

**Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования «Национальный исследовательский Томский  
политехнический университет»**

*На правах рукописи*

**Еркович Алина Вадимовна**

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

1.4.2 Аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата химических наук

**Научный руководитель:**

Доктор химических наук

Короткова Елена Ивановна

Томск – 2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение .....	5
Глава 1 Литературный обзор .....	11
1.1 Активные формы кислорода в организме человека: механизмы образования и влияние на живые системы.....	11
1.2 Гидроксильные радикалы в биологических системах .....	15
1.2.1 Образование гидроксильных радикалов в живых организмах .....	15
1.2.2 Вклад гидроксильных радикалов в окислительный стресс .....	17
1.3 Антиоксидантная защита организма .....	20
1.3.1 Ферментативные и неферментативные компоненты антиоксидантной системы.....	20
1.3.2 Антиоксидантные препараты .....	23
1.4 Методы определения гидроксильных радикалов в биологических объектах	26
1.4.1 Спектроскопические методы .....	26
1.4.2 Люминесцентные методы .....	28
1.4.3 Хроматографические методы .....	30
1.4.4 Электрохимические методы .....	31
1.5 Методы определения активности антиоксидантов в биологических объектах .....	38
1.5.1 Спектроскопические методы .....	39
1.5.2 Люминесцентные методы .....	41
1.5.3 Электрохимические методы .....	42
1.6 Обоснование цели работы .....	44
Глава 2 Экспериментальная часть.....	47
2.1 Реагенты, химическая посуда, растворы.....	47
2.2 Приборы и оборудование.....	51
2.3 Методика модификации электродов органическими соединениями серы ....	54
2.4 Пробоподготовка клеточных культур.....	55
2.5 Статистическая обработка данных.....	56

Глава 3 Влияние органических соединений серы на аналитический сигнал гидроксильных радикалов .....	57
3.1 Влияние модификатора и параметров регистрации на определение гидроксильных радикалов .....	57
3.2 Исследование свойств поверхности сенсоров различными физико- химическими методами .....	67
3.2.1 Исследование токопроводящих свойств модифицированного электрода	67
3.2.2 Исследование морфологии поверхности .....	81
3.3 Подбор рабочих условий определения гидроксильных радикалов .....	88
3.4 Аналитические характеристики сенсоров с включением органических соединений серы для определения гидроксильных радикалов .....	95
Глава 4 Разработка методики количественного определения гидроксильных радикалов в клеточных культурах .....	99
4.1 Оценка адекватности модели градуировочной зависимости .....	99
4.2 Исследование мешающего влияния компонентов реальных объектов .....	102
4.3 Методика определения гидроксильных радикалов в клеточных культурах с помощью АЦЦ/Au/ИГЭ .....	104
4.4 Оценка правильности методики определения гидроксильных радикалов в клеточных культурах с использованием АЦЦ/Au/ИГЭ .....	107
4.5 Метрологические характеристики методики определения гидроксильных радикалов в клеточных культурах с помощью АЦЦ/Au/ИГЭ .....	107
Глава 5 Исследование активности антиоксидантов по отношению к гидроксильным радикалам с использованием нового импедансометрического сенсора .....	111
5.1 Оценка активности некоторых антиоксидантов в модельном растворе .....	111
5.2 Оценка активности антиоксидантов по отношению к гидроксильным радикалам в экстрактах растений .....	117
5.3 Оценка активности антиоксидантов по отношению к гидроксильным радикалам в клеточных культурах .....	118
Заключение .....	121

Список обозначений и сокращений .....	123
Список литературы .....	125
Приложение А Расчет метрологических характеристик методики определения гидроксильных радикалов в клеточных культурах .....	141

## ВВЕДЕНИЕ

**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/дм<sup>3</sup>.

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 быстроты 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 недеструктивного 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 PC-3 (аденокарцинома простаты), A-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, генерируемым 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 выполнена на 151 странице текста компьютерной верстки и включает 34 рисунка, 50 таблиц и список литературы из 151 наименования.

**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.

## ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

### 1.1 Активные формы кислорода в организме человека: механизмы образования и влияние на живые системы

Кислород – самый распространенный химический элемент в биосфере. Его восстановление лежит в основе биоэнергетики живых организмов [1]. Основная часть молекулярного кислорода, который потребляется организмом, участвует в реакциях окисления, реализующихся в митохондриях. При переносе четырех электронов к молекуле кислорода происходит образование двух молекул воды, но одно-, двух- или трехэлектронное восстановление может привести и к образованию промежуточных продуктов. Такие соединения объединяются в группу различных веществ радикальной и нерадикальной природы, которые обладают высокой реакционной способностью и называются активными формами кислорода (АФК). К ним относятся супероксид анион-радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ), перекись водорода ( $H_2O_2$ ), гидроксильный радикал ( $OH^{\cdot}$ ), синглетный кислород ( $^1O_2$ ) и некоторые другие [2].

АФК продуцируются практически всеми внутри- и внеклеточными структурами и жидкостями (рисунок 1.1). Важно отметить, что большая часть внеклеточных активных форм кислорода образуется в клетках и попадает во внеклеточное пространство через плазматическую мембрану.

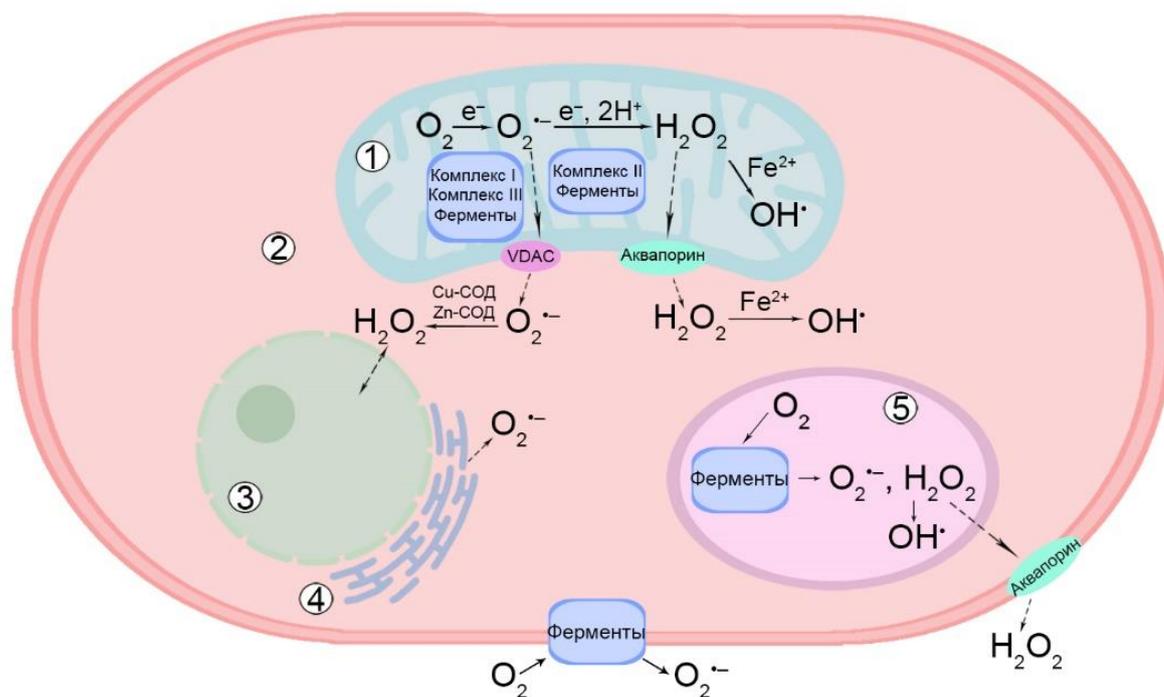


Рисунок 1.1 – Образование АФК в биологических системах. 1 – митохондрии; 2 – цитозоль; 3 – ядро; 4 – эндоплазматическая сеть; 5 – пероксисомы

Митохондрии являются важнейшими источниками АФК благодаря переносу электронов по цепи (ЦПЭ). Основные места производства супероксид анион-радикала включают комплексы дыхательной цепи I, II и III. При этом комплекс II может генерировать как  $O_2^{\bullet-}$ , так и  $H_2O_2$ . Помимо описанного ферментативного пути образования АФК, их генерация происходит в митохондриях с помощью таких ферментов, как 2-оксоглутарат дегидрогеназа, дигидрооротат дегидрогеназа, *sn*-глицерин-3-фосфатдегидрогеназа, убихинол оксидоредуктаза [3].

В митохондриальном матриксе супероксид-анион конвертируется в перекись водорода под действием марганцевой супероксиддисмутазы, тогда как в цитозоле та же реакция протекает с помощью медь-цинковой супероксиддисмутазы. Молекулы пероксида водорода, формирующиеся в митохондриальном матриксе, являются предшественниками гидроксильного радикала, образующегося в ходе реакции Фентона [4]. После этого для образовавшихся в митохондриях АФК существует несколько возможных преобразований.  $OH^{\bullet}$  немедленно взаимодействует с ближайшей биомолекулой и

разрушает ее.  $O_2^{\cdot-}$  либо преобразуется марганцевой супероксиддисмутазой в  $H_2O_2$ , либо проникает сквозь митохондриальную мембрану через потенциал-зависимый анионный канал (VDAC).  $H_2O_2$  легко перемещается в цитозоль через мембранный аквапорин [5].

Цитозоль производит АФК из различных эндогенных и экзогенных источников: цитокинов, питательных веществ и т. д. При этом в цитозоле накапливаются такие АФК, как супероксид анион-радикал и перекись водорода, генерируемые в митохондриях. Помимо этого, в цитозоле протекают реакции образования АФК с помощью НАДФН-оксидаз, индуцибельной синтазы оксида азота, индуцибельной циклооксигеназы, индуцибельной 5-липоксигеназы и индуцибельной гем-оксигеназы-1 [5]. Цитозольные АФК легко попадают в нуклеоплазму, вступая в реакции с нуклеиновыми кислотами и другими компонентами ядра [5].

Кроме цитозоля, ряд оксидаз локализован в специализированных стабильных (пероксисомы) или временных (фагосомы, мультивезикулярные тельца, эндосомы и др.) органеллах, способных продуцировать значительное количество АФК [6]. АФК также продуцируются в таких органеллах, как плазматическая мембрана, эндоплазматический ретикулум, ядро и саркоплазматический ретикулум [7–10].

Многие внеклеточные жидкости демонстрируют наличие АФК – плазма крови, семенная, перитонеальная и плевральная жидкости. АФК попадают во внеклеточные жидкости путем миграции из цитозоля через аквапорины и анионные каналы или посредством секреции, происходящей в активированных дегранулирующих лейкоцитах [11].

В таблице 1.1 обобщена ключевая информация об основных АФК и их особенностях.

Таблица 1.1 – Характеристика основных АФК [12]

АФК	Образование в биологических системах		Время свободного существования
$O_2^{\cdot-}$	<b>Внутриклеточное</b>	<b>Внеклеточное</b>	5 с
	Митохондрии, цитозоль, пероксисомы, клеточная мембрана, эндоплазматический ретикулум, саркоплазматический ретикулум, ядро	Кровь, семенная жидкость, перитонеальная жидкость, плевральная жидкость	
$H_2O_2$	<b>Внутриклеточное</b>	<b>Внеклеточное</b>	Зависит от наличия ферментов
	Митохондрии, цитозоль, пероксисомы, ядро	Кровь, семенная жидкость, перитонеальная жидкость, плевральная жидкость, слюна	
$OH^{\cdot}$	<b>Внутриклеточное</b>	<b>Внеклеточное</b>	$10^{-9}$ с
	Митохондрии, цитозоль, пероксисомы, ядро	Кровь, семенная жидкость, перитонеальная жидкость, плевральная жидкость	

Активные формы кислорода способны выполнять защитные функции в организме. Они являются необходимым элементом фагоцитоза, в процессе которого реализуется разрушение поврежденных, старых или иммунологически несовместимых клеток, а также клеток, пораженных вирусами [13]. Однако при чрезмерном образовании АФК, вызванном воздействием неблагоприятных факторов окружающей среды, инфекционными заболеваниями, постоянным стрессом, курением, алкоголизмом, некачественным питанием, в организме возникает состояние, называемое окислительным стрессом [14]. АФК могут повреждать белки и нуклеиновые кислоты, вызывать перекисное окисление липидов, приводящее к повреждениям клеточных мембран [15], индуцировать апоптоз (запрограммированную гибель клеток) [16], что в итоге способствует развитию таких патологий, как рак, сердечно-сосудистые заболевания, дисфункция головного мозга, катаракта и т. д. [17].

Таким образом, активные формы кислорода, продуцируемые в организме в больших количествах при неблагоприятных условиях, способны вызывать состояние окислительного стресса, который играет важную роль в развитии ряда патологий, в том числе и раковых заболеваний. При этом наиболее реакционным и опасным из всех свободных радикалов считается гидроксильный радикал. Более

подробно механизм образования  $\text{OH}^\bullet$  и их влияние на организм человека будут рассмотрены в следующем разделе.

## 1.2 Гидроксильные радикалы в биологических системах

### 1.2.1 Образование гидроксильных радикалов в живых организмах

Гидроксильный радикал представляет собой наиболее реакционноспособную и агрессивную активную форму кислорода.  $\text{OH}$ -радикал вызывает повреждения углерод-водородных и углерод-углеродных связей, при этом скорости реакции гидроксильного радикала и многих органических соединений соответствуют скорости диффузии. Например, по данным авторов [18], константа скорости взаимодействия  $\text{OH}$ -радикала с ферментом каталазой составляет  $2,6 \cdot 10^{11} \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ , а с гемоглобином –  $3,6 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ . В результате этого время жизни гидроксильного радикала составляет примерно  $10^{-9} \text{ c}$ , а длина миграции менее  $100 \text{ \AA}$  и сравнима с размерами органических молекул. Это означает, что гидроксильный радикал всегда будет вступать в реакцию с наиболее близкой к нему молекулой.

В организме основной источник  $\text{OH}$ -радикалов – реакция Фентона, которая возможна при участии металлов переменной валентности, в основном железа(II) и меди(I) (формула 1.1) [19]:



Не только ионы железа(II) могут приводить к разложению перекиси водорода. Подобные реакции также реализуются при участии ионов металлов переменной валентности, металлопротеинов, а также комплексов металлов с органическими молекулами. Ионы меди(I) также играют важную роль биологических реакциях окисления, поскольку проявляют большую активность, чем двухвалентное железо, в окислении липопротеинов и ДНК [20].

Ферритин, гемоглобин и микросомы выступают главными источниками каталитически активного железа в клетках. Железо в ферритине накапливается в виде  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  и высвобождается при воздействии восстановителей. В микросомах существует пул негемового железа, которое используется при синтезе P450-

зависимых ферментов, при этом высвобождение ионов железа из микросом возможно при воздействии *трет*-бутилгидропероксида [21]. Комплексы ионов металлов с низкомолекулярными соединениями, а также гемоглобин и миоглобин, тоже могут служить донорами ионов металлов, участвующих в реакциях разложения органических перекисей с образованием ОН-радикалов [2].

Еще одной значимой реакцией образования ОН-радикалов в биологических системах является реакция Габера-Вайса, которая протекает в две стадии и катализируется ионами железа, что делает ее схожей с реакцией Фентона. Первая стадия представляет собой взаимодействие трехвалентного железа с супероксид анион-радикалом (формула 1.2):



Вторая стадия дублирует реакцию Фентона (формула 1.1), поскольку включает в себя окисление иона двухвалентного железа перекисью и образование гидроксильного радикала. Исходя из этого, суммарная реакция Габера-Вайса записывается наглядно показывает формирование ОН-радикалов из супероксид анион-радикала и перекиси водорода, при этом в качестве катализатора выступает ион железа (формула 1.3) [22]:



Воздействие ионизирующего излучения на организм сопровождается образованием гидроксильных радикалов в процессе радиолиза воды (формула 1.4) [23]:



При этом могут генерироваться и другие АФК, однако их выход существенно ниже ОН-радикала.

Еще один возможный путь генерации ОН-радикалов связан с реакцией хлорноватистой кислоты и супероксидного анион-радикала (формула 1.5) [24]:



Хлорноватистая кислота в организме образуется по реакции (1.6):



катализируемой ферментами, относящимися к семейству пероксидаз млекопитающих.

Таким образом, в живых организмах существует множество путей образования гидроксильных радикалов, однако основные механизмы образования ОН-радикалов связаны с реакциями Фентона и Габера-Вайса.

### 1.2.2 Вклад гидроксильных радикалов в окислительный стресс

Гидроксильные радикалы являются инициаторами реакции перекисного окисления липидов (ПОЛ). Целями для разрушения ОН-радикалами являются фрагменты полиненасыщенных высших жирных кислот, из которых образуются клеточные мембраны, а также липопротеинов [25].

Перекисное окисление липидов протекает в несколько стадий. Реакция начинается с окисления сопряженных двойных связей, расположенных через метиленовую группу. Гидроксильный радикал переносит себе электрон от этой группы, в результате чего липид превращается в липидный радикал ( $L^{\bullet}$ ) (формула 1.7):



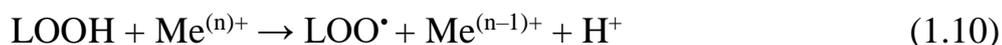
Липидный радикал реагирует с кислородом, в процессе реакции образуется пероксильный радикал ( $LOO^{\bullet}$ ) (формула 1.8):



Взаимодействуя с новыми молекулами ненасыщенных жирных кислот, пероксильный радикал инициирует появление липидных пероксидов ( $LOOH$ ), которые демонстрируют высокую стабильность при температуре тела (формула 1.9):



Скорость реакций 1.7–1.9 зависит от того, насколько высока антиоксидантная активность клетки. Реакция липидных пероксидов с комплексами металлов переменной валентности приводит к образованию пероксильных радикалов, развивающих цепь окисления (формула 1.10):



Лавинообразный процесс ПОЛ приводит к повреждению клеточных мембран, что вызывает нарушение функций мембранных белков и сбой в внутриклеточной компартментации веществ [26].

Гидроксильные радикалы вызывают окислительную модификацию нуклеотидов и нуклеиновых кислот, особенно ДНК. Из всех активных форм кислорода ОН-радикалы оказывают наиболее заметное действие на ДНК, поскольку модифицирует все четыре основания, образуя множество производных форм [27]. Азотистые основания при взаимодействии с ОН-радикалами образуют радикалы гетероциклов, что приводит к их необратимым изменениям. Некоторые из модификаций азотистых оснований, полученных таким способом, могут ослабить гликозидную связь и привести к появлению апиридиновых/апуриновых сайтов. Данный процесс влечет за собой расщепление рибозофосфатного остова в щелочных средах [28].

Белки так же, как нуклеиновые кислоты и липиды, подвержены пагубному воздействию ОН-радикалов. В ходе взаимодействия белков с гидроксильными радикалами реализуется химическая модификация полипептидной цепи или окисление боковых частей аминокислотных остатков. Возможные пути окисления компонентов белков ОН-радикалами приведены на рисунке 1.2 [29].

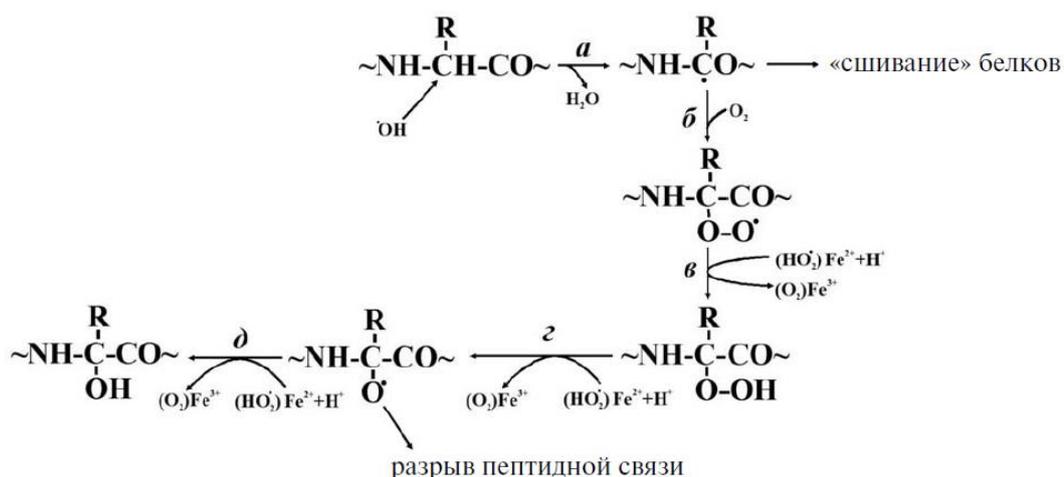


Рисунок 1.2 – Пути окисления пептидной связи гидроксильными радикалами [29]

Исходя из рисунка, зарождение реакции протекает при отщеплении ОН-радикалом водородного атома из  $\alpha$ -атома углерода аминокислотного остатка, в

результате чего образуются продукты в виде алкильного радикала и воды (а). Присоединение молекулы кислорода к алкильному радикалу приводит к формированию алкилпероксильного радикала (б), реагирующего с супероксид-анионом или с  $Fe^{2+}$  и  $H^+$  (в). Полученный алкилпероксид превращается в алкоксирадикал, причем в данном случае возможны два дальнейших пути: разрыв пептидной связи либо окисление до гидроксилпроизводного пептида (г). В отсутствие кислорода или при его недостатке два алкильных производных полипептидов могут связываться с образованием внутри- или межпептидных сшивок.

Эти окислительные модификации приводят к нарушению третичной структуры белков, к их денатурации и агрегации. Подобные изменения в дальнейшем приводят к нарушениям ферментативной и регуляторной активности многих процессов.

Приведенные выше данные указывают на то, что гидроксильные радикалы, ввиду своей высокой реакционной способности, способны оказывать значительное влияние на различные компоненты живых систем. Данные изменения являются причинами различных патологий, возникающих в организме вследствие окислительного стресса. Так, гидроксильные радикалы являются причиной нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона [30,31]. Также высокий уровень ОН-радикалов в организме может стать причиной сердечно-сосудистых заболеваний, например, инфаркта миокарда, ишемии-реперфузии или сердечной недостаточности [32]. Помимо этого, существует большой объем данных, свидетельствующий о значительном вкладе гидроксильных радикалов в развитие раковых заболеваний, что связано с повреждением ДНК и перекисным окислением липидов ОН-радикалами [33,34].

Таким образом, гидроксильные радикалы способны инициировать сердечно-сосудистые и онкологические заболевания, а также вносят существенный вклад в развитие многих не менее серьезных патологий. Однако в организме человека имеются механизмы, способные регулировать содержание

активных форм кислорода, в том числе и ОН-радикалов, – антиоксидантная система.

### **1.3 Антиоксидантная защита организма**

#### **1.3.1 Ферментативные и неферментативные компоненты антиоксидантной системы**

Роль поддержания постоянной низкой концентрации АФК в организме отводится антиоксидантной системе (АОС). В биологических системах антиоксидантами называются вещества, способные ингибировать процессы свободнорадикального окисления.

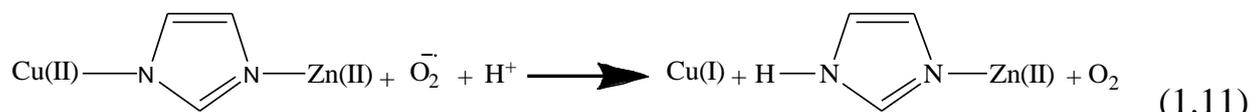
Компоненты антиоксидантной системы делятся на ферментативные и неферментативные в зависимости от способа действия. Низкомолекулярные компоненты подразделяются на гидрофобные и гидрофильные, а также на внутриклеточные и внеклеточные в зависимости от их локализации.

Система ферментативных антиоксидантов была выработана в процессе эволюции в клетках и предназначена для защиты организма от активных форм кислорода. Ферментативные антиоксиданты демонстрируют высокую специфичность действия и клеточной организации, а также обладают специфичностью применения металлов в роли катализаторов. В качестве металлов-катализаторов выступают медь, марганец, железо, никель и металлоид селен [35].

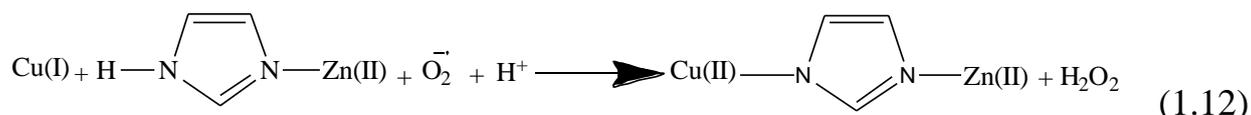
Главным ферментом внутриклеточной АОС считается фермент супероксиддисмутаза (СОД), который имеет особое значение в защите клеток от повреждающего действия супероксидного анион-радикала.

В организме человека существует три типа СОД: медь-цинковая (СОД1), марганцевая (СОД2) и экстрацеллюлярная (СОД3). Первые два типа СОД являются внутриклеточными ферментами и быстро разрушаются в межклеточной жидкости. СОД3 осуществляет дисмутацию супероксид-аниона во внеклеточном пространстве [2].

СОД приводит к значительному ускорению реакции дезактивации супероксид аниона. Реакция, реализуемая с помощью этого фермента, протекает в две стадии. Одна молекула супероксид аниона восстанавливает медь(II) при разрыве имидазольного мостика в структуре фермента (формула 1.11):



затем происходит окисление другой молекулой супероксид анион-радикала (формула 1.12) [36]:



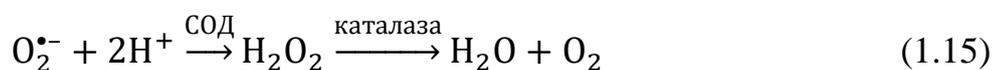
Еще один важный гемосодержащий фермент – каталаза – находится в пероксисомах, микросомах и цитозоле. Роль каталазы заключается в том, что она ускоряет разложение пероксида водорода на воду и молекулярный кислород.

Разложение перекиси водорода каталазой протекает в два этапа (формулы 1.13–1.14) [37]:



Каталаза способна длительно сохранять свою активность, почти не требуют энергии активации, а скорость ее реакции лимитируется только скоростью диффузии субстрата к активному центру фермента.

В клетках каталаза действует в комплексе с СОД, поэтому их совместное воздействие может быть представлено одной схемой (формула 1.15):



Исходя из этого, общее воздействие СОД и каталазы позволяет сохранять защиту организма от токсического действия высоких концентраций супероксидного анион-радикала и перекиси водорода, поддерживая концентрации этих веществ на низком уровне [38].

Помимо описанных ферментов в организме существует другое необходимое семейство ферментов – глутатионпероксидаз (ГПО). Они катализируют реакцию

восстановления нестойких органических гидропероксидов, в том числе гидропероксидов полиненасыщенных жирных кислот, с помощью глутатиона в стабильные соединения – оксикислоты. Они также могут инактивировать перекись водорода (формула 1.16):



где GSH обозначает восстановленный глутатион, а GS-SG – дисульфид глутатиона.

Далее глутатионредуктаза восстанавливает окисленный глутатион и завершает цикл (формула 1.17) [39]:



Поскольку сродство ГПО к перекиси водорода выше, чем у каталазы, этот фермент более эффективен при малых концентрациях перекиси водорода, однако для защиты клеток от окислительного стресса, вызванного высокими концентрациями пероксида водорода, более продуктивна каталаза [40].

Антиоксидантная система «ГПО–глутатион–глутатионредуктаза» играет ключевую роль в защите эритроцитов. Разложение перекиси водорода с помощью ГПО предотвращает образование метгемоглобина и гидроксильных радикалов, что позволяет сохранить функциональную активность эритроцитов.

Также важную роль в поддержании необходимого уровня АФК в организме играют такие ферменты, как глутатион-S-трансферазы (ГТ) [41], которые способны восстанавливать липид- и ДНК-гидропероксиды через экспрессию активности глутатионпероксидазы. Основная роль ГТ заключается в защите клеток от ксенобиотиков и продуктов ПОЛ путем их восстановления, глутатионирования или нуклеофильного замещения гидрофобных групп.

Основные неферментативные компоненты антиоксидантной системы и их характеристики представлены в таблице 1.2.

Таблица 1.2 – Неферментативные компоненты антиоксидантной системы

Название	Характеристика
Аскорбиновая кислота	Основной водорастворимый антиоксидант. Вступает во взаимодействие с супероксидным анион-радикалом, перекисью водорода и радикалом токоферола [42]. Наиболее хорошо защищает липиды от перекисного окисления ввиду своей высокой реакционной способности, благодаря чему эффективно замедляет инициацию ПОЛ в водной фазе [43].
Токоферолы	Жирорастворимые антиоксиданты. Выступают в качестве ингибиторов супероксидного анион-радикала, синглетного кислорода, гидроксильного радикала. $\alpha$ -токоферол (витамин Е) инактивирует перекисные радикалы жирных кислот $RO_2^{\cdot}$ [44].
Коэнзим Q10 (убихинон)	Ведущий митохондриальный антиоксидант, способен связываться со многими кислородными радикалами: $OH^{\cdot}$ , $O_2^{\cdot-}$ , $RO^{\cdot}$ и $RO_2^{\cdot}$ . Главный липофильный антиоксидант митохондрий и тромбоцитов, т. е. тех областей, где наблюдается низкое содержание витамина Е [45].
Глутатион	Принимает участие в работе ферментативных антиоксидантов. Глутатион, находящийся внутри клеток, способен связываться с ионами меди и тем самым затрудняет их вовлечение в реакции разложения типа Фентона [46].
Мочевая кислота	Хелатор ионов металлов переменной валентности, главным образом железа и меди. Хорошо ингибирует супероксидный анион-радикал и гидроксильный радикал, увеличивает антиоксидантное действие $\alpha$ -токоферола и аскорбиновой кислоты [2].

Приведенные данные указывают на то, что антиоксидантная система организма обладает мощным аппаратом для поддержания необходимого неопасного уровня свободных радикалов в клетках. Однако при систематическом воздействии вредных факторов происходит лавинообразный рост активных форм кислорода, вследствие чего антиоксидантная система не в состоянии регулировать их концентрацию. В данном случае необходимо применение специальных препаратов, направленных на коррекцию окислительного стресса.

### 1.3.2 Антиоксидантные препараты

Антиоксидантные препараты оказывают свое влияние на состояние организма, ингибируя действие свободных радикалов (прямые антиоксиданты), либо активируя антиоксидантную систему организма (непрямые антиоксиданты). Существуют определенные отличительные признаки в действии антиоксидантных препаратов. Например, они не вызывают физиологических или

биохимических сдвигов в здоровом организме при приеме терапевтических дозах. Они действуют неспецифично и при совершенно разных патологических процессах, а их эффекты усиливаются при комбинировании водо- и жирорастворимых антиоксидантов [47].

Витамин С или аскорбиновая кислота – наиболее популярный антиоксидант из существующих. Он синтезируется всеми растениями, пресмыкающимися и земноводными. Для человека аскорбиновая кислота является витамином, поскольку в организме человека не существует фермента L-гулонолактонооксидазы, катализирующей одну из последних стадий превращения глюкозы в аскорбат. В соответствии с данными [48], ежедневная норма потребления витамина С для мужчин составляет 90 мг в день и 75 мг в день для женщин.

$\alpha$ -токоферол или витамин Е является антиоксидантом клеточных мембран. Его недостаток вызывает накопление продуктов перекисного окисления липидов. Витамин Е используется для лечения заболеваний, в которых присутствует аутоокисление: воспаление, атеросклероз, сахарный диабет, бронхолегочная патология, нарушение репродуктивной системы. Однако в литературе фигурируют спорные данные о действенности витамина Е в лечении сердечно-сосудистых заболеваниях. В одном исследовании сообщается, что добавление  $\alpha$ -токоферола в рацион приводит к снижению частоты развития летальных и нелетальных инфарктов миокарда у больных с коронарным атеросклерозом [49]. В другом исследовании, напротив, было показано, что высокий уровень  $\alpha$ -токоферола в крови способствует увеличению частоты смертельных исходов от сердечно-сосудистых заболеваний [50].

К антиоксидантам-витаминам относятся препараты на основе каротиноидов. Это антиоксиданты, которые действуют на алкоксильные и пероксильные радикалы, синглетный кислород и пероксинитрит.  $\beta$ -каротин демонстрирует высокую тканевую специфичность: при назначении диеты с 3% содержанием  $\beta$ -каротина количество гидроперекисей фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина в эритроцитах снижалось соответственно в 50 и 13 раз и

не изменялось в плазме, легких и печени, несмотря на повышение концентрации данного антиоксиданта во всех представленных тканях [51].

Прямое антирадикальное действие является свойством многих биофлавоноидов (рутина, кверцетина, флакумина). Они также демонстрируют способность оказывать сберегающий эффект по отношению к аскорбиновой кислоте [47].

Говоря об антиоксидантных препаратах, следует отметить, что они по большей части представляют витамины либо витаминные комплексы. Витамины С и Е, а также каротиноиды (витамин А,  $\beta$ -каротин) достаточно широко распространены. Большой объем препаратов, демонстрирующих антиоксидантные свойства, содержат в себе биофлавоноиды, например, кверцетин или рутин. Известно о большом количестве препаратов, содержащих в себе коэнзим Q10.

Антиоксидантные свойства наблюдаются у многих препаратов, применяемых в комплексной терапии. Так, этилметилгидроксипиридина сукцинат («Мексидол»), производное витамина В6, является хорошим ингибитором свободных радикалов и назначается при различных сердечно-сосудистых и неврологических заболеваниях [52]. Цитофлавин, препарат, в состав которого входят янтарная кислота, инозин, никотинамид и рибофлавин, обладает высоким антиоксидантным эффектом и используется в комплексной терапии при сердечно-сосудистых и неврологических заболеваниях, а также психических расстройствах [53,54].

Многие препараты обнаруживают антиоксидантную активность как дополнительную характеристику. Так, муколитическое средство N-ацетил-L-цистеин (более известный как препарат «АЦЦ») обладает высокой антиоксидантной активностью [55]. Антиоксидантное действие эсциталопрама, относящегося к группе селективных ингибиторов обратного захвата серотонина, проявляется в индуцировании некоторых ферментов: СОД1, каталазы и глутатионпероксидаза [56]. Этот факт имеет большое значение, учитывая связь между окислительным стрессом и психическими расстройствами.

Приведенные данные указывают на большое разнообразие препаратов для уменьшения окислительного стресса в организме. Некоторые из препаратов обладают только антиоксидантным действием и применяются в составе комплексной терапии, в то время как другие обладают антиоксидантным эффектом помимо основного действия. Важно отметить, что прием витаминов и антиоксидантных препаратов должен проводиться в строгой дозировке, поскольку некоторые антиоксиданты в избыточной концентрации способны действовать как прооксиданты и генерировать еще больше активных форм кислорода.

#### **1.4 Методы определения гидроксильных радикалов в биологических объектах**

Высокая реактивность и малое время существования гидроксильных радикалов в биологических системах создает определенные трудности в их обнаружении. Вследствие высокой реакционной способности непосредственный химический анализ радикалов невозможен, поскольку их нельзя выделить и очистить как обычные молекулы. На данный момент существуют различные методы, позволяющие определять ОН-радикалы в плазме крови или клетках по устойчивым продуктам взаимодействия радикалов со специальными веществами. Важным фактором является возможность определения гидроксильных радикалов не только *in vitro*, но и *in vivo*.

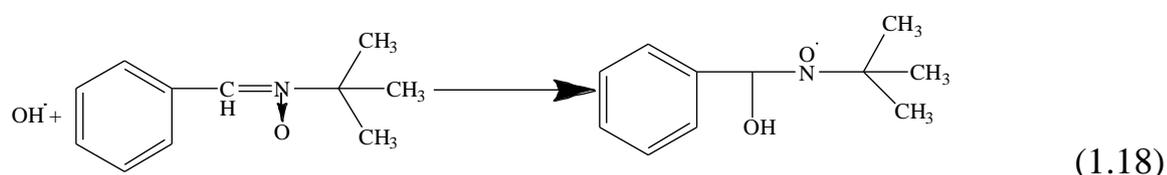
##### **1.4.1 Спектроскопические методы**

Одним из классических подходов в определении различных свободных радикалов является электронный парамагнитный резонанс (ЭПР). Этот метод основан на в резонансном поглощении электромагнитного излучения в диапазоне радиочастот веществами, помещенными в постоянное магнитное поле, что обусловлено квантовыми переходами между энергетическими подуровнями, связанными с наличием магнитного момента у электронных систем [57].

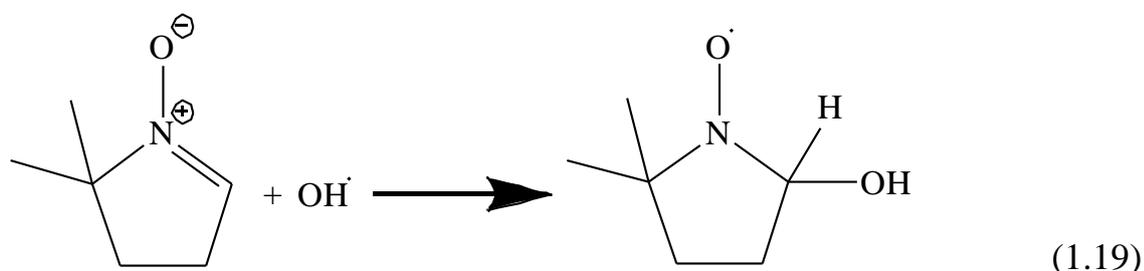
Определение гидроксильных радикалов методом ЭПР затруднено вследствие малого времени жизни ОН-радикалов. Для их регистрации чаще всего используются спиновые ловушки – химические вещества, способные реагировать

с короткоживущими радикалами. При этом образуются стабильные парамагнитные соединения – спиновые аддукты, которые и регистрируются методом ЭПР-спектроскопии [58]. Спектры ЭПР спиновых аддуктов известны, поэтому по ним однозначно определяются наличие радикалов в исследуемых объектах и их концентрация.

Обычно в качестве спиновых ловушек используются нитроны (N-оксиды иминов). Одной из наиболее распространенных спиновых ловушек для определения концентрации гидроксильных радикалов в биологических системах считаются фенилбутилнитрон (ФБН) [26]. Схема действия спиновой ловушки приведена в реакции (1.18):



Также в качестве спиновой ловушки используют 5,5-диметил-1-пирролин-N-оксид (ДМПО). Реакция образования спинового аддукта протекает по схеме (1.19):



Метод ЭПР для определения концентрации гидроксильных радикалов в биологических объектах используется во многих биофизических и медицинских исследованиях. Определение гидроксильных радикалов методом ЭПР проводилось во время ишемии головного мозга и реперфузии у крыс [59], вследствие чего была доказана роль свободных радикалов в патогенезе гистологического повреждения во время ишемии мозга. Также существуют данные об определении гидроксильных радикалов методом ЭПР в сыворотке крови пациентов с хронической почечной недостаточностью [60].

Несмотря на то, что метод электронного парамагнитного резонанса считается универсальным подходом для определения свободных радикалов, он довольно редко встречается в современных исследованиях. Основная причина заключается в сложности метода и высокой стоимости оборудования. Поэтому на данный момент ведутся активные разработки по созданию новых методик по селективной детекции ОН-радикалов в биологических системах.

#### 1.4.2 Люминесцентные методы

Среди люминесцентных методов анализа гидроксильных радикалов в биологических объектах наибольшее распространение получил флуориметрический метод.

Флуориметрический анализ основан на явлении флуоресценции, которая возникает при воздействии на вещество излучением определенной длины волны. Явление флуоресценции заключается в поглощении веществом кванта света и последующем его излучении. Поскольку часть поглощенной энергии расходуется в процессе релаксации, спектр флуоресценции сдвинут относительно спектра поглощения в длинноволновую область [61].

На данный момент существует много исследований, посвященных определению ОН-радикалов в биологических системах с помощью специфичных флуоресцентных зондов. Под флуоресцентным зондом понимается молекулярная конструкция, способная изменять свои флуоресцентные параметры, такие как интенсивность, время жизни или максимум спектра флуоресценции при связывании с аналитом [62].

