светосуммы второго и первого измерения, при этом за норму принимают 1-99% процентильный интервал разности светосуммы общего диапазона значений контрольной пробы (от здорового организма), значения ниже 1% процентильного интервала свидетельствуют о снижении оксидантного потенциала, значения, превышающие 99% процентильный интервал, интерпретируют как процесс оксидантного стресса.

Прототип имеет ряд общих признаков с техническим решением по изобретению, однако не пригоден для исследования мозга. Критерий баланса про- и антиоксидантной активности не обеспечивает необходимой точности анализа, особенно если областью интереса являются соседние отделы головного мозга. Кроме того, измерение интенсивности ХЛ пробы проводят в разное время.

Задачей изобретения является разработка способа, дающего возможность повысить точность анализа окислительно-восстановительных процессов в головном мозге животного путем одновременного сравнения количественных значений баланса про- и антиоксидантной активности в функционально разных отделах мозга и позволяющего, в частности, оценить эффективность антиоксидантной протекции.

Задача решается тем, что в способе, включающем люминолзависимый хемилюминесцентный анализ тканей и определение светосуммы разности интенсивностей светимости, приготавливают супернатанты гомогенатов ткани выбранных функционально разных отделов мозга, в каждой пробе определяют состояние баланса В про- и антиоксидантов по формуле $B = Sm1/Sm2$, где $Sm1$ - светосумма хемилюминесценции активных форм кислорода в пробе, $Sm2$ - светосумма хемилюминесценции, характеризующая антиоксидантную активность пробы, которую определяют в двухкюветном люминометре, в одну из кювет которого помещают стандартный люминолсодержащий раствор, в другую - стандартный раствор с добавлением расчетного количества исследуемой пробы. Светосумму разности интенсивностей $Sm2$ рассчитывают, одновременно измеряя разность интенсивностей свечения проб в течение 5 мин, включая латентный период развития антиоксидантной активности.

Таким образом, способ по изобретению основан на анализе кинетики люминолзависимой ХЛ, которая является интегральным результатом взаимодействия всех внутриклеточных индукторов активных форм кислорода или антиоксидантов. Для супернатантов тканей мозга условия измерений подбирают таким образом, чтобы количественное определение про- и антиоксидантной активности тканей мозга протекало в одинаковых условиях реакции ХЛ, в одинаковых объемах пробы и в течение одинакового периода времени.

Способ по изобретению иллюстрируется рисунками.

На рис.1 показана интенсивность люминолзависимой хемилюминесценции при исследовании АОА (1-я кювета - стандарт, 2-я кювета - проба).

На рис.2 показана интенсивность ХЛ, характеризующая прооксидантную активность

(спонтанная ХЛ) и уровень антиоксидантной активности (ДХЛ) в супернатанте гомогената обонятельной луковицы.

На рис.3, рис.4 приведена светосумма ХЛ за 5 мин (в $RLU \cdot 10^9$ /г ткани) и соответствующее значение баланса про- и антиоксидантной активности на примере обонятельной луковицы.

На рис.5 приведена светосумма ХЛ за 5 мин измерений, характеризующая прооксидантную и антиоксидантную активность в различных отделах головного мозга контрольных крыс.

На рис.6 показан баланс про- и антиоксидантной активности в различных отделах головного мозга крыс, получавших в разных дозах наночастицы TiO_2 , по сравнению с контролем.

Для осуществления способа приготавливают пробы тканей различных отделов головного мозга;

Отбирают 2 группы лабораторных животных, одну из которых (опытную) подвергают экспериментальному воздействию, вторая является контрольной. После завершения эксперимента на аутопсии выделяют мозг животного, из выбранных 5-7 отделов мозга берут образцы (до 200 мг), взвешивают их и помещают в охлажденный физиологический раствор. Перед началом анализа в пробирки добавляют охлажденный физиологический раствор в количестве, составляющем 1 мл на каждые 50 мг ткани. Процесс необратимого анатомического нарушения целостности клеток (гомогенизацию) проводят в гомогенизаторе Поттера-Эльвейема. Полученные гомогенаты центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин, и готовят раствор 0,1 мл супернатанта в 1 мл физраствора.

