

**Антиоксидантные свойства 5,10,15,20-тетраakis(4-гидрокси-
фенил)порфина на основе электрохимических и биологических
исследований**

С.С. Клетиков, М.В. Тесакова, В.Р. Кулагин, В.И. Парфенюк

Сергей Сергеевич Клетиков,

Кафедра технологии тонкого органического синтеза, Ивановский

государственный химико-технологический университет, 153000, Россия, г.

Иваново, пр. Шереметевский, 7, kletikov@gmail.com, +79303487457

Мария Васильевна Тесакова,

лаборатория «Новые материалы на основе макрогетероциклических

соединений», Институт химии растворов им. Г.А. Крестова РАН, 153045,

Россия, г. Иваново, ул. Академическая, д. 1, mvt@isc-ras.ru

Владислав Русланович Кулагин,

Кафедра технологии электрохимических производств, Ивановский

государственный химико-технологический университет, 153000, Россия, г.

Иваново, пр. Шереметевский, 7

Владимир Иванович Парфенюк,

лаборатория «Новые материалы на основе макрогетероциклических

соединений», Институт химии растворов им. Г.А. Крестова РАН, 153045,

Россия, г. Иваново, ул. Академическая, д. 1,

vip@isc-ras.ru, +7(4932)33-62-64.

Оценку антиоксидантной активности порфирина проводили по реакции взаимодействия 5,10,15,20-тетраakis(4-гидроксифенил)порфина со свободным радикалом 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил (DPPH). Для изучения реакции взаимодействия порфирина с DPPH использовали метод циклической вольтамперометрии. Результаты электрохимического

эксперимента послужили основанием для проверки антиоксидантных свойств порфирина на живых объектах — на курах породы «черная-московская». В ходе проведения исследований не зафиксировано нарушений физиологического состояния кур, а также не установлено существенных изменений массы тела и гибели подопытных животных. Показатели антиоксидантной активности крови позволяют судить о защите организма от токсического влияния ряда кислородсодержащих соединений. Раствор Твин-80 с порфирином не ухудшает показатели крови. Установлено, что исследуемый порфирин с концентрацией 10^{-4} моль/л снижает содержание малонового диальдегида и повышает содержание церулоплазмينا в крови, что приводит к снижению активности окислительных процессов в живом организме, а также усиливает белок синтетическую функцию печени.

Ключевые слова: электрохимия, антиоксиданты, порфирин, живые объекты, биохимические показатели крови, малоновый диальдегид, церулоплазмин.

**Antioxidant properties of 5,10,15,20-tetrakis(4-hydroxyphenyl)porphyrine
based on electrochemical and biological researches**

Sergey Sergeevich Kletikov,

Department of Technologies of Thin Organic Synthesis, Ivanovo State University of Chemistry and Technology, 153000, Ivanovo, Sheremetievskiy Avenue, 7, Russia

kletikov@gmail.com, +79303487457

Mariya Vasilyevna Tesakova,

Laboratory «New materials on the basis of macrocyclic compounds», G.A. Krestov Institute of Solution Chemistry, 153045, Ivanovo, Akademicheskaja, 1, Russia

mvt@isc-ras.ru

Vladislav Ruslanovich Kulagin,

Department of Electrochemical Technologies, Ivanovo State University of Chemistry and Technology, 153000, Ivanovo, Sheremetievskiy Avenue, 7, Russia

Parfenyuk Vladimir Ivanovich,

Laboratory «New materials on the basis of macrocyclic compounds», G.A. Krestov Institute of Solution Chemistry, 153045, Ivanovo, Akademicheskaya, 1, Russia

vip@isc-ras.ru, +7(4932) 33-62-64, доб. 2-27.

