

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева»

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы»

На правах рукописи

Евсеев Анатолий Константинович

**ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ
ДИАГНОСТИКИ И КОРРЕКЦИИ НАРУШЕНИЙ
ГОМЕОСТАЗА**

05.17.03 – технология электрохимических процессов и защита от коррозии

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
доктора химических наук

Научный консультант:
доктор химических наук, профессор
Гольдин Марк Михайлович

Москва – 2014 год

Содержание

Введение.....	7
1 Медицинские приложения электрохимии.....	16
1.1 Диагностические электрохимические технологии.....	18
1.2 Лечебные электрохимические технологии.....	19
1.3 «Редокс потенциал» как отражение баланса окислительно-восстановительной системы организма.....	23
1.3.1 Понятие «редокс потенциала».....	23
1.3.2 Анализ методов измерения «редокс потенциала» в биологических средах.....	30
1.3.3 Связь «редокс потенциала» с некоторыми гомеостатическими параметрами.....	38
1.4 Электрохимические методы определения антиоксидантной активности биологических сред.....	49
1.5 Растворы, содержащие доноры «активного» кислорода.....	57
1.5.1 Связь окисляющей активности растворов с величиной «редокс потенциала».....	59
1.5.2 Получение и свойства растворов, содержащих доноры «активного» кислорода.....	61
1.6 Электрохимическая коагуляция крови.....	68
2 Методики исследования.....	76
2.1 Электрохимические методики.....	76
2.1.1 Методики измерений.....	76
2.1.2 Методики электросинтеза.....	78
2.1.3 Методика электрохимического нанесения покрытий благородными металлами на ангиографические проводники.....	80
2.1.4 Методика определение защитной способности покрытий благородными металлами.....	81
2.1.5 Методика электрохимической коагуляции.....	82
2.2 Спектрофотометрические измерения.....	82

2.3 Биологические методики.....	86
2.3.1 Подготовка биологических сред к исследованию.....	86
2.3.2 Структура и объем исследования потенциала при разомкнутой цепи биологических сред.....	87
2.3.3 Методика исследования гемосовместимости.....	89
2.3.4 Определение антиоксидантной активности биологических сред.....	89
2.3.5 Морфофункциональные исследования.....	90
2.3.6 Бактериологические исследования.....	90
2.4 Методика приготовления модельных растворов антиоксидантов.....	90
2.5 Статистический анализ.....	91
3 Измерение потенциала при разомкнутой цепи в биологических средах.....	94
3.1 Моделирование процесса измерения потенциала при разомкнутой цепи в биологических средах.....	94
3.1.1 Проблема измерения потенциала при разомкнутой цепи в «слабых» окислительно-восстановительных средах.....	94
3.1.2 Исследование влияния добавок оксидантов и антиоксидантов на потенциал при разомкнутой цепи водных сред.....	102
3.1.3 Исследование потенциала при разомкнутой цепи в водно-белковых средах.....	104
3.2 Измерение потенциала при разомкнутой цепи в крови, сыворотки крови и плазме крови.....	107
3.2.1 Измерение потенциала при разомкнутой цепи в цельной крови.....	107
3.2.2 Измерение потенциала при разомкнутой цепи в сыворотке и плазме крови.....	108
3.2.3 Анализ зависимостей потенциала при разомкнутой цепи в сыворотке крови.....	109
3.3 Применение измерения потенциала при разомкнутой цепи в клинической практике.....	114
3.3.1 Исследование пациентов с острой церебральной патологией.....	114
3.3.2 Исследование пациентов с острыми септическими состояниями.....	121

3.3.3	Исследование пациентов с трансплантированными органами.....	124
3.3.4	Сравнительный анализ данных мониторинга потенциала при разомкнутой цепи у различных групп пациентов.....	141
3.4	Разработка новых направлений измерения потенциала при разомкнутой цепи в биологических средах и тканях.....	146
3.4.1	Применение метода измерения потенциала при разомкнутой цепи для оценки состояния желудочно-кишечного тракта.....	147
3.4.2	Исследование новых электродных материалов с целью замены платины при измерении потенциала при разомкнутой цепи в биологических средах.....	156
4	Измерение антиоксидантной активности биологических сред.....	163
4.1	Разработка метода определения антиоксидантной активности на электродах, модифицированных гексацианоферратами.....	164
4.1.1	Электросинтез пленок NiHCF и CoHCF.....	166
4.1.2	Исследование водных растворов антиоксидантов.....	169
4.1.3	Применение модифицированных электродов для анализа биологических образцов.....	174
4.2	Разработка метода определения антиоксидантной активности с помощью медиатора.....	176
4.2.1	Исследование водных растворов антиоксидантов.....	177
4.2.2	Исследование биологических образцов.....	183
4.3	Совместное определение ПРЦ и антиоксидантной активности биологических сред.....	186
5	Электросинтез растворов доноров «активного» кислорода.....	192
5.1	Электросинтез растворов на основе сульфатно-хлоридных растворов...	192
5.1.1	Выбор электродного материала.....	192
5.1.2	Влияние pH исходного раствора электролита на окисляющие свойства синтезированных растворов.....	198
5.1.3	Исследование потенциала при разомкнутой цепи в окисляющих растворах, полученных в щелочных сульфатно-хлоридных растворах....	207

5.1.4 Исследование окисляющих и биологических свойств окисляющих растворов, синтезированных в сульфатно-хлоридных растворах.....	210
5.2 Электросинтез растворов на основе карбонатных и карбонатно-хлоридных растворов.....	216
5.2.1 Электросинтез растворов на основе карбонатных растворов.....	216
5.2.2 Электросинтез растворов на основе карбонатно-хлоридных растворов.....	219
6 Электрохимический эндоваскулярный гемостаз (остановка кровотечений)..	221
6.1 Подбор электродного материала.....	222
6.2 Поляризационные измерения.....	223
6.3 Моделирование процесса электрокоагуляции на платиновом электроде	226
6.4 Оценка защитной способности покрытий благородными металлами.....	229
6.5 Электрокоагуляция <i>in vitro</i> на электродах из благородных металлов.....	231
6.6 Электрокоагуляция <i>in vivo</i>	233
Выводы.....	235
Список используемых источников.....	237
Приложение 1. Результаты микробиологических исследований.....	278

Список сокращений

- ПРЦ – потенциал при разомкнутой цепи
- АФК – активные формы кислорода
- ЛН – липидная молекула
- ОВП – окислительно-восстановительный потенциал
- РП – редокс потенциал
- НАД (NADH) – никотинамидадениндинуклеотид
- В.Е.В. – биоэлектронный метод Винсента (Vincent's bio-electronic method)
- АОА – антиоксидантная активность
- ТАС –total antioxidant capacity
- ORAC –oxygen radical absorbance capacity
- TRAP –total radical trapping antioxidant parameter
- FRAP –ferric reducing antioxidant power
- ТЕАС –Trolox equivalent antioxidant capacity
- ТВАРС –thiobarbituric acid reactive substance
- АВТС – 2,2'-азинобис[3-этил-2,3-дигидро-6-бензотиазолсульфоксилота]
- ААРН – 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин) дигидрохлорид
- ДРРН – 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил
- ЦВА – циклическая вольтамперометрия
- ЭДО – электрохимическая детоксикация организма
- ПСН – персульфат натрия
- ГХН – гипохлорит натрия
- ОРТА – оксиднорутениево-титановые аноды
- РБС – фосфатный буфер (phosphate buffer solution)
- ГБО – гипербарическая оксигенация
- ТАС – общий антиоксидантный статус (total antioxidant status)
- ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
- ТРГ – терморасширенный графит
- ГЦФ (НСФ) – гексацианоферрат

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Нарушения окислительно-восстановительной системы гомеостаза (например, гипоксические состояния, ишемия органов) являются в настоящее время весьма распространенными при заболеваниях различной этиологии, включая нарушения эндогенного характера, острые хирургические вмешательства, трансплантацию органов. Своевременная коррекция лечения указанных нарушений требует эффективных диагностических и прогностических методов исследования пациентов. Поэтому особое значение в настоящее время приобретает разработка новых неинвазивных экспресс методов диагностики осложнений при лечении пациентов с гипоксическими состояниями после операции трансплантации органов, так как прогнозирование дисфункции трансплантированного органа должно своевременно сигнализировать клиницистам о необходимости коррекции тактики лечения пациента и, тем самым, избежать осложнений. Особенно важно достоверно прогнозировать и диагностировать криз отторжения органа с помощью неинвазивного метода. Однако имеющиеся в настоящее время методы диагностики криза являются инвазивными, то есть весьма травматичными, поскольку основаны на биопсии органа с последующим гистохимическим исследованием ткани. Кроме того, отсутствуют методы, способные прогнозировать криз отторжения.

Важной проблемой остается до сих пор создание содержащих доноры «активного» кислорода детоксицирующих растворов, не разрушающих ткани, для лечения таких социально значимых заболеваний, как эндогенные токсикозы и острые экзогенные отравления. Эти заболевания приводят к гипоксическим состояниям, однако существующий в настоящее время электрохимически синтезированный «окисляющий» раствор гипохлорита натрия, как известно, помимо лечебного детоксицирующего эффекта обладает рядом побочных действий. Основными типичными осложнениями от применения гипохлоритного раствора являются разрушение сосудистой ткани в месте контакта катетера для

его введения в вену и возникновение выраженного гемолита эритроцитов (содержание свободного гемоглобина в крови достигает 10% при норме 0,02%).

К социально значимым заболеваниям следует отнести также массивные кровотечения, возникающие при травме внутренних органов. Внутрисосудистая остановка кровотечений (гемостаз) осуществляется в настоящее время, как правило, с помощью локального нагревания сосудистой стенки (например, лазером), либо механического сжатия сосуда (клипирование), однако менее травматичным является гемостаз без нагревания («холодный» гемостаз), например, с помощью анодной коагуляции крови. Однако, этот метод не получил широкого применения из-за использования в качестве рабочего электрода ангиографических проводников с дорогостоящих платиновыми наконечниками.

Электрохимические технологии, обладая рядом таких существенных преимуществ, как селективность, гибкость, простота и относительно невысокая стоимость, уже продемонстрировали широкие возможности для использования их в различных областях медицины. В настоящее время успешно внедрены в клиническую практику различные электрохимические сенсоры для диагностики параметров жизнедеятельности организма, используется электрохимически управляемая гемосорбция для лечения острых отравлений и эндотоксикозов, развивается метод электрохимической коагуляции для лечения аневризм. Имеется множество примеров использования электрохимических методов в медицине для синтеза лекарственных препаратов, с помощью электролитических покрытий придают биосовместимые свойства различным электропроводным материалам.

Большое количество работ посвящено разработке методов выявления, контроля и количественной оценки нарушений окислительно-восстановительной системы организма, которые основаны на измерениях так называемого «редокс потенциала» (РП), то есть потенциала платинового электрода в тестируемой биологической среде при разомкнутой цепи (ПРЦ). Ранее в течение многих лет предпринимались многочисленные попытки связать величину РП с различными биохимическими показателями крови. Однако отсутствие корректной воспроизводимой методики измерений потенциала платинового электрода при

разомкнутой цепи в плазме крови не дало возможности использовать полученные результаты для создания диагностического метода.

Известно, что величины редокс потенциалов биологической среды характеризуют состояние равновесия про- и антиоксидантов в организме. Поэтому представляется важной задача сопоставления величин редокс потенциалов биологической жидкости и уровня ее антиоксидантной активности. Особого внимания в рамках данной проблемы заслуживают вольтамперометрические методы определения антиоксидантов благодаря их простоте, селективности и экспрессности.

Ценность информации, полученной с помощью указанных выше методов, состоит в том, что уровень детектируемых биологически активных веществ, как правило, отражает работу функциональных систем организма и может свидетельствовать о наличии неблагоприятных процессов, протекающих в организме. Это особенно важно для выявления различных патологических состояний на ранней стадии их развития. Указанное выше направление, с нашей точки зрения, является также перспективным для разработки новых диагностических технологий, основанных на измерении потенциалов пораженных твердых тканей и сопоставлении их с величинами потенциалов здоровых участков.

Основываясь на модели Б. Норденстрема, рассматривающей организм в виде суммы закрытых электрических цепей, а также учитывая развитые в работах М.М. Гольдина теоретические и экспериментальные обоснования электрохимических механизмов взаимодействия форменных элементов крови с электропроводящими материалами, можно прийти к выводу о возможности использования для лечения не только отрицательно заряженных углей-гемосорбентов, но также и положительно заряженных материалов для электрохимического эндоваскулярного гемостаза. Работоспособность этих представлений подтверждается также исследованиями П. Сойера.

Часть настоящей работы выполнена в соответствии с Федеральной целевой

программой «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» Министерства образования и науки Российской Федерации (Госконтракт №16.513.11.3022 от 08.04.2011).

Цель работы – разработка диагностических и прогностических электрохимических технологий для исследования состояния пациентов с гипоксическими состояниями с помощью мониторинга ПРЦ платинового электрода и уровня антиоксидантов в плазме крови, а также электрохимических методов коррекции гомеостаза, включая электросинтез окисляющих растворов и электрохимическую «холодную» остановку внутрисосудистых кровотечений.

Достижение поставленной цели потребовало решения следующих задач:

1. Проанализировать электрохимическое поведение платинового электрода в бестоковом режиме в водных растворах и биологических средах, содержащих растворенный кислород и другие окислители, восстановители, антиоксиданты природного происхождения для создания метода предобработки платинового электрода.

2. Разработать электрохимические экспресс методы определения антиоксидантной активности жидких сред организма для контроля состояния пациентов.

3. Исследовать влияние окислительно-восстановительных свойств тестируемых биологических жидкостей на величину и направление отклика потенциала платинового электрода в плазме крови пациентов с гипоксическими состояниями различной этиологии.

4. Выявить связи величины и знака ПРЦ платинового электрода в плазме крови с состоянием окислительно-восстановительной системы гомеостаза для возможности прогнозирования состояния окислительного стресса либо торможения окислительных процессов в организме тестируемого пациента, разработке диагностических и прогностических электрохимических критериев при лечении пациентов с гипоксическими состояниями при трансплантации органов.

5. Разработать метод электросинтеза окисляющих растворов, содержащих дозоры «активного» кислорода, обладающих бактерицидным действием для коррекции гипоксических состояний пациентов с экзо- и эндотоксикозами и исследовать кинетику окисления некоторых токсикантов.

6. Исследовать влияние электрохимических параметров на образование сгустка в крови и плазме крови на электродах из нержавеющей стали, покрытых благородными металлами, для разработки метода «холодного» электрохимического гемостаза.

Научная новизна

В настоящей работе развиты представления об использовании единой электрохимической платформы для разработки методов диагностики и коррекции лечения при различных гомеостатических нарушениях, что обусловлено электрохимической природой протекания большинства важнейших гомеостатических процессов. С помощью электрохимической модели взаимодействия чужеродных материалов с биологическими средами организма была выявлена взаимосвязь тяжести состояния пациента с величиной так называемого РП плазмы или сыворотки крови при ежедневном мониторинге.

Измерения величин РП плазмы у 63 практически здоровых добровольцев был получен статистически значимый диапазон потенциалов, соответствующих норме у здоровых людей, диапазон составил от -60 до -20 мВ.

Впервые было установлено, что изменение величины ПРЦ в плазме или сыворотке крови пациента более чем на 25 мВ за время 24-36 часов свидетельствует о появлении осложнений. Важно, что указанные осложнения могут быть весьма тяжелыми, это многократно показано на примерах лечения пациентов с трансплантированными печенью, почкой и легкими. Действительно, у пациентов из указанных групп одновременно с появлением указанного сдвига величины ПРЦ или на несколько дней позже на основании клинических данных были зафиксированы такие осложнения, как дисфункции трансплантированного органа, воспалительные процессы различной этиологии, состояние окислительного стресса и др.

Весьма важные результаты были получены при измерениях величин ПРЦ в процессе мониторинга ПРЦ плазмы крови пациентов с трансплантированной почкой в послеоперационном периоде. Анализ полученных данных позволил выявить величину порогового потенциала платинового электрода при разомкнутой цепи на пятые сутки после операции трансплантации органа. Это позволило с весьма высокой вероятностью ($p \leq 0,05$) прогнозировать развитие указанных осложнений и, таким образом, относить пациента к группе риска.

Исследование влияния различных окислителей и восстановителей, в том числе антиоксидантов природного происхождения, на величину ПРЦ платинового электрода в плазме крови и водных растворах 0,9% NaCl, позволили экспериментально подтвердить, что природа сдвигов потенциала во времени и абсолютные величины ПРЦ платинового электрода в плазме и сыворотке крови отражают состояние баланса про- и антиоксидантных систем организма.

Статистический анализ массива данных, полученных при мониторинге величин ПРЦ платинового электрода в плазме крови позволил выделить области величин потенциалов, характерные для различных нарушений гомеостаза (острые церебральные состояния, послеоперационный период лечения пациентов с трансплантированными органами).

Полученные в настоящей работе данные об отклонениях величин ПРЦ платинового электрода в плазме крови от диапазона, характерного для здоровых людей, и сопоставление их с клиническими данными позволило сделать вывод о том, что величины ПРЦ вне диапазона, характерного для здоровых людей, соответствуют нарушениям работы окислительно-восстановительной системы гомеостаза. Сдвиги величин потенциала в положительную область соответствуют преобладанию в организме окислительных процессов и сигнализируют о вероятности возникновения у пациента состояния окислительного стресса, сдвиги величин ПРЦ в отрицательную область соответствуют торможению окислительных процессов, что может замедлять протекание процессов удаления шлаков из организма.

Впервые обнаружено влияние нозологических форм патологических

состояний пациента на вид зависимости потенциала платинового электрода в плазме или сыворотке крови от времени. Оказалось, что наличие волнообразных участков на кривой потенциал-время соответствует наличию у пациента воспалительных состояний различной природы (например, пневмония, септические состояния, пиелонефрит - неспецифический воспалительный процесс с преимущественным поражением канальцевой системы почки, преимущественно бактериальной этиологии). Возникновение периодических колебаний потенциала при разомкнутой цепи во времени, по-видимому, связано с активацией нейтрофилов при воспалительных процессах. Продуцирование нейтрофилами активных форм кислорода являться причиной кратковременного периодического возрастания потенциала электрода, которое затем компенсируется антиоксидантной системой, что приводит потенциал к первоначальному значению.

Совместный мониторинг ПРЦ и антиоксидантной активности впервые позволил рассчитать долю окислительных процессов, имеющих место в тестируемой среде.

Анализ электрохимической модели взаимодействия заряженной металлической поверхности с плазмой крови и тканями позволил предсказать протекание деструктивных процессов и электрохимического активирования образования внутрисосудистого сгустка, что использовано для создания метода «холодного» эндоваскулярного гемостаза.

Практическая значимость

Разработка электрохимических методов диагностики заболевания дает возможность коррекции тактики лечения у пациентов с трансплантированными органами (печенью, почкой и легкими), пациентов с септическими состояниями, а также пациентов с острой церебральной патологией. Преимущества разработанного метода состоят в неинвазивности, экспрессности и простоте определения. Разработаны диагностические и прогностические критерии оценки тяжести состояния, вероятности возникновения осложнений и исхода заболевания пациентов с трансплантированными органами. Обнаружены явления колебаний

потенциала во времени, что использовано для разработки метода диагностики воспалительных состояний. Разработаны электрохимические критерии оценки эффективности проведения активных лечебных мероприятий (например, процедур гипербарической оксигенации, пульс-терапии, гемодиализа и других методов эфферентной терапии).

Разработаны методы электрохимического определения антиоксидантной активности биологических сред с использованием электродов электрохимически модифицированных гексацианоферратами переходных металлов, а также с использованием п-бензохинона в качестве медиатора. Сопоставление данных измерений антиоксидантной активности плазмы крови, полученных с помощью разработанных методов, с данными, полученными стандартным спектрофотометрическим методом, показало высокую корреляцию (не менее 0,84).

Разработан способ электросинтеза лечебных растворов, содержащих активные формы кислорода, на базе электроокисления разбавленных сульфатных растворов с содержанием хлорида в электролите не более 1,5 мМ. Доказана бактерицидная активность по отношению к грамотрицательным бактериям при сохранении высокой гемосовместимости синтезированных растворов.

Разработан и испытан на животных метод остановки кровотечений с помощью «холодной» электрохимической коагуляции при использовании ангиографического проводника-электрода с электролитическим родиевым покрытием, что позволило избежать анодного растворения подложки из нержавеющей стали.

Апробация работы

Материалы работы докладывались VII Европейском симпозиуме по химической технологии (2005); VIII и IX Международных Фрумкинских симпозиумах (2006, 2010); 14 Конференции Московского городского общества гемафереза (2006); II, V–IX Международных конгрессах молодых ученых по химии и химической технологии (2006, 2009–2013); 212, 216, 219, 220, 223, 225 Съездах электрохимического общества США (2007, 2009, 2011, 2013, 2014); 61 и

65 Съездах Международного электрохимического общества (2010, 2014); XIII Съезде федерации анестезиологов и реаниматологов (2012); VI Всероссийском съезде трансплантологов (2012) и других.

Публикации

По теме диссертационной работы опубликовано 25 статей, в том числе 13 статей в российских рецензируемых журналах, включенных в перечень ВАК, и 3 статьи в международных рецензируемых журналах, включенных в базы данных Scopus и Web of Science. Опубликовано 32 тезиса докладов. Получено 2 патента Российской Федерации.

1 Медицинские приложения электрохимии

В медицине и электрохимии можно найти немало точек соприкосновения. Считается, что электрохимия как наука началась с медицинских опытов итальянского физиолога Гальвани, который является одним из основателей электрофизиологии и учения об электричестве. В 1786 году Гальвани положил начало своим опытам, он первым исследовал электрические явления при мышечном сокращении и в 1791 году в «Трактате о силах электричества при мышечном движении» было описано сделанное Гальвани знаменитое открытие. В ходе опытов по составлению замкнутой цепи из проводящих тел и металлов (лучше всего по признанию самого учёного было использовать разные металлы, например железный ключ и серебряную монету) и лягушачьего препарата Гальвани предположил, что мышца является своеобразной батареей лейденских банок, непрерывно возбуждаемой действием мозга, которое передается по нервам. Именно так и была рождена теория «животного электричества», именно эта теория создала базу для возникновения электромедицины, и открытие Гальвани произвело сенсацию.

Эти события привели к образованию трех новых наук – электрофизиологии, биофизике и электрохимии [1]. Однако выделившись в отдельную область, электрохимия достаточно продолжительное время была оторвана от медицины, поскольку занялась в основном техническими приложениями добытых знаний. В это время бурно развивались гальванотехника, коррозия и защита металлов, топливные элементы и химические источники тока, электросинтез и ряд других направлений электрохимии. И только спустя 100 лет начинает проявляться интерес к исследованиям на стыке электрохимии и медицины.

К настоящему времени в области медицинских приложений электрохимии можно выделить достаточно большое количество направлений (табл. 1.1). Подчеркнем, что такое подразделение весьма условно, поскольку зачастую для решения различных медицинских задач могут быть использованы одни и те же электрохимические технологии (например, электрофорез для разделения

макромолекул, определения подвижности форменных элементов крови и плотности поверхностного заряда клеточных мембран, транскутанного (чрескожного) введения лекарственных препаратов.

Таблица 1.1 - Электрохимические методы в медицине

Диагностические методы	Лечебные методы
- Электрохимический анализ	- Непрямая электрохимическая детоксикация
- Биосенсоры	- Электрокоагуляция
- Электрофорез	- Электрохимически управляемая гемосорбция
	- Электросинтез лекарственных препаратов
	- Электродиализ
	- Биосовместимые покрытия

Одним из фундаментальных направлений на стыке биологии и электрохимии является биоэлектрохимия, в область интересов которой попадают изучение электрохимических механизмов процессов, протекающих в живой клетке [2]. В качестве примера таких процессов можно привести клеточный электронно-протонный транспорт, возникновение потенциала клеточной мембраны, электродные реакции окислительно-восстановительных ферментов и др. [3, 4]. А.Н. Фрумкин еще в 1970-е гг. предсказал, что изучение электрохимических процессов в живом организме (т.е. биоэлектрохимия) станет одним из самых перспективных направлений развития этой науки [5].

Основоположником биоэлектрохимии считается итальянский ученый Джулио Милаццо [6], который, однако, подчеркивал, что корни биоэлектрохимии лежат в работах Гальвани и Вольты. Отметим, что исследования механизмов выработки электричества некоторыми видами животных и растений не потеряли актуальность до настоящего времени [7, 8].

Значительный вклад в развитие биоэлектрохимии внесли Л.И. Богуславский, Ю.А. Чизмаджев и В.С. Маркин, работы которых посвящены исследованиям свойств биологических мембран и механизму передачи нервного

импульса [9-11].

Бурное развитие биоэлектрохимии четко обозначило фундаментальное значение электрохимии для биологии и медицины, поскольку ее принципы лежат в основе большинства процессов жизнедеятельности организмов.

Практическое использование электрохимических методов в медицине можно подразделить на два основных направления: диагностические и лечебные технологии.

1.1 Диагностические электрохимические технологии

Из диагностических методов выделим электрофизиологические, основанные на различных электрических явлениях в живых тканях организма (биоэлектрические потенциалы). Наиболее широко в настоящее время используются электрокардиография (для диагностики кардиологических заболеваний), электроэнцефалография (для исследования функции сенсорных систем мозга), электромиография (для исследования гладкомышечных внутренних органов) и некоторые другие методы. [12, 13].

Подчеркнем, что указанные методы не являются электрохимическими в традиционном понимании, поскольку здесь отсутствуют некоторые признаки, обязательные для описания электрохимических явлений (например, нет обязательной для протекания любого электрохимического процесса границы раздела электрод/раствор), однако измеряемые электрические сигналы являются продуктами электрохимических процессов, протекающих во внутренних средах живых организмов.

Если говорить об использовании традиционных электрохимических методов для медицинской диагностики, необходимо упомянуть одно из быстро развивающихся направлений – электрохимические датчики, в том числе биосенсоры [14]. Электрохимические методы обладают рядом существенных преимуществ перед широко распространенными в медицине физико-химическими методами спектрофотометрией и хроматографией: быстрое действие, возможность

анализировать окрашенные образцы и коллоидные среды. Работа электрохимических сенсоров основана на использовании потенциометрических, амперометрических и импедансометрических методов. Основным преимуществом биосенсоров следует считать их селективность по отношению к заданным биологическим веществам и лекарственным препаратам [15-18].

Широкое распространение получили также амперометрические методы, которые позволяют быстро и с высокой чувствительностью определять концентрацию различных веществ, как в водных растворах, так и в биологических средах [19]. Среди амперометрических датчиков выделим ферментные сенсоры в виде электрода с иммобилизованным на его поверхности биологическим катализатором (например, изолированным ферментом, антителом, антигеном, некоторыми клетками, микроорганизмами, срезами тканей). Как правило, биокатализатор, который находится на поверхности электрода в иммобилизованном состоянии, осуществляет превращение субстрата, а электрод детектирует убыль одного из субстратов или продуктов ферментативной реакции [20].

В течение длительного времени исследователи проявляют активный интерес к развитию метода измерения так называемого «редокс потенциала» в различных средах (как водных, так и биологических). С электрохимической точки зрения этот метод измеряет потенциал платинового электрода при разомкнутой цепи (ПРЦ), погруженного в тестируемую среду. К настоящему времени накоплен значительный материал по диагностике состояния организма с помощью указанного метода [21, 22].

Итак, электрохимические методы и приборы, благодаря ряду указанных выше преимуществ (простота, селективность, гибкость, относительно невысокая стоимость), нашли широкое применение в различных медицинских технологиях.

1.2 Лечебные электрохимические технологии

В конце 70-х норвежский ученый Б. Норденстрём разработал концепцию

модели гомеостаза в виде «Биологически закрытых электрических цепей», которая заключается в рассмотрении организма человека как совокупности цепочек электрохимических процессов, которые образуют общую закрытую электрическую цепь [23, 24]. Согласно Б. Норденстрёму, здоровые и поврежденные участки тканей обладают различными электрическими потенциалами, что было зафиксировано с помощью измерения потенциалов платиновых электродов, имплантированных в ткани (рис. 1.1). Однако в работах Б. Норденстрёма отсутствуют физико-химические обоснования причин наблюдаемых явлений.