Для обеспечения протекания хемилюминесценции в одинаковых условиях при проведении реакций в кювету хемилюминометра на 1 мл H_2O вносят одинаковое количество раствора супернатанта, например 10 мкл, и одинаковое количество 0,01М раствора люминола в фосфатном буфере, например 30 мкл. Объемы подбирают, исходя из разрешающей способности используемого хемилюминометра. Нами использован двухкюветный хемилюминометр высокой разрешающей способности Lumat LB9507 (Berthold Technologies) с диапазоном спектральной чувствительности в интервале длин волн между 390 и 620 нм, в котором расположены все известные в настоящее время приложения биолуминесценции. Интенсивность ХЛ регистрируют в единицах RLU (относительная единица света «relative light units», равная 10 фотонам). Время проведения исследований подбирают с учетом высокой скорости хемилюминесцентных реакций, скорости установления стабильного состояния реакций и типичного времени накопления (1-5 с). В случае исследования ткани головного мозга оптимальное время измерения интенсивности люминолзависимой ХЛ составляет 5 мин.

Прооксидантную активность измеряли с помощью реакции спонтанной люминолзависимой хемилюминесценции: в кювету хемилюминометра добавляли 10 мкл раствора супернатанта + 1 мл H_2O + 30 мкл 0,01М раствора люминола, температура растворов $+37^\circ C$. Измерение интенсивности ХЛ проводят, начиная с момента прибавления раствора люминола, затем через каждую минуту (рис.2). По окончании анализа определяют светосумму Sm_1 за 5 мин. (рис.3).

Антиоксидантную активность измеряли по распространенному методу гашения интенсивности люминолзависимой ХЛ стандартного раствора после добавления раствора супернатанта (см., например В.В. Хасанов, Г.Л. Рыжова, Е.В. Мальцева. Методы исследования антиоксидантов. Химия растительного сырья. 2004. №3. с.63-75).

В качестве источника свободных радикалов использовали радикалы, образующиеся в результате реакции Фентона при взаимодействии пероксида водорода (H_2O_2) и сернокислого железа ($FeSO_4$).

Для регистрации степени гашения используют двухкюветный люминометр: в 1-й кювете регистрируется кинетика изменения интенсивности ХЛ стандартного люминолсодержащего раствора в отсутствие антиоксидантов, одновременно во 2-й кювете регистрируется кинетика изменения интенсивности ХЛ стандартного раствора после добавления супернатанта из исследуемого отдела головного мозга. Разница светосуммы Sm_2 представляет собой уровень антиоксидантной активности пробы.

Для приготовления стандартного люминолсодержащего раствора в 2,5 мл H_2O добавляют 50 мкл 0,05М раствора $FeSO_4$ +25 мкл H_2O_2 +75 мкл 0,01М раствора люминола, т.е. 1 мл стандартного раствора содержит: 20 мкл 0,05М раствора $FeSO_4$, 10 мкл H_2O_2 и 30 мкл 0,01 М раствора люминола. В обе кюветы хемилюминометра разливают по 1 мл стандартного раствора ($t=+37^\circ C$), во 2-ю кювету добавляют 10 мкл раствора супернатанта. Проводят измерение интенсивности ХЛ в 1-й и 2-й кювете, начиная с момента прибавления раствора люминола, затем через каждую минуту. Сразу после прибавления пробы (раствора супернатанта) в стандартный раствор происходит резкое увеличение интенсивности ХЛ, обусловленное развивающейся реакцией с продуктами ПОЛ и другими продуктами окисления. Через 1-1,5 мин (в зависимости от образца) во 2-й кювете начинается гашение интенсивности ХЛ антиоксидантами, присутствующими в пробе.

