

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Уральский федеральный университет имени первого
Президента России Б.Н. Ельцина»

На правах рукописи



Варзакова Дарья Павловна

**НЕИНВАЗИВНЫЕ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ
ОЦЕНКИ АНТИОКСИДАНТ/ОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ
БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ**

1.4.2. Аналитическая химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Екатеринбург – 2021

Работа выполнена на кафедре физики и химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Уральский государственный экономический университет»

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор,
Брайнина Хьена Залмановна

Официальные оппоненты: **Шпигун Лилия Константиновна**,
доктор химических наук, профессор, ФГБУН Институт
общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова
Российской академии наук, г. Москва, главный научный
сотрудник лаборатории аналитической химии и методов
разделения;

Короткова Елена Ивановна,
доктор химических наук, доцент, ФГАОУ ВО
«Национальный исследовательский Томский
политехнический университет», г. Томск, заведующий
кафедрой – руководитель отделения химической
инженерии на правах кафедры Инженерной школы
природных ресурсов;

Неудачина Людмила Константиновна,
кандидат химических наук, доцент, ФГАОУ ВО
«Уральский федеральный университет имени первого
Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург,
заведующий кафедрой аналитической химии и химии
окружающей среды Института естественных наук и
математики

Защита состоится «14» декабря 2021 г. в 14:00 ч на заседании диссертационного совета УрФУ 2.6.02.07 по адресу: 620002, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19, ауд. И-420 (зал Ученого совета).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», <https://dissovet2.urfu.ru/mod/data/view.php?id=12&rid=2977>

Автореферат диссертации разослан « ____ » _____ 2021 года

Ученый секретарь
диссертационного совета

Семенищев Владимир Сергеевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Окислительный стресс (ОС) – дисбаланс между избыточной продукцией оксидантов, инициирующих процессы химического, в том числе свободнорадикального окисления, и активностью системы антиоксидантной защиты организма (АОС), нейтрализующей избыток активных форм кислорода и азота (АФК и АФА-оксиданты), участвующих в указанных выше реакциях. Компоненты АОС - антиоксиданты (АО) – прерывают и ингибируют процессы химического и свободнорадикального окисления. ОС является важным патогенетическим звеном при возникновении и развитии широкого круга болезней, что объясняется универсальностью и ключевой ролью окислительно-восстановительных реакций, происходящих в клетках организма при патологических процессах.

Мониторинг ОС является необходимым условием подбора правильной терапии, диеты и оценки состояния здоровья. Источником информации о степени реализации ОС является антиоксидант/оксидантная активность биологических жидкостей и тканей человека. Разнообразие содержащихся в биологических объектах соединений, обладающих антиоксидантными свойствами, делает задачу определения АО достаточно сложной. Оценить вклад всех отдельных компонентов в деятельность АОС практически невозможно из-за трудоемкости, технической сложности, высокой стоимости анализов, с одной стороны, а с другой, из-за различной природы соединений и синергизма их действия. Перспективным является применение методов, позволяющих определить интегральную антиоксидантную активность (АОА), характеризующую потенциальную возможность антиоксидантного действия всех компонентов, находящихся в образце, в совокупности их взаимодействия между собой, синергизма их кооперативного антиоксидантного действия.

Общая антиоксидантная активность биологического объекта как интегральный параметр отражает антиоксидант/оксидантный статус организма в целом и может являться показателем степени выраженности ОС. Окислительно-восстановительные реакции, определяющие антиоксидант/оксидантный статус организма, имеют электрохимическую природу, поэтому наиболее перспективно использование для определения АОА электрохимических методов, позволяющих оценить донорно-акцепторные свойства исследуемой системы и отличающихся достаточной чувствительностью, простотой аналитической процедуры, экспрессностью, невысокой стоимостью аппаратуры и реактивов, простотой автоматизации измерений. Весьма важным является отсутствие необходимости использовать метод добавок.

В представленной работе, в качестве методов исследования общей антиоксидант/оксидантной активности (АОА/ОА) биологических объектов (слюна, эякулят, кожа), использованы хроноамперометрический и потенциометрический методы. Их модернизация и адаптация к анализу ряда биологических объектов создаёт условия для внедрения мониторинга ОС в клиническую практику.

Диссертационная работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований № 12-00-14037-Ир «Доступ к электронным научным информационным ресурсам зарубежных издательств» (2012 г.) и № 13-08-96050-р_урал_a

«Научные основы разработки автоматизированных средств оценки состояния антиоксидантной защиты (оксидантного стресса) организма человека» (2013-2015 гг.).

Степень научной разработанности темы

В настоящее время распространены два основных подхода к оценке антиоксидантного статуса организма. Первый заключается в прямом определении содержания отдельных высокомолекулярных и низкомолекулярных антиоксидантов. Второй основан на оценке общей антиоксидантной активности. Принимая во внимание большое количество разнообразных АО, различие механизмов и синергизм их действия в организме, следует считать второй подход предпочтительным и более информативным. Проблема оценки антиоксидантного статуса организма заключается в том, что из-за отсутствия единства подходов и терминологии, данные, полученные разными методами, как правило, несопоставимы.

Для мониторинга ОС используют показатель антиоксидантной активности крови или её фракций, что требует забора крови и делает метод инвазивным. К неинвазивным методам можно отнести определение АОА/ОА слюны, семенной жидкости и кожи человека. Снижение АОА слюны свидетельствует о наличии болезней ротовой полости, а также некоторых внутренних процессов в организме. АОА/ОА семенной жидкости связано с состоянием репродуктивной системы мужчин. Существование взаимосвязи между состоянием организма и кожи дает основания полагать, что показатель АОА/ОА кожи может служить источником информации о проблемах со здоровьем и основой для создания новых аналитических методов мониторинга состояния здоровья человека и скрининга населения с целью выявления, в частности, групп риска и заболеваний в начальных стадиях.

Другой весьма важной проблемой является определение оксидантной активности. Сложности мониторинга оксидантов (Ох) связаны как с крайне малым временем жизни АФК, так и со сложностью и высокой стоимостью оборудования.

Развитие представленных в диссертационной работе методов аналитической химии позволит получить прямую информацию об интегральной величине антиоксидант/оксидантной активности биологических объектов простым доступным способом. Эта информация будет полезна в оценке состояния здоровья, эффективности терапии и скрининге населения.

Цель работы: создание гибридного варианта хроноамперометрического метода и развитие потенциометрического метода для неинвазивного мониторинга антиоксидант/оксидантного состояния биологических объектов (слюна, семенная жидкость, кожа человека).

Для реализации поставленной цели потребовалось решение следующих задач:

1. Исследовать возможность количественной оценки результата взаимодействия АО с $K_3[Fe(CN)_6]$ хроноамперометрическим методом и разработать алгоритмы определения АОА гибридным хроноамперометрическим методом, в котором в качестве сигналообразующей используется предшествующая реакция АО с $K_3[Fe(CN)_6]$.

2. Исследовать закономерности изменения потенциала медиаторной системы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ в присутствии образцов, содержащих оксиданты и антиоксиданты, и разработать алгоритмы определения АОА/ОА гибридным потенциометрическим методом.

3. Разработать методики определения общей АОА слюны, кожи, АОА/ОА семенной жидкости гибридными хроноамперометрическим и потенциометрическим методами.

4. Исследовать взаимосвязь АОА/ОА семенной жидкости с состоянием репродуктивной функции мужчин, а также влияние косметических кремов и потребляемых напитков на величину общей АОА кожи.

Научная новизна

1. Предложен гибридный хроноамперометрический вариант определения АОА раствора, включающий предшествующую химическую реакцию взаимодействия $K_3[Fe(CN)_6]$ с АО в качестве сигналообразующей и регистрацию тока окисления продукта реакции ($K_4[Fe(CN)_6]$). Разработан неинвазивный способ определения АОА слюны гибридным хроноамперометрическим методом.

2. Интерпретированы результаты исследования процессов, происходящих при взаимодействии медиаторной системы с оксидантами и антиоксидантами, совместно присутствующими в пробе. Установлено, что взаимодействие оксидантов с восстановленной формой компонента медиаторной системы сопровождается сдвигом потенциала в сторону положительных значений, а взаимодействие антиоксидантов с окисленной формой компонента медиаторной системы сопровождается последующим сдвигом потенциала в сторону отрицательных значений.

