

ТОМСКИЙ
ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ



На правах рукописи

Еркович Алина Вадимовна

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГИДРОКСИЛЬНЫХ РАДИКАЛОВ В КЛЕТОЧНЫХ
КУЛЬТУРАХ МЕТОДОМ ИМПЕДАНСНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ**

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

1.4.2 – Аналитическая химия

Томск – 2024

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»

Научный руководитель:

Короткова Елена Ивановна

д.х.н., профессор Отделения химической инженерии Инженерной школы природных ресурсов ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»

Официальные оппоненты:

Иванова Алла Владимировна

д.х.н., профессор Кафедры аналитической химии ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»

Шилова Инесса Владимировна

д.ф.н., старший научный сотрудник Лаборатории фитофармакологии и специального питания НИИ фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга

Защита состоится «23» декабря 2024 года в 15:00 часов на заседании диссертационного совета ДС.ТПУ.08 Национального исследовательского Томского политехнического университета по адресу: 634050, г. Томск, пр. Ленина, 43а.



С диссертацией можно ознакомиться в научно-технической библиотеке Томского политехнического университета и на сайте dis.tpu.ru при помощи QR-кода.

Автореферат разослан «__» _____ 2024 года

Ученый секретарь диссертационного совета

ДС.ТПУ.08

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Е.В. Дорожко'.

Дорожко Е.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Восстановление кислорода в организме человека протекает в несколько стадий, одной из которых является образование гидроксильных радикалов, которые представляют собой крайне реакционноспособную активную форму кислорода, способную нарушить нормальный метаболизм жизнедеятельности клеток. Так, гидроксильные радикалы вызывают окислительную модификацию нуклеотидов и нуклеиновых кислот, особенно ДНК. ОН-радикалы также способствуют перекисному окислению липидов и окислению белков. Лавинообразный рост количества гидроксильных радикалов приводит к окислительному стрессу организма, который является значимым процессом в развитии ряда патологий, таких как нейродегенеративные и сердечно-сосудистые заболевания. Убедительные данные свидетельствуют также о связи окислительного стресса и раковых заболеваний.

Поскольку гидроксильные радикалы являются наиболее опасными и реакционными продуктами неполного восстановления кислорода, они по праву могут считаться одним из основных маркеров окислительного стресса в биологических системах. В этой связи оценка генерации ОН-радикалов такими объектами, как живые клетки, имеет большое значение для медицинских и аналитических исследований как с точки зрения понимания фундаментальных свободнорадикальных процессов, так и для оценки эффективности антиоксидантной терапии. Однако мониторинг гидроксильных радикалов в клеточных культурах все еще представляет определенную сложность для исследователей, что связано со сверхкоротким временем свободного существования гидроксильного радикала около 10^{-9} с и крайне низкими его концентрациями в биологических системах на уровне наномоль/дм³.

Спектроскопия электронного парамагнитного резонанса и хроматографические методы – классические подходы определения ОН-радикалов, позволяют достичь крайне низкого предела обнаружения данных частиц, однако являются методами, требующими использования радикальных ловушек. Помимо этого, данные подходы тяжело приспособить для анализа клеточных культур. Метод флуориметрии может показаться более привлекательным ввиду возможности визуализировать распределение ОН-радикалов внутри клеток, однако существует опасность разрушения биологических образцов под действием излучения в процессе измерений. Флуориметрический подход также предполагает использование радикальных ловушек, что усложняет измерение в случае неполного протекания реакции между радикальной ловушкой и ОН-радикалом.

На данный момент электрохимическое определение ОН-радикалов в живых клетках является перспективным направлением вследствие использования простого оборудования и скорости анализа в совокупности с высокой чувствительностью и селективностью. Использование специальных модификаторов, селективно взаимодействующих с гидроксильными радикалами, позволяет не только избежать дополнительного связывания ОН-радикалов с радикальными ловушками, но и проводить его прямое количественное определение в биологических объектах. В качестве модификаторов электродной поверхности в основном используются органические соединения серы, а создание микро- и наносенсоров на их основе позволяет проводить внутриклеточное определение ОН-радикалов. Помимо этого, применение неdestructивного метода электрохимической импедансной спектроскопии для анализа гидроксильных радикалов позволяет увеличить чувствительность определения и избежать повреждения модификатора на поверхности электрода, возникающего при использовании других электрохимических подходов.

Таким образом, данное исследование направлено на создание нового подхода количественного определения ОН-радикалов, продуцируемых живыми клетками, на основе сенсоров, модифицированных органическими соединениями серы, с помощью метода электрохимической импедансной спектроскопии. Данный подход позволяет достичь высокой селективности и чувствительности определения гидроксильных радикалов, что особенно важно для анализа биологических объектов.

Цель и задачи исследования. Цель работы заключается в разработке нового подхода для определения гидроксильных радикалов в клеточных культурах с использованием импедансометрического сенсора на основе серосодержащих органических соединений и оценки активности антиоксидантов по отношению к ОН-радикалам в природных и биологических объектах.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

- Исследовать влияние органических соединений серы на получение аналитического сигнала ОН-радикалов методом электрохимической импедансной спектроскопии и провести оценку морфологии поверхности сенсора на разных этапах модификации;
- Осуществить подбор рабочих условий определения гидроксильных радикалов методом электрохимической импедансной спектроскопии;
- Разработать методику количественного определения гидроксильных радикалов в клеточных культурах и провести оценку основных метрологических характеристик разработанной методики;

– Исследовать активность антиоксидантов по отношению к гидроксильным радикалам с помощью нового импедансометрического сенсора в модельной системе и клеточных культурах.

Научная новизна работы.

1. Впервые исследовано влияние органических соединений серы на получение аналитического сигнала ОН-радикалов методом электрохимической импедансной спектроскопии. Показано, что импрегнированный графитовый электрод, модифицированный электрохимически осажденным золотом и самоорганизующимся монослоем N-ацетил-L-цистеина, дает лучшие результаты селективного количественного определения ОН-радикалов в биологических объектах. Проведена оценка морфологии поверхности электрода на каждом этапе модификации методом сканирующей электронной микроскопии.

2. Разработан новый подход количественного определения внеклеточных ОН-радикалов, генерируемых живыми клетками РС-3 (аденокарцинома простаты) и 3Т3-L1 (эмбриональные фибробласты мыши), отличающийся быстротой анализа, селективностью, высокой чувствительностью и отсутствием необходимости использовать радикальные ловушки.

3. Впервые показана возможность использования импрегнированного графитового электрода, модифицированного электрохимически осажденным золотом и самоорганизующимся монослоем N-ацетил-L-цистеина, в качестве сенсорной платформы для определения активности антиоксидантов (глутатион, аскорбиновая кислота) по отношению к гидроксильным радикалам, продуцируемым в опухолевых клетках РС-3 (аденокарцинома простаты), А-431 (эпидермоидная карцинома) и U-87 (глиобластома), что позволяет рекомендовать данный подход для мониторинга антиоксидантной терапии пациентов в состоянии окислительного стресса.

