

*На правах рукописи*

**Дорожко Елена Владимировна**

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ТИОЛОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ В  
БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ МЕТОДОМ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИИ**

Специальность 02.00.02 – Аналитическая химия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Томск – 2010

Работа выполнена на кафедре физической и аналитической химии  
Национального исследовательского  
Томского политехнического университета

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ

доктор химических наук,  
доцент  
Короткова Елена Ивановна

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

доктор химических наук,  
профессор  
Гунцов Александр  
Владимирович

доктор химических наук,  
профессор  
Ковалева Светлана  
Владимировна

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ

Химический факультет  
Московского государственного  
университета  
им. М.В. Ломоносова

Защита диссертации состоится «\_\_\_» декабря 2010 г. на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 212.269.04 при ГОУ ВПО НИ ТПУ по адресу: 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-технической библиотеке ГОУ ВПО НИ ТПУ по адресу: г.Томск, ул. Белинского, 53.

Автореферат разослан: «\_\_\_» ноября 2010 г.

Ученый секретарь совета по защите  
докторских и кандидатских диссертаций

Т.М. Гиндуллина

## Общая характеристика работы

### Актуальность темы.

Биологически-активные серусодержащие соединения (БАСС), такие как глутатион, цистеин, метионин, липоевая кислота, содержащие тиоловые (SH-) группы, играют важную роль в физиологических и биохимических процессах в организме человека и животных. Особую роль тиоловым соединениям отводят при рассмотрении их в качестве компонентов неферментативного звена антиоксидантной защитной системы организма наряду с мочево́й, аскорбиновой кислотами, различными формами токоферола. Присутствующие в организме тиоловые соединения в первую очередь подвергаются действию активных кислородных радикалов, что предохраняет от их действия функциональные группы биологических молекул и клеточных мембран. Другим важным свойством тиоловых соединений является их способность образовывать комплексные соединения с ионами металлов ( $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ). Это позволяет защищать организм от токсичного действия «тиоловых ядов». Поэтому, уровень суммарного содержания тиоловых соединений в биологических объектах может выступать в качестве показателя оксидативного стресса и детоксикации организма.

На основе серусодержащих соединений создан целый ряд синтетических антиоксидантов для защиты клеток от окислительного стресса; радиопротекторов; лекарственных препаратов, применяемых при терапии атеросклероза, ишемической болезни сердца, интоксикации. На сегодняшний день, в качестве БАД, выпускаются глутатион, метионин, L-цистеини  $\alpha$ -липоевая кислота, применение которых рекомендуется при профилактики и лечении многих заболеваний.

Исследование серусодержащих соединений имеет и диагностическую ценность при определении содержания сульфгидрильных групп в сыворотке крови у больных с разными заболеваниями. Поэтому разработка новых чувствительных, доступных и экспрессных методик для определения тиоловых соединений в биологических объектах является актуальной задачей, от решения которой зависит оценка окислительных процессов и детоксикации организма в диагностических целях.

В данной работе в качестве метода суммарного определения тиоловых соединений в объектах природного и искусственного происхождения предлагается использовать простой в аппаратурном оформлении, экспрессный и высокочувствительный метод вольтамперометрии, имеющий большие потенциальные возможности.

### Цель работы:

Исследовать физико-химические закономерности окисления-восстановления ряда серусодержащих соединений (глутатиона, цистеина, метионина, липоевой кислоты) с целью разработки вольтамперометрической методики определения суммарного содержания тиоловых соединений в сыворотке крови человека.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие **задачи**:

1. Исследовать электрохимические свойства ряда тиоловых соединений (глутатиона, цистеина, метионина, липоевой кислоты) в зависимости от ряда факторов (природы фонового электролита, pH раствора, наличия ионов металлов, материала электрода).

2. рассмотреть закономерности процесса комплексообразования между ионами ртути (I), (II), меди (II) с глутатионом. Определить состав и константы устойчивости комплексов  $\text{Hg}(\text{GS})_2$  и  $\text{Hg}_2(\text{GS})_2$  методами потенциометрии, спектрофотометрии. Исследовать физико-химические закономерности окисления-восстановления глутатиона, цистеина, метионина, липоевой кислоты на ртутно-пленочном электроде.

3. Используя метод катодной вольтамперометрии и процесс электровосстановления кислорода, исследовать антиоксидантные свойства ряда серусодержащих соединений для выяснения их роли в механизмах взаимодействия с кислородом и его активными радикалами.

4. Разработать вольтамперометрическую методику количественного химического определения суммарного содержания тиоловых соединений в сыворотке крови человека. Провести оценку метрологических характеристик методики. Провести сопоставление результатов определения суммарного содержания тиоловых соединений в сыворотке крови человека методами спектрофотометрии и вольтамперометрии.

#### **Научная новизна.**

Впервые установлены закономерности окисления-восстановления глутатиона на платиновом электроде (PtЭ) в присутствии ионов ртути (II), стекло-углеродном электроде (СУЭ) в присутствии ионов меди (II) методом циклической вольтамперометрии. Показано, что ионы ртути  $\text{Hg}$  (II) образуют устойчивые комплексы с глутатионом. Определены потенциалы катодных и анодных пиков цистеина, метионина и липоевой кислоты на РПЭ. Предложены схемы окисления-восстановления тиоловых соединений в присутствии ионов металлов.

Впервые исследованы составы комплексов  $\text{Hg}(\text{GS})_2$  и  $\text{Hg}_2(\text{GS})_2$ , определены их константы устойчивости методами потенциометрии и спектрофотометрии.

Впервые исследована антиоксидантная активность (АОА) ряда тиоловых соединений (глутатиона, цистеина, метионина, липоевой кислоты) методом катодной вольтамперометрии с использованием процесса электровосстановления кислорода. Предложены схемы взаимодействия тиоловых соединений с кислородом и его радикалами.

Впервые разработан новый подход к определению суммарного содержания тиоловых соединений в сыворотке крови человека, используя метод вольтамперометрии, отличающийся высокой чувствительностью, простотой, экспрессностью и удобством анализа. Проведено сопоставление результатов анализа независимым спектрофотометрическим методом.

#### **Практическая значимость.**

Разработана вольтамперометрическая методика количественного химического определения суммарного содержания тиоловых соединений в сыворотке крови человека. Проведено суммарное содержание тиоловых соединений в сыворотке крови человека в норме и при патологии алкоголизма, используя вольтамперометрическую методику.

Доступность и простота приборного оформления, минимальная пробоподготовка дают возможность использования данной методики для медицинских исследований в контроле над эффективностью лечения и профилактики оксидативного стресса и детоксикации организма в клинической практике.

Проведена оценка антиоксидантной активности ряда тиоловых соединений по отношению к процессу электровосстановления кислорода. Полученные результаты позволили выявить наиболее активные антиоксиданты из ряда тиоловых соединений и дать рекомендации для их дальнейшего использования.

Определены оптимальные условия определения глутатиона в объектах искусственного происхождения на СУЭ в присутствии ионов меди (II) на уровне концентрации  $1.0 \cdot 10^{-9}$  моль/л и Pt электроде в присутствии ионов ртути (II) на уровне концентрации  $1.0 \cdot 10^{-4}$  моль/л.

#### **Результаты и положения, выносимые на защиту:**

1. Результаты оценки влияния природы фонового электролита, pH раствора, наличия ионов металлов, материала электрода на электрохимические свойства ряда тиоловых соединений (глутатион, цистеина, метионина, липоевой кислоты) в модельных растворах.
2. Методом потенциометрии установлен состав комплексов  $Hg(GS)_2$  и  $Hg_2(GS)_2$ , определены их константы устойчивости  $\ln\beta_2=88,4$  и  $\ln\beta_2=36,0$ .
3. Результаты определения антиоксидантной активности ряда тиоловых соединений с использованием процесса электровосстановления кислорода методом катодной вольтамперометрии.
4. Результаты определения суммарного содержания тиоловых соединений в сыворотке крови человека в норме и патологии методами спектрофотометрии и вольтамперометрии.

#### **Достоверность полученных результатов:**

1. Проведено сопоставление результатов по определению состава комплексов  $Hg(GS)_2$  и  $Hg_2(GS)_2$ , полученных методом потенциометрии с методом спектрофотометрии. Результаты сопоставимы между собой.
2. Проведено сопоставление результатов по определению антиоксидантной активности ряда тиоловых соединений методом вольтамперометрии с методом спектрофотометрии. Результаты, полученные двумя методами, коррелируют между собой.
3. Проведено сопоставление результатов по определению суммарного содержания тиоловых соединений в сыворотке крови человека в норме и патологии методами спектрофотометрии и вольтамперометрии. Результаты, полученные двумя методами, коррелируют между собой.