Флуоресцентные зонды для определения ОН<sup>•</sup>, представляющие собой органические молекулы, можно классифицировать на несколько типов по механизму реакций с гидроксильными радикалами. Эти реакции представляют собой отщепление водорода, рекомбинацию нитроксидных радикалов, ароматическое гидрокселирование, окислительное деарилирование или окисление богатых электронами гетероатомов [63].

В работе [64] показана возможность флуориметрического определения гидроксильных радикалов с помощью терефталевой кислоты, выступающей в

качестве радикальной ловушки. Метод считается высокоселективным, поскольку терефталевая кислота не вступает в реакцию с другими активными формами кислорода. Продукт гидроксирования – 2-гидрокситерефталат – является стабильным и сильно флуоресцирующим, в то время как терефталевая кислота практически не флуоресцирует.

На основании предложенного метода было проведено исследование по флуориметрическому определению гидроксильных радикалов в сыворотке крови людей с шизофренией [65]. Было показано, что в крови пациентов, больных шизофренией, концентрация гидроксильных радикалов примерно в 1,5 раза выше, чем у здоровых пациентов.

Несмотря на простоту использования флуоресцентных зондов на основе органических молекул, их общий недостаток заключается в невозможности адаптировать их для количественного определения  $\text{OH}^\bullet$ , поскольку их механизмы основаны на принципе возникновения или гашения флуоресценции гидроксильными радикалами. В связи с этим на данный момент наиболее распространены флуоресцентные зонды, которые представляют собой композиты с включением различных наночастиц: металлов, полимеров, квантовых точек и т.д. [63]. Например, для улучшения чувствительности флуориметрического подхода определения  $\text{OH}$ -радикалов с помощью терефталевой кислоты, в работе [66] была предложена конъюгация терефталевой кислоты с графеновыми квантовыми точками. Предложенный в работе флуоресцентный зонд был апробирован на живых раковых клетках HeLa, в которых проводились определение и визуализация гидроксильных радикалов.

Таким образом, флуориметрическое определение гидроксильных радикалов кажется привлекательным подходом с точки зрения возможности не только количественного определения  $\text{OH}^\bullet$ , но и их визуализации. Также этот метод подходит для определения внутриклеточных  $\text{OH}$ -радикалов. Однако данный подход имеет некоторые недостатки, связанные с трудоемкой процедурой синтеза некоторых флуориметрических зондов и опасностью разрушения биологических образцов от излучения с высокой энергией [67].

### 1.4.3 Хроматографические методы

Хроматографические методы анализа основаны на одновременном разделении сложных проб, состоящих из нескольких компонентов, и определении состава смеси с помощью специальных детекторов. Разделение компонентов происходит на твердых сорбентах либо на жидкости, нанесенной на инертный твердый носитель или внутренние стенки хроматографической колонки, что является неподвижной фазой. Подвижная фаза может находиться как в газообразном состоянии (метод газовой хроматографии), так и в жидком (метод жидкостной хроматографии).

Для количественного определения  $\text{OH}^\bullet$  в биологических объектах хроматографическими методами используются радикальные ловушки, поскольку продукты взаимодействия гидроксильных радикалов с некоторыми органическими молекулами могут быть разделены и определены различными детекторами [68].

Для определения  $\text{OH}$ -радикалов в биологических объектах в основном применяется метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с электрохимическим детектором, что позволяет проводить определение  $\text{OH}^\bullet$  на уровне фемтомолей [69]. В качестве радикальной ловушки традиционно использовалась салициловая кислота, с помощью которой проводилось определение  $\text{OH}^\bullet$  в плазме крови человека [70], а также различных органах (мозге, печени, почках) крыс [71]. Однако при взаимодействии салициловой кислоты с  $\text{OH}^\bullet$  образуется три продукта реакции, что усложняет количественное определение гидроксильных радикалов. D-фенилаланин, который используется в качестве радикальной ловушки вместо салициловой кислоты, также образует три продукта гидроксирования [72].

Известно применение масс-спектрометрического детектора в ВЭЖХ для определения  $\text{OH}$ -радикалов. Например, в работе [73] использовался метод ВЭЖХ-МС для определения концентрации  $\text{OH}^\bullet$  с помощью салициловой кислоты в плазме крови крыс. Данный подход позволил проводить измерения  $\text{OH}^\bullet$  в диапазоне 0,5–6,5 пмоль/мкл с пределом обнаружения 0,25 пмоль.

Помимо ВЭЖХ, в качестве хроматографического метода определения ОН<sup>•</sup> может использоваться метод газовой хроматографии (ГХ). Данный подход применялся в работе [74] для определения ОН-радикалов в фибробластах человека методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектором (ГХ-МС). Было показано, что данный подход позволяет определять концентрации ОН<sup>•</sup> в диапазоне 0,1–10 нмоль. Метод ГХ-МС является неудобным для определения ОН<sup>•</sup> в связи с необходимостью дериватизации для повышения гидрофобности и летучести продуктов гидроксирования.

Таким образом, хроматографические методы для определения гидроксильных радикалов отличаются крайне низкими диапазонами определения концентраций ОН<sup>•</sup> и позволяют проводить измерение ОН-радикалов *in vivo* [71]. Основными недостатками данного подхода являются необходимость использования радикальных ловушек, трудоемкость и долгое время анализа.

#### 1.4.4 Электрохимические методы

В настоящее время электрохимические методы определения гидроксильных радикалов в биологических объектах широко распространены в современных исследованиях. Ввиду своей высокой чувствительности, экспрессности и простоты аппаратуры эти методы представляют собой альтернативу классическим техникам на основе электронного парамагнитного резонанса и хроматографии.

Среди электрохимических методов анализа ОН-радикалов наиболее популярным является метод вольтамперометрии, основанный на изучении зависимости силы тока окисления или восстановления определяемого вещества от напряжения рабочего электрода, погруженного в электрохимическую ячейку. Для детекции гидроксильных радикалов методом вольтамперометрии применяют специфичные электрохимические сенсоры – устройства, в которых аналитический сигнал возникает за счет протекания электрохимического процесса [75].

Электрохимические сенсоры для определения ОН-радикалов представляют собой рабочие электроды, модифицированные различными веществами, которые избирательно взаимодействуют с гидроксильными радикалами. Наиболее часто в качестве рабочих используются электроды на основе благородных металлов, в

частности золота, а также различных форм углерода. Значительно реже применяются электроды на основе оксидов металлов. В качестве химических модификаторов используются олигонуклеотиды ДНК [76–78], самоорганизующиеся монослои (СОМ) тиолов [79–81] или полимерные пленки [82,83]. Когда подобные модификаторы вступают в реакцию с ОН-радикалами, поверхность образовавшегося слоя подвергается разрушению, что приводит к появлению аналитического сигнала, пропорционального концентрации гидроксильных радикалов. К сожалению, из всего многообразия разработанных сенсоров для анализа биологических образцов в основном использовались сенсоры на основе тиоловых СОМ.

Первый электрохимический сенсор для количественного определения ОН-радикалов на основе золотого и ртутного электродов, модифицированных 1-гексантиолом, был представлен в статье Ф. Шольца и соавт., вышедшей в 2007 году [84]. Авторы не только показали возможность использования предложенного сенсора на модельных растворах, но и провели исследование концентрации ОН<sup>•</sup> в мононуклеарных клетках периферической крови человека. Zhu А. и соавт. использовали эту концепцию для разработки нового электрохимического сенсора для обнаружения ОН<sup>•</sup> в живых клетках [85]. Сенсор представлял собой лист из оксида индия и олова, последовательно модифицированный золотом и 1-октадекантиолом. Более того, авторы использовали метод электрохимической импедансной спектроскопии (ЭИС), чтобы предотвратить разрушение СОМ. Используя данный подход, авторы смогли достичь достаточно низкого предела обнаружения  $1,80 \cdot 10^{-9}$  моль. В результате исследования было проведено определение концентрации ОН<sup>•</sup> в клетках RAW 264.7 (макрофагальные клетки). Содержание гидроксильных радикалов в клеточных культурах составило  $3,6 \pm 0,3$  нмоль.

Использование пластинки оксида индия и олова в качестве рабочего электрода представлено в еще одной работе, изданной в 2013 году [86]. Авторы работы немного усложнили процедуру модификации сенсора по сравнению с предыдущей работой, последовательно модифицировав электрод (3-

аминопропил) триэтоксисиланом, наночастицами золота, 6-(ферроценил) гексантиолом и 1-октадекантиолом. Определение  $\text{OH}^\bullet$  проводилось методом квадратно-волновой вольтамперометрии (КВВ). При анализе модельных растворов было показано, что линейность зависимости анодного и катодного пиков от концентрации  $\text{OH}^\bullet$ -радикалов наблюдается в диапазоне от  $5,00 \cdot 10^{-9}$  моль/дм<sup>3</sup> до  $4,50 \cdot 10^{-8}$  моль/дм<sup>3</sup>. Предел обнаружения составил  $3,70 \cdot 10^{-10}$  моль/дм<sup>3</sup>. Данный метод был применен для определения гидроксильных радикалов в культуре клеток HeLa (клетки рака шейки матки человека), продуцирующих  $\text{OH}^\bullet$ -радикалы при добавлении липополисахаридов. Концентрация  $\text{OH}^\bullet$  в клеточных культурах составила  $15,7 \pm 4$  нмоль/дм<sup>3</sup>.

Для создания другого электрохимического сенсора, селективного к  $\text{OH}^\bullet$ -радикалам, в работе [87] использовался микроэлектрод из нанопористого сплава золота и серебра, модифицированный наночастицами золота, 6-(ферроценил) гексантиолом и 1-октадекантиолом. Используя метод КВВ для анализа концентрации  $\text{OH}^\bullet$ , авторы провели определение содержания  $\text{OH}^\bullet$  в клетках HepG2 (клетки гепатоцеллюлярной карциномы печени). По данным исследования, концентрация  $\text{OH}^\bullet$  в клеточных культурах составила 2,4 нмоль/дм<sup>3</sup>.

Еще один электрохимический сенсор на основе золотого электрода, модифицированного нанопористым золотом, 6-(ферроценил) гексантиолом и 1-октадекантиолом для определения гидроксильных радикалов в раковых клетках, представлен в работе [79]. Разработанный сенсор был применен для определения содержания гидроксильных радикалов в клетках HepG2.

Также следует отметить несколько исследований, в которых авторы постарались создать электрохимические сенсоры для определения концентрации внутриклеточных  $\text{OH}^\bullet$ -радикалов. Одно из таких исследований представлено в работе [80], где авторами работы был создан наноэлектрод на основе капилляра из боросиликатного стекла, модифицированного пленкой золота и 1-гексантиолом. В результате исследования было проведено определение  $\text{OH}^\bullet$  в митохондриях клеток RAW 264.7 при моделировании окислительного стресса или болезни Альцгеймера.

Еще один наносенсор для определения концентрации внутриклеточных  $\text{OH}^\bullet$  разработан в работе [81]. Авторы исследования использовали вольфрамовый наноэлектрод, модифицированный наночастицами золота и 1-гексантиолом в качестве рабочего электрода. Используя метод дифференциальной импульсной вольтамперометрии (ДИВ), авторы не только продемонстрировали работоспособность сенсора на модельных растворах, но и провели определение содержания  $\text{OH}^\bullet$  в клетках RAW 264.7.

Исходя из вышеизложенного, электрохимические сенсоры для количественного определения  $\text{OH}^\bullet$  на основе самоорганизующихся монослоев тиолов имеют множество достоинств. Их отличает достаточно легкая процедура нанесения модификатора и возможность достичь низкого предела обнаружения определяемого компонента. Данные сенсоры обладают высокой селективностью по отношению к  $\text{OH}^\bullet$  по сравнению с другими активными формами кислорода и азота, ионами металлов и различными биологически активными веществами [80]. Также созданные сенсоры не требуют специальных условий хранения и могут быть регенерированы после проведения измерений [88]. Основным недостатком сенсоров на основе самоорганизующихся монослоев тиолов является использование токсичных веществ в качестве модификаторов.

Помимо рассмотренных выше примеров, в литературе существуют варианты сенсоров с другими модификаторами, которые также представляют собой вещества, способные избирательно связываться с гидроксильными радикалами. Например, Wang Z. и соавт. создали полевой транзистор на основе графена, модифицированного наночастицами золота, цистеамином и протопорфирином IX [89]. Используя этот подход, авторы смогли определять  $\text{OH}^\bullet$ -радикалы в широком диапазоне концентраций и добились достаточно низкого предела обнаружения ( $1,00 \cdot 10^{-9}$  моль/дм<sup>3</sup>). Протопорфирин IX также использовался в качестве модификатора в работе [90] при создании сенсора на основе боросиликатного наноэлектрода. Данный электрод позволил провести внутриклеточное определение  $\text{OH}^\bullet$  в клетках RAW 264.7, HeLa и BV2. В другом исследовании Duanghathairornsuk S. и соавт. использовали нанокластеры  $\text{CeO}_x$

для каталитического восстановления  $\text{OH}^\bullet$  и его определения методом циклической вольтамперометрии (ЦВА) [91]. Авторы работы не только проверили работоспособность полученного сенсора на модельных растворах, но и провели определение  $\text{OH}^\bullet$  в клетках МСЗТЗ (преостеобласты). Еще одна перспективная конструкция сенсора представлена в исследовании [92], где был изготовлен сенсор на основе графитовой бумаги с нанесенным биметаллическим органическим каркасом, внутрь которого были введены салициловая кислота и метиленовый синий. Данный сенсор был применен для анализа сыворотки крови.

Обобщенные данные по электрохимическим сенсорам для определения  $\text{OH}^\bullet$  в биологических объектах, их достоинствах и недостатках приведены в таблице 1.3.

Таблица 1.3 – Электрохимические сенсоры для определения гидроксильных радикалов в биологических объектах

Электрод	Модификатор	Метод измерения	Линейный диапазон концентраций (моль/дм <sup>3</sup> )	Предел обнаружения (моль/дм <sup>3</sup> )	Объект определения	Достоинства	Недостатки	Ссылка
Капилляр из боросиликатного стекла	Золотая пленка, 1-гексантиол	Выпрямление ионного тока	$1,00 \cdot 10^{-9} - 2,50 \cdot 10^{-7}$	$1,00 \cdot 10^{-9}$	Клетки RAW 264.7	1, 2, 3	2, 3, 4	[80]
	Золотая пленка, цистеамин, протопорфирин IX		$5,00 \cdot 10^{-9} - 1,45 \cdot 10^{-7}$	$1,58 \cdot 10^{-9}$	Клетки RAW 264.7 HeLa и BV2	1, 2, 3	2, 3	[90]
Золотой электрод	Нанопористый слой золота, 6-(Ферроценил) гексантиол	КВВ	$1,00 \cdot 10^{-12} - 1,00 \cdot 10^{-7}$	$3,16 \cdot 10^{-13}$	Клетки HepG2	2, 3	2, 4	[79]
Графен на подложке из SiO <sub>2</sub> /Si, покрытый слоем Cr/Au	Наночастицы золота, цистеамин, протопорфирин IX	Амперометрия	$1,00 \cdot 10^{-9} - 1,00 \cdot 10^{-3}$	$1,00 \cdot 10^{-9}$	Клетки HeLa	2, 3	2, 3, 4	[89]
Графитовая бумага	Биметаллический органический каркас CoZn, салициловая кислота, метиленовый синий	ДИВ	$1,25 \cdot 10^{-9} - 1,20 \cdot 10^{-6}$	$2,00 \cdot 10^{-10}$	Сыворотка крови	2, 3	2	[92]

Продолжение таблицы 1.3

Электрод	Модификатор	Метод измерения	Линейный диапазон концентраций (моль/дм <sup>3</sup> )	Предел обнаружения (моль/дм <sup>3</sup> )	Объект определения	Достоинства	Недостатки	Ссылка
Оксид индия-олова	(3-аминопропил) триэтоксисилан, наночастицы золота, 6-(Ферроценил) гексантиол, 1-октадекантиол	КВВ	$5,00 \cdot 10^{-9}$ – $4,50 \cdot 10^{-8}$	$3,70 \cdot 10^{-10}$	Клетки HeLa	2	1, 2, 3, 4	[86]
	Наночастицы золота, 1-октадекантиол	ЭИС	$9,00 \cdot 10^{-10}$ – $2,19 \cdot 10^{-8}$ (1)	$1,80 \cdot 10^{-9}$	Клетки RAW 264.7	2, 3	2, 3, 4	[85]
Микроэлектрод из нанопористого сплава Au–Ag	Наночастицы золота, 6-(Ферроценил) гексантиол, 1-октадекантиол	КВВ	$2,00 \cdot 10^{-12}$ – $8,00 \cdot 10^{-8}$	$6,40 \cdot 10^{-13}$	Клетки HepG2	2	1, 2, 3, 4	[87]
Углеродный электрод с трафаретной печатью	Наночастицы оксида церия, высокопроводящий углерод	ЦВА	$1,00 \cdot 10^{-5}$ – $1,00 \cdot 10^{-3}$	$6,00 \cdot 10^{-7}$	Клетки МС3Т3	–	1, 2, 3	[91]
Вольфрамовый нано-электрод	Наночастицы золота, 1-гексантиол	ДИВ	$1,00 \cdot 10^{-9}$ – $1,00 \cdot 10^{-5}$	$3,30 \cdot 10^{-10}$	Клетки RAW 264.7	1, 2	1, 2, 4	[81]

(1) – концентрация H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Достоинства: 1 – внутриклеточное определение; 2 – низкий предел обнаружения; 3 – легкая подготовка модификатора; 4 – быстрая модификация сенсора.

Недостатки: 1 – трудоемкая подготовка модификатора; 2 – долгая модификация сенсора; 3 – ограниченная или неизвестная стабильность сенсора; 4 – использование токсичных веществ в качестве модификаторов.

## 1.5 Методы определения активности антиоксидантов в биологических объектах

Для характеристики активности антиоксидантов используются два ключевых показателя, такие как «антиоксидантная активность» (АОА) и «антиоксидантная емкость» (АОЕ), которые обладают существенными различиями. Антиоксидантная емкость характеризует эффективность окисления антиоксиданта и связана с константой равновесия реакции. Антиоксидантная активность связана с кинетикой химической реакции, поскольку этот параметр отражает скорость окисления исследуемого антиоксиданта или скорость улавливания какого-либо реакционноспособного вещества антиоксидантом. Количественной характеристикой АОА обычно считается процент ингибирования или улавливания по отношению к эталонному соединению либо константа скорости реакции [93].

Широко используемые аналитические подходы для оценки антиоксидантной емкости и активности можно разделить на несколько типов, например, для анализа *in vitro* или *in vivo*, ферментативные и неферментативные, основанные на переносе электрона и переносе атома водорода, прямые и непрямые. Основной задачей при исследовании антиоксидантов является определение того, какой метод оценки АОА лучше подходит для конкретного вещества. Поскольку антиоксиданты могут оказывать свое действие с помощью различных механизмов, таких как улавливание свободных радикалов, связывание ионов переходных металлов, разложение перекиси водорода или гидроперекисей, подавление активных прооксидантов и восстановление биологических повреждений, необходимо учитывать, какой именно параметр активности антиоксиданта следует определять. Таким образом, метод анализа следует выбирать с учетом оцениваемой функции антиоксиданта [94].

Основные аналитические подходы, применяемые для определения антиоксидантной активности, приведены в таблице 1.4.

Таблица 1.4 – Основные подходы для определения антиоксидантной активности и антиоксидантной емкости [95]

Название подхода	Принцип определения АОА/АОЕ	Метод оценки АОА/АОЕ
DPPH	Реакция антиоксидантов с органическим радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила	Колориметрия
ABTS	Реакция антиоксидантов с органическим катион-радикалом 2,2'-азинобис[3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислоты]	
FRAP	Реакция антиоксидантов с комплексом Fe(III)	
CUPRAC	Восстановление Cu(II) до Cu(I) антиоксидантами	
ORAC	Реакция антиоксидантов с пероксильным радикалом, индуцируемым 2,2'-азобис-2-амидинопропаном	Гашение флуоресценции флуоресцеина

Помимо этих подходов, существует множество методик для определения АОА с помощью флуориметрии, электрохимических методов и хроматографии [95]. Однако не все представленные подходы реализуются в биологических объектах.

С точки зрения определения активности антиоксидантов в биологических объектах важным является анализ клеточной антиоксидантной активности. Данный подход реализуется в клеточной среде, что, предположительно, лучше учитывает поглощение, распределение и метаболизм антиоксидантов внутри клеток [94].

#### 1.5.1 Спектроскопические методы

Среди спектроскопических методов анализа антиоксидантной активности биологических образцов наибольшее распространение получили

колориметрические методы, основанные на изменении окраски (увеличении или уменьшении) веществ при наличии антиоксидантов в пробе.

Метод снижения антиоксидантной емкости меди (CUPRAC) для ряда полифенолов и флавоноидов с использованием медь(II)-неокупроинового реагента в ацетатно-аммонийном буфере применялся к серии антиоксидантов плазмы крови для анализа общей антиоксидантной активности сыворотки. Данный подход также может использоваться для оценки активности антиоксидантов по отношению к ОН-радикалам [96].

Метод ABTS использовался для определения антиоксидантной активности семенной плазмы человека с целью оценки мужского бесплодия [97]. Принцип анализа заключается в способности водных и липидных антиоксидантов в образцах семенной плазмы ингибировать окисление 2,2'-азино-ди-[3-этилбензтиазолинсульфоната] (ABTS) до ABTS<sup>+</sup>. В используемых условиях реакции антиоксиданты семенной плазмы вызывают подавление поглощения при 750 нм в степени, пропорциональной их концентрации. Способность присутствующих в образце антиоксидантов предотвращать окисление ABTS сравнивали со способностью стандарта Тролокса, водорастворимого аналога токоферола.

Колориметрический способ оценки активности антиоксидантов по отношению к ОН-радикалам с использованием о-дианизидина [98], использовался для определения антиоксидантной активности сыворотки крови, слюны и зубодесневой жидкости у беременных с заболеваниями пародонта и без них [99]. Данный подход подразумевает окисление молекул о-дианизидина ОН-радикалами, что приводит к появлению яркой желто-коричневой окраски в течение нескольких секунд. Антиоксиданты в пробе подавляют образование окраски в степени, пропорциональной их концентрации.

Колориметрический подход оценки антиоксидантной активности слюны, основанный на реакции между антиоксидантами и гидроксильными радикалами, образующимися на поверхности платиновых наночастиц, был предложен в работе [100].

Исходя из вышесказанного, колориметрические способы оценки антиоксидантной активности являются простыми, экспрессными и недорогими. Однако, несмотря на их широкое применение для анализа биологических жидкостей, колориметрические методы не применимы для анализа клеточной антиоксидантной активности.

### 1.5.2 Люминесцентные методы

Среди люминесцентных методов анализа антиоксидантной активности в биологических объектах наибольшее распространение получила флуориметрия.

Наиболее часто для анализа антиоксидантной емкости биологических образцов применяется методика ORAC, основанная на реакции окисления между флуоресцеином и пероксильными радикалами. Образующиеся перекисные радикалы разрушают флуоресцентные молекулы, вызывая уменьшение флуоресценции. При этом антиоксиданты, содержащиеся в исследуемом объекте, понижают уровень окисленных молекул флуоресцеина [101]. Данный подход часто используется для анализа антиоксидантной емкости различных биологических жидкостей, например, плазмы крови [102].

В 2007 году был предложен флуориметрический анализ клеточной антиоксидантной активности с использованием чувствительного к окислению флуоресцентного зонда, который способен проникать через клеточные мембраны [103]. В качестве зонда используется диацетат 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина (DCFH-DA), нефлуоресцентный реагент, который преобразуется внутри клеток с образованием нефлуоресцентного компонента, который окисляется при добавлении  $H_2O_2$  или пероксильными радикалами, генерируемыми 2,2'-азобис(2-амидинопропан)дигидрохлоридом, с образованием флуоресцентного дихлорфлуоресцеина. В качестве модельных клеточных линий использовались клетки эпителия толстой кишки человека (HCT-116), клетки гепатокарциномы (HepG2) и колоректальной аденокарциномы (Caco-2) для определения антиоксидантной активности фитохимических веществ и фруктовых экстрактов.

С момента публикации этот метод был применен к экстрактам нескольких натуральных продуктов, пищевым продуктам и диетическим добавкам [104]. Также было предложено использовать другие клеточные линии. Эритроциты человека использовали для оценки антиоксидантной активности растительных экстрактов в клеточных культурах с помощью флуориметрического зонда DCFH-DA в работе [105]. В качестве стандартного антиоксиданта применялся кверцетин. Также было проведено сравнение результатов данного подхода с методикой ORAC.

Флуоресцентный метод оценки активности антиоксидантов в клетках являются более чувствительным по сравнению с колориметрическими методами и дает большее представление о метаболизме антиоксидантов в клеточной среде. Однако этот подход имеет некоторые недостатки, такие как фотохимическая нестабильность и неполный захват зонда клетками. Свойства клеточной линии, используемой в анализе, также могут повлиять на результат.

### 1.5.3 Электрохимические методы

Электрохимические методы определения антиоксидантной активности и антиоксидантной емкости биологических объектов широко распространены ввиду простоты и экспрессности анализа.

Для оценки антиоксидантной емкости биологических жидкостей используются следующие подходы. Например, в работе [106] оценка интегральной антиоксидантной емкости плазмы крови проводилась методом колориметрического титрования с электрогенерированным бромом. Также авторами был предложен еще один подход для определения антиоксидантной способности плазмы крови по отношению к супероксид аниону-радикалу на основе циклической вольтамперометрии, основанный на катодном восстановлении кислорода на стуклоуглеродном электроде.

Потенциометрические техники оценки антиоксидантной активности достаточно распространены в российских и зарубежных исследованиях АОО [107]. Особенно следует отметить потенциометрическую мелодику, основанную на сдвиге электродного потенциала в медиаторной системе

$K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ , наблюдаемом при добавлении в раствор антиоксидантов. Для измерений в качестве рабочего электрода применяется платиновый электрод. Данный подход был успешно применен для оценки антиоксидантной активности крови и ее фракций: плазмы и эритроцитов [108]. Схожая методика применялась в исследовании [109] для определения антиоксидантной активности таких биологических жидкостей, как сыворотка крови и эякулят с помощью методов хроноамперометрии и хронопотенциометрии и платиновым рабочим электродом.

Способ оценки антиоксидантной активности, основанный на регистрации тока электрохимического восстановления кислорода на ртутном пленочном или стеклоуглеродном электроде, был предложен в работе [110]. Регистрация пика восстановленного кислорода проводится методом катодной вольтамперометрии. Сообщается, что антиоксиданты, присутствующие в исследуемой пробе, уменьшают значение тока восстановления кислорода пропорционально их концентрации. Данный подход использовался для оценки антиоксидантной активности сыворотки крови людей, страдающих алкоголизмом [111], и для определения активности некоторых антиоксидантных препаратов в сыворотке крови пациентов с различными неврологическими заболеваниями [112].

Говоря о других биологических объектах, следует отметить использование различных биосенсоров для определения антиоксидантной активности. Например, в работе [113] использовался биосенсор на основе цитохрома C, который проявляет каталитическую активность в отношении супероксид анион-радикала, для определения антиоксидантной активности в срезах мозга мышей. Помимо этого, существует еще один электрохимический подход, когда биологические образцы – ткани или клетки – помещают на электрод и проводят оценку антиоксидантной активности пищевых продуктов или лекарственных препаратов [114,115]. Также существует возможность исследования антиоксидантной активности с помощью биосенсоров с закрепленными клеточными культурами методом импедансной спектроскопии [116,117].

В целом электрохимические методики определения антиоксидантной активности или антиоксидантной емкости являются быстрыми и простыми в применении подходы, результаты которых сопоставимы с результатами, полученными с применением других методик оценки АОА.

### **1.6 Обоснование цели работы**

Определение концентрации гидроксильных радикалов в клеточных культурах имеет особую значимость как с точки зрения понимания фундаментальных антирадикальных процессов, так и для исследования эффективности антиоксидантов. К сожалению, мониторинг ОН-радикалов в биологических объектах все еще представляет сложность для исследователей, связанную с крайне высокой реакционной способностью и сверхкоротким временем жизни ОН-радикалов. Среди множества подходов к определению ОН<sup>•</sup> электрохимические методы обладают определенными перспективами из-за быстрого отклика, высокой селективности, короткого времени анализа и простого оборудования.

Как было показано в предыдущих разделах, самоорганизующиеся монослои органических соединений серы наиболее часто применяются в качестве модификаторов сенсоров для определения ОН-радикалов в биологических объектах. К их достоинствам относятся простота нанесения, стабильность, а также возможность селективно определять гидроксильные радикалы ввиду избирательной реакции между ОН-радикалами и соединениями серы. В литературе в основном описывается применение тиолов [81,85] для формирования самоорганизующихся монослоев на поверхности сенсоров. Несмотря на то, что поведение данных веществ при образовании СОМ наиболее хорошо изучено, их общим недостатком является высокая токсичность, что создает необходимость исследования других, менее опасных, органических соединений серы, в качестве модификаторов.

Образование СОМ требует определенных свойств поверхности, на которой будет протекать адсорбция. Органические соединения серы образуют стабильные ковалентные связи с различными благородными металлами, в частности, с

золотом [118]. Использование золотого электрода упрощает процедуру модификации, однако, делает анализ более дорогим, в связи с чем использование инертного материала с нанесенным золотом в качестве подложки для формирования СОМ кажется более перспективным. В частности, электрод на основе графита, импрегнированного полиэтиленом и парафином под вакуумом, представляет собой удобный в работе материал, который легко модифицировать, регенерировать и применять для многократных измерений. Адсорбция соединений серы на золоте наиболее хорошо изучена, поэтому в данной работе предпочтение отдается золоту в качестве подложки по сравнению с другими благородными металлами. Также следует отметить, что золото является электрохимическим инертным металлом по сравнению с серебром, медью или платиной.

В качестве метода регистрации аналитического сигнала предложено использовать метод электрохимической импедансной спектроскопии. Данный подход, основанный на воздействии небольшого переменного напряжения на электрохимическую систему и исследовании отклика системы на это возмущение при различных частотах, имеет определенные преимущества перед другими электрохимическими техниками. Так, данный подход позволяет проводить определение различных аналитов с высокой чувствительностью и в диапазоне низких концентраций. Он также дает возможность проводить измерения при равновесных значениях потенциала электрохимической ячейки, что делает его неdestructивным подходом, крайне удобным для СОМ, подверженных разрушению при использовании других электрохимических методов [85].

Следует отметить, что исследование клеточной антиоксидантной активности по отношению к гидроксильным радикалам электрохимическими методами крайне немногочисленно, поэтому разработка нового импедансометрического сенсора для оценки активности антиоксидантов в клетках также является актуальной. Предложенные сенсоры на основе органических соединений серы могут использоваться для оценки активности антиоксидантов по отношению к гидроксильным радикалам в клеточных культурах. Принцип их

действия основан на том, что внесение антиоксиданта способствует меньшему разрушению СОМ ОН-радикалами вследствие связывания ОН<sup>•</sup> с антиоксидантом.

## ГЛАВА 2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 2.1 Реагенты, химическая посуда, растворы

В работе применялись данные реактивы и стандартные вещества:

- калий хлористый (KCl), х.ч. (ГОСТ 4234-77, Уралкалий, Россия);
- калия(II) гексацианоферрат ( $K_4[Fe(CN)_6]$ ), х.ч. (ГОСТ 4207-75, ЛенРеактив, Россия);
- калия(III) гексацианоферрат ( $K_3[Fe(CN)_6]$ ), х.ч. (ГОСТ 4206-75, ЛенРеактив, Россия);
- серная кислота ( $H_2SO_4$ ), х.ч. (ГОСТ 4204-77, ЭКОС-1, Россия);
- перекись водорода ( $H_2O_2$ ), 35% (ГОСТ 177-88, Паритрейд, Россия);
- железо(III) хлорид 6-водное ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ), х.ч. (ГОСТ 4147-74, ХимКо, Россия);
- аммоний-железо(II) сернокислый 6-водный ( $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ , соль Мора), ч.д.а. (ТУ 6-09-5359-88, ЛенРеактив, Россия);
- натрий хлористый (NaCl), ч.д.а. (ГОСТ 4233-77, ХимКо, Россия);
- кальций хлористый 2-водный ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ), 99% (Sigma-Aldrich, США);
- магний сернокислый ( $MgSO_4$ ), ч.д.а. (ГОСТ 4523-67, ЛенРеактив, Россия);
- стандарт-титр тип 4 рН 6,86 (ГОСТ 8.135–2004, Уралхиминвест, Россия);
- фосфатно-солевой буфер рН 7,4 (ПанЭко, Россия);
- гипохлорит натрия (NaClO), 18% (ГОСТ 11086-76, ХимКо, Россия);
- калия гидроксид (KOH), х.ч. (ГОСТ 24363-80, Лабтех, Россия);
- кислота золотохлористоводородная ( $H[AuCl_4]$ ), х.ч. (ТУ 2612-025-00205067-2003, Аурат, Россия);
- натрий лимоннокислый 3-замещенный 2-водный, ч.д.а. (ГОСТ 22280-76, МСД, Россия);
- 1-гексантиол, 95% (Sigma-Aldrich, США);
- N-ацетил-L-цистеин, 98% (Acros Organics, США);
- D-глюкоза, 99% (Sigma-Aldrich, США);
- L-аргинин, 98% (Sigma-Aldrich, США);

- аскорбиновая кислота, ч.д.а. (ЛенРеактив, Россия);
- L-глутатион восстановленный, 97% (Panreac, Испания);
- коэнзим Q10, 98% (Sigma-Aldrich, США);
- кверцетин, х.ч. (ТУ 6-09-10-745-78, ЛенРеактив, Россия);
- клеточная среда Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), (ПанЭко, Россия);
- эмбриональная телячья сыворотка (OneShot™, Thermo Fisher Scientific, Бразилия);
- пенициллин-стрептомицин 100-кратный в растворе, 5000 ЕД/см<sup>3</sup> пенициллина и 5000 мкг/см<sup>3</sup> стрептомицина (ПанЭко, Россия);
- спирт этиловый, 95% (АО «Кемеровская фармацевтическая фабрика»);
- бидистиллированная вода.

Для приготовления растворов использовались мерные колбы объемом 10, 25, 50, 100 и 1000 см<sup>3</sup> (ГОСТ 1770-74). Необходимые объемы растворов отбирали одноканальными дозаторами переменного объема 1–5 см<sup>3</sup>, 0,1–1 см<sup>3</sup> («Экротхим», Россия) и 0,001–0,01 см<sup>3</sup> (АО «Термо Фишер Сайентифик», Россия). Наконечники универсальные для дозаторов использовались отдельно для каждого раствора. Для проведения электрохимических измерений использовались кварцевые стаканы вместимостью 20 см<sup>3</sup>. Химическая посуда, используемая в экспериментах, предварительно очищалась раствором соды с последующим ополаскиванием бидистиллированной водой. Чистота химической посуды для электрохимических измерений оценивалась путем регистрации циклических вольтамперограмм фосфатного буферного раствора. При отсутствии пиков посуду считали чистой.

*Приготовление фонового электролита.* Для приготовления фонового электролита содержимое стандарт-титра с заданным значением рН 6,86 растворяли в бидистиллированной воде в колбе на 1 дм<sup>3</sup>. Приготовленный раствор хранили в закрытой стеклянной посуде при комнатной температуре.

*Приготовление раствора хлорида калия 1 моль/дм<sup>3</sup>.* Для приготовления раствора навеску хлорида калия 7,45 г растворяли в бидистиллированной воде в колбе на 100 см<sup>3</sup>. Приготовленный раствор хранили в стеклянной посуде при комнатной температуре.

*Приготовление раствора гексацианоферрата калия  $Fe(CN)_6^{3-/4-}$  0,1 моль/дм<sup>3</sup>.* Для приготовления раствора навески калия(III) гексацианоферрата 0,823 г и калия(II) гексацианоферрата 1,056 г растворяли в бидистиллированной воде в колбе на 25 см<sup>3</sup>. Приготовленный раствор хранили в темной стеклянной посуде при комнатной температуре.

*Приготовление раствора золотохлористоводородной кислоты 50 мг/дм<sup>3</sup>.* Для приготовления раствора 0,5 см<sup>3</sup> 1 г/дм<sup>3</sup> раствора  $H[AuCl_4]$  растворяли в бидистиллированной воде в колбе на 10 см<sup>3</sup>. Приготовленный раствор хранили в темной стеклянной посуде при комнатной температуре.

*Приготовление раствора 1-гексантиола 2 ммоль/дм<sup>3</sup>.* Для приготовления раствора 0,007 см<sup>3</sup> раствора 1-гексантиола (1-ГТ) 98% растворяли в этиловом спирте в колбе на 25 см<sup>3</sup>. Приготовленный раствор хранили в стеклянной посуде при комнатной температуре.

*Приготовление раствора N-ацетил-L-цистеина 10 ммоль/дм<sup>3</sup>.* Для приготовления раствора навеску N-ацетил-L-цистеина (АЦЦ) 0,0163 г растворяли в бидистиллированной воде в колбе на 10 см<sup>3</sup>. Приготовленный раствор хранили в стеклянной посуде при температуре 2–8 °С.

*Приготовление раствора перекиси водорода 5 ммоль/дм<sup>3</sup>.* Для приготовления раствора 0,035 см<sup>3</sup> раствора перекиси водорода 35% растворяли в дистиллированной воде в колбе на 100 см<sup>3</sup>. Раствор готовили непосредственно перед работой.

*Приготовление раствора соли Мора 2 ммоль/дм<sup>3</sup>.* Для приготовления раствора навеску соль Мора 0,0392 г растворяли в бидистиллированной воде с добавлением 2 см<sup>3</sup> концентрированной серной кислоты в колбе на 50 см<sup>3</sup>. Приготовленный раствор хранили в темной стеклянной посуде при комнатной температуре.

Все растворы, а также растворы, приготовленные для исследования мешающего влияния на аналитический сигнал других АФК, ионов и биологически активных веществ, готовили растворением навесок этих веществ, взвешенных с погрешностью не более 0,0002 г. Более низкие концентрации приготовленных растворов получали последовательным разбавлением этих растворов.

*Приготовление коллоидного золота.* Синтез наночастиц золота, на поверхности которых был впоследствии сформирован самоорганизующийся монослой из 1-ГТ или АЦЦ для исследования образцов методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) проводился согласно методике [119]. 0,01% раствор  $\text{H[AuCl}_4\text{]}$  доводили до кипения, после чего по каплям вводили 1% раствор цитрата натрия до получения коллоида бордового цвета. Полученный коллоидный раствор хранили в холодильнике в темной пластиковой посуде.

*Генерация ОН-радикалов.* Генерация гидроксильных радикалов проводилась двумя методами.

### 1. Реакция Фентона

Первый вариант получения ОН-радикалов предполагал проведение реакции Фентона, реализуемой в биологических системах (формула 1.1). В качестве источника двухвалентного железа выступала соль Мора. Соотношение концентраций  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{Fe}^{2+}$  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 [120].

Для проведения реакции Фентона в ячейку с 10 см<sup>3</sup> фосфатно-буферным раствором (ФБР) рН 6,86 и подготовленным сенсором вносили различные объемы  $\text{Fe}^{2+}$  ( $1 \cdot 10^{-8}$  моль/дм<sup>3</sup> или  $1 \cdot 10^{-6}$  моль/дм<sup>3</sup>) и  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $2 \cdot 10^{-8}$  моль/дм<sup>3</sup> или  $2 \cdot 10^{-6}$  моль/дм<sup>3</sup>) и перемешивали в течение 15 минут. Для построения градуировочной зависимости использовали концентрацию ионов двухвалентного железа, вводимую в реакционную систему.