Теоретическая и практическая значимость. Теоретическая значимость исследования заключается в получении новых научных знаний о взаимодействии органических соединений серы с гидроксильными радикалами, что дало основу для создания нового аналитического подхода селективного определения ОН-радикалов в клеточных культурах. Практическая значимость работы заключается в разработке и использовании новой методики для экспресс-диагностики уровня гидроксильных радикалов в биологических объектах при индуцировании окислительного стресса, что особенно актуально для медицинских исследований в области радикальных процессов, а также в

возможности оценки активности различных антиоксидантов по отношению к ОН-радикалам, генерируемыми клеточными культурами.

Личный вклад автора. Заключается в сборе, анализе и обработке литературных данных по предложенным ранее подходам для количественного определения гидроксильных радикалов в клеточных культурах и способам оценки активности антиоксидантов, выполнение экспериментальной части работы, а также в публикации полученных результатов в виде тезисов и статей.

Положения, выносимые на защиту.

1. Результаты исследования влияния органических соединений серы на получение аналитического сигнала ОН-радикалов методом электрохимической импедансной спектроскопии. Оценка морфологии поверхности сенсора на разных этапах модификации физико-химическими методами;

2. Рабочие условия определения внеклеточных ОН-радикалов, генерируемых живыми клетками, с помощью нового импедансометрического сенсора, отличающегося высокой чувствительностью и селективностью определения. Метрологические характеристики методики определения ОН-радикалов в биологических объектах.

3. Способ оценки активности антиоксидантов по отношению к гидроксильным радикалам, применимый как для исследований модельных растворов антиоксидантов, так и для живых клеток.

Степень достоверности и апробация результатов. Основные результаты исследовательской работы были представлены на следующих мероприятиях: XXII Международная научно-практическая конференция студентов и молодых ученых имени выдающихся химиков Л.П. Кулёва и Н.М. Кижнера «Химия и химическая технология в XXI» (Томск, 2021); XI Всероссийская научная конференция и школа «Аналитика Сибири и Дальнего Востока» (Новосибирск, 2021); 12th International Conference on Instrumental Methods of Analysis, IMA-2021 (Thessaloniki, Greece, 2021); XXV Всероссийская конференция молодых ученых-химиков (Нижний Новгород, 2022); XXIII Международная научно-практическая конференция студентов и молодых ученых имени выдающихся химиков Л.П. Кулёва и Н.М. Кижнера «Химия и химическая технология в XXI» (Томск, 2022); Всероссийская конференция с международным участием «Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине» (Новосибирск, 2022); IV Съезд аналитиков России (Москва, 2022); VI Международная научно-практическая конференция «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и

функциональных материалов» (Екатеринбург, 2022); XXIV Международная научно-практическая конференция студентов и молодых ученых имени выдающихся химиков Л.П. Кулёва и Н.М. Кижнера «Химия и химическая технология в XXI» (Томск, 2023); XI Всероссийская конференция по электрохимическим методам анализа «ЭМА-2024» (Екатеринбург, 2024); XXV Юбилейная Международная научно-практическая конференция студентов и молодых ученых имени выдающихся химиков Л.П. Кулёва и Н.М. Кижнера «Химия и химическая технология в XXI веке» (Томск, 2024).

Публикации. Результаты проведенных исследований отражены в 16 печатных работах, из которых 4 статьи в научных журналах, которые индексируются базами Web of Science и Scopus, а также 12 тезисов докладов на всероссийских и международных конференциях.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора (глава 1), экспериментальной части (глава 2), результатов и их обсуждения (глава 3–5), выводов, списка литературы (151 источник), приложения, выполнена на 151 странице текста компьютерной верстки и включает 34 рисунка и 50 таблиц.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю, д.х.н., профессору ОХИ ИШПР ТПУ Коротковой Елене Ивановне за всестороннюю помощь на всех этапах выполнения диссертации. Автор благодарит к.х.н., доцента ОХИ ИШПР ТПУ Дорожку Елену Владимировну за помощь в обсуждении экспериментальных данных. Автор выражает признательность к.х.н., доценту ИШХБМТ ТПУ Плотникову Евгению Владимировичу за помощь в работе с клеточными культурами, а также к.ф.-м.н., научному сотруднику ИФПМ СО РАН Семину Виктору Олеговичу за помощь в выполнении исследований по микроскопии. Автор также благодарит своих коллег за помощь и поддержку при выполнении диссертационной работы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность научной работы, обозначены цель и задачи исследования, показаны научная и практическая значимость работы, а также степень достоверности и апробация результатов исследования.

В первой главе проведен обзор литературы по теме исследования. Рассмотрены основные реакции и механизмы образования гидроксильных радикалов в биологических объектах, а также вклад ОН-радикалов в окислительные повреждения в организме человека. Представлены методы количественной оценки гидроксильных радикалов в биологических

объектах, при этом основной акцент смещен на электрохимические методы как наиболее перспективные подходы. Показано, что применение органических соединений серы в качестве модификаторов поверхности электродов в совокупности с чувствительным и неdestructивным методом электрохимической импедансной спектроскопии способно привести к возможности количественного определения гидроксильных радикалов, генерируемых живыми клетками. Рассмотрены основные подходы оценки антиоксидантной активности, при этом показано, что на данный момент исследования оценки активности антиоксидантов по отношению к ОН-радикалам в живых клетках крайне немногочисленны.

Во второй главе описаны используемые в работе химические реактивы, оборудование, на котором проводились исследования, а также применяемые электроды. Представлена схема модификации рабочего электрода (рисунок 1) на основе импрегнированного

графитового электрода (ИГЭ) электрохимически осажденным золотом (Au/ИГЭ) и самоорганизующимся монослоем (СОМ) органических соединений серы: 1-гексантиола (1-ГТ) либо N-ацетил-L-цистеина (АЦЦ).

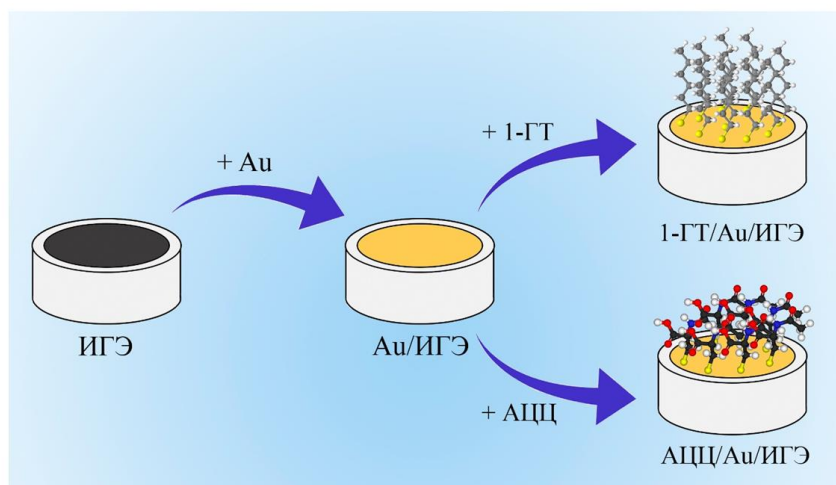


Рисунок 1 – Схема модификации электродов органическими соединениями серы; ИГЭ: импрегнированный графитовый электрод, 1-ГТ: 1-гексантиол, АЦЦ: N-ацетил-L-цистеин

Предложенные сенсоры обозначены в тексте как 1-ГТ/Au/ИГЭ и АЦЦ/Au/ИГЭ. Также в данном разделе описана пробоподготовка клеточных культур для оценки уровня генерации ОН-радикалов.