#### **Апробация работы.**

Основные результаты работы представлены устными и стендовыми докладами на российских и международных конференциях и симпозиумах: на международном симпозиуме «Молекулярные механизмы регуляции функции клетки» (г.Тюмень 12-16 сентября, 2005г.), на международной конференции «ISRANALYTICA» (г. Иерусалим, Израиль, 2006г.), на Всероссийской научной конференции с международным участием «Электроаналитика 2005» (Екатеренбург 23-27 мая, 2005г.), на международном конгрессе по аналитической химии «ICAS-2006» (г. Москва, 2006г), на VII всероссийская конференция по электрохимическим методам анализа с международным участием (г. Москва, 2008г), на Международной научно - практической конференция «Биотехнология» (г. Москва, 2008), на Итоговой конференции по результатам выполнения мероприятий за 2009 год в рамках приоритетного направления «Живые системы» ФЦП « Исследования

и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» (г. Москва, 2009г.).

### **Публикации.**

По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, и тезисы 9 докладов.

### **Объем и структура диссертации.**

Диссертационная работа изложена на 173 страницах, содержит 11 таблиц, 42 рисунка и библиографию из 213 наименований. Работа состоит из введения, пяти глав, выводов, списка литературы и приложений.

Во введении раскрыта актуальность темы, определены цели и задачи исследования, сформулирована научная новизна и практическая значимость работы.

В первой главе приведен литературный обзор, в котором рассмотрены физико-химические свойства, биологическая роль, методы определения тиоловых соединений.

Во второй главе описаны условия эксперимента, способы приготовления растворов и электродов, представлены данные об используемом оборудовании и объектах исследования.

Третья глава посвящена исследованию электрохимических свойств глутатиона в зависимости от влияния различных факторов: материала электрода, природы фоновых электролитов, pH раствора, наличия ионов металлов. Описаны электрохимические свойства цистеина, метионина, липоевой кислоты. Исследованы свойства комплексообразования глутатиона с ионами ртути (I) и (II) методами потенциометрии и спектрофотометрии. Исследованы физико-химическим закономерностям восстановления глутатиона на ртутно-пленочном электроде.

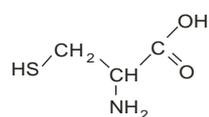
В четвертой главе представлены результаты определения антиоксидантной активности тиоловых соединений по отношению к процессу электровосстановления кислорода методом катодной вольтамперометрии. Представлены результаты сравнительных определений АОА тиоловых соединений методом спектрофотометрии.

В пятой главе дано описание методики количественного определения глутатиона в модельных средах и суммарного содержания тиоловых соединений в сыворотке крови человека методом вольтамперометрии. Определены метрологические характеристики методики. Представлены результаты сравнительных определений суммарного содержания тиоловых соединений в сыворотке крови человека в норме и патологии методами спектрофотометрии и вольтамперометрии.

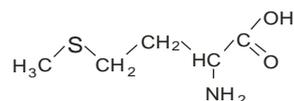
## **Экспериментальная часть**

### *Объекты исследования*

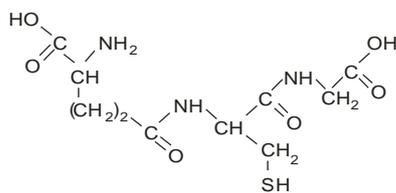
В качестве модельных систем для поиска аналитических сигналов тиоловых соединений и исследования их антиоксидантных свойств были рассмотрены модельные растворы: L-глутатиона (GSH); L-цистеина (CYS); метионина;  $\alpha$ -липоевой кислоты .



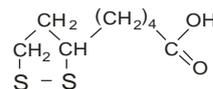
Цистеин



Метионин



Глутатион



Липоевая кислота

Рис.1 Структурные формулы L-глутатитиона, L-цистеина, метионина и α- липоевой кислоты

Для определения суммарного содержания тиоловых соединений в биологических объектах была использована сыворотка крови людей без видимых патологий и больных алкоголизмом. Электрохимические свойства БАСС исследовались на вольтамперометрическом анализаторе ТА-2 («Техноаналит» г. Томск). Использовались индикаторные электроды: платиновый (Pt), ртутно-пленочный (РПЭ), стеклоуглеродный (СУЭ). В качестве электрода сравнения в работе использовали хлоридсеребряный электрод (ХСЭ). В качестве вспомогательного электрода использовали СУЭ. Исследование антиоксидантных свойств тиоловых соединений осуществляли на СУЭ с использованием анализатора «АОА-1» («Полиант» г. Томск).

### Основное содержание работы

#### *Исследование электрохимических свойств тиоловых соединений*

#### Исследование влияния материала электрода, природы фоновых электролитов, pH раствора, наличие ионов металлов на электрохимических свойств глутатиона

Изучено влияние материала электрода на электрохимические свойства глутатиона. Методом циклической вольтамперометрии были найдены аналитические сигналы GSH на РПЭ в катодной и анодной областях (рис. 1). Потенциал окисления GSH составил  $E = -0.065\text{В}$ , потенциал восстановления составил  $E = -0.237\text{В}$ .

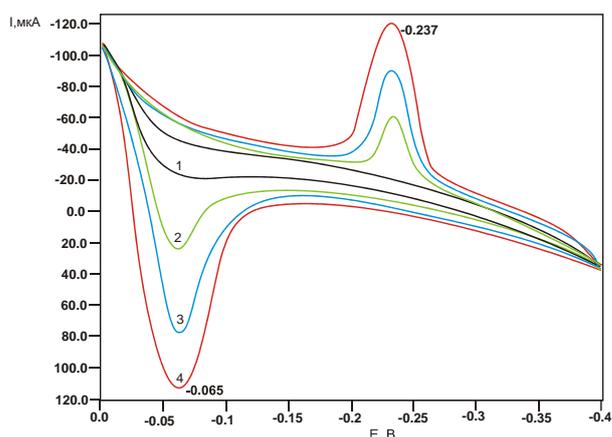


Рис.1. Циклические вольтамперограммы окисления-восстановления GSH на РПЭ в фосфатном буферном растворе (рН 6.86) в отсутствие вещества (1); и в присутствии  $5.2 \cdot 10^{-4}$  М GSH (2);  $8.2 \cdot 10^{-4}$  М GSH (3);  $9.8 \cdot 10^{-4}$  М GSH (4).  $W=60$  мВ/с.

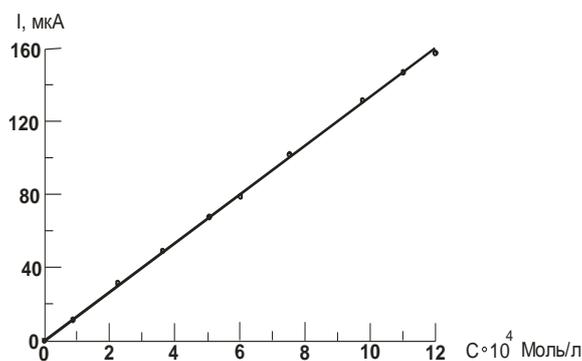
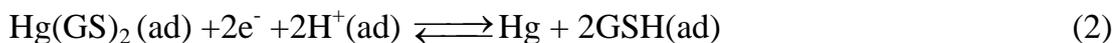


Рис. 2. Зависимость тока восстановления GSH на РПЭ от его концентрации в растворе в области от  $4.5 \cdot 10^{-5}$  моль/л до  $1.1 \cdot 10^{-3}$  моль/л.  $W=60$  мВ/с; рН 6.86 фосфатный буфер.

Ток пика восстановления отражает восстановление комплекса ртути-глутатион. Ток пика окисления отражает формирование комплекса ртути-глутатион на поверхности РПЭ. Полный электродный механизм может быть представлен уравнениями (1–2):



Используя данные условия эксперимента, была построена зависимость тока восстановления GSH на РПЭ от его концентрации в растворе, имеющая прямолинейный характер в области концентраций от  $4.5 \cdot 10^{-5}$  до  $1.1 \cdot 10^{-3}$  М (рис. 2). Предел обнаружения GSH составил  $1.3 \cdot 10^{-5}$  М.

На электродах из других материалов (Pt, СУЭ) в данной области потенциалов GSH оказался неактивным. Отсутствие сигнала GSH в отсутствие ионов-комплексообразователей свидетельствует о том, что электрохимическая активность GSH проявляется в области потенциалов от  $E=0.0$  до  $-0.40$  В за счет комплексообразования с ионами металлов через тиоловую группу.