### 2. Фотохимическое разложение перекиси водорода

Для этого в ячейку с  $10 \text{ см}^3$  ФБР рН 6,86 и подготовленным сенсором вносили различные объемы  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $2 \cdot 10^{-8}$  моль/дм<sup>3</sup> или  $2 \cdot 10^{-6}$  моль/дм<sup>3</sup>) и облучали ультрафиолетовым излучением в течение 15 минут. При построении градуировочной зависимости учитывали, что в результате разложения одной молекулы перекиси водорода ультрафиолетовым излучением образуется две молекулы  $\text{OH}^\bullet$ , из которых только половина будет уходить в раствор [121]:



*Генерация синглетного кислорода.* Генерацию синглетного кислорода для оценки его влияния на аналитический сигнал проводили следующим образом. В ячейку с  $10 \text{ см}^3$  ФБР рН 6,86 и подготовленным сенсором вносили  $0,5 \text{ см}^3$  раствора  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $2 \cdot 10^{-6}$  моль/дм<sup>3</sup>) и добавляли  $0,025 \text{ см}^3$   $\text{NaClO}$  ( $4 \cdot 10^{-5}$  моль/дм<sup>3</sup>) для получения концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{NaClO}$  в ячейке  $1 \cdot 10^{-7}$  моль/дм<sup>3</sup>. Далее проводили перемешивание в течение 15 минут. Концентрацию полученного синглетного кислорода считали равной концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{NaClO}$ .

## 2.2 Приборы и оборудование

*Электрохимические измерения.* Электрохимические измерения, включая импедансную спектроскопию, проводили на потенциостате-гальваностате PalmSens 4 (Palmsens B.V., Нидерланды). Электрохимическая ячейка для определения концентрации  $\text{OH}^\bullet$ -радикалов представляла собой трехэлектродную систему с кварцевым стаканом объемом  $20 \text{ см}^3$ , заполненным фоновым электролитом.

При проведении измерений методом фарадеевского импеданса напряжение постоянного тока  $E_{\text{dc}}$  определялся как равновесный потенциал окислительно-восстановительной пары  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ . Также устанавливали амплитуду напряжения  $E_{\text{ac}} = 0,01 \text{ В}$  и диапазон частот от 0,1 до  $10^5$  Гц. Измерения проводились в  $0,1 \text{ моль/дм}^3$   $\text{KCl}$ , содержащем  $5 \text{ ммоль/дм}^3$   $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ .

Для проведения измерений методом нефарадеевского импеданса устанавливались следующие параметры:  $E_{\text{dc}} = 0,28 \text{ В}$  (что соответствует потенциалу разомкнутой цепи);  $E_{\text{ac}} = 0,01 \text{ В}$ ; диапазон частот от 0,1 до  $10^5$  Гц. Измерения проводились в ФБР (рН = 6,86).

Расчет емкости двойного электрического слоя ( $C_{dl}$ ) проводился по формуле (2.2) [122]:

$$C_{dl} = Q \cdot \omega_{max}^{(n-1)} \quad (2.2)$$

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

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

$n$  – экспоненциальный показатель, обозначающий фазовое отклонение.

Для исследования степени протекания реакции Фентона и реакции разложения перекиси водорода УФ-излучением использовали вольтамперометрический анализатор ТА-Lab (Томьаналит, Россия). Электрохимическая ячейка для определения перекиси водорода представляла собой трехэлектродную систему с кварцевым стаканом объемом 20  $\text{см}^3$ , заполненным фоновым электролитом.

*Электроды.* Рабочим электродом в работе выступал дисковый электрод, представляющий собой полипропиленовый корпус, заполненный графитом, импрегнированным полиэтиленом и парафином под вакуумом (ИГЭ) производства ООО «ЮМХ», Россия. Геометрическая площадь электрода составляет 0,126  $\text{см}^2$ . Перед нанесением модификаторов поверхность электрода механически очищали с помощью фильтровальной бумаги.

В работе электрод сравнения и вспомогательный электрод представляли собой хлоридсеребряные электроды (ХСЭ). ХСЭ состоит из спирали из серебряной проволоки с нанесенным хлоридом серебра и помещенной в полипропиленовый корпус с полупроницаемой мембраной из оксида алюминия. В начале работы корпус электрода необходимо заполнить раствором 1 моль/ $\text{дм}^3$  КСl и оставить на сутки при комнатной температуре для установления равновесного значения потенциала. Перед использованием необходимо ополоснуть электроды бидистиллированной водой. Готовые электроды хранятся при комнатной температуре в стакане с раствором 1 моль/ $\text{дм}^3$  КСl.

*Оборудование для исследования морфологии поверхности сенсоров.* Изучение шероховатости поверхности ИГЭ проводилось на трехмерном

оптическом интерферометре-профилометре New View 6200 (Zygo, США). Параметры шероховатости определялись по ГОСТ 25142-82 с помощью программного обеспечения MetroPro (Zygo, США).

Исследование морфологии поверхности сенсора до и после осаждения золота из раствора золотохлористоводородной кислоты проводилось на сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) JSM-7500FA (Jeol, Япония) с полевой эмиссией при ускоряющем напряжении 10 кВ.

Исследования структуры и элементного состава наночастиц золота с адсорбированными молекулами соединений серы проводили на просвечивающем электронном микроскопе JEM 2100 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 200 кВ. Количественный энергодисперсионный анализ (ЭДС) осуществлялся с помощью безазотного ЭДС детектора INCA Energy (Oxford instruments, Великобритания), установленного на ПЭМ. Были получены карты распределения элементов с нескольких участков размером  $\sim 100 \times 100$  нм, содержащих скопления частиц. Обработка спектров ЭДС проводилась при помощи программы INCA Energy TEM 250, версия 4.15 (Oxford instruments, Великобритания).

*Другое вспомогательное оборудование.* Взвешивание навесок осуществлялось с помощью аналитических весов с дискретностью 0,0001 г ВЛ-124 I специального класса точности (ООО «НПП Госметр», Россия).

Для генерации УФ-излучения применяли ультрафиолетовые лампы марки ДКБУ-11 с длиной волны 254 нм и суммарной мощностью 22 Вт, встроенные в вольтамперометрический анализатор ГА-Lab (Томьаналит, Россия).

Визуальный контроль роста и состояния клеток, а также оптические фотографии клеток проводили и получали на культуральных чашках Петри с помощью инвертированного микроскопа Zeiss AxioVert A1 (Zeiss, Германия).

Для поддержания необходимой температуры при анализе клеточных культур использовали магнитную мешалку с подогревом US-1500D (ULAB, Россия).

Бидистиллированную воду получали на установке БЭ-4 (Ливам, Россия).

### 2.3 Методика модификации электродов органическими соединениями серы

*Методика формирования на поверхности электрода самоорганизующегося монослоя 1-ГТ.* Для формирования самоорганизующегося монослоя 1-ГТ на поверхности электрода ИГЭ предварительно модифицировали золотом (Au/ИГЭ). Нанесение золота на поверхность ИГЭ проводилось электрохимическим способом из раствора  $\text{H[AuCl}_4\text{]}$  ( $50 \text{ мг/дм}^3$ ) в течение 10 мин в диапазоне потенциалов от  $-0,55 \text{ В}$  до  $0,05 \text{ В}$  при скорости развертки  $1 \text{ мВ/с}$ . После нанесения золота проводилась электрополировка поверхности сенсора  $0,05 \text{ моль/дм}^3$  раствором серной кислоты методом ЦВА в диапазоне от  $0$  до  $1,5 \text{ В}$  при скорости развертки  $100 \text{ мВ/с}$  в течение 10 циклов. Для получения самоорганизующегося монослоя 1-ГТ сенсор Au/ИГЭ погружали в спиртовой раствор 1-ГТ с концентрацией  $2 \text{ ммоль/дм}^3$  на 24 часа. Полученный сенсор обозначен как 1-ГТ/Au/ИГЭ.

*Методика формирования на поверхности электрода самоорганизующегося монослоя АЦЦ.* Для формирования самоорганизующегося монослоя АЦЦ на поверхности электрода ИГЭ предварительно модифицировали золотом (Au/ИГЭ). Нанесение золота на поверхность ИГЭ проводилось электрохимическим способом из раствора  $\text{H[AuCl}_4\text{]}$  ( $50 \text{ мг/дм}^3$ ) в течение 10 мин в диапазоне потенциалов от  $-0,55 \text{ В}$  до  $0,05 \text{ В}$  при скорости развертки  $1 \text{ мВ/с}$ . После нанесения золота проводилась электрополировка поверхности сенсора  $0,05 \text{ моль/дм}^3$  раствором серной кислоты методом ЦВА в диапазоне от  $0$  до  $1,5 \text{ В}$  при скорости развертки  $100 \text{ мВ/с}$  в течение 10 циклов. Для получения самоорганизующегося монослоя АЦЦ сенсор Au/ИГЭ погружали в водный раствор АЦЦ с концентрацией  $10 \text{ ммоль/дм}^3$  на 24 часа. Полученный сенсор обозначен как АЦЦ/Au/ИГЭ.

Общая схема приготовления электродов, модифицированных органическими соединениями серы, приведена на рисунке 2.1.

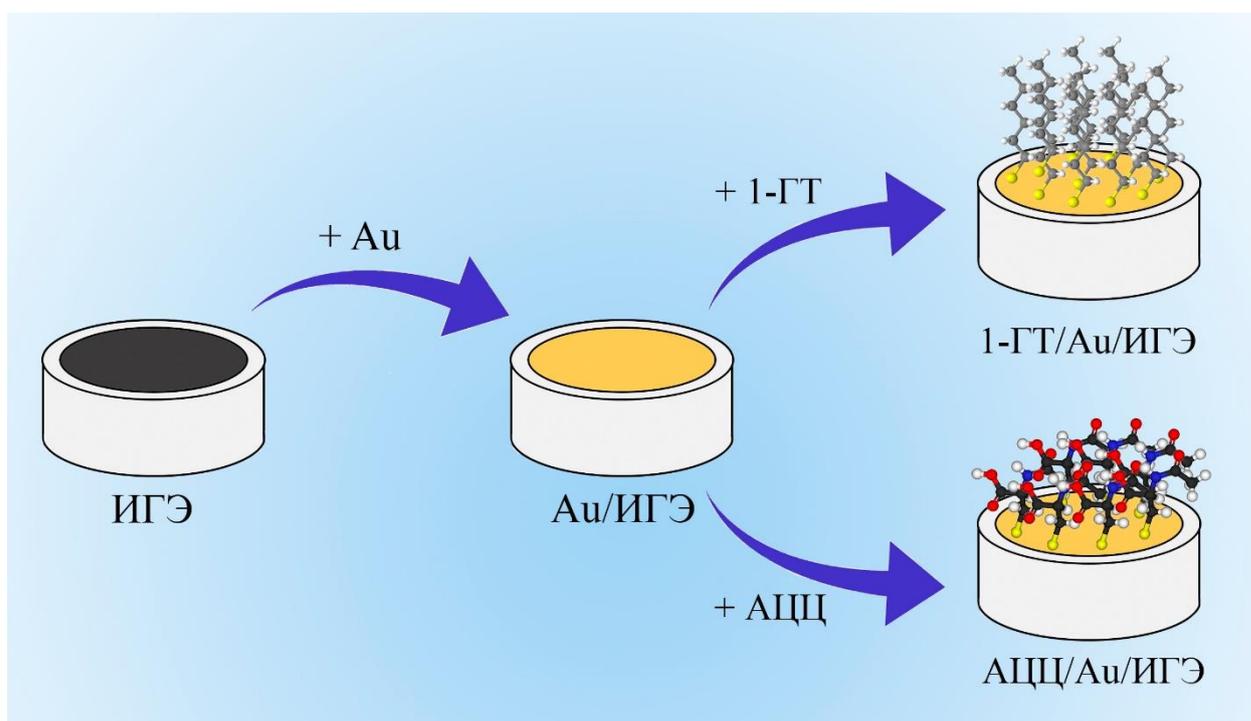


Рисунок 2.1 – Схема модификации электродов органическими соединениями серы; ИГЭ: импрегнированный графитовый электрод, 1-ГТ: 1-гексантиол, АЦЦ: N-ацетил-L-цистеин

Удаление остаточных молекул 1-ГТ или АЦЦ с поверхности электродов после проведения измерений проводилось в 0,1 моль/дм<sup>3</sup> КОН методом вольтамперометрии с линейной разверткой потенциала в диапазоне от –0,5 В до –1,3 В при скорости развертки 100 мВ/с.

#### 2.4 Пробоподготовка клеточных культур

Для определения количества ОН-радикалов, генерируемых живыми клетками, были исследованы клеточные культуры РС-3 (аденокарцинома), А-431 (эпидермоидная карцинома), U-87 (глиобластома) и 3Т3-L1 (эмбриональные фибробласты мыши). Все клеточные культуры выводились в фазу стабильного экспоненциального роста и использовались в экспериментах. Клеточные культуры выращивали в среде DMEM, обогащенной 10% эмбриональной телячьей сывороткой и антибиотиками (смесь 50 ЕД/см<sup>3</sup> пенициллина и 50 мкг/см<sup>3</sup> стрептомицина). Культивирование клеток проводили в инкубаторе при температуре 37 °С, 5% атмосфере СО<sub>2</sub> и 100% влажности. Для выполнения экспериментов по определению ОН-радикалов клетки высевали в чашки Петри ( $d = 35$  мм,  $h = 10$  мм) для культивирования в концентрации 10<sup>5</sup> клеток/см<sup>3</sup>,

инкубировали в течение суток в инкубаторе для достижения прикрепления клеток к субстрату и активного роста и использовали в эксперименте.

## **2.5 Статистическая обработка данных**

Для моделирования импедансных спектров использовалось программное обеспечение PStRace 5.8 (Palmsens B.V., Нидерланды). Моделирование спектров проводилось на основе соотношений Крамерса-Кронига с использованием алгоритма Левенберга-Марквардта. Оценку правильности подобранных эквивалентных схем проводили по двум критериям: относительная погрешность каждого элемента не должна превышать 5%, а критерий хи-квадрат ( $\chi^2$ ) должен быть в пределах  $10^{-3}$  [123].

Оценка метрологических характеристик разработанной методики количественного определения гидроксильных радикалов в клеточных культурах проводилась на основе РМГ 61-2010 «Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки» с использованием программы MS Office Excel 2007 для проведения расчетов.

Статистическая обработка линейных и экспоненциальных зависимостей проводилась с использованием программного обеспечения OriginPro 2023.

## ГЛАВА 3 ВЛИЯНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ СЕРЫ НА АНАЛИТИЧЕСКИЙ СИГНАЛ ГИДРОКСИЛЬНЫХ РАДИКАЛОВ

### 3.1 Влияние модификатора и параметров регистрации на определение гидроксильных радикалов

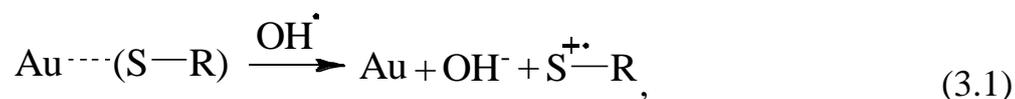
Как было показано в разделе 1.4.4, в качестве электрохимических сенсоров для количественного определения  $\text{OH}^\bullet$  в клеточных культурах в основном используются электроды, модифицированные органическими соединениями серы, поскольку данные вещества могут быть окислены  $\text{OH}$ -радикалами, что приводит к появлению аналитического сигнала. В связи с этим в работе предложено использовать два органических серосодержащих соединения в качестве модификаторов: 1-гексантиол (1-ГТ) и N-ацетил-L-цистеин (АЦЦ). Оба вещества демонстрируют высокие константы скорости реакции с  $\text{OH}$ -радикалами:  $\sim 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$  для 1-ГТ [81] и  $1,36 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$  для АЦЦ [124], что на несколько порядков выше, чем константы скорости их реакций с другими активными формами кислорода. Этот факт позволяет выдвинуть предположение, что разработанные сенсоры будут обладать высокой селективностью и чувствительностью.

В качестве материала-субстрата разрабатываемых сенсоров предложено использовать графит, импрегнированный полиэтиленом и парафином под вакуумом. Использование графитового материала в качестве подложки для сенсора обусловлено несколькими причинами. Во-первых, с точки зрения электрохимических характеристик этот материал легко поляризуется и позволяет проводить измерения в широком диапазоне потенциалов. Во-вторых, он удобен в работе, легко модифицируется и регенерируется, а также может применяться для многократных измерений. Для образования самоорганизующихся монослоев 1-ГТ и АЦЦ на поверхности графитовых электродов необходимо предварительно модифицировать поверхность рабочих электродов электрохимически осажденным золотом, поскольку органические соединения серы образуют стабильные ковалентные связи с золотом [118]. Окисление данных веществ  $\text{OH}$ -радикалами

приводит к разрушению монослоя на поверхности сенсора, которое пропорционально концентрации  $\text{OH}^\bullet$  и может быть зарегистрировано методом электрохимической импедансной спектроскопии.

Метод нефарадеевского импеданса имеет большие перспективы при оценке степени разрушения СОМ  $\text{OH}$ -радикалами по сравнению с методом фарадеевского импеданса. Поскольку при проведении измерений методом фарадеевского импеданса требуется использование окислительно-восстановительной метки, которая может оказывать мешающее влияние на СОМ, для получения аналитического сигнала в качестве фонового электролита использовали ФБР рН 6,86, а измерения проводили методом нефарадеевского импеданса, для которого 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 2.2.

Разрушение самоорганизующегося монослоя гидроксильными радикалами основано на следующем процессе. Взаимодействие  $\text{OH}$ -радикалов с различными веществами основано на трех типах реакций: перенос электрона, отщепление водорода и электрофильное присоединение к ненасыщенным связям. При этом из всех реакций отщепление водорода протекает наиболее медленно.  $\text{OH}^\bullet$  является электрофилом, соответственно, имеет сильное сродство к богатым электронами участкам молекул, таким как ароматические или серосодержащие молекулы [125]. Таким образом, можно ожидать, что взаимодействие  $\text{OH}$ -радикалов с 1-ГТ и АЦЦ будет протекать через атом серы. Предполагаемая реакция воздействия  $\text{OH}^\bullet$  на СОМ представлена на схеме (3.1):



после чего образовавшийся катион-радикал серы диффундирует в раствор.

Для регистрации аналитического сигнала и подтверждения его формирования за счет органических соединений серы были получены импедансные спектры для электродов ИГЭ, Au/ИГЭ и 1-ГТ/Au/ИГЭ в ФБР pH 6,86 до и после генерации ОН-радикалов с помощью реакции Фентона (начальные концентрации ионов железа(II) и пероксида водорода равны  $1 \cdot 10^{-9}$  моль/дм<sup>3</sup> и  $2 \cdot 10^{-9}$  моль/дм<sup>3</sup> соответственно), а также для АЦЦ/Au/ИГЭ при тех же условиях и генерации ОН-радикалов с помощью реакции фотохимического разложения пероксида водорода (начальная концентрация пероксида водорода  $1 \cdot 10^{-9}$  моль/дм<sup>3</sup>). Полученные импедансные спектры приведены на рисунке 3.1.

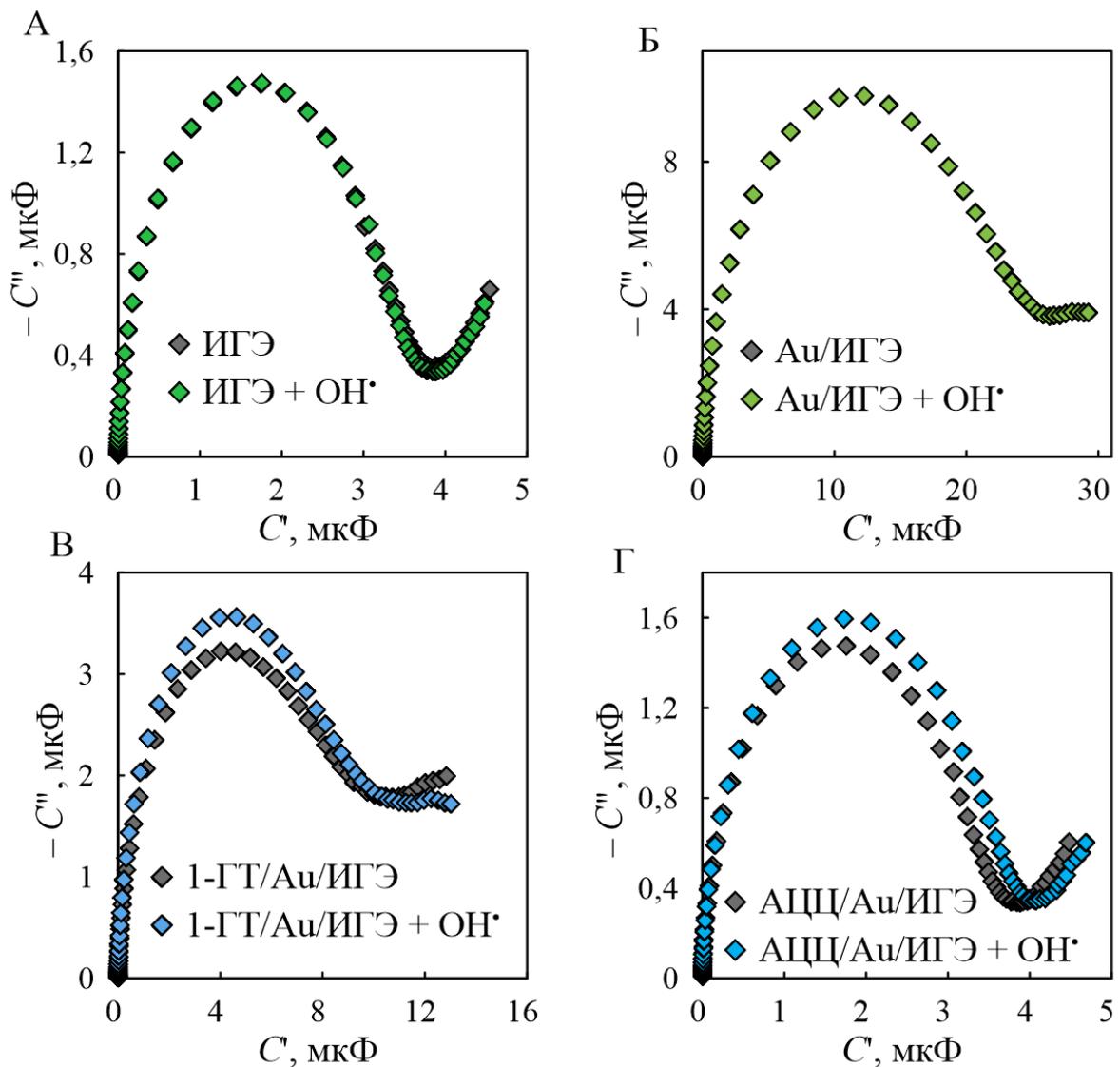


Рисунок 3.1 – Импедансные спектры до и после генерации ОН-радикалов с помощью реакции Фентона, полученные для электродов ИГЭ (А), Au/ИГЭ (Б) и 1-ГТ/Au/ИГЭ (В), а также с помощью реакции фотохимического разложения пероксида водорода для электрода АЦЦ/Au/ИГЭ (Г)

За аналитический сигнал в данном способе измерений принимается разница емкости ДЭС при генерации  $\text{OH}^{\bullet}$  и емкости ДЭС фона ( $\Delta C = C - C_0$ ). Как видно из рисунка 3.1, при использовании электродов ИГЭ и Au/ИГЭ емкость ДЭС при воздействии  $\text{OH}$ -радикалов практически не изменяется ( $\Delta C_{\text{ИГЭ}} = 0,015$  мкФ;  $\Delta C_{\text{Au/ИГЭ}} = 0,006$  мкФ). Однако после адсорбции органических соединений серы наблюдается значительное увеличение емкости после воздействия  $\text{OH}$ -радикалов ( $\Delta C_{\text{1-ГТ/Au/ИГЭ}} = 0,848$  мкФ;  $\Delta C_{\text{АЦЦ/Au/ИГЭ}} = 0,329$  мкФ). Полученные данные подтверждают ключевую роль органических соединений серы в формировании аналитического сигнала за счет их десорбции при воздействии гидроксильных радикалов. При этом стоит отметить, что для сенсора АЦЦ/Au/ИГЭ существует вероятность мешающего влияния со стороны ионов железа(II) на адсорбированный слой молекул АЦЦ, в связи с чем использование реакции фотохимического разложения пероксида водорода кажется более оправданным.

При генерации  $\text{OH}$ -радикалов в модельной системе существует вероятность неполного перехода реагирующих веществ в продукты. Для определения степени протекания реакции Фентона (формула 1.1) и реакции фотохимического разложения пероксида водорода (формула 2.1) было проведено определение перекиси водорода методом катодной вольтамперометрии с помощью электрода Au/ИГЭ. Пероксид водорода восстанавливается на электроде, модифицированном золотом, при потенциале  $-0,4$  В [126]. Данный подход позволяет проводить количественное определение  $\text{H}_2\text{O}_2$  в диапазоне от  $1 \cdot 10^{-12}$  до  $1 \cdot 10^{-5}$  моль/дм<sup>3</sup>. Таким образом, данный способ был применен для проверки степени конверсии пероксида водорода в реакциях Фентона и фотохимического разложения  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Для устранения мешающего влияния растворенного кислорода измерения проводили в ФБР при барботировании газообразным азотом. Измерения проводили в диапазоне потенциалов от  $0,2$  В до  $-0,65$  В при скорости развертки  $100$  мВ/с. Полученные вольтамперограммы приведены на рисунке 3.2.

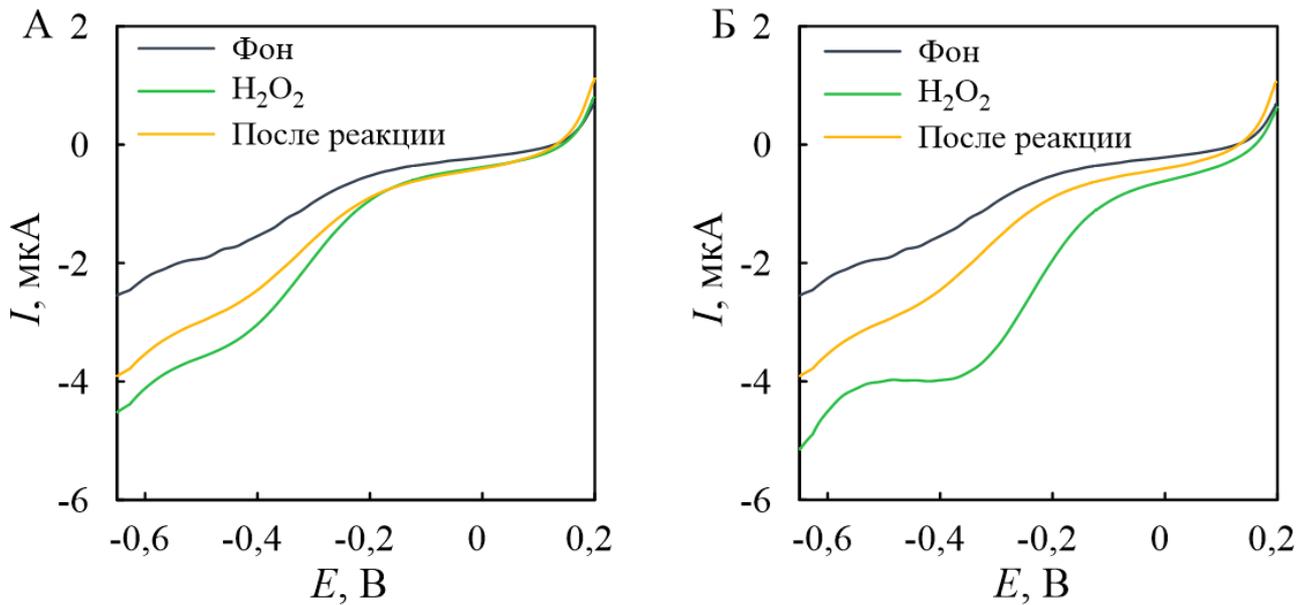


Рисунок 3.2 – Определение степени протекания реакции Фентона (А) и реакции фотохимического разложения пероксида водорода (Б)

Как видно из рисунка, до внесения перекиси водорода на вольтамперограммах отсутствуют пики, однако после внесения  $1 \cdot 10^{-7}$  моль/дм<sup>3</sup> наблюдается пик восстановления  $\text{H}_2\text{O}_2$  при  $-0,37$  В. При этом после внесения железа (рисунок 3.1А) или при воздействии УФ-излучения (рисунок 3.1Б) пик восстановления пероксида водорода исчезает, а полученные вольтамперограммы сопоставимы с фоновыми кривыми. Полученные данные подтверждают, что реакция Фентона и реакция фотохимического разложения  $\text{H}_2\text{O}_2$  протекают полностью.

При генерации ОН-радикалов с помощью реакции Фентона в системе могут протекать побочные реакции. Полная схема реакции Фентона приведена в таблице 3.1.

Таблица 3.1 – Стадии реакции Фентона [127]

Номер реакции	Схема реакции	Константа скорости, рН 4 ( $\text{M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ )
1	$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^\bullet + \text{OH}^-$	70
2	$\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{HO}_2^\bullet/\text{O}_2^{\bullet-} + \text{H}^+$	$2,50 \cdot 10^{-3}$
3	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{OH}^\bullet \rightarrow \text{HO}_2^\bullet/\text{O}_2^{\bullet-} + \text{H}_2\text{O}$	$3,30 \cdot 10^7$
4	$\text{Fe}^{3+} + \text{HO}_2^\bullet/\text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2 + \text{H}^+$	$6,48 \cdot 10^6$
5	$\text{Fe}^{2+} + \text{OH}^\bullet \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^-$	$3,20 \cdot 10^8$
6	$\text{Fe}^{2+} + \text{HO}_2^\bullet/\text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}_2$	$2,40 \cdot 10^6$

Продолжение таблицы 3.1

Номер реакции	Схема реакции	Константа скорости, рН 4 ( $M^{-1} \cdot c^{-1}$ )
7	$HO_2^{\bullet}/O_2^{\bullet-} + HO_2^{\bullet}/O_2^{\bullet-} \rightarrow H_2O_2 + O_2$	$1,40 \cdot 10^7$
8	$OH^{\bullet} + HO_2^{\bullet}/O_2^{\bullet-} \rightarrow H_2O + O_2$	$7,51 \cdot 10^9$
9	$OH^{\bullet} + OH^{\bullet} \rightarrow H_2O_2$	$5,20 \cdot 10^9$

Как видно из таблицы 3.1, зарождение цепной реакции происходит по схеме 1, а обрыв цепи происходит в результате реакции 5. При этом в ходе реакции могут образовываться и другие активные формы кислорода, такие как гидропероксильный радикал и супероксид-анион радикал, однако 1-ГТ не будет вступать в реакцию с этими АФК [81]. Реакции 2 и 4 в основном протекают в кислых средах, в связи с чем при рН 6,86 они менее вероятны, однако реакция 3 характеризуется высокой константой скорости и не зависит от рН, ввиду чего она также возможна при данных условиях. Влияние других АФК на аналитический сигнал маловероятно ввиду протекания быстрых реакций 6 и 7, однако реакция 8 может повлиять на конечную концентрацию ОН-радикалов в растворе. Протекание реакции 9 также способствует уменьшению концентрации гидроксильных радикалов. Помимо реакции взаимодействия двухвалентного железа и перекиси водорода,  $Fe^{2+}$  может окисляться до  $Fe^{3+}$  растворенным кислородом, однако при кислых и нейтральных рН эта реакция протекает очень медленно, и ей можно пренебречь [128].

Наличие побочных процессов при протекании реакции Фентона не позволяет утверждать, что в данной реакции выход ОН-радикалов равен 100%. Это предположение подтверждают литературные данные [129,130], указывающие на то, что выход гидроксильных радикалов может варьироваться от 40% до 130% в зависимости от соотношения начальных концентраций  $Fe^{2+}$  и  $H_2O_2$ , а также рН среды. Таким образом, при использовании реакции Фентона для генерации ОН-радикалов целесообразнее указывать исходную концентрацию ионов железа(II), вводимую в реакционную смесь.

Для подтверждения, что компоненты реакции Фентона не влияют на аналитический сигнал, были зарегистрированы импедансные спектры при внесении железа(II) и перекиси водорода по отдельности, а также двух

компонентов вместе для генерации ОН-радикалов при концентрации ионов  $\text{Fe}^{2+}$   $1 \cdot 10^{-9}$  моль/дм<sup>3</sup> с использованием сенсора 1-ГТ/Ау/ИГЭ (рисунок 3.3).

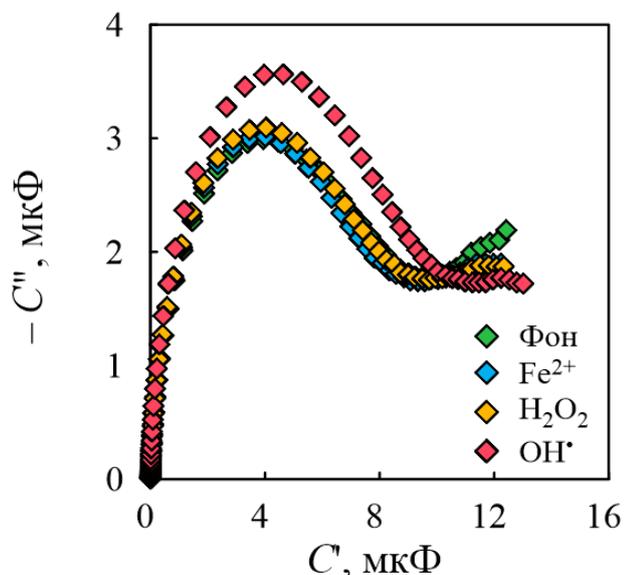


Рисунок 3.3 – Регистрация аналитического сигнала от ОН-радикалов ( $C_{\text{Fe}^{2+}} = 1 \cdot 10^{-9}$  моль/дм<sup>3</sup>) с помощью 1-ГТ/Ау/ИГЭ методом нефарадеевского импеданса

При моделировании полученных спектров было определено, что  $\Delta C_{\text{Fe}^{2+}} = 0,002$  мкФ,  $\Delta C_{\text{H}_2\text{O}_2} = 0,041$  мкФ,  $\Delta C_{\text{ОН}\cdot} = 0,847$  мкФ. Данные оценки мешающего влияния компонентов реакции на аналитический сигнал по  $t$ -критерию [131] приведены в таблице 3.2.

Таблица 3.2 – Оценка влияния компонентов реакции Фентона на аналитический сигнал методом нефарадеевского импеданса ( $P = 0,95$ ;  $n = 3$ )

Компонент реакции	$t_{\text{эксп}}$	$t_{\text{табл}}$
$\text{Fe}^{2+}$	0,533	4,303
$\text{H}_2\text{O}_2$	0,354	
$\text{ОН}\cdot$	8,354	

Как видно из таблицы 3.2, изменения емкости, наблюдаемые при внесении реагентов Фентона по отдельности, не являются значимыми, поскольку значения критерия Стьюдента ниже критического, в то время как их совместное внесение приводит к значимому изменению емкости. Эти данные указывают на то, что аналитический сигнал получен только от  $\text{ОН}\cdot$ , в то время как реагенты не оказывают влияния на разрушение СОМ.

Измерения, осуществляемые с помощью сенсора АЦЦ/Ау/ИГЭ, следует проводить в среде без посторонних ионов, поскольку они могут оказывать

существенное влияние на СОМ ввиду наличия атомов азота и кислорода в молекуле АЦЦ. В связи с этим необходимо исключить влияние ионов железа(II) при генерации ОН-радикалов. Это возможно при продуцировании ОН<sup>•</sup> в реакции разложения перекиси водорода под действием УФ-излучения (формула 2.1).

Особенность реакции фотохимического разложения перекиси водорода заключается в возможности точно рассчитать концентрацию ОН-радикалов, продуцируемых в процессе реакции. При этом отсутствие ионов железа в реакции позволяет избежать некоторых подобных реакций, представленных в таблице 3.1. Основные реакции, протекающие при генерации ОН<sup>•</sup> в процессе фотохимического разложения H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, приведены в таблице 3.3.

Таблица 3.3 – Стадии реакции фотохимического разложения пероксида водорода [132,133]

Номер реакции	Схема реакции	Характеристика реакции
1	$\text{H}_2\text{O}_2 + h\nu_{254 \text{ нм}} \rightarrow 2\text{OH}^\bullet$	$\phi_{\text{H}_2\text{O}_2} \approx 0,5; \phi_{\text{OH}^\bullet} \approx 1,0$
2	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{OH}^\bullet \rightarrow \text{HO}_2^\bullet + \text{H}_2\text{O}$	$k = 2,7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$
3	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{HO}_2^\bullet \rightarrow \text{OH}^\bullet + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$	$k = 5,3 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$
4	$\text{OH}^\bullet + \text{OH}^\bullet \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$	$k = 5,20 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$
5	$\text{HO}_2^\bullet + \text{HO}_2^\bullet \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$	$k = 8,3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$
6	$\text{OH}^\bullet + \text{HO}_2^\bullet \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$	$k = 6,0 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$

Как видно из таблицы 3.3, зарождение цепи протекает по реакции 1, а обрыв цепи происходит в результате реакций 4–6. Единственным побочным продуктом, образующимся в данном процессе, является гидропероксильный радикал, однако АЦЦ не вступает во взаимодействие с этим компонентом [134]. При этом растворенный кислород не будет оказывать мешающего влияния при данной длине волны, поскольку его превращение в озон возможно только при УФ-излучении с длиной волны 185 нм [135].

Важной характеристикой фотохимической реакции являются такие параметры, как первичный квантовый выход ( $\phi$ ) и общий квантовый выход ( $\Phi$ ). Первичный квантовый выход ( $\phi$ ) – это отношение числа фотозобужденных молекул, подвергшихся химическому превращению в первичной фотохимической стадии, к числу квантов света, поглощенных реакционной системой. Общий квантовый выход ( $\Phi$ ) – это отношение числа молекул образовавшегося продукта

или израсходованного реагента к числу квантов света, поглощенных реакционной системой. Для реакции 1 таблицы 3.3 было определено, что первичный квантовый выход перекиси водорода  $\Phi_{\text{H}_2\text{O}_2}$  приблизительно равен 0,5, в то время как общий квантовый выход  $\Phi_{\text{H}_2\text{O}_2}$  равен единице и не зависит от длины волны возбуждения, интенсивности излучения и начальной концентрации перекиси водорода. При этом первичный квантовый выход гидроксильных радикалов  $\Phi_{\text{OH}\cdot}$  также приблизительно равен единице, однако может изменяться в зависимости от длины волны возбуждения [133]. Такое значение  $\Phi_{\text{OH}\cdot}$  объясняется тем, что одна молекула  $\text{H}_2\text{O}_2$  в возбужденном состоянии быстро распадается на две молекулы  $\text{OH}\cdot$ , которые могут подвергнуться первичной рекомбинации в окружении молекул растворителя. Этот процесс протекает со скоростью, сопоставимой со скоростью диффузии ( $\sim 10^{-9}$  с), в результате чего только половина генерируемых  $\text{OH}\cdot$ -радикалов способна участвовать в химических реакциях в водном растворе [133]. Таким образом, концентрация  $\text{OH}\cdot$ -радикалов, генерируемых в процессе фотохимического разложения перекиси водорода, будет равна концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$ , вносимой в ячейку.

Для подтверждения, что компоненты реакции фотохимического разложения пероксида водорода не влияют на аналитический сигнал, были зарегистрированы импедансные спектры при воздействии на сенсор АЦЦ/Au/ИГЭ перекиси водорода и УФ-излучения по отдельности, а также вместе для генерации  $\text{OH}\cdot$ -радикалов в концентрации  $1 \cdot 10^{-9}$  моль/дм<sup>3</sup>. Полученные импедансные спектры представлены на рисунке 3.4.