3. Предложен новый подход к исследованию АОА/ОА семенной жидкости, заключающийся в обнаружении оксидантов и антиоксидантов в семенной жидкости в одном измерении.

4. Установлена взаимосвязь показателя АОА/ОА семенной жидкости с состоянием репродуктивной функции мужчин.

5. Впервые исследовано влияние косметических кремов и потребляемых напитков на АОА кожи. Показана взаимосвязь состава косметической продукции и напитков с величиной АОА кожи, измеренной с использованием неинвазивного потенциометрического метода.

Теоретическая и практическая значимость

Исследовано взаимодействие АО с $K_3[Fe(CN)_6]$ в качестве предшествующей реакции с последующей регистрацией тока окисления продукта ($K_4[Fe(CN)_6]$) хроноамперометрическим методом. Показана возможность количественной оценки результата этого взаимодействия.

Разработана методика определения АОА слюны хроноамперометрическим методом, не требующая пробоподготовки.

Впервые показано наличие оксидантов и антиоксидантов в семенной жидкости при патологических состояниях и предложен механизм их взаимодействия с медиаторной системой.

Разработана и аттестована методика определения общей антиоксидант/оксидантной активности семенной жидкости мужчин методом потенциометрии. Свидетельство об аттестации № 222.0067/01.00258/2014 выдано ФГУП «УНИИМ».

Разработанные методики и алгоритмы использованы в интерфейсах новых потенциометрических анализаторов:

- «Антиоксидант», предназначенном для определения АОА/ОА растворов;
- «ПА-S», предназначенном для определения АОА/ОА кожи.

Показана возможность использования разработанных подходов и методик определения АОА/ОА семенной жидкости в диагностических целях для выявления патологии репродуктивной функции мужчин.

Результаты исследований воздействия косметических средств на антиоксидантную активность кожи позволяют рекомендовать использование неинвазивного варианта гибридного потенциометрического метода в косметической промышленности для оптимизации состава и технологии получения продукта с антиоксидантными свойствами для конкретной возрастной категории потребителей.

Методология и методы исследования

Основными методами исследования общей АОА в данной работе являлись потенциометрия и хроноамперометрия, как наиболее простые, информативные, более полно отвечающие природе окислительно-восстановительных процессов. Методология исследования состояла в сочетании предшествующей сигналообразующей окислительно-восстановительной реакции окисленной формы медиаторной системы с последующей потенциометрической или хроноамперометрической регистрацией аналитического сигнала. Выбор условий регистрации хроноамперограмм осуществляли при помощи метода циклической вольтамперометрии.

Антиоксидант/оксидантную активность семенной жидкости и антиоксидантную активность кожи определяли гибридным потенциометрическим методом. Результаты определения АОА слюны развитым в настоящей работе гибридным хроноамперометрическим методом сравнивали с результатами, полученными стандартизированным потенциометрическим методом.

Положения, выносимые на защиту:

1. Результаты исследования взаимодействия АО с $K_3[Fe(CN)_6]$ в качестве предшествующей реакции с последующей регистрацией тока окисления продукта ($K_4[Fe(CN)_6]$) хроноамперометрическим методом.

2. Способ обнаружения антиоксидантов и оксидантов при совместном присутствии в семенной жидкости гибридным потенциометрическим методом.

3. Алгоритмы определения АОА слюны гибридным хроноамперометрическим и потенциометрическим методами; АОА кожи, АОА/ОА семенной жидкости гибридным потенциометрическим методом с использованием медиаторной системы.

4. Результаты неинвазивного анализа реальных объектов (слюны, семенной жидкости и кожи человека) гибридными хроноамперометрическим и потенциометрическим методами.

5. Результаты, указывающие на взаимосвязь АОА/ОА семенной жидкости с состоянием репродуктивной функции мужчин, а также влияние косметических кремов и потребляемых напитков на величину общей АОА кожи.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных в диссертации результатов подтверждается использованием современных методов измерений, и данными метрологической оценки, проведённой службой аттестации и сертификации (ФГУП «Уральский научно-исследовательский институт метрологии»).

Основные результаты работы представлены на VIII Международной конференции «Биоантиоксидант» (Москва, 2010 г.); Съезде аналитиков «Аналитическая химия – новые методы и возможности» (Москва, 2010 г.); Симпозиуме с международным участием «Теория и практика электроаналитической химии» (Томск, 2010 г.); Третьем международном конкурсе научных работ молодых ученых в области нанотехнологий (Москва, 2010 г.); VIII Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа с международным участием «Электрохимические методы анализа» (Уфа-Абзаково, 2012 г.); IV Международной научно-практической конференции «Адаптация биологических систем к естественным и экстремальным факторам среды» (Челябинск, 2012 г.); VII всероссийской конференции Молодых учёных, аспирантов и студентов с международным участием по химии и наноматериалам (Санкт-Петербург, 2013 г.); IX Всероссийской конференции «Химия и медицина» с Молодежной научной школой по органической химии (УФА, 2013 г.); Втором съезде аналитиков России (Москва 2013 г.).

Личный вклад соискателя состоял в постановке и решении основных задач, планировании и проведении экспериментальных исследований, обработке, интерпретации и систематизации полученных результатов.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных ВАК РФ и Аттестационным советом и входящих в международные базы Scopus и Web of Science, и 9 тезисов докладов, представленных на различных конференциях.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, пяти глав, заключения, списка литературы, включающего 165 ссылок на отечественные и зарубежные работы и приложения. Работа изложена на 129 страницах машинописного текста, содержит 42 рисунка и 20 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во Введении раскрыта актуальность темы исследования, сформулированы цели и задачи, определены научная новизна, практическая значимость и положения, выносимые на защиту.

В главе 1 обоснован выбор объектов анализа. Описаны существующие подходы к определению антиоксидантной и оксидантной активности и содержания антиоксидантов в биологических объектах, в частности в семенной жидкости, слюне и коже человека.

В главе 2 описаны аппаратура, материалы, реактивы и методики потенциометрического и определения АОА биологических объектов.

В главе 3 представлен гибридный хроноамперометрический метод определения антиоксидантной активности. На рисунке 1 приведена циклическая вольтамперограмма, зарегистрированная в диапазоне 0 – 0.45 В с использованием толстопленочного платинового электрода (ТПЭ), погружённого в раствор, содержащий эквимольную смесь $K_3[Fe(CN)_6]$ и $K_4[Fe(CN)_6]$ (0.3 мМ) и фосфатный буфер (рН=7.4).

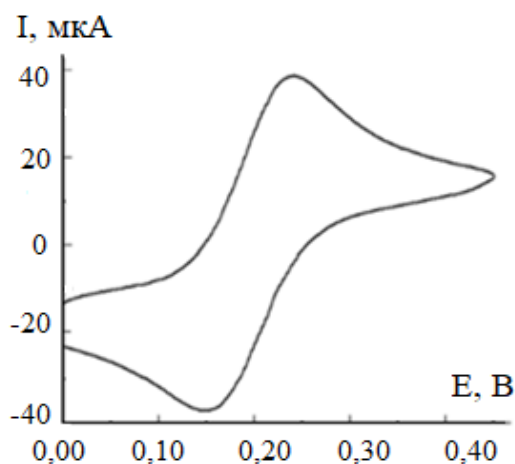


Рисунок 1 – Циклическая вольтамперограмма, зарегистрированная с использованием ТПЭ, погружённого в раствор, содержащий 0.5 мМ $K_3[Fe(CN)_6]$ и 0.5 мМ $K_4[Fe(CN)_6]$ и фосфатный буфер (рН=7.4). Скорость развертки 0.1 В/с

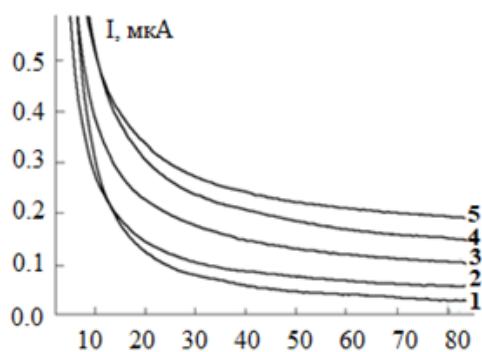
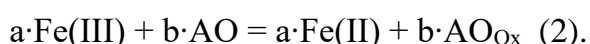