С целью выбора фонового электролита исследовали восстановление GSH на РПЭ в растворах: фосфатные буферные растворы с рН  $4.01 \div 9.18$  и боратные буферные растворы с рН  $4.01 \div 9.18$ . Все перечисленные растворы можно использовать для вольтамперометрического определения GSH на РПЭ при  $E_{\text{пк}} = -0.237$  В, однако рабочим фоновым электролитом был выбран боратный буферный раствор (рН 9.18), на фоне которого регистрируются четко выраженные и хорошо воспроизводимые пики восстановления.

На рис. 3 представлена зависимость тока восстановления GSH на РПЭ при  $E = -0.237$  В в боратном буфере от рН раствора.

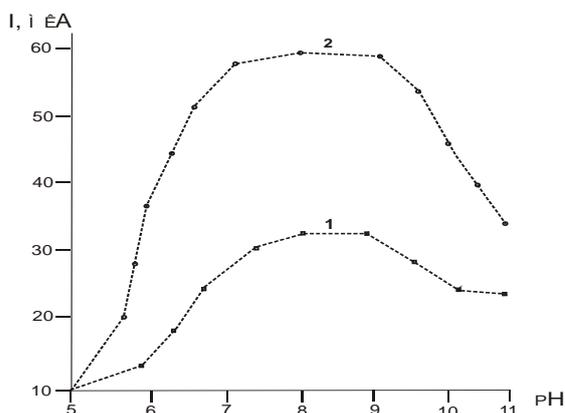


Рис. 3. Зависимость тока восстановления GSH на РПЭ при  $E = -0.237$  В от pH раствора при концентрациях глутатиона в растворе:  $C_1 = 8.2 \cdot 10^{-5}$  моль/л (1);  $C_2 = 5.6 \cdot 10^{-4}$  моль/л (2)

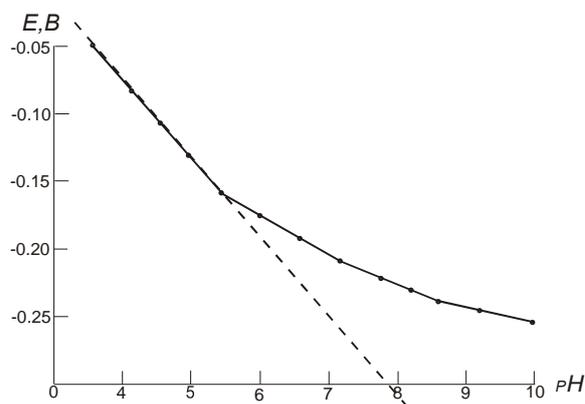


Рис. 4. Зависимость потенциала восстановления GSH на РПЭ от pH раствора,  $C_{GSH} = 5.6 \cdot 10^{-4}$  моль/л

В области pH 8-9 наблюдался максимальный ток восстановления GSH, тогда как в сильно - щелочных (pH 10-11) и нейтральных (pH 6.86) средах ток имел минимальное значение. Интервал pH от 8 до 9, по-видимому, способствует смещению равновесия в сторону анионной формы глутатиона  $GS^-$  с последующим образованием комплексного соединения с ионами ртути:



На рис. 4 представлена зависимость потенциала восстановления GSH на РПЭ от pH раствора. Из зависимости потенциала максимума пика восстановления GSH на РПЭ от кислотности среды следует, что с увеличением pH происходит смещение потенциала пика в анодную область, что связано с предшествующей реакцией депротонизации, в результате которой образуется анионная форма глутатиона по уравнению (3).

Значение pH в точке пересечения продолжения прямолинейного участка экспериментальной зависимости  $E$  от pH соответствует величине константы диссоциации глутатиона  $pK = 7.92$ . Из этих данных вычислено значение эффективной константы диссоциации GSH по тиоловой группе, которое составило  $K_{эф} = 1.2 \cdot 10^{-8}$ .

При исследовании комплексообразующих свойств GSH с ионами ртути  $Hg^{2+}$  были сняты катодные вольтамперограммы в области потенциалов  $E =$  от 0.0 до  $-0.8$  В на РтЭ в боратном буферном растворе (pH 9.18).

На рис. 5 представлены вольтамперограммы восстановления ионов ртути  $Hg^{2+}$  ( $3.4 \cdot 10^{-5}$  М) в отсутствии и в присутствии раствора GSH на РтЭ.

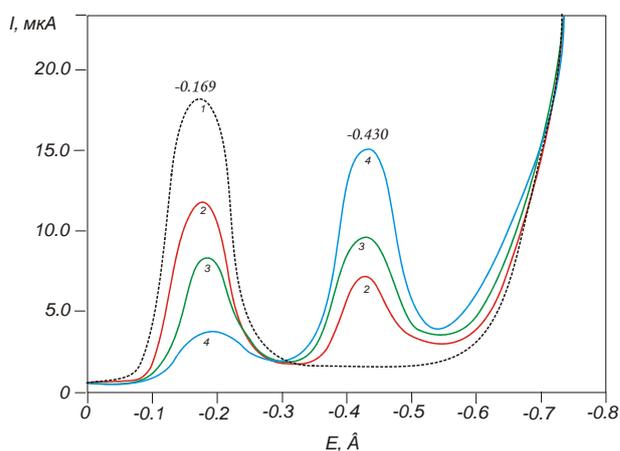


Рис. 5. Вольтамперограммы восстановления ионов  $\text{Hg}^{2+}$  ( $3.4 \cdot 10^{-5}$  моль/л) в отсутствии (1) и в присутствии GSH в растворе:  $5.9 \cdot 10^{-5}$  моль/л (2);  $1.2 \cdot 10^{-5}$  моль/л (3);  $1.8 \cdot 10^{-5}$  моль/л (4).  $W=60$  мВ/с; pH 9.18 боратный буфер; Трехэлектродная ячейка. Рабочий электрод платиновый

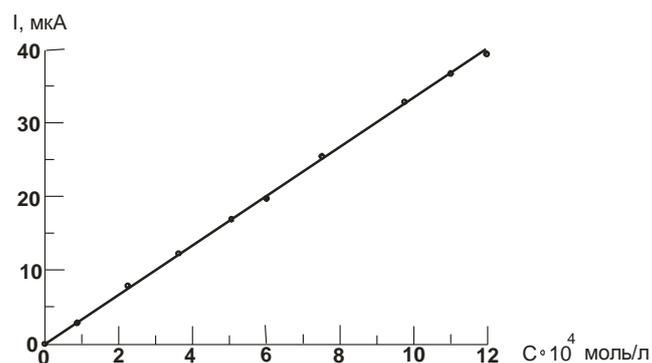


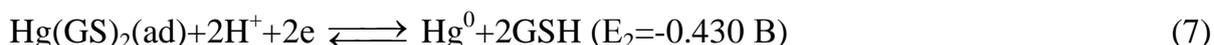
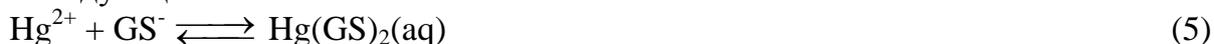
Рис. 6. Зависимость тока восстановления GSH в присутствии ионов  $\text{Hg}^{2+}$  от концентрации GSH в растворе в области от  $1.0 \cdot 10^{-4}$  моль/л до  $1.2 \cdot 10^{-3}$  моль/л.  $W=60$  мВ/с; pH 9.18 боратный буфер; Трехэлектродная ячейка. Рабочий электрод платиновый

В отсутствие GSH в исследуемом растворе ионы  $\text{Hg}^{2+}$  восстанавливаются в одну стадию по схеме (рис. 5, кривая 1):



При введении в ячейку раствора GSH ( $5.9 \cdot 10^{-5}$  М) был обнаружен новый пик при  $E_2 = -0.430$  В (рис. 5, кривые 2), который значительно увеличивался с увеличением концентрации GSH, при этом первый пик уменьшался (рис. 5, кривые 3-4). Данные электрохимические явления связаны с образованием комплекса  $\text{Hg}(\text{GS})_2$ , который восстанавливается при потенциале  $E_2 = -0.430$  В. За счет связывания свободных ионов  $\text{Hg}^{2+}$  в устойчивый комплекс при введении раствора GSH, первый пик восстановления при потенциале  $E_1 = -0.169$  В уменьшается и смещается в более электроотрицательную область потенциалов. Наиболее эффективная концентрация соли  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  составила  $3.7 \cdot 10^{-5}$  М.