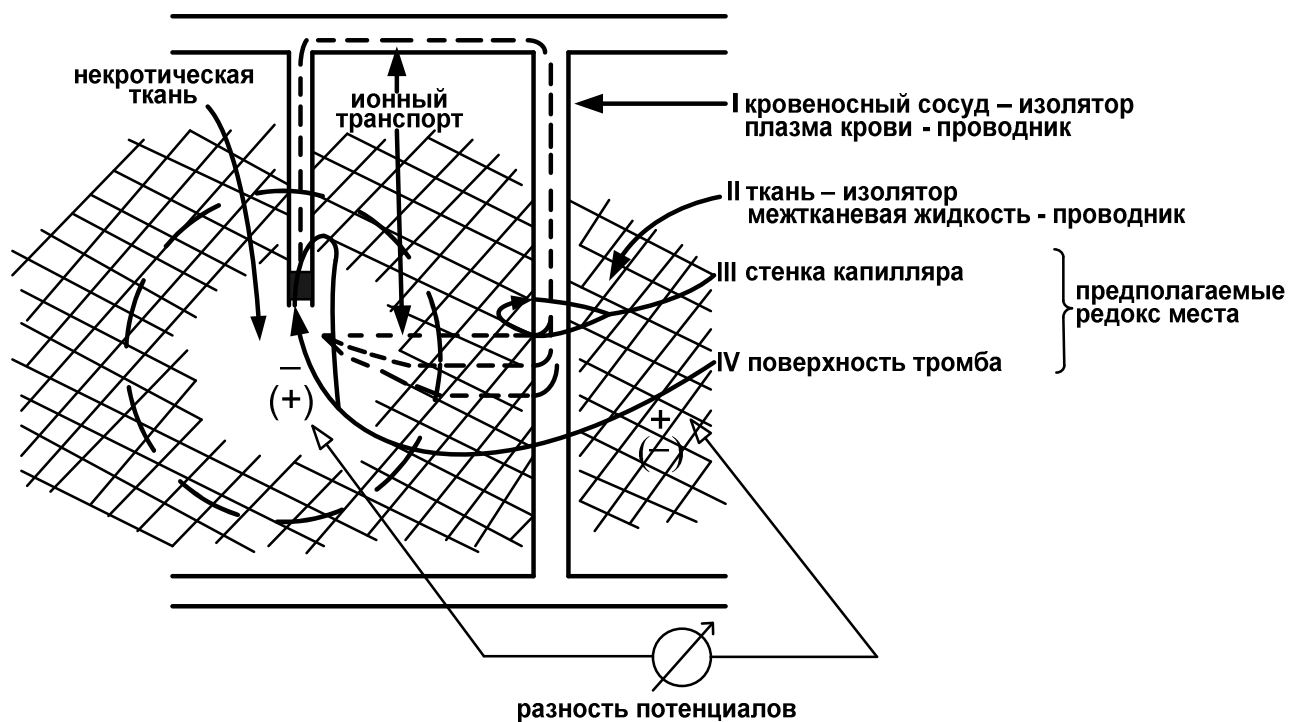


Рисунок 1.1 – Сосудисто-внутриканевая закрытая цепь [23].

Основываясь на своей модели, Б. Норденстрём предложил электрохимический метод лечения злокачественных опухолей с помощью вживления в пораженные участки электродов и поляризации их до потенциалов, обеспечивающих гибель злокачественных клеток [25]. Метод Б. Норденстрема нашел продолжение в разработке метода лечения рака с помощью электрохимического лизиса [26, 27].

В 60-х годах XX века П. Соьер показал возможность протекания процесса анодного тромбообразования при контакте металлического электрода с кровью [28], на основе этих представлений был предложен метод электрохимической коагуляции крови для остановки кровотечений [29].

Изучение взаимодействия форменных элементов крови с заряженной поверхностью активированного угля [30] позволило создать электрохимическую модель указанного взаимодействия, заложить основы создания биосовместимых гемосорбентов и реализовать электрохимически управляемые процессы удаления экзотоксикантов из крови.

Помимо улучшения биосовместимых свойств материалов медицинского назначения с помощью внешней поляризации, в последние годы развиваются электрохимические медицинские технологии, использующие электропроводные полимеры (например, полипиррол) для электросинтеза биосовместимых композитных материалов [31-33].

Представляет интерес попытка разработать метод прямой электрохимической детоксикации крови [34]. Суть данного метода заключалась в пропускании крови через анодную камеру электролизера и анодному окислению находящихся в крови токсических веществ. Однако эта попытка обречена на неудачу, поскольку, как следует из работ П. Соьера [29], при анодных потенциалах на электроде протекают процессы тромбообразования. Действительно, авторы наблюдали явление блокировки анода денатурирующимися при анодной поляризации белками [35] и назвали это явление эффектом «белковой защиты».

Проблем активного воздействия на кровь в процессе окисления растворенных в ней ксенобиотиков и эндотоксикантов удалось избежать с помощью так называемого непрямого электроокисления токсикантов в крови. Этот метод состоит в том, что в кровь вводят заранее электрохимически синтезированный раствор, содержащий доноры «активного» кислорода. При контакте такого раствора с биологической жидкостью, содержащей экзо- или эндотоксиканты, способные окисляться, происходит детоксикация, в результате

которой образуются нетоксичные продукты. Изначально в качестве донора «активного» кислорода использовали раствор электрохимически синтезированного 0,06% гипохлорита натрия [36], однако данный раствор обладает рядом существенных недостатков. Позднее этот принцип лег в основу разработки менее агрессивных растворов на основе электрохимически синтезированного персульфата натрия [37-39].

Помимо развития методов электросинтеза окисляющих растворов, постоянно пополняется список синтезированных электрохимически лекарственных веществ [40-46].

Новый подход к созданию электрохимически управляемых медицинских технологий, предложенный и развитый в работах М.М. Гольдина с сотр. [47, 48], основанный на учете электрохимического характера важнейших гомеостатических процессов (например, преобразования сигналов и передача нервных импульсов, передачи заряда в электронных транспортных цепочках дыхания, ионного обмена через клеточную мембрану [3, 4, 6-11, 49, 50]), позволил создать электрохимическую модель взаимодействия электропроводного материала с клетками крови. Согласно этой модели, электропроводящий материал (металл, активированный уголь и другие углеродные материалы, электропроводный полимер) является электродом, погруженным в биологическую среду. Электрохимический подход к пониманию явлений, происходящих на границе раздела электрод/раствор (в рамках данной модели - биологическая среда), позволил использовать потенциал контактирующего с биологической средой материала (электрода) для управления процессами взаимодействия клетки с чужеродными материалами (например, углеродными гемосорбентами, металлическими стентами и др.). Разработанные на базе понимания электрохимического механизма взаимодействия электродов с живыми системами, электрохимически управляемые процессы детоксикации организма показали перспективность исследований в этой области.

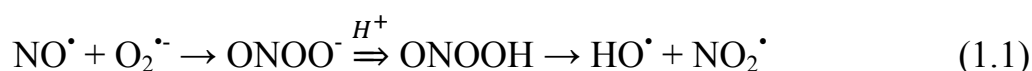
1.3 «Редокс потенциал» как отражение баланса окислительно-восстановительной системы организма

1.3.1 Понятие «редокс потенциала»

В последнее время наблюдается возрастание интереса к роли окислительно-восстановительных процессов, протекающих в организме, как к компоненту гомеостаза, и к связи этих процессов с различными патологическими состояниями. В нормально функционирующем организме человека существует баланс между окислителями (прооксидантами, свободными радикалами), образующимися в ряде физико-химических процессов в организме, и восстановителями (компонентами системы антиоксидантной защиты). Нарушения этого баланса при заболеваниях различной этиологии могут приводить к окислительным стрессам и ослаблению иммунитета либо к замедлению радикальных процессов, т.е. к нарушениям процессов очищения внутренней среды организма от продуктов распада.

Наиболее широкую группу прооксидантов составляют активные формы кислорода (АФК). Известно, что молекулярный кислород, попадающий в организм, как правило, не вступает в неконтролируемые химические реакции внутри организма и не подвергает опасности органические макромолекулы клетки. Наибольшей активностью обладают супероксидные радикалы ($O_2^{\cdot-}$), перекись водорода (H_2O_2), гидропероксидный радикал (HO_2^{\cdot}) и гидроксильный радикал (HO^{\cdot}), синглетные формы кислорода (1O_2), ионы NO_2^- и гипохлорную кислоту ($HClO$) [51-53].

К АФК может быть отнесен еще один кислородный радикал – окись азота (NO^{\cdot}), который при взаимодействии с $O_2^{\cdot-}$ образует сильный окислитель пероксинитрит, который в свою очередь распадается с образованием высокоактивного гидроксил-радикала [54]:



Основные механизмы появления АФК в организме связаны обычно с нарушениями функционирования электронотранспортных цепей митохондрий или микросом [55]. Особняком стоит нормальный процесс формирования АФК фагоцитами в ходе стимуляции неспецифической защиты организма [56, 57]. Также АФК играют важную роль в протекании различных процессов в защитных иммунных механизмах организма [56].

Упомянутые выше прооксиданты относят к первичным радикалам. Взаимодействию первичных радикалов с липидными молекулами (LH) приводит к образованию вторичных радикалов вида - L^{\cdot} , LO_2^{\cdot} , LO^{\cdot} .

Основные виды биологически важных свободных радикалов представлены в табл. 1.2 [54].

Таблица 1.2 – Основные виды АФК, свободных радикалов и эндогенных прооксидантов, образующихся в живых системах [52]

	Свободные радикалы	Эндогенные прооксиданты
Активные формы кислорода	$O_2^{\cdot-}$ HO_2^{\cdot} HO^{\cdot} NO^{\cdot}	$H_2O_2 \rightarrow HO^{\cdot}$ $HOCl \rightarrow HO^{\cdot}$ $ONOOH \rightarrow HO^{\cdot}$
Свободные радикалы липидов	L^{\cdot} LO_2^{\cdot} LO^{\cdot}	$LOOH \rightarrow LO^{\cdot}$
Радикалы антиоксидантов	$\alpha\text{-TO}^{\cdot}$ $^{\cdot}QH$ $HO\text{-Asc-O}^{\cdot}$	—

Противовесом свободным радикалам и прооксидантам в организме служит антиоксидантная система, ограничивающая накопление высокотоксичных свободнорадикальных интермедиатов.

Основными элементами антиоксидантной системы организма являются такие важнейшими ферменты, как супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза. Классические антиоксиданты – витамин Е, витамин А и каротиноиды – активны по отношению ко всему спектру АФК, но их вклад в общую антиоксидантную активность организма не слишком велик [58].

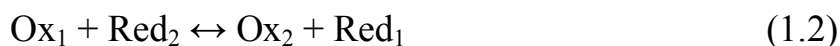
Как правило, в организме определенной группе прооксидантов соответствует определенная группа антиоксидантов табл. 1.3.

Таблица 1.3 – Основные типы природных и синтетических антиоксидантов [52]

Свободные радикалы или эндогенные прооксиданты	Антиоксиданты	
	Природные	Синтетические
$O_2^{\cdot-}$	супероксиддисмутаза	миметики СОД: медь-содержащие органические комплексы
H_2O_2	каталаза, GSH- пероксидаза	–
LO_2^{\cdot}, LO^{\cdot}	α -токоферол, восстановленная форма убихинона Q_{10}	фенольные антиоксиданты: ионол (дибунол), пробукол и др.
$\alpha\text{-}TO^{\cdot}, \text{QH}^{\cdot}$	аскорбиновая кислота	–
$LOOH$	GSH-пероксидаза, GSH-трансфераза	миметики селен-содержащей GSH-пероксидазы: эбселен и др. селен-органические соединения
$ONOO^{\cdot}$	GSH-пероксидаза	эбселен

С электрохимической точки зрения реакции, характерные как для прооксидантной, так и для антиоксидантной систем, можно описать суммой окислительно-восстановительных процессов. Интегральным отражением этих

процессов, протекающих в организме, является величина так называемого окислительно-восстановительного (ОВП) или «редокс потенциала» (РП) биологических сред организма (кровь, плазма крови, сыворотка крови, моча, спинномозговая жидкость и др.) [59, 60]. Взаимодействие между указанными системами организма можно представить в виде уравнения (1.2) [61]:



Таким образом, в организме протекают две окислительно-восстановительные реакции:



В общем случае электродный потенциал полуреакций типа (1.3) и (1.4) можно выразить с помощью уравнению Нернста [61]:

$$E = E_0 + \frac{RT}{n_1F} \ln \frac{a_{\text{Ox}_1}}{a_{\text{Red}_1}} \quad (1.5)$$

$$E = E_0 + \frac{RT}{n_2F} \ln \frac{a_{\text{Ox}_2}}{a_{\text{Red}_2}} \quad (1.6)$$

где E – электродный потенциал, В;

E_0 – стандартный электродный потенциал, В;

R – универсальная газовая постоянная, 8,31 Дж/(моль·К);

T – температура, К;

n – число электронов;

F – число Фарадея, 96485,35 Кл·моль⁻¹;

a_{Ox} и a_{Red} — активность окисленной и восстановленной форм вещества, участвующего в полуреакции.

В организме можно выделить несколько окислительно-восстановительных систем: сульфгидрильные системы (цистеин, глутатион), гемоглобин-оксигемоглобин, гемоглобин-метгемоглобин, цитохром [62]. Стандартные потенциалы наиболее часто встречающихся биологических окислительно-восстановительных систем приведены в табл. 1.4.

Таблица 1.4 – Стандартные окислительно-восстановительные потенциалы часто встречающихся биологических окислительно-восстановительных систем (E_0), 25 °С [63]

Окисленная форма	Восстановленная форма	Число электронов, n	E_0 , В
ацетат + диоксид углерода	пируват	2	-0,70
сукцинат + $CO_2 + 2H^+$	α -кетоглутарат + H_2O	2	-0,67
ацетат	ацетальдегид	2	-0,60
глицерат-3-Ф	глицеральдегид-3-Ф + H_2O	2	-0,55
O_2	O_2^-	1	-0,55
ферредоксин (ox)	ферредоксин (red)	1	-0,43
диоксид углерода	формиат	2	-0,42
$2H^+$	H_2	2	-0,42
α -кетоглутарат + $CO_2 + 2H^+$	изоцитрат	2	-0,38
ацетоацетат	β -гидроксibuтират	2	-0,35
цистин	цистеин	2	-0,34
пируват + CO_2	малат	2	-0,33
$NAD^+ + 2H^+$	$NADH + H^+$	2	-0,32
FMN (связанный)	$FMNH_2$	2	-0,30
1,3-бисфосфоглицерат + $2H^+$	глицеральдегид-3-Ф + Ф	2	-0,29
глутатион (ox)	глутатион (red)	2	-0,23
FAD (свободный) + $2H^+$	$FADH_2$	2	-0,22

Продолжение таблицы 1.4

Окисленная форма	Восстановленная форма	Число электронов, n	E_0 , В
ацетальдегид + $2H^+$	этанол	2	-0,20
пируват+ $2H^+$	лактат	2	-0,19
оксалацетат + $2H^+$	малат	2	-0,17
α -кетоглутарат + NH_4^+	глутамат	2	-0,14
FAD + $2H^+$ (связанный)	FADH ₂ (связанный)	2	0,003- 0,09
метиленовый голубой (ок)	метиленовый голубой (red)	2	0,01
фумарат + $2H^+$	сукцинат	2	0,03
CoQ (Убихинон) - UQ + H^+	UQH [•]	2	0,031
UQ + $2H^+$	UQH ₂	2	0,06
дигидроаскорбиновая кислота	аскорбиновая кислота	2	0,06
убихинон (ок)	убихинон (red)	2	0,10
цитохром b ₂ ; Fe ³⁺	цитохром b ₂ ; Fe ²⁺	1	0,12
цитохром c ₁ ; Fe ³⁺	цитохром c ₁ ; Fe ²⁺	1	0,22
цитохром c; Fe ³⁺	цитохром c; Fe ²⁺	1	0,25
цитохром a; Fe ³⁺	цитохром a; Fe ²⁺	1	0,29
$1/2 O_2 + H_2O$	H ₂ O ₂	2	0,30
цитохром a ₃ ; Fe ³⁺	цитохром a ₃ ; Fe ²⁺	1	0,35
феррицианид	ферроцианид	2	0,36
цитохром f; Fe ³⁺	цитохром f; Fe ²⁺	1	0,37
нитрат	нитрит	1	0,42
фотосистема P700	-	-	0,43
Fe ³⁺	Fe ²⁺	1	0,77
$1/2 O_2 + 2H^+$	H ₂ O	2	0,816

Как утверждает В.Н. Шилов [64], определяющая роль в переключении структурных процессов реорганизации ткани принадлежит «редокс потенциалу». Понимание влияния «редокс потенциала» на процессы, протекающие в клетке, как структурной единице организма, дает возможность понять природу общих процессов, протекающих на уровне организма. Согласно В.Н. Шилову, редокс потенциал клетки является показателем ее функционального состояния и определяющим фактором ее структурных преобразований, что иллюстрируется рис. 1.2.

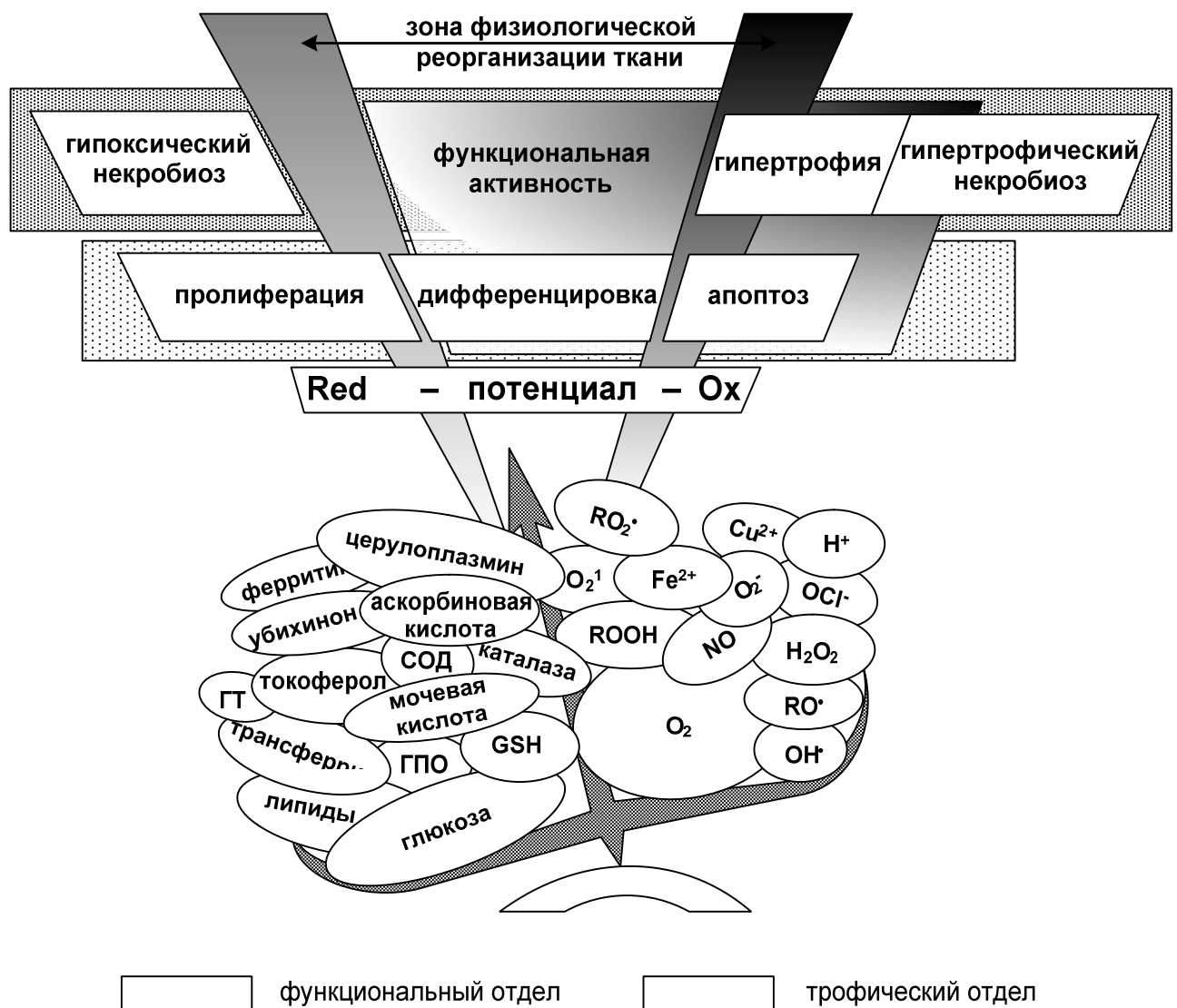


Рисунок 1.2 – Влияние «редокс потенциала» на ход структурных процессов в тканях [64].

Такой способ организации наделяет ткань потенциальными возможностями выхода почти из любого сложного положения, как при повреждающих воздействиях, так и в случаях адаптационного реагирования.

Для нас важно, что была обнаружена связь выраженных сдвигов «редокс потенциала» тканей с включением механизмов клеточной гибели [65].

Таким образом, поскольку живая клетка находится в контакте с окружающей средой, существует тесная связь между внутриклеточным «редокс потенциалом» и окислительно-восстановительным состоянием среды, в которой находится клетка [66]. Поэтому неудивителен интерес к методам измерения, как «редокс потенциала» внутриклеточной среды, так и среды, окружающей клетку, проявившийся уже с конца XIX века [62, 67].

1.3.2 Анализ методов измерения «редокс потенциала» в биологических средах

В настоящее время измерения «редокс потенциала» широко распространены. Это связано с возможностью получения ценной информации о свойствах не только биологических, но и других тестируемых сред. Важно также, что методы измерения являются достаточно простыми и дешевыми. Достаточно широкое применение измерения «редокс потенциала» находят в экологической сфере, где измеренные величины «редокс потенциала» тестируемых сред используют для контроля состояния природных водных источников, грунтовых вод, анализа почв и грунтов [69-71]. В промышленных областях водоочистки и водоподготовки величины «редокс потенциала» используют для оценки качества питьевой воды на всех стадия технологического процесса [72-75]. Имеются примеры использования указанных измерений для санитарно-эпидемиологического контроля, в частности для тестирования качества дезинфицирующих растворов и воды плавательных бассейнов, поскольку выявлена корреляция величины «РП» и концентрации свободного хлора в воде, одним из ключевых параметров для оценки дезинфекционных свойств воды в

бассейнах [76-78].

Особый интерес представляют измерения «редокс-потенциала» в медицине [22, 62, 79]. Первоначально «редокс потенциал» определяли колориметрическим методом с помощью окислительно-восстановительных индикаторов, таких как индофенол, ализариновый синий, метиленовый синий [62], которые до сих пор используются для определения величин внутриклеточного «редокс потенциала» [80, 81].

Однако для определения «РП» водных растворов и биологических сред наибольшее распространение получил электрохимический метод измерения «редокс потенциала» [62].

Суть метода состоит в измерении потенциала рабочего (индифферентного) электрода относительно электрода сравнения при погружении данных электродов в тестируемую среду. В качестве рабочего электрода, как правило, используют платину [48, 82-85] или золото [86-89], однако имеются работы, где в качестве рабочего электрода, который должен быть индифферентным по отношению к тестируемой среде, предлагается использовать углеродные материалы [90]. В качестве электрода сравнения используют каломельный [91], однако чаще всего хлорсеребряный электрод сравнения (Ag/AgCl) [92].

Если рассматривать используемый в медицине термин «редокс потенциал» с электрохимических позиций, это, безусловно, не является корректным. Действительно, в реальной системе измеряющий (рабочий) электрод не является индифферентным, помимо окислительно-восстановительных реакций, на поверхности «индифферентного» электрода возможно протекание других процессов, например адсорбционных, которые могут оказывать влияние на величину потенциала. Кроме того, в литературе используется понятие «редокс потенциала» по отношению к растворам, не обладающим окислительно-восстановительной активностью. Например, физиологический раствор (водный раствор 0,15 М NaCl), часто используемый в медицинской практике, не является окислительно-восстановительной системой. Однако скачок потенциала на границе металл/раствор, обусловленный образованием двойного электрического

слоя, в любом случае возникает при погружении металла или иного электропроводного материала в раствор, содержащий электролит. Величина этого скачка потенциала обусловлена природой электропроводного материала и раствора. Необходимо также учитывать способность имеющихся в тестируемой жидкости катионов, анионов, протеинов, других веществ, растворенных в тестируемой жидкости, специфически взаимодействовать с электродом (например, адсорбироваться на его поверхности). При измерениях потенциала электрода, погруженного в биологическую среду, необходимо учитывать также окислительно-восстановительную активность биологической среды, влияние на потенциал электрода адсорбции растворенного кислорода, клеток крови, белков, ферментов и других природных веществ, способных взаимодействовать с поверхностью электрода.

Таким образом, по отношению к биологическим и другим сложным системам, в которые погружен электропроводный материал, вместо термина «редокс потенциал», используемого в медицинской, биологической и экологической литературе, корректным с электрохимической точки зрения является использование термина «потенциал электрода при разомкнутой цепи» или бестоковый потенциал.

Несмотря на очевидные преимущества и достаточно широкое распространение электрохимического метода, он обладает некоторыми недостатками. В сильных окислительно-восстановительных системах постоянное значение потенциала на платиновом электроде устанавливается в пределах нескольких милливольт, иногда с точностью до 0,1 мВ [62]. Иная картина наблюдается в слабых окислительно-восстановительных системах, с которыми особенно часто приходится встречаться в биологических средах (например, кровь, плазма и сыворотка крови) [62].

Еще в начале XX в. в классической работе Л. Михаэлиса было обнаружено, что в биологических средах два одинаковых золотых или платиновых электрода, погруженных в один и тот же раствор, показывают разницу в значении потенциала на 0,1 В и более [62], хотя с формальной точки зрения, согласно

уравнению Нернста, различные экземпляры электродов в одном и том же растворе должны иметь одинаковый потенциал. Только при этих условиях измерения потенциала имеют смысл с точки зрения практического применения. Л. Михаэлис обнаружил, что, если потенциал электродов неодинаков, причин может быть две [62]. Во-первых, электроды «плохи», «отравлены»; тогда они имеют различные потенциалы и в «сильных» окислительно-восстановительных системах, (например, хинон/гидрохинон), хотя значения в них различаются меньше, чем в слабых окислительно-восстановительных системах. В этих случаях, согласно Л. Михаэлису, пользоваться такими электродами нельзя.

Во-вторых, если окислительно-восстановительная система слаба (как в случае биологических жидкостей), индивидуальные особенности электродов оказывают сильное влияние на потенциал, вступая в конкуренцию с потенциалом, обусловливаемым свойствами раствора.

При сравнении золота и платины (табл. 1.5) видно, что оба металла обладают недостатками, однако платина является предпочтительней благодаря более высокому току обмена. Это связано с тем, что только на платине возможно достичь приемлемое время «отклика» на изменения системы в разбавленных растворах [92].

Таблица 1.5 – Сравнение золотого и платинного электродов [92]

Параметр	Золото	Платина
Стандартный потенциал, В	1,42	1,20
Плотность тока обмена, мА/см ²	0,3	10

Рассмотрим подробнее механизм «отклика» платинового электрода на изменение свойств тестируемого раствора. Важную роль в установлении равновесия между тестируемым раствором и платиновым электродом играет каталитическая активность платины по отношению к кислороду [93]. Согласно [92] атомы кислорода при адсорбции на платине образуют монослой, а механизмы связи от адсорбции атома кислорода на поверхности платины до образования

диоксида зависят от «редокс потенциала» среды [94]. В растворах содержащих воду, на поверхности электрода образуются адсорбционные и фазовые слои смешанных оксидов платины [95, 96]. При этом могут возникать процессы обмена кислородом между оксидом и молекулами воды, которые также влияют на потенциал электрода [97, 98]. Важным фактором является также степень гомогенности поверхности платины: на поверхности электрода могут сосуществовать участки с сильно различающейся активностью в отношении взаимодействия с компонентами раствора [99].

С нашей точки зрения именно состояние поверхности, включая состав и соотношение поверхностных оксидов платины, а также степень неоднородности поверхности вносят основной вклад в воспроизводимость результатов измерений. В практическом отношении также важно, что потенциал изменяется во времени. Это, в частности, связано с замедленностью процессов адсорбции веществ на электроде [100]. Как правило, по истечении некоторого времени величина потенциала стабилизируется. Этот период времени, кроме прочего, зависит от каталитической активности материала электрода. Так, было отмечено [101], что, помимо оксидов, на поверхности платины возможно образование сульфидов. Стандартные потенциалы и константы устойчивости некоторых соединений, образующихся на поверхности платины, приведены в табл 1.6.