The evaluation of antioxidant activity of porphyrin was carried out on the mutual reaction of 5,10,15,20-tetrakis(4-hydroxyphenyl)porphyrin with a free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). A cyclic voltammetry method was used to research the interaction of porphyrin and DPPH. The results of the electrochemical experiment served as a basis for testing antioxidant qualities of porphyrin on living creatures – chickens of the “Moscow-black” breed. During the duration of the research, no disturbance of physiological condition of the chickens was noticed, as well as any considerable change of body mass or causes of death. The data on blood’s antioxidant activity lets us evaluate the organism’s ability to defend itself from toxic influences of various oxygen-containing compounds. As data shows, the dilution Twin-80 with porphyrin does not lower the blood condition. During the experiment the following was noted: hydroxyl-containing porphyrin with concentrations of 10^{-4} mole/l lowers the amount of malondialdehyde and increases the amount of ceruloplasmin in blood, which leads to lowering the activity of oxidizing processes in a living organism, and also empowers the protein synthesizing function of the liver.

Keywords: electrochemistry, antioxidants, porphyrins, living objects, biochemical indicators of blood, malondialdehyde, ceruloplasmin.

В середине XX века в связи с ухудшением экологической ситуации резко обострилась проблема радикального окисления в живых организмах. Эти процессы в организме являются одними из основных механизмов возникновения синдрома окислительного стресса и развития различного рода патологий. В настоящее время вектор современных исследований направлен на поиск и изучение новых соединений, так называемых антиоксидантов, способствующих контролю свободных радикалов в живых организмах. Одними из кандидатов на роль антиоксидантов являются соединения порфиринового ряда [1-5] вследствие того, что они обладают способностью «гасить» свободные радикалы, что и определяет их антиоксидантную активность.

Целью работы явилось исследование антиоксидантных и токсикологических свойств 5,10,15,20-тетракис(4-гидроксифенил)порфина ($H_2T(4-OHPh)P$) на основе электрохимических и биологических данных.

Методика эксперимента

Оценку антиоксидантной активности (АОА) порфиринов проводили по реакции взаимодействия исследуемых соединений со свободным радикалом 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил (DPPH) [6-7]. Для изучения этой реакции записывали циклические вольтамперограммы (ЦВА) для раствора DPPH с концентрацией 10^{-3} М и с добавлением раствора порфирина той же концентрации. Исследования проводили в трехэлектродной электрохимической ячейке (рабочий электрод – стержень из стеклоуглерода, вспомогательный электрод – платиновая проволока, электрод сравнения – насыщенный каломельный электрод) в свежеприготовленных растворах этилового спирта с добавлением фонового электролита (0,02 М тетрабутиламмония перхлората). Сначала записывали ЦВА раствора DPPH, затем постепенно добавляли раствор порфирина.

Экспериментальное исследование на птице выполнено в 2017 году на кафедре акушерства, хирургии и незаразных болезней животных ИГСХА и организованном при ней ветеринарном центре «Ветасс». Исследования

проводились на 12-месячных курах-несушках породы «черная-московская», живой массой 1,7-1,8 кг, из которых сформировали 5 групп по 10 особей в каждой (табл. 1). Растворы вводили курам перорально однократно по 2 мл в течение 14 дней.

Таблица 1. Экспериментальные группы

Table 1. Experimental groups

Группа	Применяемый препарат
контрольная	Основной рацион
1	Основной рацион +1% раствор аскорбиновой кислоты
2	Основной рацион +водный раствор Твин-80
3	Основной рацион +водный раствор Твин-80 + Порфирин $C=10^{-3}$ моль/л
4	Основной рацион +водный раствор Твин-80+ Порфирин $C=10^{-4}$ моль/л

Оценку антиоксидантного действия проводили по результатам анализа крови и сыворотки крови. Кровь брали из вены cutaneaulnaris на внутренней стороне крыла над локтевым сочленением со всем соблюдением правил асептики и антисептики. Для проведения исследования использовали гематологические и биохимические методы: определение гематокрита с помощью гематокритной центрифуги СМ-70, гемоглобина методом Сали; форменных элементов по методу К.С. Фоминой и В.И. Шмельковой с реактивом Фриеда и Лукачевой (в модификации И.А. Болотникова); содержание мочевой кислоты и глюкозы – на полуавтоматическом биохимическом анализаторе BioChem ВА; холестерина – на биохимическом анализаторе «Сапфир» (Япония); общего белка, кальция, фосфора, магния, калия – на биохимическом анализаторе ВА-88А (mindray) chemistry Analyzer (США); содержание малонового диальдегида (МДА) – на спектрофотометре «Solar 1251» (Беларусь) [8-9]; церулоплазмина (ЦП) – методом ИФА, «Assaypro» (США) [10].