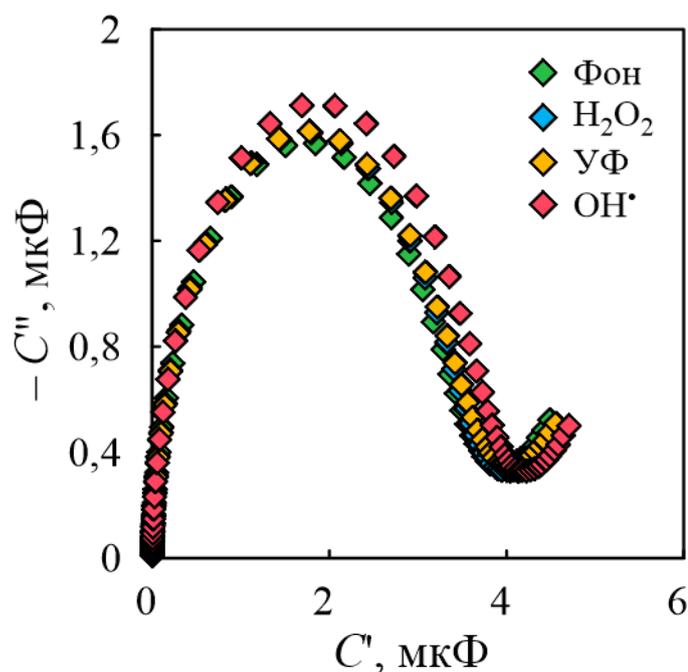


Рисунок 3.4 – Регистрация аналитического сигнала от  $\text{OH}$ -радикалов ( $10^{-9}$  моль/дм<sup>3</sup>) с помощью АЦЦ/Au/ИГЭ методом нефарадеевского импеданса

При моделировании полученных спектров было определено, что  $\Delta C_{\text{H}_2\text{O}_2} = 0,007$  мкФ,  $\Delta C_{\text{УФ}} = 0,065$  мкФ,  $\Delta C_{\text{ОН}\cdot} = 0,359$  мкФ. Данные оценки мешающего влияния компонентов реакции на аналитический сигнал по  $t$ -критерию приведены в таблице 3.4.

Таблица 3.4 – Оценка влияния компонентов реакции разложения перекиси водорода на аналитический сигнал методом нефарадеевского импеданса ( $P = 0,95$ ;  $n = 3$ )

Компонент реакции	$t_{\text{эксп}}$	$t_{\text{табл}}$
$\text{H}_2\text{O}_2$	1,205	4,303
УФ-излучение	3,294	
$\text{ОН}\cdot$	27,592	

Как видно из таблицы 3.4, изменения емкости, наблюдаемые для компонентов реакции по отдельности, не являются значимыми ( $t_{\text{эксп}} < t_{\text{табл}}$ ), в то время как их совместное внесение приводит к значимому изменению емкости. Эти данные указывают на то, что аналитический сигнал получен только от  $\text{ОН}\cdot$ , в то время как компоненты реакции не оказывают влияния на разрушение СОМ.

Таким образом, продемонстрированные подходы являются перспективными для дальнейших аналитических исследований по определению гидроксильных радикалов. Оба сенсора демонстрируют хороший аналитический отклик при

воздействии достаточно низких концентраций ОН-радикалов, в связи с чем для каждого варианта необходимо провести оценку поверхности сенсоров различными физико-химическими методами, подобрать рабочие условия регистрации аналитического сигнала и построить градуировочные зависимости.

### 3.2 Исследование свойств поверхности сенсоров различными физико-химическими методами

#### 3.2.1 Исследование токопроводящих свойств модифицированного электрода

Исследование токопроводящих свойств ИГЭ и его модификаций проводилось методом ЦВА с использованием окислительно-восстановительной метки  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ . Регистрацию циклических вольтамперограмм проводили в диапазоне потенциалов от  $-0,3$  В до  $0,8$  В при скорости развертки  $100$  мВ/с. Полученные ЦВА представлены на рисунке 3.5.

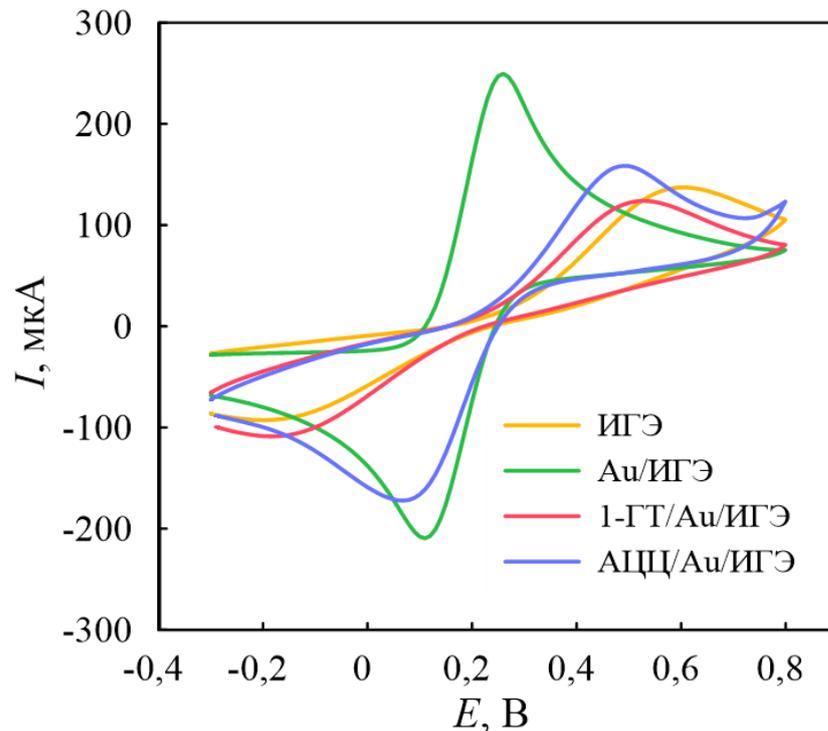


Рисунок 3.5 – Циклические вольтамперограммы ИГЭ, Au/ИГЭ, 1-ГТ/Au/ИГЭ и АЦЦ/Au/ИГЭ в  $0,1$  моль/дм<sup>3</sup> КСl, содержащем  $5$  ммоль/дм<sup>3</sup>  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$

Для немодифицированного ИГЭ характерно наличие слабо выраженных, далеко отстоящих друг от друга окислительно-восстановительных пиков, что указывает на низкие токопроводящие свойства поверхности. 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 [136]. В связи с этим происходит заметное уменьшение окислительно-восстановительных пиков. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о закреплении серосодержащих соединений на поверхности Au/ИГЭ.

Для расчета электроактивной площади поверхности ИГЭ и его модификаций необходимо определить характер электродного процесса, протекающего при окислении или восстановлении иона гексацианоферрата. Для этого были записаны циклические вольтамперограммы при скоростях развертки от 0,01 до 0,2 В/с. Оценка электродного процесса проводилась по следующим критериям обратимости.

1. Токи катодного и анодного пиков для обратимого процесса практически одинаковы по величине (формула 3.2):

$$\frac{I_{\text{па}}}{I_{\text{пк}}} = 1 \quad (3.2)$$

2. Потенциалы пиков сдвинуты друг относительно друга на  $0,057/n$  В (формула 3.3):

$$\Delta E_{\text{п}} = E_{\text{па}} - E_{\text{пк}} = \frac{0,057}{n}, \text{ В} \quad (3.3)$$

При этом разность между анодным и катодным пиком ( $\Delta E_{\text{п}}$ ) не должна изменяться при изменении скорости развертки потенциала.

3. Ток пика ( $I_{\text{п}}$ ) окисления или восстановления пропорционален квадратному корню из скорости развертки потенциала ( $\sqrt{v}$ ). Данный критерий не является однозначным, поскольку не позволяет отличить обратимый и необратимый процессы [137].

4. Зависимость потенциала пика ( $E_{\text{п}}$ ) окисления или восстановления от натурального логарифма квадратного корня из скорости развертки потенциала ( $\ln\sqrt{v}$ ) нелинейна [138].

В таблице 3.5 приведены результаты для оценки электродного процесса по критериям 1 и 2 для ИГЭ.

Таблица 3.5 – Оценка характера электродного процесса для ИГЭ

Скорость развертки (В/с)	$\frac{I_{\text{па}}}{I_{\text{пк}}}$	$\Delta E_{\text{п}}$ (В)
0,01	0,985	0,649
0,025	1,17	0,779
0,04	1,21	0,829
0,055	1,25	0,849
0,07	1,30	0,879
0,085	1,34	0,899
0,1	1,37	0,919
0,115	1,40	0,939
0,13	1,43	0,959
0,145	1,48	0,969
0,16	1,50	0,979
0,175	1,52	0,999
0,19	1,55	1,01
0,2	1,57	1,01

Как видно из таблицы 3.5, токи анодного и катодного пиков практически одинаковы по величине, однако разница между анодным и катодным пиком намного превышает 0,057 В и увеличивается со скоростью развертки. Таким образом, процесс окисления и восстановления иона гексацианоферрата на ИГЭ может быть как обратимым, так и необратимым.

В таблице 3.6 приведены результаты для оценки электродного процесса по критериям 1 и 2 для Au/ИГЭ.

Таблица 3.6 – Оценка характера электродного процесса для Au/ИГЭ

Скорость развертки (В/с)	$\frac{I_{\text{па}}}{I_{\text{пк}}}$	$\Delta E_{\text{п}}$ (В)
0,01	1,07	0,120
0,025	1,14	0,140
0,04	1,18	0,170
0,055	1,22	0,190
0,07	1,27	0,190
0,085	1,31	0,210
0,1	1,32	0,230
0,115	1,35	0,270
0,13	1,39	0,270

Продолжение таблицы 3.6

Скорость развертки (В/с)	$\frac{I_{па}}{I_{пк}}$	$\Delta E_{п}$ (В)
0,145	1,42	0,290
0,16	1,42	0,290
0,175	1,44	0,300
0,19	1,47	0,330
0,2	1,47	0,330

Как видно из таблицы 3.6, токи анодного и катодного пиков практически одинаковы по величине, однако разница между анодным и катодным пиком намного превышает 0,057 В и увеличивается со скоростью развертки. Таким образом, процесс окисления и восстановления иона гексацианоферрата на Au/ИГЭ может быть как обратимым, так и необратимым.

В таблице 3.7 приведены результаты для оценки электродного процесса по критериям 1 и 2 для 1-ГТ/Au/ИГЭ.

Таблица 3.7 – Оценка характера электродного процесса для 1-ГТ/Au/ИГЭ

Скорость развертки (В/с)	$\frac{I_{па}}{I_{пк}}$	$\Delta E_{п}$ (В)
0,01	0,981	0,460
0,025	0,990	0,550
0,04	1,00	0,590
0,055	1,01	0,610
0,07	1,05	0,640
0,085	1,09	0,660
0,1	1,12	0,680
0,115	1,16	0,700
0,13	1,20	0,720
0,145	1,25	0,740
0,16	1,27	0,750
0,175	1,30	0,760
0,19	1,33	0,780
0,2	1,35	0,780

Как видно из таблицы 3.7, токи анодного и катодного пиков практически одинаковы по величине, однако разница между анодным и катодным пиком намного превышает 0,057 В и увеличивается со скоростью развертки. Таким образом, процесс окисления и восстановления иона гексацианоферрата на 1-ГТ/Au/ИГЭ может быть как обратимым, так и необратимым.

В таблице 3.8 приведены результаты для оценки электродного процесса по критериям 1 и 2 для АЦЦ/Аu/ИГЭ.

Таблица 3.8 – Оценка характера электродного процесса для АЦЦ/Аu/ИГЭ

Скорость развертки (В/с)	$\frac{I_{\text{па}}}{I_{\text{пк}}}$	$\Delta E_{\text{п}}$ (В)
0,01	0,987	0,225
0,025	1,13	0,335
0,04	1,15	0,380
0,055	1,19	0,405
0,07	1,24	0,435
0,085	1,29	0,455
0,1	1,31	0,475
0,115	1,35	0,495
0,13	1,39	0,515
0,145	1,41	0,525
0,16	1,44	0,535
0,175	1,48	0,555
0,19	1,51	0,575
0,2	1,55	0,575

Как видно из таблицы 3.8, токи анодного и катодного пиков практически одинаковы по величине, однако разница между анодным и катодным пиком намного превышает 0,057 В и увеличивается со скоростью развертки. Таким образом, процесс окисления и восстановления иона гексацианоферрата на АЦЦ/Аu/ИГЭ может быть как обратимым, так и необратимым.

На рисунке 3.6 представлена зависимость анодного и катодного токов от квадратного корня из скорости развертки для ИГЭ, Аu/ИГЭ, 1-ГТ/Аu/ИГЭ и АЦЦ/Аu/ИГЭ.

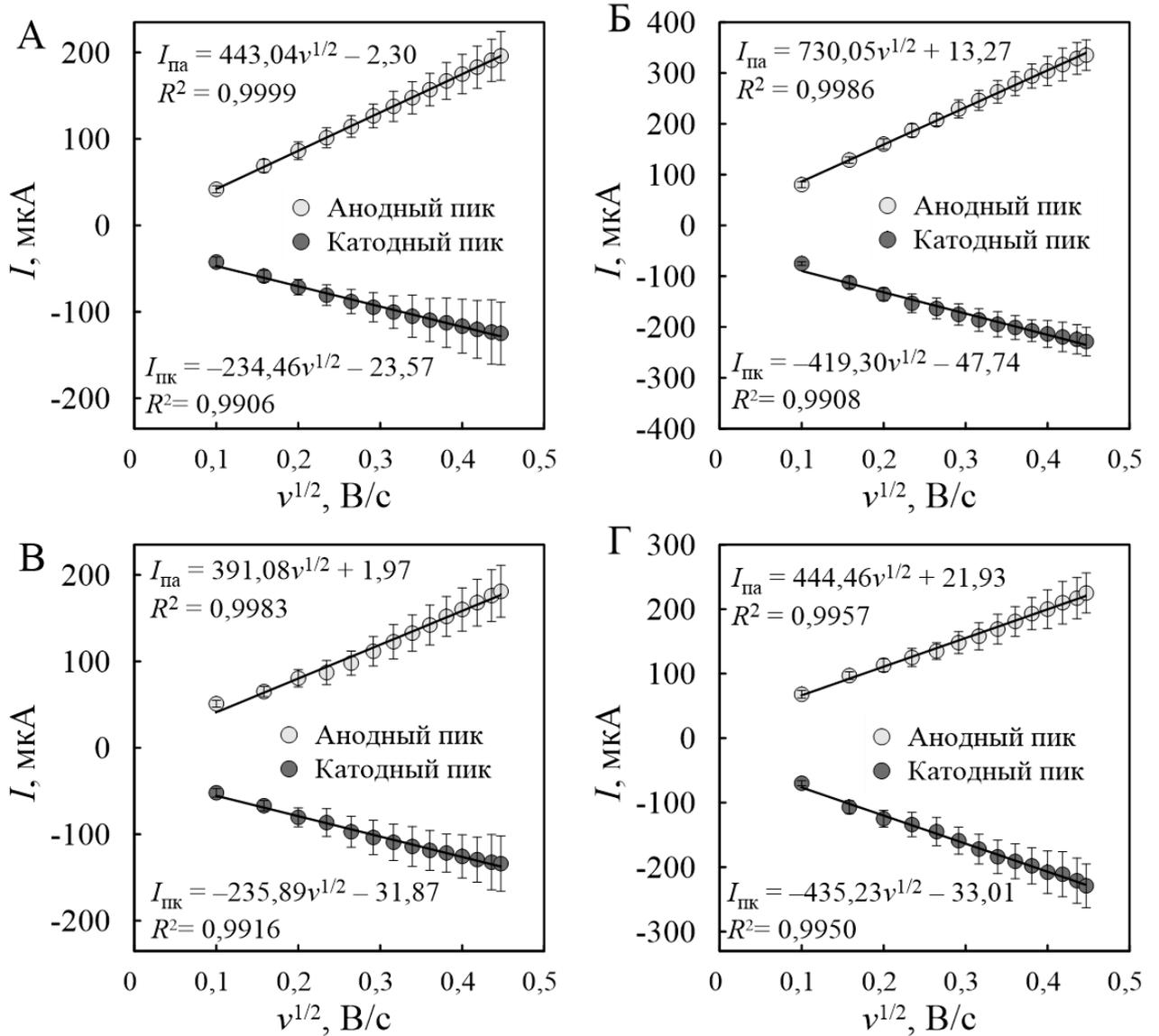


Рисунок 3.6 – Зависимость анодного и катодного токов от квадратного корня из скорости развертки для ИГЭ (А), Au/ИГЭ (Б), 1-ГТ/Au/ИГЭ (В) и АЦЦ/Au/ИГЭ (Г)

Как видно из рисунка 3.6, все зависимости являются линейными, что исключает квазиобратимый характер процесса окисления или восстановления иона гексацианоферрата.

На рисунке 3.7 представлена зависимость потенциала пика окисления или восстановления от натурального логарифма квадратного корня из скорости развертки потенциала для ИГЭ, Au/ИГЭ, 1-ГТ/Au/ИГЭ и АЦЦ/Au/ИГЭ.

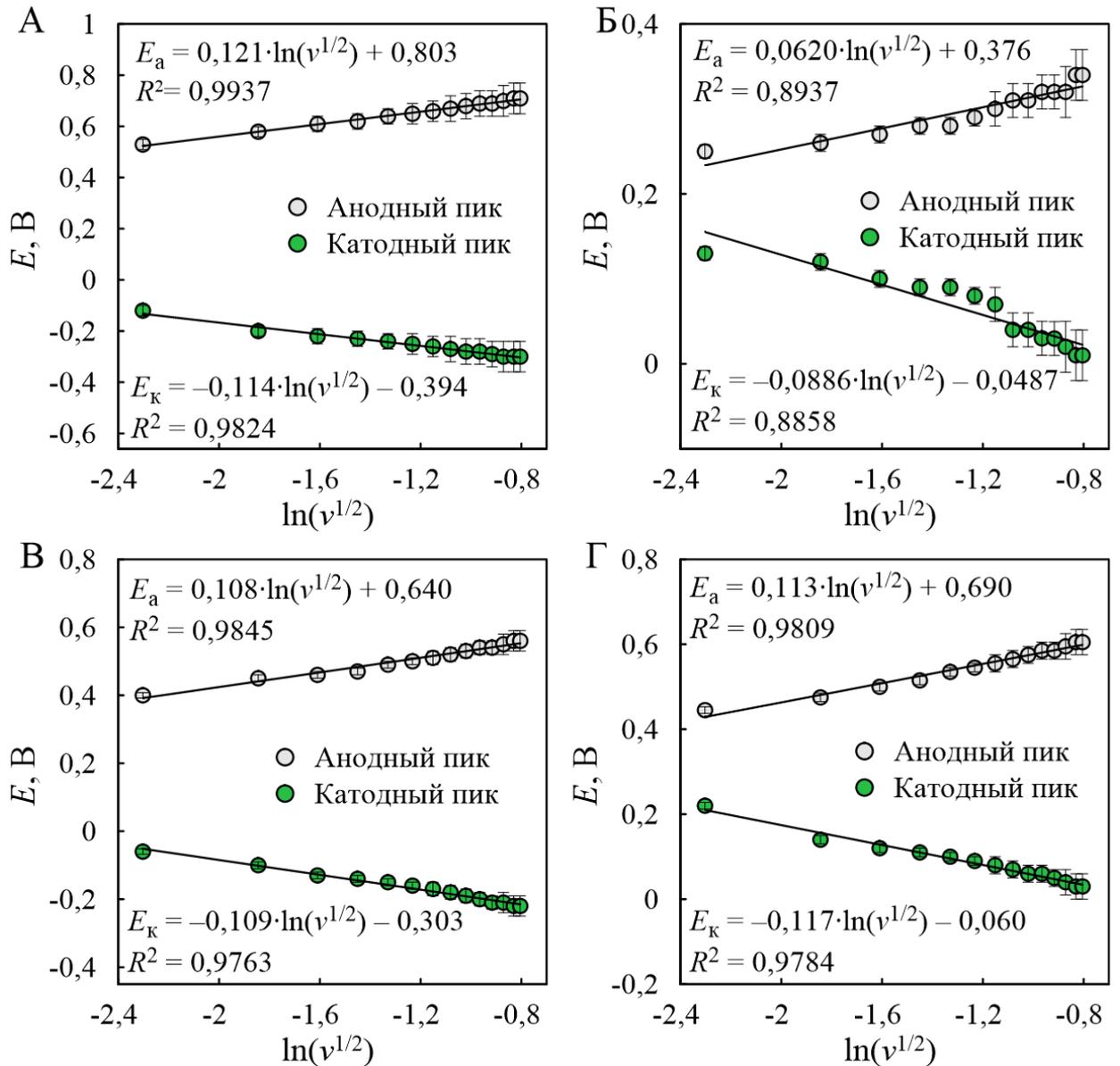


Рисунок 3.7 – Зависимость потенциала пика окисления или восстановления от натурального логарифма квадратного корня из скорости развертки для ИГЭ (А), Au/ИГЭ (Б), 1-ГТ/Au/ИГЭ (В) и АЦЦ/Au/ИГЭ (Г)

Как видно из рисунка 3.7, зависимость является нелинейной только для процессов окисления и восстановления на Au/ИГЭ, в то время как остальные графики показывают высокую степень линейности. Таким образом, можно сделать вывод, что процессы окисления и восстановления иона гексацианоферрата являются обратимыми только для электрода Au/ИГЭ, в то время как на других электродах они необратимы. Данный вывод объясняется тем, что нанесенный слой модификатора в виде органических соединений серы

замедляет собственно электрохимическую стадию переноса электрона на поверхности электрода, делая ее лимитирующей.

Исходя из полученных данных, для расчета электроактивной площади поверхности Au/ИГЭ можно использовать уравнение Рэндлса-Шевчика для обратимого процесса (формула 3.4) [139]:

$$I_p = 2,69 \cdot 10^5 \cdot A \cdot n^{3/2} \cdot D^{1/2} \cdot v^{1/2} \cdot C, \quad (3.4)$$

где  $I_p$  – сила тока катодного или анодного пика, А;

$A$  – электроактивная площадь, см<sup>2</sup>;

$n$  – число электронов, переносимых в процессе электродной реакции  
( $n = 1$ );

$D$  – коэффициент диффузии, см<sup>2</sup>/с ( $D_{Ox} = 7,63 \cdot 10^{-6}$  см<sup>2</sup>/с [140]);

$v$  – скорость развертки потенциала, В/с ( $v = 0,1$  В/с);

$C$  – концентрация электролита, моль/см<sup>3</sup> ( $C = 5 \cdot 10^{-6}$  моль/см<sup>3</sup>).

Для расчета электроактивной площади поверхности ИГЭ, 1-ГТ/Au/ИГЭ и АЦЦ/Au/ИГЭ необходимо использовать уравнение Рэндлса-Шевчика для необратимого процесса (формула 3.5) [139]:

$$I_p = 2,99 \cdot 10^5 \cdot \sqrt{\alpha} \cdot A \cdot n^{3/2} \cdot D^{1/2} \cdot v^{1/2} \cdot C, \quad (3.5)$$

где  $I_p$  – сила тока катодного или анодного пика, А;

$\alpha$  – коэффициент переноса ( $\alpha = 0,5$  [141]);

$A$  – электроактивная площадь, см<sup>2</sup>;

$n$  – число электронов, переносимых в процессе электродной реакции  
( $n = 1$ );

$D$  – коэффициент диффузии, см<sup>2</sup>/с ( $D_{Ox} = 7,63 \cdot 10^{-6}$  см<sup>2</sup>/с);

$v$  – скорость развертки потенциала, В/с ( $v = 0,1$  В/с);

$C$  – концентрация электролита, моль/см<sup>3</sup> ( $C = 5 \cdot 10^{-6}$  моль/см<sup>3</sup>).

Таким образом, электроактивная площадь немодифицированного ИГЭ составила 0,119 см<sup>2</sup>. Электроактивная площадь Au/ИГЭ равна 0,213 см<sup>2</sup>, 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 см<sup>2</sup> и 0,0915 см<sup>2</sup> соответственно.

Для оценки степени адсорбции 1-ГТ или АЦЦ на поверхности Au/ИГЭ была рассчитана поверхностная концентрация этих молекул на электроде. Известно, что органические соединения серы десорбируются с золотой поверхности в щелочных водных растворах при отрицательных потенциалах по реакции (3.6) [142]:



Этот факт был подтвержден регистрацией вольтамперограмм для 1-ГТ/Au/ИГЭ и АЦЦ/Au/ИГЭ с линейной разверткой потенциала в диапазоне от – 0,5 В до –1,2 В при скорости развертки 100 мВ/с в водном растворе 0,1 моль/дм<sup>3</sup> КОН (рисунок 3.8).

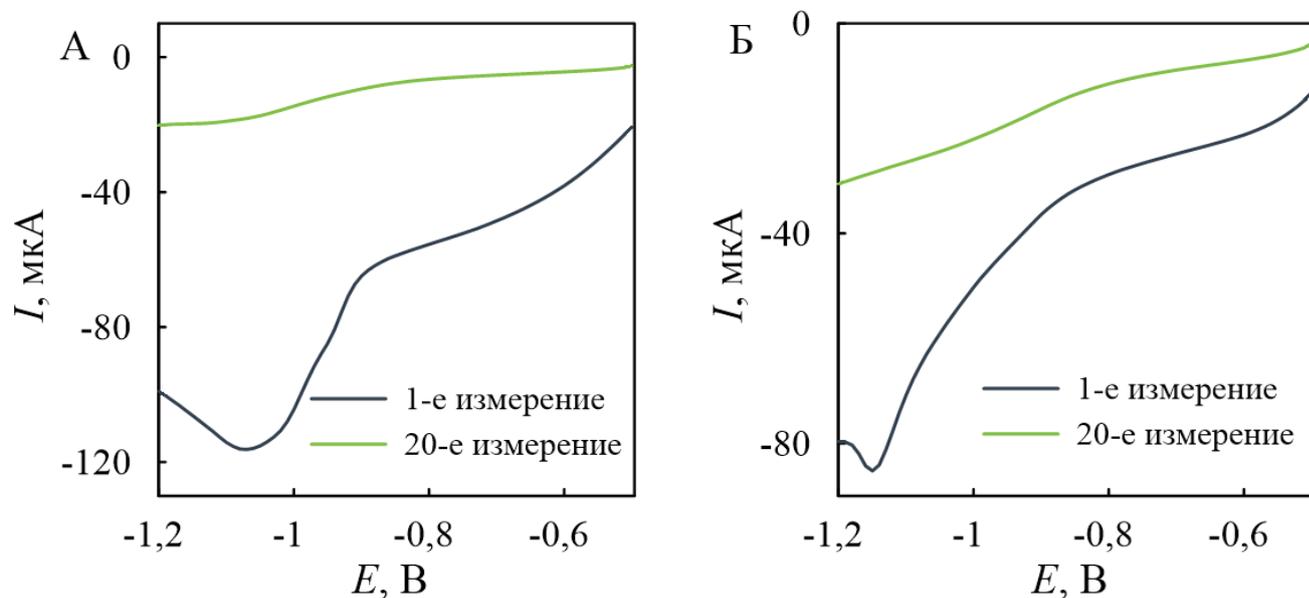


Рисунок 3.8 – Электрохимическая десорбция 1-ГТ (А) и АЦЦ (Б) с поверхности Au/ИГЭ

Как видно из рисунка, при регистрации первой вольтамперограммы отчетливо заметен пик восстановления и десорбции органических соединений серы при –1,08 В и –1,15 В для 1-ГТ и АЦЦ соответственно. При этом после последовательной регистрации 20 вольтамперограмм данный пик полностью

исчезает, а полученные вольтамперограммы соответствуют электроду Au/ИГЭ, что указывает на полную десорбцию самоорганизующихся монослоев.

Поверхностная концентрация СОМ рассчитывается по формуле (3.7) [143]:

$$\Gamma = \frac{Q}{nFA}, \quad (3.7)$$

где  $\Gamma$  – поверхностная концентрация частиц, моль/см<sup>2</sup>;

$Q$  – количество электричества, Кл;

$n$  – число электронов, переносимых в процессе электродной реакции

( $n = 1$ );

$F$  – постоянная Фарадея (96485 Кл/моль);

$A$  – электроактивная площадь, см<sup>2</sup>.

Количество электричества, затрачиваемое на восстановление и десорбцию серосодержащих молекул с поверхности Au/ИГЭ, было определено методом хроноамперометрии. Измерения проводились при потенциале  $-1,08$  В для 1-ГТ и  $-1,15$  В для АЦЦ в водном растворе  $0,1$  моль/дм<sup>3</sup> КОН. Время измерения подбирали таким образом, чтобы кривая тока вышла на плато, что означало бы полную десорбцию СОМ с электрода. Так, необходимое время для десорбции СОМ составило 250 сек при ширине шага  $0,5$  сек. Полученные графики приведены на рисунке 3.9.

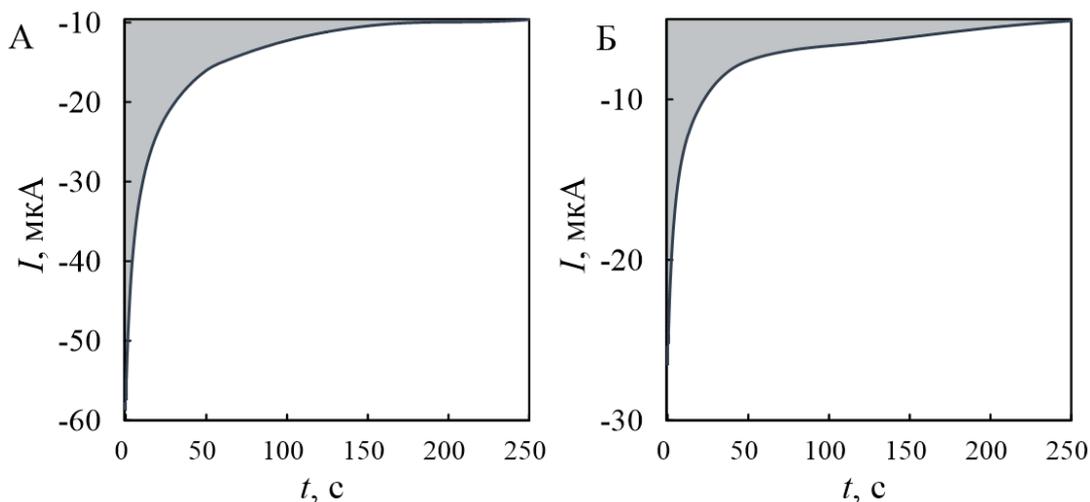


Рисунок 3.9 – Хроноамперометрическое измерение количества электричества при десорбции 1-ГТ (А) и АЦЦ (Б) с поверхности электрода

Площадь закрашенной области на рисунке 3.9 соответствует количеству электричества и равна  $1,76 \cdot 10^{-3}$  Кл для 1-ГТ и  $8,91 \cdot 10^{-4}$  Кл для АЦЦ. Исходя из уравнения 3.7, поверхностная концентрация частиц 1-ГТ составила  $1,95 \cdot 10^{-7}$  моль/см<sup>2</sup>, а поверхностная концентрация молекул АЦЦ составила  $1,01 \cdot 10^{-7}$  моль/см<sup>2</sup>. Полученные данные указывают на значительную площадь покрытия Au/ИГЭ самоорганизующимся монослоем, что подтверждает полученный высокий аналитический сигнал ОН-радикалов.

Помимо этого, электрохимические свойства поверхности сенсоров были оценены двумя методами электрохимической импедансной спектроскопии. Первый подход представляет собой регистрацию спектров методом фарадеевского импеданса, в котором главной характеристикой токопроводящих свойств выступает сопротивление переноса заряда ( $R_{пз}$ ). Параметры измерений подробно описаны в разделе 2.2. Полученные импедансные спектры для ИГЭ и его модификаций в координатах Найквиста, где  $Z'$  – активное сопротивление, а  $Z''$  – реактивное сопротивление, приведены на рисунке 3.10. Для количественной оценки  $R_{пз}$  полученные спектры моделировали с помощью эквивалентной электрической схемы, приведенной во вставке рисунка 3.10.

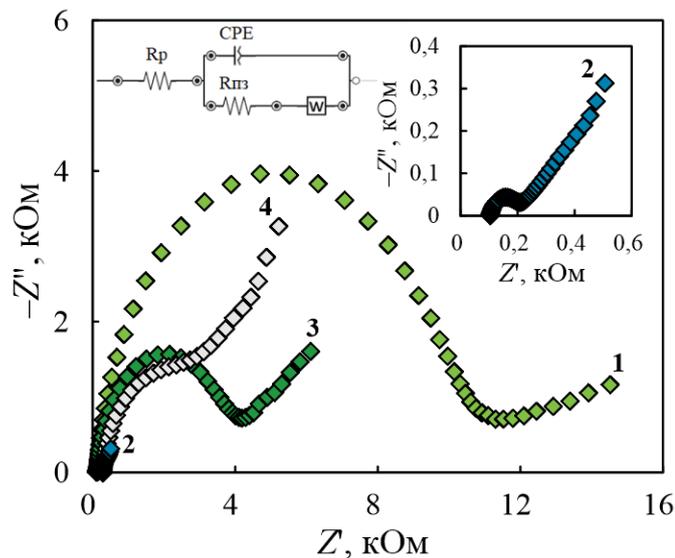


Рисунок 3.10 – Импедансные спектры ИГЭ (1), Au/ИГЭ (2), 1-ГТ/Au/ИГЭ (3) и АЦЦ/Au/ИГЭ (4), полученные методом фарадеевского импеданса. Параметры эквивалентной электрической схемы:  $R_p$  – сопротивление раствора; CPE – элемент постоянной фазы;  $R_{пз}$  – сопротивление переноса заряда;  $W$  – элемент Варбурга

Как видно из рисунка, все спектры представляют собой полуокружности, переходящие в прямые линии под углом  $45^\circ$  к оси абсцисс, что указывает на процесс переноса заряженных частиц и их диффузию в приэлектродном пространстве. В связи с этим для моделирования импедансных спектров использовалась схема Рэндлса-Эршлера, состоящая из сопротивления раствора, элемента постоянной фазы, который заменяет емкость двойного электрического слоя ввиду неоднородности поверхности и большой шероховатости электродов, сопротивления переноса заряда и элемента Варбурга, который соответствует процессу диффузии. Значения  $R_{пз}$ , полученные при моделировании спектров фарадеевского импеданса, приведены в таблице 3.9.

Таблица 3.9 – 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	$10020 \pm 40$	$1,6 \pm 0,9$	$(3 \pm 1) \cdot 10^{-3}$
Au/ИГЭ	$90 \pm 10$	$1,4 \pm 0,8$	$(5 \pm 1) \cdot 10^{-4}$
1-ГТ/Au/ИГЭ	$3510 \pm 30$	$0,6 \pm 0,3$	$(5 \pm 1) \cdot 10^{-4}$
AЦЦ/Au/ИГЭ	$2420 \pm 30$	$1,2 \pm 0,5$	$(2 \pm 1) \cdot 10^{-4}$

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. Условия измерений подробно описаны в разделе 2.2. Полученные импедансные спектры приведены на рисунке 3.11. Для количественной оценки  $C_{dl}$  полученные

спектры моделировали с помощью эквивалентной электрической схемы, приведенной во вставке рисунка.

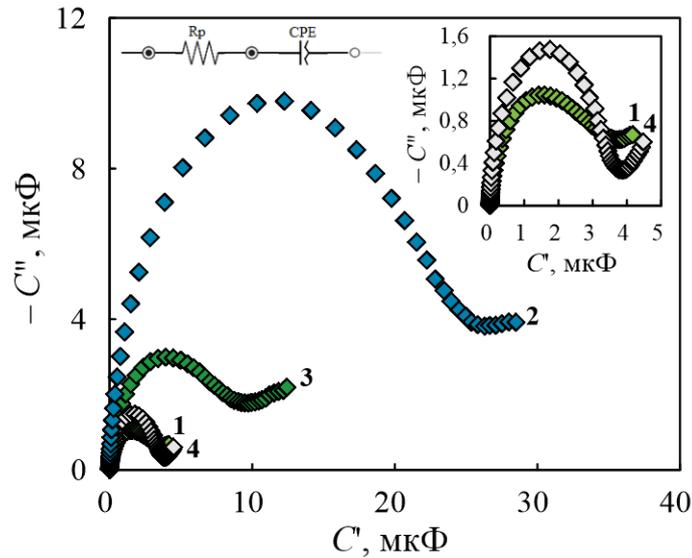


Рисунок 3.11 – Импедансные спектры ИГЭ (1), Au/ИГЭ (2), 1-ГТ/Au/ИГЭ (3) и АЦЦ/Au/ИГЭ (4), полученные методом нефарадеевского импеданса. Параметры эквивалентной электрической схемы:  $R_p$  – сопротивление раствора; CPE – элемент постоянной фазы

Поскольку данные измерения проводились в фосфатном буферном растворе, не содержащем окислительно-восстановительной метки, при протекании через ячейку электрического тока наблюдается только два процесса: наличие сопротивления раствора, всегда присутствующего в растворах электролитов, а также формирование двойного электрического слоя на границе электрод–раствор. При этом представление спектров в координатах Найквиста не является информативным, поскольку спектры выглядят как прямые линии под небольшим углом к оси ординат. В связи с этим для большей наглядности спектры на рисунке 3.11 представлены в координатах емкостей, где  $C'$  – действительная часть комплексной емкости, соответствующая емкости, измеренной при постоянном токе, а  $C''$  – мнимая часть комплексной емкости, которая соответствует потерям энергии за счет диссипации [144]. Данные параметры связаны с активным и реактивным сопротивлением следующими соотношениями:

$$C'(\omega) = \frac{-Z''(\omega)}{\omega|Z(\omega)|^2} \quad (3.8)$$

$$C''(\omega) = \frac{Z'(\omega)}{\omega|Z(\omega)|^2} \quad (3.9)$$

где  $C'(\omega)$  и  $C''(\omega)$  – действительная и мнимая части комплексной емкости соответственно;

$Z'(\omega)$  и  $Z''(\omega)$  – действительная и мнимая части импеданса соответственно;

$Z(\omega)$  – полное сопротивление системы;

$\omega$  – угловая частота.

При этом частота, при которой наблюдается наибольшее значение  $C''(\omega)$ , рассматривается как точка, в которой происходит переход от резистивного поведения к емкостному [144].

Наличие четко выраженных полуокружностей на спектрах рисунка 3.10 свидетельствует о формировании заряда на поверхности раздела фаз, при этом диаметр полукруга характеризует емкость двойного электрического слоя (ДЭС). Присутствие на спектрах прямой линии, появляющейся после полуокружности, указывает на наличие медленного процесса движения ионов в диффузном слое. Как видно из рисунка 3.11, емкость ДЭС немодифицированного ИГЭ является достаточно низкой, в то время как нанесение золота способствует ее значительному увеличению. Адсорбция органических соединений серы приводит к заметному уменьшению емкости ввиду закрытия поверхности сенсора.

Значения элемента постоянной фазы, состоящего из двух параметров,  $Q$  и  $n$ , полученные при моделировании спектров нефарадеевского импеданса, приведены в таблице 3.10.

Таблица 3.10 – Экстраполированные параметры импедансных спектров, полученные при моделировании данных нефарадеевского импеданса ( $P = 0,95$ ;  $n = 3$ )

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

С учетом данных таблицы 3.10, расчет  $C_{dl}$  проводился по формуле 2.2. 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.

Данные, полученные при исследовании свойств поверхности сенсоров электрохимическими методами, позволяют сделать вывод, что органические соединения серы значительно изменяют характеристики электродов, ввиду чего их разрушение при окислении ОН-радикалами приводит к заметному отклику от созданных сенсоров.

### 3.2.2 Исследование морфологии поверхности

Образование самоорганизующихся монослоев из органических соединений серы требует определенных свойств поверхности субстрата, на котором будет формироваться СОМ. В связи с этим крайне важными характеристиками электродов ИГЭ и Au/ИГЭ является морфология их поверхностей, оценка шероховатости и распределения золота, осажденного электрохимическим способом.