Необходимо отметить, что комплекс  $\text{Hg}(\text{GS})_2$  предварительно адсорбируется на поверхности Pt. Полный электродный механизм может быть представлен следующей схемой:



Используя данные условия эксперимента, была построена зависимость тока восстановления комплекса  $\text{Hg}(\text{GS})_2$  от концентрации GSH в растворе, имеющая прямолинейный характер в области концентраций от  $1.0 \cdot 10^{-4}$  до  $1.2 \cdot 10^{-3}$  М (рис. 6). Предел обнаружения GSH по току восстановления комплекса  $\text{Hg}(\text{GS})_2$  составил  $8.3 \cdot 10^{-5}$  М.

В работе было проведено исследование реакции комплексообразования GSH с ионами меди  $\text{Cu}^{2+}$  на СУЭ в боратном буферном растворе (pH 9.18). На платиновом электроде перенапряжение выделения меди очень мало, следовательно, для оценки влияния меди на глутатион в качестве индикаторного электрода был выбран СУЭ.

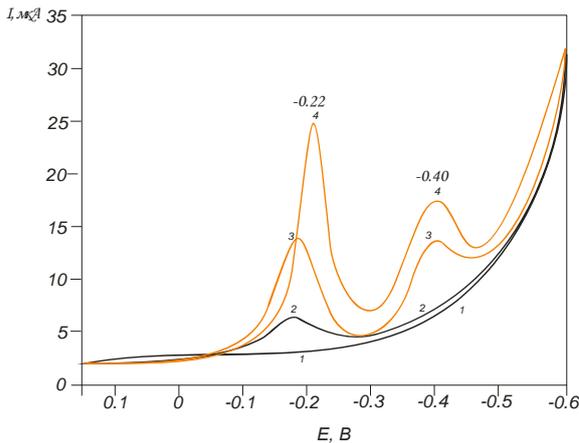


Рис. 7. Вольтамперограммы восстановления ионов  $\text{Cu}^{2+}$  ( $4.2 \cdot 10^{-5}$  моль/л) в отсутствии (2) и в присутствии GSH в растворе:  $1.37 \cdot 10^{-11}$  моль/л (3);  $6.8 \cdot 10^{-8}$  моль/л (4). (1) – линия остаточного тока.  $W=60$  мв/с; pH 9.18 боратный буфер; Трехэлектродная ячейка. Рабочий электрод стеклоуглеродный

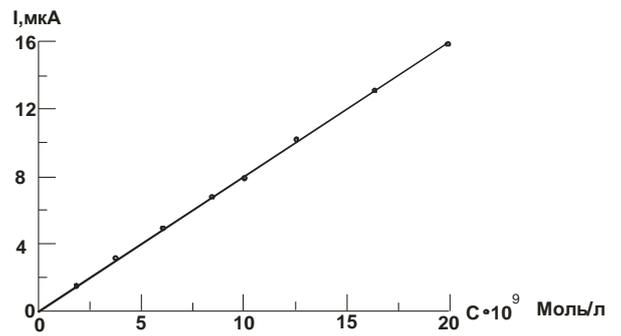


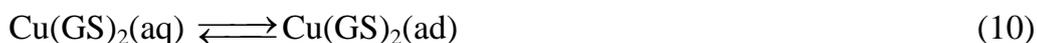
Рис. 8. Зависимость тока восстановления GSH в присутствии ионов  $\text{Cu}^{2+}$  от концентрации GSH в растворе в области от  $1.0 \cdot 10^{-9}$  моль/л до  $2.0 \cdot 10^{-8}$  моль/л.  $W=60$  мв/с; pH 9.18 боратный буфер; Трехэлектродная ячейка. Рабочий электрод стеклоуглеродный

На рис. 7 показаны вольтамперограммы восстановления ионов меди  $\text{Cu}^{2+}$  на СУЭ в отсутствии и в присутствии GSH. В отсутствии GSH в растворе ионы меди  $\text{Cu}^{2+}$  восстанавливаются на СУЭ в одну стадию по механизму (рис. 7, кривая 2):

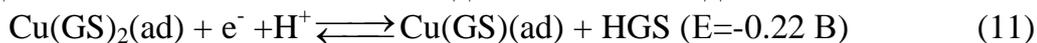


При введении в электрохимическую ячейку раствора GSH  $1.37 \cdot 10^{-11}$  М (рис. 7, кривая 3) появляется новый пик при  $E_2 = -0.4$  В, который так же как и первый при  $E_1 = -0.18$  В увеличивается с добавлением концентрации GSH  $6.8 \cdot 10^{-8}$  М (рис. 7, кривая 4). Замечено, что потенциал пика восстановления при  $E = -0.18$  В в присутствии GSH смещается в сторону более отрицательных значений потенциалов.

Было предложено, что данные электрохимические явления связаны с тем, что при введении GSH в раствор образуется комплексное соединение состава  $\text{Cu}(\text{GS})_2$ , которое адсорбируется на поверхности СУЭ:



Адсорбированный комплекс восстанавливается на СУЭ в две стадии. При этом следует отметить, что анионы  $\text{GS}^-$  выступают в качестве катализатора процесса восстановления ионов меди из комплекса до  $\text{Cu}^0$ :



Прямолинейная зависимость тока восстановления комплекса  $\text{Cu}(\text{GS})$  при  $E_2 = -0.40$  В от концентрации GSH в растворе при данных условиях эксперимента сохранялась в области от  $1.0 \cdot 10^{-11}$  до  $2.0 \cdot 10^{-8}$  М (рис. 8), предел обнаружения GSH составил  $8.2 \cdot 10^{-12}$  М.

Таким образом, в присутствии ионов меди в растворе образуется комплексное соединение глутатиона с медью, которое позволяет значительно снизить предел обнаружения глутатиона до  $8.2 \cdot 10^{-12}$  М, используя в качестве аналитического сигнала пик восстановления комплекса Cu(GS) при  $E = -0.40$  В на СУЭ. Оптимальная концентрация ионов меди в растворе составила  $4.2 \cdot 10^{-5}$  моль/л в боратном буферном растворе pH 9.18.

Новая методика определения в указанном диапазоне концентраций GSH имеет преимущества по сравнению с используемыми вольтамперометрическими методами: значительно увеличивается чувствительность метода, использование в качестве электродного материала не токсичной ртути, а СУЭ. Однако, аналитический сигнал GSH в присутствии ионов меди (II) на СУЭ плохо воспроизводится в условиях эксперимента, что затрудняет его использование для разработки методики определения тиоловых соединений в биологических объектах.

Таким образом, исследованы электрохимические свойства GSH. Рассмотрено влияние различных факторов на его электрохимические свойства: материал электрода, pH раствора, природа фоновых электролитов.

Установлено, что процесс окисления-восстановления глутатиона на РПЭ идет с формированием комплекса  $Hg(GS)_2$ , в случае анодного тока, и с восстановлением комплекса  $Hg(GS)_2$ , в случае катодного тока. Наиболее оптимальной средой для электрохимического определения GSH является боратный буферный раствор с pH 9.18. Из экспериментальных данных впервые вычислено значение эффективной константы диссоциации GSH  $K_{эф} = 1.2 \cdot 10^{-8}$  на РПЭ методом вольтамперометрии.

Изучено явление комплексообразования GSH с ионами  $Hg^{2+}$  и  $Cu^{2+}$ . Сделано ряд предположений по механизмам восстановления комплексов  $Hg(GS)_2$ ,  $Cu(GS)_2$  на PtЭ и СУЭ.

Исследование электрохимических свойств цистеина, метионина и липоевой кислоты на РПЭ

В данном разделе были изучены электроаналитические свойства цистеина, липоевой кислоты, и метионина на РПЭ с целью поиска аналитического сигнала от SH-групп исследуемых молекул для разработки методики суммарного определения тиоловых соединений в сыворотке крови человека.

В работе были сняты циклические вольтамперные кривые для всех исследуемых веществ (рис. 9, 11, 13) и получены пики окисления и восстановления тиоловых соединений в зависимости от их концентрации в растворе. Потенциалы катодных и анодных пиков представлены в табл. 1.