Все процедуры с животными в эксперименте проводили в соответствии с протоколами «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (European Communities Directive (86/609/EEC) с требованиями нормативных правовых актов, регламентирующих выполнение исследований по безопасности и эффективности фармакологических веществ в РФ (Приказ МЗ РФ «Об утверждении правил лабораторной практики» №267 от 19.06.2003 г.) и законодательством Российской Федерации (Национальный стандарт ГОСТ Р 53434-2009).

Результаты исследования и обсуждение

Ранее нами был изучен ряд гидрокси-производных тетрафенилпорфинов. По результатам проведенных исследований установлено [11-14], что $H_2T(4-OHPh)P$ обладает наибольшей антиоксидантной активностью из всех изученных соединений. В настоящей работе рассмотрим оценку антиоксидантных свойств порфиринов на примере $H_2T(4-OHPh)P$ и незамещенного тетрафенилпорфина.

При записи ЦВА раствора DPPH развертку потенциала проводили от значения потенциала рабочего электрода в растворе DPPH (~ 0.45 В) сначала в сторону отрицательных, затем в сторону положительных потенциалов (рис. 1). Пики на катодной ветви ЦВА соответствуют: (I) – восстановлению радикала DPPH до аниона, (IV) – восстановлению аниона DPPH до радикала. Пики на анодной ветви ЦВА соответствуют процессам: (II) – окислению аниона DPPH до радикала, (III) – окислению радикала до катиона (рис. 1 а). Молекулярная форма DPPH существует в области положительных потенциалов (от ~ 0.4 до ~ 0.7 В) относительно насыщенного каломельного электрода сравнения [15].

Из уравнения Шевичка–Рэндлса [16] $I_p = 2,69 \cdot 10^5 \cdot z^{3/2} S D^{1/2} v^{1/2} C_i^0$ (где I_p – ток пика, А/см²; n – число электронов, принимающих участие в элементарном процессе; D – коэффициент диффузии восстанавливаемого/окисляемого вещества, см²/с; S – площадь электрода,

см²; V – скорость развертки, В/с; C^0 – концентрация деполаризатора в объеме раствора, моль/л) следует, что при заданной поверхности электрода и скорости развертки потенциала отношение токов пиков окисления или восстановления DPPH в ходе реакции равно отношению концентраций:

$$I/I_0 = C/C_0, \quad (1)$$

где I – значение тока в пике при данной концентрации DPPH (C), I_0 – значение тока в пике при начальной концентрации DPPH (C_0).

Следовательно, изменение величины тока пиков окислительно-восстановительных процессов определяется изменением концентрации DPPH [17] и может служить для оценки антиоксидантной активности вступающего в реакцию вещества. Для сравнения АОА в работе приведены данные по антиоксидантным свойствам незамещенного тетрафенилпорфина.

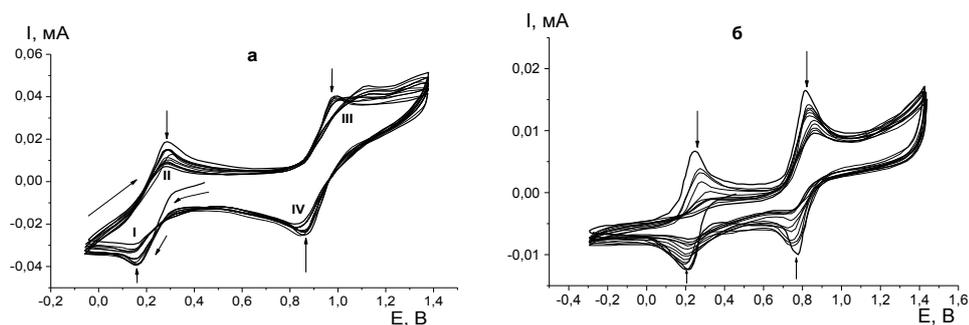


Рис.1. ЦВА растворов DPPH при добавлении порфиринов: а) DPPH + тетрафенилпорфин в дихлорметане; б) DPPH + H₂T(4-ОНPh)P в этаноле.