Типичная кинетика реакции ХЛ при исследовании пробы обонятельной луковицы показана на рис.1. На первой минуте реакции интенсивность ХЛ стандартного раствора и пробы выше, чем интенсивность ХЛ только стандартного раствора за счет присутствия продуктов ПОЛ в пробе. Антиоксидантная активность развивается после начала гашения ХЛ стандартного раствора элементами с антиоксидантной активностью, которые содержатся в исследуемой пробе (приблизительно через 57 с). Латентный период развития антиоксидантной активности зависит от характера антиоксидантов, присутствующих в пробе. Как видно по точке пересечения кривых, латентный период развития антиоксидантной активности занимает значительную долю времени измерений (около 20%) и должен быть учтен при расчетах. Затем по разнице интенсивностей ХЛ в 1-й и 2-й кюветах за 5 мин опыта, включая латентный период, определяют уровень антиоксидантной активности (рис.2). По результатам измерений сопоставляют ее со светосуммой ХЛ, полученной при измерении прооксидантной активности (рис.3) и рассчитывают баланс (рис.4). Пример осуществления способа.

Проведен эксперимент по исследованию влияния на состояние центральной нервной системы хронического закармливания крыс нанопорошками диоксида титана в двух дозах: 50 мг/крысу и 100 мг/крысу ежедневно, в течение 7 дней. Итого - 3 группы животных, в каждой группе по 10 крыс: контрольная, опытная 50 мг нано TiO_2 , опытная 100 мг нано TiO_2 . После завершения эксперимента крыс декапитировали под легким эфирным наркозом, на аутопсии выделили мозг животных и выбрали 7 отделов мозга: 1 - обонятельная луковица, 2 - мозжечок, 3 - задний мозг, 4 - образец из правой фронтальной коры, 5 - нижнее двухолмие, 6 - верхнее двухолмие, 7 - образец из таламической области. Все образцы обработали, как описано выше в методике приготовления проб.

После проведения хемилюминесцентного анализа про- и антиоксидантной активности и расчетов по каждой пробе у всех групп животных были получены результаты,

приведенные на рис.5. Достоверные отличия по прооксидантной активности между отделами $p < 0,05$ (критерий Вилкоксона)

Полученные результаты показывают, что в разных отделах мозга наблюдаются разные уровни про- и антиоксидантной активностей. При этом прооксидантная активность ниже всего в образцах фронтальной коры, которая имеет достоверные отличия с образцами нижнего двухолмия, все остальные отделы мозга занимают промежуточное положение.

Антиоксидантная активность максимальна в образцах нижнего двухолмия и имеет достоверные отличия с образцами обонятельной луковицы, мозжечка, заднего мозга. Образцы обонятельной луковицы имеют достоверно более низкий уровень антиоксидантной активности по сравнению не только с образцами нижнего двухолмия, но и с образцами фронтальной коры и таламической области. Образцы заднего мозга также имеют более низкий уровень антиоксидантной активности по сравнению с образцами фронтальной коры, нижнего двухолмия и таламической области. Эти результаты свидетельствуют о гетерогенности метаболизма в разных отделах мозга и могут быть полезным диагностическим и прогностическим признаком. Данные свидетельствуют о значительном превышении активности механизмов антиоксидантной защиты над механизмами индукции свободных радикалов, что является, по-видимому, важным защитным механизмом структур головного мозга.

Баланс про- и антиоксидантов, рассчитанный согласно изобретению по частному от деления уровня прооксидантов ($Sm1$) на уровень антиоксидантов ($Sm2$), отражает, в данном случае, уровень защиты структур головного мозга от повреждения радикальным окислением. Как видно из рис.6, наибольший уровень защиты - в структурах фронтальной коры, наименьший - в структурах обонятельной луковицы, заднего мозга и верхнего двухолмия.