Таблица 1.6 – Константы устойчивости реакций, включающих платину, в водных растворах [101]

№	Реакция	$E_0, \text{В}$	$\log K^0$
1	$\text{Pt}^0 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{Pt-O} + 2\text{H}^+ + 2\bar{e}$	0,88	-29,7
2	$\text{Pt}^0 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{PtO} + 2\text{H}^+ + 2\bar{e}$	0,9	-30,4
3	$\text{Pt}^0 + 2\text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{PtO}_2 + 4\text{H}^+ + 4\bar{e}$	2,08	-141
4	$\text{Pt}^0 + 3\text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{PtO} \cdot 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{H}^+ + 2\bar{e}$	1,00	-33,8
5	$\text{Pt}^0 + 4\text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{PtO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + 4\text{H}^+ + 4\bar{e}$	0,96	-64,9
6	$\text{Pt}^0 + 5\text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{PtO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O} + 4\text{H}^+ + 4\bar{e}$	0,98	-66,3

Продолжение таблицы 1.6

№	Реакция	$E_0, \text{В}$	$\log K^0$
7	$\text{Pt}^0 + 6\text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{PtO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + 4\text{H}^+ + 4\bar{e}$	1,06	-71,6
8	$\text{Pt}^0 + 3\text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{PtO}_3 + 6\text{H}^+ + 6\bar{e}$	1,50	-152
9	$\text{Pt}^0 + 4\text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{PtO}_4 + 8\text{H}^+ + 8\bar{e}$	1,60	-216
10	$3\text{Pt}^0 + 4\text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{Pt}_3\text{O}_4 + 8\text{H}^+ + 8\bar{e}$	1,11	-150
11	$\text{Pt}^0 + 2\text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{Pt}(\text{OH})_2 + 2\text{H}^+ + 2\bar{e}$	0,98	-33,1
12	$\text{Pt}^0 + 6\text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{Pt}(\text{OH})_6^{2-} + 6\text{H}^+ + 4\bar{e}$		-97,55
13	$\text{Pt}^0 + \text{SO}_4^{2-} + 6\text{H}^+ + 4\bar{e} \leftrightarrow \text{PtS} + 4\text{H}_2\text{O}$		52,05
14	$\text{Pt}^0 + 4\text{Cl}^- \leftrightarrow \text{PtCl}_4^- + 2\bar{e}$		-24,7
15	$\text{Pt}^0 + 6\text{Cl}^- \leftrightarrow \text{PtCl}_6^{2-} + 4\bar{e}$		-47,7
16	$\text{Pt}^0 \leftrightarrow \text{Pt}^{2+} + 2\bar{e}$		-40,6

При измерении потенциала платинового электрода при разомкнутой цепи в биологической среде, представляющей собой значительно более сложную систему, необходимо учитывать не только состояние окислительно-восстановительного равновесия тестируемой биологической среды (в случае крови, плазмы или сыворотки крови это равновесие между содержанием про- и антиоксидантов), но также взаимодействие электрода с растворенным кислородом, влияние адсорбционных и иных взаимодействий белков, ферментов и других природных соединений, содержащихся в биологической среде, с электродом (например, денатурирование белков при взаимодействии с чужеродной поверхностью). Действительно, как показано в [102-105], взаимодействие платины с белками имеет место и приводит к изменению потенциала платины при разомкнутой цепи.

Таким образом, можно сделать важный вывод: одной из основных проблем при измерении потенциала платинового электрода при разомкнутой цепи в биологических средах является обеспечение некоего заданного стандартизованного состояния поверхности электрода непосредственно перед измерением величины ПРЦ.

Известны различные методы предварительной обработки платинового электрода перед проведением измерений. Они сводятся к механической, химической или электрохимической обработке электрода с целью очистки и приведения поверхности электрода к стандартному состоянию. В большинстве случаев используется очистка химическими веществами, такими как щелочь, соляная кислота, смесь азотной и хромовой кислоты, серная кислота [92, 106]. Однако, применение такой очистки ограничено из-за коррозионной активности указанных сред и высокой вероятностью образования на поверхности электрода слоя оксидов на платине [107, 108]. Используют также очистку поверхности платины в растворах неорганических восстановителей, однако данный вид предварительной обработки может приводить к увеличению каталитической активности платины, что, как указано выше, ухудшает измерения редокс потенциала [92]. Механические методы удаления оксидов (полировку химически инертными абразивными материалами [109], либо разработанный Х. Эйрингом и др. [110] метод измерения «потенциала скобления» (“scrape potential”)) являются весьма сложными и практически непригодны для рутинных измерений. К тому же «свежая» поверхность металла обладает повышенной химической активностью вследствие большого числа дислокаций, выходящих на поверхность, усиливая химическое взаимодействие в системе металл/раствор, что вносит искажения в измеряемые величины потенциалов [111].

Наиболее распространенный метод предварительной обработки платинового электрода - электрохимическая обработка. Как правило, это метод анодно-катодной активации [112-114], детали которой зависят от исследуемой системы. Например, авторы [113] предложили проводить циклирование потенциала со скоростями развертки от 1 до 10 В/мин в области от $-0,3$ до $1,5$ В (н.к.э) в 1 М растворе H_2SO_4 или в 0,1 М $HClO_4$. Известно, что основным фактором воздействия анодно-катодной активации платины является десорбция загрязнений с поверхности электрода [115]. Другим известным методом является циклирование потенциала со скоростями развертки 500 мВ/с в области от -600 до 600 мВ (х.с.э) в растворах неорганических солей [48], что обеспечивает обработку

электрода в более мягких условиях.

Кроме предварительной очистки, для стабилизации потенциала электрода, предлагается использовать калибровочные растворы, составы которых представлены в табл. 1.7.

Таблица 1.7 – Состав стандартных калибровочных растворов

Раствор	Состав	Потенциал электрода, мВ
Раствор Зобелла [116]	$3,3 \cdot 10^5$ М $K_3[Fe(CN)_6]$ $3,3 \cdot 10^5$ М $K_4[Fe(CN)_6]$ 0,1 М KCl	+229±5
Раствор Лайта [117]	0,1 М $FeNH_4(SO_4)_2$ 0,1 М $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ 1 М H_2SO_4	+476±5

Однако указанные растворы являются сильными окислительно-восстановительными системами, а, как упомянуто выше, в таких системах потенциал при разомкнутой цепи устанавливается достаточно устойчиво. В связи с этим использование стандартных растворов мало пригодно при анализе растворов, не обладающих сильными окислительно-восстановительными свойствами.

При измерениях «редокс потенциала» подавляющее большинство авторов представляют результаты измерений в виде дискретных величин. Такой подход, однако, справедлив только для систем с высокими величинами тока обмена, поскольку потенциал электрода в таких системах устанавливается достаточно быстро [76]. Однако, как уже говорилось выше, биологические среды являются слабыми окислительно-восстановительными системами, что в свою очередь связано с продолжительным временем, необходимым для установления равновесия в данной системе. К сожалению, это явление, вероятно, выпало из поля зрения исследователей [82, 118, 119]. Редким исключением является

небольшое число исследований, в которых приводятся зависимости изменения «редокс потенциала» во времени [22, 79, 120].

Подчеркнем, что к настоящему времени, за исключением монографии [22], опубликованной в 1965 г., не найдено обобщающих исследований по измерению «редокс потенциала» в биологических средах. Это можно связать лишь с недостаточной надежностью получаемых данных, что, главным образом, обусловлено отсутствием унифицированного метода измерения «редокс потенциала».

Вышесказанное особенно важно для медицинских исследований. В самом деле, изучение свойств крови или другой биологической среды с помощью измерений «редокс потенциала» должно быть обеспечено не только высоко чувствительной методикой, но, главное, методика должна обладать высокой воспроизводимостью, чтобы сопоставление измеренных величин «редокс потенциала» с данными биологических лабораторных исследований могло бы являться информативным.

1.3.3 Связь «редокс потенциала» с некоторыми гомеостатическими параметрами

Впервые «редокс потенциал» в среде, содержащей живые организмы (культуры анаэробных бактерий), был измерен с помощью индифферентного электрода в работе Л. Джиллеспи [121]. Первые эксперименты по измерению «редокс потенциала» во взвесах клеток и фрагментах тканей организма принадлежат Р. Коннаноу, Б. Когёну и В. Кларку, которые изучали восстановительный потенциал в клеточных суспензиях [62, 122]. Исследования этих ученых дали толчок к развитию измерений «редокс потенциала» в биологических средах.

Весьма существенно, что при измерении «редокс потенциала» в культуре бактерий или в суспензии клеток и тканей, погружая электрод в исследуемую среду, мы измеряем разность потенциалов между рабочим электродом и

электродом сравнения.

Таким образом, измеренные в суспензиях клеток потенциалы электрода [122] не отражают потенциал живой клетки. Для потенциометрического измерения редокс потенциала клетки необходимо ввести электрод внутрь клетки, что является практически невозможным в виду малых размеров объекта и разрушения клетки при введении внутрь ее даже наноразмерного электрода. Следует, по-видимому, сделать вывод о принципиальной невозможности измерять внутриклеточные потенциалы электрохимическим методом, поскольку введение электрода любых размеров в клеточную структуру неизбежно приводит к гибели клетки.

Если рассматривать организм как суперсистему, состоящую из набора различных систем (органов, тканей, клеток), одной из ключевых является система кровообращения. На уровне организма кровь следует рассматривать в виде каналов связи между различными подсистемами, а сама кровь превращается в коммуникационного посредника, определяющего не только энергетическую, но и информационную поддержку функционирования, как различных органов и систем, так и самого организма. Таким образом, система кровообращения играет важнейшую роль в регуляции жизнеобеспечения организма, то есть гомеостаза, включая его окислительно-восстановительный компонент [64].

С помощью кровообращения к внутренним системам управления окислительно-восстановительным статусом клетки подключаются интегральные системы управления редокс состоянием тканей за счет изменения системного и регионального кровотока [64]. Общий характер связи различных редокс систем клетки (митохондриального, микросомального, перекисного окисления и т.д.) с микроциркуляторным руслом показан на рис. 1.3.

Таким образом, «редокс потенциал» внутренней среды организма, в частности крови, является интегральным показателем баланса окислительно-восстановительной системы и служит источником информации о состоянии организма. В связи с этим совершенно закономерен интерес к исследованию «редокс потенциала» биологических сред (крови, сыворотки крови, плазмы крови

и т.д.) для поиска взаимосвязей с другими параметрами жизнедеятельности.

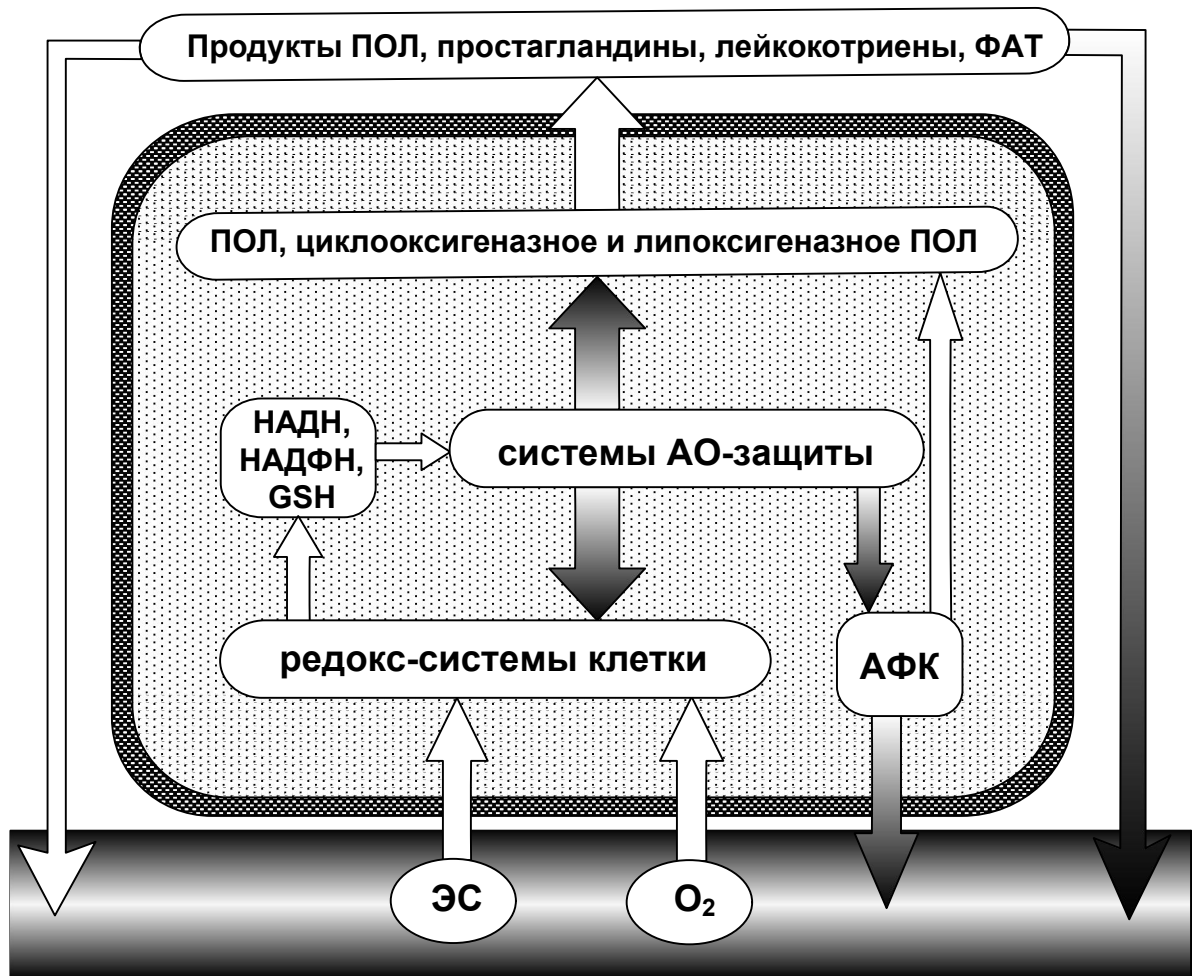


Рисунок 1.3 – Взаимодействие редокс-систем клетки с системой микроциркуляции (ЭС – энергетические субстраты) [64].

Первые крупные работы по измерению «редокс потенциала» в крови и сыворотке крови были проведены С. Бембе и С. Дитрихом [123] и П. Рейссом [124, 125]. Была обнаружена разница около 280 мВ в величинах «редокс потенциала» сыворотки крови в аэробных и анаэробных (в токе азота) условиях. Различие между двумя этими величинами связывают с влиянием кислорода.

При сравнении электрохимических свойств сыворотки крови, плазмы крови и цельной крови С. Бембе и С. Дитрих [123] не обнаружили значительной разницы в величинах «редокс потенциала» в условиях без доступа кислорода и отметили небольшое различие в условиях с доступом кислорода. Кроме того, в

отличие от других, указанные авторы не обнаружили существенных различий в величинах «редокс потенциала» больных и здоровых людей. Вероятно, этот факт связан с несовершенством использованного ими метода измерения «РП».

Отметим, что на начальном этапе измерений «редокс потенциалов» вопросу различия величин «редокс потенциала» цельной крови, плазмы и сыворотки крови было посвящено значительное число работ [22, 123, 126-130]. Было обнаружено, что «редокс потенциал» цельной крови является более отрицательным по сравнению с плазмой крови и сывороткой крови. Помимо этого еще в 30-х годах было обнаружено и вновь подтверждено в 50-х, что цельная кровь обладает большей редокс емкостью, что связывали с наличием в эритроцитах крови равновесия системы Fe^{+2}/Fe^{+3} [22] и тем фактом, что мембраны эритроцитов заряжены отрицательно [131]. Однако в последующем исследователи пришли к выводу о том, что восстановительная емкость цельной крови связана не столько с наличием эритроцитов, сколько с их метаболической активностью, поскольку метаболическая активность эритроцитов генерирует восстановительную емкость посредством цепи реакций дегидрогенирования [131].

Помимо опытов *in vitro*, с началом активных измерений «редокс потенциалов» рядом исследователей [132-134], были предприняты попытки измерения «редокс потенциала» непосредственно в циркулирующей крови *in vivo*. Были получены данные о сезонном влиянии на «редокс потенциал» [133], зафиксировано изменение потенциала при наличии инфекционных заболеваний, диабете, онкологических заболеваниях [132], туберкулезе [135]. Однако несовершенство методик измерения препятствовало дальнейшему развитию метода и получению новых воспроизводимых данных.

Наибольший интерес у исследователей вызывала возможность с помощью простых измерений обнаружить качественные и количественные связи измеренных величин «редокс потенциала» с определенными биохимическими параметрами тестируемых сред организма. Такой подход мог помочь использовать измеренные величины «редокс потенциала» крови в качестве

критериев, характеризующих природу заболевания и тяжесть состояния пациента.

В качестве диагностического критерия «редокс потенциал» впервые был использован при анализе сыворотки крови онкологических больных, однако различными исследователями были получены противоположные данные. Так Н. Ватерман [136], Р. Браунер [137] и М. Акцай [131] обнаружили при исследовании крови онкологических больных смещение измеренных величин «редокс потенциалов» в положительную область значений относительно потенциалов, характерных для практически здоровых, в то время как Д. Катер [138, 139] нашел обратное направление сдвига величины «редокс потенциала» более чем на 100 мВ.

Одной из первых работ, направленной на изучение влияния антиоксидантов на величину «редокс потенциала», было исследование С. Бембе и С. Дитриха [126]. Авторы обнаружили, что добавление аскорбиновой кислоты к сыворотке крови приводило к смещению величины «редокс потенциала» исследуемой системы в область отрицательных значений. В исследованиях Л. Мейера [129] при патологических состояниях, особенно при инфекционных заболеваниях, диабете и кардиоваскулярных расстройствах разница в величинах «редокс потенциала» между здоровыми и больными достигала 40 мВ. В ряде случаев увеличение положительных значений «редокс потенциала» авторы связывали с дефицитом аскорбиновой кислоты. Схожая картина описана в работе [140] при сезонных колебаниях «редокс потенциала», при повышенном потенциале у истощенных пациентов [123, 126].

М. Серейски [141] обнаружил смещение величин «редокс потенциала» в отрицательную область при шизофрении, причем лечение длительным сном в ряде случаев приводило к возврату «редокс потенциала» к нормальным величинам, характерным для практически здоровых людей. Подобные смещения величины «редокс потенциала» в отрицательную область были обнаружены М. Серейски [141] и при других заболеваниях, например, при онкологических заболеваниях и туберкулезе. Эти данные значительно расходятся с данными Н. Ватермана [136], М. Акцай [131], С. Бембе и С. Дитриха [123] и Л. Мейера

[127]. В отличие от Л. Мейера [127], М. Серейски [141] обнаружил смещение отрицательные значения потенциала при инфекционных заболеваниях.

Логическим развитием накопленного материала была разработка биоэлектрического метода Винсента (В.Е.В.) и создание соответствующего прибора [142-144]. Этот прибор позволял измерять наряду с величиной «редокс потенциала» тестируемой среды еще рН, удельное омическое сопротивление и температуру пробы.

Полученные таким образом результаты, по мнению Л. Винсента, могли быть использованы для определения риска широкого круга заболеваний: протекания злокачественных процессов, бактериальных инфекций, тромбоза, анемии, сахарного диабета, острых состояний печени, желчного пузыря и поджелудочной железы, микоза, простатита, мезенхимального алкалоза и ацидоза. Отметим, что метод до настоящего времени имеет практическое применение [145-147]. Данные полученные методом В.Е.В. представляются в виде зеленого треугольника на специальной диаграмме (рис. 1.4). В зависимости от зоны, в которой лежит треугольник ставится диагноз: зеленый – нет риска, желтый – сниженный иммунитет, красная – острая опасность.

Однако особо подчеркнем, что в этом приборе не предусмотрена возможность стандартизации состояния поверхности рабочего платинового электрода для измерения «РП», поэтому данные, полученные методом Винсента, нельзя считать достаточно надежными.

Одной из наиболее значительных работ, описывающих теоретические предпосылки и практические возможности электрохимического метода измерения «редокс потенциалов», является монография Е. Циглера [22]. Автор рассмотрел методические вопросы измерения «редокс потенциала», проанализировал влияние различных условий на измеряемую величину, собрал и представил большой клинический материал, опубликованный до 1965 г. К сожалению, следует констатировать, что подобных обобщающих исследований по проблемам измерений «редокс потенциалов» биологических сред до сих пор не имеется. Вероятно, это связано с тем, что к моменту опубликования монографии

Е. Циглера не было разработано надежных методов измерения «редокс потенциалов» в жидких средах организма, а поэтому и анализ работ, представленный Е. Циглером, был весьма затруднен.

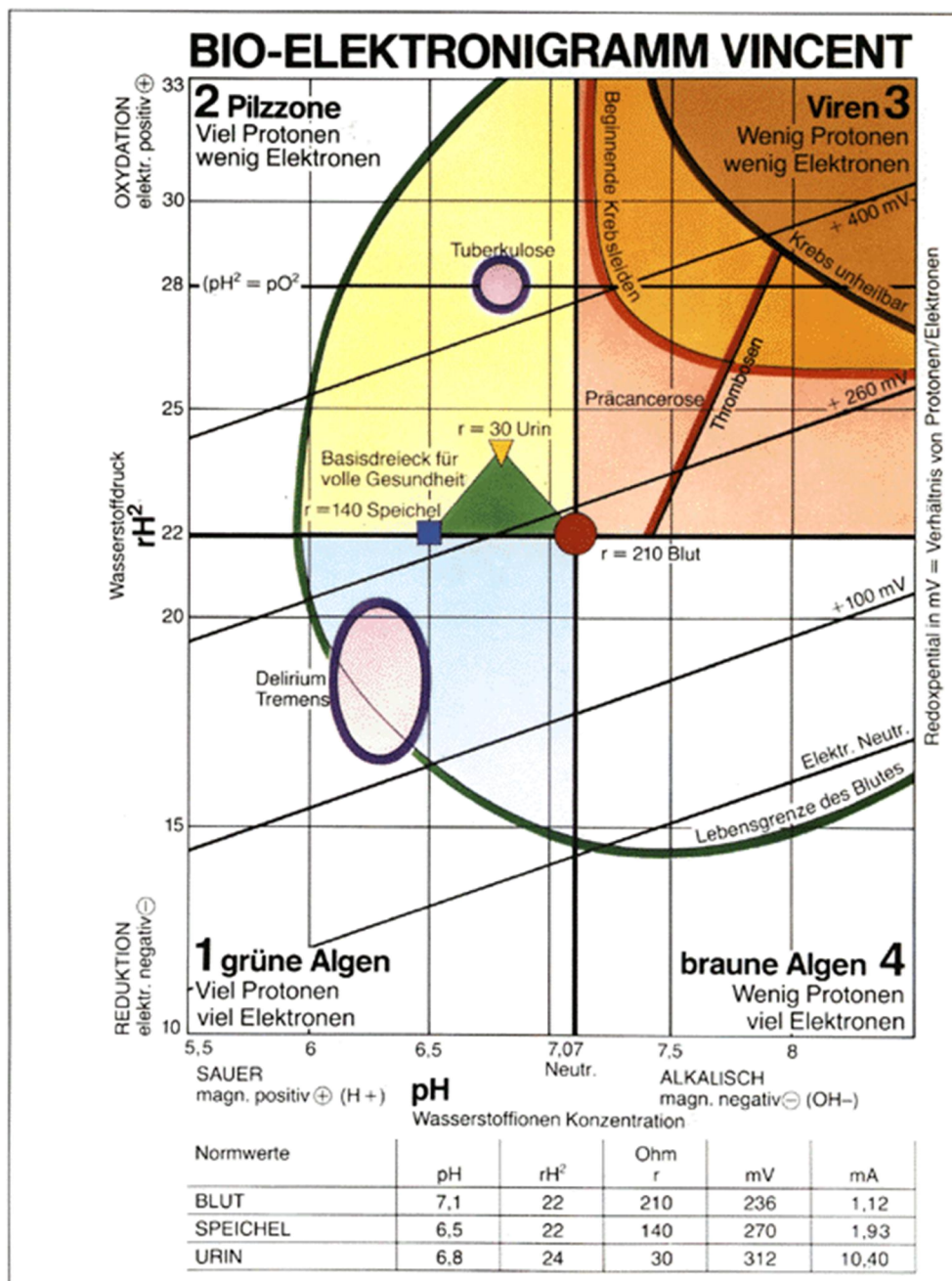


Рисунок 1.4 – Диаграмма по методу В.Е.В. [148].

По-видимому, это было основной причиной того, что Е. Циглер нашел слишком большое количество работ с несопоставимыми противоречащими друг другу результатами. В итоге он пришел к выводу о том, что для получения

воспроизводимых результатов при измерении «редокс потенциала» необходимо дополнительно использовать катодную поляризацию измерительного платинового электрода в тестируемой биологической среде. С этим выводом, по нашему мнению, нельзя согласиться, потому что при протекании тока на поверхности на электроде должны иметь место процессы взаимодействия электрода с тестируемым биологическим материалом, что, как показано выше, хотя бы на примере работы [35], приведет к денатурированию белков исследуемой плазмы крови и блокировке электродной.

В 60-х годах XX века появляются работы по поиску взаимосвязи величин и знака редокс потенциала с различными биохимическими параметрами жизнедеятельности организма. Была обнаружена корреляция величины «редокс потенциала» в крови, плазме и сыворотке крови с величинами напряжения кислорода [21] и углекислого газа в крови [79], а также с соотношением пируват/лактат [145], параоксоназа/арилэстераза [59] и статусом перекисного окисления липидов [149].

Кроме того, к настоящему времени обнаружены корреляции величин «редокс потенциала» с возрастом пациента [150], гипо- и гипертеродными состояниями [86], наличием окислительного стресса [61, 82, 151], инфекционными заболеваниями [152], геморрагического шока [89, 153], нейротравм [60], полиорганной недостаточностью [154], последствиями проведения операции аорто-коронарного шунтирования [155], терапией с применением гипербарической оксигенации [153]. Описаны также попытки определения сохранности органов для трансплантации с помощью измерений «редокс потенциалов» так называемых перфузатов, то есть растворов после промывания сосудов трансплантируемого органа [156-158].

Основные важные моменты в истории измерения «редокс потенциала» отражены в табл. 1.8.

Таблица 1.8 – История измерения «редокс потенциала» в биологических средах

Год	Авторы	Примечания	Литература
1933	Ватерман Н.	Смещение в положительную область величин «РП» у онкологических больных.	[136]
1934	Браунер Р., Сору Е.	Смещение в положительную область величин «РП» у онкологических больных.	[137]
1937	Серейски М.	Смещение величины «РП» в отрицательную область у пациентов с шизофренией, онкозаболеваниями, лихорадочными состояниями, при отравлении анилином: обратный эффект при тиреотоксикозе.	[141]
1938	Оутевская Л.	Более отрицательные значения «РП» венозной крови из печени и почек по сравнению с кровью из бедренной вены.	[22]
1939	Мейер Л.	Смещение величины «РП» после добавления в цельную кровь аскорбиновой кислоты, такое же явление при добавлении цельную кровь цистеина и $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.	[127]
1941	Бембе С., Дитрих С.	Более отрицательные величины «РП» в цельной крови по сравнению с плазмой. Смещение величины РП в положительную область потенциалов при истощении.	[123,126]
1940- 1944	Рейсс П.	Обнаружены изменения величины «РП» при добавлении к плазме крови различных антикоагулянтов.	[124,125]

Продолжение таблицы 1.8

1943	Тиволли Л., Лемэйр Т.	Обнаружена взаимосвязь между величиной «редокс потенциала» и содержанием сахара в крови.	[22]
1935	Ойвин И.	Обнаружено смещение величины «РП» в отрицательную область при добавлении к плазме крови глутатиона и цианида. Нормализация величины «РП» при введении инсулина пациенту после резекции поджелудочной железы.	[129,130]
1956	Акцай М.	Смещение величины «редокс потенциала» в положительную область при онкозаболеваниях и туберкулезе.	[131]
1954- 1956	Винсент Л.	Исследование связи «редокс потенциала» биологических жидкостей с различными заболеваниями.	[142-144]
1960- 1965	Циглер Е.	Изучение влияния на величину «РП» добавок антиоксидантов (аскорбиновой кислоты) к цельной крови. Проведены систематические исследования влияния характера патологии заболевания на величину «редокс потенциала».	[22]
1964- 1967	Гросс Х., Фарменр Б.	Обнаружена корреляция между величиной «РП» крови и величиной напряжения кислорода в крови pO_2	[21]
1974- 1985	Джеллинек М.	Проведен мониторинг сохранности органов с помощью измерения «редокс потенциала» перфузатов.	[156,157]
1987- 1993	Танигучи С.	Исследована взаимосвязь величины «РП» с наличием геморрагического шока и мультиорганной недостаточности.	[145,154]

Продолжение таблицы 1.8

1991	Бернард С., Галлинет Дж.	Обнаружена корреляция между величиной «редокс потенциала» крови и $p\text{CO}_2$.	[79]
1991	Ван Россум Дж., Шамхарт Д.	Исследована взаимосвязь величины «редокс потенциала» с возрастом пациента.	[150]
2006	Коллс Дж.	Обнаружена взаимосвязь «редокс потенциала» с наличием у пациента состояния окислительного стресса.	[151]
2007- 2009	Раэль Л., Бар-Ор Р.	С помощью измерений величин «редокс потенциала» у пациентов с нейротравмой оказалось возможным диагностировать состояние окислительного стресса.	[60]

Таким образом, к настоящему моменту на многих примерах показано, что измерения величин «редокс потенциала» биологических сред может служить мощным диагностическим и аналитическим инструментом, позволяющим оценивать состояние баланса про- и антиоксидантных систем организма и связанных с указанным балансом процессов, а также дифференцировать различные патологические состояния. Однако отметим, что ни одна группа исследователей не опубликовала на тему измерения «редокс потенциала» более двух-трех публикаций, что, вероятно, связано с отсутствием унифицированного метода измерений. По нашему мнению, отсутствие унифицированного методического подхода к измерению редокс потенциала затрудняет, либо вовсе делает некорректным сопоставление данных, полученных различными авторами, и, как следствие, ограничивает распространение метода.