В третьей главе представлены результаты исследования влияния органических соединений серы на аналитический сигнал гидроксильных радикалов. Показано, что органические соединения серы являются ключевым элементом, влияющим на формирование аналитического сигнала ОН-радикалов (рисунок 2), регистрируемого методом нефарадеевского импеданса и представляющего собой разницу емкости двойного электрического слоя (ДЭС) при генерации ОН-радикалов и емкости ДЭС фона ($\Delta C = C - C_0$). При проведении измерений методом нефарадеевского импеданса основной количественной характеристикой поверхности является емкость двойного электрического слоя (C_{dl}). Для

моделирования импедансных спектров использовалась эквивалентная электрическая схема, состоящая из двух последовательно соединенных элементов: сопротивления раствора и элемента постоянной фазы, заменяющего емкость двойного электрического слоя ввиду неоднородности поверхности и большой шероховатости электродов. Расчет C_{dl} проводился по формуле 1:

$$C_{dl} = Q \cdot \omega_{\max}^{(n-1)} \quad (1)$$

где Q – элемент постоянной фазы (CPE), $c^n/\text{Ом} \cdot \text{см}^2$;

$\omega_{\max}$ – частота, при которой мнимая часть импеданса достигает максимального значения, рад/с;

n – экспоненциальный показатель, обозначающий фазовое отклонение.

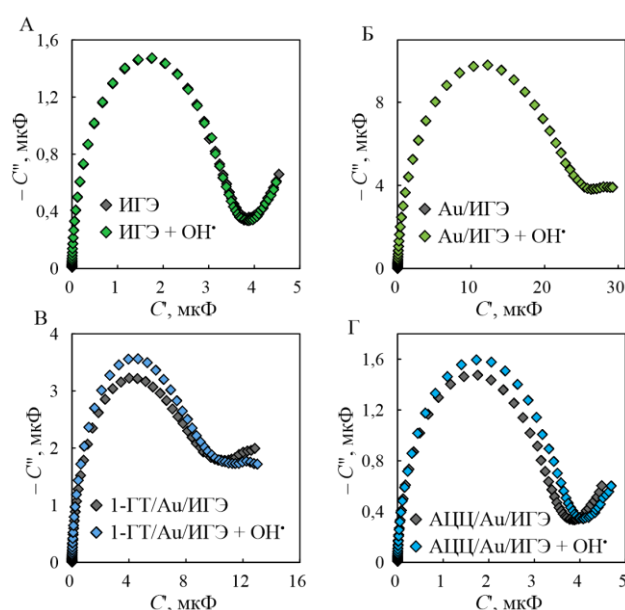


Рисунок 2 – Импедансные спектры до и после генерации ОН-радикалов с помощью реакции Фентона, полученные для электродов ИГЭ (А), Au/ИГЭ (Б) и 1-ГТ/Au/ИГЭ (В), а также с помощью реакции фотохимического разложения пероксида водорода для электрода АЦЦ/Au/ИГЭ (Г)

Как видно из рисунка 2, при использовании электродов ИГЭ и Au/ИГЭ емкость ДЭС при воздействии ОН-радикалов практически не изменяется. Однако после адсорбции органических соединений серы наблюдается значительное увеличение емкости после воздействия ОН-радикалов. При этом стоит отметить, что в случае измерений с помощью сенсоров ИГЭ, Au/ИГЭ и 1-ГТ/Au/ИГЭ генерация ОН-радикалов проводилась с помощью реакции Фентона (формула 2):



Соотношение концентраций H_2O_2 и Fe^{2+} всегда было постоянным и равнялось 2:1, поскольку иное соотношение реагентов приводит к более полному протеканию побочных

процессов по сравнению с необходимой реакцией образования ОН-радикалов [Neyens E., Baeyens J., 2003]. Наличие побочных процессов при протекании реакции Фентона не позволяет утверждать, что в данной реакции выход ОН-радикалов равен 100% [Wiegand H. L. et al., 2017]. Таким образом, при использовании реакции Фентона для генерации ОН-радикалов целесообразно указывать исходную концентрацию ионов железа(II), вводимую в реакционную смесь. Как показали контрольные эксперименты, ни ионы железа(II), ни перекись водорода по отдельности не приводили к значимому изменению емкости при измерениях с помощью 1-ГТ/Au/ИГЭ, что указывает на отсутствие мешающего влияния со стороны компонентов реакции.

Для сенсора АЦЦ/Au/ИГЭ, ввиду возможного мешающего влияния со стороны ионов железа(II) на адсорбированный слой молекул АЦЦ, генерация ОН-радикалов проводилась с помощью реакции фотохимического разложения пероксида водорода при длине волны 254 нм (формула 3):



при этом концентрация ОН-радикалов равна концентрации H_2O_2 , вносимой в ячейку, вследствие первичной рекомбинации половины ОН-радикалов в окружении молекул растворителя [Stefan M. I., 2017.]. Как показали контрольные эксперименты, ни перекись водорода, ни УФ-излучение по отдельности не приводят к значимому изменению емкости, что указывает на отсутствие мешающего влияния со стороны компонентов реакции.

Исследование свойств поверхности предложенных сенсоров проводилось такими электрохимическими методами, как циклическая вольтамперометрия (ЦВА) и электрохимическая импедансная спектроскопия (ЭИС). Токпроводящие свойства ИГЭ и его модификаций исследовали методом ЦВА с использованием окислительно-восстановительной метки $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$. Полученные ЦВА представлены на рисунке 3. Для немодифицированного ИГЭ характерно наличие слабо выраженных, далеко отстоящих друг от друга окислительно-восстановительных пиков. Нанесение золота приводит к появлению четкого электрохимического отклика от $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, связанного с улучшением токопроводящих свойств поверхности. В то же время образование СОМ на поверхности сенсора препятствует транспорту электронов и блокирует движение ионов $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ к поверхности электрода, что обусловлено диэлектрическими свойствами органических соединений серы.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о закреплении серосодержащих соединений на поверхности Au/ИГЭ. Исходя из полученных данных, для расчета электроактивной площади электродов использовалось уравнение Рэндлса-Шевчика [Комптон Р.Г., Бэнкс К.Е., 2015].

Таким образом, электроактивная площадь немодифицированного ИГЭ составила $0,119 \text{ см}^2$. Электроактивная площадь Au/ИГЭ равна $0,213 \text{ см}^2$, что превышает геометрическую площадь ИГЭ и может быть связано с осаждением золотых частиц в виде конгломератов, увеличивающих геометрическую площадь электрода и, соответственно, электроактивную площадь за счет улучшения токопроводящих свойств. При этом электроактивные площади 1-ГТ/Au/ИГЭ и АЦЦ/Au/ИГЭ приблизительно равны и составили $0,0936 \text{ см}^2$ и $0,0915 \text{ см}^2$ соответственно.

