

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

заведующего кафедрой - руководителя отделения химической инженерии на правах кафедры Инженерной школы природных ресурсов Национального исследовательского Томского политехнического университета. Коротковой Елены Ивановны

на диссертацию Варзаковой Дарьи Павловны
«Неинвазивные электрохимические методы оценки
антиоксидант/оксидантной активности биологических объектов»,
представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по
специальности 1.4.2. Аналитическая химия

Актуальность исследования. Диссертация Варзаковой Д.П. посвящена разработке гибридного варианта хроноамперометрического метода и развитию потенциометрического метода для неинвазивного мониторинга антиоксидант/оксидантного состояния биологических объектов. Действительно, антиоксиданты играют важную роль в метаболизме окислительных процессов, происходящих в организме человека и животных. Окислительный стресс, возникающий при сбое защитной антиоксидантной системы организма, является первопричиной многих заболеваний, в том числе социально-значимых. Поэтому постоянный контроль за состоянием защитной антиоксидантной системы организма необходим. И использование для данной цели интегрального показателя антиоксидантной активности, характеризующего потенциальную возможность антиоксидантного действия всех компонентов, находящихся в образце, в совокупности их взаимодействия между собой, синергизма их кооперативного антиоксидантного действия, весьма оправдан.

Существующие методы анализа, основанные на других физико-химических принципах, являются достаточно точными и информативными, однако имеют ряд недостатков. Среди них длительность процедуры анализа, невозможность исследования, в ряде случаев, окрашенных проб, использование конкурирующих реакций, высокие требования к квалификации персонала и ряд других. Исходя из выше изложенного, электрохимические методы в их совокупности являются наиболее

оптимальными для оценки интегральной антиоксидантной активности биологических образцов. Особенно актуален подход использования именно неинвазивных электрохимических методов для определения интегральной антиоксидантной активности (АОА) биологических объектов.

Научная новизна работы заключается прежде всего в разработке неинвазивного способа определения АОА слюны гибридным хроноамперометрическим методом, где в качестве сигналообразующей метки используется предшествующая химическая реакция взаимодействия $K_3[Fe(CN)_6]$ с АО с последующей регистрацией тока окисления продукта реакции ($K_4[Fe(CN)_6]$).

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.

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

Практическая значимость работы состоит в разработке методики определения АОА слюны хроноамперометрическим методом, не требующая пробоподготовки. 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.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и практических рекомендаций

Степень обоснованности положений и выводов диссертационной работы Варзаковой Д.П. соответствует общепринятой, подтверждается корректностью сформулированных задач. Достоверность результатов и выводов, сформулированных в диссертационной работе, подтверждается использованием современных методов измерений, и данными метрологической оценки, проведённой службой аттестации и сертификации (ФГУП «Уральский научно-исследовательский институт метрологии»).

Личный вклад автора несомненен.

Диссертация Варзаковой Д.П. изложена на 129 страницах текста, состоит из введения, литературного обзора, пяти глав, заключения, списка литературы, включающем 165 ссылок на отечественные и зарубежные работы и приложения. Диссертация содержит 20 таблиц, 42 рисунка.

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. В качестве аналитического сигнала использовался ток окисления $K_4[Fe(CN)_6]$, продукта восстановления $K_3[Fe(CN)_6]$ антиоксидантами пробы. Правильность выбора условий определения АОА методом хроноамперометрии подтверждена анализом модельных индивидуальных АО: аскорбиновая и мочева кислота, глутатион и цистеин. 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.

В главе 4 описаны адаптированные гибридные хроноамперометрический и потенциометрический методы определения АОА слюны. Для оценки правильности предлагаемого метода определения АОА слюны использовали метод стандартных добавок. 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. При сравнительном определении АОА образцов слюны методами потенциометрии с использованием медиаторной системы и хроноамперометрии, была обнаружена высокая корреляция полученных результатов.

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. Показано, что 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, а взаимодействие оксидантов с восстановленной формой компонента медиаторной системы будет сопровождаться сдвигом потенциала в сторону положительных значений. 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. Уточнено, что вопрос о точном определении концентрации антиоксидантов и оксидантов при анализе одной пробы требует проведения дополнительных исследований. Предположено, 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 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, помещённых в контактирующий с кожей электропроводящий гель. Изменение соотношения компонентов медиаторной системы является следствием их взаимодействия с веществами, диффундирующими из кожи. 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.