Fig. 1. CV of DPPH solutions with addition of porphyrins: a) DPPH + tetraphenylporphine in dichloromethane; b) DPPH + H₂T(4-ОНPh)P in ethanol.

Как следует из рис. 1 при постепенном добавлении порфирина наблюдается уменьшение пиков окисления и восстановления DPPH, что свидетельствует о снижении его концентрации, а, следовательно, наличия антиоксидантных свойств у исследуемого порфирина.

В таблице 2 представлены значения эффективной концентрации антиоксиданта (CI_{50}) (в ммоль/л), необходимой для уменьшения первого

восстановительного пика DPPH с концентрацией 10^{-3} моль/л на 50%. Для определения количественной оценки антиоксидантной активности записывали ЦВА раствора DPPH в присутствии эффективной концентрации порфиринов при скорости развертки потенциала 200 мВ/с в течении 10 мин и рассчитывали значение показателя A по изменению величины тока пиков DPPH в начальный I_0 и конечный $I_{\text{кон}}$ момент времени (через 10 мин от начала реакции) [18]:

$$A = \frac{I_0 - I_{\text{кон}}}{I_0},$$

Значение показателей A_1 и A_2 представлены в табл.1.

Таблица 2. Показатели эффективности антиоксидантного действия порфиринов.

Table 2. Indicators of the effectiveness of the antioxidant effect of porphyrins.

Порф.	CI ₅₀	A ₁	A ₂	A ₁	A ₂
		в C ₂ H ₅ OH		в CH ₂ Cl ₂	
H ₂ TPhP	–	–	–	0,34	0
H ₂ T(4-ОНPh)P	0,13	0,84	0,79	–	–

По результатам проведенных исследований показано, что гидроксизамещенный тетрафенилпорфин обладает антиоксидантными свойствами. Незамещенный тетрафенилпорфин (ТРР) не проявляет антиоксидантную активность в реакции с DPPH. Как можно заметить из рис. 1, при добавлении ТРР к раствору свободного радикала, пики DPPH практически не изменяются.

Полученные результаты оценки антиоксидантной активности электрохимическим методом дали возможность выбора наиболее активного антиоксиданта для дальнейших исследований антиоксидантных свойств на живых объектах.

В табл. 3 представлены результаты анализа крови кур: содержание в крови малонового диальдегида (нмоль/мл) и церулоплазмينا (нг/мл) для контрольной и всех четырех опытных групп.

Таблица 3. Содержание МДА и церулоплазмينا в крови кур.

Table 3. The content of MDA and ceruloplasmin in the blood of chickens.

	Контр.	Опытные группы			
		1	2	3	4
МДА	15,26 ±0,28	7,78 ±0,15	8,21 ±0,11	7,70 ±0,11	6,58 ±0,09
ЦП	1,96 ±0,06	1,99 ±0,13	2,10 ±0,07	2,34 ±0,06	2,44 ±0,06

Малоновый диальдегид возникает в организме при деградации полиненасыщенных жиров активными формами кислорода, также является маркером перекисного окисления липидов и оксидантного стресса [19, 20]. Во всех четырех опытных группах наблюдается снижение концентрации МДА по сравнению с контрольной: в 1-й группе содержание МДА снизилось на 49%; 2-й группе – на 46.2%; в 3-й группе – на 49.5%; в 4-й группе, при концентрации порфирина $C=10^{-4}$ моль/л, наблюдается наилучший результат – снижение МДА на 56% (табл. 3).

Церулоплазмин показывает степень антиоксидантной защиты организма. Согласно многочисленным литературным данным при различных патологических процессах уровень ЦП в плазме (сыворотке) крови, как правило, уменьшается [21, 22]. Содержание ЦП в сыворотке крови, по сравнению с контрольной группой, повышается: во 2-й группе на 7.1%, в 3-й группе – на 19.4% и в 4-й группе – на 24,5%. При пероральном введении аскорбиновой кислоты снижения ЦП относительно контрольной группы не наблюдается. Наилучший результат проявления антиоксидантной активности наблюдали в 4-й группе кур, которым выпаивали раствор $H_2T(4-OHPh)P$ с концентрацией $C=10^{-4}$ моль/л.