Исследование свойств поверхности проводили методами фарадеевского и нефарадеевского импеданса. В первом случае главной характеристикой токопроводящих свойств выступает сопротивление переноса заряда ($R_{пз}$). Полученные импедансные спектры для ИГЭ и его модификаций в координатах Найквиста, где Z' – активное сопротивление, а Z'' – реактивное сопротивление, приведены на рисунке 4. Для количественной оценки $R_{пз}$ полученные спектры моделировали с помощью эквивалентной электрической схемы, приведенной во вставке рисунка 4.

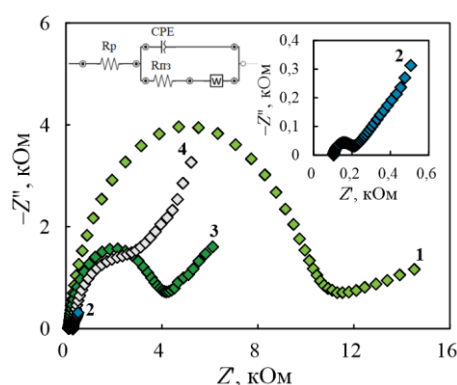


Рисунок 4 – Импедансные спектры ИГЭ (1), Au/ИГЭ (2), 1-ГТ/Au/ИГЭ (3) и АЦЦ/Au/ИГЭ (4), полученные методом фарадеевского импеданса

Параметры эквивалентной электрической схемы: R_p – сопротивление раствора; CPE – элемент постоянной фазы; $R_{пз}$ – сопротивление переноса заряда; W – элемент Варбурга.

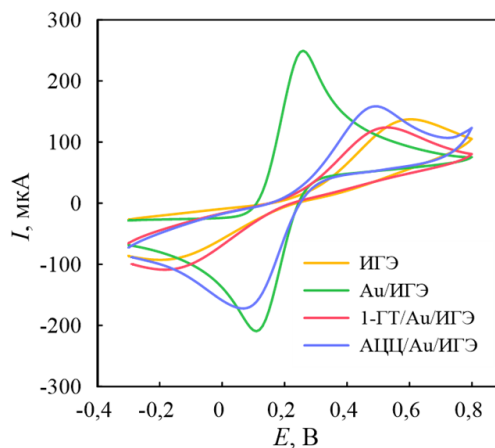


Рисунок 3 – Циклические вольтамперограммы ИГЭ, Au/ИГЭ, 1-ГТ/Au/ИГЭ и АЦЦ/Au/ИГЭ в 0,1 моль/дм³ KCl, содержащем 5 ммоль/дм³ Fe(CN)₆^{3-/4-}

Значения $R_{пз}$, полученные при моделировании спектров фарадеевского импеданса, приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Экстраполированные параметры импедансных спектров, полученные при моделировании данных фарадеевского импеданса ($P = 0,95$; $n = 3$)

Электрод	$R_{пз}$ (Ом)	Относительная погрешность (%)	Критерий хи-квадрат
ИГЭ	10020 ± 40	$1,6 \pm 0,9$	$(3 \pm 1) \cdot 10^{-3}$
Au/ИГЭ	90 ± 10	$1,4 \pm 0,8$	$(5 \pm 1) \cdot 10^{-4}$
1-ГТ/Au/ИГЭ	3510 ± 30	$0,6 \pm 0,3$	$(5 \pm 1) \cdot 10^{-4}$
АЦЦ/Au/ИГЭ	2420 ± 30	$1,2 \pm 0,5$	$(2 \pm 1) \cdot 10^{-4}$

Как видно из таблицы, немодифицированный ИГЭ обладает достаточно высоким сопротивлением переноса заряда, что указывает на его низкие токопроводящие свойства. Однако нанесение золота приводит к уменьшению $R_{пз}$ почти в 100 раз, подтверждая улучшение электрохимических свойств поверхности. При этом образование самоорганизующихся монослоев препятствует переносу электронов за счет диэлектрических свойств СОМ, что вызывает значительное увеличение сопротивления переноса заряда. Полученные данные коррелируют с результатами, полученными методом ЦВА.

Значительные изменения, происходящие на поверхности ИГЭ в процессе модификации, также исследовались методом нефарадеевского импеданса. Полученные импедансные спектры приведены на рисунке 5. Для количественной оценки C_{dl} полученные спектры моделировали с помощью эквивалентной электрической схемы, приведенной во вставке рисунка.

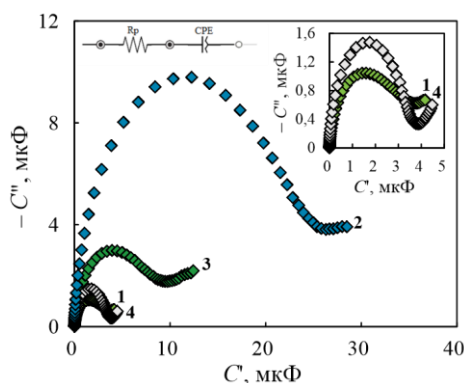


Рисунок 5 – Импедансные спектры ИГЭ (1), Au/ИГЭ (2), 1-ГТ/Au/ИГЭ (3) и АЦЦ/Au/ИГЭ (4), полученные методом нефарадеевского импеданса.

Параметры эквивалентной электрической схемы: R_p – сопротивление раствора; CPE – элемент постоянной фазы. Значения элемента постоянной фазы, состоящего из двух параметров, Q и n , полученные при моделировании спектров нефарадеевского импеданса, приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Экстраполированные параметры импедансных спектров, полученные при моделировании данных нефарадеевского импеданса ($P = 0,95$; $n = 3$)

Электрод	Q (с ⁿ /Ом)	Относительная погрешность (%)	n	Относительная погрешность (%)	Критерий хи-квадрат
ИГЭ	$4,57 \pm 0,04$	$2,0 \pm 0,2$	$0,87 \pm 0,04$	$0,60 \pm 0,02$	$(5,6 \pm 0,7) \cdot 10^{-3}$
Au/ИГЭ	$30,08 \pm 0,09$	$1,7 \pm 0,1$	$0,91 \pm 0,01$	$0,55 \pm 0,02$	$(4 \pm 1) \cdot 10^{-3}$
1-ГТ/Au/ИГЭ	$12,53 \pm 0,07$	$1,7 \pm 0,2$	$0,87 \pm 0,03$	$0,50 \pm 0,04$	$(3,8 \pm 0,8) \cdot 10^{-3}$
АЦЦ/Au/ИГЭ	$4,48 \pm 0,08$	$0,9 \pm 0,1$	$0,942 \pm 0,003$	$0,21 \pm 0,04$	$(1,0 \pm 0,7) \cdot 10^{-3}$

С учетом данных таблицы 2, расчет C_{dl} проводился по формуле 1. Таким образом, C_{dl} немодифицированного ИГЭ составила $(2,20 \pm 0,05)$ мкФ. Модификация золотом увеличивает емкость двойного электрического слоя до $(18,58 \pm 0,04)$ мкФ, что связано с более высокой адсорбционной способностью ионов из раствора на поверхности золота. Для 1-ГТ/Au/ИГЭ и АЦЦ/Au/ИГЭ наблюдается уменьшение емкости до $(5,93 \pm 0,03)$ мкФ и $(2,96 \pm 0,01)$ мкФ соответственно, ввиду того, что плотный слой органических молекул на поверхности электрода препятствует абсорбции ионов из раствора на межфазной границе.