Рисунок 2 – Хроноамперограммы окисления $K_4[Fe(CN)_6]$ в присутствии $5 \cdot 10^{-4}$ $K_3[Fe(CN)_6]$ (1). Концентрация $K_4[Fe(CN)_6]$ $5 \cdot 10^{-6}$ М (2), 10^{-5} М (3), $1.5 \cdot 10^{-5}$ М (4), $2 \cdot 10^{-4}$ М (5). Фон: Фосфатный буфер (рН=7.4)

При потенциалах более положительных, чем 0.3 В, происходит только процесс окисления $K_4[Fe(CN)_6]$. При этом $K_3[Fe(CN)_6]$ не восстанавливается, что даёт возможность фиксировать хроноамперограммы окисления $K_4[Fe(CN)_6]$, в присутствии $K_3[Fe(CN)_6]$ (рис. 2). Потенциалы, при которых происходит только процесс окисления $K_4[Fe(CN)_6]$, лежат в диапазоне 0.35 – 0.45 В. Для регистрации тока окисления $K_4[Fe(CN)_6]$ выбран потенциал

0.45 В. Регистрацию сигнала производили в течение 80 с. Ток измеряли по истечении 70 с. Концентрацию реагента ($K_3[Fe(CN)_6]$) выбирали таким образом, чтобы его количества было достаточно для протекания реакции окисления антиоксидантов в биологическом образце. Концентрация АО при анализе биологических объектов (плазма крови и фолликулярная жидкость) лежит в диапазоне 0.70-3.5 мМ-экв. В связи с этим для анализа биологических объектов использовали раствор, содержащий $2 \cdot 10^{-4}$ М $K_3[Fe(CN)_6]$ (концентрация в электрохимической ячейке (ЭХЯ)).

В качестве аналитического сигнала использовали ток окисления $K_4[Fe(CN)_6]$ (1), продукта восстановления $K_3[Fe(CN)_6]$ антиоксидантами пробы (2):



Расчет концентрации АО, введенного в ЭХЯ, проводится по уравнению:

$$AOA = C_{Доб} \cdot \left(\frac{\Delta I_{Обр}}{\Delta I_{Доб}} \right) \cdot \frac{V_{Доб}}{V_{Обр}} \quad (3),$$

где АОА – антиоксидантная активность, М-экв;

$C_{Доб}$ – концентрация стандартной добавки $K_4[Fe(CN)_6]$, М;

$\Delta I_{Обр}$ – приращение тока окисления $K_4[Fe(CN)_6]$, полученного в результате взаимодействия АО с $K_3[Fe(CN)_6]$, мкА;

$\Delta I_{Доб}$ – приращение тока окисления $K_4[Fe(CN)_6]$, полученный после введения стандартной добавки $K_4[Fe(CN)_6]$, мкА;

$V_{Обр}$ – объем образца АО вводимого в ячейку, мл;

$V_{Доб}$ – объем стандартной добавки $K_4[Fe(CN)_6]$, вводимой в ячейку, мл.

Правильность выбора условий определения АОА методом хроноамперометрии подтверждается анализом модельных индивидуальных АО: аскорбиновая и мочевая кислоты, глутатион и цистеин (табл. 1). Ток окисления $K_4[Fe(CN)_6]$, образовавшийся в результате взаимодействия АО с $K_3[Fe(CN)_6]$, можно рассматривать как аналитический сигнал и использовать в качестве источника информации о концентрации АО.

Таблица 1 – Характеристики результатов хроноамперометрического определения АОА модельных антиоксидантов: аскорбиновой кислоты ($0.7-2.5 \cdot 10^{-5}$ М), мочевой кислоты ($1.0-2.5 \cdot 10^{-5}$ М), цистеина ($1.0-2.5 \cdot 10^{-5}$ М) и глутатиона ($0.5-2.5 \cdot 10^{-5}$ М) (n=5, P=0.95)

АО	Уравнение регрессии, $I, \mu A; C, 10^5 M$	R^2
Аскорбиновая кислота	$I=0.14C-0.019$	0.994
Мочевая кислота	$I=0.10C-0.054$	0.978
Цистеин	$I=0.08C-0.009$	0.993
Глутатион	$I=0.08C-0.011$	0.979

Для подтверждения возможности использования предложенного хроноамперометрического метода для анализа сложных биологических матриц проведен анализ плазмы крови.

Моделировали антиоксидантный состав плазмы крови раствором, выбранным по литературным данным (табл. 2). В состав раствора входили основные АО, отвечающие за антиоксидантное действие, а также основной белок плазмы крови – альбумин.

Таблица 2 – Результаты хроноамперометрического определения АОА раствора, моделирующего антиоксидантный состав плазмы крови ($n=5$, $P=0.95$)

Соединение	Концентрация	АОА расчетная, мМ-экв	АОА измеренная, мМ-экв	S_r , %
Аскорбиновая кислота	$0.08 \cdot 10^{-3}$ М	0.77	0.80 ± 0.02	4.64
Мочевая кислота	$0.40 \cdot 10^{-3}$ М			
Цистеин	$0.017 \cdot 10^{-3}$ М			
Глутатион	$0.03 \cdot 10^{-3}$ М			
Альбумин	45 г/л			

Как видно из табл. 2, АОА модельного раствора плазмы крови, измеренная гибридным хроноамперометрическим методом, демонстрирует хорошую сходимость с рассчитанным значением АОА.

Для оценки правильности определения АОА нативной плазмы крови использовали метод стандартных добавок (табл. 3).

Таблица 3 – Результаты оценки правильности определения АОА нативной плазмы крови с использованием метода стандартных добавок аскорбиновой кислоты (АК) ($n=3$, $P=0.95$). Раствор: фосфатный буфер + $2 \cdot 10^{-4}$ М $K_3[Fe(CN)_6]$, $pH=7.4$

Проба	АОА пробы, мМ-экв	Введено АК, мМ-экв	Найдено АОА в пробе с добавкой АК, мМ-экв	Найдено АОА АК, мМ-экв	Степень извлечения, % (Recovery)
1	1.25 ± 0.09	0.5	1.68 ± 0.03	0.43 ± 0.03	86.0
2	0.99 ± 0.09	1.0	1.87 ± 0.03	0.88 ± 0.03	88.0
3	1.12 ± 0.07	1.5	2.35 ± 0.05	1.23 ± 0.05	82.0

Приведенные в табл. 3 данные свидетельствуют о приемлемой правильности результатов определения АОА плазмы крови.

Достоверность результатов определения АОА плазмы крови гибридным хроноамперометрическим методом подтверждается согласием результатов, полученных предложенной в этой работе и развитой ранее метрологически аттестованной потенциометрической методикой. Наблюдается высокая степень корреляции результатов

определения АОА плазмы крови, полученных этими двумя методами (рис. 3.9). Найденный коэффициент корреляции Пирсона составляет $R=0.87$ и превышает критическое значение ($R_{\text{крит}}=0.67$).

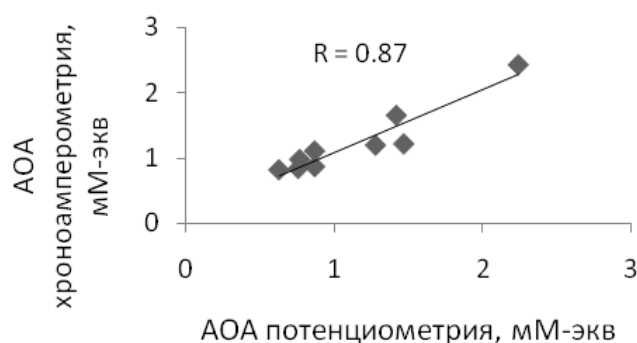


Рисунок 3 – Корреляция результатов определения АОА плазмы крови потенциометрическим и хроноамперометрическим методами ($n=3$, $P=0.95$)

Полученные значения критериев Стьюдента и Фишера ($t_{\text{эксп}} = 0.32$ и $F_{\text{эксп}} = 1.03$) не превышают критических значений ($t_{\text{табл}} = 2.31$ и $F_{\text{табл}} = 3.44$) для уровня значимости 0.05 при $n=3$), что свидетельствует о незначимом различии результатов, полученных потенциометрическим и хроноамперометрическим методами.