На рисунке 3.12 представлена профилограмма поверхности центра немодифицированного ИГЭ в виде 3D-изображения при 20-кратном увеличении.

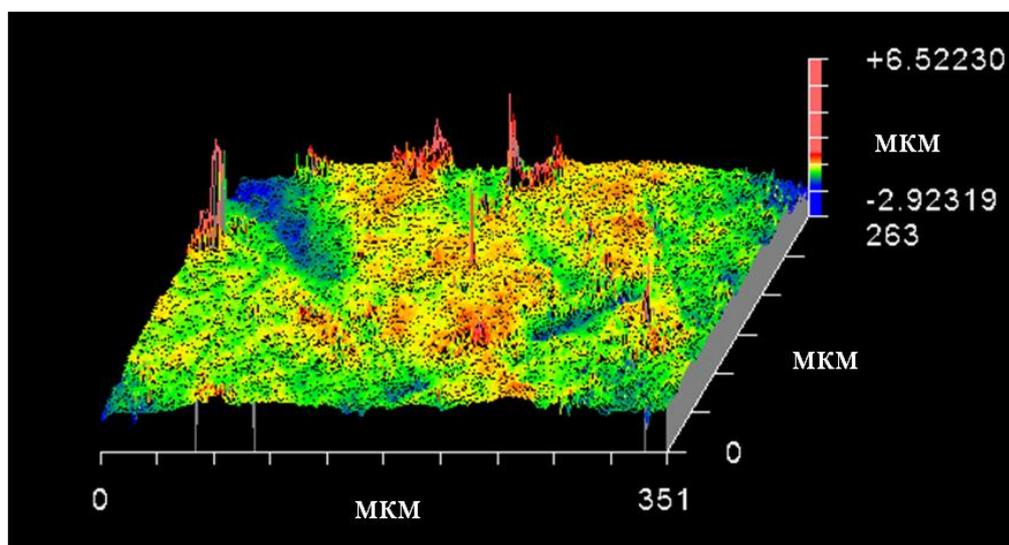


Рисунок 3.12 – Профилограмма ИГЭ

Как видно из рисунка 3.12, поверхность электрода является достаточно неоднородной, что обусловлено наличием остаточных пор и образованием микротрещин вследствие механической шлифовки электрода. Интегральный параметр средней шероховатости ( $R_a$ ) для данной поверхности равен 0,239 мкм, что указывает на значительную степень неровности электрода.

Приведенное на рисунке 3.13 СЭМ изображение ИГЭ во вторичных электронах также подтверждает значительную неоднородность поверхности электрода.

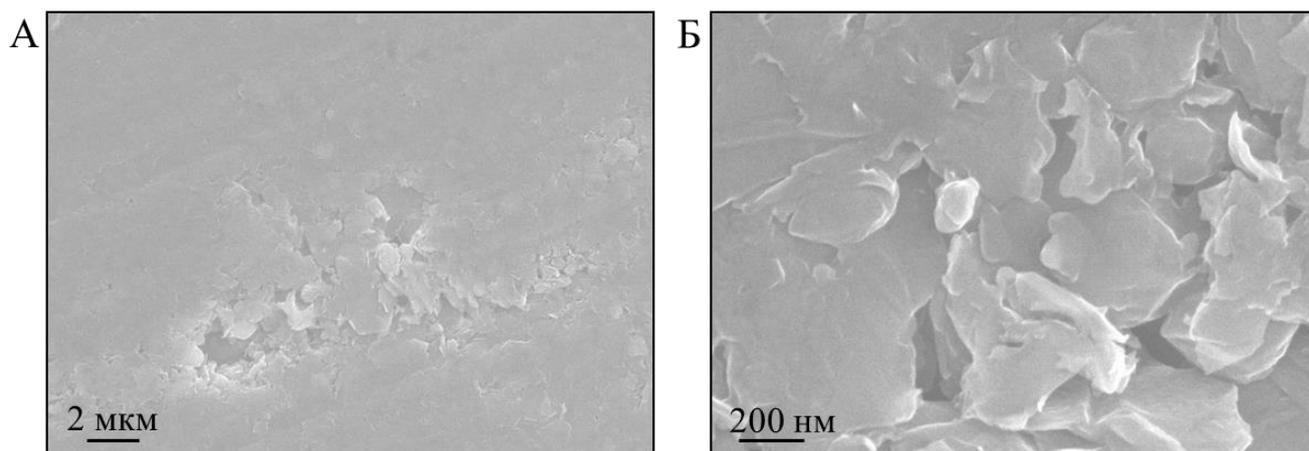


Рисунок 3.13 – СЭМ изображения участков поверхности ИГЭ во вторичных электронах при разном увеличении (А, Б)

Материал электрода представляет собой композит, который сохраняет микропористость вследствие неравномерно распределенной фазы из полиэтилена

и парафина в процессе импрегнирования. По изменению контраста на рисунке 3.13А хорошо заметны следы импрегната – смеси полиэтилена и парафина, а также царапины, появляющиеся вследствие механической шлифовки поверхности ИГЭ. Помимо этого, на поверхности электрода присутствуют остаточные микропоры размером до двух микрометров, в окрестности которых также обнаруживаются отдельные поры с меньшим диаметром до 200 нм (рисунок 3.13Б). Таким образом, можно ожидать, что во время электрохимического нанесения золота его осаждение будет протекать и в местах скопления пор.

Изображение поверхности Au/ИГЭ, полученное методом сканирующей электронной микроскопии, приведено на рисунке 3.14.

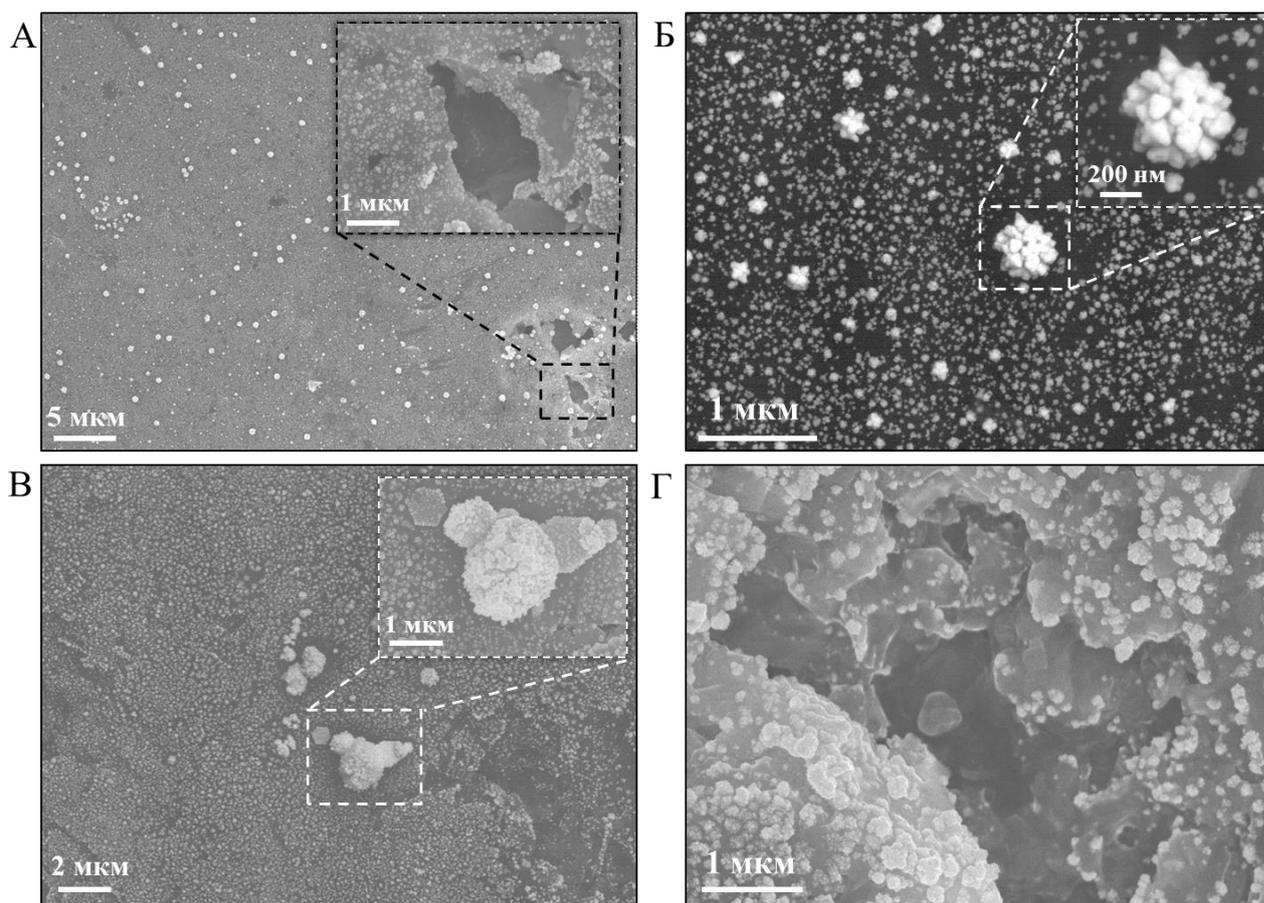


Рисунок 3.14 – СЭМ изображения поверхности Au/ИГЭ. Изображения во вторичных электронах (А, В, Г) и в обратно рассеянных электронах (Б). Во вставках приведены увеличенные участки поверхности, содержащие поры (А) и дендритные кристаллы золота (Б, В)

Как видно из рисунка 3.14, сформированный слой золота состоит из отдельных частиц и их конгломератов (рисунок 3.14А). Восстановление металла происходит на всей поверхности электрода, включая границы пор и другие неровности. Контраст на изображении в обратно рассеянных электронах (рисунок 3.14Б) свидетельствует о том, что данные частицы золота размером ~100–500 нм представляют собой дендритные кристаллы и неоднородно распределены по поверхности. Из-за большой шероховатости поверхности ИГЭ островки кристаллизации имеют различную ориентацию, формируя скопления дендритов с правильными гранями (рисунок 3.14В). Внутренние стенки пор также содержат частицы золота, осажденные по их границам (рисунок 3.14Г). Это указывает на то, что токопроводящими местами ИГЭ являются не только ровные участки, но и дефекты в виде остаточных пор. Таким образом, можно ожидать, что образование СОМ будет происходить на всех отмеченных неоднородностях поверхности.

Для подтверждения химического состава осажденного слоя золота и отсутствия на поверхности электрода посторонних примесей был проведен анализ области Au/ИГЭ методом ЭДС. Полученные данные представлены на рисунке 3.15.

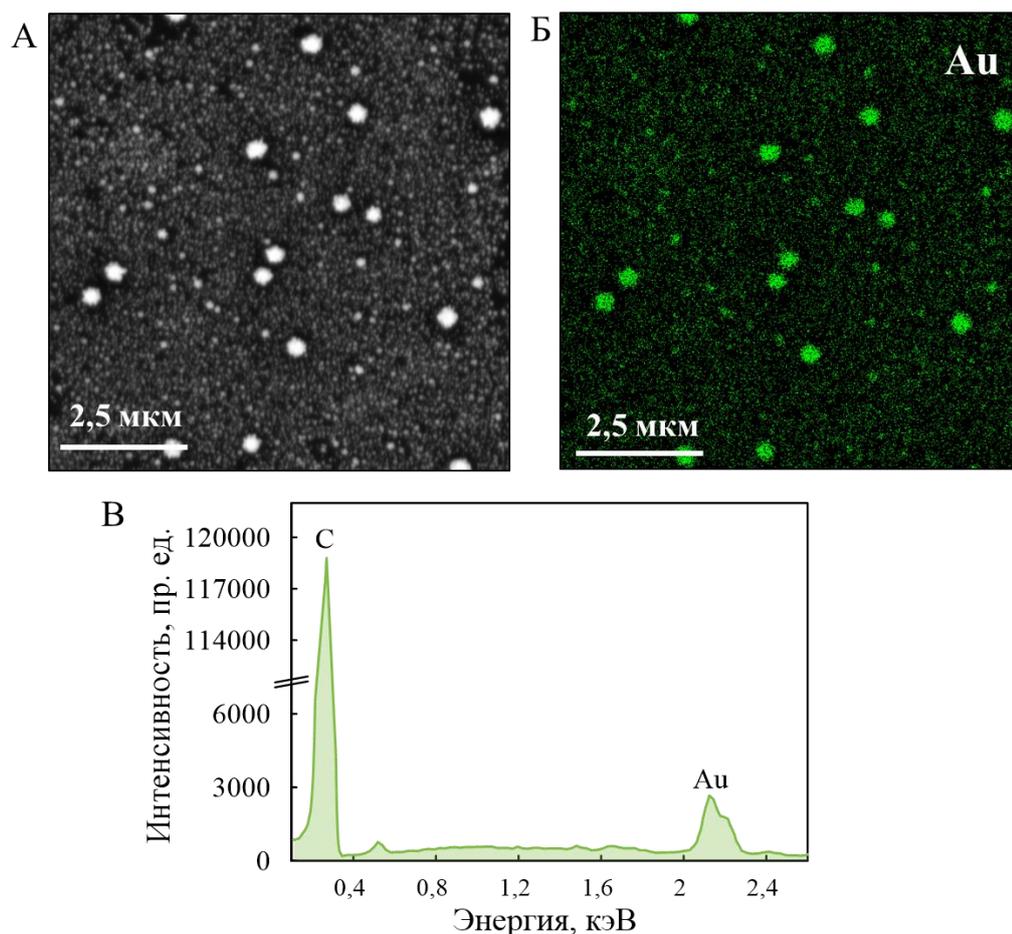


Рисунок 3.15 – Изображение в обратно рассеянных электронах поверхности Au/ИГЭ (А) и соответствующие этому участку карта распределения золота (Б) и ЭДС спектр (В)

Карта распределения золота по поверхности ИГЭ подтверждает сделанные ранее выводы об островковом характере роста золота в результате восстановления из раствора  $\text{H}[\text{AuCl}_4]$ . На ЭДС спектре (рисунок 3.15В) отчетливо видны спектральная  $K$ -линия углерода ( $E_{\text{C}} = 0,277$  кэВ) и  $L$ -линия золота ( $E_{\text{Au}} = 2,123$  кэВ). Также на представленном спектре отсутствуют другие элементы, что указывает на высокую степень чистоты слоя золота, осажденного на ИГЭ. Таким образом, поскольку осажденное золото занимает всю углеродную подложку, включая остаточные поры, а также сформированная пленка золота не имеет посторонних примесей в виде других элементов, полученная поверхность является подходящей для адсорбции на ней органических соединений серы.

Метод сканирующей электронной микроскопии не позволяет установить факт адсорбции органических соединений серы на поверхности Au/ИГЭ. В связи

с этим для моделирования процесса образования СОМ на золотой поверхности были синтезированы золотые наночастицы, на которых впоследствии была проведена адсорбция 1-ГТ или АЦЦ. Данные коллоидные частицы с адсорбированными молекулами органических соединений серы были исследованы методом просвечивающей электронной микроскопии с подтверждением элементного состава методом ЭДС. ПЭМ изображение наночастиц золота с адсорбированными на них молекулами 1-ГТ и соответствующие ему карты распределения элементов и ЭДС спектр приведены на рисунке 3.16.

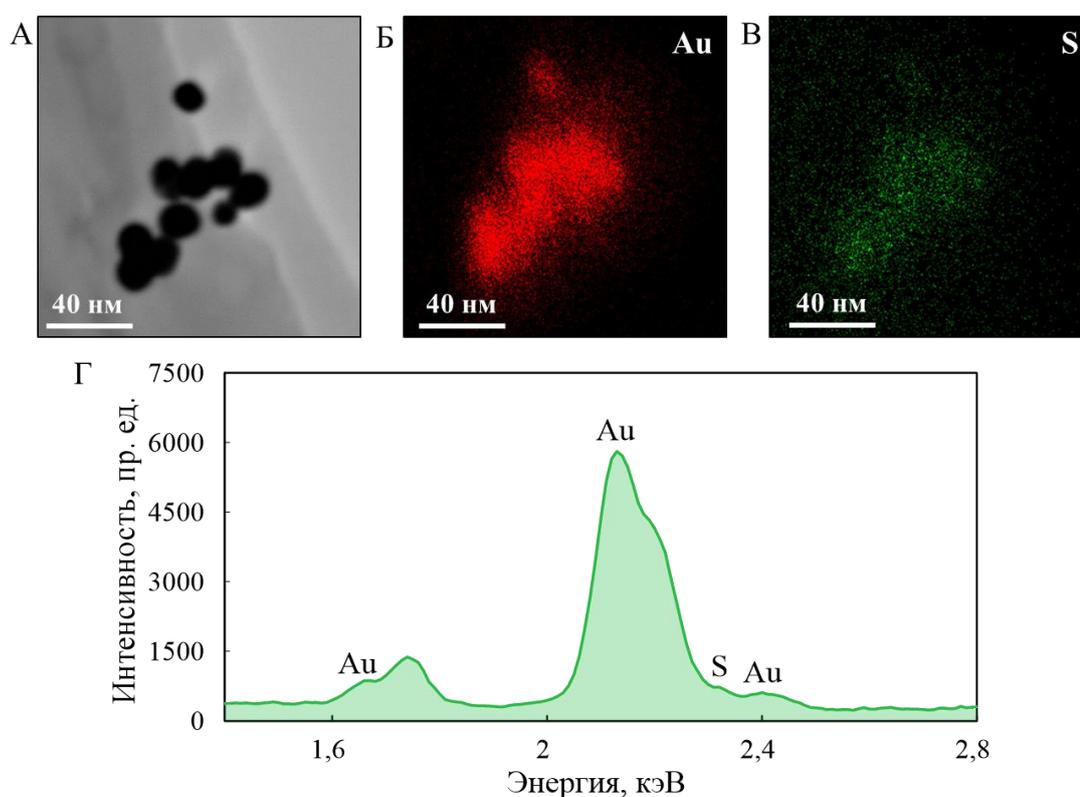


Рисунок 3.16 – Светлопольное ПЭМ изображение наночастиц золота с адсорбированными молекулами 1-ГТ (А) и соответствующие данному участку анализа карты распределения золота (Б), серы (В) и ЭДС спектр (Г)

Как видно из рисунка 3.16А, средний диаметр наночастиц золота, на которых проводилась сорбция 1-ГТ, составляет 20 нм. Карты распределения элементов (рисунки 3.16Б и 3.16В) подтверждают адсорбцию 1-ГТ на поверхности золота, так как распределение серы и золота наблюдается в одинаковых областях. На ЭДС спектре присутствуют *L*-линии золота с энергиями

пиков ( $E_{Au} = 1,66, 2,13$  и  $2,43$  кэВ) соответственно. Также на спектре отчетливо заметна  $K$ -линия серы ( $E_S = 2,33$  кэВ), которая отсутствовала на ЭДС спектре на рисунке 3.15. Полученные данные подтверждают адсорбцию 1-ГТ на золотой поверхности.

Аналогичные данные, полученные для наночастиц золота с адсорбированными на них молекулами АЦЦ, приведены на рисунке 3.17.

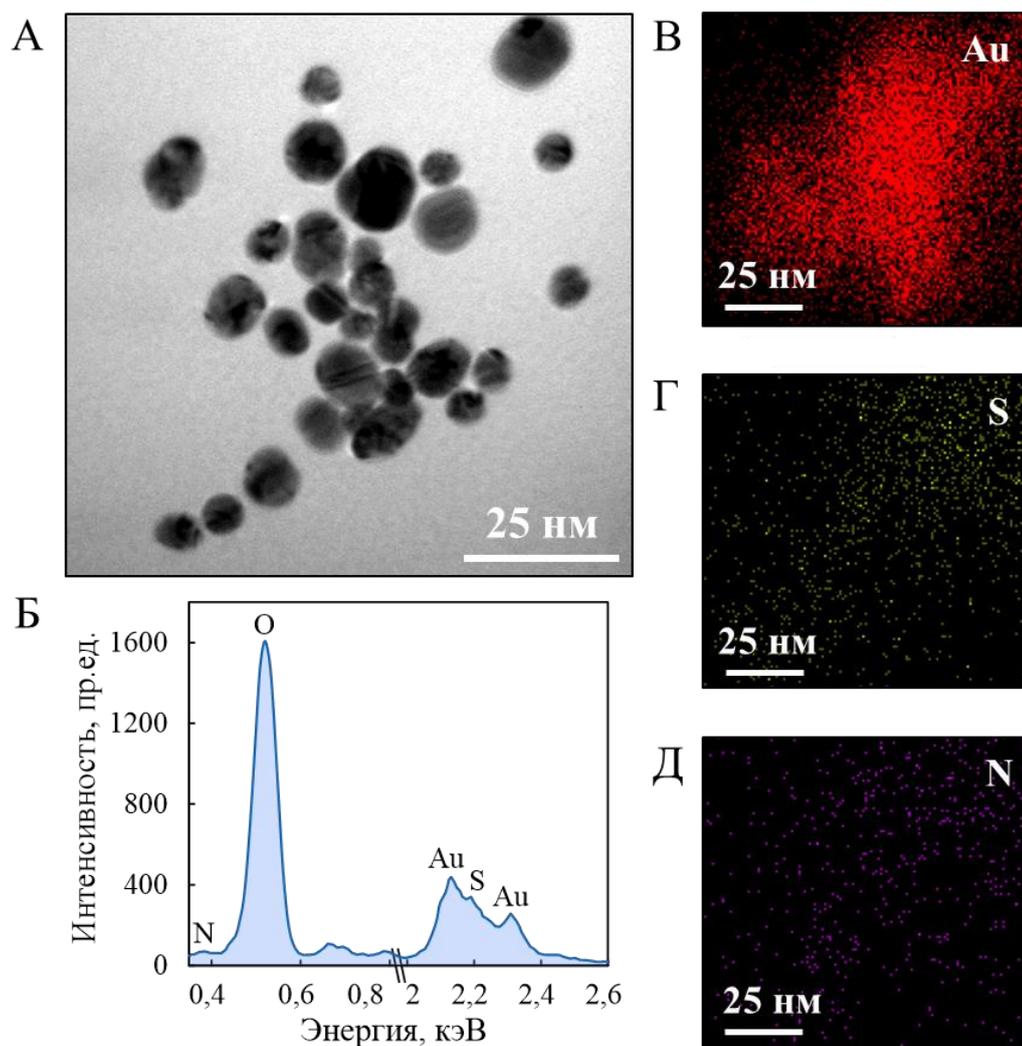


Рисунок 3.17 – Светлопольное ПЭМ изображение наночастиц золота с адсорбированными молекулами АЦЦ (А) и соответствующие данному участку анализа ЭДС спектр (Б) и карты распределения золота (В), серы (Г) и азота (Д)

Исходя из рисунка 3.17А видно, что адсорбция АЦЦ проводилась на наночастицах золота диаметром 10–15 нм. На полученном ЭДС спектре данного участка присутствуют пики энергий следующих элементов:  $K$ -линия азота ( $E_N = 0,38$  кэВ),  $K$ -линия кислорода ( $E_O = 0,52$  кэВ) и  $K$ -линия серы ( $E_S = 2,19$  кэВ),

соответствующие элементам, присутствующим в молекуле АЦЦ. Также на спектре присутствуют *L*-линии золота ( $E_{Au} = 2,13$  и  $2,31$  кэВ). Карты распределения элементов (рисунки 3.17В–Д) подтверждают сорбцию АЦЦ на золотых наночастицах, поскольку распределение золота, серы и азота наблюдается на одинаковых участках.

Таким образом, результаты исследования морфологии поверхности сенсоров различными микроскопическими методами позволяют сделать следующие выводы. Поверхность немодифицированного ИГЭ является достаточно неоднородной, в связи с чем восстановление золота происходит на всех участках поверхности, повторяя неровный рельеф углеродной подложки. Этот факт не является недостатком поверхности, поскольку указывает, что поверхность электрода является более разветвленной, соответственно, площадь, занимаемая осажденным золотом и самоорганизующимся монослоем, будет больше. При этом образовавшийся слой золота не имеет посторонних примесей, что предполагает нанесение плотного СОМ органических соединений серы. Также показано, что 1-ГТ и АЦЦ хорошо сорбируются на золотых наночастицах, что подтверждает их закрепление на поверхности Au/ИГЭ.

### **3.3 Подбор рабочих условий определения гидроксильных радикалов**

Важными параметрами, влияющими на аналитический сигнал, являются условия формирования самоорганизующихся монослоев на поверхности электродов, а именно время формирования СОМ и концентрация раствора, из которого происходит сорбция органических соединений серы. Из литературных данных известно, что для образования СОМ на поверхности золота необходимо минимум 12 часов, а проводить сорбцию можно из раствора с минимальной концентрацией  $1 \cdot 10^{-6}$  моль/дм<sup>3</sup> [118]. Однако наиболее часто для образования СОМ на поверхности электрода используются следующие параметры: концентрация раствора составляет порядка  $10^{-3}$  моль/дм<sup>3</sup>, а время нанесения равно 24 часа [79,85].

Для оценки плотности формирования монослоев от времени и исходной концентрации растворов были проведены исследования поверхности 1-

ГТ/Аu/ИГЭ и АЦЦ/Аu/ИГЭ методом фарадеевского импеданса. Зависимость сопротивления переноса заряда от времени формирования СОМ 1-гексантиола из раствора с исходной концентрацией  $2 \cdot 10^{-3}$  моль/дм<sup>3</sup> приведена на рисунке 3.18.

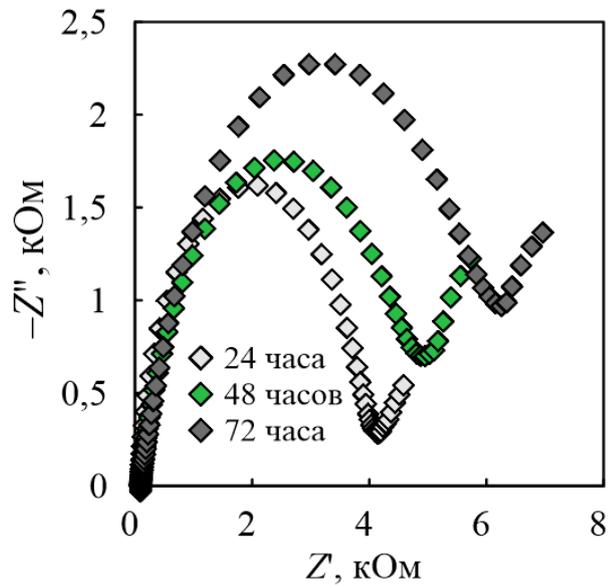


Рисунок 3.18 – Влияние времени формирования самоорганизующегося монослоя 1-ГТ на поверхности Аu/ИГЭ из раствора с исходной концентрацией  $2 \cdot 10^{-3}$  моль/дм<sup>3</sup>

Как видно из рисунка, с увеличением времени происходит более плотное формирование СОМ на поверхности электрода. При моделировании эквивалентных схем было определено, что  $R_{пз}$  для 24 часов составляет 3819 Ом,  $R_{пз}$  для 48 часов равно 4517 Ом, а  $R_{пз}$  для 72 часов равно 6110 Ом. Таким образом, увеличение времени формирования монослоя способствует повышению степени заполнения поверхности сенсора молекулами 1-ГТ, однако это также способствует возрастанию времени процесса модификации, что является неудобным с точки зрения практического применения. В связи с этим 24 часа является наиболее подходящим временем для формирования монослоя 1-ГТ на Аu/ИГЭ.

Для исследования влияния концентрации исходного раствора 1-ГТ на формирование монослоя на поверхности Аu/ИГЭ проводили сорбцию из растворов 1-гексантиола концентрацией  $2 \cdot 10^{-4}$  моль/дм<sup>3</sup>,  $2 \cdot 10^{-3}$  моль/дм<sup>3</sup> и  $2 \cdot 10^{-2}$  моль/дм<sup>3</sup> в течение 24 часов. Данные изменений свойств поверхности электрода в зависимости от концентрации 1-ГТ приведены на рисунке 3.19.

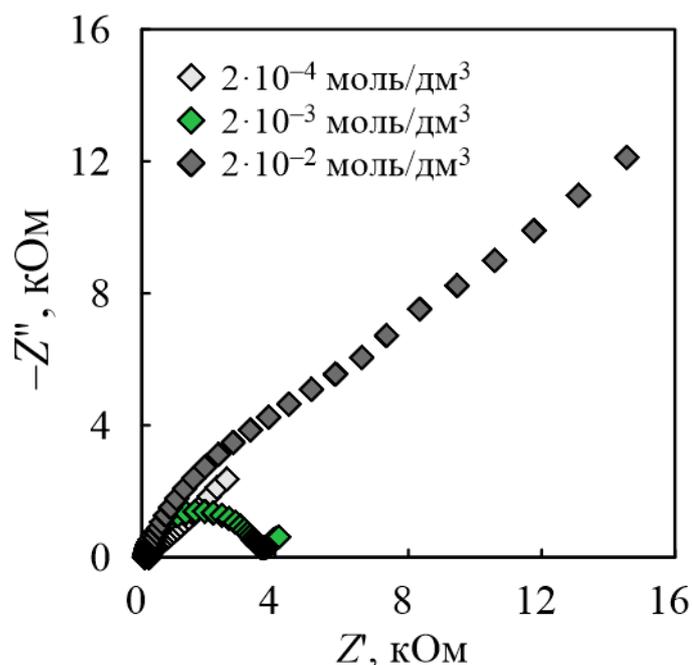


Рисунок 3.19 – Влияние концентрации исходного раствора 1-ГТ на формирование самоорганизующегося монослоя на поверхности Au/ИГЭ при времени сорбции 24 часа

Как видно из рисунка 3.19, увеличение концентрации исходного раствора 1-ГТ приводит к значительному росту сопротивления переноса заряда, вызванному увеличением поверхностной концентрации 1-гексантиола на поверхности электрода. Так,  $R_{пз}$  для концентрации  $2 \cdot 10^{-4}$  моль/дм<sup>3</sup> равно 989 Ом, в то время как  $R_{пз}$  для концентрации  $2 \cdot 10^{-3}$  моль/дм<sup>3</sup> составляет 3316 Ом, а для концентрации  $2 \cdot 10^{-2}$  моль/дм<sup>3</sup>  $R_{пз}$  равно 8154 Ом. Несмотря на то, что наибольшее значение сопротивления переноса заряда достигается при исходной концентрации 1-ГТ  $2 \cdot 10^{-2}$  моль/дм<sup>3</sup>, высокая токсичность модификатора требует использования более низкой концентрации. Таким образом, наиболее подходящими параметрами для формирования самоорганизующегося монослоя 1-ГТ являются 24 часа и исходная концентрация раствора  $2 \cdot 10^{-3}$  моль/дм<sup>3</sup>.

Для определения условий формирования самоорганизующегося монослоя АЦЦ на поверхности электрода были проведены измерения сопротивления переноса заряда при сорбции из раствора N-ацетил-L-цистеина  $1 \cdot 10^{-2}$  моль/дм<sup>3</sup> в течение 24 часов, 48 часов и 72 часов. Полученная зависимость приведена на рисунке 3.20.

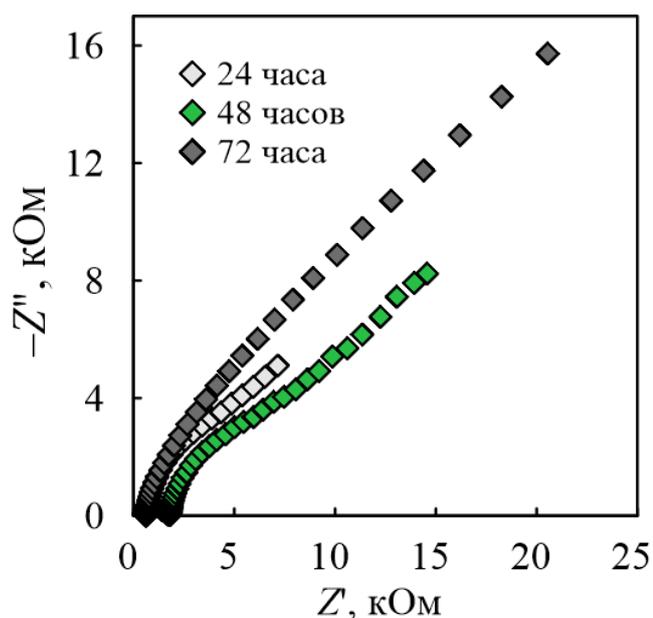


Рисунок 3.20 – Влияние времени формирования самоорганизующегося монослоя АЦЦ на поверхности Au/ИГЭ из раствора с исходной концентрацией  $1 \cdot 10^{-2}$  моль/дм<sup>3</sup>

Как видно из рисунка, при увеличении времени сорбции происходит заметный рост сопротивления переноса заряда, вызванный образованием более плотного монослоя. Так,  $R_{пз}$  для 24 часов составляет 4269 Ом,  $R_{пз}$  для 48 часов равно 6078 Ом, а  $R_{пз}$  для 72 часов равно 8112 Ом. Однако большое время нанесения является неудобным с точки зрения практического применения, в связи с чем наиболее подходящим временем для формирования СОМ является 24 часа.

Для оценки влияния концентрации исходного раствора АЦЦ на формирование монослоя проводили сорбцию из растворов N-ацетил-L-цистеина концентрацией  $1 \cdot 10^{-4}$  моль/дм<sup>3</sup>,  $1 \cdot 10^{-3}$  моль/дм<sup>3</sup> и  $1 \cdot 10^{-2}$  моль/дм<sup>3</sup> в течение 24 часов. Данные изменений свойств поверхности электрода в зависимости от концентрации АЦЦ приведены на рисунке 3.21.

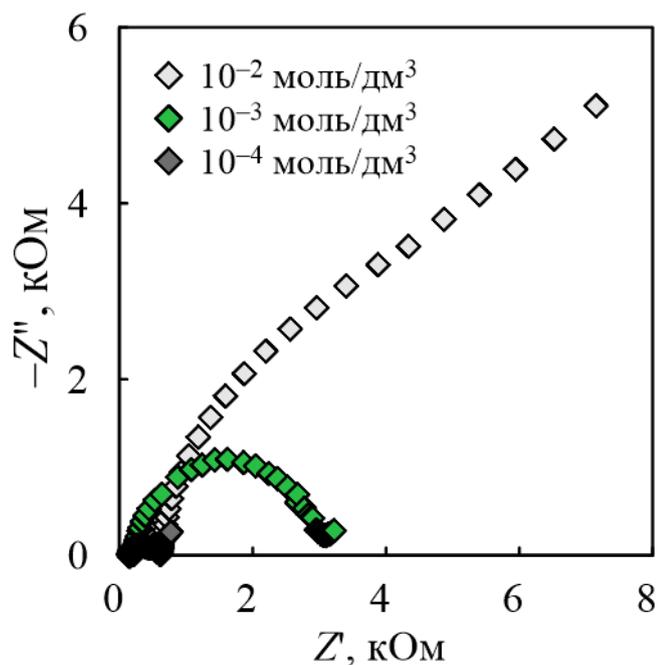


Рисунок 3.21 – Влияние концентрации исходного раствора АЦЦ на формирование самоорганизующегося монослоя на поверхности Au/ИГЭ при времени сорбции 24 часа

Как видно из рисунка, увеличение концентрации исходного раствора способствует возрастанию сопротивления переноса заряда. Так,  $R_{пз}$  для концентрации  $1 \cdot 10^{-4}$  моль/дм<sup>3</sup> равно 314 Ом, в то время как  $R_{пз}$  для концентрации  $1 \cdot 10^{-3}$  моль/дм<sup>3</sup> составляет 2738 Ом, а для концентрации  $1 \cdot 10^{-2}$  моль/дм<sup>3</sup>  $R_{пз}$  равно 4629 Ом. Наличие большой диффузионной составляющей на спектре для концентрации  $1 \cdot 10^{-2}$  моль/дм<sup>3</sup> не является критичным, поскольку измерения аналитического сигнала проводятся методом нефарадеевского импеданса. Таким образом, наиболее подходящими параметрами для формирования самоорганизующегося монослоя АЦЦ являются 24 часа и исходная концентрация раствора  $1 \cdot 10^{-2}$  моль/дм<sup>3</sup>.

Одним из наиболее важных параметров для получения высокого аналитического сигнала является время реакции образования ОН-радикалов. Поэтому в работе исследовалась зависимость аналитического сигнала сенсоров 1-ГТ/Au/ИГЭ и АЦЦ/Au/ИГЭ от времени реакции Фентона и реакции разложения пероксида водорода.

На рисунке 3.22 представлена зависимость отношения емкости фона к емкости аналитического сигнала ( $C_0/C$ ) от времени реакции Фентона для сенсора 1-ГТ/Au/ИГЭ в диапазоне от 60 до 1200 с при концентрации ионов  $Fe^{2+}$   $1 \cdot 10^{-9}$  моль/дм<sup>3</sup>.

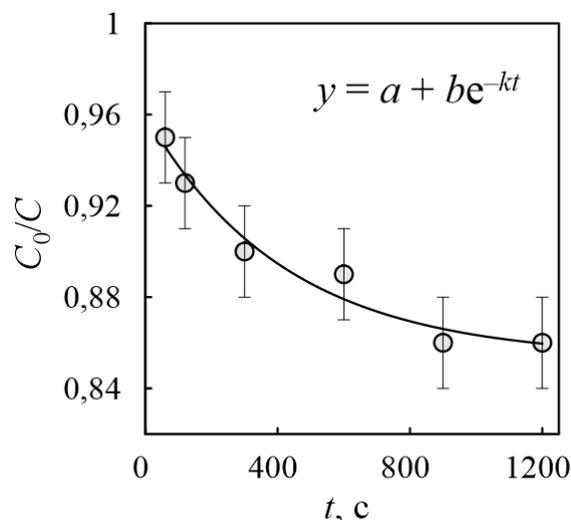


Рисунок 3.22 – Кинетика разрушения монослоя 1-ГТ ОН-радикалами в диапазоне времени от 60 до 1200 с при регистрации сигнала методом нефарадеевского импеданса ( $P = 0,95$ ;  $n = 3$ )

Исходя из рисунка, значение  $C_0/C$  выходит на плато при 900 с. Таким образом, необходимое время реакции для получения наиболее высокого аналитического сигнала составляет 15 минут. Полученная зависимость была аппроксимирована кинетическим уравнением первого порядка, приведенным на вставке рисунка 3.22. Результаты статистической обработки кинетического уравнения представлены в таблице 3.11.

Таблица 3.11 – Статистическая обработка кинетического уравнения, приведенного на рисунке 3.22 ( $P = 0,95$ ;  $n = 3$ )

Коэффициент	Значение коэффициента	Достигнутый уровень значимости	Коэффициент корреляции ( $R^2$ )
$a$	$0,85 \pm 0,01$	0,000009	0,9673
$b$	$0,11 \pm 0,01$	0,003	
$k$	$0,0024 \pm 0,0009$	0,02	

Значение коэффициента корреляции является удовлетворительным, что указывает на правильность использования уравнения первого порядка. Помимо этого, значения достигнутого уровня значимости для всех коэффициентов менее 0,05, что говорит о значимости этих коэффициентов.

На рисунке 3.23 представлена зависимость отношения  $C_0/C$  от времени реакции разложения перекиси водорода под действием УФ-излучения для сенсора АЦЦ/Au/ИГЭ в диапазоне от 120 до 1200 с при концентрации ОН-радикалов  $1 \cdot 10^{-9}$  моль/дм<sup>3</sup>.