Исследование морфологии поверхности электродов проводилось микроскопическими методами анализа, такими как лазерная профилометрия для оценки шероховатости ИГЭ, сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) для оценки степени осаждения золота на поверхности ИГЭ и просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) для установления факта адсорбции молекул 1-ГТ и АЦЦ на золоте. Результаты исследования морфологии поверхности сенсора различными микроскопическими методами позволяют сделать следующие выводы. Поверхность ИГЭ является достаточно неоднородной (рисунок 6), в связи с чем восстановление золота происходит на всех участках поверхности, повторяя неровный рельеф углеродной подложки.

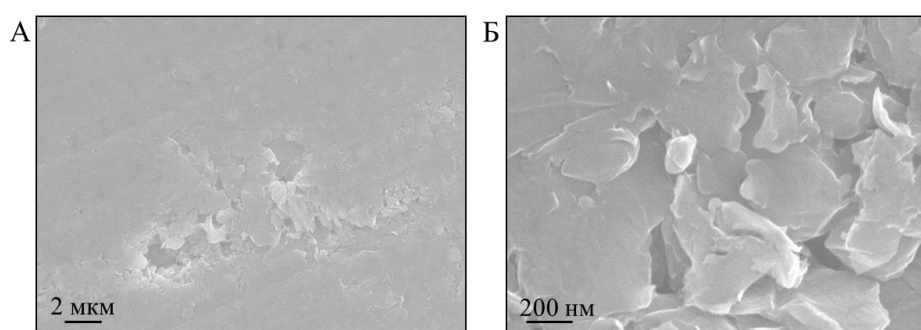


Рисунок 6 – СЭМ изображения участков поверхности ИГЭ во вторичных электронах при разном увеличении (А, Б)

Используемые в работе органические соединения серы хорошо сорбируются на золотых наночастицах, что подтверждает их закрепление на поверхности Au/ИГЭ.

Рабочие условия, которые позволяют получить наиболее высокий отклик от сенсоров 1-ГТ/Au/ИГЭ и АЦЦ/Au/ИГЭ, представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Рабочие условия для определения гидроксильных радикалов на электродах с включением органических соединений серы

Сенсор	Метод регистрации аналитического сигнала	Время нанесения СОМ (ч)	Концентрация раствора для нанесения СОМ (моль/дм ³)	Время проведения реакции образования ОН-радикалов (мин)
1-ГТ/Аu/ИГЭ	Нефарадеевский импеданс	24	$2 \cdot 10^{-3}$	15
АЦЦ/Аu/ИГЭ	Нефарадеевский импеданс	24	$1 \cdot 10^{-2}$	15

Исходя из аналитических возможностей разработанных сенсоров, были построены градуировочные зависимости аналитического сигнала от концентрации ОН-радикалов. На рисунке 7 приведена зависимость аналитического сигнала (ΔC) от десятичного логарифма исходной концентрации ионов Fe^{2+} , полученная с помощью сенсора 1-ГТ/Аu/ИГЭ в диапазоне концентраций от 0,01 нмоль/дм³ до 1 нмоль/дм³.

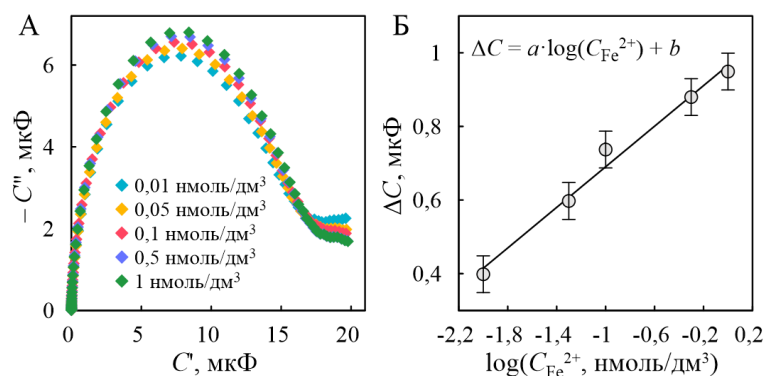


Рисунок 7 – Аналитический сигнал сенсора 1-ГТ/Аu/ИГЭ в зависимости от исходной концентрации ионов Fe^{2+} (А); градуировочная зависимость ΔC от логарифма концентрации Fe^{2+} (Б) ($P = 0,95$; $n = 3$)

Результаты статистической обработки полученной регрессионной зависимости приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Статистическая обработка уравнения регрессии градуировочной зависимости, приведенного на рисунке 7 ($P = 0,95$; $n = 3$)

Коэффициент	Значение коэффициента	Достигнутый уровень значимости	Коэффициент корреляции (R^2)
a	$0,28 \pm 0,02$	0,0000004	0,9854
b	$0,97 \pm 0,02$	0,00006	

На рисунке 8 приведена зависимость аналитического сигнала (ΔC) от десятичного логарифма концентрации ОН-радикалов, полученная с помощью сенсора АЦЦ/Аu/ИГЭ в диапазоне концентраций от 0,08 нмоль/дм³ до 8 нмоль/дм³.

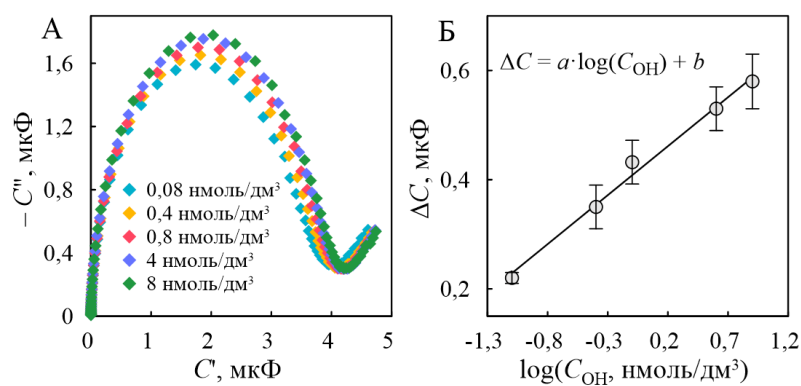


Рисунок 8 – Аналитический сигнал сенсора АЦЦ/Ау/ИГЭ в зависимости от концентрации $\text{OH}^\bullet$ (А); градуировочная зависимость ΔC от логарифма концентрации $\text{OH}^\bullet$ (Б) ($P = 0,95$; $n = 3$)

Результаты статистической обработки полученной регрессионной зависимости приведены в таблице 5.