В главе 4 описаны адаптированные гибридные хроноамперометрический и потенциометрический методы определения АОА слюны. На рисунке 4 приведены хроноамперограммы окисления $K_4[Fe(CN)_6]$, образующегося при взаимодействии $K_3[Fe(CN)_6]$ с антиоксидантами слюны, вводимой в раствор в разных количествах.

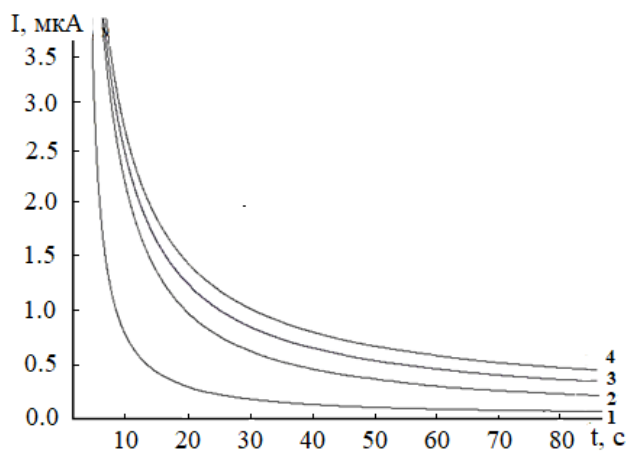


Рисунок 4 – Хроноамперограммы окисления $K_4[Fe(CN)_6]$ в растворе, содержащем $2 \cdot 10^{-4} M K_3[Fe(CN)_6]$ (1) и 0.1 мл (2), 0.2 мл (3) слюны, а также в присутствии $10^{-5} M K_4[Fe(CN)_6]$ (4). Фон: Фосфатный буфер (pH=7.4)

На рисунке 5 приведена зависимость найденной величины АОА слюны, от ее объёма, введенного в 5 мл раствора, содержащего 0.01 M $K_3[Fe(CN)_6]$.

При малых аликвотах (≤ 0.05 мл), найденная величина АОА мала, а при увеличении аликвоты (≥ 0.05 мл) найденное значение АОА не растёт, что может быть связано с возрастающим влиянием матрицы слюны на аналитический сигнал. Далее в анализе объём аликвоты составлял 0,1 мл.

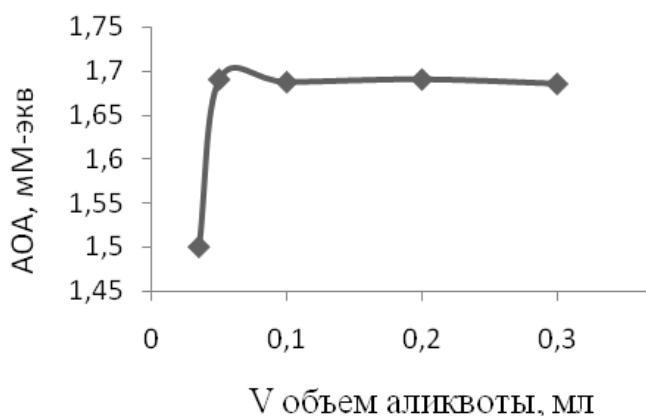


Рисунок 5 – Зависимость найденной хроноамперометрическим методом величины АОА слюны от аликвоты, введённой в 5 мл раствора, содержащего 0,01 М $K_3[Fe(CN)_6]$

Величина АОА слюны до центрифугирования (нативная слюна) и после центрифугирования (надосадочная жидкость) (1500 об/мин, 15 мин) практически идентична (табл. 4), а стадия замораживания практически не влияет на АОА слюны (табл. 5), что позволило не применять пробоподготовку, использовать для анализа как свежие, так и предварительно замороженные образцы и в дальнейшем использовать слюну в ее исходном состоянии.

Таблица 4 – Результаты хроноамперометрического определения АОА нативной слюны и слюны после центрифугирования (n=3, P=0.95)

№	АОА, мМ-экв			
	Нативная слюна	S_r , %	Надосадочная жидкость слюны после центрифугирования	S_r , %
1	1.17±0.08	6.87	1.14±0.08	6.86
2	0.71±0.05	6.40	0.69±0.04	5.80
3	0.88±0.02	1.92	0.85±0.02	2.41

Таблица 5 – Результаты хроноамперометрического определения АОА нативной слюны до и после замораживания (n=3, P=0.95)

№	АОА, мМ-экв			
	Без замораживания	S_r , %	После замораживания	S_r , %
1	1.18±0.03	2.50	1.17±0.02	1.75
2	1.44±0,06	4.50	1.43±0,05	3.24
3	0.95±0,02	2.58	0.94±0,01	1.81

Для оценки правильности предлагаемого метода определения АОА слюны использовали метод стандартных добавок (табл. 6).

Таблица 6 – Результаты определения АОА слюны хроноамперометрическим методом, без и с добавлением аскорбиновой кислоты (АК) ($n=3$, $P=0.95$). Фон: Фосфатный буфер рН=7.4

Проба	АОА пробы, мМ-экв	Введено АК, мМ-экв	Найдено АОА в пробе с добавкой АК, мМ-экв	Найдено АОА АК, мМ-экв	Степень извлечения АК, %
1	1.43±0.07	1.00	2.31±0.06	0.88±0.06	88.0
2	0.82±0.11	1.50	2.10±0.05	1.28±0.05	85.3
3	1.21±0.08	2.00	3.02±0.03	1.81±0.03	90.5

Сравнение полученных данных свидетельствует о приемлемой правильности результатов определения АОА слюны гибридным хроноамперометрическим методом.

Для оценки достоверности полученных результатов хроноамперометрического определения АОА слюны был выбран потенциометрический метод с медиаторной системой.

Для анализа слюны гибридным потенциометрическим методом использована медиаторная система $C(K_3[Fe(CN)_6])/C(K_4[Fe(CN)_6])=0,01/0,0001$ М, потенциал которой устанавливается достаточно быстро, и он стабилен во времени. АОА рассчитывали по уравнениям 4-5.

$$X = AOA = \frac{C_{Ox} - \alpha C_{Red}}{1 + \alpha} \quad (4)$$

$$\alpha = (C_{Ox} / C_{Red}) \cdot 10^{(E_1 - E)nF / 2.3RT} \quad (5),$$

где E – потенциал системы в исходном состоянии, В; C_{Ox} – концентрация окисленной формы медиаторной системы, М; C_{Red} – концентрация восстановленной формы медиаторной системы, М; E_1 – измеряемый потенциал системы после введения анализируемого образца, В; X – концентрация антиоксидантов в растворе после введения в него анализируемого образца, М-экв; $n=1$; R – 8.31 ДжМ⁻¹К⁻¹; F – 96485 КлМ⁻¹; T – температура, К.

На рис. 6 приведена зависимость найденной АОА слюны от аликвоты пробы, введенной в 1 мл раствора, содержащего медиаторную систему 0.01 М $K_3[Fe(CN)_6]$ / 0.0001 М $K_4[Fe(CN)_6]$.

Степень разбавления, очевидно, ограничивается, с одной стороны, пределом обнаружения АОА, с другой, – концентрацией окисленной формы медиаторной системы в растворе. В рассматриваемом случае аликвота не должна быть меньше 0.2 мл.

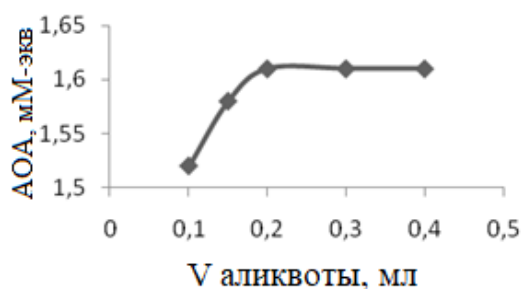


Рисунок 6 – Зависимость найденной потенциометрическим методом величины АОА слюны от аликвоты пробы, введенной в 1 мл раствора медиаторной системы (10^{-2} М $K_3[Fe(CN)_6]$ и 10^{-4} М $K_4[Fe(CN)_6]$)

Анализ проб слюны следует приводить в следующих условиях: медиаторная система $K_3[Fe(CN)_6] / K_4[Fe(CN)_6] = 0.01$ М / 0.0001 М, объем буферного раствора (фосфатный буфер) составлял 1 мл, объем аликвоты слюны 0.2 мл (что соответствует разбавлению образца в электрохимической ячейке в 6 раз).