Использование способа по изобретению позволило выяснить, что пероральное поступление наночастиц диоксида титана вызвало значительные изменения в уровне про-и антиоксидантной активности всех отделов мозга по сравнению с контрольными значениями, причем в трех отделах (задний мозг, фронтальная кора и таламическая область) эти изменения носили дозозависимый характер. В большинстве отделов (за исключением нижнего двухолмия) баланс про- и антиоксидантной активности снизился. Это снижение было обусловлено снижением уровня прооксидантной активности и некоторым увеличением уровня антиоксидантной активности. Можно сделать вывод о том, что пероральное поступление наночастиц диоксида титана вызывает дисбаланс редокс-зависимых внутриклеточных сигнальных систем и, в целом, нарушение редокс-гомеостаза и метаболизма клеток, а в нервной системе - нарушение передачи нервного импульса. Эти изменения носят однонаправленный характер во всех исследованных отделах мозга, более выражено проявляясь в заднем мозге, фронтальной коре и таламической области.

Технический результат при использовании изобретения - повышение достоверности результатов исследования за счет исключения случайных отклонений в измеряемых показателях. Использованная литература:

1. Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З. Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания. 2008. Новосибирск: АРТА, 284 с.

2. Владимиров Ю.А. Свечение, сопровождающее биохимические реакции. Соросовский образовательный журнал, 1999, 6: 25-32

3. Евразийский патент ЕА 016868. Измайлов Д.Ю., Владимиров Ю.А. Способ определения количества и/или активности антиоксидантов.

4. Пат. RU 2300104 (2007 г.).
5. Пат. RU 2200320 (2003 г.).
6. Пат. RU 2194984 (2002 г.).
7. Пат. RU 2457488, опубл. 27.07.2012 (выбран за прототип).

5

Формула изобретения

Способ количественной оценки баланса про- и антиоксидантов в отделах головного мозга животного, включающий люминолзависимый хемилюминесцентный анализ тканей и определение светосуммы разности интенсивностей светимости пробы, отличающийся тем, что приготавливают супернатанты гомогенатов ткани выбранных функционально разных отделов мозга и определяют состояние баланса В про- и антиоксидантов в каждой пробе по формуле $B = Sm1/Sm2$, где Sm1 - светосумма хемилюминесценции активных форм кислорода в пробе, Sm2 - светосумма хемилюминесценции, характеризующая антиоксидантную активность пробы, которую определяют в двухкюветном люминометре, в одну из кювет которого помещают стандартный люминолсодержащий раствор, в другую - стандартный раствор с добавлением расчетного количества исследуемой пробы, и измеряют разность интенсивностей свечения в течение 5 мин, включая латентный период развития антиоксидантной активности.