1.4 Электрохимические методы определения антиоксидантной активности биологических сред

Одним из главных механизмов неспецифической защиты органов и тканей от вредных последствий взаимодействия с окружающей средой является активность антиоксидантных систем, обеспечивающих защиту живых клеток от повреждения свободными радикалами. Существует несколько механизмов нейтрализации токсичности АФК. Среди них следует отметить превращение АФК в менее активные молекулы и предотвращение процессов активизации радикалов в более токсичные формы (например, H_2O_2 в OH^\bullet) [159]. На рис. 1.5 показана схема совместного действия водорастворимых и жирорастворимых клеточных антиоксидантов.

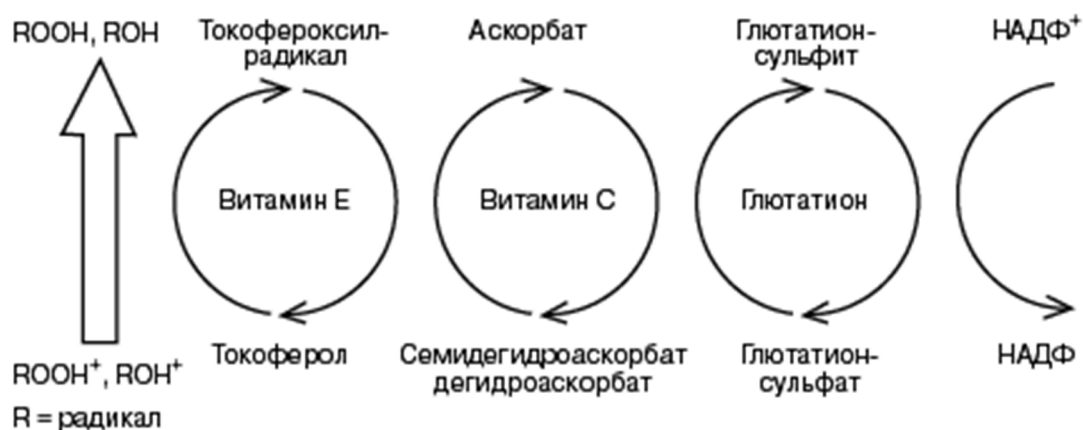


Рисунок 1.5 – Совместное действие водорастворимых и жирорастворимых клеточных антиоксидантов [160].

Продуцирование свободных радикалов и антиоксидантов в организме в норме сбалансированы. В случае сбоя в работе окислительно-восстановительной системы гомеостаза, если, например, возникает диспропорция с преимущественным образованием свободных радикалов, наблюдается состояние окислительного стресса [161, 162]. Большинство клеток может переносить умеренную степень окислительного стресса благодаря тому, что они обладают репаративной системой (способностью к регенерации), выявляющей и удаляющей

поврежденные окислением молекулы. Существует по крайней мере две основные причины развития окислительного стресса: снижение количества антиоксидантов и повышение количества АФК. При большинстве заболеваний окислительный стресс вторичен по отношению к основной болезни; однако неконтролируемое распространение токсичных радикалов вызывает больше клеточных повреждений, чем само заболевание [163].

Сумма имеющихся в организме эндогенных и экзогенных защитных механизмов, обеспечивающих сохранение окислительного баланса, составляет антиоксидантную активность (АОА).

Таким образом, определение уровня антиоксидантов в крови или плазме крови является важной задачей для коррекции лечения пациентов с нарушенными функциями окислительно-восстановительной системы гомеостаза.

Существует большое количество методов определения антиоксидантов, которые различаются по типу источника окисления, окисляемого соединения и способу его детектирования [164]. Однако, несмотря на большое количество методов, имеются трудности при сравнении результатов, полученных различными исследователями [165]. Подчеркнем, что в настоящее время определяют общую антиоксидантную активность (total antioxidant capacity (ТАС)) [166], поскольку определение индивидуальных соединений является трудоемким и сложным в интерпритации результатов.

Методы определения уровня антиоксидантов в организме можно разделить на спектрометрические, электрохимические, хроматографические (табл. 1.9).

Таблица 1.9 – Методы определения антиоксидантов [167]

Метод	Суть метода	Способ детектирования
спектрометрия		
DPPH	реакция с органическим радикалом	колориметрия
ABTS	реакция с органическим катион радикалом	колориметрия
FRAP	реакция с комплексом Fe(III)	колориметрия

Продолжение таблицы 1.9

Метод	Суть метода	Способ детектирования
спектрометрия		
PFRAP	восстановление феррицианида железа и последующая реакция ферроцианида железа с Fe^{3+}	колориметрия
CUPRAC	восстановление Cu (II) до Cu (I)	колориметрия
ORAC	реакция с пероксил радикалом, индуцированным AAPH	снижение флуоресценции
HORAC	подавление OH^{\bullet} радикалов, генерированных Co(II), основанной на Фентон-подобной системе	снижение флуоресценции флуоресцина
TRAP	захват радикалов производных люминола, генерированных при разложении AAPH	затухание хемилюминесценции
Флуориметрия	испускание света веществом, которое поглощает свет или другое электромагнитное излучение различных длин волн	запись возбуждения флуоресценции / спектра излучения
Электрохимические методы		
ЦВА	циклическая развертка потенциала рабочего электрода и запись изменения тока	измерение величины катодного/анодного пика
Амперометрия	потенциал рабочего электрода поддерживается постоянным	измерение величины тока при окислении /восстановлении электроактивного вещества
Биамперометрия	взаимодействие пробы (антиоксиданта) с окисленной формой обратимой индикаторной редокс пары	Измерение тока, между двумя идентичными рабочими электродами при малой разности потенциала

Продолжение таблицы 1.9

Хроматография		
Газовая хроматография	разделение веществ в смеси, основанное на перераспределении между жидкой стационарной фазой и подвижной газовой фазой	определение ионизацией в пламени или термической проводимости
Высокоэффективная жидкостная хроматография	разделение веществ в смеси, основанное на перераспределении между твердой стационарной фазой и подвижной жидкой фазой с различной полярностью, высокой скоростью потока и давлением	Спектрофотометрия в УФ и видимой области, флуоресценция, масс-спектрометрия или электрохимическое определение

Кроме того [167], выделяют ряд специфических методов, основанных на использовании биологических маркеров (например, яйцеклетки китайского хомяка [168], кальцеина АМ [169], окисленных протеинов [170], окислительного повреждения ДНК [171], лизосомального перекисного окисления липидов [172]).

В настоящее время наибольшее распространение получили спектрофотометрические методы [167], в которых чаще всего измеряется антиоксидантная активность по отношению к свободным синтетическим долгоживущим радикалам (АВТС (2,2'-азинобис[3-этил-2,3-дигидро-6-бензотиазолсульфоксилота]), ААРН (2,2'-азобис(2-метилпропионамидин) дигидрохлорид), DPPH (1,1-дифенил-2-пикрилгидразил) и др.). Однако данные методы обладают рядом существенных недостатков, заключающихся в низкой (не более 0,35) или отсутствующей корреляцией между указанными методами, отсутствии истинных субстратов в процессе измерения [165], использовании экстрактов [167], дороговизне и, в ряде случаев, длительному (до 1,5 часов) анализу [164].

В связи с этим в настоящее время более перспективным, с нашей точки зрения, является разработка электрохимических методов определения общей антиоксидантной активности, поскольку электрохимические методы обладают

рядом существенных преимуществ: простота, экспрессность, высокая точность измерений. Кроме того, только электрохимические методы позволяют непосредственно измерять содержание всех антиоксидантов в пробе [165].

Одним из электрохимических методов, который нашел применение для определения антиоксидантов, является потенциометрический метод. Суть потенциометрического метода заключается в измерении бестокового потенциала в среде, содержащей редокс пару. В качестве рабочего электрода, как правило, применяются инертные материалы, такие как платина, золото.

Так в работах [173, 174] измерялся сдвиг потенциала Pt-электрода в медиаторной системе $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$, наблюдающийся при введении образца антиоксиданта в раствор. Этот сдвиг является следствием химического взаимодействия антиоксиданта с $K_3[Fe(CN)_6]$. Данным методом были проведены исследования антиоксидантной активности цельной крови, сыворотки крови, плазмы крови, эритроцитарной массы, семенной жидкости и фолликулярной жидкости. Была получена высокая корреляция при сравнении потенциометрического метода с методом TAS Randox ($R^2 = 0,89$), а также при определении TRA (Total Reducing Activity) эритроцитарной массы, полученных методом потенциометрии с реакцией генерирования радикалов и без ее использования ($R^2 = 0,98$). Однако, как уже было описано выше, существует необходимость предварительной обработки платинового измерительного электрода [48] при проведении потенциометрических измерений, поскольку при определении содержания антиоксидантов в плазме или сыворотке крови на электроде возможна адсорбция белков, в результате которой потенциал электрода смещается от первоначального значения.

Помимо потенциометрических методов определения антиоксидантной активности, применение находят и вольтамперометрические методы. В настоящее время метод циклической вольтамперометрии используют для количественного определения антиоксидантной активности низкомолекулярных антиоксидантов в плазме крови [175], гомогенатах тканей и растительных экстрактах [176, 177]. Из вольтамперограмм могут быть получены следующие данные [167]:

- биологический окислительный потенциал (E и $E_{1/2}$), который относится к природе специфической частицы,
- величина анодного тока (I_a).

Как правило, большинство авторов [175, 176, 179-181] используют в качестве рабочего электрода стеклоуглерод. Потенциал пика или точка перегиба тока характеризуют активность антиоксидантов и их способность отдавать электроны. Величина анодного тока соответствует концентрации антиоксидантов в плазме.

В работе [175] было проведено исследование антиоксидантной активности плазмы крови 29 человек с помощью циклической вольтамперометрии с использованием дискового стеклоуглерода (рис. 1.6). Однако низкая чувствительность данного метода в плазме крови не позволяет получать точные результаты.

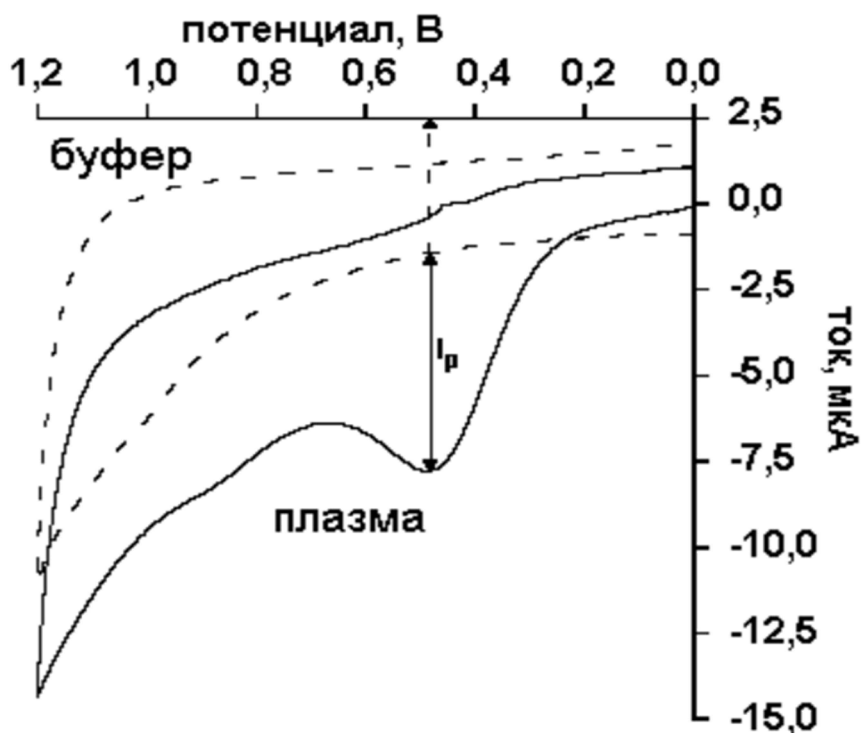


Рисунок 1.6 – Определение антиоксидантной активности из кривых циклической вольтамперометрии [175].

В работе [182] компоненты плазмы, разбавленные в 50-100 раз в фосфатном буфере, окислялись на электроде из стеклоуглерода при потенциале 380 мВ (относительно х.с.э.), при этом на кривой ток-потенциал наблюдалось появление широкого пика. Хотя авторы приводят зависимость величины анодного пика от степени разбавления плазмы (рис. 1.7), не указано при какой степени разбавления проводились основные измерения. Кроме того, метод кулонометрического титрования электрогенерированного бромиды, предложенный в качестве референсного, считается малопригодным, поскольку бром может окислить не только антиоксиданты, но и другие соединения [165].

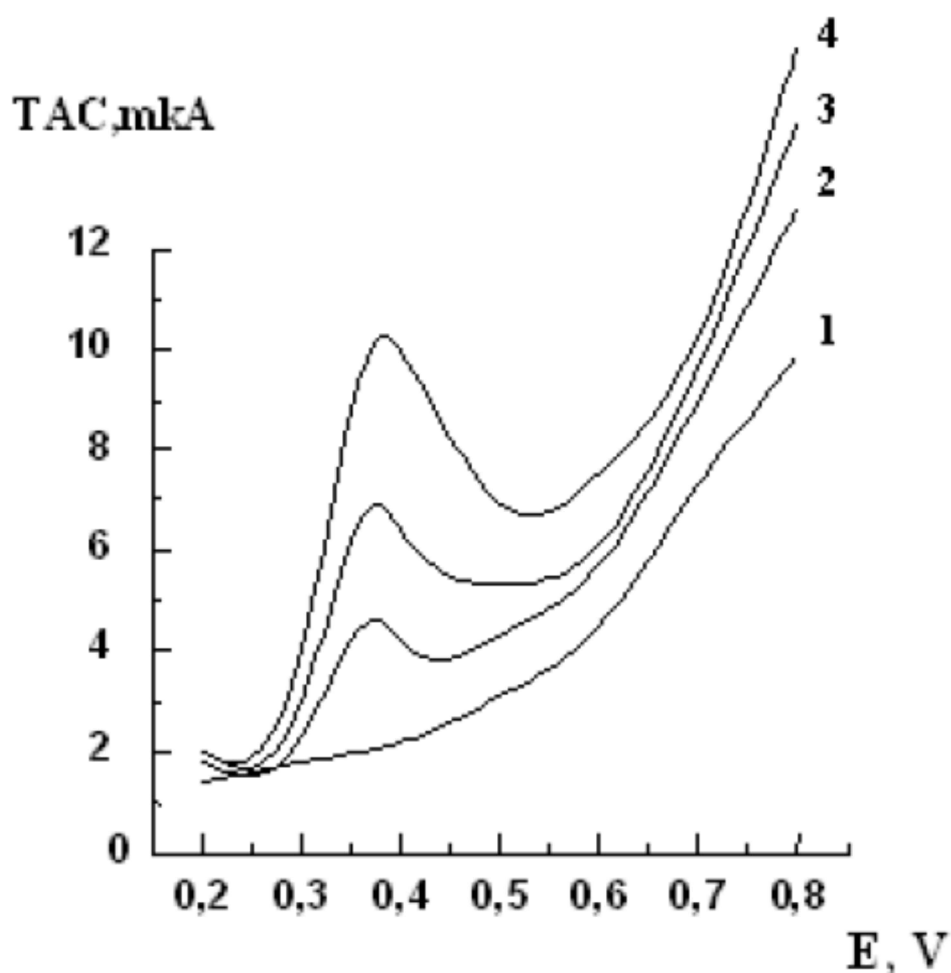


Рисунок 1.7 – Вольтамперограммы различных объемов (мл) плазмы в фосфатном буфере (15 мл, рН 7,4): 1 – 0; 2 – 0,15; 3 – 0,20; 4 – 0,30. Скорость развертки потенциала 200 мВ/с [182].

Для определения АОА методом ЦВА, помимо стеклоуглерода, используют и другие электродные материалы. Так, в работе [183] в качестве рабочего электрода в предложен алмаз, допированный бором. Как утверждают авторы, этот электрод обладает высокой коррозионной стойкостью в различных средах и может быть использован в течение длительного периода времени. Кроме того, он значительно расширяет возможности исследователя за счет наиболее широкого электрохимического окна из известных сейчас анодных материалов [184].

Для определения уровня антиоксидантов также использовались такие электродные материалы, как ртутный капающий электрод [185-189], ртутный амальгамированный электрод [190-195], угольные пастовые электроды [196-198], композитные электроды [199-202], электроды на основе ИТО [203] и планарные электроды (screen printed electrodes) [204].

В работах [185, 186, 205, 206] был предложен метод определения уровня антиоксидантов по величине катодного тока восстановления кислорода в апротонных растворителях на ртутном пленочном электроде. Основным недостатком указанного метода является использование электрода, содержащего ртуть, кроме того перед проведением анализа в сыворотке крови существует необходимость осаждения белков трихлоруксусной кислотой.

В целом метод циклической вольтамперометрии в приложении к определению уровня антиоксидантов является перспективным. Результаты измерений в простых средах (водные растворы антиоксидантов, соки, экстракты фруктов и т.д.), полученные с помощью ЦВА, находятся в согласии с измерениями, полученными с помощью других методов, например спектрофотометрией с применением $ABTS^+$ и $DPPH^*$ [207]. Однако требуется проведение дальнейших исследований для повышения как чувствительности применяемых электродных материалов (стеклоуглерод) с одной стороны, и замены таких окислителей как бром и йод на более «мягкие» электрохимически активные вещества с другой стороны.

1.5 Растворы, содержащие доноры «активного» кислорода

Как было отмечено выше, в нормально функционирующем организме должен сохраняться баланс между про- и антиоксидантами. В организме за процессы окисления отвечает группа цитохромов P450, находящихся в печени, которые играют важную роль в окислении многочисленных соединений, например, как эндогенного (стероиды, желчные кислоты, жирные кислоты, простагландины, лейкотриены, биогенные амины), так и экзогенного происхождения (лекарства, яды, продукты промышленного загрязнения, пестициды, канцерогены, мутагены и т.п.) [208]. Однако наличие некоторых патологических состояний (гипоксии, острых отравлений, инфекционных, сердечно-сосудистых заболеваний) [209-211] приводит к нарушениям процессов естественного метаболизма в организме и выведению продуктов окисления. При этом происходит накопление окисленных или частично окисленных веществ в организме, что неблагоприятно сказывается на функциях печени, как основного детоксицирующего органа, а также почек, потовых желез и др.

Таким образом, для компенсации таких патологических состояний организму необходимо интенсифицировать работу окислительной составляющей окислительно-восстановительной системы, чтобы вернуть систему в состояние равновесия.

Эту задачу медики научились решать с помощью введения в кровь окислителей. Примером наиболее распространенных в настоящее время методов насыщения крови окислителями является терапия молекулярным кислородом с помощью гипербарической оксигенации [212], однако, в ряде случаев, например, при острых отравлениях, этот метод не всегда справляется с задачей быстрого выведения ксенобиотока из организма путем ускорения процесса его биотрансформации с помощью повышения парциального давления кислорода в крови.

В таких случаях более действенным является внутривенное введение в кровь доноров активного кислорода. В настоящее время имеется немало таких

методов, которые объединяют под общим названием «окислительная терапия» [213]. Оказалось, что доноры «активного» кислорода, содержащиеся в водных растворах перекиси водорода, озона, если ввести их в организм внутривенно [214-216], активизируют обмен веществ, усиливают детоксикационную способность организма. Окислители, попадая в организм, значительно ускоряют процессы окисления ксенобиотиков, а также ускоряют многие процессы естественного метаболизма, доокисляя продукты естественного распада различных шлаков. Кроме того, окисляющие растворы обладают противовоспалительным и обезболивающим действием. В настоящее время ведутся активные поиски новых методов синтеза растворов, содержащих доноры «активного» кислорода для внутривенного применения, исследуются механизмы взаимодействия «активного» кислорода не только с токсикантами, но и с микроорганизмами, определяющие антисептические свойства окисляющих растворов.

При контакте «окисляющих» растворов с биологическими средами освобождается активный кислород, что показано в схемах 1.7 и 1.8 на примерах растворов, содержащих окислители в виде перекиси водорода и озона:



Проникая внутрь клеточной структуры бактериальной микрофлоры, «активный» кислород образует биологически активные группы, оказывающие окислительное воздействие на мембрану микроорганизмов, разрушая целостность ее оболочек. Именно этот эффект гибели бактериальных клеток определяет антисептический эффект активного кислорода.

1.5.1 Связь окисляющей активности растворов с величиной «редокс потенциала»

Одной из важных задач в анализе медицинских окисляющих растворов является оценка их окислительной активности. Особого внимания этот вопрос заслуживает при необходимости оценить дезинфицирующую активность растворов и для оценки результатов обработки сточных вод [217-219]. Проведение рутинного измерения концентрации активного вещества требует времени и дополнительных затрат на реактивы. Кроме того известно, что активность свежеприготовленных растворов со временем снижается [220, 221].

Одним из методов, позволяющих оценить окислительную активность раствора, является измерение величины его «редокс потенциала» (то есть величины ПРЦ платинового электрода, погруженного в тестируемую среду). Так в 1972 году Всемирная организация здоровья включила данный метод в мировые стандарты по качеству воды [222] и установлено, что питьевая вода при величине «РП» 650 мВ является обеззараженной (рис. 1.8).

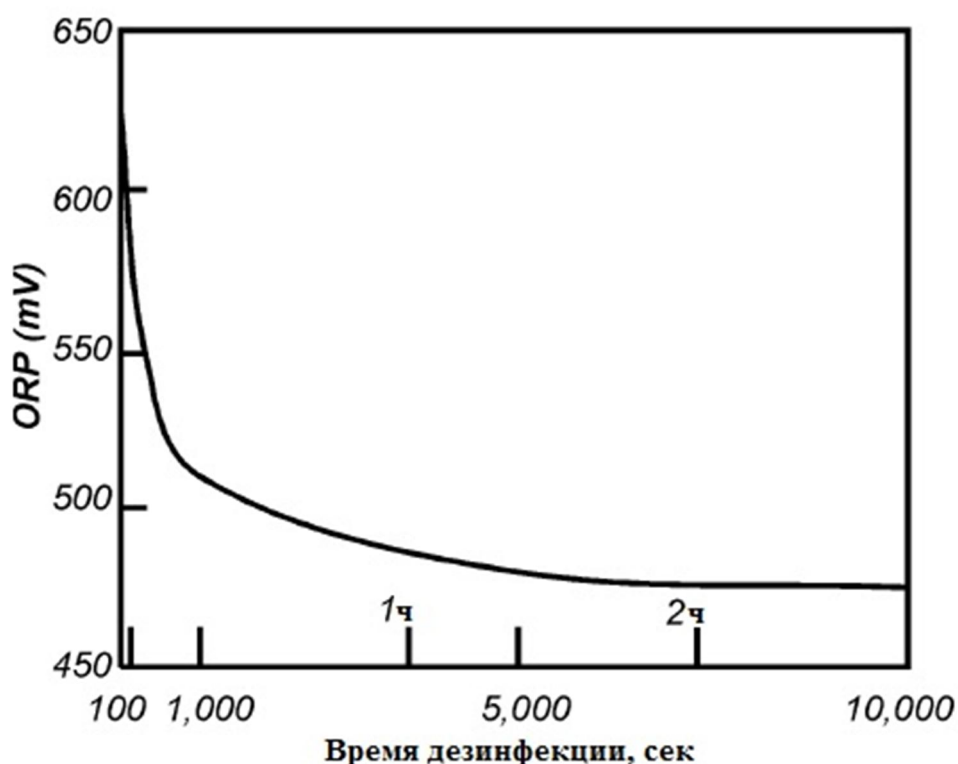


Рисунок 1.8 – Время дезинфекции воды от *E.coli* [223].

Однако при данном значении гибнут только *E.coli*, для гибели других видов бактериальной микрофлоры (листерии, сальмонеллы, дрожжей и плесени) необходимо значение «РП» 750 мВ, которое в 1982 году было принято в качестве нормы для воды в Европе [224]. Данные выживаемости бактерий в зависимости от величины «РП» приведены в табл. 1.10 [77].

Таблица 1.10 – Время выживаемости бактерий в зависимости от величины «РП» воды

Патогенный организм	Время жизни в секундах (с) или часах (ч) при РП		
	<485 мВ	550 мВ<X<620 мВ	> 665 мВ
<i>E.Coli</i> O157:H7	>300 с	>600 с	>10 с
<i>Salmonella spp.</i>	>300 с	>300 с	>20 с
<i>Listeria monocytogenes</i>	>300 с	>300 с	>30 с
thermotolerant coliform	>48 ч	>48 ч	>30 с

Простота и доступность электрохимического метода определения «РП» позволила сделать этот метод основным к настоящему времени для оценки качества воды [225-228].

С другой стороны, при использовании растворов доноров «активного» кислорода в медицинской практике, необходимо более тщательно контролировать параметры раствора, поскольку применение раствора с неоправданно высокой концентрацией окислителя может привести к химическим ожогам кожи и слизистых оболочек при наружном применении [229] и травмам форменных элементов крови и гемолизу при внутривенном введении [230,231].

Таким образом, важность оценки окислительной активности растворов не вызывает сомнения, а применение метода измерения потенциала при разомкнутой цепи следует, по нашему мнению, считать наиболее эффективным в настоящее время благодаря простоте, экспрессности и информативности.

1.5.2 Получение и свойства растворов, содержащих доноры «активного» кислорода

В 1970-х С. Яо и С. Вольфсон [34, 232, 233] предложили метод прямой электрохимической детоксикации крови, суть которого заключалась в установке платиновых электродов в крупную вену или в ячейку с кровью и анодному окислению находящихся в крови токсических веществ. В 1983 г. Ю.М. Лопухиным и А.И. Арчаковым [234, 235] была создана электрохимическая модель цитохрома P450, а также детоксикационно-экскреторная система, состоящая из реактора для получения окислителя и диализатора. Электрохимический реактор моделировал окислительную функцию печени, а диализатор - экскреторную функцию почек.

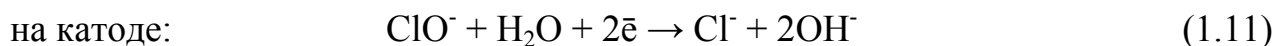
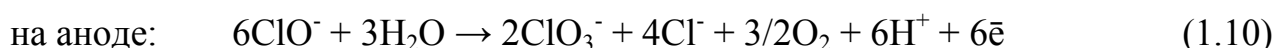
Однако при работе с биологическими жидкостями были выявлены проблемы [35] «белковой блокады» (прекращение прохождения электрического тока через ячейку вследствие блокировки поверхности электрода белками и разрушенными форменными элементами) и «белковой защиты» (молекула альбумина, связанная с токсикантом, препятствует его подходу к поверхности электрода), в связи с чем возникла идея создания метода непрямой электрохимической детоксикации. При непрямой электрохимической детоксикации кровь не вступает непосредственно в контакт с электрохимической ячейкой. Электролизу должен подвергаться раствор для синтеза переносчика активного кислорода, вводимого затем больному.

Впервые метод непрямой электрохимической детоксикации был реализован с помощью электрохимически синтезированного раствора гипохлорита натрия (NaClO). Этот раствор был синтезирован в бездиафрагменном электролизере с анодом из ОРТА и катодом из нержавеющей стали при электролизе физиологического раствора (0,9% NaCl) [36, 236]. Полученный раствор, содержащий 0,03-0,06% гипохлорита натрия (ГХН), для проведения детоксикационной терапии вводился пациенту внутривенно [230]. Донором

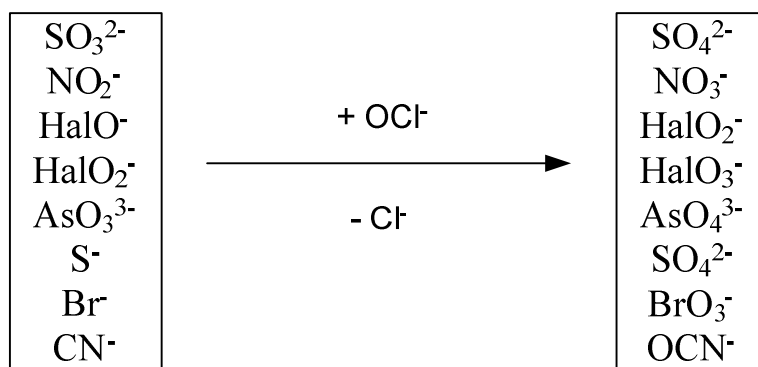
активного кислорода являлся гипохлорит-ион (ClO^-), который распадается в крови до атомарного кислорода согласно реакции:



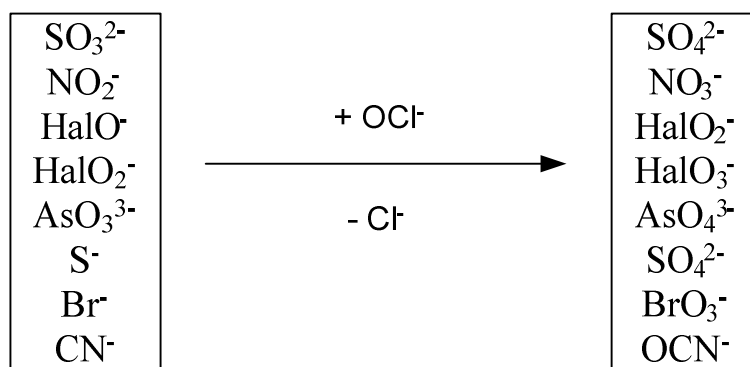
При электросинтезе гипохлорита натрия в указанных условиях имеет место протекание побочных реакций, которые снижают выход основного продукта:



Электрохимически синтезируемый раствор гипохлорита натрия в течение многих лет широко использовался в клинической практике. Поскольку гипохлорит натрия обладает низкой молекулярной массой и малыми геометрическими размерами, это вещество свободно проникает через клеточные мембраны, а, следовательно, окисляет токсиканты, содержащиеся не только в крови, но и в тканях [236]. Доказано [237], что обеззараживающий эффект гипохлорита связан именно с атомарным кислородом, а не хлором, который в небольших количествах может содержаться в гипохлорите натрия. Действительно, в ряде реакций его можно формально рассматривать как донор положительно заряженного хлора по схеме [238]:



Оказалось [239], что 0,06% раствор гипохлорита натрия способен окислять многие неорганические соединения, выступая в качестве донора кислорода по схеме [238]:



где Hal - атом галогена.