Величина АОА слюны до центрифугирования (нативная слюна) и после центрифугирования (надосадочная жидкость) (1500 об/мин, 15 мин) практически идентична (табл. 7), а стадия замораживания практически не влияет на АОА слюны (табл. 8), что позволило исключить пробоподготовку.

Таблица 7 – Результаты потенциометрического определения АОА нативной слюны и слюны после центрифугирования (n=3, P=0.95)

№	АОА, мМ-экв			
	Нативная слюна	S _r , %	Надосадочная жидкость слюны после центрифугирования	S _r , %
1	0.87±0.03	3.04	0.81±0.03	3.80
2	1.56±0.03	1.69	1.45±0.06	4.22
3	1.13±0.06	4.60	1.06±0.07	6.53

Таблица 8 – Результаты потенциометрического определения АОА нативной слюны до и после замораживания (n=3, P=0.95)

№	АОА, мМ-экв			
	Без замораживания	S _r , %	После замораживания	S _r , %
1	1.15±0.05	4.39	1.12±0.05	4.09
2	0.95±0.08	8.51	0.94±0.04	3.83
3	1.29±0.05	3.96	1.28±0.02	2.06

При сравнительном определении АОА образцов слюны методами потенциометрии с использованием медиаторной системы и хроноамперометрии, была обнаружена высокая корреляция полученных результатов (рис. 7). Коэффициент корреляции Пирсона R=0.87 выше критического значения (R_{крит}=0.67).

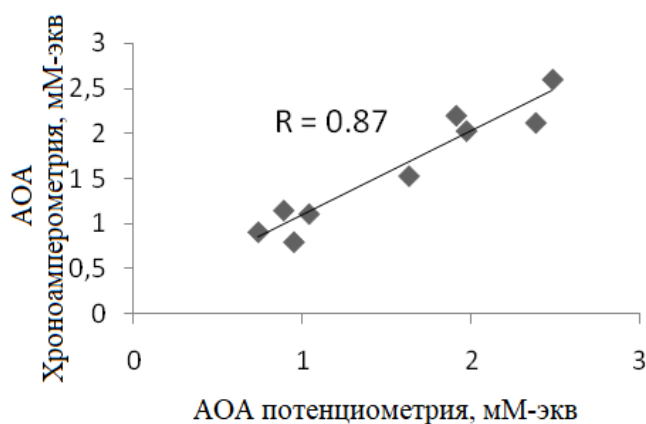


Рисунок 7–Корреляция результатов определения АОА слюны потенциометрическим и хроноамперометрическим методами ($n=3$, $P=0.95$)

Полученные значения критериев Стьюдента и Фишера ($t_{\text{эксп}} = 1.48$ и $F_{\text{эксп}} = 1.91$) не превышают критических значений ($t_{\text{табл}} = 2.31$ и $F_{\text{табл}} = 3.44$ для уровня значимости 0.05 при $n = 3$), что свидетельствует о незначимом различии результатов полученных потенциометрическим и хроноамперометрическим методами.

Пятая глава посвящена новому подходу к исследованию АОА/ОА семенной жидкости.

При исследовании некоторых проб семенной жидкости были обнаружены сдвиги потенциалов в сторону положительных значений (рис. 8).

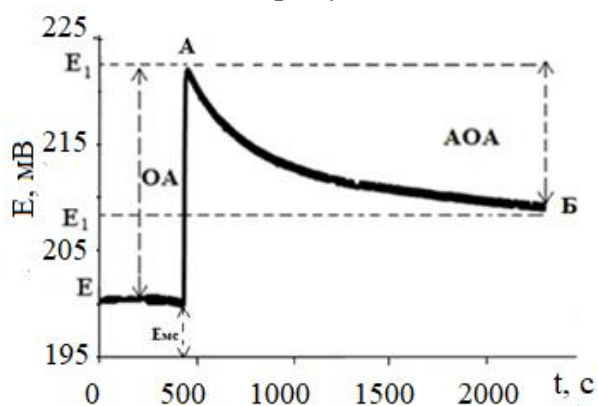


Рисунок 8 – Зависимость потенциала электрода от времени, зарегистрированная при исследовании раствора, содержащего медиаторную систему (10^{-3} М $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ и 10^{-3} М $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) и семенную жидкость инфертильного мужчины, $\text{pH}=7.4$

По всей видимости, в пробе содержатся и оксиданты, и антиоксиданты. В таком случае проба может взаимодействовать с обоими компонентами медиаторной системы. При этом взаимодействие антиоксидантов с окисленной формой компонента медиаторной системы будет сопровождаться сдвигом потенциала в сторону отрицательных значений (участок АБ), а взаимодействие оксидантов с восстановленной формой компонента медиаторной системы будет сопровождаться сдвигом потенциала в сторону положительных значений (скачок в точке А).

Для изучения электрохимического поведения модельного оксиданта в растворе медиаторной системы использовали пероксид водорода (H_2O_2). Введение H_2O_2 в электрохимическую ячейку, содержащую медиаторную систему, приводит к сдвигу потенциала в сторону положительных значений (рис. 9). Это свидетельствует о протекании реакции (6).



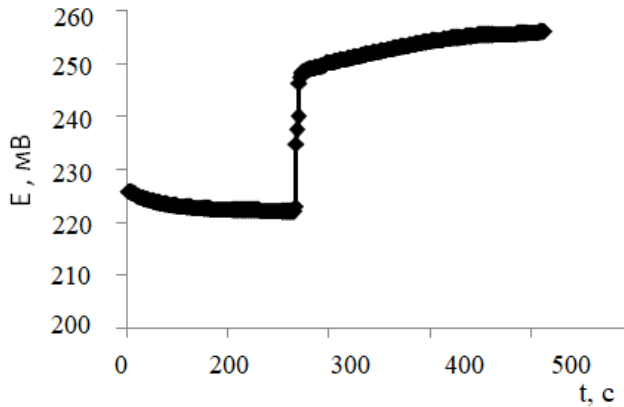
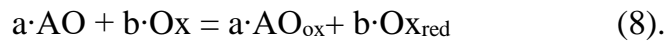
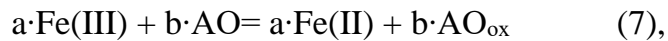


Рисунок 9 – Зависимость потенциала электрода от времени при введении в медиаторную систему (10^{-3} М $K_3[Fe(CN)_6]$ + 10^{-3} М $K_4[Fe(CN)_6]$ + 2.3 мМ-экв H_2O_2 , pH=4.0

При одновременном введении АК и H_2O_2 (рис. 10), протекают три конкурирующие реакции (6) и (7, 8):



Кривая при этом имеет такую же форму, как и кривая, изображенная на рис. 8.

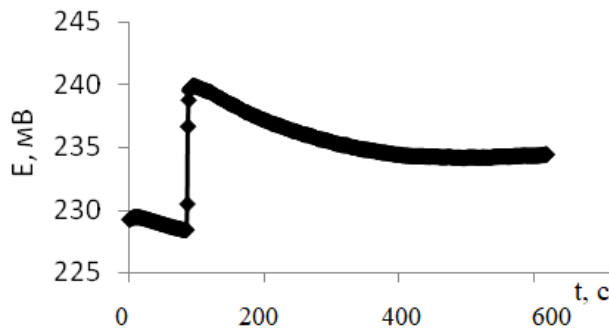


Рисунок 10 – Зависимость потенциала электрода от времени при введении в медиаторную систему (10^{-3} М $K_3[Fe(CN)_6]$ + 10^{-3} М $K_4[Fe(CN)_6]$ + 2.3 мМ-экв H_2O_2 и 3 мМ-экв АК, pH=4.0

Принимая во внимание то, что система, содержащая АО, O_x и $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$, является неравновесной и скорости взаимодействия АО и O_x с окисленной и восстановленной формами медиаторной системы могут оказаться соизмеримыми, поэтому некорректно делать заключение о содержании антиоксидантов и оксидантов в пробе только на основании рис. 8. Вопрос о точном определении концентрации АО и O_x при анализе одной пробы требует проведения дополнительных исследований, в частности, учитывающих изменение пробы при извлечении её из живого организма.