Таблица 5 – Статистическая обработка уравнения регрессии градуировочной зависимости, приведенного на рисунке 8 ($P = 0,95$; $n = 3$)

Коэффициент	Значение коэффициента	Достигнутый уровень значимости	Коэффициент корреляции (R^2)
a	$0,18 \pm 0,01$	0,0005	0,9882
b	$0,428 \pm 0,008$	0,00001	

Исходя из полученных данных, для дальнейших измерений OH -радикалов в клеточных культурах было решено использовать сенсор АЦЦ/Ау/ИГЭ, поскольку для зависимости, полученной при использовании АЦЦ/Ау/ИГЭ, характерно наличие более высокого коэффициента корреляции, а также более широкий диапазон определяемых концентраций. Помимо этого, подход для генерации OH -радикалов с помощью реакции фотохимического разложения пероксида водорода позволяет точно рассчитать концентрацию генерируемых OH , что особенно важно для аналитических исследований.

В четвертой главе представлена разработка методики количественного определения гидроксильных радикалов в клеточных культурах с помощью сенсора АЦЦ/Ау/ИГЭ. Для полученной градуировочной зависимости (рисунок 8) была проведена оценка адекватности предложенной модели и установлено, что данная модель является адекватной. Таким образом, уравнение $\Delta C = 0,18 \cdot \log(C_{\text{OH}}) + 0,42$ может быть использовано для расчета концентрации OH -радикалов в реальных объектах.

Биологические системы являются комплексными объектами, которые могут содержать другие активные формы кислорода, различные ионы и биологически активные вещества. Для того чтобы определить, могут ли данные вещества оказывать мешающее влияние на самоорганизующийся монослой в процессе измерений, была оценена

селективность разработанного сенсора. В данном исследовании селективность оценивалась путем измерения отклика от 1 нмоль/дм³ ОН[•] и потенциально мешающих веществ в концентрации 100 нмоль/дм³. Оценка мешающего влияния по *t*-критерию приведена в таблице 6.

Таблица 6 – Расчет мешающего влияния по *t*-критерию ($P = 0,95; n = 3$)

Потенциально мешающий компонент	$t_{\text{эксп}}$	$t_{\text{табл}}$
Синглетный кислород (¹ O ₂)	3,387	4,303
Гипохлорит-ион (ClO ⁻)	3,800	
Перекись водорода (H ₂ O ₂)	3,625	
D-глюкоза	4,111	
L-аргинин	4,000	
Аскорбиновая кислота	3,353	
Глутатион	1,667	
Кверцетин	8,071	
Коэнзим Q10	4,057	
Ион магния (Mg ²⁺)	2,600	
Ион кальция (Ca ²⁺)	2,636	
Ион железа(II) (Fe ²⁺)	3,138	
Ион железа(III) (Fe ³⁺)	2,838	
Ион калия (K ⁺)	3,000	
Ион натрия (Na ⁺)	3,122	

Как видно из таблицы, из всех рассмотренных компонентов, взятых в стократном избытке, мешающие влияние на монослой АЦЦ оказывает только кверцетин. Таким образом, если в пробе присутствует данный компонент, для учета мешающего влияния на аналитический сигнал с его стороны необходимо провести регистрацию импедансных спектров пробы, после чего вычесть полученное значение емкости ДЭС из спектра аналитического сигнала. Полученные данные указывают на крайне высокую селективность разработанного сенсора и возможность его применения для анализа в биологических системах.

Разработанная методика была апробирована на двух клеточных линиях: РС-3 (аденокарцинома простаты) и 3Т3-L1 (эмбриональные фибробласты мыши). Измерение емкости ДЭС и уровень внеклеточных ОН[•], экспрессируемых данными клеточными линиями, приведены на рисунке 9.

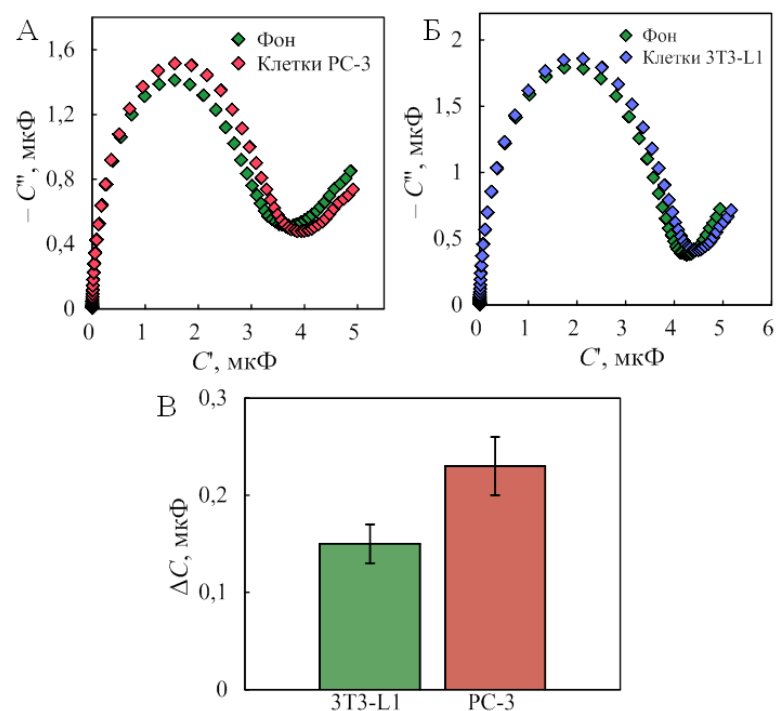


Рисунок 9 – Аналитический сигнал, полученный от опухолевых клеток PC-3 (А) и здоровых клеток T3T-L1 (Б); сравнение отклика от здоровых и опухолевых клеток ($P = 0,95$; $n = 3$) (В)

Как видно из рисунка, клетки PC-3 показали значительное изменение емкости при их инкубации с пероксидом водорода, что свидетельствует о высокой экспрессии ОН-радикалов этой клеточной линией (рисунок 9А). Как показали контрольные эксперименты, ни фосфатный буферный раствор (ФБР), в котором находились клетки во время измерений ($pH = 7,4$), ни перекись водорода, ни сами клетки не вызвали значимого увеличения емкости, что подтверждает наличие аналитического сигнала от внеклеточных ОН-радикалов. Концентрация внеклеточных ОН-радикалов, генерируемых опухолевыми клетками, составила $0,10 \pm 0,03$ нмоль/дм³. В то же время здоровые клетки T3T-L1 показали значительно меньший отклик при воздействии перекиси водорода (рисунок 9Б). Значение полученного аналитического сигнала находится в пределах систематической ошибки методики, в связи с чем количественно оценить внеклеточные ОН^{*}, генерируемые данной клеточной линией, не представляется возможным. Однако сравнение аналитического сигнала, полученного от двух клеточных линий, убедительно показывает различие между опухолевыми и здоровыми клетками (рисунок 9В). Эти данные свидетельствуют о значительном увеличении окислительного стресса в опухолевых клетках.

Для оценки правильности методики применялся метод введено-найдено на модельных растворах, представляющих собой ФБР с pH 6,86, для трех уровней концентраций с

использованием стандартных растворов перекиси водорода. Полученные данные приведены в таблице 7.