**Таблица 1.** Потенциалы катодных и анодных пиков тиоловых веществ

Название	$E_a, В$	$E_k, В$
Цистеин	-0.082	-0.187
Липоевая кислота	-0.309	-0.373
Метионин	-	-0.315

Следует отметить, что для исследуемых веществ пики восстановления и окисления в области потенциалов от -0.082 до -0.373 указывают на формирование на РПЭ (в случае анодных пиков) и восстановление (в случае катодных пиков) тиол-ртутных комплексов через SH-группы. Форма циклических вольтамперных кривых и разность потенциалов катодных и анодных пиков говорят преимущественно об квазиобратимых или обратимых электродных процессах.

Необходимо отметить, что в исследуемом диапазоне концентраций  $3 \cdot 10^{-4}$  -  $2 \cdot 10^{-3}$  моль/л ток восстановления тиоловых соединений, кроме метионина, прямопропорционален их концентрациям в растворах. Это может быть использовано для разработки методик их количественного определения в модельных средах. Так же сигналы могут быть использованы для разработки методик количественного определения суммарного определения тиоловых соединений в сыворотке крови человека по цистеину или липоевой кислоте в указанном диапазоне концентраций.

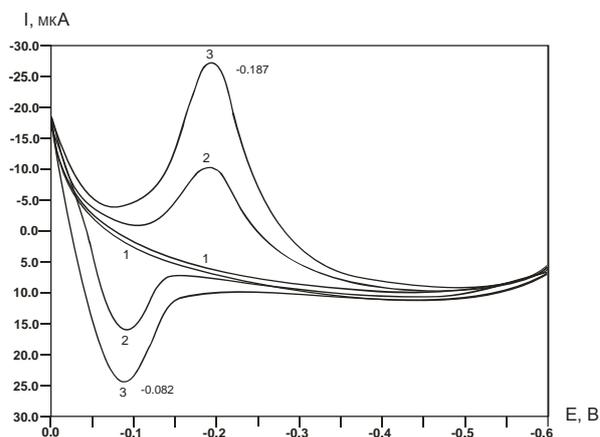


Рис. 9. Циклические вольтамперограммы цистеина на РПЭ в фоновом электролите – боратный буфер pH 9.18; W=60 мВ/с; (1) – фоновая кривая; (2) –  $2.6 \cdot 10^{-4}$  моль/л; (3) –  $7.7 \cdot 10^{-4}$  моль/л

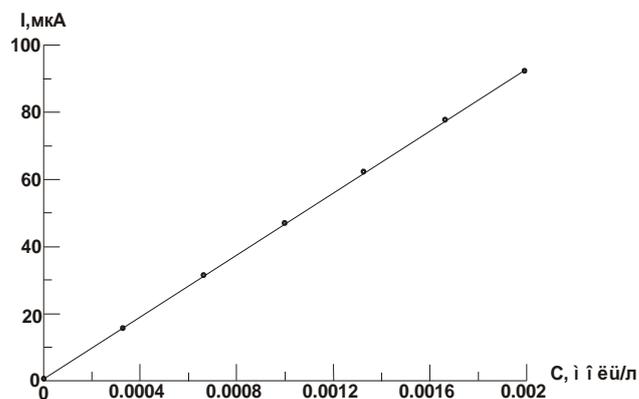


Рис. 10. Зависимость тока восстановления цистеина на РПЭ от его концентрации в растворе; W=60 мВ/с; pH 9.18 боратный буфер

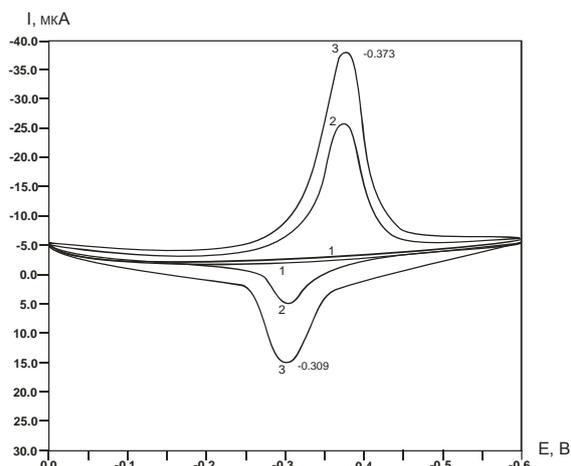


Рис. 11. Циклические вольтамперограммы липоевой кислоты на РПЭ в фоновом электролите – боратный буфер pH 9.18; W=60 мВ/с; (1) – фоновая кривая; (2) –  $2.6 \cdot 10^{-4}$  моль/л; (3) –  $7.7 \cdot 10^{-4}$  моль/л

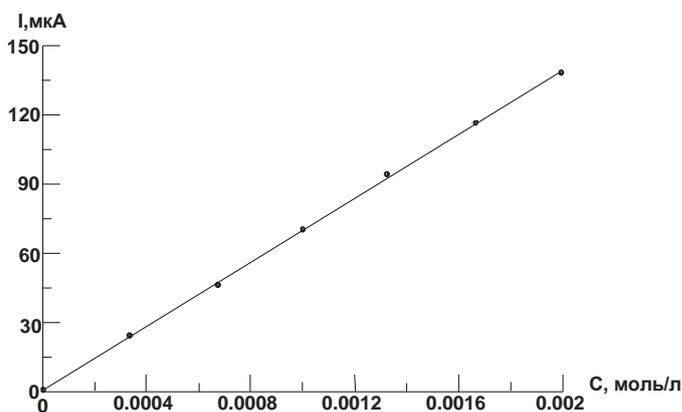


Рис. 12. Зависимость тока восстановления липоевой кислоты на РПЭ от ее концентрации в растворе на РПЭ; W=60 мВ/с; pH 9.18 боратный буфер

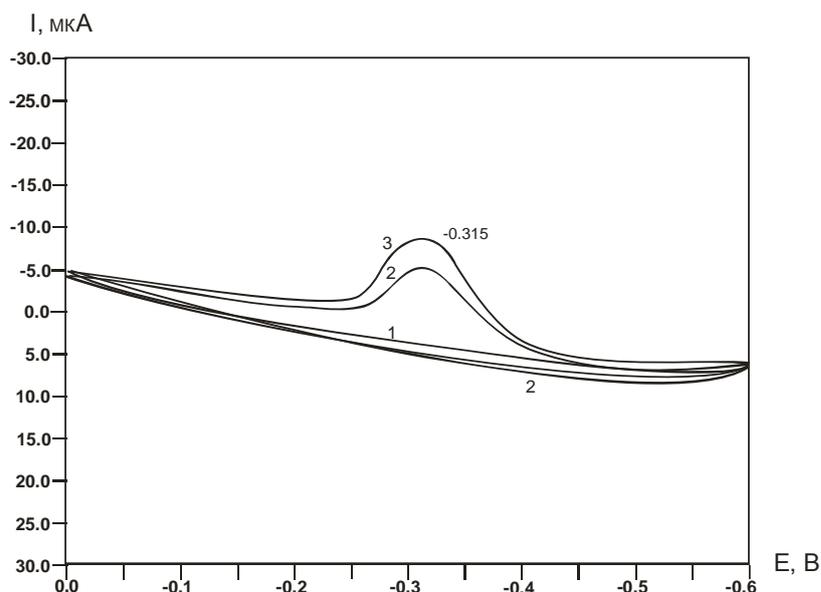


Рис. 13. Циклические вольтамперограммы метионина на РПЭ в фоновом электролите – боратный буфер рН 9.18; W=60 мВ/с; (1) – фоновая кривая; (2) –  $1.3 \cdot 10^{-3}$  моль/л; (3) –  $7.6 \cdot 10^{-3}$  моль/л

### ***Определение констант устойчивости и состава комплексов ртуть-глутатион методами потенциометрии и спектрофотометрии***

Для определения состава комплексов ртуть-глутатион и их констант устойчивости ( $\ln\beta_n$ ) с ионами ртути (I) и (II) методом потенциометрии в работе использовалась установка для измерения ЭДС системы, платиновый и хлорид-серебрянные электроды, растворы нитратов солей ртути  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  ( $1 \cdot 10^{-6}$  моль/л) и  $\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2$  ( $1 \cdot 10^{-6}$  моль/л). Постоянство ионной силы поддерживалось раствором  $\text{KNO}_3$  (1 моль/л). Использовался свежеприготовленный раствор GSH (5 моль/л), из которого методом последовательного разбавления готовили другие растворы GSH. Определение потенциала системы проводили в боратном буферном растворе рН 9.18. Исследуемый раствор продували инертным газом азотом для удаления следов кислорода. Первоначально исследовалась система  $\text{Hg(II)-GSH}$ .