Выводы

1. На основе электрохимического метода исследования установлено, что 5,10,15,20-тетракис(4-гидроксифенил)порфин обладает высокой антиоксидантной активностью.

2. В ходе проведения эксперимента на живых объектах установлено, что исследуемый порфирин с концентрацией $C=10^{-3}$ и $C=10^{-4}$ моль/л не приводит к гибели животных, также не зафиксировано отравления организма и явного нарушения состояния кур.

3. Установлено, что $H_2T(4-OHPh)P$ с концентрацией $C=10^{-4}$ моль/л снижает содержание малонового диальдегида на 56% и увеличивает концентрацию церулоплазмينا в сыворотке крови на 24.5%. Вероятно, $H_2T(4-OHPh)P$ усиливает функцию печени в части синтеза белка, что приводит к увеличению концентрации церулоплазмينا в сыворотке крови, а также снижению общей активности свободных радикалов в организме.

4. Увеличение на порядок концентрации $H_2T(4-OHPh)P$ не приводит к улучшению результатов ЦП и МДА.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Kuzmin S.M., Chulovskaya S.A., Parfenyuk V.I.** Hydroxyalcyloxysubstitutedtetraphenylporphyrins: mechanismandsuperoxidescavengingactivity. *J. PorphyrinsPhthalocyanines*. 2016.V. 20. N. 12. P. 1477–1485. DOI:10.1142/S1088424616501212
2. **Tesakova M.V., Parfenyuk V.I.** The Electrochemical evaluation of the antioxidant activity of substituted tetraphenylporphyrins. *Russian Journal of Electrochemistry*.2017.V. 53. N. 11. P. 1281–1285. DOI: 10.1134/S1023193517110155
3. **Tesakova M.V., Semeikin A.S., Parfenyuk V.I.** Synthesis, electrochemical properties and antioxidant activity of hydroxy substituted tetraphenylporphyrins. *Macroheterocycles*. 2017. V. 10. N. 1. P. 43–50. DOI: 10.6060/mhc160319t

4. **Tesakova M.V., Semeikin A.S., Parfenyuk V.I.** Electrochemical properties and antioxidant activity of tetraphenylporphyrin derivatives. *Russian Journal of Electrochemistry*. 2015. V. 51.N. 7. P. 686–692. DOI: 10.1134/S1023193515070095

5. **Печникова Н.Л., Алопина Е.В., Кузнецов О.Ю., Агеева Т.А., Койфман О.И.** Синтез и исследование антибактериальной активности бромпроизводных порфиринопolyмеров и их цинковых комплексов. *Изв. вузов. Химия и хим. технология*. 2017. Т. 60. Вып. 2. С. 52-59. DOI: <http://dx.doi.org/10.6060/tcct.2017602.5404>

6. **Scherer R., Godoy H.T.** Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*. 2009. V. 112. N. 3. P. 654–658. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.06.026

7. **Bahar E., Ara J., Alam M., Nath B., Bhowmik U., Runi N.** In vitro antioxidant and thrombolytic activity of methanol extract of *Sidaacuta*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2013. V. 2. N. 2. P. 125–133.

8. **Промыслов М.Ш., Демчук М.Л.** Модификация метода определения суммарной антиоксидантной активности сыворотки крови. *Вопросы медицинской химии*. 1990. 4. С. 90–92.

9. **Ishihara M.** Studies on lipoperoxide of normal pregnant women and patient toxemia of pregnancy. *Clinica Chimica Acta*. 1978. V. 84. P. 1–9. DOI: 10.1016/0009-8981(78)90469-2

10. **Фримель Г.** Иммунологические методы. М.: Медицина. 1987. 472 с.