Наряду с перечисленными выше активными детоксицирующими свойствами, растворы гипохлорита натрия, как оказалось, обладают весьма существенными недостатками. Например, использование растворов гипохлорита натрия с концентрацией более 600 мг/л приводило к деструктивному воздействию на клетки крови [230, 240]. Кроме того, из-за высокой окисляющей активности гипохлорита натрия существует опасность протекания неблагоприятных процессов в организме. В работах О.М. Панасенко [239], Дж. Шиллера [241], С. Винтенборна [242] и др. было обнаружено, что HOCl/OCl^- вступает в реакцию с углеводами, а также вызывает окислительную деструкцию как мономеров, так и полимеров углеводной природы. Потенциально опасной является реакция гипохлорита с нуклеотидами [243]. В частности, при реакции гипохлорита с аденозинмонофосфатом сначала наблюдалось хлорирование, а затем быстрая деструкция гетероциклического кольца. Известно, что гипохлорит способен реагировать со многими низкомолекулярными органическими соединениями, имеющими важное биологическое значение. Среди них: NADH, мочевиная и аскорбиновая кислоты [242, 244], десфероксамин [245-247], тиомочевина [244, 245], меркаптоэтанол, дитиотреитол [244], таурин [242, 244, 245], малоновый и глутаровый диальдегид [248, 249], карнозин [240, 251], бутилированный гидрокситолуол (ионол) [252], β -каротин, ретинол, порфирины и гемопорфирины

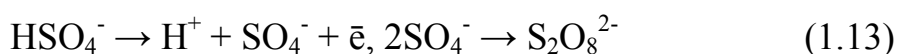
[243] и др. Будучи сильным окислителем и вступая в реакцию с белками и/или липидами, гипохлорит является реальным претендентом на роль потенциального модификатора белок-липидных комплексов в организме, в частности липопротеинов крови.

Резюмируя вышесказанное, можно заключить, что применение гипохлорита натрия связано с высокой степенью риска разрушения жизненно важных составных частей крови.

Еще одним примером раствора, содержащего доноры активного кислорода, является раствор персульфат натрия [253-255]. Недавно была разработана технология электрохимического синтеза растворов персульфата натрия для медицинского применения [256]. Образование надсерной кислоты и персульфатов при электролитическом окислении серной кислоты и ее солей является одной из тех анодных реакций, механизм которых до настоящего времени еще окончательно не ясен [5, 257-259]. Многочисленные работы, посвященные электросинтезу персульфатов, не дали однозначного ответа на вопрос о том, образуется ли надсерная кислота в результате первичной электрохимической электрохимической реакции по схеме:



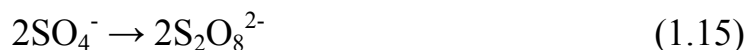
либо



Можно также предположить, что надсерная кислота является продуктом окисления сульфат-иона активным кислородом, выделяющимся при разряде гидроксильных ионов. Некоторые авторы считают, что при разряде последних образуется перекись водорода, окисляющая сульфат-ион в персульфат [258]. Имеется также вероятность окисления сульфат-ионов кислородом, адсорбированным на платине.

Основными схемами образования персульфата являются [257-259]:

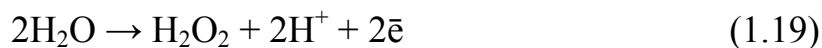
1) непосредственный разряд ионов SO_4^{2-} с образованием SO_4^- ионов и дальнейшей их димеризацией:



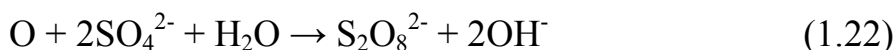
2) непосредственный разряд ионов HSO_4^- и их димеризация:



3) окисление серной кислоты перекисью водорода, образовавшейся электрохимически на аноде (С. Глесстон и А. Хиклинг):



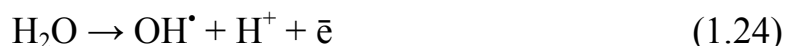
4) окисление серной кислоты атомарным кислородом, образующимся на аноде:



В работе [5] показано, что кислород воды не участвует в окислении сульфат-иона в персульфат на платиновом электроде. В данной работе также не отрицается механизм, в котором на аноде первично образуется содержащий кислород продукт окисления воды, например OH^\bullet , который затем окисляет ион SO_4^{2-} в объеме раствора путем электронного перехода (без передачи кислорода):



Данного механизма придерживаются как авторы [260, 261], проводившие электросинтез пероксодисерной кислоты на алмазных электродах допированных бором, так и авторы [37-39], разработавшие процесс электросинтеза персульфата из разбавленных сульфатных растворов. В данном случае предполагалось первичное образование гидроксил радикала по схеме



и далее гидроксил радикала реагирует с анионом HSO_4^- с образованием персульфата



Окисление сульфатов протекает при высоких анодных потенциалах [258], поэтому электролиз следует проводить при больших анодных плотностях тока (до 5 кА/м^2).

При электрохимическом получении окислителей и веществ, богатых кислородом, на аноде обычно происходят одновременно процессы анодного окисления и выделения газообразного кислорода (и отчасти озона). Эти процессы протекают при более высоком анодном потенциале по сравнению с потенциалом разряда галогена или кислорода; в качестве анодного материала применяют только платину или ее сплавы с некоторыми металлами платиновой группы [258, 262-264], платино-титановые аноды [258, 265], аноды на основе диоксида свинца [258, 266], карбида кремния [266], карбида хрома [266], а также алмазные электроды, допированные бором [260, 261, 267].

Персульфаты получают, как в диафрагменных, так и в бездиафрагменных электролизерах. Во втором случае, кроме добавок, увеличивающих перенапряжение выделения кислорода (хлорид, фторид, цианид, роданид),

добавляют небольшое количество хромата калия. Последний образует в прикатодном слое защитную пленку гидроксида хрома, играющую роль диафрагмы [268]. Следует, однако, учитывать, что добавки таких высокотоксичных веществ, как соединения хрома, нельзя использовать для электросинтеза растворов медицинского назначения.

Интересные результаты получены при электролизе нейтральных растворов сульфата аммония. В этом случае можно получить персульфат аммония с выходом по току, достигающим 95–96%. Замечательно то, что высокий выход $S_2O_8^{2-}$ удается получить из раствора, в котором отсутствуют HSO_4^- . Правда, непосредственно в прианодном слое из-за выделения некоторого количества кислорода, образуется кислота и, следовательно, бисульфат аммония. Возможно, в нейтральной среде, когда отсутствуют ионы HSO_4^- , анодный процесс осуществляется за счет разряда ионов SO_4^{2-} [269].

Получение лечебных растворов возможно, как путем растворения уже готового концентрированного окисляющего агента до необходимых лечебных концентраций, так и получение лечебного препарата с заданной концентрацией окисляющего агента *in situ*. В последнем случае наиболее перспективным является электрохимическое генерирование окислителя в процессе электролиза [36, 215, 216, 236, 269]. Электрохимический метод получения позволяет регулировать параметры процесса таким образом, чтобы на выходе из электролизера получать растворы с заданной концентрацией окисляющего агента. Немаловажным преимуществом электрохимического способа получения растворов «активного» кислорода является то, что в процессе синтеза в электролизере раствор становится стерильным [269]. Это позволяет снизить затраты на дополнительную стерилизацию синтезированных растворов и уменьшить общее время получения готового к применению раствора.

Кроме указанного, еще одно очень важное преимущество использования электрохимически синтезированных окисляющих растворов *in situ* было обнаружено в работе [38]. С помощью измерения величин потенциалов платинового электрода при разомкнутой цепи сравнивалась окисляющая

активность растворов, содержащих одинаковые концентрации персульфата натрия, приготовленных растворением сухого реактива, произведенного промышленным путем, и электрохимически синтезированного раствора персульфата, приготовленного *in situ*. Оказалось, что величины ПРЦ платинового электрода в электрохимически синтезированном растворе *in situ* на 100 мВ более положительны, чем в растворах, приготовленные из промышленного сухого реактива. Таким образом, было доказано, что окислительная активность раствора, полученного *in situ*, значительно выше, чем у промышленного аналога. Кроме того, для медицинского применения особый интерес представляет электросинтез персульфатов из разбавленных растворов сульфатов, что гарантирует их быстрое использование без дополнительных манипуляций (например, разбавление концентрированных растворов и стерилизация) [256].

Показано [253], что механизм действия персульфата натрия заключается в непосредственном участии в тканевом дыхании, благодаря усилению транспорта электронов в нарушенной дыхательной цепи.

К преимуществам растворов персульфата натрия следует отнести высокую окислительную активность электрохимически синтезированных растворов по отношению к ряду ксенобиотиков [37, 38].

Еще одним из окислителей, которые могли бы найти применение в медицине, является перкарбонат, однако, существующие в настоящее время технологии [270-272] в медицине не использовались.

1.6 Электрохимическая коагуляция крови

Одним из опасных факторов, сопровождающих оперативное вмешательство, ранения и некоторые заболевания, является кровотечение. С целью остановки кровотечений разработано и используется в медицинской практике большое количество хирургических и лекарственных методов [273]. К настоящему времени разработан достаточно широкий спектр гемостатических препаратов, основанных, как на применении химических веществ (перекись

водорода, сосудосужающие средства, препараты целлюлозы, цианакрилатные гели, поливиниловый спирт), так и биологических препаратов (на основе коллагена, фибрина и других компонентов свертывающей системы крови) [273, 274].

Помимо медикаментозных методов, развивались хирургические методы лечения, основанные на экстренном закрытии поврежденных сосудов с целью остановки кровотечений. К немедикаментозным методам остановки кровотечений (гемостаза) [275] относятся:

- клипирование (перезакрытие) сосуда гемостатическими клипсами,
- лигирование (перевязывание) сосуда эластичными нитями, скрепками или кольцами,
- внутрисосудистое закрытие сосуда с помощью раздуваемых давлением воздушных баллонов,
- закрытие сосуда с помощью термо- или криовоздействия (термозонд, криовоздействие);
- закрытие сосуда с помощью лазерной внутрисосудистой коагуляции тканей.

В поисках быстрого и эффективного метода закрытия поврежденного сосуда путем создания внутри него кровяного сгустка некоторые исследователи обратились к известному явлению электрокоагуляции [28, 276].

Электрокоагуляция тканей (включая кровь) может осуществляться как с помощью переменного тока высокой частоты [277, 278], так и с использованием постоянного тока [28, 279].

В случае использования переменного тока эффект коагуляции происходит из-за локального нагрева тканей переменным током высокой частоты (более 10 кГц). Различают моно- и биполярный режимы электрокоагуляции. Основное отличие состоит в том, что в монополярном режиме ток протекает между активным (рабочим) электродом, с помощью которого осуществляются манипуляции, и пассивным электродом, закрепленным на поверхности тела пациента. При этом ток проходит через значительный объем тканей. В

биполярном режиме ток протекает только между двумя активными электродами. В монополярном режиме воздействие тока сконцентрировано у окончания монополярного инструмента, что позволяет проводить более тонкие операции. Биполярный может осуществлять только коагуляцию тканей.

При использовании постоянного тока коагуляция происходит за счет тромбообразования без нагревания рабочей зоны при взаимодействии ткани с положительно заряженным электродом [280, 281]. Схематично процесс электрокоагуляции при постоянном токе изображен на рис. 1.9. Достоинством данного метода является отсутствие термического повреждения тканей, которое может привести к некрозам.

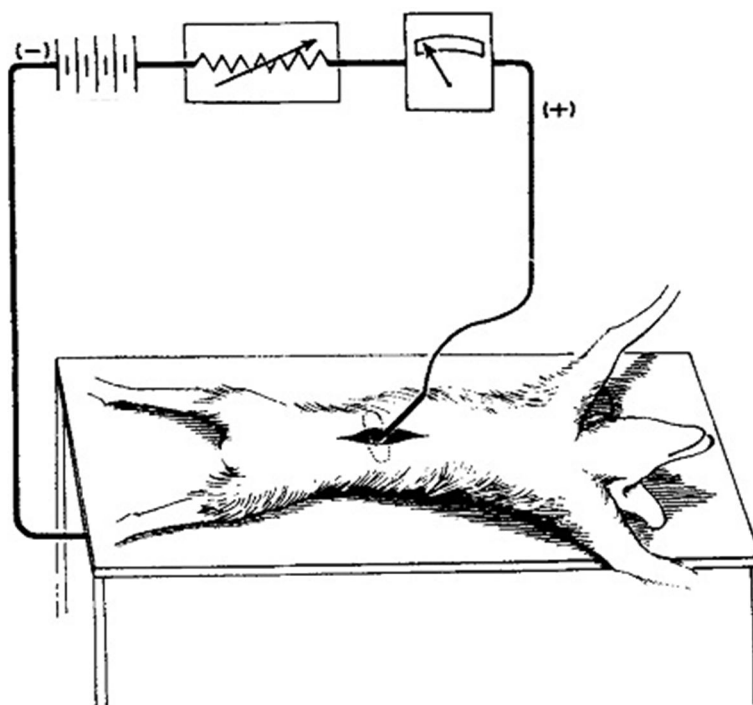


Рисунок 1.9 – Схематичное изображения процедуры электрокоагуляции при постоянном токе [282]. 1- источник постоянного тока (батарея), 2 – сопротивление, 3 – миллиамперметр, 4 – положительный электрод (рабочий), 5 – отрицательный электрод (вспомогательный).

Исследования процесса «холодной» электрохимической коагуляции выявили влияние электрохимических параметров на поведение факторов свертываемости крови [283-285]. В этих работах впервые было показано, что

анодные реакции катализируют процессы тромбообразования. Однако авторы этих работ указывают на отсутствие понимания механизма влияния поверхности поляризованного до анодных потенциалов электрода на реакцию биологического материала.

Необходимо подчеркнуть выдающееся значение работ П. Сойера для развития представления о взаимодействии чужеродных электропроводных поверхностей с биологическим материалом. Так, при исследовании широкого ряда металлов и сплавов было показано, что для тромбообразования необходимо, чтобы величина потенциала поверхности была положительнее $+300 \div +400$ мВ (н.в.э.) [28].

Экспериментально было установлено, что для электрокоагуляции при постоянном токе достаточно силы тока около 20 мА [282]. Однако важным параметром, помимо силы тока, является время воздействия (табл. 1.11).

Таблица 1.11 – Параметры электрокоагуляции

№	Сила ток, мА	Время, мин	Материал электрода	Литература
1	1-2	1-3	платина	[286]
2	3-5	20	платина	[287]
3	10-15	30	платина	[288]
4	20-40 (до 90)	20 (до 180)	платина	[281]
5	5→45→5	0→30→60	сплав платина-золото	[289]
6	0,1-0,9	18-93	нержавеющая сталь	[290]
7	0,2-2	62-390	сталь	[291]
8	250-500	5 сек	сталь	[292]
9	1	5	сталь, покрытая медью	[293]
10	0,3-5	30-60	сплав медь-бериллий	[294]
11	5-10	30-60	сплав медь-бериллий	[295]
12	0,2-0,8	10-30	медь	[296]
13	2	240	медь	[297]

Анализ литературных данных по электрокоагуляции при постоянном токе выявил ряд недостатков метода, в том числе:

- сложность образования сгустка крови, закрывающего сосудистое русло, в сосудах диаметром более 2 мм [281];

- коррозия материала электрода в условиях контакта рабочего электрода с хлорид-ионом (содержание хлорида в крови составляет 0,15 М); имеются данные о коррозии электродов из меди, сплава меди с бериллием, стали, что должно приводить к отравлению пациента тяжелыми металлами [293-297];

- во многих работах имеются указания авторов на необходимость длительного времени проведения процедуры электрокоагуляции (2-4 часа) [281, 293, 297].

В целом можно сделать вывод о том, что электрохимическая коагуляция при постоянном токе является важным и перспективным направлением для остановки кровотечения, поскольку в этом случае не происходит термического повреждения тканей. Важнейшими проблемами являются исследование механизма взаимодействия анода с кровью и стенкой сосуда, а также выбор некорродируемого в хлоридных растворах электродного материала, снижение времени манипуляции, выбор параметров процесса электрохимической коагуляции при постоянном токе.

Таким образом, судя по современным электрохимическим и медицинским литературным источникам, поиск новых электрохимических приложений для создания технологий для диагностики и коррекции таких нарушений гомеостаза, как дисбаланс окислительно-восстановительной системы организма, острые кровотечения, острые церебральные нарушения, воспалительные процессы, является весьма важно и актуальной проблемой на стыке электрохимии и медицины.

Современное состояние проблем диагностики и коррекции лечения гипоксических состояний организма и противоположных явлений, то есть состояний окислительного стресса, вызванных различными причинами, как

следует из анализа медицинских исследований, свидетельствует о недостаточности современных лабораторных методов для своевременного выявления указанных патологических состояний, так как сумма современных биохимических и других рутинных лабораторных методов, как правило, не позволяет в большинстве случаев своевременно поставить точный диагноз. Еще более серьезной проблемой является возможность на основании неинвазивных лабораторных исследований прогнозировать исход заболевания пациента с нарушениями окислительно-восстановительной системы организма.

В то же время анализ литературных данных позволил выявить высокие потенциальные возможности электрохимического метода измерений так называемого «редокс потенциала» жидких сред организма. Важно, что величина «редокс потенциала» биологических сред организма (кровь, плазма крови, сыворотка крови, моча, спинномозговая жидкость и др.) является интегральным показателем, характеризующим состояние окислительно-восстановительного компонента гомеостаза.

Однако, как явствует из анализа подавляющего большинства имеющихся работ по электрохимическим измерениям величин «редокс потенциала» в биологических средах, до настоящего времени сопоставление полученных этим методом данных весьма затруднительно вследствие отсутствия надежного воспроизводимого метода измерений.

Основной проблемой для создания стандартизованного, надежного и воспроизводимого метода измерений «редокс потенциалов», которые с электрохимических позиций правильнее называть потенциалом при разомкнутой цепи платинового электрода, является, как показал анализ работ в этом направлении, проблема стандартизации поверхности платинового электрода. Вероятно, для очистки поверхности платины после каждого измерения и стандартизации состояния поверхности электрода могут быть использованы различные методы (механические, химические, электрохимические). Для достижения поставленной цели, с нашей точки зрения, наиболее целесообразно использовать химические и электрохимические методы обработки.

Необходимо также решить проблему выбора материала рабочего электрода, поскольку в работах различных авторов используется весьма широкий набор металлов, углеродных материалов и даже обнаружены работы, где рабочим электродом является стеклянный электрод. Понятно, что это исключает возможность не только сопоставлять измеренные величины, но и получать данные, заслуживающие доверия.

Крупным недостатком современных исследований является измерение исключительно дискретных значений величин «редокс потенциала», хотя известно, что для установления равновесия в системе металл/раствор необходимо определенное время. Также при этом упускается возможность извлечь дополнительную ценную информацию из уравнения зависимости потенциала от времени.

Согласно современным представлениям, величина «редокс потенциала» является интегральным показателем, отражающим состояние равновесия про- и антиоксидантов в организме, представляется весьма полезным сопоставление данных мониторинга величин «редокс потенциала» и одновременно уровня антиоксидантов в плазме или сыворотке крови пациента. Однако наиболее распространенные для определения уровня антиоксидантов в организме спектрометрические методы обладают рядом существенных недостатков, заключающихся в дороговизне, длительном анализе, низкой корреляции между методами, отсутствии истинных субстратов в процессе измерения, трудности анализа окрашенных образцов, что требует использования экстрактов. Поэтому в настоящее время весьма полезным представляется разработка электрохимических методов, очевидными преимуществами которых являются экспрессность и высокая точность измерений.

Анализ работ по современным методам лечения гипоксических состояний показывает, что направление по разработке новых методов электросинтеза растворов для непрямого электрохимического окисления ксенобиотиков и ускорения процессов метаболизма при заболеваниях почек и печени является весьма перспективным. Сопоставление результатов по окисляющей активности

электрохимически синтезированных растворов гипохлорита натрия и персульфата натрия показало, что имеется возможность создания растворов более мягкого окисляющего действия, чем гипохлорит и, в то же время, более активных по сравнению с растворами персульфата с помощью введения в сульфатный электролит микродобавок хлорида.

Весьма полезным представляется развитие метода «холодной» электрохимической коагуляции для лечения такого опасного нарушения гомеостаза, как острые внутрисосудистые кровотечения. Исследование электрохимических механизмов метода электрохимической коагуляции при постоянном токе и использование анодных материалов, не корродирующих при контакте с кровью или стенкой сосуда, может привести к пониманию происходящих при электрохимической коагуляции процессов, что даст возможность разработать новый метод, пригодный для клинического применения.

2 Методики исследования

2.1 Электрохимические методики

2.1.1 Методики измерений

Во всех исследованиях в качестве электрода сравнения использовали насыщенный хлорсеребряный электрод (х.с.э.). Водные растворы электролитов готовили на бидистиллированной воде из химических реактивов квалификации не ниже «ч.д.а».

Величину рН определяли с помощью рН-метра Ф360 (Beckman Coulter, США).

Анодные поляризационные измерения для исследования процесса электросинтеза окисляющих растворов проводили с помощью потенциостата ИРС-Pro L (НПФ «Вольта», Россия). Использовали трехэлектродную схему подключения. Измерения проводили в режиме компенсации омических потерь. В качестве рабочих электродов (IrO_2/Ti , Pt/Ti) использовали образцы с площадью поверхности 1 см^2 . В качестве противоэлектрода использовали сетку из платинированного титана.

Измерения потенциала платинового электрода при разомкнутой цепи в водных растворах и биологических жидкостях проводили на потенциостате ИРС-Compact (НПФ «Вольта», Россия). Для этого исследовали зависимость потенциала электрода, погруженного в тестируемую среду, от времени. Время стабилизации значений потенциала составляло 15 мин. Перед каждым измерением рабочий электрод подвергали специально разработанной предварительной обработке (см. главу 3). Общая схема измерительной установки представлена на рис. 2.1.

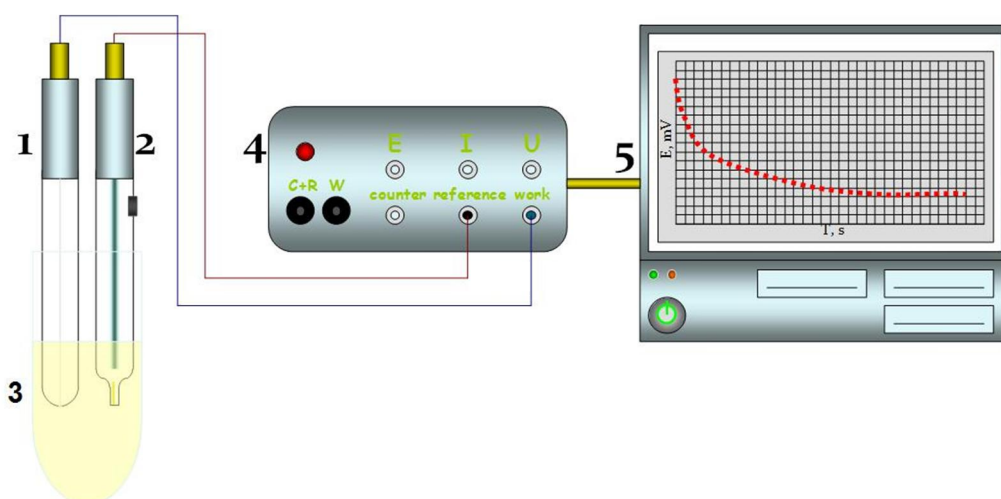


Рисунок 2.1 – Схема установки для измерения ПРЦ платинового электрода. 1 – рабочий электрод (Pt), 2 – электрод сравнения (Ag/AgCl), 3 – ячейка с анализируемой средой, 4 – потенциостат, 5 – персональный компьютер.

Определение антиоксидантной активности проводили методом ЦВА (см. главу 4) с помощью потенциостата IPC-PRO MF (НПФ «Вольта», России). В качестве рабочих электродов использовали стеклоуглерод, модифицированный МНСФ, с площадью поверхности $0,02 \text{ см}^2$ и точечный платиновый электрод ЭПЛ-02. В качестве противоэлектрода использовали сетку из платинированного титана. Схема установки представлена на рис. 2.2.

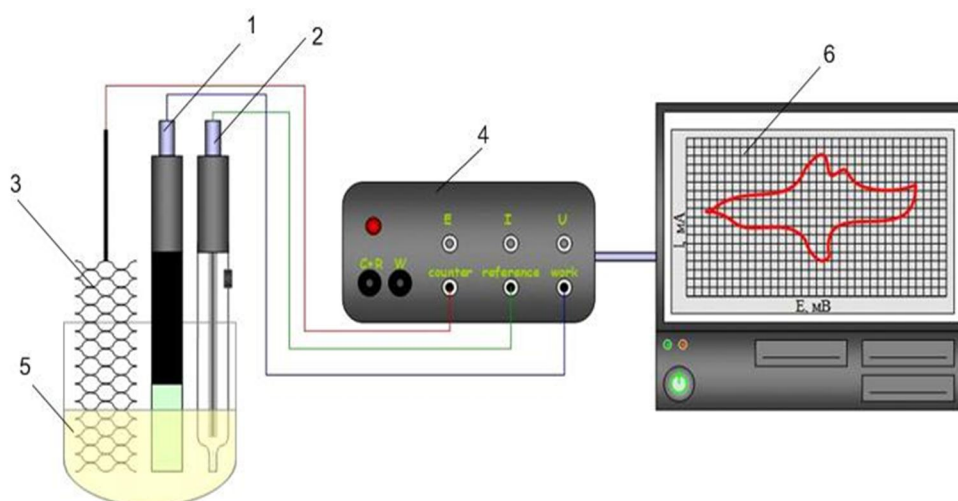


Рисунок 2.2 – Схема установки для определения антиоксидантной активности биологических сред. 1 – рабочий электрод (Pt), 2 – хлорсеребряный электрод, 3 – противоэлектрод, платинированный титан, 4 – потенциостат, 5 – ячейка, 6 – компьютер.

2.1.2 Методики электросинтеза

Электрохимический синтез окисляющих растворов осуществляли в двухкамерном электролизере фильтр-прессного типа (рис. 2.3,2.4). Полимерную мембрану МФ-4СК использовали для разделения катодной и анодной камер. Катодом служил титан, анодом – титан, покрытый диоксидом иридия. Площади катода и анода были одинаковыми и составляли $6,25 \text{ см}^2$. Объемы катодной и анодной камер также были одинаковыми и составляли $2,5 \text{ см}^3$. Водные растворы электролитов прокачивали через анодную и катодную камеру со скоростью 10–15 мл/мин с помощью перистальтического насоса BL 759 В (Bellco, Италия). Электросинтез проводили в сульфатных ($0,14 \text{ М Na}_2\text{SO}_4$), сульфатно-хлоридных ($0,14 \text{ М Na}_2\text{SO}_4 + 0,68\text{--}70 \text{ мМ NaCl}$), карбонатных ($0,14 \text{ М Na}_2\text{CO}_3$) и карбонатно-хлоридных ($0,14 \text{ М Na}_2\text{CO}_3 + 0,68 \text{ мМ NaCl}$) растворах электролитов. Напряжение подавали от стабилизированного источника питания НУ3005-2 (MASTECH, Гонконг).

Общая схема установки представлена на рис. 2.5.