Анализ экспериментальных зависимостей равновесного потенциала системы E от концентраций ионов  $\text{Hg}^{2+}$  и лиганда  $\text{GS}^-$  при различных их соотношениях на основе уравнения Нернста (13) позволил определить параметры процесса комплексообразования – число лигандов (n) и константу устойчивости  $\ln\beta_n$  комплекса  $\text{Hg}(\text{GS})_2$ .

$$E = E^0 - \frac{RT}{2F} \ln\beta_n + \frac{RT}{2F} \ln C(\text{Hg}_{2+}) - \frac{nRT}{2F} \ln C(\text{GS}) \quad (13)$$

Где R-универсальная газовая постоянная 8,31 Дж/моль·К;

T-температура, К;

F-постоянная Фарадея 96485,3 Кл·моль<sup>-1</sup>;

$\beta_n$ -константа устойчивости комплекса

$E^0$  формальный электродный потенциал системе не содержащей комплексообразующих частиц, а только ионы ртути  $\text{Hg}^{2+}$ .

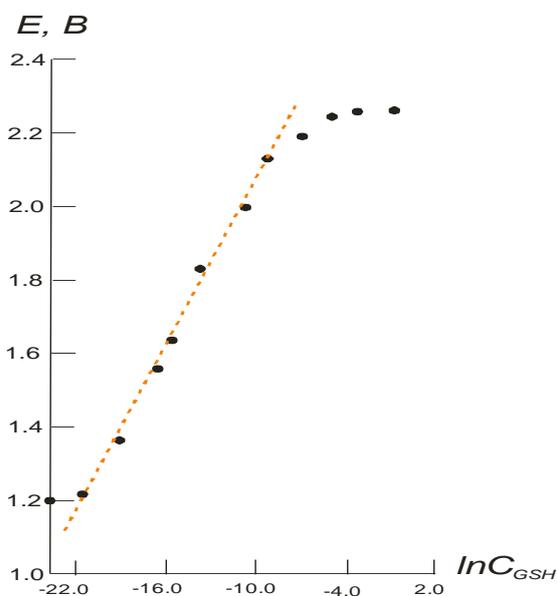


Рис. 14. Зависимость потенциала системы ртуть (II)-глутатион ( $E, V$ ) от  $\ln C_{GSH}$ . Концентрация ионов  $Hg^{2+} \cdot 3 \cdot 10^{-6}$  моль/л

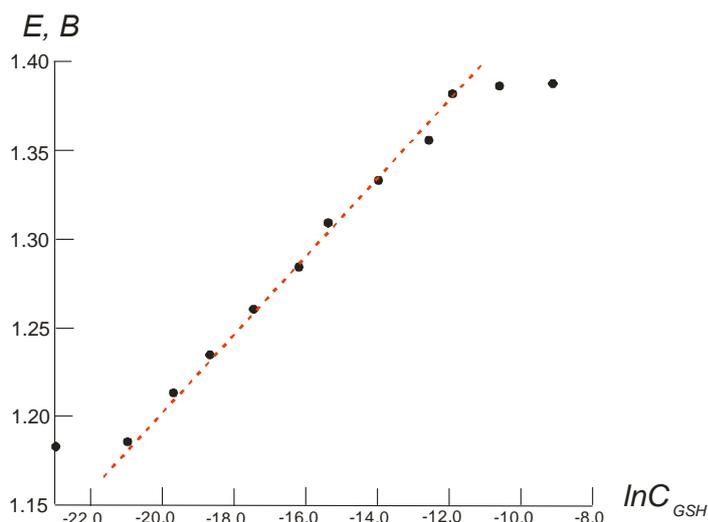


Рис. 15. Зависимость потенциала системы ртуть (I)-глутатион ( $E, V$ ) от  $\ln C_{GSH}$ . Концентрация ионов  $Hg_2^{2+} \cdot 3 \cdot 10^{-6}$  моль/л

Согласно рис.14 было определено число лигандов, входящих в состав комплекса  $Hg(GS)_2$ , которое равно  $n=2,48 \approx 2$ . Константа устойчивости комплекса  $Hg(GS)_2$  составила  $\ln \beta_2 = 88,39$  ( $\log \beta_2 = 38,38$ ).

Аналогичным способом были определены параметры процесса комплексообразования комплекса  $Hg_2(GS)_2$  по экспериментальной зависимости  $E$  от концентраций ионов одновалентной ртути  $Hg_2^{2+}$  и лигандов  $GS^-$  при различных их соотношениях. (рис. 15). Было определено количество лигандов  $n=1,93 \approx 2$ . Константа устойчивости комплекса  $Hg_2(GS)_2$  составила  $\ln \beta_2 = 36,03$  ( $\log \beta_2 = 15,64$ ).

Таким образом, на основании значений констант устойчивости комплексов ионов ртути (I) и (II) с глутатионом, можно сделать вывод, что наиболее стабильным является комплекс ионов двухвалентной ртути состава  $Hg(GS)_2$ . Это позволяет предположить, что он формируется на поверхности РПЭ быстрее, чем комплекс  $Hg_2(GS)_2$ .

Метод спектрофотометрии был выбран для сравнения полученных результатов по составу комплекса  $Hg(GS)_2$  с методом потенциометрии.

Исследование комплексообразования системы  $Hg(II)$ -GSH проводилось на спектрофотометре СФ-46, используя кювету с толщиной поглощающего слоя 1 см. Длины волн устанавливали в области 180-250 нм с погрешностью  $\pm 0,1$  нм. В качестве раствора сравнения использовали бидистиллированную воду.

Максимум спектров поглощения  $Hg(II)$  ( $C_{Hg(NO_3)_2} = 1,5 \cdot 10^{-5}$  моль/л) и GSH ( $C_{GSH} = 1,5 \cdot 10^{-5}$  моль/л) соответствовали значениям  $\lambda_{Hg(II)} = 200$  нм и  $\lambda_{GSH} = 195$  нм (рис. 16). При совместном присутствии  $Hg(II)$  и GSH появляется новый спектр поглощения при 215 нм, соответствующая спектру поглощения комплексного соединения системы  $Hg(II) - GSH$ . В дальнейшем оптическую плотность измеряли при  $\lambda = 215$  нм.

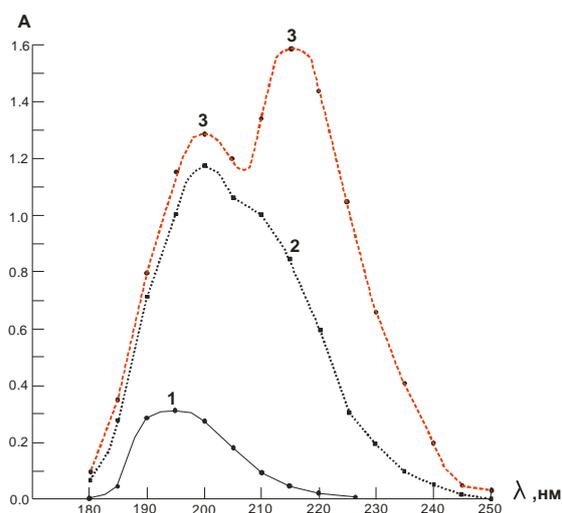


Рис. 16. Спектры поглощения систем ртуть – глутатион в водных средах: 1 – GSH ( $1,5 \cdot 10^{-5}$  моль/л); 2 –  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  ( $1,5 \cdot 10^{-5}$  моль/л); 3 – комплекса  $\text{Hg}(\text{GS})_2$  ( $C_{\text{GSH}} 1,5 \cdot 10^{-5}$  моль/л и  $C_{\text{Hg}(\text{NO}_3)_2} 1,5 \cdot 10^{-5}$  моль/л)

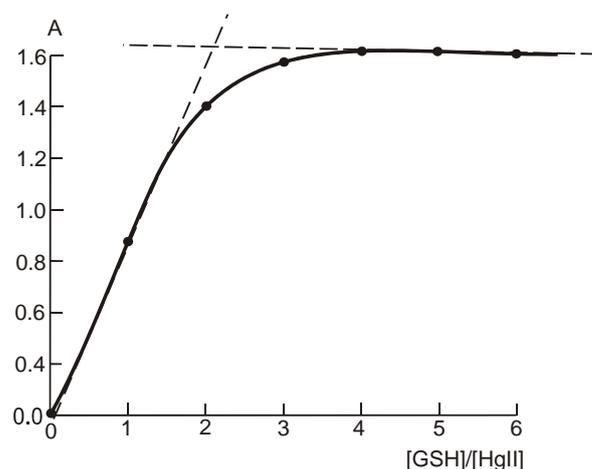


Рис. 17. Зависимость оптической плотности раствора А от мольного соотношения  $[\text{GSH}]/[\text{HgII}]$

По кривой насыщения (рис. 17) методом молярных соотношений найдены оптимальные молярные соотношения компонентов комплексного соединения  $\text{Hg}(\text{GS})_2$  при  $\lambda=215$  нм, которые равны 1:2, что согласуется с экспериментальными данными потенциометрического метода.