Оксидантная активность может быть рассчитана по формулам 9, 10:

$$OA = \frac{\alpha C_{Red} - C_{Ox}}{1 + \alpha} \quad (9)$$

$$\alpha = (C_{Ox} / C_{Red}) \cdot 10^{(E_1 - E)nF/2.3RT} \quad (10),$$

где E, E_1 - потенциалы электрода до и после взаимодействия медиаторной системы с образцом, мВ; C_{Ox} – исходная концентрация окисленной формы медиаторной

системы в ячейке, M ; C_{Red} – исходная концентрация восстановленной формы медиаторной системы в ячейке, M ; OA – оксидантная активность, M -экв.

Если реакция (7) успевает пройти до конца или в пробе содержатся только оксиданты, концентрации окисленного и восстановленного компонентов медиаторной системы в точке А (рис. 8) выражаются уравнениями:

$$C'_{Ox} = C_{Ox} + X \quad (11),$$

$$C'_{Red} = C_{Red} - X \quad (12),$$

где X – концентрация оксидантов, M -экв; C'_{Ox} – концентрация окисленной формы медиаторной системы в ячейке после взаимодействия с оксидантами, M ; C'_{Red} – концентрация восстановленной формы медиаторной системы в ячейке после взаимодействия с оксидантами.

Затем, с учетом установившихся концентраций компонентов медиаторной системы, рассчитывается антиоксидантная активность по формулам 13-14.

$$AOA = \frac{C'_{Ox} - \alpha C'_{Red}}{1 + \alpha} \quad (13)$$

$$\alpha = (C'_{Ox} / C'_{Red}) \cdot 10^{(E'_1 - E')nF/2.3RT} \quad (14),$$

где E' – потенциал электрода, установившийся после взаимодействия медиаторной системы с оксидантами; E'_1 – потенциал электрода, установившийся после взаимодействия медиаторной системы с оксидантами и антиоксидантами.

При исследовании образцов семенной жидкости, содержащих оксиданты, были получены оценочные результаты. При этом наблюдалась достаточно хорошая воспроизводимость. Стандартное отклонение результатов определения AOA/OA 24 образцов семенной жидкости не превышает 12%.

Исследование образцов семенной жидкости 54 пациентов с нормоспермией и 21 - с патоспермией (олиго-, астено-, терато-, смешанные формы, лейкоцитоспермия) показало (табл. 9), что пробы пациентов с нормоспермией почти в 90 % случаев имеют только AOA . При патоспермии OA зафиксирована в 60 % проб.

Таблица 9 - Результаты исследования AOA/OA образцов семенной жидкости пациентов с нормоспермией и патоспермией

Диагноз	Количество образцов с AOA , (%)	Количество образцов с OA , (%)
Нормоспермия (54 пациента)	88.9	11.1
Патоспермия (21 пациент)	40.3	59.7

Можно предположить, что наличие оксидантной активности семенной жидкости может быть с определенной долей вероятности использовано в качестве

предварительного диагностического критерия выделения пациентов группы риска, требующих более детального обследования.

В главе 6 описан неинвазивный потенциометрический метод оценки антиоксидантной активности кожи. Источником информации об АОА служит сдвиг потенциала индикаторного электрода, обусловленный изменением соотношения компонентов медиаторной системы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$, помещённых в контактирующий с кожей электропроводящий гель. Изменение соотношения компонентов медиаторной системы является следствием их взаимодействия с веществами, диффундирующими из кожи. АОА рассчитывают по уравнению 4.

Рабочим электродом служил ТПЭ. В качестве электрода сравнения выбрали электрод типа ECG electrodes Arbo («Kendall», США), защищенный мембраной, препятствующей проникновению ферроцианид ионов к поверхности, и, таким образом, его потенциал оказался достаточно устойчивым в течение измерительного цикла.

Схема устройства для измерения АОА кожи представлена на рисунке 12. Использовали гель электродный контактный высокопроводящий «Унимакс» (ООО «Гельтек-Медика, Россия»).

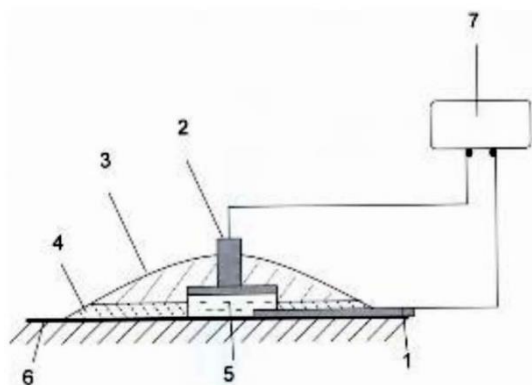


Рисунок 12 – Схема устройства для измерения АОА кожи: 1 – ТПЭ, установленный со стороны открытой части электрода (3); 2 - электрод сравнения; 4 - клеящий слой; 5 - электропроводящий гель, содержащий медиаторную систему. Рабочий электрод (1) и гель (5) контактируют с кожей (6). Высокоомный потенциометр (7).

Потенциалы нескольких электродов сравнения различаются в пределах 10 мВ, однако, это не влияет на результаты оценки АОА, т.к. источником информации служит разность между начальным и установившимся значениями потенциала.

Приведенные в таблице 9 результаты определения АОА модельных растворов показывают соответствие величин «введено-найденно» и возможность их получения с весьма малыми отклонениями от истинных значений. Модельными системами служили смеси, содержащие гель, медиаторную систему ($K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6] = 10^{-3}/10^{-5}$ М) и АО, входящих в состав биологических объектов. Кожу моделировала тефлоновая плёнка.

Фотография устройства для измерения АОА кожи и регистрируемая при этом потенциодинамическая кривая представлены на рис. 13 и 14 соответственно.

Таблица 9 – Результаты анализа растворов модельных антиоксидантов, введенных в гель с медиаторной системой, содержащей $1 \text{ мМК}_3[\text{Fe}(\text{CN})]_6$ и $10 \text{ мМК}_4[\text{Fe}(\text{CN})]_6$ ($n=3$, $P=0.95$)

Антиоксидант	Введено, 10^5 М-экв	Найдено, 10^5 М-экв	S_r	Recovery, %
Аскорбиновая кислота	2	1.88 ± 0.10	5.5	94
	4	4.05 ± 0.05	1.2	101
Глутатион	2	1.78 ± 0.10	5.8	89
	4	4.18 ± 0.08	1.8	104
Мочевая кислота	2	2.00 ± 0.03	1.5	99
	4	4.04 ± 0.05	1.2	101



Рисунок 13 - Общий вид устройства для измерения АОА кожи

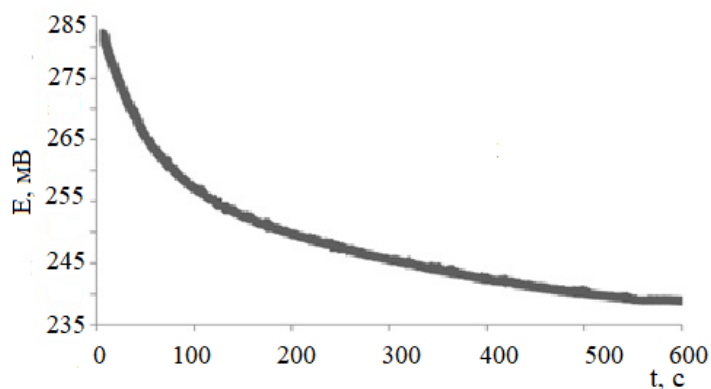


Рисунок 14 – Изменение во времени потенциала электрода, контактирующего с гелем, содержащего медиаторную систему и нанесенного на поверхность кожи

В таблице 10 представлены результаты измерения АОА разных участков кожи рук добровольцев, свидетельствующие о том, что место контакта практически не влияет на значение АОА (табл. 10).