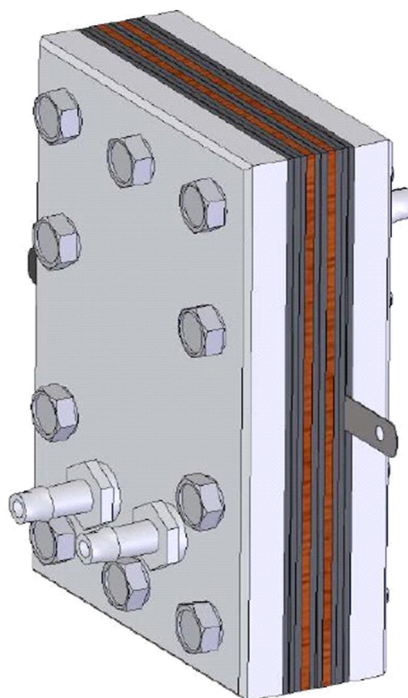


Рисунок 2.3 – Общий вид ячейки для электросинтеза окисляющих растворов.

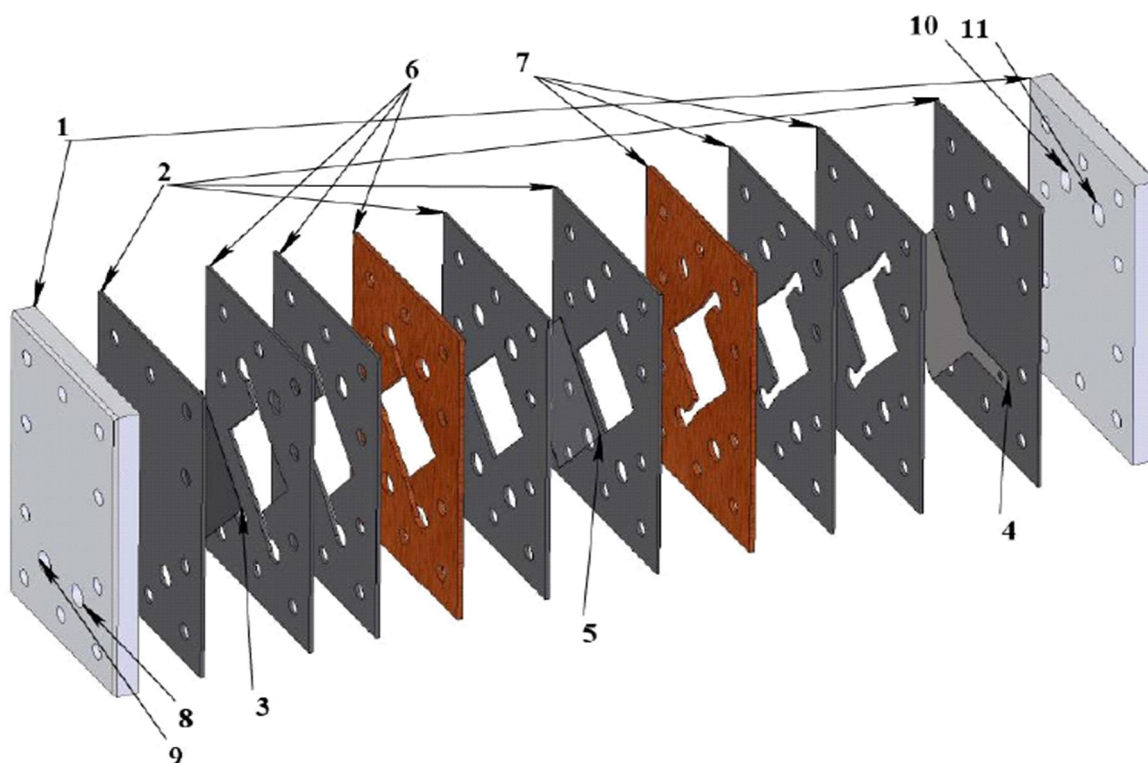


Рисунок 2.4 – Конструкция ячейки для электросинтеза окисляющих растворов. 1 – корпус, 2 – резиновые прокладки, 3 – анод, 4 – катод, 5 – мембрана, 6 – обкладки анодной камеры, 7 – обкладки катодной камеры, 8 – вход в анодное пространство, 9 – вход в катодное пространство, 10 – выход из анодного пространства, 10 – выход из катодного пространства.

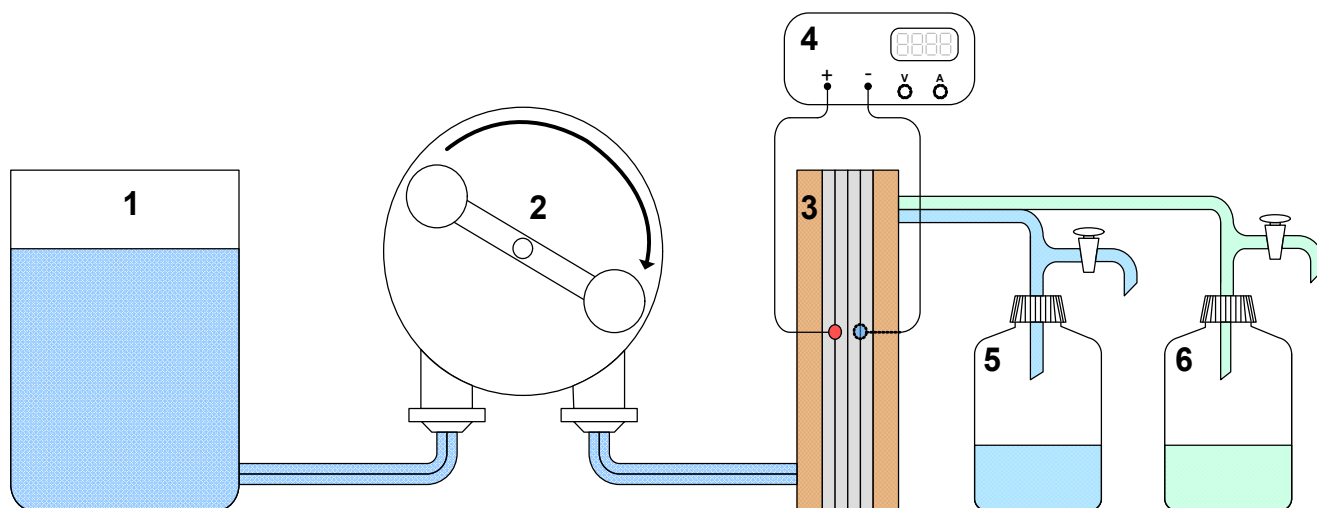


Рисунок 2.5 – Общий вид установки для электросинтеза: 1 – емкость с исходным раствором электролита, 2 – перистальтический насос, 3 – электрохимическая ячейка, 4 – источник питания, 5 – емкость для сбора католита, 6 – емкость для сбора анолита.

Электросинтез гексацианоферратов осуществляли в режиме циклической развертки потенциала в диапазоне потенциалов от -400 до +1100 мВ (х.с.э.) в течение 35 циклов при скорости 25 мВ/с при комнатной температуре из свежеприготовленного электролита следующего состава: 0,15 М NaCl, 0,001 М $K_3[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$, 0,001 М $MSO_4 \cdot 6H_2O$ (где М= Co, Ni). В качестве подложки для нанесения пленки гексацианоферрата использовали цилиндрический электрод из стеклоуглерода, площадь поверхности составляла 2 мм² (торец электрода), в качестве вспомогательного электрода использовали сетку из платинированного титана. Предварительно рабочую поверхность стеклоуглерода обрабатывали шлифовальной бумагой М6 и промывали дистиллированной водой.

После осаждения электрод промывали дистиллированной водой и проводили проверку характеристик полученного покрытия по методике [298] в 0,15 М растворе NaCl в течение 10 циклов в диапазоне потенциалов от -400 до +1000 мВ (х.с.э.) при скорости развертки потенциала 250 мВ/с.

2.1.3 Методика электрохимического нанесения покрытий благородными металлами на ангиографические проводники

В качестве рабочих электродов были использованы ангиографические проводники TSCF-35-145-3 (Cook Medical Inc., США), 2 мм длины которых от торцевой части были электролитически покрыты родием, рутением, золотом и палладием.

Перед нанесением покрытия наконечник проводника подвергали механической обработке шлифовальной бумагой М10, промывке в холодной воде, обезжириванию, промывке в теплой воде, активации в соляной кислоте (1:1), промывке в теплой воде перед нанесением покрытия.

Родиевое электролитическое покрытие наносили из электролита, разработанного на кафедре ТЭП РХТУ им. Д.И. Менделеева, содержащего

2 г/л $\text{Rh}_2(\text{SO}_4)_3$ (по мет.) и 50 г/л H_2SO_4 при температуре электролита 35 °С, катодной плотности тока 2 А/дм² в течение 4 мин.

Золотое покрытие наносили из электролита «Золото-ювел», совместно разработанного РХТУ им. Д.И. Менделеева и компанией «Клио» (Россия), при комнатной температуре, катодной плотности тока 2 А/дм² в течение 4 мин.

Рутениевое покрытие наносили из электролита «Рутений-ювел», совместно разработанного РХТУ им. Д.И. Менделеева и компанией «Клио» (Россия), при комнатной температуре, катодной плотности тока 2 А/дм² в течение 4 мин.

Палладиевое покрытие наносили из электролита «Палладий-ювел», совместно разработанного РХТУ им. Д.И. Менделеева и компанией «Клио» (Россия), при комнатной температуре, катодной плотности тока 2 А/дм² в течение 4 мин.

После нанесения покрытий образец промывали теплой водой и подвергали сушке.

2.1.4 Методика определения защитной способности покрытий благородными металлами

Защитную способность оценивали по графически определенным токам коррозии в плазме крови систем «однослойное металлическое покрытие-защищаемый металл» (метод Розенфельда) [299]. Толщина покрытия составляла 0,01 и 0,1 мкм. В качестве материала основы использовали нержавеющую сталь марки 314L.

Для этого определяли токи коррозии с использованием поляризационных диаграмм коррозии, построенных на основе суммарных кривых. Для количественного определения контактного тока необходимо иметь значение стационарного (бестокового) потенциала исследуемой системы и поляризационную кривую катодного процесса в исследуемом растворе. Токи растворения защищаемого металла определяли графически проецированием на катодную кривую значения стационарного потенциала изучаемой системы.

Модельные коррозионные испытания проводили в ячейке объемом 20 мл.

В качестве стационарного (бестокового) потенциала исследуемой системы «однослойное металлическое покрытие – защищаемый металл» был принят потенциал через 5 минут измерения в плазме крови.

Катодные поляризационные кривые получены с помощью потенциостата IPC-Pro L (НПФ «Вольта», Россия) при скорости развертки потенциала 0,5 мВ/с. В качестве вспомогательного электрода использовали ОРТА.

2.1.5 Методика электрохимической коагуляции

Электрохимическую коагуляцию осуществляли в гальваностатическом режиме с помощью потенциостата IPC Pro MF (НПФ «Вольта», Россия) в диапазоне величин тока от 100 до 750 мкА и времени проведения процесса от 15 до 120 с. В качестве рабочих электродов были использованы ангиографические проводники TSCF-35-145-3 (Cook Medical Inc., США), описанные выше. В качестве вспомогательного электрода использовали сетку из нержавеющей стали. Исследования проводили в ячейке объемом 20 мл, использовали цельную кровь практически здоровых людей. Объем образцов для исследования составлял 10 мл.

Модельные эксперименты проводили на платиновом микроэлектроде с площадью поверхности $5 \cdot 10^{-4}$ дм².

2.2 Спектрофотометрические измерения

Анализ концентрации окислителей в растворах осуществляли йодометрическим методом [300] на спектрофотометре DU 800 (Beckman Coulter, США). Для калибровки использовали водные растворы $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ известной концентрации. Для этого 0,1 мл раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ добавляли к 0,9 мл воды и 2 мл 1 М раствора КJ. Полученные растворы выдерживали 15 минут, далее проводили спектрофотометрический анализ. Определение проводили в ультрафиолетовой области спектра в диапазоне длин волн от 270 нм до 400 нм. В

качестве раствора сравнения использовали 2 мл 1 М раствора КJ и 1 мл воды.

В УФ спектре поглощения калибровочных растворов $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (рис. 2.6) наблюдали два характерных максимума при длинах волн 283 нм и 352 нм и минимум при длине волны 319 нм. В табл. 2.1 приведены значения оптической плотности калибровочных растворов при длинах волн 283, 319 и 352 нм в зависимости от концентрации $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$.

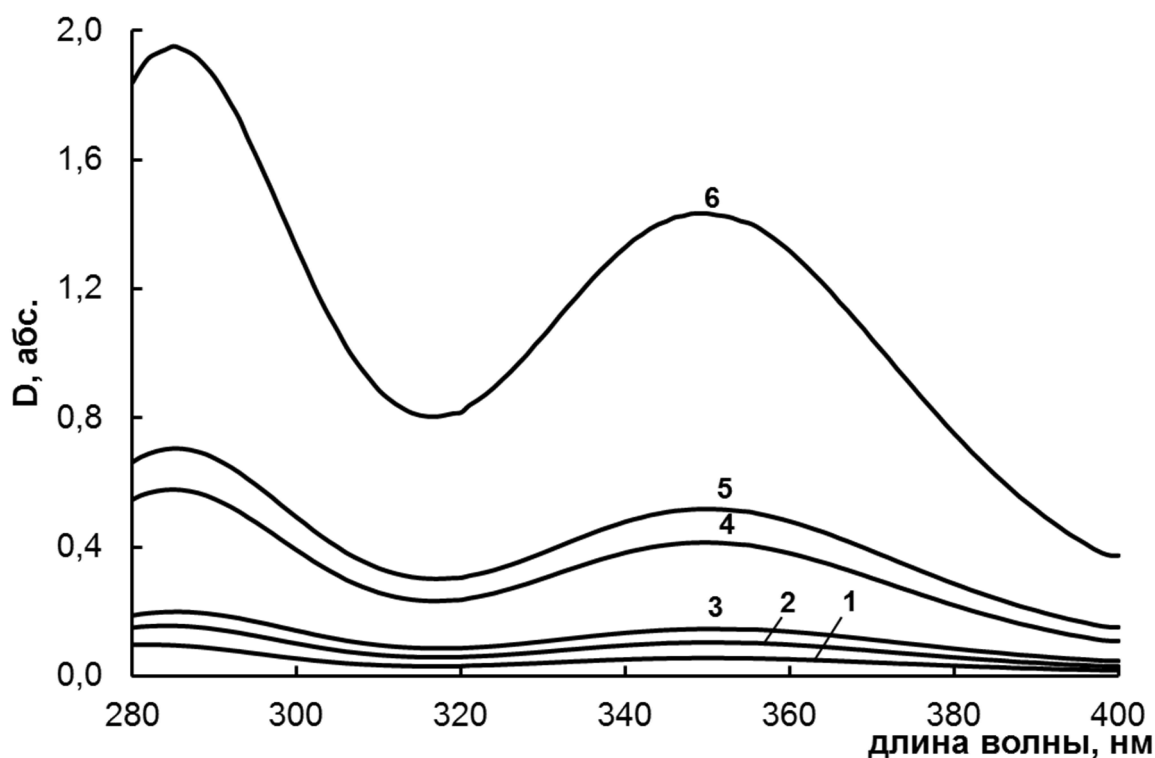


Рисунок 2.6 – Спектры поглощения растворов $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ с известной концентрацией, ммоль/л: 1 – 0,0688; 2 – 0,1375; 3 – 0,2750; 4 – 0,5500; 5 – 1,1000; 6 – 2,2000.

Таблица 2.1 – Оптическая плотность растворов персульфата

Концентрация $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$, ммоль/л	Оптическая плотность при длине волны D, абс. величина.		
	283 нм	319 нм	352 нм
0,0688	0,0976	0,0314	0,0565
0,1375	0,1562	0,0594	0,1045
0,2750	0,1976	0,0871	0,1461
0,5500	0,5739	0,2356	0,4123
1,1000	0,6978	0,3042	0,5162
2,2000	1,9654	0,8140	1,4254

В работе применяли способ расчета определяемой концентрации по разности значений оптической плотности: определялась разница между максимумом и минимумом УФ спектра поглощения, из которых затем строили калибровочную кривую (рис. 2.7).

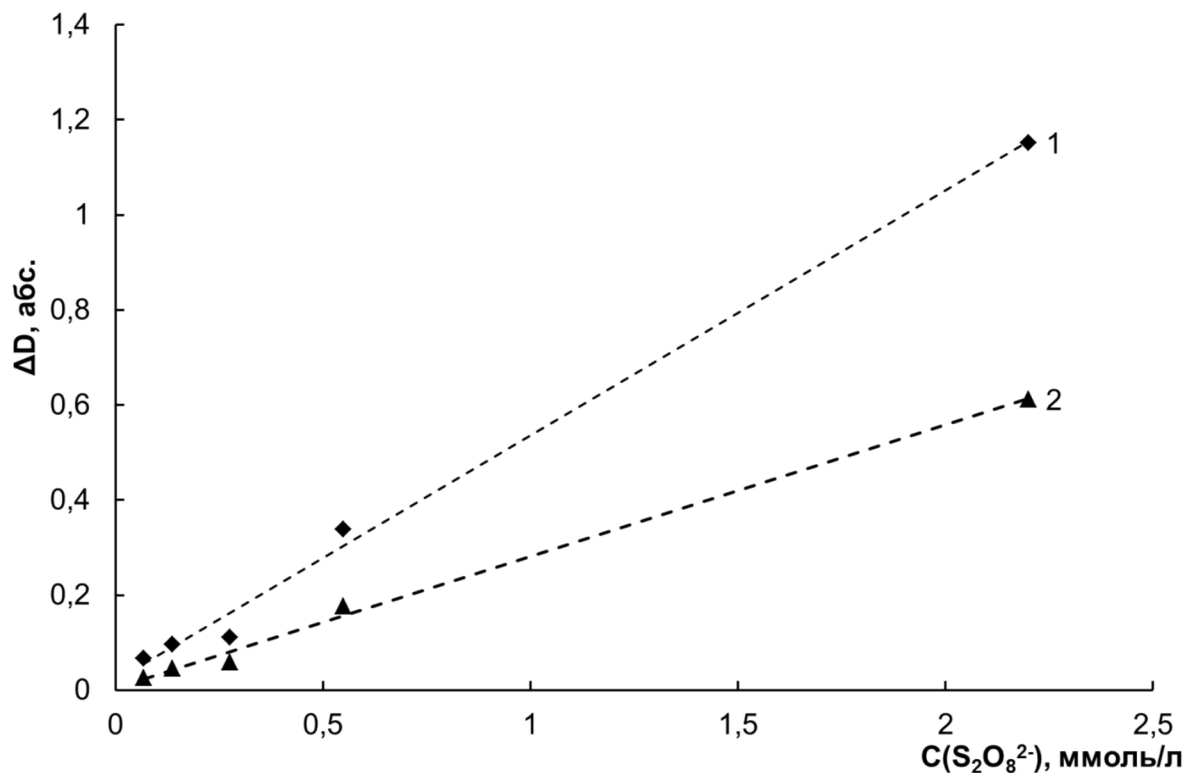


Рисунок 2.7 – Зависимость оптической плотности от концентрации $Na_2S_2O_8$: 1 - ΔD_1 (283 нм – 319 нм), 2 - ΔD_2 (352 нм – 319 нм).

Во всех случаях калибровочных кривые в диапазоне концентраций персульфата от 0,07 до 2,20 мМ являлись линейными. По данной зависимости вычисляли концентрации при ΔD_1 и ΔD_2 , далее рассчитывали среднюю концентрацию (2.1).

$$C = \frac{\left(\frac{\Delta D_1 - 0,019}{0,5162} + \frac{\Delta D_2 - 0,044}{0,277}\right)}{2} \quad (2.1)$$

где C – концентрация окислителя, ммоль/л;

ΔD_1 – разность оптической плотности при длинах волн 283 и 319 нм, абс.;

ΔD_2 – разность оптической плотности при длинах волн 352 и 319 нм, абс.

Анализ раствора состоял в том, что 0,1 мл окисляющего раствора добавляли к 0,9 мл воды и 2 мл 1 М раствора КJ. Полученную смесь выдерживали в течение 15 минут, после чего подвергали спектрофотометрическому анализу по методике, описанной выше.

Окисляющую активность синтезированных растворов на основе сульфатно-хлоридных растворов по отношению к лекарственным препаратам оценивали по снижению концентрации хлорпротиксена ((Z)-4-[3-(2-Хлортиоксантен-9-илиден)-пропил]-1-диметиламин), которую определяли спектрофотометрически.

Растворы хлорпротиксена готовили путем разбавления исходного концентрированного раствора (50 мг/л). В анализируемый раствор, содержащий 0,9 мл раствора хлорпротиксена добавляли 0,1 мл дистиллированной воды и 2 мл концентрированной серной кислоты. Полученные растворы выдерживали 10 минут, далее проводили спектрофотометрический анализ. Определение проводилось в диапазоне длин волн от 200 нм до 600 нм. Спектры поглощения растворов хлорпротиксена в зависимости от концентрации приведены на рис. 2.8.

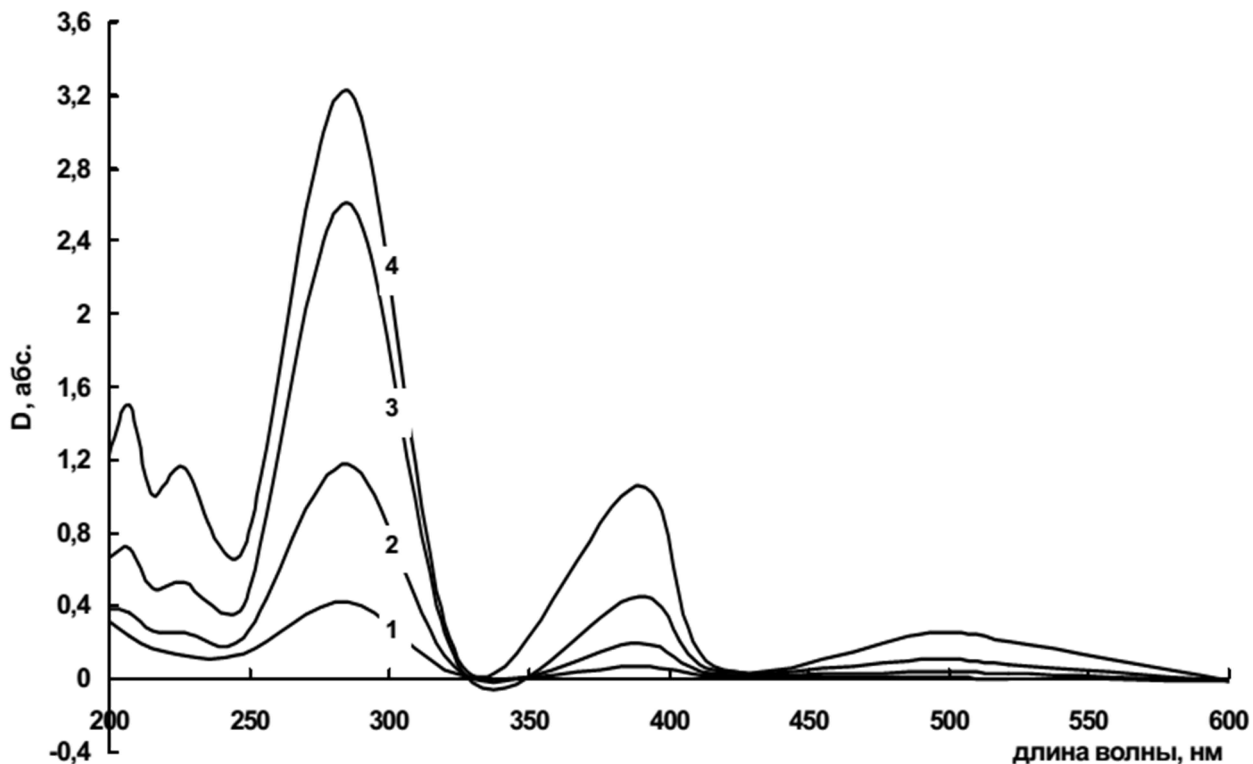


Рисунок 2.8 – Спектры поглощения растворов хлорпротиксена в зависимости от концентрации, мг/л: 1 – 6,25, 2 – 12,5, 3 – 25, 4 – 50.

При исследовании активности синтезированных окисляющих растворов использовали раствор хлорпротиксена с концентрацией 25 мг/л. Анализ состоял в том, что к анализируемому раствору, содержащему 0,9 мл лекарственного препарата, добавляли 0,1 мл окисляющего раствора и 2 мл концентрированной серной кислоты. В качестве контроля использовали раствор, содержащий 0,9 мл раствора хлорпротиксена с концентрацией 25 мг/л, 0,1 мл дистиллированной воды и 2 мл концентрированной серной кислоты. Спектрофотометрическое определение проводили в диапазоне длин волн от 200 нм до 600 нм через определенные промежутки времени (5, 15, 30, 60, 90, 120 минут). Изменение концентрации хлорпротиксена оценивали по снижению пика поглощения при 283 нм.

2.3 Биологические методики

2.3.1 Подготовка биологических сред к исследованию

Цельную кровь получали у практически здоровых добровольцев с помощью вакуумной системы для забора крови; использовали пробирки Vacutainer[®] LH 102 I.U. (BD, Великобритания) с антикоагулянтом гепарином лития. Объем образцов крови для исследования составлял 2 мл.

Плазму крови получали по описанной выше схеме. Объем образцов крови для получения плазмы составлял 5 мл. Затем цельную кровь термостатировали при 37 °С в течение 30 мин в сухожаровом шкафу STABILITHERM 118 EU2 Vent (Thermo Scientific, Франция) после чего центрифугировали при 1500g в течение 15 мин на центрифуге CR 3.12 (Jouan, Франция). Объем образцов полученной плазмы крови для исследования составлял 2 мл.

Сыворотку крови получали по указанной схеме для плазмы; для получения сыворотки использовали пробирки Vacutainer[®] SST[™] II Advance (BD, Великобритания) с активатором свертывания кремнеземом. Объем образцов сыворотки крови для исследования составлял 2 мл.

Разница между сывороткой крови и плазмой крови состоит в отсутствии в сыворотке белка фибриногена, который является составной частью системы свертывания крови. В цельную кровь перед центрифугированием для получения плазмы добавляют антикоагулянт (цитрат натрия, ЭДТА, гепарин лития, гепарин натрия), препятствующий свертыванию, сыворотку крови можно использовать для тестирования без дополнительных реактивов.

2.3.2 Структура и объем исследования потенциала при разомкнутой цепи биологических сред

В исследование были включены следующие группы пациентов:

- пациенты с острой церебральной патологией,
- пациенты с острым септическим состоянием,
- пациенты после трансплантации органов (почка, печень, легкое).

Пациентам с острой церебральной патологией (черепно-мозговой травмой, ишемическим и геморрагическим инсультом, ишемией мозга после клипирования интракраниальных аневризм) проводили лечение методом гипербарической оксигенации (16 пациентов, 58 сеансов ГБО). Сеансы ГБО включали в комплексную терапию в максимально ранние сроки после операции удаления интракраниальных гематом сосудистого или травматического генеза, клипирования артериальных аневризм, а также в остром периоде ишемического инсульта. Сеансы ГБО осуществлялись в реанимационной барокамере «Sechrist 2800» (Sechrist, США), оснащенной аппаратом искусственной вентиляции легких «Sechrist 500» (Sechrist, США), монитором для контроля электрокардиограммы и частоты дыхания (Agilent, Германия), а также прибором для мониторинга артериального давления во время сеанса «Oscillomate 1630» (CASMED, США). Использовали режимы 1,2-1,4 АТА в течение 40 мин изопрессии. Во время сеанса ГБО проводили мониторинг электрокардиограммы, артериального давления, частоты дыхания.

Пациентам с острыми септическими состояниями при эндотоксикозах и абдоминальных травмах в тактику лечения была включена антибактериальная терапия, кроме того, в ряде случаев осуществляли сеансы экстракорпоральной терапии (гемодиализ, гемодиализация, плазмаферез).

В группе пациентов с трансплантированными органами исследовали пациентов в раннем послеоперационном периоде после трансплантации печени, почки и легкого. Одной из особенностей данной группы пациентов является медикаментозная терапия иммуносупрессивными препаратами, которая может быть как однокомпонентной, так и многокомпонентной (два, три препарата).

Уровень эндогенной интоксикации определяли с помощью измерения уровня среднемолекулярных пептидов по методике [301].

Структура и объем исследования представлен в табл. 2.2.

Таблица 2.2 – Структура и объем исследования

Отделение	Количество обследованных пациентов	Количество проведенных анализов
Отделение гипербарической оксигенации (ГБО)	16 (12 мужчин, 4 женщины)	116
Отделение острых эндотоксикозов (ООЭ)	23 (16 мужчин, 7 женщин)	70
Центр трансплантации печени (ЦТП)	64 (40 мужчин, 24 женщины)	615
Отделение трансплантации почки и поджелудочной железы (ОТПиПЖ)	59 (42 мужчины, 17 женщин)	967
Отделение трансплантации легкого (ОТЛ)	7 (4 мужчины, 3 женщины)	143
ИТОГО	169	1911

2.3.3 Методика исследования гемосовместимости

Исследование гемосовместимости проводили с помощью определения степени гемолиза эритроцитов при взаимодействии окисляющих растворов с цельной кровью спектрофотометрическим методом [302].