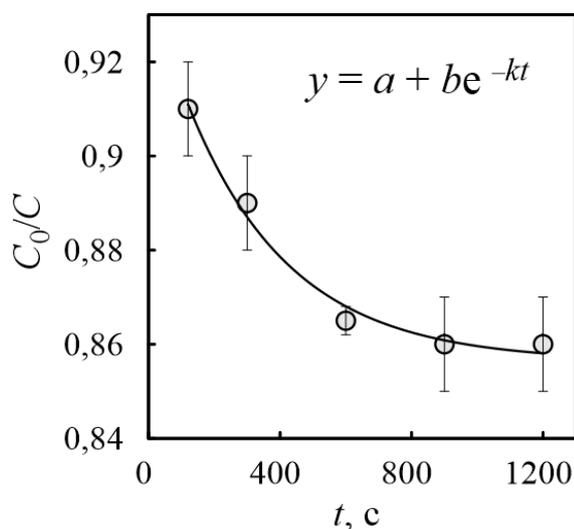


Рисунок 3.23 – Кинетика разрушения монослоя АЦЦ ОН-радикалами в диапазоне времени от 120 до 1200 с при регистрации сигнала методом нефарадеевского импеданса ( $P = 0,95$ ;  $n = 3$ )

Как видно из рисунка, значение  $C_0/C$  выходит на плато при 900 с. Исходя из этого, для получения наиболее высокого аналитического сигнала данную реакцию необходимо проводить в течение 15 минут. Полученная зависимость была аппроксимирована кинетическим уравнением первого порядка, приведенным на вставке рисунка 3.23. Результаты статистической обработки кинетического уравнения представлены в таблице 3.12.

Таблица 3.12 – Статистическая обработка кинетического уравнения, приведенного на рисунке 3.23 ( $P = 0,95$ ;  $n = 3$ )

Коэффициент	Значение коэффициента	Достигнутый уровень значимости	Коэффициент корреляции ( $R^2$ )
$a$	$0,856 \pm 0,004$	0,00002	0,9880

Продолжение таблицы 3.12

Коэффициент	Значение коэффициента	Достигнутый уровень значимости	Коэффициент корреляции ( $R^2$ )
$b$	0,0804±0,008	0,009	0,9880
$k$	0,0032±0,0008	0,04	

Удовлетворительное значение коэффициента корреляции свидетельствует о правильности использования уравнения первого порядка. Помимо этого, значения достигнутого уровня значимости для всех коэффициентов составили менее 0,05, что говорит о значимости этих коэффициентов.

Таблица 3.13 суммирует подобранные рабочие условия, которые позволяют получить наиболее высокий отклик от сенсоров 1-ГТ/Аu/ИГЭ и АЦЦ/Аu/ИГЭ.

Таблица 3.13 – 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 <sup>3</sup> )	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

Полученные данные позволяют построить градуировочные зависимости аналитического сигнала от концентрации ОН-радикалов и определить наиболее подходящий способ оценки уровня ОН<sup>•</sup> в клеточных культурах.

### 3.4 Аналитические характеристики сенсоров с включением органических соединений серы для определения гидроксильных радикалов

Известно, что концентрация ОН<sup>•</sup> в биологических объектах составляет примерно  $1 \cdot 10^{-9}$  моль/дм<sup>3</sup> [87], в связи с чем диапазон концентраций для построения градуировочной зависимости должен подбираться таким образом,

чтобы данная концентрация находилась посередине диапазона. Также необходимо, чтобы градуировочная зависимость была линейна в широком диапазоне концентраций. Исходя из этого, а также из аналитических возможностей разработанных сенсоров, были построены градуировочные зависимости аналитического сигнала от концентрации ОН-радикалов.

На рисунке 3.24 приведена зависимость аналитического сигнала ( $\Delta C$ ) от десятичного логарифма исходной концентрации ионов  $\text{Fe}^{2+}$ , полученная с помощью сенсора 1-ГТ/Ау/ИГЭ в диапазоне концентраций от 0,01 нмоль/дм<sup>3</sup> до 1 нмоль/дм<sup>3</sup>.

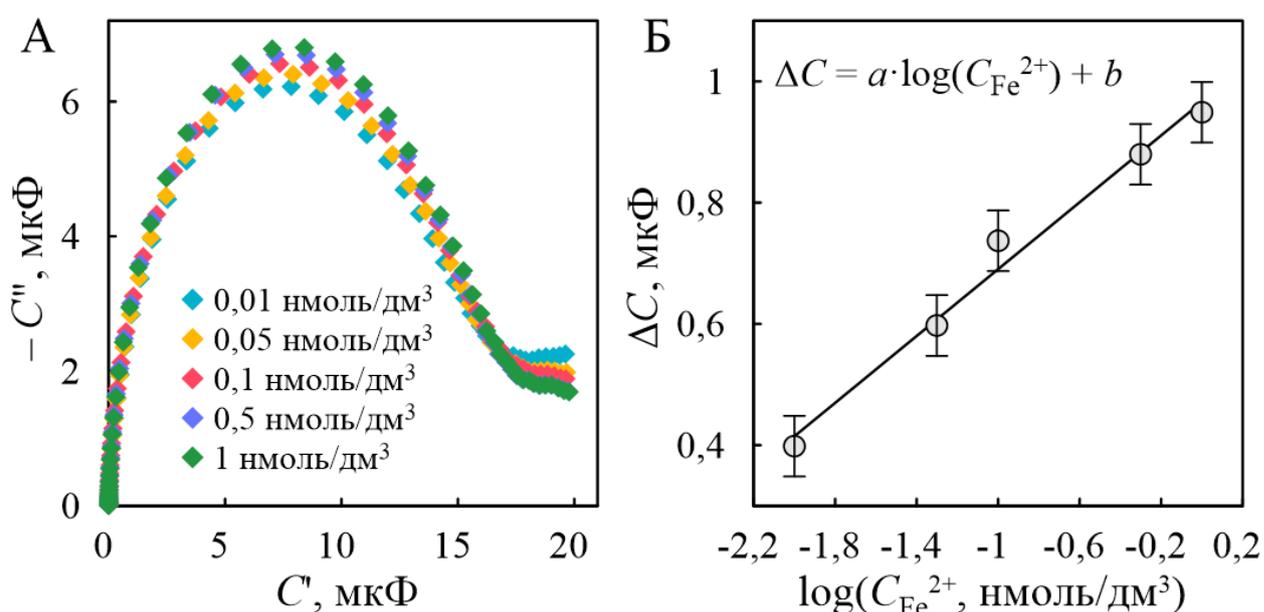


Рисунок 3.24 – Аналитический сигнал сенсора 1-ГТ/Ау/ИГЭ в зависимости от исходной концентрации ионов  $\text{Fe}^{2+}$  (А); градуировочная зависимость  $\Delta C$  от логарифма концентрации  $\text{Fe}^{2+}$  (Б) ( $P = 0,95$ ;  $n = 3$ )

Результаты статистической обработки полученной регрессионной зависимости приведены в таблице 3.14.

Таблица 3.14 – Статистическая обработка уравнения регрессии градуировочной зависимости, приведенного на рисунке 3.24 ( $P = 0,95$ ;  $n = 3$ )

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	

Как видно из таблицы, оба коэффициента уравнения являются значимыми, так как достигнутый уровень значимости намного меньше 0,05. Также данная модель характеризуется высоким коэффициентом корреляции. Таким образом, данные статистической обработки указывают на то, что полученная зависимость является линейной во всем представленном диапазоне концентраций. Существенным недостатком полученной градуировочной зависимости является высокое значение свободного коэффициента по сравнению с угловым коэффициентом в уравнении регрессии, поскольку данный факт указывает на большой вклад систематической погрешности в измерения.

На рисунке 3.25 приведена зависимость аналитического сигнала ( $\Delta C$ ) от десятичного логарифма концентрации ОН-радикалов, полученная с помощью сенсора АЦЦ/Au/ИГЭ в диапазоне концентраций от 0,08 нмоль/дм<sup>3</sup> до 8 нмоль/дм<sup>3</sup>.

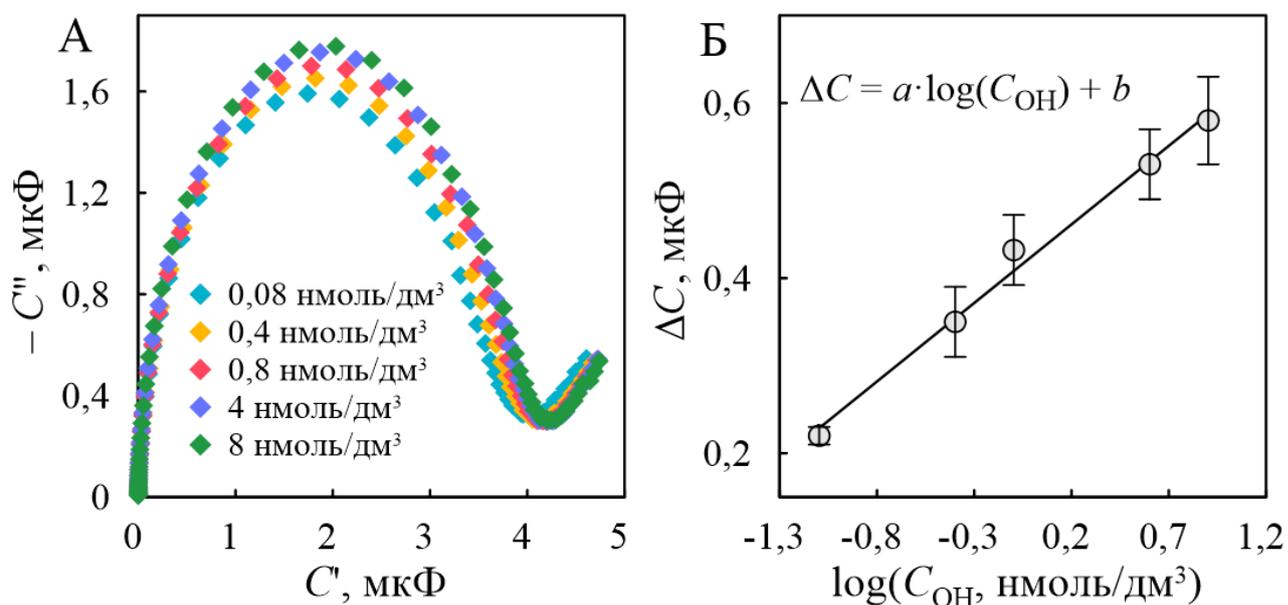


Рисунок 3.25 – Аналитический сигнал сенсора АЦЦ/Au/ИГЭ в зависимости от концентрации ОН<sup>•</sup> (А); градуировочная зависимость  $\Delta C$  от логарифма концентрации ОН<sup>•</sup> (Б) ( $P = 0,95$ ;  $n = 3$ )

Результаты статистической обработки полученной регрессионной зависимости приведены в таблице 3.15.

Таблица 3.15 – Статистическая обработка уравнения регрессии градуировочной зависимости, приведенного на рисунке 3.25 ( $P = 0,95; n = 3$ )

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	

Значение коэффициента корреляции, близкое к единице, указывает на то, что зависимость является линейной во всем диапазоне концентраций. Также установлено, что оба коэффициента уравнения являются значимыми ( $p \leq 0,05$ ). Значение свободного коэффициента также является достаточно высоким по сравнению с угловым коэффициентом, однако это значение меньше, чем для предыдущей зависимости.

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

## ГЛАВА 4 РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГИДРОКСИЛЬНЫХ РАДИКАЛОВ В КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ

### 4.1 Оценка адекватности модели градуировочной зависимости

Для применения зависимости аналитического сигнала от концентрации ОН-радикалов, полученной в разделе 3.4 с помощью сенсора АЦЦ/Au/ИГЭ, в анализе реальных объектов, необходимо проверить ее адекватность. Адекватность модели подразумевает соответствие модели моделируемому объекту или процессу. Модель градуировочной зависимости считается адекватной, если разброс между параллельными опытами при каждом уровне  $\Delta C_i$  больше, чем расхождения между рассчитанными по модели и экспериментальными значениями  $\Delta C_i$  [145].

Вначале была проведена проверка гипотезы однородности дисперсий. Для этого были проведены три параллельных измерения аналитического сигнала  $\Delta C_i$  для пяти концентраций ОН-радикалов. После этого по полученным экспериментальным данным были рассчитаны средние значения изменения емкости при каждой концентрации  $\Delta C_{cp}$ . Полученные данные приведены в таблице 4.1.

Таблица 4.1 – Зависимость аналитического сигнала ОН-радикалов от десятичного логарифма концентрации

№	$\lg(C_{OH}, \text{нмоль/дм}^3)$	$\Delta C_1$ (мкФ)	$\Delta C_2$ (мкФ)	$\Delta C_3$ (мкФ)	$\Delta C_{cp}$ (мкФ)
1	-1,097	0,224	0,221	0,219	0,221
2	-0,398	0,363	0,362	0,335	0,353
3	-0,0969	0,478	0,432	0,405	0,438
4	0,602	0,549	0,539	0,514	0,534
5	0,903	0,596	0,586	0,558	0,580

Проверка гипотезы однородности дисперсий проводилась по критерию Кохрена. Для этого рассчитывались дисперсии для каждого опыта по формуле (4.1):

$$s_i^2 = \frac{\Sigma(\Delta C_i - \Delta C_{cp})^2}{(n-1)}, \quad (4.1)$$

где  $s_i^2$  – дисперсия для  $i$ -го опыта;

$\Delta C_i$  – экспериментальное значение аналитического сигнала;

$\Delta C_{\text{ср}}$  – среднее экспериментальное значение аналитического сигнала;

$n$  – число параллельных измерений ( $n = 3$ ).

Далее определялось наибольшее значение  $s_{i(\text{max})}^2$  и рассчитывался критерий Кохрена по формуле (4.2):

$$G_{\text{расч}} = \frac{s_{i(\text{max})}^2}{\sum_{i=1}^N s_i^2}, \quad (4.2)$$

где  $G_{\text{расч}}$  – критерий Кохрена;

$s_{i(\text{max})}^2$  – максимальное значение дисперсии;

$s_i^2$  – дисперсия для  $i$ -го опыта;

$N$  – число независимых опытов ( $N = 5$ ).

Полученное значение критерия Кохрена необходимо сравнить с табличным с учетом степеней свободы  $f_1 = n - 1 = 2$  и  $f_2 = N = 5$  и доверительной вероятности 0,95. Если рассчитанный критерий Кохрена меньше табличного, то дисперсии однородны. Полученные расчеты приведены в таблице 4.2.

Таблица 4.2 – Проверка однородности дисперсий по критерию Кохрена ( $P = 0,95$ ;  $f_1 = 2$ ;  $f_2 = 5$ )

$s_i^2$	$s_{i(\text{max})}^2$	$G_{\text{расч}}$	$G_{\text{табл}}$
$6,33 \cdot 10^{-6}$	$1,36 \cdot 10^{-3}$	0,584	0,684
$2,52 \cdot 10^{-4}$			
$1,36 \cdot 10^{-3}$			
$3,25 \cdot 10^{-4}$			
$3,88 \cdot 10^{-4}$			

Исходя из полученных данных видно, что дисперсии однородны, следовательно, полученные результаты можно использовать для построения регрессионной зависимости.

Для оценки адекватности модели необходимо рассчитать дисперсию воспроизводимости и дисперсию адекватности.

Расчет дисперсии воспроизводимости проводится по формуле (4.3):

$$s_{\text{вос}}^2 = \frac{\sum_{i=1}^N s_i^2}{N}, \quad (4.3)$$

где  $s_{\text{вос}}^2$  – дисперсия воспроизводимости;

$N$  – число независимых опытов ( $N = 5$ );

$s_i^2$  – дисперсия для  $i$ -го опыта.

Для определения дисперсии адекватности рассчитываются значения аналитического сигнала, полученные при подстановке значений определяемых концентраций в уравнение регрессии  $\Delta C^*$ . Расчет дисперсии адекватности проводится по формуле (4.4):

$$s_{ад}^2 = \frac{n \sum_{i=1}^N (\Delta C_{сп} - \Delta C^*)^2}{N - k}, \quad (4.4)$$

где  $s_{ад}^2$  – дисперсия адекватности;

$n$  – число параллельных опытов для каждого независимого опыта ( $n = 3$ );

$N$  – число независимых опытов ( $N = 5$ );

$k$  – число значимых коэффициентов в уравнении ( $k = 2$ );

$\Delta C_{сп}$  – среднее экспериментальное значение аналитического сигнала для каждого  $i$ -го уровня из  $n$  числа параллельных определений;

$\Delta C^*$  – значение функции отклика, рассчитанное по модели для каждого  $i$ -го уровня.

Адекватность модели определяется по критерию Фишера (формула 4.5).

$$F = \frac{s_{ад}^2}{s_{вос}^2}, \quad (4.5)$$

где  $F$  – расчетное значение критерия Фишера;

$s_{ад}^2$  – дисперсия адекватности;

$s_{вос}^2$  – дисперсия воспроизводимости.

Полученное значение критерия Фишера сравнивают с табличным с учетом степеней свободы  $f_1 = N - k = 3$  и  $f_2 = N \cdot (n - 1) = 10$  и доверительной вероятности 0,95. Если рассчитанный критерий Фишера меньше табличного, то модель считается адекватной.

Результаты оценки адекватности модели представлены в таблице 4.3.

Таблица 4.3 – Оценка однородности дисперсий по критерию Фишера ( $P = 0,95$ ;  $f_1 = 3$ ;  $f_2 = 10$ )

$s_{\text{вос}}^2$	$\Delta C^*$	$s_{\text{ад}}^2$	$F$	$F_{\text{табл}}$
$4,67 \cdot 10^{-4}$	0,232	$3,27 \cdot 10^{-4}$	0,699	3,71
	0,357			
	0,411			
	0,536			
	0,590			

Как видно из таблицы 4.3, рассчитанный критерий Фишера меньше табличного значения, поэтому можно сделать вывод, что данная модель является адекватной. Таким образом, уравнение  $\Delta C = 0,18 \cdot \log(C_{\text{ОН}}) + 0,42$  может быть использовано для расчета концентрации ОН-радикалов в реальных объектах.

#### **4.2 Исследование мешающего влияния компонентов реальных объектов**

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  $1 \text{ нмоль/дм}^3$  ОН $\cdot$  и потенциально мешающих веществ в концентрации  $100 \text{ нмоль/дм}^3$  (рисунок 4.1).

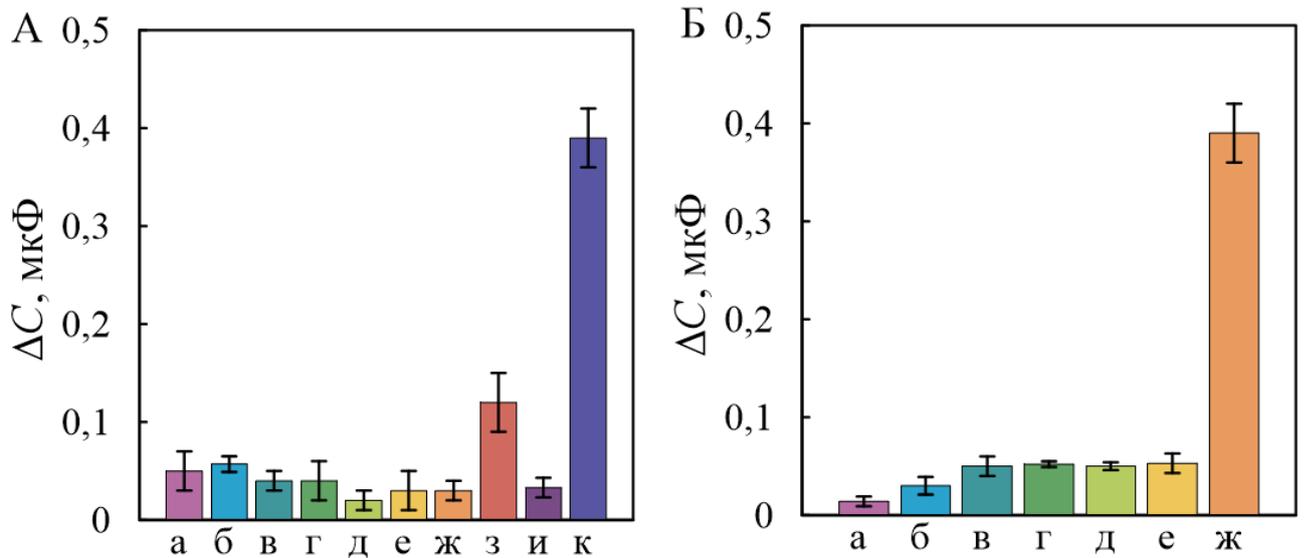


Рисунок 4.1 – (А) Селективность АЦЦ/Au/ИГЭ по отношению к АФК и биологически активным веществам:  $^1\text{O}_2$  (а),  $\text{ClO}^-$  (б),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (в), D-глюкоза (г), L-аргинин (д), аскорбиновая кислота (е), глутатион (ж), кверцетин (з), коэнзим Q10 (и),  $\text{OH}^\bullet$  (к); (Б) селективность АЦЦ/Au/ИГЭ по отношению к ионам  $\text{Mg}^{2+}$  (а),  $\text{Ca}^{2+}$  (б),  $\text{Fe}^{2+}$  (в),  $\text{Fe}^{3+}$  (г),  $\text{K}^+$  (д),  $\text{Na}^+$  (е),  $\text{OH}^\bullet$  (ж) ( $P = 0,95$ ;  $n = 3$ )

Оценка мешающего влияния по  $t$ -критерию приведена в таблице 4.4.

Таблица 4.4 – Расчет мешающего влияния по  $t$ -критерию ( $P = 0,95$ ;  $n = 3$ )

Потенциально мешающий компонент	$t_{\text{эксп}}$	$t_{\text{табл}}$
Синглетный кислород ( $^1\text{O}_2$ )	3,387	4,303
Гипохлорит-ион ( $\text{ClO}^-$ )	3,800	
Перекись водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )	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 ( $\text{Mg}^{2+}$ )	2,600	
Ион кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ )	2,636	
Ион железа(II) ( $\text{Fe}^{2+}$ )	3,138	
Ион железа(III) ( $\text{Fe}^{3+}$ )	2,838	
Ион калия ( $\text{K}^+$ )	3,000	
Ион натрия ( $\text{Na}^+$ )	3,122	

Как видно из таблицы, из всех рассмотренных компонентов, взятых в стократном избытке, мешающее 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.

### **4.3 Методика определения гидроксильных радикалов в клеточных культурах с помощью АЦЦ/Аu/ИГЭ**

Для определения ОН-радикалов, генерируемых живыми клетками, пригодны только адгезивные клеточные культуры, поскольку суспензионные культуры могут оказывать мешающее влияние на работу сенсора, закрепляясь на его поверхности.

На первом этапе регистрируют импедансный спектр фона. Для этого собирают трехэлектродную ячейку, состоящую из сенсора АЦЦ/Аu/ИГЭ в качестве рабочего электрода, электрод сравнения и вспомогательный электрод – хлоридсеребряные, заполненные 1 моль/дм<sup>3</sup> КСl. Электроды подключают к потенциостату-гальваностату и помещают в 10 см<sup>3</sup> ФБР рН 6,86. Измерения проводят при следующих параметрах:  $E_{dc} = 0,28$  В;  $E_{ac} = 0,01$  В; диапазон частот от 0,1 до 10<sup>5</sup> Гц. Регистрируют не менее 5 импедансных спектров для получения воспроизводимых результатов.

Для исследования генерации ОН<sup>•</sup> живыми клетками температура в чашках Петри с высеянными клеточными культурами поддерживается на уровне 37 °С. Перед измерениями среду удаляют дозатором и вносят 2 см<sup>3</sup> ФБР (рН = 7,4). Клетки стимулируют к выработке ОН<sup>•</sup> путем их инкубации с 1·10<sup>-7</sup> моль/дм<sup>3</sup> Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>, внося в чашку Петри 0,2 см<sup>3</sup> Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> концентрации 1·10<sup>-5</sup> моль/дм<sup>3</sup>, в течение 15 минут. После внесения перекиси водорода электрод сразу погружают в раствор, чтобы обеспечить разрушение СОМ внеклеточными ОН-радикалами. Через 15 минут электрод ополаскивают бидистиллированной водой и ставят в электрохимическую ячейку для измерений, включающую в себя 10 см<sup>3</sup> ФБР рН 6,86 и хлоридсеребряные электроды, заполненные 1 моль/дм<sup>3</sup> КСl, в качестве вспомогательного электрода и электрода сравнения. Проводят измерения при

следующих параметрах:  $E_{dc} = 0,28$  В;  $E_{ac} = 0,01$  В; диапазон частот от 0,1 до  $10^5$  Гц. Регистрируют не менее 5 импедансных спектров для получения воспроизводимых результатов. Измерения, проводимые методом электрохимической импедансной спектроскопии, проводят при комнатной температуре.

Для определения внеклеточных ОН-радикалов, генерируемых живыми клетками, моделируют полученные спектры с помощью эквивалентной электрической схемы (рисунок 3.13). По формуле 2.2 рассчитывают емкость ДЭС для фонового спектра и для спектра после разрушения монослоя гидроксильными радикалами. Далее определяют разность  $\Delta C = C - C_0$ , где  $C$  – емкость ДЭС после воздействия ОН-радикалов, а  $C_0$  – емкость ДЭС фона. Качественное содержание внеклеточных ОН-радикалов оценивается по наличию смещения  $\Delta C$ , а количественное – по градуировочному графику (рисунок 3.24).

Разработанная методика была апробирована на двух клеточных линиях: РС-3 (аденокарцинома простаты) и 3Т3-L1 (эмбриональные фибробласты мыши). Оптические фотографии нормального роста используемых клеточных культур приведены на рисунке 4.2.

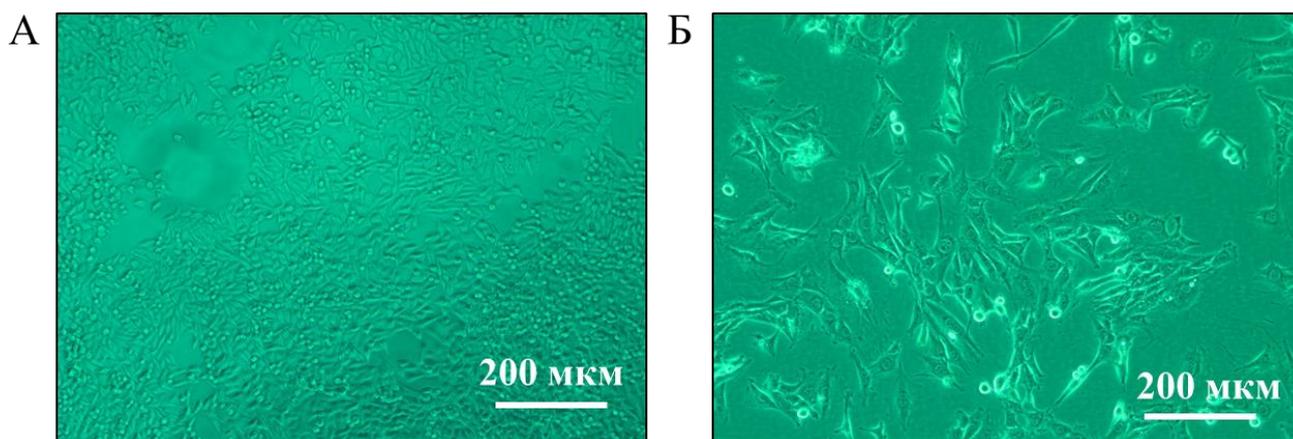


Рисунок 4.2 – Оптические фотографии клеток РС-3 (А) и 3Т3-L1 (Б)

Как видно из рисунка 4.2, клетки образуют плотный слой на дне чашки Петри, что указывает на возможность их использования в эксперименте. Измерение емкости ДЭС и уровень внеклеточных ОН $\cdot$ , экспрессируемых данными клеточными линиями, приведены на рисунке 4.3.

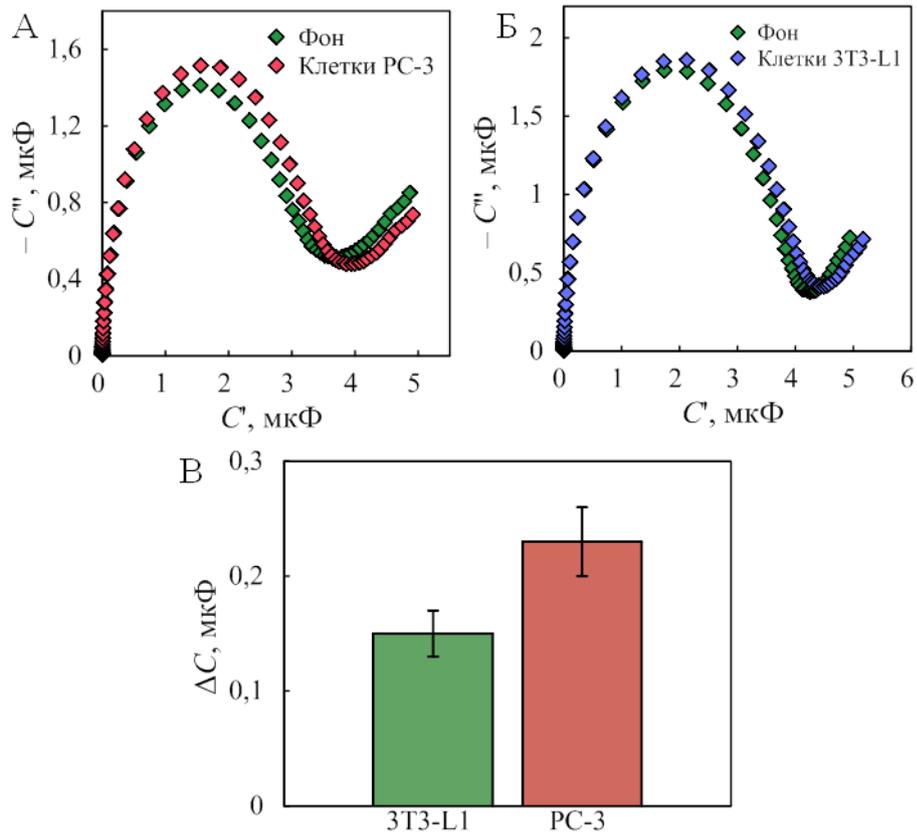


Рисунок 4.3 – Аналитический сигнал, полученный от опухолевых клеток PC-3 (А) и здоровых клеток T3T-L1 (Б); сравнение отклика от здоровых и опухолевых клеток ( $P = 0,95$ ;  $n = 3$ ) (В)

Как видно из рисунка, клетки PC-3 показали значительное изменение емкости после воздействия  $H_2O_2$ , что свидетельствует о высокой экспрессии  $OH^\bullet$  этой клеточной линией (рисунок 4.3А). Как показали контрольные эксперименты, ни ФБР (рН = 7,4), ни перекись водорода, ни сами клетки не вызывали значимого увеличения емкости, что подтверждает наличие аналитического сигнала от внеклеточных  $OH^\bullet$ . Концентрация внеклеточных  $OH^\bullet$ -радикалов, генерируемых опухолевыми клетками, составила  $0,10 \pm 0,03$  нмоль/дм<sup>3</sup>. В то же время здоровые клетки T3T-L1 показали значительно меньший отклик при воздействии перекиси водорода (рисунок 4.3Б). Значение полученного аналитического сигнала находится в пределах систематической ошибки методики, в связи с чем количественно оценить внеклеточные  $OH^\bullet$ , 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 4.3В). Эти данные

свидетельствуют о значительном увеличении окислительного стресса в опухолевых клетках.

#### 4.4 Оценка правильности методики определения гидроксильных радикалов в клеточных культурах с использованием АЦЦ/Au/ИГЭ

Для оценки правильности методики применялся метод введено-найдено на модельных растворах, представляющих собой ФБР с рН 6,86, для трех уровней концентраций с использованием стандартных растворов перекиси водорода. Полученные данные приведены в таблице 4.5.

Таблица 4.5 – Оценка правильности методики ( $P = 0,95$ ;  $n = 3$ ;  $t_{\text{табл}} = 4,303$ )

Введено (нмоль/дм <sup>3</sup> )	Найдено (нмоль/дм <sup>3</sup> )	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.

#### 4.5 Метрологические характеристики методики определения гидроксильных радикалов в клеточных культурах с помощью АЦЦ/Au/ИГЭ

Для определения наименьшего содержания ОН-радикалов, при котором они могут быть обнаружены по данной методике анализа с заданной доверительной вероятностью, был рассчитан предел обнаружения гидроксильных радикалов. Расчет предела обнаружения ( $C_{\text{min}}$ ) проводился по  $3s$ -критерию по формуле 4.6.

$$C_{\text{min}} = \frac{3s_a}{a}, \quad (4.6)$$

где  $s_a$  – стандартное отклонение свободного коэффициента;

$a$  – чувствительность или угловой коэффициент градуировочного графика.

Так, предел обнаружения для разработанной методики составил 0,01 нмоль/дм<sup>3</sup>.

Для разработанной методики количественного определения гидроксильных радикалов в клеточных культурах были оценены следующие метрологические характеристики:

1. Показатель повторяемости – значение приписанной характеристики случайно погрешности результатов единичного анализа, полученных по методике в условиях повторяемости.

2. Показатель внутрилабораторной прецизионности – значение приписанной характеристики случайной погрешности результатов анализа, полученных по методике в условиях внутрилабораторной прецизионности.

3. Показатель точности – значение характеристики погрешности, установленное для любого результата анализа, полученного при соблюдении требований и правил данной методики [131].

4. Показатель правильности – значение систематической погрешности.

Точность означает степень близости результата измерений к принятому опорному значению, в качестве которого могут выступать:

1. теоретическое или установленное значение, базирующееся на научных принципах;

2. приписанное или аттестованное значение, базирующееся на экспериментальных работах какой-либо национальной или международной организации;

3. согласованное или аттестованное значение, базирующееся на совместных экспериментальных работах под руководством научной или инженерной группы;

4. математическое ожидание измеряемой характеристики, то есть среднее значение заданной совокупности результатов измерений – лишь в том случае, когда пункты 1–3 недоступны.

Прецизионность – это степень близости друг к другу независимых результатов измерений, полученных в конкретных регламентированных условиях.

Повторяемость – прецизионность в условиях повторяемости, т.е. в условиях, при которых независимые результаты измерений получают одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования, в пределах короткого промежутка времени [146].

Расчет данных метрологических характеристик для методики количественного определения гидроксильных радикалов в клеточных культурах приведен в приложении А. Полученные показатели для диапазона определяемых концентраций приведены в таблице 4.6.

Таблица 4.6 – Значения показателей повторяемости, внутрилабораторной прецизионности, правильности и точности ( $P = 0,95; n = 2; L = 15$ )

Концентрация ОН-радикалов (нмоль/дм <sup>3</sup> )	Показатель повторяемост и (относительно е среднеквадрат ическое отклонение повторяемост и), $\sigma_r$ (%)	Показатель внутрилабораторн ой прецизионности (относительное среднеквадратиче ское отклонение внутрилабораторн ой прецизионности), $\sigma_{Rл}$ (%)	Показатель правильности (границы относительно й систематичес кой погрешности при вероятности $P = 0,95$ ), $\pm\Delta_c$ (%)	Показатель точности (границы относитель ной погрешнос ти при $P =$ $0,95$ ), $\pm\Delta$ (%)
0,08	8	9	16	30
0,4	8	9	15	29
0,8	4	5	15	24
4	4	5	12	20
8	3	5	8	17

Исходя из значений таблицы 4.6 видно, что для всего диапазона измерений концентрации ОН-радикалов можно установить одно максимальное значение показателей повторяемости, внутрилабораторной прецизионности, правильности и точности. По данным метрологическим параметрам принято решение приписать наибольшую погрешность, равную 30%, для всех рассматриваемых концентраций. Данные показатели приведены в таблице 4.7.

Таблица 4.7 – Диапазон измерений, значения показателей повторяемости, внутрилабораторной прецизионности, правильности и точности ( $P = 0,95$ ;  $n = 2$ ;  $L = 15$ )

Диапазон измерений (нмоль/дм <sup>3</sup> )	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости), $\sigma_r$ (%)	Показатель внутрилабораторной прецизионности (относительное среднеквадратическое отклонение внутрилабораторной прецизионности), $\sigma_{Rл}$ (%)	Показатель правильности (границы относительно й систематической погрешности при вероятности $P = 0,95$ ), $\pm\Delta_c$ (%)	Показатель точности (границы относительной погрешности при $P = 0,95$ ), $\pm\Delta$ (%)
от 0,08 до 8	8	9	16	30

Как видно из таблицы 4.7, 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.

## ГЛАВА 5 ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТОВ ПО ОТНОШЕНИЮ К ГИДРОКСИЛЬНЫМ РАДИКАЛАМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НОВОГО ИМПЕДАНСОМЕТРИЧЕСКОГО СЕНСОРА

### 5.1 Оценка активности некоторых антиоксидантов в модельном растворе

Современные представления об окислительном стрессе обуславливают важность антиоксидантной терапии не только в процессе различных заболеваний, но и в повседневной жизни человека. Известно, что большинство антиоксидантов обладают способностью ингибировать различные активные формы кислорода, такие как супероксид анион-радикал или перекись водорода, однако эти же антиоксиданты не всегда могут быть эффективны по отношению к гидроксильным радикалам. Так как разработанный сенсор АЦЦ/Au/ИГЭ показал высокую селективность и чувствительность по отношению к ОН-радикалам, он был применен для оценки активности некоторых антиоксидантов по отношению к гидроксильным радикалам.

В качестве исследуемых антиоксидантов были выбраны четыре соединения: аскорбиновая кислота, глутатион, коэнзим Q10 и кверцетин. Данные вещества относятся к различным типам антиоксидантов. Так, кверцетин относится к классу флавоноидов, коэнзим Q10 к типу соединений, содержащих хиноидную группу, глутатион – представитель сераорганических соединений, синтезируемых в организме.

Активность выбранных антиоксидантов исследовали на трех уровнях концентраций:  $1 \cdot 10^{-4}$ ,  $1 \cdot 10^{-5}$  и  $1 \cdot 10^{-6}$  моль/дм<sup>3</sup>. Выбор данного концентрационного диапазона обусловлен перспективой дальнейшего изучения активности антиоксидантов в биологических образцах, что предполагает использование низких концентраций, а также тем фактом, что некоторые из антиоксидантов в высоких концентрациях способны действовать как прооксиданты [147].

Для оценки способности антиоксидантов улавливать гидроксильные радикалы в ячейку с 10 см<sup>3</sup> ФБР рН 6,86 вносили определенный объем

антиоксиданта, после чего вносили  $0,5 \text{ см}^3 \text{ H}_2\text{O}_2$  ( $2 \cdot 10^{-8}$  моль/дм<sup>3</sup>) для генерации гидроксильных радикалов в концентрации  $1 \cdot 10^{-9}$  моль/дм<sup>3</sup>. Подготовленную ячейку с внесенным сенсором облучали УФ-излучением в течение 15 мин, после чего измеряли емкость двойного электрического слоя методом нефарадеевского импеданса. Для оценки активности антиоксидантов по отношению к ОН-радикалам использовали два критерия: концентрацию ОН<sup>•</sup>, подвергнутых действию антиоксиданта, а также процент уловленных ОН-радикалов. Концентрацию ОН-радикалов, подвергнутых действию антиоксиданта, рассчитывали по формуле (5.1):

$$C'_{\text{ОН}} = C_{\text{ОН}} - \frac{\Delta C_{\text{ант}}}{\Delta C_{\text{ОН}}} \cdot C_{\text{ОН}}, \quad (5.1)$$

где  $C'_{\text{ОН}}$  – концентрация ОН-радикалов, ингибированных антиоксидантом;

$C_{\text{ОН}}$  – начальная концентрация ОН-радикалов ( $1 \cdot 10^{-9}$  моль/дм<sup>3</sup>);

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

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

Процент уловленных ОН-радикалов определяются по формуле (5.2):

$$\%_{\text{ОН}} = 1 - \left( \frac{\Delta C_{\text{ант}}}{\Delta C_{\text{ОН}}} \right), \quad (5.2)$$

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.

Зависимости процента уловленных ОН-радикалов от типа и концентрации антиоксиданта представлены на рисунке 5.1.