Таблица 10 – Воспроизводимость результатов оценки АОА разных участков кожи респондентов потенциометрическим методом ($n=3$, $P=0.95$)

№	АОА, 10^5 М-экв	Среднее значение АОА, 10^5 М-экв	S_r , %
Респондент 1	1.15	1.16 ± 0.06	5.2
	1.22		
	1.10		
Респондент 2	2.04	2.04 ± 0.12	6.1
	2.17		
	1.92		

Исследовано изменение показателя АОА кожи после нанесения двух новых косметических кремов, предоставленных производителем, – «Для рук» и «+55». После нанесения крема «Для рук» через 20 мин наблюдается увеличение АОА кожи всех респондентов (рис. 15А). Наиболее сильно эффект проявляется у респондентов 1 и 2, которых условно отнесли к «старшей возрастной группе». Через 8 ч после нанесения крема у респондентов 1, 2, 4 и 5 значение АОА кожи было выше, чем до его применения, при этом у респондентов 2, 4 и 5 происходит возрастание этого показателя по сравнению с АОА кожи, измеренной через 20 мин после нанесения крема. Через 24 часа наблюдается снижение АОА кожи респондентов, но для респондентов «старшей возрастной группы» значение АОА остается заметно выше, чем до нанесения крема. Нанесение на кожу крема «+55» вызывает увеличение АОА кожи (рис. 15Б) у респондентов старше 45 лет (4-6) и практически не влияет на этот показатель у потребителей 22-27 лет (1 - 3).

Полученные результаты показывают, что неинвазивный метод оценки АОА кожи перспективно использовать для анализа косметических средств с целью оптимизации состава конечного продукта с учётом целевой аудитории.

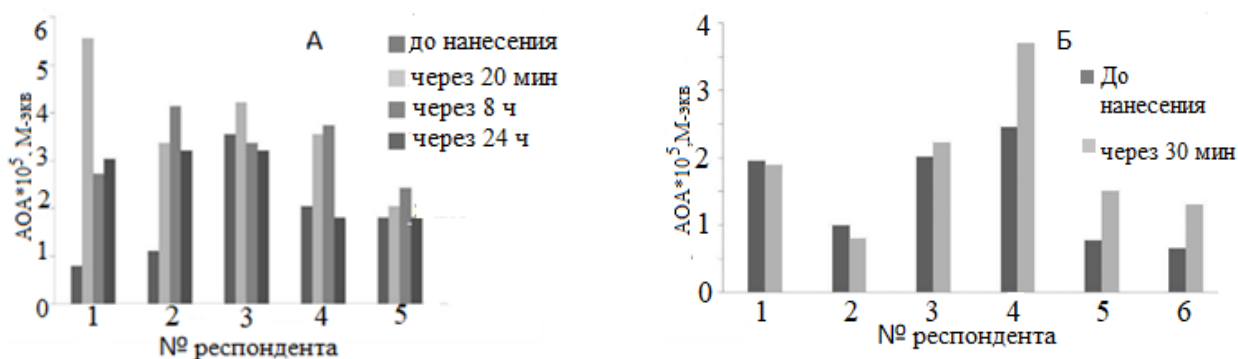


Рисунок 15 – АОА кожи респондентов до и после воздействия кремов «Для рук» (А) и «55+» (Б)

Воздействие эндогенных факторов на кожу позволяет предполагать взаимосвязь между состоянием организма в целом и АОА кожи. Для установления связи АОА кожи и фракций крови (плазма и эритроцитарная масса) проведено исследование влияния на эти показатели приёма натошак апельсинового сока и трёх экспериментальных составов энергетического напитка, предоставленных производителем. Содержания АО в энергетических напитках заметно выше, чем в апельсиновом соке (рис. 16).

В исследовании принимали участие 10 респондентов в возрасте от 18 до 20 лет (5 мужчин и 5 женщин), не имеющие хронических заболеваний. Напитки в количестве 100 мл принимались добровольцами натошак. Оценивали АОА кожи и фракций крови через 30 и 40-50 минут после приёма напитка, соответственно. Употребление энергетического напитка 1 приводит к увеличению АОА плазмы у 100% и росту АОА кожи – у 70% добровольцев (рис. 17).

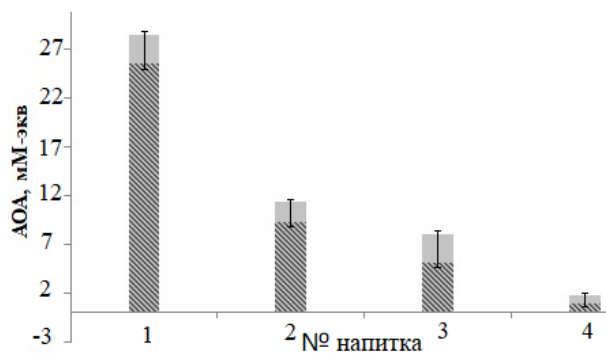


Рисунок 16 – АОА напитков 1 - 3 и апельсинового сока 4 (n=5, P=0.95)

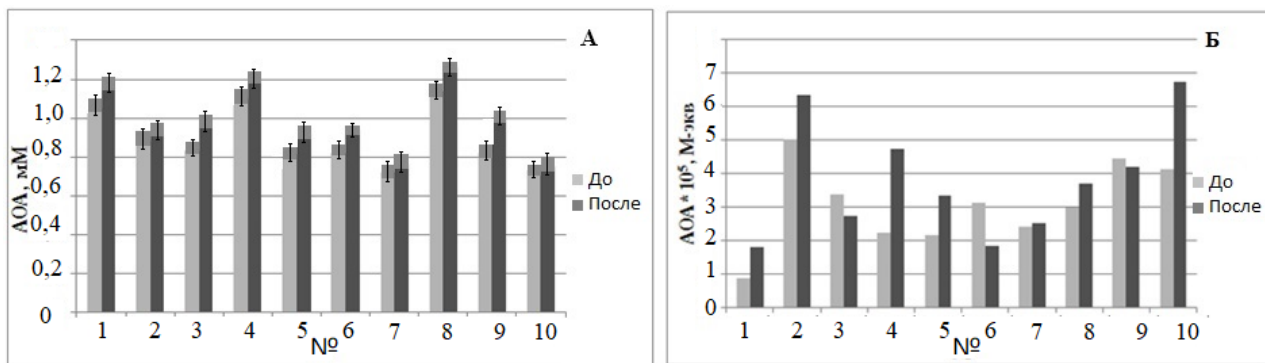


Рисунок 17 – Антиоксидантная активность плазмы крови (А) и кожи (Б) респондентов: ■ до приёма напитка, ■ после приёма напитка

Хотя прямой корреляции между АОА плазмы и АОА кожи не наблюдается, состояние организма оперативно отражается на состоянии кожи. Реакция антиоксидантного состояния кожи на пероральный приём АО указывает, что измеренный неинвазивным методом показатель АОА кожи может, в первом приближении, быть использован для оценки состояния ОС организма в целом.

По результатам обследования 112 пациентов, условно разделенных на относительно здоровых добровольцев и пациентов, страдающих гипертонической болезнью были выработаны предварительные референтные значения показателя АОА кожи (рис. 18).



Рисунок 18 – Предварительные референтные значения показателя АОА кожи

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Предложен и развит новый гибридный вариант хроноамперометрического метода, включающий предшествующую химическую реакцию восстановления $K_3[Fe(CN)_6]$ антиоксидантами пробы. Показана линейная зависимость тока окисления продукта этой реакции – $K_4[Fe(CN)_6]$ от концентрации модельных АО (АК, МК,

глутатион, цистеин), что позволяет использовать приращение тока в качестве аналитического сигнала. Предел обнаружения АО равен $6.9 \cdot 10^{-6}$ М.

2. Предложенный подход апробирован при исследовании биологических образцов. Относительное стандартное отклонение результатов анализа плазмы крови не превышало 9%. Степень корреляции результатов определения АОА предложенным гибридным вариантом хроноамперометрического метода в сравнении со стандартизованным потенциометрическим методом составила 0.89 ($R_{\text{крит}}=0.67$), рассчитанные значения критериев Стьюдента и Фишера ($t_{\text{эксп}} = 0.32$ и $F_{\text{эксп}} = 1.03$) не превышают критических значений.

3. Разработана методика определения АОА слюны новым гибридным вариантом хроноамперометрического метода, не требующая специальной пробоподготовки. Относительное стандартное отклонение результатов определения АОА слюны не превышает 8%. Степень корреляции результатов определения АОА предложенным гибридным вариантом хроноамперометрического метода в сравнении со стандартизованным потенциометрическим методом составила 0.92 ($R_{\text{крит}}=0.67$), рассчитанные значения критериев Стьюдента и Фишера ($t_{\text{эксп}} = 1.48$ и $F_{\text{эксп}} = 1.91$) не превышают критических значений.