### ***Исследование антиоксидантных свойств тиоловых соединений вольтамперометрическим и спектрофотометрическим методами***

В данной работе предлагается использовать вольтамперометрический метод для исследования антиоксидантных свойств тиоловых соединений, основанный на модельной реакции электровосстановления кислорода.

Для исследования антиоксидантных свойств тиоловых соединений методом вольтамперометрии, использовалась модельная реакция электровосстановления кислорода ( $\text{ЭВ O}_2$ ), протекающей на СУЭ электроде в области потенциалов от 0 до  $-1.2$  В по механизму, аналогичному восстановлению кислорода в живых клетках.



При введении серосодержащих соединений в электрохимическую ячейку ток  $\text{ЭВ O}_2$  первоначально возрастал в связи с резким смещением равновесия в сторону образования супероксид анион радикала  $\text{O}_2^{\cdot -}$ , а затем уменьшался при последующих добавках вещества в раствор, что связано с взаимодействием тиоловых соединений с анион – радикалом кислорода по механизму:



При этом потенциал полувольты кислорода сдвигается в положительную область (рис.18).

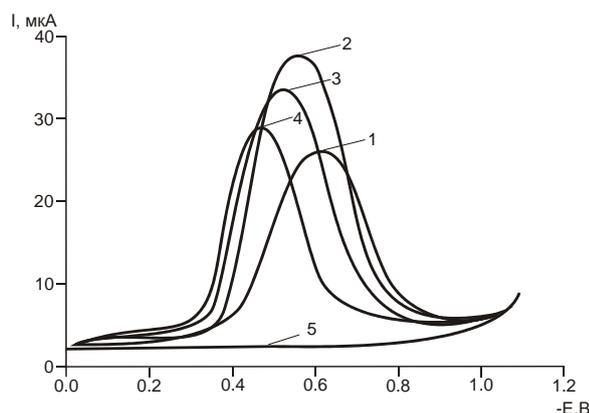


Рис. 18. Вольтамперограммы тока ЭВ  $O_2$  (1)-в фоновом электролите (фосфатный буфер pH 6.86) и в присутствии глутатиона: (2)  $C=1 \cdot 10^{-5}$  моль/л; (3)  $C=5 \cdot 10^{-5}$  моль/л; (4)  $C=8 \cdot 10^{-5}$  моль/л; (5)-линия остаточного (фонового) тока в отсутствии кислорода в растворе. Скорость развертки потенциала – 60 мВ/с

В работе была проведена оценка антиоксидантной активности серусодержащих соединений при их концентрациях в электрохимической ячейке  $1 \cdot 10^{-3}$  моль/л, используя кинетический критерий, отражающий количество активных кислородных радикалов, прореагировавших с антиоксидантом за минуту времени,  $K_{кин}$  (мкмоль\л·мин):

$K_{кин} = \left(1 - \frac{I_i}{I_0}\right) \cdot \frac{C_{O_2}^0}{t}$	<p>где <math>I_i</math> - ток ЭВ <math>O_2</math> в присутствии АО в растворе, мкА,  <math>I_0</math> - ток ЭВ <math>O_2</math> в отсутствии АО в растворе, мкА;  <math>C_{O_2}^0</math> - исходная концентрация кислорода в растворе, мкмоль/л,  <math>t</math> - время протекания реакции взаимодействия антиоксиданта с активными кислородными радикалами, мин.</p>
--	--

По результатам определений строился график зависимости функции  $(1 - I/I_0)$  от времени ( $t$ ), затем определялся коэффициент антиоксидантной активности исследуемых веществ -  $K$ .

В табл. 2 представлены результаты определения коэффициентов антиоксидантной активности для исследуемых серусодержащих соединений и стандартных антиоксидантов в их наиболее эффективных концентрациях ( $C = 1 \cdot 10^{-3}$  моль/л). В качестве стандартных антиоксидантов были выбраны аскорбиновая кислота, дигидрохверцетин и селенит натрия.

**Таблица 2.** Рассчитанные значения коэффициентов антиоксидантной активности ( $K$ ) серусодержащих соединений и некоторых стандартных антиоксидантов ( $n=3$ )

Название вещества	$K$ , мкмоль\л·мин.
Аскарбиновая кислота	$1.15 \pm 0.04$
Дигидрохверцетин	$0.65 \pm 0.03$
Селинит натрия	$1.28 \pm 0.02$
Глутатион	$4.35 \pm 0.03$
Цистеин	$3.44 \pm 0,05$
Цистин	$2.81 \pm 0.03$
Метионин	$1.02 \pm 0.03$
Липоевая кислота	$4.86 \pm 0.02$
Таурин	$2.30 \pm 0.04$

Как видно из табл. 2, БАСС проявили хорошую антиоксидантную активность относительно стандартных антиоксидантов. Липоевая кислота и глутатион показали наибольшие значения. Метионин проявил минимальную антиоксидантную активность.

**Методика определения суммарного содержания тиоловых соединений в сыворотке крови человека методом вольтамперометрии**

Для разработки методики определения суммарного содержания тиоловых соединений в сыворотке крови человека был использован аналитический сигнал GSH при катодной развертке потенциала при  $E=-0.237$  В на РПЭ, где зависимость прироста предельного тока восстановления GSH от увеличения его концентрации в растворе линейна. Эта область находилась между концентрациями от  $6.4 \cdot 10^{-5}$  до  $6.2 \cdot 10^{-4}$ .

Методика заключалась в съемке вольтамперограмм восстановления суммарного содержания тиоловых соединений сыворотки крови на РПЭ при потенциале  $E=-0.237$ В. В качестве аппаратного оформления использовался вольтамперометрический анализатор ТА-2 с подключенной к нему электрохимической ячейкой, состоящей из индикаторного РПЭ, хлорид – серебряных электродов сравнения и вспомогательного электрода.

Использовалась постоянноточковая вольтамперометрия с линейной скоростью развертки потенциала 60мВ/с. Оптимальным фоном являлся боратный буфер 0.025 М, рН 9.18. Удаление кислорода осуществляли путем его вытеснения инертным газом азотом в течении 15 минут. Азот подавали через стеклянную трубочку в электрохимическую ячейку.

Обобщенные результаты показателей качества результатов анализа для диапазона исследуемых концентраций, представлены в таблице 3.

Таблица 3. Показатели качества результатов анализа			
моль/л	$\sigma_r$	$\sigma_R$	$\pm\Delta$
0.000064	$1.9 \cdot 10^{-6}$	$2.7 \cdot 10^{-6}$	$6.0 \cdot 10^{-6}$
0.00031	$3.2 \cdot 10^{-5}$	$4.4 \cdot 10^{-5}$	$8.8 \cdot 10^{-5}$
0.00061	$4.1 \cdot 10^{-5}$	$5.3 \cdot 10^{-5}$	$10.4 \cdot 10^{-5}$

$\sigma_r \approx S_{rm}$  - значение показателя повторяемости для результатов, полученных по методике в условиях повторяемости;

$\sigma_R \approx S_{Rm}$  - значение показателя промежуточной прецизионности результатов, полученных в условиях внутрिलाбораторной прецизионности;

$\pm\Delta$  - показатель точности результатов измерения.

Используя разработанную методику было проведено определение суммарного содержания тиоловых соединений белковой и небелковой природы в сыворотке крови здоровых людей и больных алкоголизмом методом добавок. Исследовали сыворотку крови 50 здоровых и 50 больных алкоголизмом людей. В качестве метода сравнения был использован классический метод спектрофотометрии определения тиоловых соединений в сыворотке крови человека.

В таблицах 5 и 6 представлены результаты сравнительных определений суммарного содержания тиолов белковой и небелковой природы в сыворотке крови

в норме и при патологии алкоголизма (выборка из 50 результатов), измеренных двумя методами.