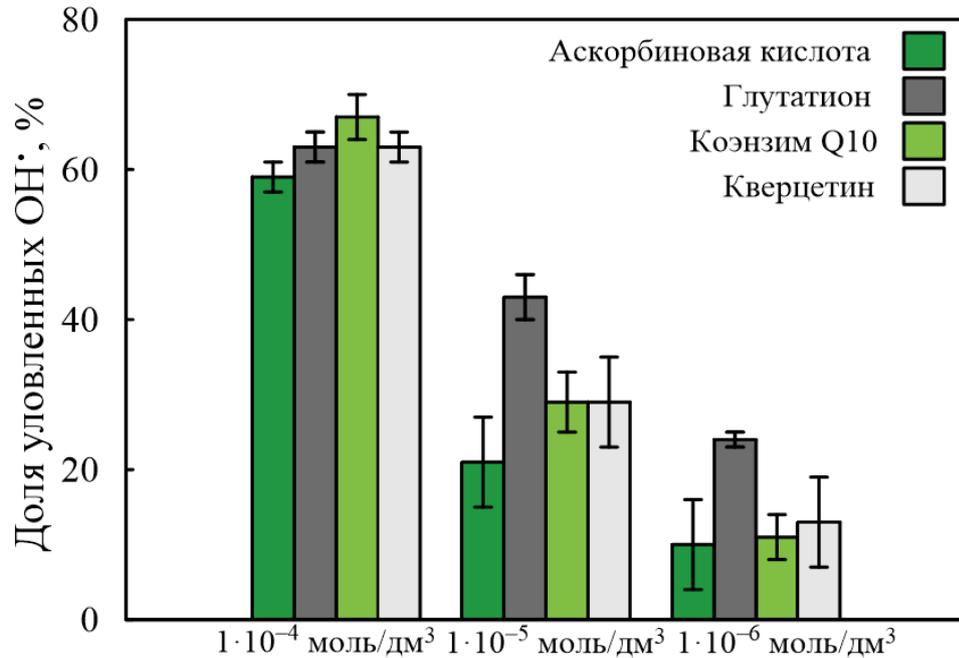


Рисунок 5.1 – Оценка активности антиоксидантов по отношению к гидроксильным радикалам ( $P = 0,95$ ;  $n = 3$ )

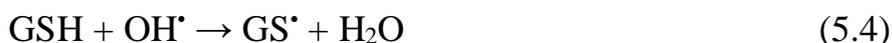
Как видно из рисунка, при высокой концентрации антиоксидантов ( $1 \cdot 10^{-4}$  моль/дм<sup>3</sup>) все четыре вещества проявляют приблизительно одинаковую способность улавливать OH-радикалы. Однако при уменьшении концентрации антиоксидантов активность аскорбиновой кислоты, коэнзима Q10 и кверцетина в отношении OH· заметно снижается, в то время как глутатион показывает самый высокий процент ингибирования гидроксильных радикалов даже при концентрации  $1 \cdot 10^{-6}$  моль/дм<sup>3</sup>. Данная закономерность подтверждает известные данные, согласно которым глутатион за счет наличия атома серы проявляет наибольшую способность улавливать OH-радикалы [148].

Взаимодействие гидроксильных радикалов с рассматриваемыми антиоксидантами протекает по следующим схемам. Реакция OH-радикалов с аскорбиновой кислотой (АН<sub>2</sub>) протекает через отщепление атома водорода с образованием монодегидроаскорбата анион-радикала (А<sup>•-</sup>) [149]:



$$k_{5.3} = 4 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$$

Реакция взаимодействия гидроксильных радикалов с глутатионом (GSH) протекает через отщепление атома водорода [148], в результате чего образуются глутатионильный радикал (GS<sup>•</sup>) и дисульфид глутатиона (GS-SG):



$$k_{5.4} = (5,4 \pm 0,4) \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$$



$$2k_{5.5} = 1,5 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$$

Помимо этого, в реакции может образовываться углерод-центрированный радикал (<sup>•</sup>GSH):



$$k_{5.6} = 8 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$$

В литературе нет данных о кинетике реакций взаимодействия коэнзима Q10 или кверцетина с OH-радикалами, однако, исходя из основных типов реакций, в которые могут вступать гидроксильные радикалы, можно предположить, что взаимодействие данных антиоксидантов с OH<sup>•</sup> будет протекать либо через отщепление атома водорода в случае кверцетина, либо через присоединение к двойной связи или к ароматическому кольцу в случае коэнзима Q10 [150].

В таблице 5.1 приведены результаты количественной оценки уловленных OH-радикалов (C'<sub>OH</sub>) различными антиоксидантами в зависимости от их концентраций.

Таблица 5.1 – Количество OH-радикалов, ингибированных различными антиоксидантами, в зависимости от концентрации антиоксидантов ( $P = 0,95$ ;  $n = 3$ )

Концентрация антиоксиданта (моль/дм <sup>3</sup> )	Процент OH-радикалов, уловленных антиоксидантом (%)	Концентрация уловленных OH-радикалов C' <sub>OH</sub> · 10 <sup>10</sup> (моль/дм <sup>3</sup> )
Аскорбиновая кислота		
1 · 10 <sup>-4</sup>	59 ± 2	5,9 ± 0,2
1 · 10 <sup>-5</sup>	21 ± 6	2,1 ± 0,6
1 · 10 <sup>-6</sup>	10 ± 6	1,0 ± 0,6

Продолжение таблицы 5.1

Концентрация антиоксиданта (моль/дм <sup>3</sup> )	Процент ОН-радикалов, уловленных антиоксидантом (%)	Концентрация уловленных ОН-радикалов $C'_{ОН} \cdot 10^{10}$ (моль/дм <sup>3</sup> )
Глутатион		
$1 \cdot 10^{-4}$	$63 \pm 2$	$6,3 \pm 0,2$
$1 \cdot 10^{-5}$	$43 \pm 3$	$4,3 \pm 0,3$
$1 \cdot 10^{-6}$	$24 \pm 1$	$2,4 \pm 0,1$
Коэнзим Q10		
$1 \cdot 10^{-4}$	$67 \pm 3$	$6,7 \pm 0,3$
$1 \cdot 10^{-5}$	$29 \pm 4$	$2,9 \pm 0,4$
$1 \cdot 10^{-6}$	$11 \pm 3$	$1,1 \pm 0,3$
Кверцетин		
$1 \cdot 10^{-4}$	$63 \pm 8$	$6,3 \pm 0,8$
$1 \cdot 10^{-5}$	$29 \pm 10$	$2,9 \pm 1,0$
$1 \cdot 10^{-6}$	$13 \pm 10$	$1,3 \pm 1,0$

Данные, представленные в таблице 5.1, коррелируют с данными рисунка 5.1 и убедительно свидетельствуют об эффективности использования данных биологических веществ в антиоксидантной терапии для ингибирования ОН-радикалов.

Исследование зависимости активности антиоксидантов в модельном растворе от концентрации антиоксиданта осуществлялось на примере аскорбиновой кислоты. Измерения проводились в диапазоне концентраций от 0,176 до 1760 мг/дм<sup>3</sup>. Полученные данные приведены на рисунке 5.2.

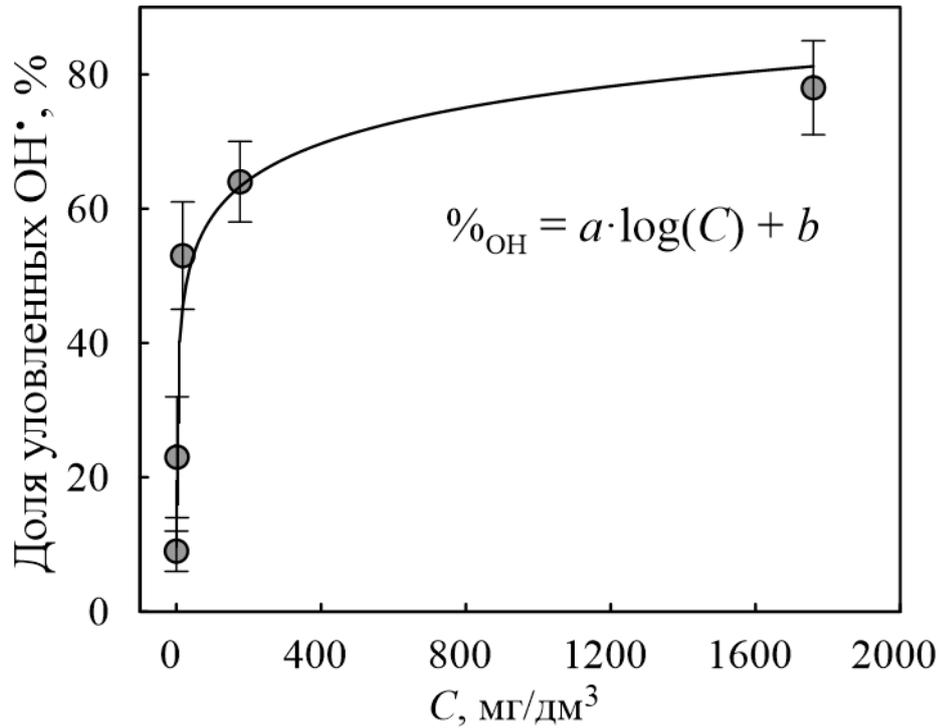


Рисунок 5.2 – Зависимости степени ингибирования ОН-радикалов аскорбиновой кислотой от концентрации антиоксиданта ( $P = 0,95$ ;  $n = 3$ )

Как видно из рисунка, полученная зависимость носит логарифмический характер. Таким образом, исходя из полученных данных видно, что активность аскорбиновой кислоты значительно увеличивается при увеличении концентрации от 0,176 до 17,6 мг/дм<sup>3</sup>, однако дальнейшее увеличение концентрации не приводит к заметному росту антиоксидантной активности.

Статистическая обработка полученной зависимости приведена в таблице 5.2.

Таблица 5.2 – Статистическая обработка уравнения зависимости, приведенной на рисунке 5.2 ( $P = 0,95$ ;  $n = 3$ )

Коэффициент	Значение коэффициента	Достигнутый уровень значимости	Коэффициент корреляции ( $R^2$ )
$a$	$18 \pm 2$	0,002	0,9729
$b$	$23 \pm 7$	0,0005	

Как видно из таблицы, значения достигнутого уровня значимости для всех коэффициентов ниже критического, что говорит о значимости этих коэффициентов. Помимо этого, значение коэффициента корреляции является

удовлетворительным, что указывает на правильность использования уравнения, указанного во вставке рисунка 5.2.

Таким образом, полученные значения антиоксидантной активности указывают на возможность применения разработанного подхода для оценки активности различных антиоксидантов в модельных средах, экстрактах растений, пищевых продуктах и биологических объектах.

## 5.2 Оценка активности антиоксидантов по отношению к гидроксильным радикалам в экстрактах растений

Для апробации разработанного подхода оценки активности антиоксидантов в различных объектах по отношению к гидроксильным радикалам были проведены исследования образцов водных экстрактов пихты сибирской, предоставленные ООО «Сибинверс». Для проведения комплексной оценки антиоксидантной активности образцов были исследованы различные степени разбавления экстрактов. Поскольку рекомендуемое разведение для приема экстракта составляет 1 см<sup>3</sup> экстракта на 150 см<sup>3</sup> воды, было принято решение также исследовать концентрацию экстракта в 10 раз больше рекомендуемой дозировки, а также в 10 и 100 раз меньше. Результаты анализа представлены в таблице 5.3.

Таблица 5.3 – Процент уловленных ОН-радикалов различными образцами экстрактов ( $P = 0,95$ ;  $n = 3$ )

Образец	Разведение			
	10 см <sup>3</sup> /150 см <sup>3</sup>	1 см <sup>3</sup> /150 см <sup>3</sup>	0,1 см <sup>3</sup> /150 см <sup>3</sup>	0,01 см <sup>3</sup> /150 см <sup>3</sup>
I	(78 ± 2)%	(64 ± 4)%	(27 ± 6)%	(6 ± 2)%
II	(85 ± 1)%	(67 ± 3)%	(37 ± 2)%	(9 ± 4)%
III	(77 ± 6)%	(62 ± 6)%	(30 ± 10)%	(7 ± 4)%
IV	(96 ± 1)%	(77 ± 2)%	(34 ± 3)%	(9 ± 6)%
V	–	(81 ± 7)%	(64 ± 4)%	(13 ± 6)%

I – фильтрованный образец, концентрированный, срок хранения полтора года; II – фильтрованный образец, концентрированный, срок хранения четыре месяца; III – фильтрованный образец, концентрированный, срок хранения месяц; IV – нефильтрованный образец, концентрированный; V – фильтрованный образец, свежий, разведенный.

Как видно из таблицы 5.3, все экстракты показывают достаточно высокую антиоксидантную активность при разведении 10 см<sup>3</sup>/150 см<sup>3</sup> и 1 см<sup>3</sup>/150 см<sup>3</sup>.

Процент улавливая ОН-радикалов соизмерим со значениями, полученными для известных антиоксидантов (аскорбиновая кислота, глутатион). Однако стоит отметить, что образцы I–III, хранившиеся в течение определенного срока, показали меньший процент ингибирования ОН-радикалов по сравнению со свежими образцами, что указывает на влияние срока хранения на антиоксидантную активность. Также установлено, что образец IV показал практически полное улавливание гидроксильных радикалов при разведении в 10 раз больше указанного, однако образец V проявил наибольшую степень ингибирования ОН-радикалов при рекомендуемой степени разведения. Также важным показателем является высокая степень улавливания ОН-радикалов образцом V при концентрации в 10 раз меньше рекомендуемой, в то время как другие образцы показывают значительное уменьшение антиоксидантной активности при данном разведении.

Таким образом, разработанный подход может применяться для оценки активности антиоксидантов по отношению к ОН-радикалам в различных экстрактах, пищевых продуктах и лекарственных препаратах.

### **5.3 Оценка активности антиоксидантов по отношению к гидроксильным радикалам в клеточных культурах**

Поскольку разработанный подход оценки активности антиоксидантов зарекомендовал себя как быстрый и удобный способ определения степени ингибирования ОН-радикалов в различных объектах, было принято решение провести оценку активности некоторых антиоксидантов в опухолевых клетках. В качестве исследуемых клеточных культур были выбраны клетки РС-3, представленные в разделе 4.3, а также клетки А-431 (эпидермоидная карцинома) и U-87 (глиобластома). Оптические фотографии нормального роста клеток приведены на рисунке 5.3.

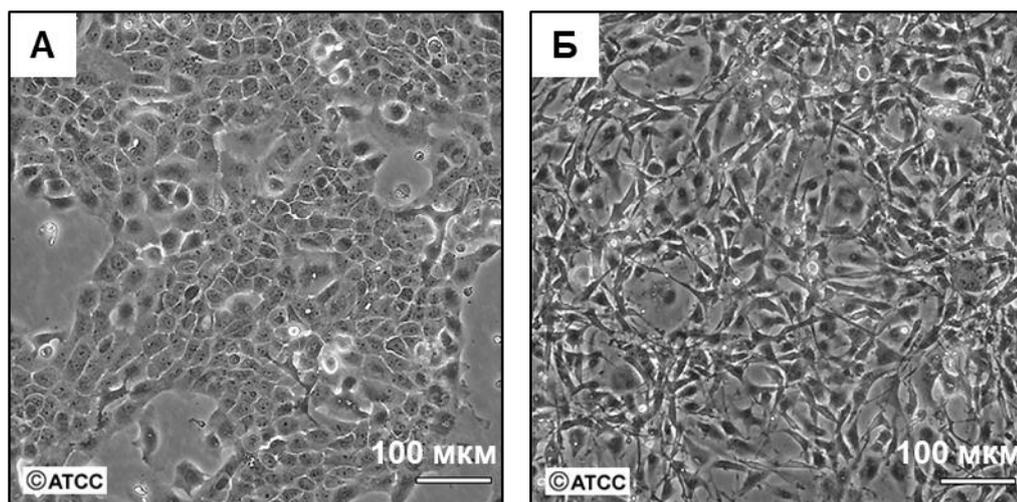


Рисунок 5.3 – Оптические фотографии клеток A-431 (А) и U-87 (Б) [151]

В качестве модельных антиоксидантов использовались аскорбиновая кислота и глутатион, поскольку они растворимы в воде, что позволяет избежать мешающего влияния со стороны этанола на живые клетки.

Подготовка клеточных культур к анализу и способ генерации ОН-радикалов в живых клетках были аналогичны процедуре в разделе 4.3. Для оценки активности выбранных антиоксидантов в чашку Петри с 2,25 см<sup>3</sup> ФБР pH 7,4 вносили определенный объем антиоксиданта для его концентрации 1·10<sup>-5</sup> моль/дм<sup>3</sup>, после чего клетки инкубировали с 1·10<sup>-7</sup> моль/дм<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в течение 15 минут. Результаты степени ингибирования ОН-радикалов антиоксидантами в живых клетках представлены в таблице 5.4.

Таблица 5.4 – Процент уловленных ОН-радикалов антиоксидантами в опухолевых клетках ( $P = 0,95$ ;  $n = 3$ )

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

Как видно из таблицы, данные 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.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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/дм<sup>3</sup>) 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<sup>•</sup>. Предложенный подход анализа активности антиоксидантов был апробирован на водных экстрактах пихты сибирской, что показывает возможность применения данного способа для исследования различных экстрактов растений, пищевых продуктов и лекарственных препаратов. 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.

## СПИСОК ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

- 1-ГТ – 1-гексантиол;
- ABTS – 2,2'-азино-ди-[3-этилбензтиазолинсульфонат];
- АН<sub>2</sub> – аскорбиновая кислота;
- CPE – элемент постоянной фазы;
- CUPRAC – метод снижения антиоксидантной способности меди CUPric Reducing Antioxidant Capacity;
- DCFH-DA – 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин;
- DMEM – клеточная среда Dulbecco's Modified Eagle Medium;
- GSH – глутатион;
- GS-SG – дисульфид глутатиона;
- ORAC – антиоксидантная емкость кислородных радикалов Oxygen radical antioxidant capacity;
- VDAC – потенциал-зависимый анионный канал;
- АОА – антиоксидантная активность;
- АОЕ – антиоксидантная емкость;
- АОС – антиоксидантная система;
- АФК – активные формы кислорода;
- АЦЦ – N-ацетил-L-цистеин;
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;
- ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектором;
- ГПО – глутатионпероксидазы;
- ГТ – глутатион-S-трансферазы;
- ГХ – газовая хроматография;
- ГХ-МС – газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектором;
- ДИВ – дифференциальная импульсная вольтамперометрия;
- ДМПО – 5,5-диметил-1-пирролин-N-оксид;
- ДЭС – двойной электрический слой;
- ИГЭ – импрегнированный графитовый электрод;

КВВ – квадратно-волновая вольтамперометрия;  
ОО – образец для оценивания;  
ПОЛ – перекисное окисление липидов;  
ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия;  
СКО – среднее квадратическое отклонение;  
СОД – супероксиддисмутаза;  
СОД1 – медь-цинковая супероксиддисмутаза;  
СОД2 – марганцевая супероксиддисмутаза;  
СОД3 – экстрацеллюлярная супероксиддисмутаза;  
СОМ – самоорганизующийся монослой;  
СЭМ – сканирующая электронная микроскопия;  
ФБН – фенилбутилнитрон;  
ФБР – фосфатно-буферный раствор;  
ХСЭ – хлоридсеребряный электрод;  
ЦВА – циклическая вольтамперометрия;  
ЦПЭ – цепь переноса электронов;  
ЭДС – энергодисперсионный анализ;  
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота;  
ЭИС – электрохимическая импедансная спектроскопия;  
ЭПР – электронный парамагнитный резонанс.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Halliwell B. Free Radicals in Biology and Medicine / B. Halliwell, J. M. C., Gutteridge. – Oxford: Oxford University Press, 2015. – 905 с.
2. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / Е. Б. Меньщикова, В. З. Ланкин, Н. К. Зенков [и др.]. – М.: Слово, 2006. – 556 с.
3. Mailloux R. J. Unearthing the secrets of mitochondrial ROS and glutathione in bioenergetics / R. J. Mailloux, S. L. McBride, M. E. Harper // Trends in biochemical sciences. – 2013. – Т. 38. – № 12. – С. 592–602.
4. ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cells / A. V. Snezhkina, A. V. Kudryavtseva, A. V. Kardymon [и др.] // Oxidative medicine and cellular longevity. – 2019. – Т. 2019. – № 1. – С. 1–17.
5. The Interplay of Reactive Oxygen Species, Hypoxia, Inflammation, and Sirtuins in Cancer Initiation and Progression / M. Tafani, L. Sansone, F. Limana [и др.] // Oxidative medicine and cellular longevity. – 2016. – Т. 2016. – № 1. – С. 1–18.
6. Spencer N. Y. The basic biology of redoxosomes in cytokine-mediated signal transduction and implications for disease-specific therapies / N.Y. Spencer, J.F. Engelhardt // Biochemistry. – 2014. – Т. 53. – № 10. – С. 1551–1564.
7. ROS systems are a new integrated network for sensing homeostasis and alarming stresses in organelle metabolic processes / Y. Sun, Y. Lu, J. Saredy [и др.] // Redox biology. – 2020. – Т. 37. – С. 101696.
8. Li J. M. Endothelial cell superoxide generation: Regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology / J. M. Li, A. M. Shah // American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. – 2004. – Т. 287. – № 5. – С. 1014–1030.
9. Harris I. S. The Complex Interplay between Antioxidants and ROS in Cancer / I. S. Harris, G. M. DeNicola // Trends in cell biology. – 2020. – Т. 30. – № 6. – С. 440–451.
10. Molecular Mechanisms of Endothelial NO Synthase Uncoupling / S. Luo, H. Lei, H. Qin, Y. Xia // Current pharmaceutical design. – 2014. – Т. 20. – № 22. – С. 3548–3553.

11. Robinson J. M. Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes / J. M. Robinson // *Histochemistry and cell biology*. – 2008. – Т. 130. – № 2. – С. 281–297.
12. Electrochemical Sensors for the Detection of Reactive Oxygen Species in Biological Systems: A Critical Review / A. V. Geraskevich, A. N. Solomonenko, E. V. Dorozhko [и др.] // *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. – 2024. – Т. 54. – № 4. – С. 742–774.
13. Кулинский В. И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред и защита / В. И. Кулинский // *Соросовский образовательный журнал*. – 1999. – Т. 5. – № 1. – С. 2–7.
14. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay / A. Rahal, A. Kumar, V. Singh [и др.] // *BioMed research international*. – 2014. – Т. 2014. – С. 1–19.
15. Sayre L. M. Oxidative stress and neurotoxicity / L. M. Sayre, G. Perry, M. A. Smith // *Chemical research in toxicology*. – 2008. – Т. 21. – № 1. – С. 172–188.
16. Pollack M. Apoptosis and Aging: Role of the Mitochondria / M. Pollack, C. Leeuwenburgh // *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. – 2001. – Т. 56. – № 11. – С. B475–B482.
17. Cutler R. G. *Critical Reviews of Oxidative Stress and Aging* / R. G. Cutler, H. Rodriguez. – Singapore: World Scientific, 2003. – 1513 с.
18. Свободные радикалы в живых системах / Ю. А. Владимиров, О. А. Азизова, А. И. Деев, А. В. Козлов // *Итоги науки и техники. Биофизика*. – 1991. – Т. 29. – С. 132–168.
19. Goldstein S. The Fenton reagents / S. Goldstein, D. Meyerstein, G. Czapski // *Free radical biology and medicine*. – 1993. – Т. 15. – № 4. – С. 435–445.
20. Copper-ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide / O. I. Aruoma, B. Halliwell, E. Gajewski, M. Dizdaroglu // *Biochemical Journal*. – 1991. – Т. 273. – № 3. – С. 601–604.
21. Possible Sources of Iron for Lipid Peroxidation / G. Minotti, M. D. Gennaro, D. D'ugo, P. Granone // *Free Radical Research Communications*. – 1991. – Т. 12. –

- № 1. – С. 99–106.
22. Kehrer J. P. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity / J. P. Kehrer // *Toxicology*. – 2000. – Т. 149. – № 1. – С. 43–50.
  23. Roots R. Estimation of Life Times and Diffusion Distances of Radicals Involved in X-Ray-Induced DNA Strand Breaks or Killing of Mammalian Cells / R. Roots, S. Okada // *Radiation research*. – 1975. – Т. 64. – № 2. – С. 306–320.
  24. Панасенко О. М. Хлорноватистая кислота как предшественник свободных радикалов в живых системах / О. М. Панасенко, И. В. Горудко, А. В. Соколов // *Успехи биологической химии*. – 2013. – Т. 53. – С. 195–244.
  25. Зайцев В. Г. Методологические аспекты исследований свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма / В. Г. Зайцев, В. И. Закревский // *Вестник Волгоградской медицинской академии: Сборник научных трудов*. – 1998. – Т. 54. – № 4. – С. 49–53.
  26. Владимиров Ю. А. Свободные радикалы в биологических системах / Ю. А. Владимиров // *Соросовский образовательный журнал*. – 2000. – Т. 6. – № 12. – С. 13–19.
  27. Gilbert D. L. Fifty Years of Radical Ideas / D. L. Gilbert // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2000. – Т. 899. – № 1. – С. 1–14.
  28. Кузнецова А. А. Окисление ДНК и ее компонентов активными формами кислорода / А. А. Кузнецова, Д. Г. Кнорре, О. С. Федорова // *Успехи химии*. – 2009. – Т. 78. – № 7. – С. 714–734.
  29. Луцак В. И. Свободнорадикальное окисление белков и его связь с функциональным состоянием организма (обзор) / В. И. Луцак // *Биохимия*. – 2007. – Т. 72. – № 8. – С. 995–1017.
  30. Chen X. Oxidative stress in neurodegenerative diseases / X. Chen, C. Guo, J. Kong // *Neural regeneration research*. – 2012. – Т. 7. – № 5. – С. 376–385.
  31. Formation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals from A $\beta$  and  $\alpha$ -synuclein as a possible mechanism of cell death in Alzheimer's disease and Parkinson's disease / B. J. Tabner, S. Turnbull, O. M. El-Agnaf, D. Allsop // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2002. – Т. 32. – № 11. – С. 1076–1083.

32. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases / E. Dubois-Deruy, V. Peugnet, A. Turkieh, F. Pinet // *Antioxidants*. – 2020. – Т. 9. – № 9. – С. 864.
33. Dreher D. Role of oxygen free radicals in cancer development / D. Dreher, A. F. Junod // *European Journal of cancer*. – 1996. – Т. 32. – № 1. – С. 30–38.
34. Malins D. C. Progression of human breast cancers to the metastatic state is linked to hydroxyl radical-induced DNA damage / D. C. Malins, N. L. Polissar, S. J. Gunselman // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1996. – Т. 93. – № 6. – С. 2557–2563.
35. Sies H. Oxidative stress: From basic research to clinical application / H. Sies // *The American journal of medicine*. – 1991. – Т. 91. – № 3. – С. S31–S38.
36. X-Ray, NMR and Molecular Dynamics Studies on Reduced Bovine Superoxide Dismutase: Implications for the Mechanism / L. Banci, I. Bertini, B. Bruni [и др.] // *Biochemical and biophysical research communications*. – 1994. – Т. 202. – № 2. – С. 1088–1095.
37. Wendel A. Enzymes acting against reactive oxygen / A. Wendel // *Enzymes*. 1988. – Т. 6. – С. 161–167.
38. Чеснокова Н. П. Молекулярно-клеточные механизмы инактивации свободных радикалов в биологических системах / Н. П. Чеснокова, Е. В. Понукалина, М. Н. Бизенкова // *Успехи современного естествознания*. – 2006. – № 7. – С. 29–36.
39. Halliwell B. Biochemical mechanisms accounting for the toxic action of oxygen on living organisms: The key role of superoxide dismutase / B. Halliwell // *Cell biology international reports*. – 1978. – Т. 2. – № 2. – С. 113–128.
40. Eaton J. W. Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary / J. W. Eaton // *The Journal of laboratory and clinical medicine*. – 1991. – Т. 118. – № 1. – С. 3–4.
41. Калинина Е. В. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов / Е. В. Калинина, Н. Н. Чернов, М. Д. Новичкова // *Успехи биологической химии*. – 2014. – Т. 54. – С. 299–348.
42. Niki E. Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals

- / E. Niki // *The American journal of clinical nutrition*. – 1991. – Т. 54. – № 6. – С. 1119S-1124S.
43. Frei B. Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low-density lipoprotein against oxidative damage / B. Frei // *The American journal of clinical nutrition*. – 1991. – Т. 54. – № 6. – С. 1113S-1118S.
44. Перекисное окисление липидов и механизм антиоксидантного действия / В. В. Чудинова, С. М. Алексеев, Е. И. Захарова, Р. П. Евстигнеева // *Биоорганическая химия*. – 1994. – Т. 20. – № 10. – С. 1029–1047.
45. Антиоксиданты, перекисное окисление липидов и рецепторзависимое увеличение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в тромбоцитах человека / Е. В. Негреску, А. В. Лебедев, Г. Н. Балденков [и др.] // *Вопросы медицинской химии*. – 1992. – Т. 38. – № 1. – С. 36–39.
46. Freedman J. H. The Role of Glutathione in Copper Metabolism and Toxicity / J. H. Freedman, M. R. Ciriolo, J. Peisach // *Journal of Biological Chemistry*. – 1989. – Т. 264. – № 10. – С. 5598–5605.
47. Крылов Ю. Ф. Фармакология: учебник / Ю. Ф. Крылов, В. М. Бобырев // М.: ВУНМЦ МЗ РФ, 1999. – 352 с.
48. Frei B. The new US Dietary Reference Intakes for vitamins C and E / B. Frei, M. G. Traber // *Redox report*. – 2001. – Т. 6. – № 1. – С. 5–9.
49. Stephens N. G. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS) / N. G. Stephens // *Lancet*. – 1996. – Т. 347. – С. 408–416.
50. Sahyoun N. R. Vitamins C and E, and Mortality in an Elderly Population / N. R. Sahyoun, P. F. Jacques, R. M. Russell // *American journal of epidemiology*. – 1996. – Т. 144. – № 5. – С. 501–511.
51. Nakagawa K.  $\beta$ -Carotene as a high-potency antioxidant to prevent the formation of phospholipid hydroperoxides in red blood cells of mice / K. Nakagawa, K. Fujimoto, T. Miyazawa // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*. – 1996. – Т. 1299. – № 1. – С. 110–116.
52. Применение этилметилгидроксипиридина сукцината в лечении больных с

- сердечной недостаточностью / Г. И. Сидоренко, С. М. Комиссарова, С. Ф. Золотухина, М. Е. Петровская // Кардиология. – 2011. – Т. 51. – № 6. – С. 44–48.
53. Применение нейрометаболического протектора цитофлавина в терапии пограничных нервно-психических расстройств / С. А. Иванова, В. Я. Семке, Н. М. Ракитина [и др.] // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. – 2006. – № 2. – С. 101–103.
54. Эффективность нейрометаболического протектора цитофлавина у больных, перенесших ишемический инсульт, в раннем восстановительном периоде (многоцентровое рандомизированное исследование) / А. Агафьина, А. Коваленко, С. Румянцева [и др.] // Врач. – 2006. – № 1. – С. 60–65.
55. Ушлакова Е. А. Ацетилцистеин в клинической практике: настоящее и перспективы / Е. А. Ушлакова // Фарматека. – 2007. – Т. 17. – С. 30–36.
56. Скибицкий В. В. Артериальная гипертензия и депрессивные расстройства: возможности использования комбинированной антигипертензивной и психокорректирующей фармакотерапии / В. В. Скибицкий, А. В. Скибицкий, А. В. Фендрикова // Артериальная гипертензия. – 2016. – Т. 22. – № 5. – С. 505–518.
57. ЭПР-спектроскопия, электрохимические и комбинированные методы анализа: учебно-методическое пособие / А. Н. Козицина, А. В. Иванова, Ю. А. Глазырина [и др.]. – Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2018. – 60 с.
58. Инграм Д. Электронный парамагнитный резонанс в свободных радикалах / Д. Инграм, Л. А. Блюменфельд. – Москва: Изд-во иностр. лит., 1961. – 346 с.
59. Detection of free radicals during brain ischemia and reperfusion by spin trapping and microdialysis / I. Zini, A. Tomasi, R. Grimaldi [и др.] // Neuroscience letters. – 1992. – Т. 138. – № 2. – С. 279–282.
60. Serum Hydroxyl Radical Scavenging Capacity as Quantified with Iron-Free Hydroxyl Radical Source / N. Endo, S. Oowada, Y. Sueishi [и др.] // Journal of clinical biochemistry and nutrition. – 2009. – Т. 45. – № 2. – С. 193–201.
61. Маряхина В. С. Оптические методы в химии, биологии и медицине / В. С.

- Маряхина. – Москва: ООО «ФЛИНТА», 2015. – 144 с.
62. Johnson I. Fluorescent probes for living cells / I. Johnson // *The Histochemical Journal*. – 1998. – Т. 30. – № 3. – С. 123–140.
  63. Fluorescent detectors for hydroxyl radical and their applications in bioimaging: A review / J. T. Hou, M. Zhang, Y. Liu [и др.] // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2020. – Т. 421. – С. 213457.
  64. Validation of a robust and sensitive method for detecting hydroxyl radical formation together with evoked neurotransmitter release in brain microdialysis / W. Freinbichler, M. A. Colivicchi, M. Fattori [и др.] // *Journal of neurochemistry*. – 2008. – Т. 105. – № 3. – С. 738–749.
  65. Study of OH• Radicals in Human Serum Blood of Healthy Individuals and Those with Pathological Schizophrenia / E. I. Korotkova, B. Misini, E. V. Dorozhko [и др.] // *International journal of molecular sciences*. – 2011. – Т. 12. – № 1. – С. 401–409.
  66. Fluorescent TPA@GQDs Probe for Sensitive Assay and Quantitative Imaging of Hydroxyl Radicals in Living Cells / X. Hai, Z. Guo, X. Lin [и др.] // *ACS applied materials & interfaces*. – 2018. – Т. 10. – № 6. – С. 5853–5861.
  67. Detection Technologies for Reactive Oxygen Species: Fluorescence and Electrochemical Methods and Their Applications / S. Duanghathaipornsuk, E. J. Farrell, A. C. Alba-Rubio [и др.] // *Biosensors*. – 2021. – Т. 11. – № 2. – С. 30.
  68. Cheng F. C. Hydroxyl radical in living systems and its separation methods / F. C. Cheng, J. F. Jen, T. H. Tsai // *Journal of Chromatography B*. – 2002. – Т. 781. – № 1–2. – С. 481–496.
  69. Use of salicylate with high pressure liquid chromatography and electrochemical detection (LCED) as a sensitive measure of hydroxyl chemical detection (LCED) as a sensitive measure of hydroxyl free radicals in adriamycin treated rats / R. A. Floyd, R. Henderson, J. J. Watson, P. K. Wong // *Journal of free radicals in biology & medicine*. – 1986. – Т. 2. – С. 13–18.
  70. Coudray C. Determination of salicylate hydroxylation products as an in vivo oxidative stress marker / C. Coudray, A. Favier // *Free Radical Biology and*

- Medicine. – 2000. – Т. 29. – № 11. – С. 1064–1070.
71. McCabe D. R. Improved method for the estimation of hydroxyl free radical levels in vivo based on liquid chromatography with electrochemical detection / D. R. McCabe, T. J. Maher, I. N. Acworth // *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. – 1997. – Т. 691. – № 1. – С. 23–32.
  72. Detection and scavenging of hydroxyl radical via D-phenylalanine hydroxylation in human fluids / R. Biondi, S. Brancorsini, G. Poli [и др.] // *Talanta*. – 2018. – Т. 181. – С. 172–181.
  73. Tabatabaei A. R. LC/MS analysis of hydroxylation products of salicylate as an indicator of in vivo oxidative stress / A. R. Tabatabaei, F. S. Abbott // *Free Radical Biology and Medicine*. – 1999. – Т. 26. – № 7–8. – С. 1054–1058.
  74. Luo X. Determination of hydroxyl radicals using salicylate as a trapping agent by gas chromatography-mass spectrometry / X. Luo, D. C. Lehotay // *Clinical biochemistry*. – 1997. – Т. 30. – № 1. – С. 41–46.
  75. Disposable electrochemical sensors for the analysis of environmental samples / M. R. Tarasevich, V. A. Bogdanovskaya, L. V. Gegeshidze [и др.] // *Journal of Analytical Chemistry*. – 1999. – Т. 54. – № 9. – С. 858–863.
  76. Sensitive electrochemical detection of hydroxyl radical with biobarcode amplification / L. Wu, Y. Yang, H. Zhang [и др.] // *Analytica chimica acta*. – 2012. – Т. 756. – С. 1–6.
  77. A sensitive electrochemical method based on Fenton-induced DNA oxidation for detection of hydroxyl radical / J. C. Si, L. Lu, Z. F. Gao [и др.] // *Analytical Methods*. – 2014. – Т. 6. – № 16. – С. 6536–6540.
  78. Real Time Detection of Hazardous Hydroxyl Radical Using an Electrochemical Approach / Y. Huang, A. Sinha, H. Zhao [и др.] // *ChemistrySelect*. – 2019. – Т. 4. – № 43. – С. 12507–12511.
  79. A novel electrochemical sensor for determination of hydroxyl radicals in living cells by coupling nanoporous gold layer with self-assembled 6-(Ferrocenyl) hexanethiol / Y. Xu, D. Wang, Y. Zhang [и др.] // *Analytica Chimica Acta*. – 2020. – Т. 1096. – С. 69–75.

80. In situ detection of hydroxyl radicals in mitochondrial oxidative stress with a nanopipette electrode / W. Chen, S. Ding, J. Wu [и др.] // *Chemical Communications*. – 2020. – Т. 56. – № 86. – С. 13225–13228.
81. Sensitive and Selective Measurement of Hydroxyl Radicals at Subcellular Level with Tungsten Nanoelectrodes / S. Ding, M. Li, H. Gong [и др.] // *Analytical chemistry*. – 2020. – Т. 92. – № 3. – С. 2543–2549.
82. Gualandi I. A new electrochemical sensor for OH radicals detection / I. Gualandi, D. Tonelli // *Talanta*. – 2013. – Т. 115. – С. 779–786.
83. A Polypyrrole Based Sensor for the Electrochemical Detection of OH Radicals / I. Gualandi, L. Guadagnini, S. Zappoli, D. Tonelli // *Electroanalysis*. – 2014. – Т. 26. – № 7. – С. 1544–1550.
84. Indirect Electrochemical Sensing of Radicals and Radical Scavengers in Biological Matrices / F. Scholz, G. López de Lara González, L. Machado de Carvalho [и др.] // *Angewandte Chemie-International Edition*. – 2007. – Т. 46. – № 42. – С. 8079–8081.
85. Selective and sensitive determination of hydroxyl radicals generated from living cells through an electrochemical impedance method / A. Zhu, Y. Liu, Q. Rui, Y. Tian // *Chemical Communications*. – 2011. – Т. 47. – № 14. – С. 4279–4281.
86. Li L. An electrochemical strategy for fast monitoring of  $\cdot\text{OH}$  released from live cells at an electroactive FcHT-functional surface amplified by Au nanoparticles / L. Li, A. Zhua, Y. Tian // *Chemical Communications*. – 2013. – Т. 49. – № 13. – С. 1279–1281.
87. Wang D. Double signal amplification through a functionalized nanoporous Au–Ag alloy microwire and Au nanoparticles: development of an electrochemical  $\cdot\text{OH}$  sensor based on a self-assembled layer of 6-(ferrocenyl)hexanethiol / D. Wang, B. Huang, Y. Li // *Chemical Communications*. – 2019. – Т. 55. – № 17. – С. 2425–2428.
88. Electrochemical Assay to Quantify the Hydroxyl Radical Scavenging Activity of Medicinal Plant Extracts / M. Hilgemann, F. Scholz, H. Kahlert [и др.] // *Electroanalysis*. – 2010. – Т. 22. – № 4. – С. 406–412.