Таблица 7 – Оценка правильности методики ($P = 0,95$; $n = 3$; $t_{\text{табл}} = 4,303$)

Введено (нмоль/дм ³)	Найдено (нмоль/дм ³)	Стандартное отклонение (s)	Относительное стандартное отклонение (s_r), %	$t_{\text{эксп}}$
0,10	0,09±0,03	0,000174	0,20	1,312
0,50	0,52±0,03	0,0208	3,94	0,283
1,00	0,92±0,05	0,0208	2,31	0,961

Как видно из таблицы, относительное стандартное отклонение для всех образцов не превышает 5%, а значения критерия Стьюдента во всех случаях ниже критического. Таким образом, данные, полученные методом нефарадеевского импеданса, могут считаться удовлетворительными.

Предел обнаружения для разработанной методики составил 0,01 нмоль/дм³.

В соответствии с РМГ 61-2010 были рассчитаны метрологические характеристики разработанной методики, результаты которых представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Значения показателей повторяемости, внутрилабораторной прецизионности, правильности и точности ($P = 0,95$; $n = 2$; $L = 15$)

Диапазон измерений (нмоль/дм ³)	Показатель повторяемости, σ_r (%)	Показатель внутрилабораторной прецизионности, σ_{R_L} (%)	Показатель правильности, $\pm\Delta_c$ (%)	Показатель точности, $\pm\Delta$ (%)
от 0,08 до 8	8	9	16	30

Полученные значения показателей качества методики являются удовлетворительными, поскольку показатель точности не превышает 30%, что позволяет использовать разработанную методику для анализа уровня гидроксильных радикалов, генерируемых живыми клетками, для анализа различных клеточных культур в микробиологических лабораториях.

В пятой главе показано применение разработанного сенсора для исследования активности антиоксидантов по отношению к гидроксильным радикалам. Количественно активность антиоксидантов оценивалась по проценту уловленных ОН-радикалов (формула 4):

$$\%_{\text{ОН}} = 1 - \left(\frac{\Delta C_{\text{ант}}}{\Delta C_{\text{ОН}}} \right) \quad (4)$$

где $\%_{\text{ОН}}$ – процент уловленных ОН-радикалов;

$\Delta C_{\text{ант}}$ – аналитический сигнал, полученный при воздействии антиоксиданта;

$\Delta C_{\text{ОН}}$ – аналитический сигнал без антиоксиданта.

Показано, что среди выбранных антиоксидантов (аскорбиновая кислота, глутатион,

коэнзим Q10 и кверцетин) глутатион демонстрирует наибольший процент ингибирования гидроксильных радикалов (рисунок 10).

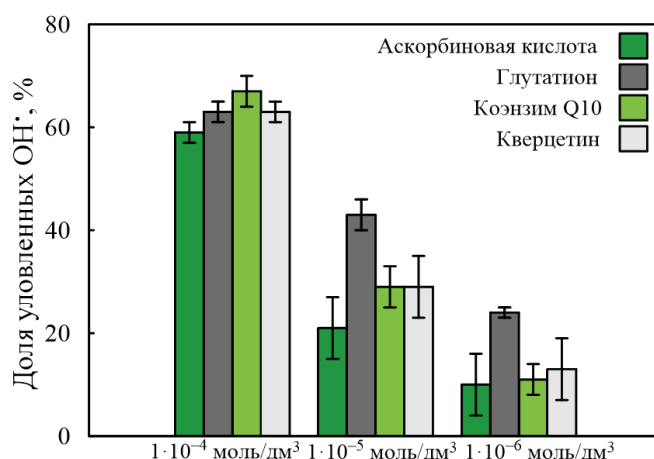


Рисунок 10 – Оценка активности антиоксидантов по отношению к гидроксильным радикалам ($P = 0,95$; $n = 3$)

Активность водорастворимых антиоксидантов, аскорбиновой кислоты и глутатиона, была исследована в опухолевых клеточных линиях: РС-3 (аденокарцинома простаты), А-431 (эпидермоидная карцинома) и U-87 (глиобластома). Результаты степени ингибирования ОН-радикалов антиоксидантами в живых клетках представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Процент уловленных ОН-радикалов антиоксидантами в опухолевых клетках ($P = 0,95$; $n = 3$)

Антиоксидант	Клеточная линия	Процент ОН-радикалов, уловленных антиоксидантом (%)
Глутатион	РС-3	40 ± 10
	А-431	40 ± 10
	U-87	40 ± 10
Аскорбиновая кислота	РС-3	15 ± 8
	А-431	11 ± 3
	U-87	11 ± 3

Как видно из таблицы, антиоксиданты проявляют такую же способность улавливать гидроксильные радикалы, продуцируемые опухолевыми клетками, как и в модельных растворах. Как и в случае с модельной системой, глутатион показал большую эффективность в ингибировании ОН-радикалов, чем аскорбиновая кислота. Полученные данные позволяют сделать вывод, что представленные антиоксиданты являются эффективными при подавлении окислительного стресса в клетках, а разработанный способ оценки активности антиоксидантов может применяться для анализа различных клеточных культур.

ВЫВОДЫ

Предложенная в работе методика количественного определения гидроксильных радикалов в клеточных культурах методом спектроскопии электрохимического импеданса

отвечает современным требованиям аналитической химии в стремлении к экспрессности, дешевизне и простоте анализа комплексных биологических объектов.

Созданный импедансометрический сенсор отличается простотой модификации и использованием нетоксичных и доступных химических реагентов в качестве модификаторов, представляющих собой золотохлористоводородную кислоту и N-ацетил-L-цистеин. Исследование свойств поверхности сенсора различными физико-химическими методами показало, что предложенная конструкция на основе графитового электрода, модифицированного электрохимически осажденным золотом и самоорганизующимся монослоем N-ацетил-L-цистеина, является перспективной для проведения измерений концентрации ОН-радикалов.

Рабочие условия для определения гидроксильных радикалов с помощью предложенного сенсора включают в себя не только необходимое время генерации ОН-радикалов с помощью реакции фотохимического разложения пероксида водорода в течение 15 минут, но и время нанесения самоорганизующегося монослоя (24 часа), а также исходную концентрацию раствора АЦЦ ($1 \cdot 10^{-2}$ моль/дм³) для получения наиболее интенсивного аналитического сигнала.

Разработана методика количественного определения гидроксильных радикалов в клеточных культурах, апробированная на двух клеточных линиях: аденокарциноме простаты и эмбриональных фибробластах мыши. Данные, полученные с помощью разработанной методики, убедительно свидетельствуют о повышенном состоянии окислительного стресса в опухолевых клетках. Проведена оценка основных метрологических характеристик разработанной методики: показателя повторяемости, показателя внутрилабораторной прецизионности, показателя правильности и показателя точности. Установлено, что показатель точности не превышает норму точности, вследствие чего полученные метрологические характеристики могут считаться установленными характеристиками погрешности для совокупности результатов анализа, которые были получены по разработанной методике в отдельной лаборатории.

Исследование активности антиоксидантов по отношению к гидроксильным радикалам с помощью нового импедансометрического сенсора в модельной системе показало, что наиболее эффективным антиоксидантом для подавления ОН-радикалов может считаться глутатион, поскольку данное вещество демонстрирует наибольший процент ингибирования ОН[•]. Оценка активности аскорбиновой кислоты и глутатиона в опухолевых клетках (аденокарцинома простаты, эпидермоидная карцинома и глиобластома) подтвердила, что

серосодержащие соединения наиболее эффективны для ингибирования ОН-радикалов, генерируемых живыми клетками.