4. Исследованы закономерности изменения потенциала медиаторной системы $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ в присутствии образцов, содержащих оксиданты и антиоксиданты. Разработаны алгоритмы определения АОА/ОА гибридным потенциометрическим методом.

5. Разработана методика определения АОА/ОА семенной жидкости, позволяющая оценить АОА и ОА в одном измерении. Диапазон определяемых концентраций АОА составляет 0.2 – 6 ммоль-экв/дм³. Показатели повторяемости и воспроизводимости составляют 7 и 13 %.

6. Установлена взаимосвязь антиоксидант/оксидантной активности семенной жидкости с состоянием репродуктивной системы. Показано, что наличие оксидантной составляющей при исследовании семенной жидкости может указывать на развитие патологий репродуктивной функции мужчин.

7. Развита неинвазивный способ определения антиоксидантной активности кожи гибридным вариантом метода потенциометрии с использованием медиаторной системы, получены результаты, показывающие взаимосвязь величины АОА кожи с:

- составом используемой косметической продукции;
- составом потребляемых напитков;
- патологиями сердечно-сосудистой системы

8. Разработанные алгоритмы определения АОА/ОА биологических жидкостей и тканей реализованы в потенциометрических анализаторах «Антиоксидант» и «ПА-S», предназначенных для определения АОА/ОА семенной жидкости и кожи.

Перспективы дальнейшей разработки темы исследования заключаются в том, что полученные результаты, развитые подходы и методы, созданные на их базе приборы, будучи использованы в медицине, позволят разработать диагностические показатели и

критерии оценки состояния здоровья человека. Для этого, в первую очередь, необходимы: проведение исследования АОА клеток, в частности сперматозоидов, гибридным вариантом хроноамперометрического метода; разработка гибридного варианта метода хроноамперометрии для определения ОА биологических жидкостей; проведение дополнительных исследований для определения концентрации АО и Ох в семенной жидкости, разработка теоретических основ неинвазивного потенциометрического метода определения АОА кожи; улучшение воспроизводимости результатов исследования кожи; сокращение времени анализа.

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

Статьи в рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных ВАК РФ и Аттестационным советом УрФУ:

1. Брайнина, Х. З. Хроноамперометрический метод определения интегральной антиоксидантной активности / Х. З. Брайнина, **Д. П. Варзакова**, Е. Л. Герасимова // Журнал аналитической химии. – 2012. – Т. 67. – № 4. – С. 409–415. (0.54 п.л. /0.18 п.л.)

Brainina, Kh. Z. A chronoamperometric method for determining total antioxidant activity / Kh. Z. Brainina, **D. P. Varzakova**, E. L. Gerasimova // Journal of analytical chemistry. – 2012. – V.67. – №4. – P. 364-369. (0.54 п.л. /0.18 п.л.) (Scopus, WoS)

2. Brainina, Kh. Z. Potentiometric method for evaluating the oxidant/antioxidant activity of seminal and follicular fluids and clinical significance of this parameter for human reproductive function / Kh. Z. Brainina, **D. P. Varzakova**, E. L. Gerasimova, S. L. Balezin, I. G. Portnov, V. A. Makutina, E. V. Tyrchaninova // The Open Chemical and Biomedical Methods Journal. – 2012. – № 5. – P. 1–7. (0.46 п.л. /0.07 п.л.) (Scopus)

3. Brainina, Kh. Z. Noninvasive Method of Determining Skin Antioxidant/Oxidant Activity: Clinical and Cosmetics Applications / Kh. Z. Brainina, **D. P. Varzakova**, E. L. Gerasimova, Yan E. Kazakov, L. G. Galperin // Analytical and Bioanalytical Electrochemistry – 2013. – V. 5. – № 5. – P. 528–542. (0.87 п.л. /0.17 п.л.) (Scopus, WoS)

4. Varzakova, D. P. Noninvasive electrochemical antioxidant activity estimation: saliva analysis / **D. P. Varzakova**, Kh. Z. Brainina, Yan E. Kazakov, M. B. Vidrevich // Biointerface Research in Applied Chemistry. – 2018. – V.8. - № 5. – P. 3383-3387. (0.25 п.л. /0.063 п.л.) (Scopus, WoS)

Другие публикации:

5. Герасимова, Е. Л. Хроноамперометрический метод определения интегральной антиоксидантной активности / Е. Л. Герасимова, **Д. П. Варзакова** // Сб. тез докладов Съезда аналитиков России и Школы молодых учёных «Аналитическая химия – новые методы и возможности». Москва (пансионат «Клязьма») – 2010. – С. 56. (0.08 п.л. /0.04 п.л.)

6. Варзакова, Д. П. Электрохимические сенсоры на основе наночастиц металлов для мониторинга окружающей среды и клинического анализа / **Д. П. Варзакова**, Л. А. Пьянкова, Т. Ю. Добрынина, Х. З. Брайнина // Тезисы докладов Третьего Международного конкурса работ молодых ученых в области нанотехнологий. Москва. 2010. 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM). (0.25 п.л. /0.06 п.л.)

7. Бляхман, Ф. А. Антиоксидантный статус и системная гемодинамика у лиц молодого возраста / Ф. А. Бляхман, Х. З. Брайнина, **Д. П. Варзакова**, Е. Л. Герасимова, В. Я. Крохолов, В. А. Телешев, Т. Ф. Шкляр // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2012. – № 3. – С. 59–61. (0.42 п.л. /0.10 п.л.)
8. Шкляр, Т. Ф. Половой диморфизм антиоксидантного уровня отвечает за контроль артериального давления / Т. Ф. Шкляр, **Д. П. Варзакова**, Е. Л. Герасимова, Ф. А. Бляхман // Материалы IV Международной науч.- практич. конф. «Адаптация биологических систем к естественным и экстремальным факторам среды». Челябинск – 2012. – С. 134-138. (0.25 п.л. /0.06 п.л.)
9. Герасимова, Е. Л. Неинвазивный метод определения антиоксидантной активности / Е. Л. Герасимова, **Д. П. Варзакова**, Х. З. Брайнина // Материалы VIII Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа с международным участием «Электрохимические методы анализа (ЭМА-2012)». Уфа-Абзаково – 2012. – С. 71. (0.06 п.л. /0.003 п.л.)
10. Герасимова, Е. Л. Определение оксидантной активности семенной жидкости потенциометрическим методом / Е. Л. Герасимова, **Д. П. Варзакова**, Л. А. Пьянкова // Тезисы докладов Седьмой всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием по химии и нанотехнологиям «Менделеев-2013. Аналитическая химия». Санкт-Петербург – 2013. – С. 104-105. (0.06 п.л. /0.03 п.л.)
11. Брайнина, Х. З. Оксидант/антиоксидантное состояние эякулята, как критерий оценки репродуктивной функции мужчин / Х. З. Брайнина, **Д. П. Варзакова**, Е. Л. Герасимова, Л. А. Судакова, Н. Ю. Стожко, С. Л. Балезин, М. Я. Ходос // Тезисы докладов IX Всероссийской конференции с молодёжной научной школой по органической химии. «Химия и медицина» Уфа-Абзаково – 2013. – С. 7. (0.08 п.л. /0.03 п.л.)
12. Варзакова, Д. П. Потенциометрический метод оценки антиоксидантной активности кожи / **Д. П. Варзакова**, Е. Л. Герасимова, М. Г. Маркина, Е. В. Викулова // Тезисы докладов IX Всероссийской конференции с молодёжной научной школой по органической химии. «Химия и медицина» Уфа-Абзаково – 2013. – С. 151. (0.06 п.л. /0.015 п.л.)
13. Брайнина, Х. З. Неинвазивный метод оценки оксидант/антиоксидантной активности кожи / Х. З. Брайнина, **Д. П. Варзакова**, Е. Л. Герасимова, М. Г. Маркина, Е. В. Викулова, Л. А. Судакова, Я. Е. Казаков, Л. Г. Гальперин // Тезисы докладов Второго съезда аналитиков России. Москва – 2013. – С. 444. (0.06 п.л. /0.0075 п.л.)