Заключение обобщает результаты работы с указанием возможных направлений дальнейшего развития данной тематики исследования.

Работа выполнена на хорошем профессиональном уровне. Однако, есть ряд замечаний:

1. Какова природа аналитического сигнала при определении антиоксидантной активности хроноамперометрическим методом?
2. На стр. 46 - 47 диссертации описаны формулы определения антиоксидантной активности по разности потенциалов до и после введения пробы с антиоксидантами. Есть ли противоречия в термине «антиоксидантная активность», что предполагает кинетический характер определения?
3. В формуле 2.4 (стр. 47 диссертации) суммарная концентрация антиоксидантов X приравнивается к антиоксидантной активности (АОА). Это разные по своей природе термины. Как их можно объединить?
4. На стр. 53 диссертации приведены рисунки приращения тока окисления $K_4[Fe(CN)_6]$ от концентрации индивидуальных антиоксидантов при потенциале $E=0.45V$. В этой области потенциалов сами антиоксиданты могут давать пики окисления. Не мешает ли это определению?
5. В таблице 3.4 (стр. 57 диссертации) приведены результаты хроноамперометрического определения АОА раствора, моделирующего антиоксидантный состав плазмы крови. Как производили определение расчетной АОА? Наблюдается ли в данном случае принцип аддитивности?
6. В таблице 3.6 (стр. 59 диссертации) приведены значения АОА плазмы крови разных образцов? Что это за образцы и чем они отличались?

7. В главе 4 приведены результаты определения АОА слюны. Какие антиоксиданты, на Ваш взгляд, определяют АОА слюны в целом?
8. На стр. 76 диссертации приведены уравнения 5.1 и 5.2 взаимодействия антиоксидантов и оксидантов с медиаторной системой. Были ли рассчитаны кинетические параметры (константы скорости) данных химических реакций хотя бы на примере индивидуальных антиоксидантов и оксидантов?
9. Рассматривали ли Вы возможность взаимодействия антиоксидантов и оксидантов в образцах семенной жидкости не только с медиаторной системой, но и друг с другом при их совместном присутствии?
10. Список публикаций соискателя включает 4 статьи и 9 тезисов докладов, из которых практически все публикации 2012, 2013 годов, кроме одной статьи. С чем это связано?
11. Есть неточные выражения и опечатки в ряде случаев как в диссертации, так и в автореферате.

Указанные замечания носят рекомендательный характер и не влияют на общую оценку работы.

Заключение по диссертационной работе

Материалы диссертации прошли апробацию на всероссийских и международных конференциях, полученные результаты опубликованы в четырех статьях в международных высокорейтинговых журналах баз Scopus и Web of Science, рекомендованных ВАК для публикации результатов кандидатских диссертаций, и 9-ти тезисов доклада. Ссылки на собственные работы автора в диссертации присутствуют. Автореферат и публикации полностью отражают содержание диссертации.

Таким образом, диссертация Варзаковой Д.П. «Неинвазивные электрохимические методы оценки антиоксидант/оксидантной активности биологических объектов», соответствует требованиям, установленным п. 9 Положения о присуждении ученых степеней УрФУ, предъявляемым к

кандидатским диссертациям, как научно-квалификационная работа, совокупность теоретических положений которой можно квалифицировать как научное достижение в области аналитической химии антиоксидантов. Автор работы, Варзакова Дарья Павловна, достойна присуждения степени кандидата химических наук по специальности 1.4.2. Аналитическая химия.

Официальный оппонент,
Доктор химических наук, доцент,
зав. Кафедрой-
руководитель отделения
Химической инженерии
ФГАОУ ВО «Национальный
исследовательский
Томский политехнический университет»



Короткова Елена Ивановна

г. Томск, 634050, пр. Ленина, 30
тел. 8 (3822) 56-43-20, e-mail: elikor@tpu.ru

Подпись Коротковой Елены Ивановны заверяю
Ученый секретарь Ученого совета
ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский
Томский политехнический университет»



Е.А. Кулинич

«16» 11. 2021г