Синтезированные растворы добавляли к цельной крови в соотношении 1:10. В качестве контроля использовали цельную кровь с добавкой физиологического раствора в том же соотношении. Полученные образцы инкубировали в течение 5 минут при 37°C.

Анализируемая проба и контроль подвергали центрифугированию при 1500g в течение 15 мин на центрифуге CR 3.12 (Jouan, Франция). Затем отбирали 0,3 мл надосадочной жидкости, которую добавляли к 3 мл рабочего раствора Na_2CO_3 с концентрацией 0,1 г/л. Спектрофотометрическое определение относительной плотности исследуемых растворов относительно рабочего раствора Na_2CO_3 проводили в кварцевых кюветах с толщиной слоя жидкости 10 мм при трех фиксированных длинах волн: 380, 415 и 450 нм на спектрофотометре DU 800 (Beckman Coulter, США). На основании полученных данных рассчитывали концентрацию свободного гемоглобина (2.2).

$$C_{\text{Hb}} = 0,836 \cdot (2 \cdot A_{415} - A_{380} - A_{450}), \quad (2.2)$$

где C_{Hb} – концентрация свободного гемоглобина, г/л;

A_{415} , A_{380} , A_{450} – относительная плотность анализируемых растворов при 415, 380 и 450 нм соответственно, абс.

2.3.4 Определение антиоксидантной активности биологических сред

Спектрофотометрическое определение антиоксидантной активности биологических сред проводили с помощью набора TAS Randox[®] kit (total antioxidant status) (Randox Laboratory Ltd., Великобритания) по методу [303].

2.3.5 Морфофункциональные исследования

Морфофункциональный анализ эритроцитов проводили с помощью метода, основанного на окрашивании клеток витальными (прижизненными) флуорохромными красителями с последующим анализом во флуоресцентном микроскопе Eclipse 80i (Nikon, Япония) [304].

2.3.6 Бактериологические исследования

Бактериологические исследования проводили по стандартным методикам в бактериологической лаборатории ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ».

2.4 Методика приготовления модельных растворов антиоксидантов

Для приготовления стокового 10^{-2} М раствора Тролокса ((±)-6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота) использовали модифицированную нами методику [305], при этом к навеске 0,026 г Тролокса (Sigma Aldrich, 97%, $M = 250,29$) добавляли 1 мл 95% раствора C_2H_5OH , 8,7 мл бидистиллированной воды и 0,3 мл 1 М раствора NaOH. Растворы Тролокса с более низкой концентрацией готовили разбавлением стокового раствора буферным раствором PBS (phosphate buffer solution, pH 7,4) до требуемой концентрации.

Для приготовления стокового 10^{-2} М раствора кверцетин дигидрата использовали модифицированную нами методику [305], при этом к навеске 0,035 г кверцетин дигидрата (Alfa Aesar, 97%, $M = 338,28$) добавляли 1 мл 95% раствора C_2H_5OH , 8,7 мл бидистиллированной воды и 0,3 мл 1 М раствора NaOH. Растворы кверцетин дигидрата с более низкой концентрацией готовили разбавлением стокового раствора буферным раствором PBS до требуемой концентрации.

2.5 Статистический анализ

Статистический анализ данных осуществляли с применением Statistica 6.0 (StatSoft, США). Среднее значение и стандартное отклонение рассчитывали при доверительной вероятности 95%.

$$S = \sqrt{\frac{(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2.3)$$

где S - выборочное стандартное отклонение;

x_i - отдельное значение;

\bar{x} - среднее всех x_i ;

n - общее число измерений.

$$SE = \frac{S}{\sqrt{n}} \quad (2.4)$$

где SE – стандартная ошибка;

S - выборочное стандартное отклонение;

n - общее число измерений.

Данные о чувствительности, специфичности, точности, а также прогностической ценности положительного и отрицательного результата теста были получены с помощью обработки матрицы решений (четырёхпольной таблицы) (табл. 2.3) [306,307].

Таблица 2.3 – Образец четырехпольной таблицы для расчета характеристик диагностического метода

		БОЛЕЗНЬ	
		присутствует	отсутствует
ТЕСТ	положительный	a (истинно положительные)	b (ложноположительные)
	отрицательный	c (ложноотрицательные)	d (истинно отрицательные)

Чувствительность (Se) определяли как долю лиц с положительным результатом теста в популяции с заболеванием:

$$Se = \frac{a}{a+c} \quad (2.5)$$

Специфичность (Sp) определяли как долю лиц с отрицательным результатом теста в популяции без заболевания:

$$Sp = \frac{d}{b+d} \quad (2.6)$$

Точность (Ac) соответствовала доле правильных результатов теста в общем количестве результатов:

$$Ac = \frac{a+d}{a+b+c+d} \quad (2.7)$$

Прогностическая ценность положительного результата теста (+PV) соответствовала вероятности наличия заболевания при положительном результате теста:

$$+PV = \frac{a}{a+b} \quad (2.8)$$

Прогностическая ценность отрицательного результата теста (-PV) соответствовала вероятности отсутствия заболевания при отрицательном результате теста:

$$-PV = \frac{d}{c+d} \quad (2.9)$$

3 Измерение потенциала при разомкнутой цепи в биологических средах

3.1 Моделирование процесса измерения потенциала при разомкнутой цепи в биологических средах

3.1.1 Проблема измерения потенциала при разомкнутой цепи в «слабых» окислительно-восстановительных средах

Анализ литературы показал, что одной из существенных проблем при проведении измерений в биологических средах (так называемых «слабых» окислительно-восстановительных системах) является влияние состояния электрода на измеряемую величину потенциала при разомкнутой цепи.

Прежде всего, задача измерения потенциалов платины в биологических средах подразумевала невозможность проведения измерений в средах, освобожденных от растворенного кислорода. Это связано с тем, что вытеснение кислорода из живых систем приведет к изменению физиологических процессов, происходящих в таких объектах, как кровь, плазма и сыворотка крови. Известно, что при контакте платинового электрода с тестируемой биологической средой растворенный кислород и молекулы воды, способны реагировать с поверхностью платины, образуя смешанные поверхностные оксиды платины в виде моно- и полислоев. Поскольку потенциал электрода при этом меняется [95,108], мы предположили, что отклик электрода, состоящий в изменении потенциала при контакте различными средами, зависит и определяется, в основном, составом образующихся поверхностных оксидов платины и их соотношением.

Кроме того, известно, что платиновый электрод может адсорбировать ионы хлорида, содержащиеся в биологических средах, в широкой области потенциалов [308]. Заметим также, что имеются и электролиты, индифферентные по отношению к платине, например, сульфаты.

В главе 1 цитировались литературные источники, в которых зафиксирована способность платины адсорбировать компоненты биологических сред (белки,

ферменты), что приводят к загрязнению поверхности электрода и увеличению погрешности измерений потенциала при разомкнутой цепи. Согласно анализу этих явлений, потенциал платины при разомкнутой цепи будет изменяться в результате каждого взаимодействия и суммарно в случае одновременного воздействия нескольких упомянутых факторов.

Первоначально невозможность получения воспроизводимых результатов при измерениях ПРЦ с помощью промышленно выпускаемого прибора HI 98201 (Hanna instruments, США) была обнаружена при анализе окислительной активности электрохимически синтезированного раствора на основе сульфатно-хлоридного электролита. Так при последовательном измерении в одном и том же растворе было отмечено смещение ПРЦ в сторону более положительных значений потенциала (табл. 3.1).

Таблица 3.1 – ПРЦ различных образцов электрохимически синтезированного раствора на основе сульфатно-хлоридного электролита (0,14 М Na₂SO₄, 0,005 М NaCl, 50 А/дм²)

№ образца	ПРЦ, мВ
1	1121
2	1120
3	1138
4	1156
5	1194

Схожая картина наблюдалась при измерении ПРЦ на индивидуальном платиновом электроде в индифферентных растворах электролитов. Действительно, при отсутствии дополнительной подготовки электрода перед измерением потенциал электрода с каждым последующим измерением постоянно смещался в область положительных значений.

Так, при измерении в 0,1 М растворе Na_2SO_4 наблюдалось смещение потенциала при разомкнутой цепи суммарно на 200 мВ (от 150 мВ до 350 мВ) за две недели (рис. 3.1).

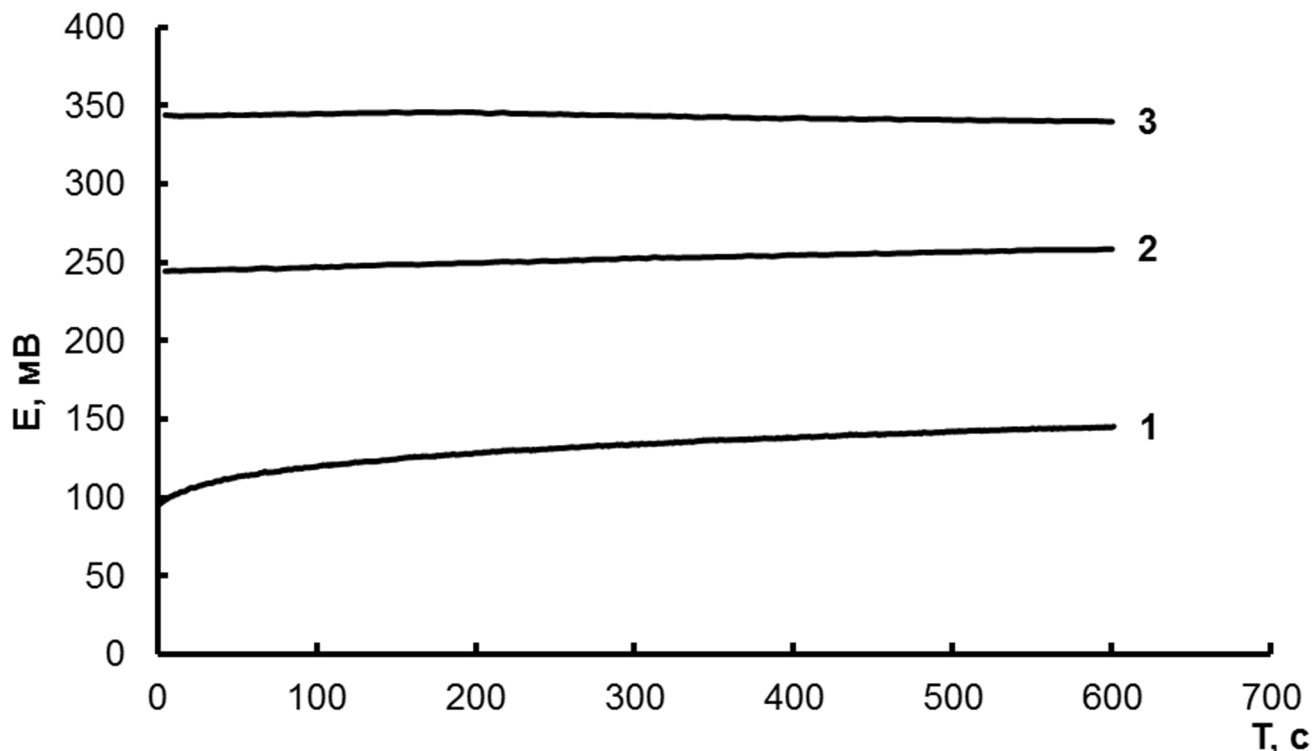
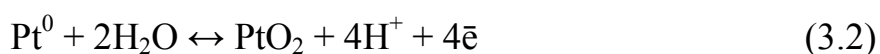
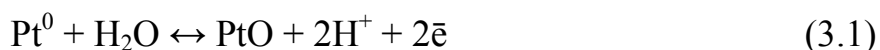


Рисунок 3.1 – Зависимость потенциала Pt электрода от времени в 0,1 М Na_2SO_4 . 1 – после обработки, 2 – через 7 дней, 3 – через 14 дней.

Поскольку известно, что на поверхности платины при контакте с растворами, содержащими кислород, образуются смешанные оксиды платины с различной валентностью платины [101,309], наблюдаемое явление, вероятно, можно объяснить накоплением на поверхности электрода соединений кислорода согласно следующим реакциям:



Таким образом, возможные ошибки измерений ПРЦ электрода в тестируемых биологических средах и водных растворах могут быть связаны с протеканием на его поверхности указанных реакций, а также адсорбцией компонентов тестируемых растворов. В результате любое измерение (то есть контакт платины с биологической жидкостью или водным раствором, содержащими потенциальные реагенты или адсорбенты) приведет поверхность платины в новое состояние.

Поэтому было решено перед каждым измерением производить обработку электрода с целью убирать с поверхности нежелательные адсорбированные частицы и, тем самым, приводить поверхность к определенному стандартному состоянию.

Одним из распространенных методов подготовки электродов в электрохимической практике является катодно-анодная обработка, которая заключается либо в последовательной потенциостатической обработке при отрицательных и положительных потенциалах, либо в циклической потенциодинамической обработке [113-115].

Было решено использовать метод циклической потенциодинамической обработки платинового электрода. Исходя из необходимости использовать для предобработки электролит, индифферентный по отношению к платине, был выбран водный раствор 0,1 М Na_2SO_4 , поскольку, как указано выше, этот электролит практически не взаимодействует с платиной. Более того, известно, что сульфат не адсорбируется на платине, в отличие от хлорида. Действительно, авторы [310, 311] исследовали адсорбционную активность растворов сульфата на платине и обнаружили, что при потенциале максимальной адсорбции на платине адсорбируется пренебрежительно малое количество сульфата, всего около $2 \cdot 10^{-14}$ ионов/см².

Таким образом, раствор сульфата натрия был выбран в качестве индифферентного электролита для разработки метода предобработки платинового электрода. Для того, чтобы выбрать диапазон потенциалов и скорость сканирования потенциала, были снята циклическая вольтамперограмма

платинового электрода в 0,1 М растворе в диапазоне потенциалов от -0,8 до +1,6 В (н.в.э.) (рис. 3.2).

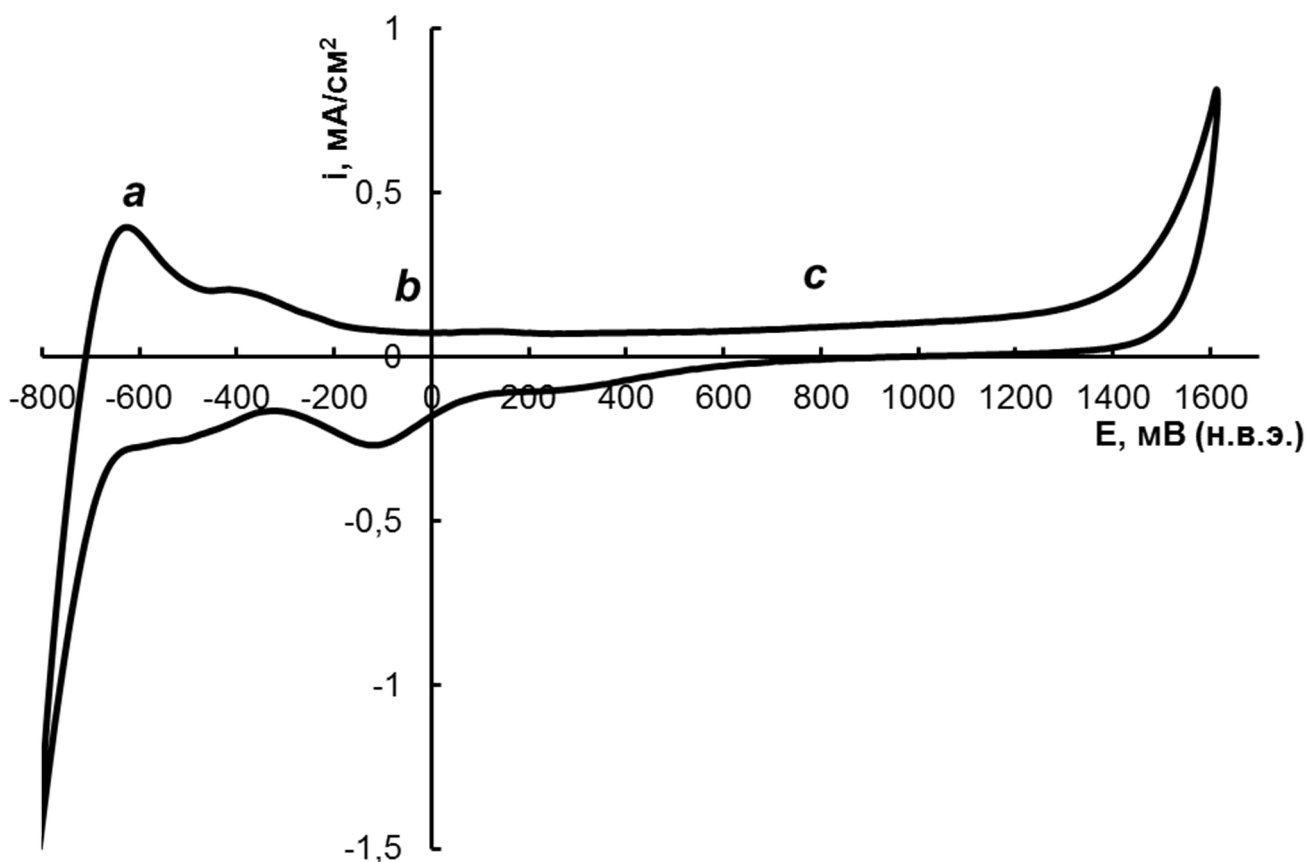


Рисунок 3.2 – Циклическая вольтамперограмма Pt электрода в 0,1 М растворе Na₂SO₄ при скорости развертки потенциала 500 мВ/с.

Из полученных данных (рис. 3.2), были определены характерные для подобных зависимостей участки [312], соответствующие водородной области (а), двойнослойной области (b) и кислородной области (с).

Информация, которая получена из анализа электрохимического поведения платины в 0,1 М растворе сульфата натрия, была использована для подбора условий обработки электрода. Были исключены участки ЦВА, соответствующие реакциям выделения кислорода и водорода, и предложена методика предварительной очистки платинового электрода, заключающаяся в циклической потенциодинамической обработке электрода в диапазоне потенциалов от -600 мВ до +600 мВ. Чтобы избежать протекания нежелательных процессов

взаимодействия растворенного кислорода с поверхностью платины, было решено ввести в состав электролита восстановитель сульфит натрия. Имелась также вероятность химического восстановления поверхностных оксидов платины, которые необходимо удалить с поверхности, поскольку они накапливаются на электроде в процессе контакта платины с тестируемыми биологическими средами во время измерений потенциала, как уже указано выше. Добавление сульфита позволяет не использовать для удаления избытка поверхностных оксидов процесс выделения водорода на электроде при электрохимической обработке. Этот процесс не следует использовать из-за блокирования поверхности обрабатываемого электрода пузырьками водорода.

Было решено проводить потенциодинамическую обработку платины в указанных выше диапазонах потенциалов в течение 50 циклов со скоростью 500 мВ/с, а затем в течение 10 циклов в диапазоне от +100 мВ до +200 мВ (рис. 3.3).

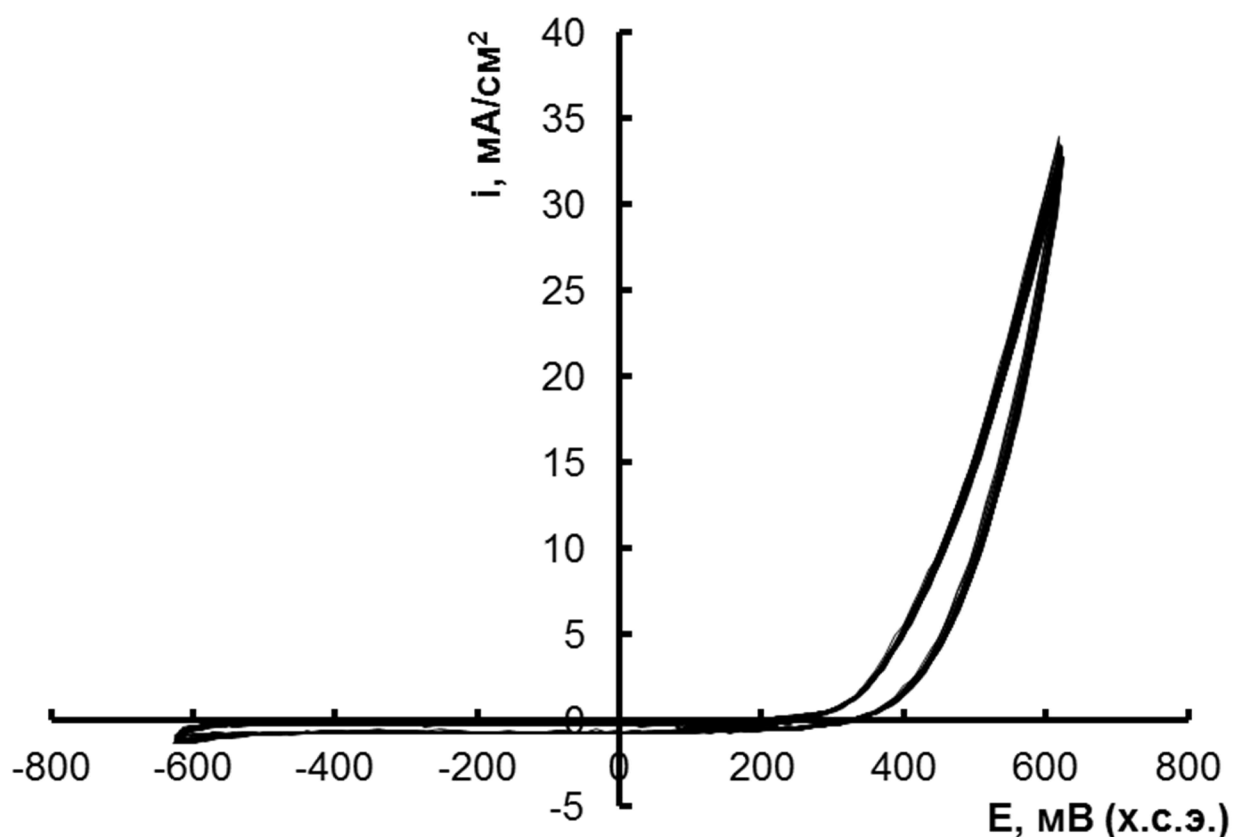


Рисунок 3.3 – Циклическая вольтамперограмма обработки Pt электрода в 0,1 М Na₂SO₃.

Было установлено, что предложенная обработка действительно приводила к стабилизации значения потенциала платинового электрода при разомкнутой цепи около 140 ± 5 мВ в водном растворе 0,1 М Na_2SO_4 (рис. 3.4). Эта величина потенциала («контрольный потенциал») проверялась после каждой обработки до начала измерений.

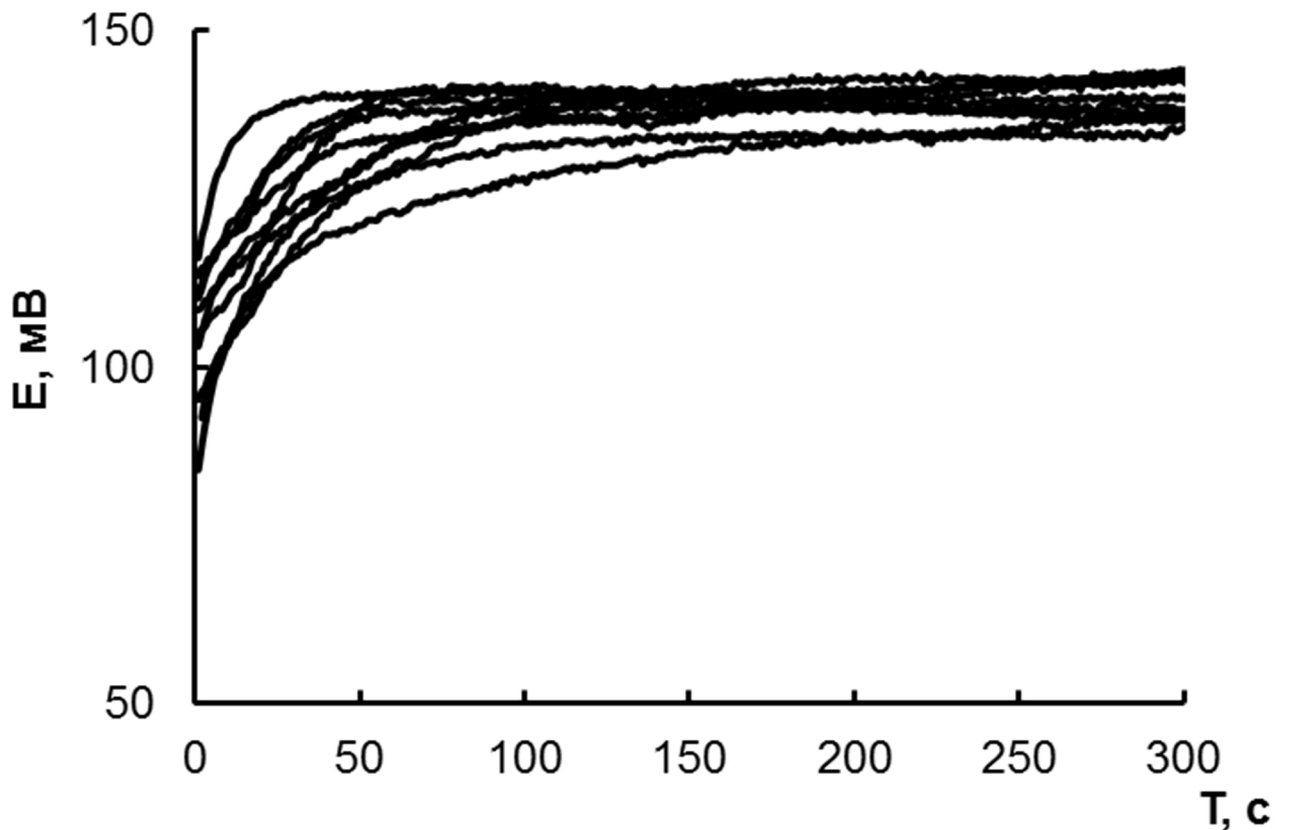


Рисунок 3.4 – Проверка ПРЦ платинового электрода в 0,1 М Na_2SO_4 ($n = 10$).

При статистической обработке полученных данных при уровне значимости более 95% были рассчитаны стандартное отклонение и стандартная ошибка измерения, которые составили 3,06 и 0,97 соответственно (табл. 3.2).

Предложенная методика, как видно из данных, собранных в табл. 3.2, позволила получать воспроизводимые данные не только в водных растворах, но и в биологических средах (рис. 3.5).

Таблица 3.2 – Данные по статистической обработке результатов измерения ПРЦ ($p \leq 0,05$)

N	x_i (значение ПРЦ через 5 минут)	\bar{x} (среднее значение ПРЦ)	S, мВ	SE, мВ
1	138,31	140,97	3,06	0,97
2	142,17			
3	140,24			
4	137,92			
5	137,34			
6	137,44			
7	136,63			
8	143,71			
9	143,91			
10	144,30			

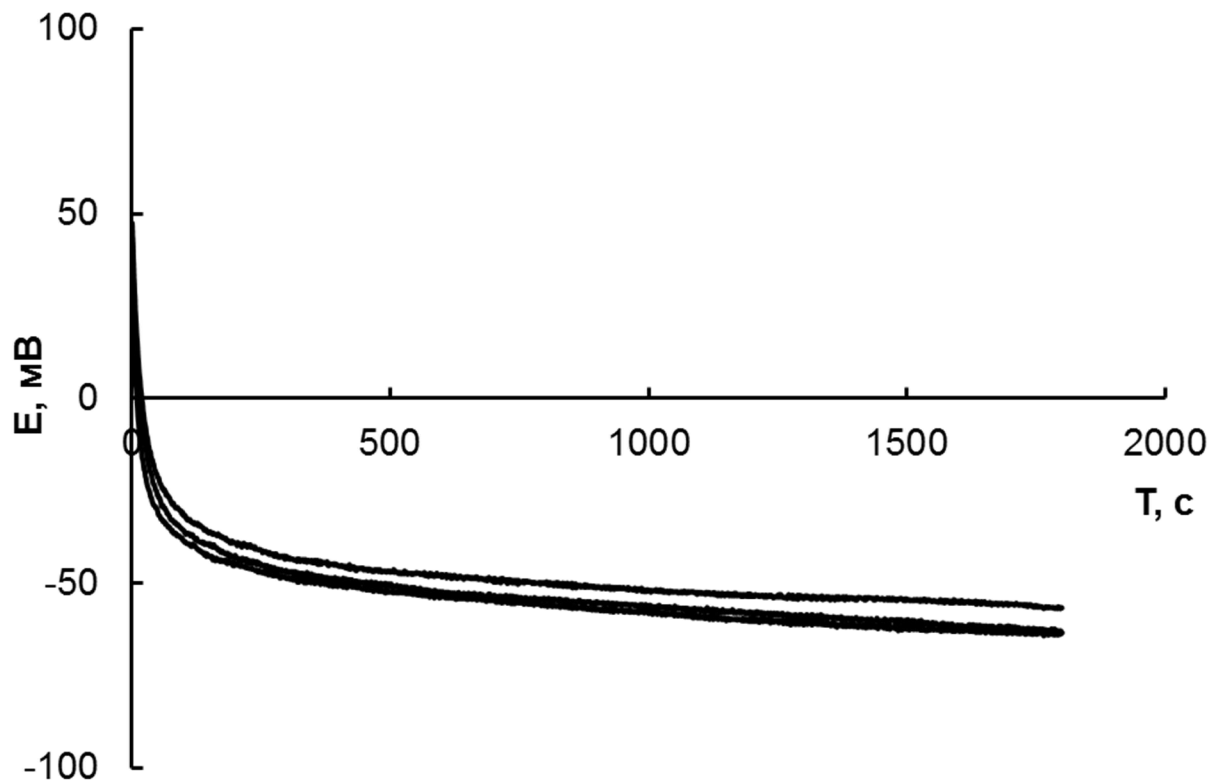


Рисунок 3.5 – Воспроизводимость измерений ПРЦ в сыворотке крови.