20

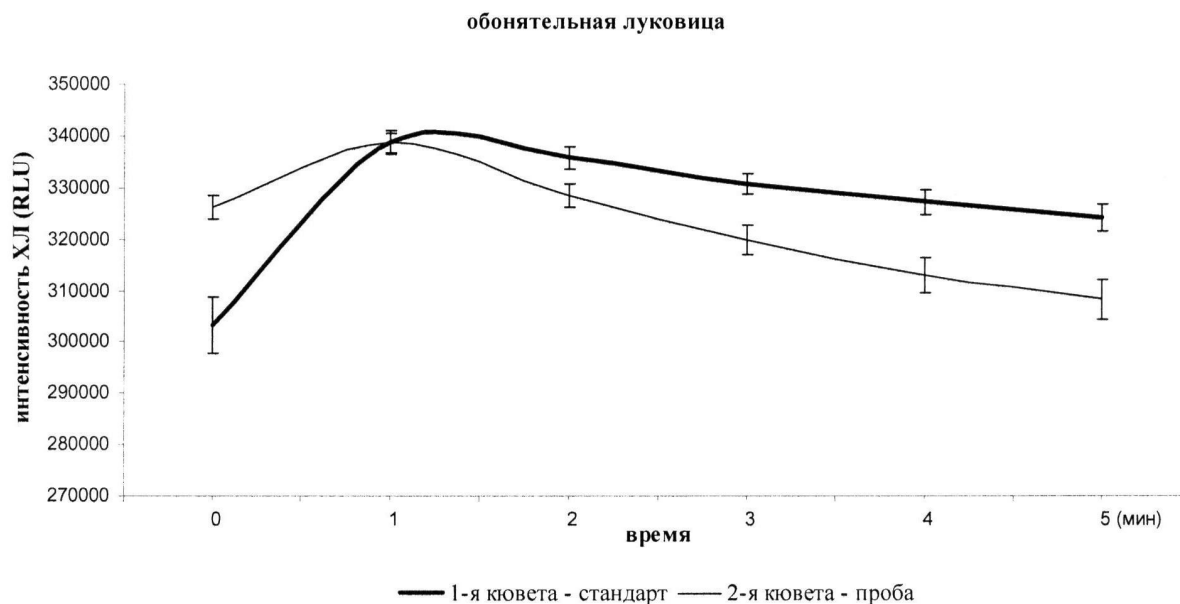
25

30

35

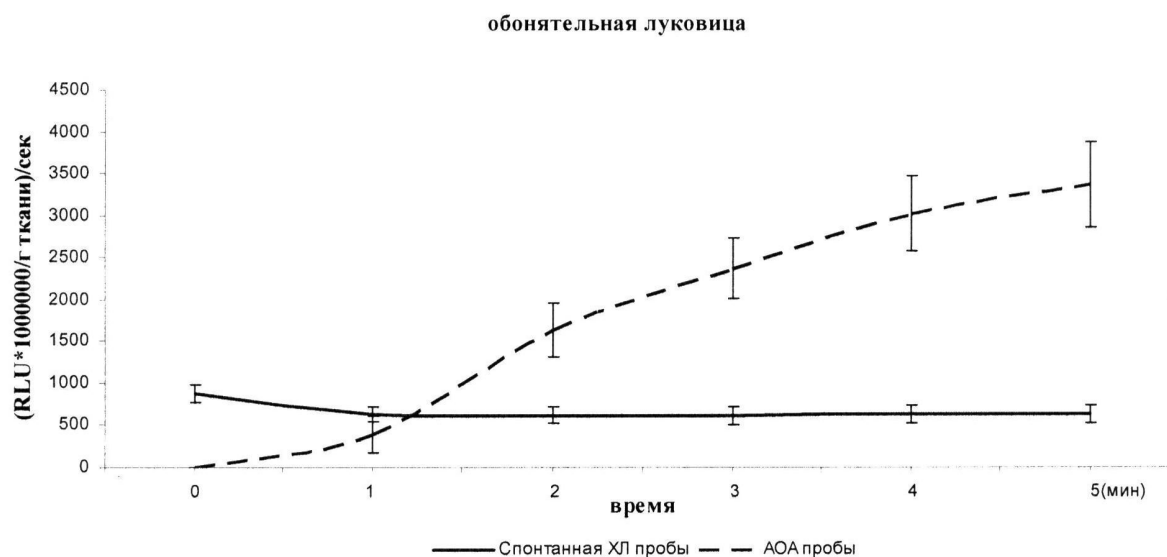
40

45



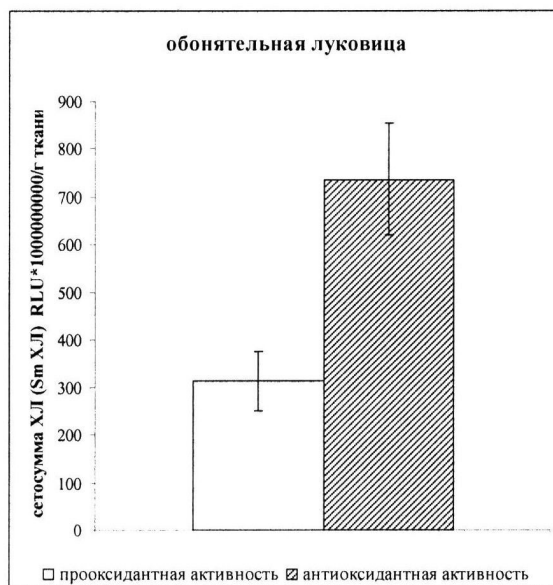
Интенсивность люминолзависимой хемилюминесценции при исследовании АОА, в стандартном растворе (1-я кювета) и с добавлением пробы (2-я кювета).