11. **Кузьмин С.М., Чуловская С.А., Парфенюк В.И.** Оценка антиоксидантной активности тетраакис(пара-аминофенил)порфина по отношению к супероксид анион-радикалу методом вольтамперометрии. *Макрогетероциклы*. 2013. Т. 6. Вып. 4. С. 334–339. DOI: 10.6060/mhc131057k

12. **Кузьмин С.М., Чуловская С.А., Тесакова М.В., Семейкин А.С., Парфенюк В.И.** Замещенные тетрафенилпорфирины как перспективные

молекулярные формы с высокой антиоксидантной активностью. *Макрогетероциклы*. 2014. Т. 7. Вып. 3. С. 218–224. DOI: 10.6060/mhc140511k

13. **Kuzmin S.M., Chulovskaya S.A., Parfenyuk V.I.** Substituent position influence on the electrochemical properties and antioxidant activity of tetra(aminophenyl)porphyrins. *J. Porphyrins Phthalocyanines*. 2014. V. 18. P. 585–593. DOI:10.1142/S108842461450031X

14. **Tesakova M.V., Semeikin A.S, Parfenyuk V.I.** Electrochemical determination of antioxidant properties of a series of tetraphenylporphyrin derivatives and their zinc complexes. *J. Porphyrins Phthalocyanines*. 2015. V. 19. P. 1034–1038. DOI:10.1142/S1088424615500765

15. **Solon E., Bard A.J.** The electrochemistry of diphenylpicrylhydrazyl. *Journal of the American Chemical Society*. 1964. V. 86. P. 1926–1928. DOI: 10.1021/ja01064a005

16. **Bard A.J., Faulkner L.R.** Electrochemical methods: fundamentals and applications. NY: John Wiley and Sons. INC. 2001. 850 p.

17. **Tyurin V., Jingwei Z., Glukhova A., Milaeva E.** Electrochemical antioxidative activity assay of metalloporphyrins bearing 2,6-di-tert-butylphenol groups Based on Electrochemical DPPH-Test. *Macroheterocycles*. 2011. V. 4. N. 3. P. 211–212. DOI: 10.6060/mhc2011.3.10

18. **Tyurin V.Yu., Yaohuang Wu, Dolganov A.V., Milaeva E.R.** The antioxidative activity assay of 2,6-di-tert-butylphenols with phosphonate groups using cyclic voltammetry. *Doklady Chemistry*. 2011. V. 436. N. 2. P. 31–33. DOI: 10.1134/S0012500811020042

19. **Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф.** Биологическая химия. М.: Медицина. 1998. 704 с.

20. **Назаренко Г.И., Кишкун А.А.** Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. М.: Медицина. 2000. 544 с.

21. **Бессарабов Б.Ф., Клетикова Л.В., Алексеева С.А., Сушкова Н.К.** Клинические и лабораторные методы исследования сельскохозяйственной птицы при незаразных болезнях. М.: ЗооВетКнига. 2014. 310 с.

22. **Зборовская И.А., Банникова М.В.** Антиоксидантная система организма, ее значение в метаболизме. *Вестн. РосАМН*. 1995. Вып. 6. С. 53–60.

REFERENCES

1. **Kuzmin S.M., Chulovskaya S.A., Parfenyuk V.I.** Hydroxy alcyloxy substituted tetraphenylporphyrins: mechanism and superoxide scavenging activity. *J. Porphyrins Phthalocyanines*. 2016. V. 20. N. 12. P. 1477–1485. DOI:10.1142/S1088424616501212

2. **Tesakova M.V., Parfenyuk V.I.** The Electrochemical evaluation of the antioxidant activity of substituted tetraphenylporphyrins. *Russian Journal of Electrochemistry*. 2017. V. 53. N. 11. P. 1281–1285. DOI: 10.1134/S1023193517110155

3. **Tesakova M.V., Semeikin A.S., Parfenyuk V.I.** Synthesis, electrochemical properties and antioxidant activity of hydroxy substituted tetraphenylporphyrins. *Macroheterocycles*. 2017. V. 10. N. 1. P. 43–50. DOI: 10.6060/mhc160319t

4. **Tesakova M.V., Semeikin A.S., Parfenyuk V.I.** Electrochemical properties and antioxidant activity of tetraphenylporphyrin derivatives. *Russian Journal of Electrochemistry*. 2015. V. 51. N. 7. P. 686–692. DOI: 10.1134/S1023193515070095

5. **Nadezhda L. Pechnikova, Tatiana A. Ageeva, Oskar I. Koifman, Elena V. Alopina, Oleg Yu.** Synthesis and study of the antibacterial activity of bromo-derivatives of porphyrin polymers and their zinc complexes. *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol.* 2017. T. 60. Вып. 2. С. 52-59. (in Russian). DOI: <http://dx.doi.org/10.6060/tcct.2017602.5404>

6. **Scherer R., Godoy H.T.** Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*. 2009. V. 112. N. 3. P. 654–658. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.06.026

7. **Bahar E., Ara J., Alam M., Nath B., Bhowmik U., Runi N.** In vitro antioxidant and thrombolytic activity of methanol extract of *Sidaacuta*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2013. V. 2. N. 2. P. 125–133.