Таким образом, разработанный подход позволяет решить две основные проблемы, возникающие при исследовании уровня ОН-радикалов в биологических образцах. Он позволяет отказаться от использования радикальных ловушек, а также дает возможность проводить определение крайней низких концентраций гидроксильных радикалов. Разработанная методика не только открывает новые возможности для исследования фундаментальных радикальных процессов в клеточных культурах, но и предоставляет возможность проводить оценку антиоксидантной терапии в процессе лечения.

Основное содержание работы изложено в следующих публикациях:

1. **Geraskevich, A.V.** Voltammetric Study of the Total Activity of Antioxidants in the Blood Serum of Patients with Neurological Diseases / O. A. Voronova, E.I. Korotkova, E.V. Plotnikov, A.V. Geraskevich, N.G. Kataeva, E.V. Dorozhko, I.S. Gamayurova, O.I. Lipskikh, K.V. Derina // *Chemosensors*. – 2021. – Т. 9. – №. 5. – С. 103.

2. **Geraskevich, A.V.** Electrochemical sensors for the detection of reactive oxygen species in biological systems: A critical review / A.V. Geraskevich, A.N. Solomonenko, E.V. Dorozhko, E.I. Korotkova, J. Barek // *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. – 2024. – Т. 54. – №. 4. – С. 742–774.

3. **Erkovich (Geraskevich), A.V.** A novel impedimetric sensor based on N-acetyl-L-cysteine for the determination of hydroxyl radicals in cell cultures in vitro / A.V. Erkovich, E.I. Korotkova, E.V. Dorozhko, E.V. Plotnikov, V.O. Semin, A.P. Chernova, J. Barek, A.N. Solomonenko, N.V. Aseeva // *Talanta*. – 2024. – Т. 270. – С. 125600.

4. **Erkovich (Geraskevich), A.V.** An N-Acetyl-L-Cysteine Impedance Sensor for Assessing Antioxidant Activity against Hydroxyl Radicals / / A.V. Erkovich, E.I. Korotkova, E.V. Dorozhko, A.N. Solomonenko, N.V. Aseeva // *Journal of Analytical Chemistry*. – 2024. – Т. 79. – №. 6. – С. 663–670.

5. **Гераскевич, А.В.** Определение гидроксильных радикалов методом импедансной спектроскопии в биологических объектах / А.В. Гераскевич // *Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XXII Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени выдающихся химиков Л.П. Кулёва и Н.М. Кижнера, посвященной 125-летию со дня основания Томского политехнического университета. В 2 томах.* – Томск: ТПУ, 2021 – Т. 1 – С. 285–286.

6. **Гераскевич, А.В.** Электрохимический сенсор для определения ОН-радикалов в биологических объектах / А.В. Гераскевич // Аналитика Сибири и Дальнего Востока: сборник докладов тезисов XI Всероссийской научной конференции и школы. – Новосибирск: ИХХ СО РАН, 2021 – С. 121.

7. **Geraskevich, A.V.** Impedimetric sensor for hydroxyl radical detection in biological systems / J. Barek, A.V. Geraskevich, E.I. Korotkova // 12th International Conference on Instrumental Methods of Analysis (IMA-2021): Book of abstracts. – Thessaloniki: Aristotle University of Thessaloniki, 2021 – p. 195.

8. **Еркович (Гераскевич), А.В.** Импедиметрический сенсор для определения гидроксильных радикалов в биологических объектах / А.В. Еркович (Гераскевич) // XXV Всероссийская конференция молодых учёных-химиков (с международным участием): тезисы докладов. – Нижний Новгород: ННГУ, 2022. – С. 226.

9. **Гераскевич, А.В.** Импедиметрический сенсор для определения гидроксильных радикалов в биологических системах / А.В. Гераскевич // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XXIII Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени выдающихся химиков Л.П. Кулёва и Н.М. Кижнера. В 2 томах. – Томск: Изд-во ТПУ, 2022 – Т. 1 – С. 331–332.

10. **Еркович (Гераскевич), А.В.** Электрохимическое определение гидроксильных радикалов в биологических объектах / А.В. Еркович (Гераскевич), Е.И. Короткова // Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине: материалы всероссийской конференции с международным участием, посвященной 75-й годовщине со дня рождения профессора Александра Евгеньевича Просенко. – Новосибирск: НГПУ, 2022 – С. 44–45.

11. **Еркович (Гераскевич), А. В.** Разработка метода на основе импедансной спектроскопии для определения гидроксильных радикалов в биологических системах / А.В. Еркович (Гераскевич), Е.И. Короткова // IV Съезд аналитиков России: Тезисы докладов. – Москва: ГЕОХИ РАН, 2022 – С. 28.

12. **Еркович (Гераскевич), А. В.** Импедиметрический сенсор, модифицированный серосодержащими соединениями, для определения ОН-радикалов в биологических объектах / А.В. Еркович (Гераскевич), Е.И. Короткова // Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов: сборник тезисов VI Международной конференции. – Екатеринбург: УрФУ, 2022 – С. 314.

13. **Еркович (Гераскевич), А. В.** Импедиметрический сенсор для определения гидроксильных радикалов в раковых клетках / А.В. Еркович (Гераскевич), Е.В. Плотников, А.П. Чернова (Асташкина) // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XXIV Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени выдающихся химиков Л.П. Кулёва и Н.М. Кижнера, посвященной 85-летию со дня рождения профессора А.В. Кравцова. В 2 томах. – Томск: ТПУ, 2023 – Т. 1 – С. 393–394.

14. **Еркович (Гераскевич), А. В.** Импедансометрический сенсор для определения гидроксильных радикалов в клеточных культурах и оценки антиоксидантной активности / А.В. Еркович (Гераскевич), Е.И. Короткова // Сборник тезисов XI Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа «ЭМА-2024». – Екатеринбург: УрФУ, 2024. – С. 63.

15. **Еркович (Гераскевич), А. В.** Разработка электрохимического сенсора на основе самоорганизующегося монослоя N-ацетил-L-цистеина для оценки антиоксидантной активности природных антиоксидантов / Ю.В. Денисова, А.В. Еркович (Гераскевич) // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XXV Юбилейной Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени выдающихся химиков Л.П. Кулёва и Н.М. Кижнера, посвященной 100-летию со дня рождения профессора В.П. Лопатинского. В 2 томах. – Томск: ТПУ, 2024 – Т. 1. – С. 244–245.

16. **Еркович (Гераскевич), А. В.** Разработка электрохимического сенсора на основе N-ацетил-L-цистеина для определения гидроксильных радикалов в биологических объектах методом анодной вольтамперометрии / А.А. Трапезоньян, А.В. Еркович (Гераскевич) // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XXV Юбилейной Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени выдающихся химиков Л.П. Кулёва и Н.М. Кижнера, посвященной 100-летию со дня рождения профессора В.П. Лопатинского. В 2 томах. – Томск: ТПУ, 2024 – Т. 1. – С. 274–275.