Рис. 1



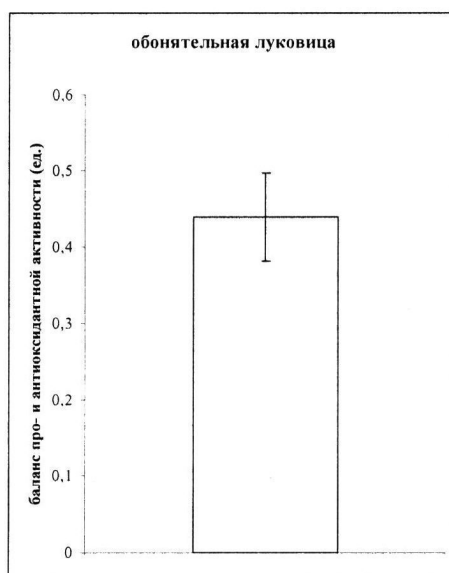
Интенсивность ХЛ пробы, характеризующая прооксидантную активность (спонтанная ХЛ) и антиоксидантную активность (по разности значений на рис.1).

Рис. 2



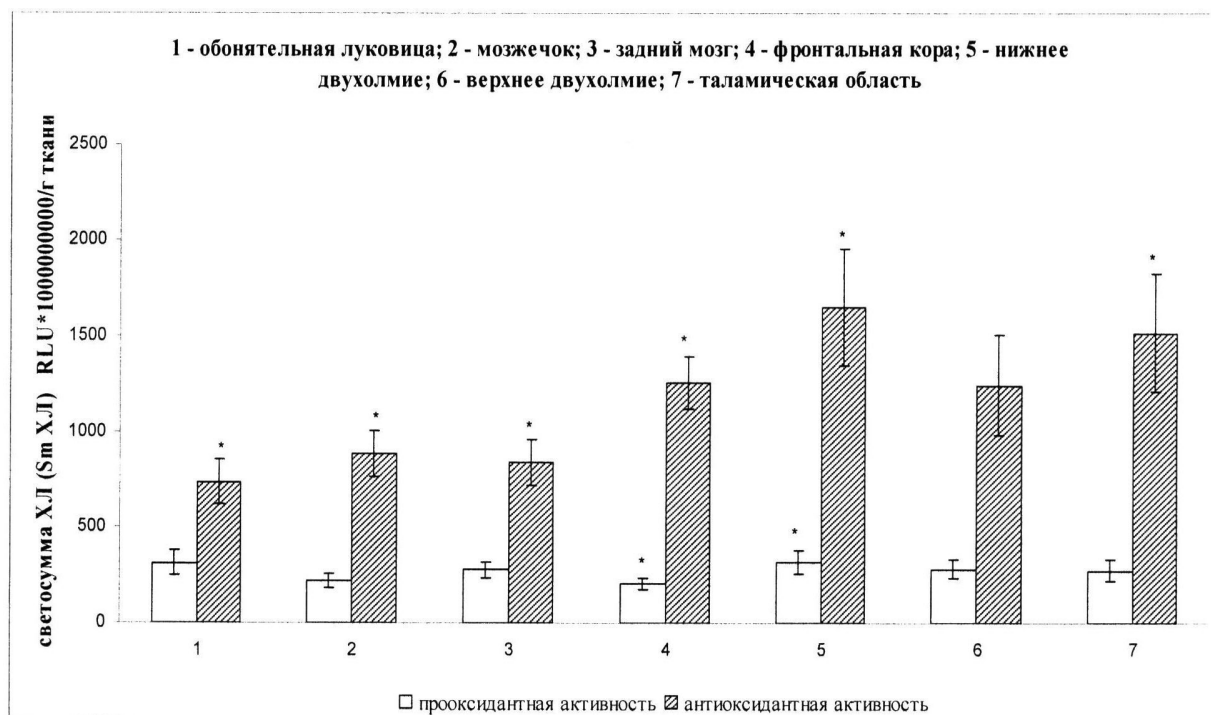
Светосумма ХЛ за 5 мин. измерений, характеризующая ПОА и АОО на примере обонятельной луковицы