**Таблица 5.** Найденные значения концентрации суммарного содержания белковых и небелковых тиоловых соединений в сыворотки крови человека без видимых патологий, определенные вольтамперометрическим и спектрофотометрическими методами (n=3, P=0.95)

Номер образца сыворотки крови человека без видимых патологий	Концентрация белковых тиолов, $C \cdot 10^{-3}$ моль/л		Концентрация небелковых тиолов, $C \cdot 10^{-3}$ моль/л	
	Вольтамперометрический метод	Спектрофотометрический метод	Вольтамперометрический метод	Спектрофотометрический метод
1	0.16±0.07	0.10±0.03	0.062±0.006	0.054±0.003
2	0.18±0.07	0.10±0.02	0.078±0.002	0.034±0.006
3	0.25±0.04	0.16±0.05	0.072±0.04	0.060±0.005
4	0.16±0.04	0.09±0.05	0.080±0.004	0.056±0.005
5	0.28±0.03	0.13±0.03	0.063±0.003	0.040±0.003
6	0.31±0.06	0.25±0.06	0.074±0.006	0.035±0.007
7	0.24±0.02	0.18±0.06	0.067±0.006	0.047±0.005
8	0.22±0.06	0.12±0.03	0.074±0.007	0.045±0.008
9	0.15±0.04	0.08±0.04	0.065±0.005	0.022±0.003

**Таблица 6.** Найденные значения концентрации суммарного содержания белковых и небелковых тиоловых соединений в сыворотки крови человека при патологии алкоголизма, определенные вольтамперометрическим и спектрофотометрическими методами

Номер образца сыворотки крови человека без видимых патологий	Концентрация белковых тиолов, $C \cdot 10^{-3}$ моль/л		Концентрация небелковых тиолов, $C \cdot 10^{-3}$ моль/л	
	Вольтамперометрический метод	Спектрофотометрический метод	Вольтамперометрический метод	Спектрофотометрический метод
1	0.58±0.07	0.50±0.03	0.082±0.006	0.054±0.003
2	0.51±0.07	0.47±0.02	0.088±0.002	0.034±0.006
3	0.48±0.04	0.30±0.05	0.092±0.04	0.060±0.005
4	0.63±0.04	0.56±0.05	0.094±0.004	0.076±0.005
5	0.61±0.03	0.56±0.03	0.093±0.003	0.040±0.003
6	0.50±0.06	0.42±0.06	0.094±0.006	0.035±0.007
7	0.57±0.02	0.45±0.06	0.097±0.006	0.047±0.005
8	0.52±0.06	0.40±0.03	0.094±0.007	0.045±0.008
9	0.55±0.04	0.41±0.04	0.095±0.005	0.022±0.003

По результатам, представленным в таблицах 5 и 6 видно, что полученные данные хорошо коррелируют между собой. Это позволяет рекомендовать вольтамперометрическую методику использовать в клинических лабораториях.

## ВЫВОДЫ

1. Исследованы электрохимические свойства глутатиона, цистеина, метионина, липоевой кислоты в зависимости от материала электрода, природы фонового электролита, рН раствора, наличия ионов металлов. Показано, что оптимальными условиями определения тиоловых соединений являются рН 9.18, фоновый электролит: боратный буфер, использование РПЭ.

2. Исследованы физико-химические закономерности восстановления глутатиона, цистеина, метионина, липоевой кислоты на РПЭ. Показано, что ионы металлов (Hg (II), Cu (II)) образуют устойчивые комплексы с глутатионом. Предложены схемы окисления – восстановления тиоловых соединений в присутствии изученных ионов металлов.

3. Исследованы составы комплексов и определены константы устойчивости комплексов  $\text{Hg}(\text{GS})_2$  и  $\text{Hg}_2(\text{GS})_2$  методами потенциометрии и спектрофотометрии.

4. Исследованы антиоксидантные свойства глутатиона, цистеина, метионина, липоевой кислоты методом катодной вольтамперометрии с использованием процесса электровосстановления кислорода. Предложены схемы взаимодействия тиоловых соединений с кислородом и его радикалами. Проведены сравнительные определения антиоксидантных свойств тиоловых соединений методом спектрофотометрии. Выявлены наиболее активные соединения.

5. Разработана вольтамперометрическая методика количественного химического определения суммарного содержания тиоловых соединений в сыворотке крови человека. Проведены корреляционные исследования результатов определения тиоловых соединений в сыворотке крови человека в норме и патологии алкоголизма методами спектрофотометрии и вольтамперометрии.

### **Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:**

1. Дорожко Е.В., Короткова Е.И., Карбаинов Ю.А. Исследование антиоксидантных свойств глутатиона методом вольтамперометрии // Материалы международного симпозиума «Молекулярные механизмы регуляции функции клетки», Тюмень 12-16 сентября 2005г, С.53-55.
2. Dorozhko E.V., Korotkova E.I., Avramchik O.A., Karbainov Y.A.. New method and analyzer for antioxidant activity determination of serum blood // Materials of the 9<sup>th</sup> Annual Meeting of the Israel Analytical Chemistry Society (Israel Scientific Conference) “ISRANALYTICA 2006”. 2006. P. 95.
3. ДорожкоЕ.В., Короткова Е.И., Карбаинов Ю.А. Вольтамперометрический метод исследования антиоксидантных свойств глутатиона // Всероссийская научная конференция с международным участием «Электроаналитика 2005», Екатеринбург 23-27 мая 2005.С. 85.
4. Dorozhko E.V., Korotkova E.I., Karbainov Y.A. Study of antioxidant properties of blood serum by voltammetry // International Congress on Analytical Sciences ICAS-2006, June 25-30.2006. Moscow, Russia, p.128.

5. Короткова Е.И., Драчева Л.В., Дорожко Е.В. Исследование антиоксидантных свойств пробиотических композиций // Аналитические методы измерений и приборы в пищевой промышленности, Москва 2007. С.29.
6. Короткова Е.И., Дорожко Е.В., Аврамчик О.А., Вторушина А.Н. Разработка анализатора для определения антиоксидантов в биологических объектах // Итоговая конференция по результатам выполнения мероприятий за 2007 год в рамках приоритетного направления «Живые системы» ФЦП « Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» Сборник тезисов, 6-7 декабря 2007.С. 218-219.
7. Короткова Е.И., Липских О.И., Дорожко Е.В. Исследование антиоксидантных свойств пробиотических композиций // Международная научно-практическая конференция Биотехнология. Вода и пищевые продукты. 11-13 марта, 2008.С. 116.
8. Дорожко Е.В., Короткова Е.И. Физико-химические закономерности окисления-восстановления глутатиона // VII всероссийская конференция по электрохимическим методам анализа с международным участием. 2008. С. 34.
9. Драчева Л.В., Дорожко Е.В., Короткова Е.И. Применение вольтамперометрического метода при изучение биантиоксидантов // Журнал Пищевая промышленность № 4. 2008. С. 28-29.
10. Дорожко Е.В., Драчева Л.В., Аврамчик О.А. Изучение антиоксидантной активности пропионовокислых бактерий // Журнал Пищевая промышленность № 2. 2009. С. 12-13.
11. Плотников Е.В., Короткова Е.И., Дорожко Е.В., Букель М.В., В. Линерт В. Исследование суммарной антиоксидантной активности сыворотки крови человека в норме и патологии алкоголизма методом вольтамперометрии // Заводская лаборатория, №12. 2009. С. 12-16.
12. Короткова Е.И., Плотников Е.В., Дорожко Е.В., Букель М.В. Разработки по проведению проблемно-ориентированных поисковых исследований и созданию научно-технического задела в области живых систем с участием научных организаций Австрии // Итоговая конференция по результатам выполнения мероприятий за 2009 год в рамках приоритетного направления «Живые системы» ФЦП « Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» Сборник тезисов, 6-7 декабря 2009. С. 218-219.
13. Дорожко Е.В., Короткова Е.И. Исследование электрохимических свойств глутатиона методом вольтамперометрии // Известия ВУЗов. Химия и химическая технология. Т 53 (2). 2010. С.118-124.

Автор считает своим долгом выразить искреннюю признательность научному руководителю – д.х.н., доценту кафедры ФАХ, НИ ТПУ Коротковой Елене Ивановне за всестороннюю помощь при подготовке и написании диссертационной работы, а также д.х.н., профессору каф. Экологии и безопасности жизнедеятельности, НИ ТПУ Романенко С.В. за помощь в постановке ряда экспериментов и консультации по использованию программы ASSAER, к.х.н., доценту каф. ФАХ, НИ ТПУ Пикуле Н.П. за консультации по расчету качественных метрологических показателей МВИ, также хочется поблагодарить за внимательное отношение и конструктивные предложения по работе д.х.н., проф., НИ ТПУ Колпакову Н.А., к.х.н. доцента НИ ТПУ Гиндуллину Т.М.