8. **Promyslov M.SH., Demchuk M.L.** Modification of the method for determining the total antioxidant activity of blood serum. *Questions of medical chemistry*. 1990. V. 4. P. 90-92 (in Russian).

9. **Ishihara M.** Studies on lipoperoxide of normal pregnant women and patient toxemia of pregnancy. *Clinica Chimica Acta*. 1978. V. 84. P. 1–9. DOI: 10.1016/0009-8981(78)90469-2

10. **Frimel G.** Immunological methods. M.: Medicine, 1987. 472 p. (in Russian).

11. **Kuzmin S.M., Chulovskaya S.A., Parfenyuk V.I.** Estimation of antioxidant activity of tetrakis(p-aminophenyl)porphine regard to superoxide ions by voltammetry method. *Macroheterocycles*. 2013. V. 6. N 4. P. 334–339 (in Russian). DOI: 10.6060/mhc131057k

12. **Kuz'min S.M., Chulovskaya S.A., Tesakova M.V., Semeikin A.S., Parfenyuk V.I.** Substituted tetraphenylporphyrins as promising molecular systems with high antioxidant activity. *Macroheterocycles*. 2014. V. 7. N. 3. P. 218–224 (in Russian). DOI: 10.6060/mhc140511k

13. **Kuzmin S.M., Chulovskaya S.A., Parfenyuk V.I.** Substituent position influence on the electrochemical properties and antioxidant activity of tetra(aminophenyl)porphyrins. *J. Porphyrins Phthalocyanines*. 2014. V. 18. P. 585–593. DOI:10.1142/S108842461450031X

14. **Tesakova M.V., Semeikin A.S, Parfenyuk V.I.** Electrochemical determination of antioxidant properties of a series of tetraphenylporphyrin derivatives and their zinc complexes. *J. Porphyrins Phthalocyanines*. 2015. V. 19. P. 1034–1038. DOI:10.1142/S1088424615500765

15. **Solon E., Bard A.J.** The electrochemistry of diphenylpicrylhydrazyl. *Journal of the American Chemical Society*. 1964. V. 86. P. 1926-1928. DOI: 10.1021/ja01064a005

16. **Bard A.J., Faulkner L.R.** Electrochemical methods: fundamentals and applications. NY: John Wiley and Sons. INC. 2001.850 p.

17. **Tyurin V., Jingwei Z., Glukhova A., Milaeva E.** Electrochemical antioxidative activity assay of metalloporphyrins bearing 2,6-di-tert-butylphenol groups Based on Electrochemical DPPH-Test. *Macroheterocycles*. 2011. V. 4. N. 3. P. 211–212. DOI: 10.6060/mhc2011.3.10

18. **Tyurin V.Yu., Yaohuang Wu, Dolganov A.V., Milaeva E.R.** The antioxidative activity assay of 2,6-di-tert-butylphenols with phosphonate groups using cyclic voltammetry. *Doklady Chemistry*. 2011. V. 436. N. 2. P. 31–33. DOI: 10.1134/S0012500811020042

19. **Berezov T.T., Korovkin B.F.** Biological chemistry. M.: Medicine, 1998. 704 p. (in Russian).

20. **Nazarenko G.I., Kishkun A.A.** Clinical evaluation of laboratory results. M.: Medicine. 2000. 544 p. (in Russian).

21. **Bessarabov B.F., Kletikova L.V., Alekseeva S.A., Sushkova N.K.** Clinical and laboratory methods of research of agricultural birds in non-communicable diseases. M.: ZooVetKniga. 2014. 310 p. (in Russian).

22. **Zborovskaya. I.A., Bannikova M.V.** Antioxidant system of the body, its importance in metabolism. *Vestn. RosAMN*. 1995. N. 6. P. 53-60 (in Russian).