Рис. 3



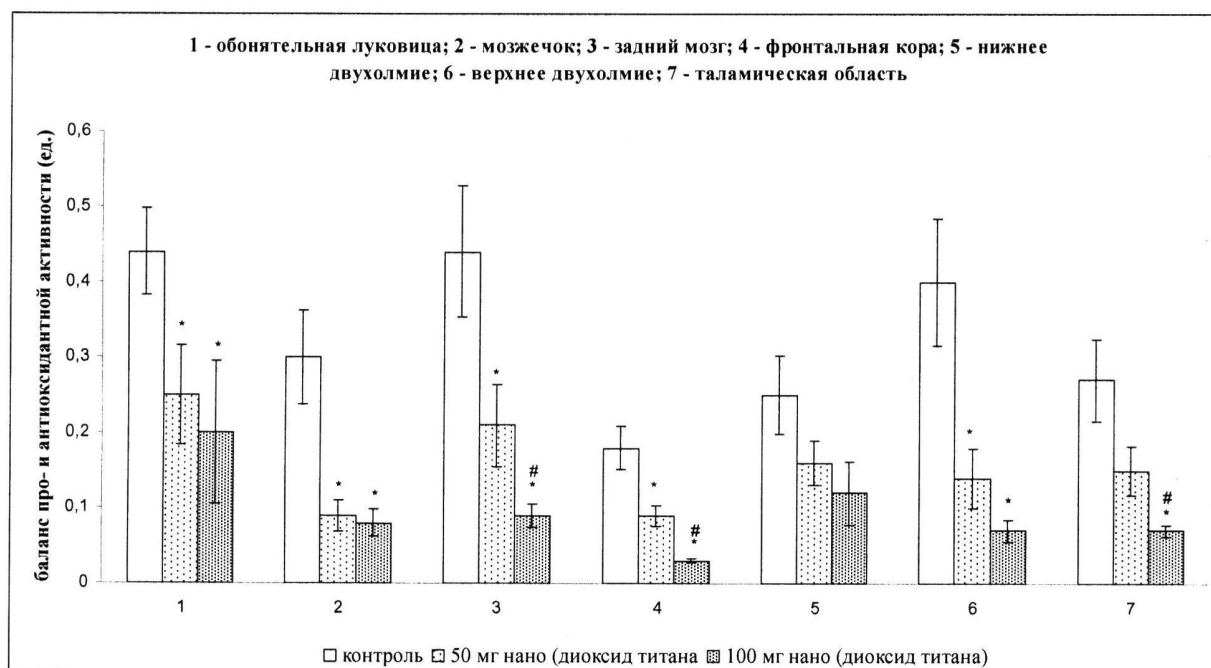
Баланс про- и антиокислительной активности в обонятельной луковице.

Рис. 4



Светосумма ХЛ за 5 мин. измерений, характеризующая прооксидантную и антиоксидантную активность в различных отделах головного мозга контрольных крыс.

Рис. 5



Баланс про- и антиоксидантной активности в различных отделах головного мозга крыс, получавших наночастицы TiO_2 (50 мг, 100 мг), по сравнению с контролем.

Рис. 6