89. Free radical sensors based on inner-cutting graphene field-effect transistors / Z. Wang, K. Yi, Q. Lin [и др.] // *Nature communications*. – 2019. – Т. 10. – № 1. – С. 1–10.
90. A highly sensitive and selective artificial nanochannel for in situ detection of hydroxyl radicals in single living cell / F. Yang, Y. Zhu, C. Zhang [и др.] // *Analytica Chimica Acta*. – 2022. – Т. 1235. – С. 340537.
91. Supersensitive CeO<sub>x</sub>-based nanocomposite sensor for the electrochemical detection of hydroxyl free radicals / S. Duanghathaipornsuk, D. S. Kim, T. L. Phares [и др.] // *Nanoscale*. – 2021. – Т. 13. – № 9. – С. 5136–5144.
92. Ratiometric electrochemical determination of hydroxyl radical based on graphite paper modified with metal–organic frameworks and impregnated with salicylic acid / H. Dong, Z. Jiang, Y. Chen [и др.] // *Microchimica Acta*. – 2024. – Т. 191. – № 3. – С. 1–10.
93. Apak R. Current Issues in Antioxidant Measurement / R. Apak // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2019. – Т. 67. – № 33. – С. 9187–9202.
94. Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays / R. Apak, M. Özyürek, K. Güçlü, E. Çapanoğlu // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2016. – Т. 64. – № 5. – С. 997–1027.
95. Pisoschi A. M. Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review / A. M. Pisoschi, G. P. Negulescu // *Biochem Anal Biochem*. – 2011. – Т. 1. – № 1. – С. 1–10.
96. Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity Assay for Antioxidants in Human Serum and for Hydroxyl Radical Scavengers / R. Apak, K. Güçlü, M. Özyürek [и др.] // *Advanced protocols in oxidative stress II*. – 2010. – Т. 594. – С. 215–239.
97. Diagnostic value of the total antioxidant capacity (TAC) in human seminal plasma / R. Mahfouz, R. Sharma, D. Sharma [и др.] // *Fertility and sterility*. – 2009. – Т. 91. – № 3. – С. 805–811.
98. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions / O. Erel // *Clinical biochemistry*. – 2004. – Т. 37. –

- № 2. – С. 112–119.
99. Total Antioxidant Capacity and Antioxidant Enzymes in Serum, Saliva, and Gingival Crevicular Fluid of Preeclamptic Women With and Without Periodontal Disease / V. Canakci, A. Yildirim, C. Canakci [и др.] // *Journal of periodontology*. – 2007. – Т. 78. – № 8. – С. 1602–1611.
  100. Platinum Nanozyme-Enabled Colorimetric Determination of Total Antioxidant Level in Saliva / D. Pedone, M. Moglianetti, M. Lettieri [и др.] // *Analytical Chemistry*. – 2020. – Т. 92. – № 13. – С. 8660–8664.
  101. Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of Plasma and Other Biological and Food Samples / R. L. Prior, H. A. Hoang, L. Gu [и др.] // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2003. – Т. 51. – № 11. – С. 3273–3279.
  102. Harasym J. Effect of fruit and vegetable antioxidants on total antioxidant capacity of blood plasma / J. Harasym, R. Oledzki // *Nutrition*. – 2014. – Т. 30. – № 5. – С. 511–517.
  103. Wolfe K. L. Cellular Antioxidant Activity (CAA) Assay for Assessing Antioxidants, Foods, and Dietary Supplements / K. L. Wolfe, H. L. Rui // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2007. – Т. 55. – № 22. – С. 8896–8907.
  104. Antiproliferative and antioxidant effect of polar hemp extracts (*Cannabis sativa* L., Fedora cv.) in human colorectal cell lines / S. Moccia, F. Siano, G. L. Russo [и др.] // *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. – 2020. – Т. 71. – № 4. – С. 410–423.
  105. Quercetin and rutin exhibit antiamyloidogenic and fibril-disaggregating effects in vitro and potent antioxidant activity in APP<sub>swe</sub> cells / K. Jiménez-Aliaga, P. Bermejo-Bescós, J. Benedí, S. Martín-Aragón // *Life sciences*. – 2011. – Т. 89. – № 25–26. – С. 939–945.
  106. Ziyatdinova G. K. Electrochemical determination of the total antioxidant capacity of human plasma / G. K. Ziyatdinova, H. C. Budnikov, V. I. Pogorel’Tzev // *Analytical and bioanalytical chemistry*. – 2005. – Т. 381. – № 8. – С. 1546–1551.
  107. Ivanova A. V. Potentiometric Study of Antioxidant Activity: Development and

- Prospects / A. V. Ivanova, E. L. Gerasimova, K. Z. Brainina // Critical reviews in analytical chemistry. – 2015. – Т. 45. – № 4. – С. 311–322.
108. New Electrochemical Method of Determining Blood and Blood Fractions Antioxidant Activity / K. Z. Brainina, L. E. Alyoshina, E. E. Gerasimova [и др.] // Electroanalysis. – 2009. – Т. 21. – № 3–5. – С. 618–624.
109. Platinum electrode regeneration and quality control method for chronopotentiometric and chronoamperometric determination of antioxidant activity of biological fluids / K. Z. Brainina, A. V. Tarasov, Y. E. Kazakov, M. B. Vidrevich // Journal of electroanalytical chemistry. – 2018. – Т. 808. – С. 14–20.
110. Korotkova E. I. Study of antioxidant properties by voltammetry / E. I. Korotkova, Y. A. Karbainov, A. V. Shevchuk // Journal of Electroanalytical Chemistry. – 2002. – Т. 518. – № 1. – С. 56–60.
111. Study of Total Antioxidant Activity of Human Serum Blood in the Pathology of Alcoholism / E. I. Korotkova, W. Freinbichler, W. Linert [и др.] // Molecules. – 2013. – Т. 18. – № 2. – С. 1811–1818.
112. 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 [и др.] // Chemosensors. – 2021. – Т. 9. – № 5. – С. 103.
113. Ganesana M. Real-time monitoring of superoxide accumulation and antioxidant activity in a brain slice model using an electrochemical cytochrome c biosensor / M. Ganesana, J. S. Erlichman, S. Andreescu // Free Radical Biology and Medicine. – 2012. – Т. 53. – № 12. – С. 2240–2249.
114. Tissue-based biosensor for monitoring the antioxidant effect of orally administered drugs in the intestine / S. T. Rajendran, K. Huszno, G. Dębowski [и др.] // Bioelectrochemistry. – 2021. – Т. 138. – С. 107720.
115. Caco-2 cell-based electrochemical biosensor for evaluating the antioxidant capacity of Asp-Leu-Glu-Glu isolated from dry-cured Xuanwei ham / L. Xing, Q. Ge, D. Jiang [и др.] // Biosensors and Bioelectronics. – 2018. – Т. 105. – С. 81–89.
116. Chen J. yu и др. An AUC-based impedance sensing method for rapid assessment

- of antioxidant compounds with NIH-3T3 cells cultured in a 16-well E-plate with integrated microelectrode arrays / J. Y. Chen, C. M. Li, W. Zhu [и др.] // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2019. – Т. 283. – С. 390–398.
117. A novel electrochemical biosensor for antioxidant evaluation of phloretin based on cell-alginate/L-cysteine/gold nanoparticle-modified glassy carbon electrode / Y. Ye, J. Ji, F. Pi [и др.] // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2018. – Т. 119. – С. 119–125.
118. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology / J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel [и др.] // *Chemical reviews*. – 2005. – Т. 105. – № 4. – С. 1103–1169.
119. Synthesis of Precision Gold Nanoparticles Using Turkevich Method / J. Dong, P. L. Carpinone, G. Pyrgiotakis [и др.] // *KONA Powder and Particle Journal*. – 2020. – Т. 37. – С. 224–232.
120. Neyens E. A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique / E. Neyens, J. Baeyens // *Journal of Hazardous materials*. – 2003. – Т. 98. – № 1–3. – С. 33–50.
121.  $H_2O_2$  /  $O_3$ ,  $H_2O_2$  / UV And  $H_2O_2$  /  $Fe^{2+}$  Processes For The Oxidation Of Hazardous Wastes / P. Schulte, A. Bayer, F. Kuhn [и др.] // *Ozone: Science & Engineering*. – 1995. – Т. 17. – № 2. – С. 119–134.
122. Hsu C. H. Concerning the conversion of the constant phase element parameter  $Y_0$  into a capacitance / C. H. Hsu, F. Mansfeld // *Corrosion*. – 2001. – Т. 57. – № 09. – С. 747–748.
123. Lazanas A. C. Electrochemical Impedance Spectroscopy—A Tutorial / A. C. Lazanas, M. I. Prodromidis // *ACS Measurement Science Au*. – 2023. – Т. 3. – № 3. – С. 162–193.
124. The antioxidant action of N-acetylcysteine: Its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid / O. I. Aruoma, B. Halliwell, B. M. Hoey, J. Butler // *Free radical biology and medicine*. – 1989. – Т. 6. – № 6. – С. 593–597.
125. Collin F. Chemical Basis of Reactive Oxygen Species Reactivity and Involvement

- in Neurodegenerative Diseases / F. Collin // *International journal of molecular sciences*. – 2019. – Т. 20. – № 10. – С. 2407.
126. Sputtering enhanced peroxidase like activity of a dendritic nanochip for amperometric determination of hydrogen peroxide in blood samples / B. Purohit, K. Mahato, A. Kumar, P. Chandra // *Microchimica Acta*. – 2019. – Т. 186. – № 9. – С. 1–10.
127. Duesterberg C. K. Process optimization of fenton oxidation using kinetic modeling / C. K. Duesterberg, T. D. Waite // *Environmental science & technology*. – 2006. – Т. 40. – № 13. – С. 4189–4195.
128. A. Fischbacher Hydroxyl radical yields in the Fenton process under various pH, ligand concentrations and hydrogen peroxide/Fe(II) ratios / A. Fischbacher, C. von Sonntag, T. C. Schmidt // *Chemosphere*. – 2017. – Т. 182. – С. 738–744.
129. Lloyd R. V. The Origin of the Hydroxyl Radical Oxygen in the Fenton Reaction / R. V. Lloyd, P. M. Hanna, R. P. Mason // *Free radical biology and medicine*. – 1997. – Т. 22. – № 5. – С. 885–888.
130. Investigation of the Iron-Peroxo Complex in the Fenton Reaction: Kinetic Indication, Decay Kinetics, and Hydroxyl Radical Yields / H. L. Wiegand, C. T. Orths, K. Kerpen [и др.] // *Environmental science & technology*. – 2017. – Т. 51. – № 24. – С. 14321–14329.
131. РМГ 61-2010. Государственная система обеспечения единства измерений. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки. – Москва: Стандартинформ, 2013. – 59 с.
132. Understanding and modeling the formation and transformation of hydrogen peroxide in water irradiated by 254 nm ultraviolet (UV) and 185 nm vacuum UV (VUV): Effects of pH and oxygen / Q. Zhang, L. Wang, B. Chen [и др.] // *Chemosphere*. – 2020. – Т. 244. – С. 125483.
133. Stefan M. Advanced oxidation processes for water treatment: fundamentals and applications / M. Stefan. – London: IWA publishing, 2017. – 686 с.
134. Reduction of molecular oxygen by redox active thiols: comparison of glutathione,

- N-acetylcysteine, cysteine, and homocysteine / M. Nyui, Y. Shoji, M. Ueno [и др.] // *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. – 2019. – Т. 65. – № 3. – С. 185–192.
135. Shirayama H. Photodegradation of chlorinated hydrocarbons in the presence and absence of dissolved oxygen in water / H. Shirayama, Y. Tohezo, S. Taguchi // *Water research*. – 2001. – Т. 35. – № 8. – С. 1941–1950.
136. A dielectric model of self-assembled monolayer interfaces by capacitive spectroscopy / M. S. Goes, H. Rahman, J. Ryall [и др.] // *Langmuir*. – 2012. – Т. 28. – № 25. – С. 9689–9699.
137. Колпакова Н. А. Общие вопросы электрохимического анализа: учебное пособие / Н. А. Колпакова. – Томск: Изд-во ТПУ, 2022. – 173 с.
138. Girault H.H. Analytical and Physical Electrochemistry / H. H. Girault. – New York: EPFL Press, 2004. – 431 с.
139. Комптон Р. Г. Постигая вольтамперометрию / Р. Г. Комптон, К. Е. Бэнкс. – Томск: Изд-во ТПУ, 2015. – 509 с.
140. Hu I. F. Activation and deactivation of glassy carbon electrodes / I. F. Hu, D. H. Karweik, T. Kuwana // *Journal of electroanalytical chemistry and interfacial electrochemistry*. – 1985. – Т. 188. – № 1–2. – С. 59–72.
141. Bard A. J. Electrochemical methods: fundamentals and applications / A. J. Bard, L. R. Faulkner, H. S. White. – Hoboken: John Wiley & Sons, Ltd, 2022. – 1015 с.
142. Jacob J. D. C. In situ vibrational study of the reductive desorption of alkanethiol monolayers on gold by sum frequency generation spectroscopy / J. D. C. Jacob, T. R. Lee, S. Baldelli // *The Journal of Physical Chemistry C*. – 2014. – Т. 118. – № 50. – С. 29126–29134.
143. Электроаналитические методы: теория и практика / А. М. Бонд, Д. Инцельт, Х. Калерт [и др.]. – Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 326 с.
144. Analysis of impedance spectroscopy of aqueous supercapacitors by evolutionary programming: Finding DFRT from complex capacitance / A. Oz, S. Hershkovitz, N. Belman [и др.] // *Solid State Ionics*. – 2016. – Т. 288. – С. 311–314.
145. Короткова Е. И. Планирование и организация эксперимента: учебное

- пособие для вузов / Е. И. Короткова. – Томск: Изд-во ТПУ, 2010. – 122 с.
146. ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения. – Москва: Стандартинформ, 2009. – 24 с.
147. Naidu K. A. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview / K. A. Naidu // Nutrition journal. – 2003. – Т. 2. – № 1. – С. 1–10.
148. Abedinzadeh Z. Reactions of OH· and Br<sub>2</sub> radicals with glutathione. A radiolysis study / Z. Abedinzadeh, M. Gardés-Albert, C. Ferradini // International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part C. Radiation Physics and Chemistry. – 1992. – Т. 40. – № 6. – С. 551–558.
149. Cabelli D. E. Kinetics and mechanism for the oxidation of ascorbic acid/ascorbate by HO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub><sup>-</sup> radicals. A pulse radiolysis and stopped-flow photolysis study / D. E. Cabelli, B. H. J. Bielski // J. Phys. Chem. 1983. – Т. 87. – № 10. – С. 1809–1812.
150. J. Espinosa-García The Trapping of the OH Radical by Coenzyme Q. A Theoretical and Experimental Study / J. Espinosa-García, C. Gutiérrez-Merino // The Journal of Physical Chemistry A. – 2003. – Т. 107. – № 45. – С. 9712–9723.
151. ATCC: The Global Bioresource Center [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.atcc.org/> (дата обращения: 19.08.2024).

**ПРИЛОЖЕНИЕ А РАСЧЕТ МЕТРОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК  
МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГИДРОКСИЛЬНЫХ РАДИКАЛОВ В  
КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ**

*1. Оценка показателя повторяемости методики анализа*

Для оценки показателя повторяемости рассчитывают среднее арифметическое результатов единичного анализа содержания компонента в  $m$ -м образце для оценивания (ОО), полученных в условиях повторяемости, по формуле А.1:

$$X_{m,l} = \frac{\sum_{i=1}^N X_{m,li}}{N}, \quad (\text{А.1})$$

где  $X_{m,l}$  – среднее арифметическое результатов единичного анализа;

$X_{m,li}$  – результат единичного анализа;

$N$  – число параллельных измерений;

$m$  – номер ОО;

$l$  – номер независимого опыта.

Далее рассчитывают выборочную дисперсию ( $S_{m,l}^2$ ) по формуле 4.1 и выбирают наибольшее значение  $S_{m,l(\max)}^2$ . Проверяют гипотезу о равенстве генеральных дисперсий по значению критерия Кохрена ( $G_{m(\max)}$ ), используя формулу 4.2. Полученное значение критерия Кохрена сравнивают с табличным для числа степеней свободы  $\nu = N - 1$ , соответствующего максимальной дисперсии, и  $f = L$ , соответствующего числу суммируемых дисперсий, и доверительной вероятности  $P = 0,95$ . Если  $G_{m(\max)} > G_{\text{табл}}$ , то соответствующее  $S_{m,l(\max)}^2$  исключают из расчетов и повторяют процедуру до следующего по значению  $S_{m,l}^2$  и т.д. до тех пор, пока  $G_{m(\max)}$  не станет меньше либо равно  $G_{\text{табл}}$ .

Неисключенные из расчетов  $S_{m,l}^2$  считают однородными и по ним оценивают средние квадратические отклонения (СКО), характеризующие повторяемость результатов единичного анализа, полученных для содержания, соответствующего содержанию компонента в ОО. Эти СКО рассчитывают по формуле А.2:

$$S_{r,m} = \sqrt{\frac{\sum S_{m,l}^2}{L'}}, \quad (\text{A.2})$$

где  $S_{r,m}$  – СКО повторяемости;

$S_{m,l}^2$  – неисключенные дисперсии;

$L'$  – число неотброшенных дисперсий.

Показатель повторяемости методики анализа в виде СКО  $\sigma_{r,m}$  для содержания, соответствующего содержанию компонента в  $m$ -м ОО, устанавливают, принимая равным  $S_{r,m}$ .

### 2. Оценка показателя внутрилабораторной прецизионности

Рассчитывают общее среднее результатов анализа  $X_m$  по формуле А.3:

$$X_m = \frac{\sum_{l=1}^L X_{m,l}}{L}, \quad (\text{A.3})$$

где  $X_m$  – общее среднее результатов анализа;

$X_{m,l}$  – среднее арифметическое результатов единичного анализа;

$L$  – число независимых опытов.

Далее рассчитывают СКО результатов измерений, полученных в условиях внутрилабораторной прецизионности по формуле А.4:

$$S_{R,m} = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^L (X_{m,l} - X_m)^2}{L-1}}, \quad (\text{A.4})$$

где  $S_{R,m}$  – СКО результатов измерений, полученных в условиях внутрилабораторной прецизионности;

$X_{m,l}$  – среднее арифметическое результатов единичного анализа;

$X_m$  – общее среднее результатов анализа;

$L$  – число независимых опытов.

Показатель внутрилабораторной прецизионности в виде СКО  $\sigma_{R,m}$  для содержания, соответствующего содержанию компонента в  $m$ -м ОО, устанавливают, принимая равным  $S_{R,m}$ .

### 3. Оценка показателя правильности методики анализа

Рассчитывают значение смещения  $\Theta_m$  как разность между средним значением результатов анализа и аттестованным значением  $m$ -го ОО по формуле А.5:

$$\Theta_m = X_m - C_m, \quad (\text{A.5})$$

где  $\Theta_m$  – смещение;

$X_m$  – общее среднее результатов анализа;

$C_m$  – аттестованное значение  $m$ -го ОО.

Проверяют значимость вычисленного значения  $\Theta_m$  по критерию Стьюдента.

Для этого рассчитывают значение  $t$ -критерия для  $m$ -го ОО по формуле А.6:

$$t_m = \frac{|\Theta_m|}{\sqrt{\frac{s_{R,m}^2}{L} + \frac{\Delta_{0,m}^2}{3}}}, \quad (\text{A.6})$$

где  $t_m$  – критерий Стьюдента;

$\Theta_m$  – смещение;

$s_{R,m}^2$  – дисперсия общего среднего результата;

$L$  – число независимых опытов.

$\Delta_{0,m}$  – погрешность аттестованного значения  $m$ -го ОО.

Полученное значение  $t_m$  сравнивают с  $t_{\text{табл}}$  при числе степеней свободы  $f = L - 1$  для доверительной вероятности  $P = 0,95$ .

Если  $t_m \leq t_{\text{табл}}$ , то оценка смещения незначима на фоне случайного разброса, и в этом случае ее принимают равной нулю, а показатель правильности методики при получении экспериментальных данных в условиях внутрилабораторной прецизионности рассчитывают по формуле А.7:

$$\Delta_{с,m} = 1,96 \cdot \sqrt{\frac{s_{R,m}^2}{L} + \frac{\Delta_{0,m}^2}{3}} = 1,96 \cdot \sigma_{с,m}, \quad (\text{A.7})$$

где  $\Delta_{с,m}$  – показатель правильности методики анализа;

$s_{R,m}^2$  – дисперсия общего среднего результата;

$L$  – число независимых опытов.

$\Delta_{0,m}$  – погрешность аттестованного значения  $m$ -го ОО.

$\sigma_{с,m}$  – среднеквадратичное отклонение неисклученной систематической погрешности лаборатории.

Если  $t_m > t_{\text{табл}}$ , то оценка значения смещения значима на фоне случайного разброса. Показатель правильности методики рассчитывается по формуле А.8:

$$\Delta_{с,m} = \max\{|\Theta_m - 1,96 \cdot \sigma_{с,m}|, |\Theta_m + 1,96 \cdot \sigma_{с,m}|\}, \quad (\text{A.8})$$

где  $\Delta_{с,m}$  – показатель правильности методики анализа;

$\Theta_m$  – смещение;

$\sigma_{с,m}$  – среднеквадратичное отклонение неисключенной систематической погрешности лаборатории.

#### 4. Оценка показателя точности методики анализа

Показатель точности методики анализа при получении экспериментальных данных в условиях внутрилабораторной прецизионности для принятой вероятности  $P = 0,95$  рассчитывают по формуле А.9:

$$\Delta_m = 1,96 \cdot \sqrt{\sigma_{R,m}^2 + \sigma_{с,m}^2}, \quad (\text{А.9})$$

где  $\Delta_m$  – показатель правильности методики анализа;

$\sigma_{R,m}$  – показатель внутрилабораторной прецизионности;

$\sigma_{с,m}$  – среднеквадратичное отклонение неисключенной систематической погрешности лаборатории.

При значимости смещения на фоне случайного разброса расчет показателя точности методики анализа проводится по формуле А.10:

$$\Delta_m = \max\{|\Theta_m - 1,96 \cdot \sigma_m(\Delta)|, |\Theta_m + 1,96 \cdot \sigma_m(\Delta)|\}, \quad (\text{А.10})$$

где  $\Delta_m$  – показатель правильности методики анализа;

$\Theta_m$  – смещение;

$\sigma_m$  – среднеквадратичное отклонение.

Расчет метрологических характеристик для методики количественного определения гидроксильных радикалов в клеточных культурах проводился для всего диапазона концентраций градуировочной зависимости.

$$1. C_{OH} = 0,08 \text{ нмоль/дм}^3$$

Основные результаты расчета повторяемости приведены в таблице А.1.

Таблица А.1 – Расчет показателя повторяемости для концентрации гидроксильных радикалов 0,08 нмоль/дм<sup>3</sup>

$C_1$ (нмоль/ дм <sup>3</sup> )	$C_2$ (нмоль/ дм <sup>3</sup> )	$C_{\text{среднее}}$ (нмоль/ дм <sup>3</sup> )	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, $S^2$	$S^2_{\text{max}}$	$G_{\text{max}}$	$G_{\text{табл}}$	$S_r = \sigma_r$ (нмоль/дм <sup>3</sup> )	$\sigma_r$ (%)
0,075	0,065	0,070	$5,00 \cdot 10^{-5}$	$1,13 \cdot 10^{-4}$	0,268	0,471	0,00529	8
0,071	0,078	0,075	$2,45 \cdot 10^{-5}$					
0,071	0,067	0,069	$8,00 \cdot 10^{-6}$					
0,068	0,073	0,071	$1,25 \cdot 10^{-5}$					
0,085	0,075	0,080	$5,00 \cdot 10^{-5}$					
0,075	0,068	0,072	$2,45 \cdot 10^{-5}$					
0,084	0,069	0,077	$1,13 \cdot 10^{-4}$					
0,063	0,061	0,062	$2,00 \cdot 10^{-6}$					
0,073	0,078	0,076	$1,25 \cdot 10^{-5}$					
0,069	0,075	0,072	$1,80 \cdot 10^{-5}$					
0,071	0,062	0,067	$4,05 \cdot 10^{-5}$					
0,065	0,073	0,069	$3,20 \cdot 10^{-5}$					
0,053	0,058	0,056	$1,25 \cdot 10^{-5}$					
0,065	0,063	0,064	$2,00 \cdot 10^{-6}$					
0,068	0,074	0,071	$1,80 \cdot 10^{-5}$					

Как видно из таблицы А.1,  $G_{\text{max}} < G_{\text{табл}}$ , что подтверждает гипотезу о равенстве генеральных дисперсий.

Результаты расчета показателя внутрилабораторной прецизионности приведены в таблице А.2.

Таблица А.2 – Расчет показателя внутрилабораторной прецизионности для концентрации гидроксильных радикалов 0,08 нмоль/дм<sup>3</sup>

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	$S_R = \sigma_R$ (нмоль/дм <sup>3</sup> )	$\sigma_R$ (%)
0,070	0,00612	9

Оценка показателя правильности приведена в таблице А.3.

Таблица А.3 – Расчет показателя правильности для концентрации гидроксильных радикалов 0,08 нмоль/дм<sup>3</sup>

$\Theta$	$t$	$t_{\text{табл}}$	$\Delta_{c(\text{н})}$	$\Delta_{c(\text{в})}$	$\pm \Delta_c$ (нмоль/дм <sup>3</sup> )	$\pm \Delta_c$ (%)
-0,010	17,423	2,093	0,0113	0,00902	0,0113	16

Как видно из таблицы, значение критерия Стьюдента превышает табличное, в связи с чем необходимо проводить расчет нижней и верхней границ систематической погрешности.

Значение показателя точности, рассчитанное на основании данных таблиц А.2 и А.3, приведено в таблице А.4.

Таблица А.4 – Показатель точности для концентрации гидроксильных радикалов 0,08 нмоль/дм<sup>3</sup>

$\Delta$ (нмоль/дм <sup>3</sup> )	$\Delta$ (%)
0,02	30

$$2. C_{OH} = 0,4 \text{ нмоль/дм}^3$$

Основные результаты расчета повторяемости приведены в таблице А.5.

Таблица А.5 – Расчет показателя повторяемости для концентрации гидроксильных радикалов 0,4 нмоль/дм<sup>3</sup>

$C_1$ (нмоль/ дм <sup>3</sup> )	$C_2$ (нмоль/ дм <sup>3</sup> )	$C_{\text{среднее}}$ (нмоль/ дм <sup>3</sup> )	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, $S^2$	$S^2_{\text{max}}$	$G_{\text{max}}$	$G_{\text{табл}}$	$S_r = \sigma_r$ (нмоль/дм <sup>3</sup> )	$\sigma_r$ (%)
0,32	0,35	0,34	$4,50 \cdot 10^{-4}$	4,05 · 10 <sup>-3</sup>	0,314	0,471	0,0293	8
0,43	0,40	0,42	$4,50 \cdot 10^{-4}$					
0,37	0,35	0,36	$2,00 \cdot 10^{-4}$					
0,32	0,37	0,35	$1,25 \cdot 10^{-3}$					
0,32	0,36	0,34	$8,00 \cdot 10^{-4}$					
0,36	0,33	0,35	$4,50 \cdot 10^{-4}$					
0,31	0,36	0,34	$1,25 \cdot 10^{-3}$					
0,32	0,34	0,33	$2,00 \cdot 10^{-4}$					
0,40	0,35	0,38	$1,25 \cdot 10^{-3}$					
0,45	0,42	0,44	$4,50 \cdot 10^{-4}$					
0,39	0,30	0,35	$4,05 \cdot 10^{-3}$					
0,39	0,36	0,38	$4,50 \cdot 10^{-4}$					
0,32	0,34	0,33	$2,00 \cdot 10^{-4}$					
0,38	0,33	0,36	$1,25 \cdot 10^{-3}$					
0,35	0,37	0,36	$2,00 \cdot 10^{-4}$					

Как видно из таблицы А.5,  $G_{\text{max}} < G_{\text{табл}}$ , что подтверждает гипотезу о равенстве генеральных дисперсий.

Результаты расчета показателя внутрилабораторной прецизионности приведены в таблице А.6.

Таблица А.6 – Расчет показателя внутрилабораторной прецизионности для концентрации гидроксильных радикалов 0,4 нмоль/дм<sup>3</sup>

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	$S_R = \sigma_R$ (нмоль/дм <sup>3</sup> )	$\sigma_R$ (%)
0,36	0,0307	9

Оценка показателя правильности приведена в таблице А.7.

Таблица А.7 – Расчет показателя правильности для концентрации гидроксильных радикалов 0,4 нмоль/дм<sup>3</sup>

$\Theta$	$t$	$t_{\text{табл}}$	$\Delta_{c(n)}$	$\Delta_{c(v)}$	$\pm\Delta_c$ (нмоль/дм <sup>3</sup> )	$\pm\Delta_c$ (%)
-0,041	5,717	2,093	0,0555	0,0272	0,0555	15

Как видно из таблицы, значение критерия Стьюдента превышает табличное, в связи с чем необходимо проводить расчет нижней и верхней границ систематической погрешности.

Значение показателя точности, рассчитанное на основании данных таблиц А.6 и А.7, приведено в таблице А.8.

Таблица А.8 – Показатель точности для концентрации гидроксильных радикалов 0,4 нмоль/дм<sup>3</sup>

$\Delta$ (нмоль/дм <sup>3</sup> )	$\Delta$ (%)
0,1	29

3.  $C_{OH} = 0,8$  нмоль/дм<sup>3</sup>

Основные результаты расчета повторяемости приведены в таблице А.9.

Таблица А.9 – Расчет показателя повторяемости для концентрации гидроксильных радикалов 0,8 нмоль/дм<sup>3</sup>

$C_1$ (нмоль/дм <sup>3</sup> )	$C_2$ (нмоль/дм <sup>3</sup> )	$C_{\text{среднее}}$ (нмоль/дм <sup>3</sup> )	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, $S^2$	$S^2_{\text{max}}$	$G_{\text{max}}$	$G_{\text{табл}}$	$S_r = \sigma_r$ (нмоль/дм <sup>3</sup> )	$\sigma_r$ (%)
0,93	0,91	0,92	$2,00 \cdot 10^{-4}$	5,00 · 10 <sup>-3</sup>	0,290	0,471	0,0339	4
0,91	0,81	0,86	$5,00 \cdot 10^{-3}$					
0,85	0,82	0,84	$4,50 \cdot 10^{-4}$					
0,96	0,98	0,97	$2,00 \cdot 10^{-4}$					
0,91	0,96	0,94	$1,25 \cdot 10^{-3}$					
0,97	0,95	0,96	$1,45 \cdot 10^{-4}$					
0,86	0,96	0,91	$5,00 \cdot 10^{-3}$					
0,95	0,98	0,97	$4,50 \cdot 10^{-4}$					
0,96	0,94	0,95	$2,00 \cdot 10^{-4}$					

## Продолжение таблицы А.9

$C_1$ (нмоль/ дм <sup>3</sup> )	$C_2$ (нмоль/ дм <sup>3</sup> )	$C_{\text{среднее}}$ (нмоль/ дм <sup>3</sup> )	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, $S^2$	$S^2_{\text{max}}$	$G_{\text{max}}$	$G_{\text{табл}}$	$S_r = \sigma_r$ (нмоль/дм <sup>3</sup> )	$\sigma_r$ (%)
0,94	0,92	0,93	$2,00 \cdot 10^{-4}$	$5,00 \cdot 10^{-3}$	0,290	0,471	0,0339	4
0,86	0,84	0,85	$2,00 \cdot 10^{-4}$					
0,93	0,98	0,96	$1,25 \cdot 10^{-3}$					
0,98	0,95	0,97	$4,50 \cdot 10^{-4}$					
0,82	0,85	0,84	$4,50 \cdot 10^{-4}$					
0,91	0,85	0,88	$1,80 \cdot 10^{-3}$					

Как видно из таблицы А.9,  $G_{\text{max}} < G_{\text{табл}}$ , что подтверждает гипотезу о равенстве генеральных дисперсий.

Результаты расчета показателя внутрилабораторной прецизионности приведены в таблице А.10.

Таблица А.10 – Расчет показателя внутрилабораторной прецизионности для концентрации гидроксильных радикалов 0,8 нмоль/дм<sup>3</sup>

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	$S_R = \sigma_R$ (нмоль/дм <sup>3</sup> )	$\sigma_R$ (%)
0,91	0,0498	5

Оценка показателя правильности приведена в таблице А.11.

Таблица А.11 – Расчет показателя правильности для концентрации гидроксильных радикалов 0,8 нмоль/дм<sup>3</sup>

$\Theta$	$t$	$t_{\text{табл}}$	$\Delta_{c(n)}$	$\Delta_{c(v)}$	$\pm \Delta_c$ (нмоль/дм <sup>3</sup> )	$\pm \Delta_c$ (%)
0,12	8,914	2,093	0,0894	0,140	0,140	15

Как видно из таблицы, значение критерия Стьюдента превышает табличное, в связи с чем необходимо проводить расчет нижней и верхней границ систематической погрешности.

Значение показателя точности, рассчитанное на основании данных таблиц А.10 и А.11, приведено в таблице А.12.

Таблица А.12 – Показатель точности для концентрации гидроксильных радикалов 0,8 нмоль/дм<sup>3</sup>

$\Delta$ (нмоль/дм <sup>3</sup> )	$\Delta$ (%)
0,2	24

$$4. C_{OH} = 4 \text{ нмоль/дм}^3$$

Основные результаты расчета повторяемости приведены в таблице А.13.

Таблица А.13 – Расчет показателя повторяемости для концентрации гидроксильных радикалов 4 нмоль/дм<sup>3</sup>

$C_1$ (нмоль/ дм <sup>3</sup> )	$C_2$ (нмоль/ дм <sup>3</sup> )	$C_{\text{среднее}}$ (нмоль/ дм <sup>3</sup> )	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, $S^2$	$S^2_{\text{max}}$	$G_{\text{max}}$	$G_{\text{табл}}$	$S_r = \sigma_r$ (нмоль/дм <sup>3</sup> )	$\sigma_r$ (%)
4,53	4,61	4,57	$3,20 \cdot 10^{-3}$	2,05 · 10 <sup>-1</sup>	0,455	0,471	0,173	4
4,81	4,77	4,79	$8,00 \cdot 10^{-4}$					
4,50	4,89	4,70	$7,60 \cdot 10^{-2}$					
4,80	4,64	4,72	$1,28 \cdot 10^{-2}$					
4,68	4,04	4,36	$2,05 \cdot 10^{-1}$					
4,69	4,40	4,55	$4,21 \cdot 10^{-2}$					
4,49	4,53	4,51	$8,00 \cdot 10^{-4}$					
4,34	4,47	4,41	$8,45 \cdot 10^{-3}$					
4,20	4,30	4,25	$5,00 \cdot 10^{-3}$					
4,09	4,29	4,19	$2,00 \cdot 10^{-2}$					
3,98	4,12	4,05	$9,80 \cdot 10^{-3}$					
4,31	4,47	4,39	$1,28 \cdot 10^{-2}$					
3,95	4,05	4,00	$5,00 \cdot 10^{-3}$					
4,05	4,31	4,18	$3,38 \cdot 10^{-2}$					
4,42	4,59	4,51	$1,45 \cdot 10^{-2}$					

Как видно из таблицы А.13,  $G_{\text{max}} < G_{\text{табл}}$ , что подтверждает гипотезу о равенстве генеральных дисперсий.

Результаты расчета показателя внутрилабораторной прецизионности приведены в таблице А.14.

Таблица А.14 – Расчет показателя внутрилабораторной прецизионности для концентрации гидроксильных радикалов 4 нмоль/дм<sup>3</sup>

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	$S_R = \sigma_R$ (нмоль/дм <sup>3</sup> )	$\sigma_R$ (%)
4,11	0,241	5

Оценка показателя правильности приведена в таблице А.15.

Таблица А.15 – Расчет показателя правильности для концентрации гидроксильных радикалов 4 нмоль/дм<sup>3</sup>

$\Theta$	$t$	$t_{\text{табл}}$	$\Delta_{c(n)}$	$\Delta_{c(b)}$	$\pm \Delta_c$ (нмоль/дм <sup>3</sup> )	$\pm \Delta_c$ (%)
0,41	6,604	2,093	0,289	0,533	0,533	12

Как видно из таблицы, значение критерия Стьюдента превышает табличное, в связи с чем необходимо проводить расчет нижней и верхней границ систематической погрешности.

Значение показателя точности, рассчитанное на основании данных таблиц А.14 и А.15, приведено в таблице А.16.

Таблица А.16 – Показатель точности для концентрации гидроксильных радикалов 4 нмоль/дм<sup>3</sup>

$\Delta$ (нмоль/дм <sup>3</sup> )	$\Delta$ (%)
0,9	20

$$5. C_{OH} = 8 \text{ нмоль/дм}^3$$

Основные результаты расчета повторяемости приведены в таблице А.17.

Таблица А.17 – Расчет показателя повторяемости для концентрации гидроксильных радикалов 8 нмоль/дм<sup>3</sup>

$C_1$ (нмоль/ дм <sup>3</sup> )	$C_2$ (нмоль/ дм <sup>3</sup> )	$C_{\text{среднее}}$ (нмоль/ дм <sup>3</sup> )	Выборочная дисперсия результатов параллельных определений, $S^2$	$S^2_{\text{max}}$	$G_{\text{max}}$	$G_{\text{табл}}$	$S_r = \sigma_r$ (нмоль/дм <sup>3</sup> )	$\sigma_r$ (%)
8,23	7,96	8,10	0,036	0,205	0,270	0,471	0,225	3
7,92	8,25	8,09	0,054					
7,25	7,47	7,36	0,024					
7,40	7,28	7,34	0,007					
7,87	7,59	7,73	0,039					
7,32	7,58	7,45	0,034					
7,98	7,54	7,76	0,097					
6,92	6,87	6,90	0,001					
6,96	6,48	6,72	0,115					
7,53	7,38	7,46	0,011					
7,94	8,14	8,04	0,020					
7,68	7,48	7,58	0,020					
7,63	7,42	7,53	0,022					
7,31	7,69	7,50	0,072					
7,65	8,29	7,97	0,205					

Как видно из таблицы А.17,  $G_{\text{max}} < G_{\text{табл}}$ , что подтверждает гипотезу о равенстве генеральных дисперсий.

Результаты расчета показателя внутрилабораторной прецизионности приведены в таблице А.18.

Таблица А.18 – Расчет показателя внутрилабораторной прецизионности для концентрации гидроксильных радикалов 8 нмоль/дм<sup>3</sup>

Общее среднее арифметическое по 15 сериям	$S_R = \sigma_R$ (нмоль/дм <sup>3</sup> )	$\sigma_R$ (%)
7,57	0,405	5

Оценка показателя правильности приведена в таблице А.19.

Таблица А.19 – Расчет показателя правильности для концентрации гидроксильных радикалов 8 нмоль/дм<sup>3</sup>

$\Theta$	$t$	$t_{\text{табл}}$	$\Delta_{c(n)}$	$\Delta_{c(v)}$	$\pm\Delta_c$ (нмоль/дм <sup>3</sup> )	$\pm\Delta_c$ (%)
-0,43	4,144	2,093	0,638	0,228	0,638	8

Как видно из таблицы, значение критерия Стьюдента превышает табличное, в связи с чем необходимо проводить расчет нижней и верхней границ систематической погрешности.

Значение показателя точности, рассчитанное на основании данных таблиц А.18 и А.19, приведено в таблице А.20.

Таблица А.20 – Показатель точности для концентрации гидроксильных радикалов 8 нмоль/дм<sup>3</sup>

$\Delta$ (нмоль/дм <sup>3</sup> )	$\Delta$ (%)
1	17

Обобщенные результаты полученных данных приведены в разделе 4.5.

Рассчитанные показатели методики определения гидроксильных радикалов в клеточных культурах являются установленными характеристиками погрешности для совокупности результатов анализа, которые были получены по разработанной методике в отдельной лаборатории.