Стандартное отклонение при измерении ПРЦ в сыворотке крови составило 3,85 мВ при стандартной ошибке 2,22 ($p \leq 0,05$).

3.1.2 Исследование влияния добавок оксидантов и антиоксидантов на потенциал при разомкнутой цепи водных сред

Прежде всего было исследовано влияние добавок оксидантов и антиоксидантов на величины ПРЦ платинового электрода в водных средах. В качестве оксидантов были исследованы растворы гипохлорита натрия и персульфата натрия (рис. 3.6).

Как видно из представленных на рис. 3.6 данных добавление оксидантов приводило к смещению величины ПРЦ в положительную область значений потенциала.

При исследовании растворов, содержащих антиоксиданты аскорбиновую кислоту, α -токоферол, ионол и кверцетин дигидрат, было найдено, что величина ПРЦ платинового электрода сместилась в область более отрицательных значений (рис. 3.7).

Оказалось, что величина смещения зависит от активности антиоксиданта, так при одинаковой концентрации антиоксиданты можно составить ряд по смещению величины ПРЦ в отрицательную область потенциалов:

кверцетин дигидрат < ионол < α -токоферол < аскорбиновая кислота,

что соответствует литературным данным уровней антиоксидантной активности исследованных соединений [313].

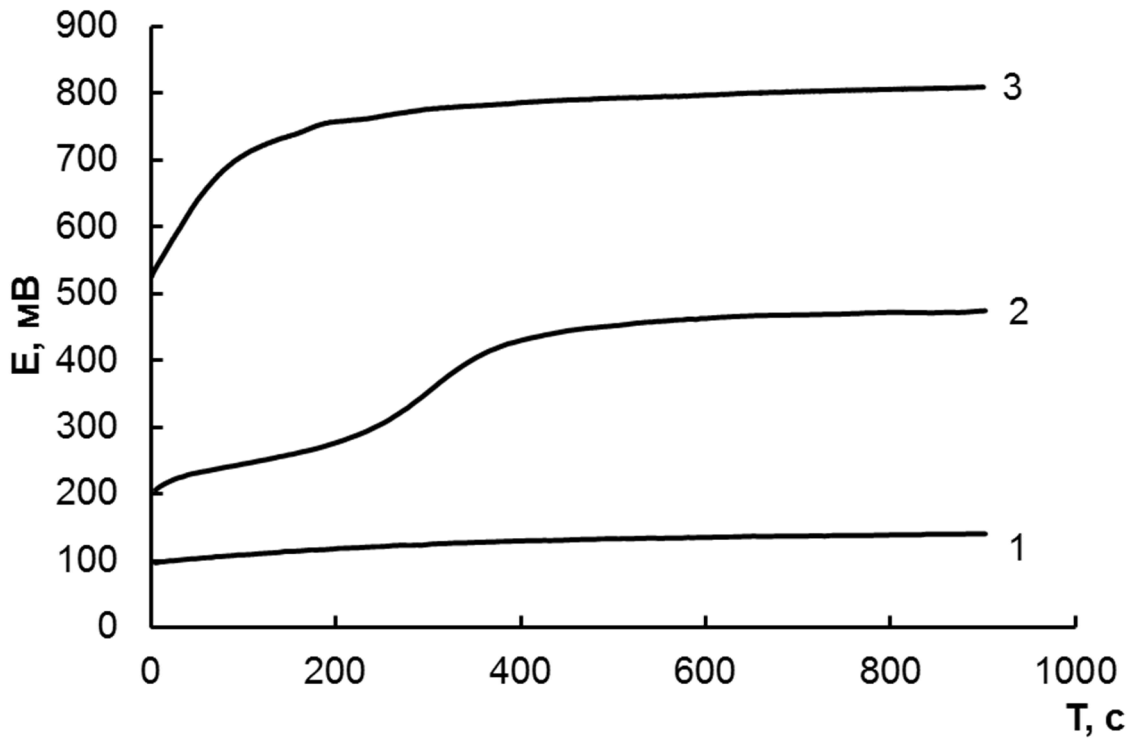


Рисунок 3.6 – Зависимость ПРЦ от времени в водном растворе: 1 – 0,1 М Na_2SO_4 , 2 – 0,1 М Na_2SO_4 + 2,1 мМ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$, 3 – 0,1 М Na_2SO_4 + 4,0 мМ NaClO .

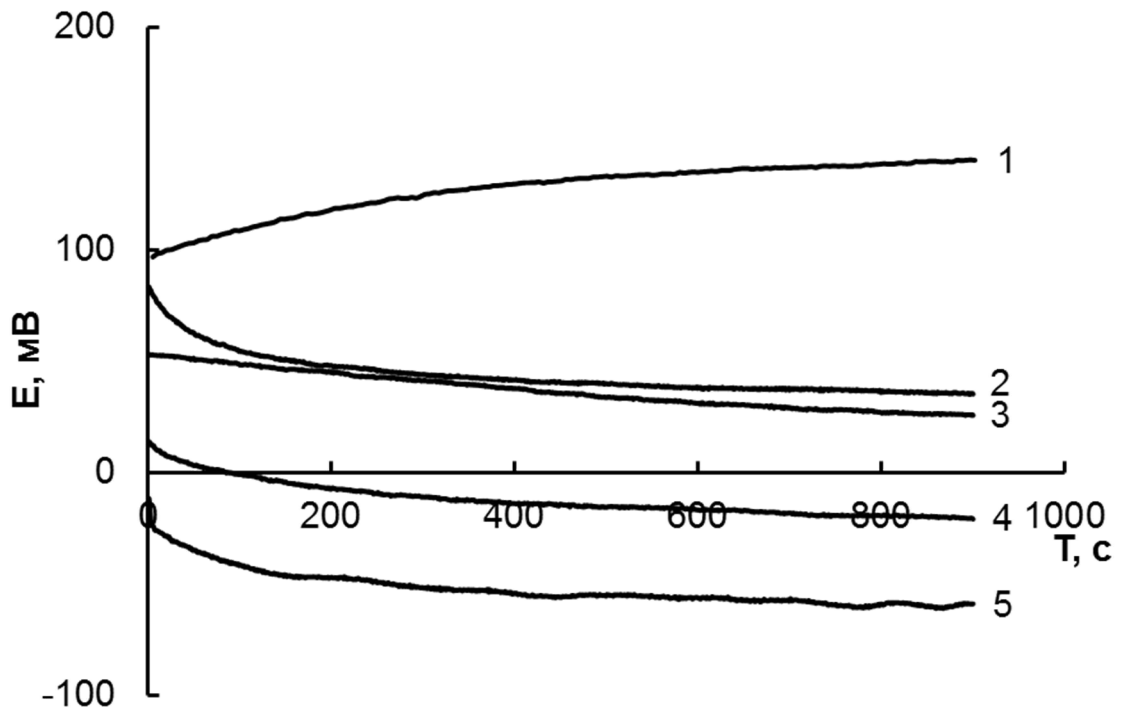


Рисунок 3.7 – Зависимость ПРЦ от времени от времени в водном растворе: 1 – 0,1 М Na_2SO_4 , 2 – 0,1 М Na_2SO_4 + 1 мМ аскорбиновой кислоты, 3– 0,1 М Na_2SO_4 + 1 мМ α -токоферола, 4 – 0,1 М Na_2SO_4 + 1 мМ инонола, 5 – 0,1 М Na_2SO_4 + 1 мМ кверцетин дигидрата.

3.1.3 Исследование потенциала при разомкнутой цепи в водно-белковых средах

Для оценки влияния компонентов биологической среды на ПРЦ платинового электрода было решено в качестве модели использовать растворы белков (альбумина и глобулина) в изотоническом физиологическом растворе (водный раствор 0,15 М NaCl) или растворе Хенкса, состоящем из хлористых, фосфорнокислых и сернокислых солей натрия, калия и магния, поскольку данные компоненты являются преобладающими в крови.

При добавлении к физиологическому раствору человеческого альбумина было обнаружено, что по мере увеличения содержания белка происходит смещение величин ПРЦ платинового электрода в отрицательную область (рис. 3.8).

Подобная картина наблюдается при добавлении к физиологическому раствору глобулина (рис. 3.9).

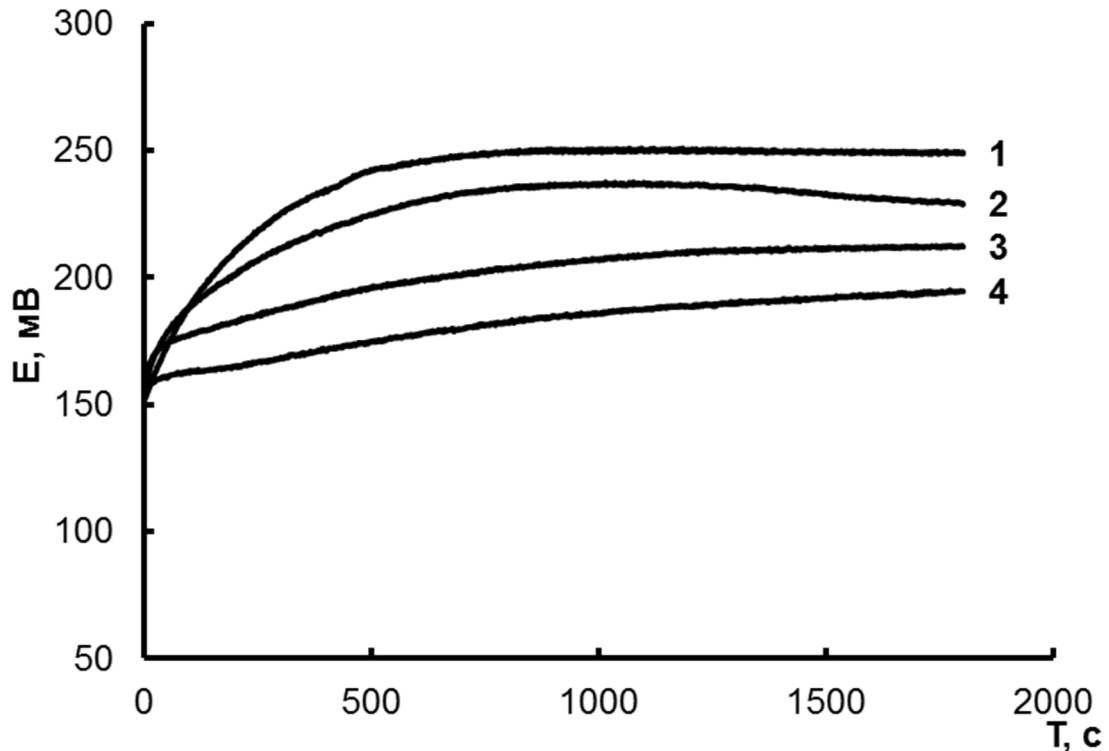


Рисунок 3.8 – Влияние альбумина на ПРЦ платинового электрода в 0,15 М NaCl. 1 – 0,15 М NaCl, 2 – 0,15 М NaCl + 1% альбумин, 3 – 0,15 М NaCl + 10% альбумин, 4 – 0,15 М NaCl + 20% альбумин.

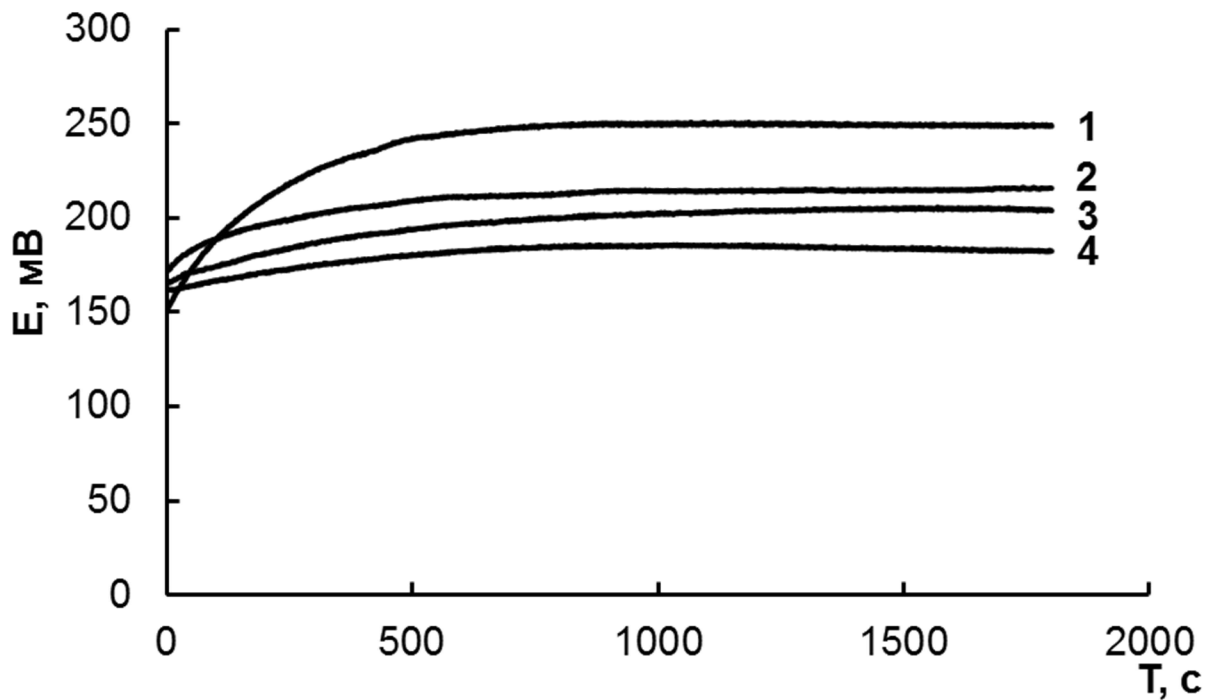


Рисунок 3.9 – Влияние глобулина на ПРЦ платинового электрода в 0,15 М NaCl. 1 – 0,15 М NaCl, 2 – 0,15 М NaCl + 3,125% глобулин, 3 – 0,15 М NaCl + 6,25% глобулин, 4 – 0,15 М NaCl + 12,5% глобулин.

Можно предположить, что обнаруженный эффект смещения величины ПРЦ платинового электрода может быть связан с адсорбцией альбумина и глобулина на поверхности платинового электрода. Подобные явления наблюдались в работах [102, 103].

Однако вид зависимости потенциала от времени растворов альбумина и глобулина отличаются от вида, характерного для сыворотки крови, состоящей, подобно нашим моделям, из водных растворов альбумина и глобулина и 0,15 М хлорида натрия: если в модельных растворах наблюдается изменение ПРЦ во времени, направленное в положительную область потенциалов до величины, соответствующей постоянному значению ПРЦ (рис. 3.8 и 3.9), то при измерениях ПРЦ в сыворотке крови (рис. 3.5) наблюдается изменение ПРЦ, направленное в отрицательную область потенциалов до величины, соответствующей постоянному значению ПРЦ. Более того, величины постоянных значений ПРЦ, измеренные в сыворотке крови, лежат в значительно более отрицательной области по сравнению с модельными растворами – разница составляет более 200 мВ.

Вероятно, этот эффект можно объяснить воздействием антиоксидантов, входящих в состав сыворотки крови. Это предположение было подтверждено с помощью исследования модельных растворов, модифицированных добавлением в них аскорбиновой кислоты в качестве антиоксиданта (рис. 3.10).

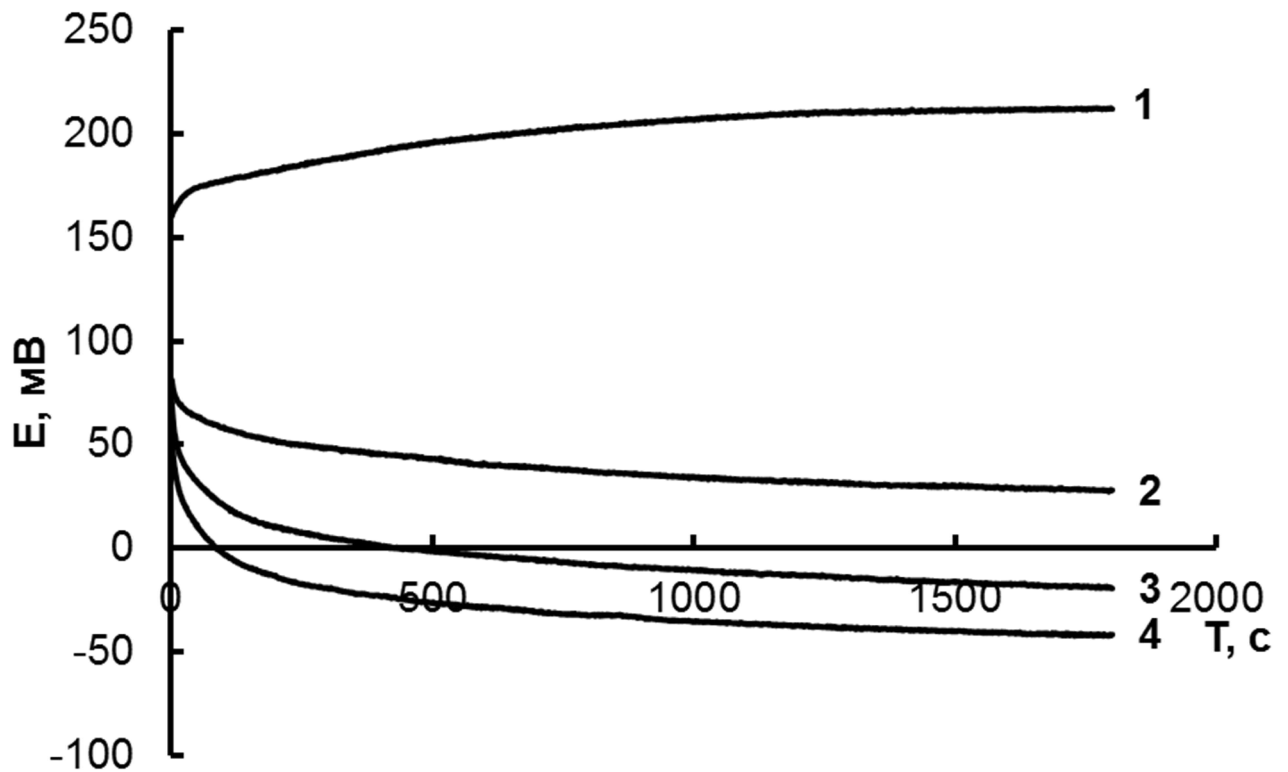


Рисунок 3.10 – Влияние аскорбиновой кислоты на ПРЦ платинового электрода в растворе, содержащем 0,15 М NaCl и 10% альбумин. 1 – фон, 2 – фон + 0,57 мМ аскорбиновой кислоты, 3 – фон + 1,70 мМ аскорбиновой кислоты, 4 – фон + 2,84 мМ аскорбиновой кислоты.

Как видно из этих данных, добавление аскорбиновой кислоты существенно изменило форму кривой. Кривая ПРЦ – время приобрела при добавлении антиоксиданта к раствору альбумина форму зависимости ПРЦ – время, полученной в реальной биологической среде (сыворотке крови) (рис. 3.5).

Таким образом, подтверждено предположение о том, что соотношение оксидантов и антиоксидантов в тестируемой биологической среде (кровь, сыворотка крови, плазма крови) является потенциалопределяющим фактором.

3.2 Измерение потенциала при разомкнутой цепи в крови, сыворотки крови и плазме крови

В качестве объектов исследования ПРЦ могут быть использованы такие биологические жидкости организма как кровь, сыворотка крови, плазма крови, пот, слюна, моча, спинномозговая жидкость. Однако, по-нашему мнению, наиболее информативным источником является кровь, сыворотка или плазма, в настоящей работе исследовались именно указанные биологические среды.

3.2.1 Измерение потенциала при разомкнутой цепи в цельной крови

Прежде всего, было проведено исследование в цельной крови, как наиболее простой в отношении пробоподготовки среды для анализа. Цельную кровь получали у 15 практически здоровых добровольцев (9 мужчин и 6 женщин) натошак с помощью вакуумной системы для забора крови, использовались пробирки с антикоагулянтом гепарином лития. Использование антикоагулянта вызвано необходимостью избежать свертывания крови во время измерения, которое составляло 30 мин.

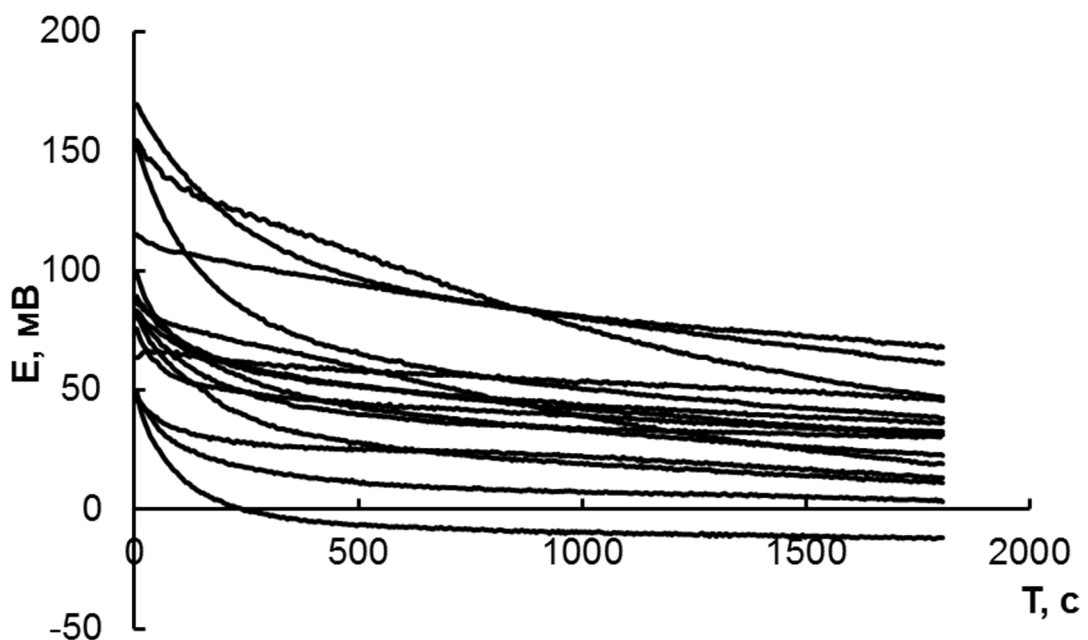


Рисунок 3.11 – Зависимость ПРЦ от времени в цельной крови практически здоровых людей ($n = 15$).

Из полученных данных, представленных на (рис. 3.11), видно, что для практически здоровых людей величины ПРЦ находятся в диапазоне $29,96 \pm 21,24$ мВ ($p \leq 0,05$).

Поскольку в процессе измерения ПРЦ в цельной крови происходило оседание форменных элементов крови (эритроцитов и лейкоцитов), что могло приводить к ошибкам измерений, в дальнейшем объектами исследований являлись плазма и сыворотка крови.

3.2.2 Измерение потенциала при разомкнутой цепи в сыворотке и плазме крови

Прежде всего, необходимо было выяснить влияние антикоагулянта на результаты измерения ПРЦ.

Сыворотка и плазма крови были получены из цельной крови 3 практически здоровых людей добровольцев (2 мужчин и 1 женщины). Время регистрации изменения ПРЦ в анализируемой среде составляло 15 мин.

При сравнении данных (табл. 3.3), полученных в сыворотке и плазме крови практически здоровых людей было обнаружено, что величины ПРЦ в данных средах имеют близкие значения. Поэтому был сделан вывод о возможности использовать для измерений ПРЦ обе среды.

Таблица 3.3 – Сравнение величин ПРЦ сыворотки и плазмы крови практически здоровых

№ пациента	ПРЦ сыворотки крови, мВ	ПРЦ плазмы крови, мВ
1	-39,649	-44,287
2	-33,654	-28,852
3	-41,315	-42,877

3.2.3 Анализ зависимостей потенциала при разомкнутой цепи в сыворотке крови

Сыворотку крови получали из цельной крови 63 практически здоровых людей добровольцев в возрасте 19-40 лет (46 мужчин, 17 женщин) Время регистрации изменения ПРЦ в анализируемой среде составляло 30 мин. Результаты представлены на рис. 3.12.



Рисунок 3.12 – Зависимость ПРЦ от времени в сыворотке крови практически здоровых людей ($n = 63$).

Анализ полученных данных показал, что у 70% исследованных практически здоровых добровольцев величина ПРЦ находится в диапазоне от -20 до -60 мВ (рис. 3.13).

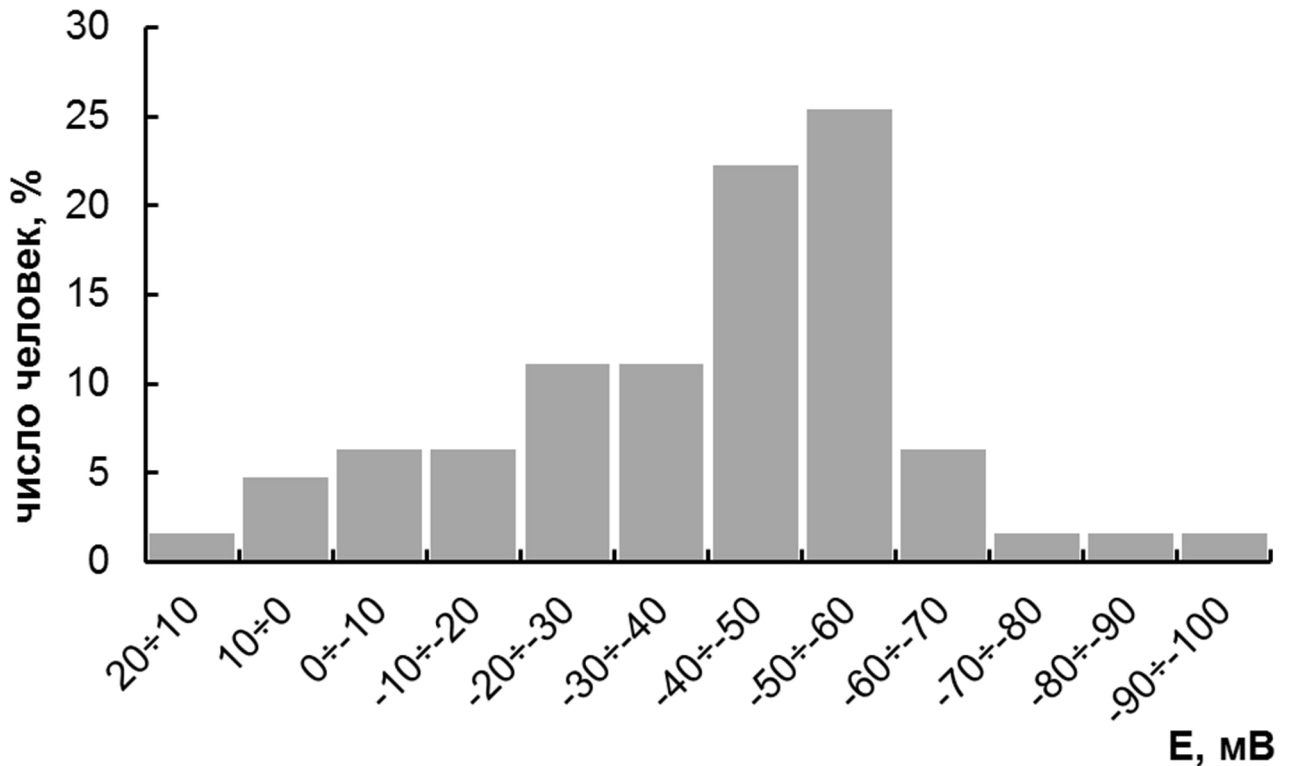


Рисунок 3.13 – Распределение величины ПРЦ платинового электрода в сыворотке крови практически здоровых людей (n = 63).

Для расчета средних значений измеренных величин ПРЦ и стандартного отклонения массив полученных данных был подвергнут статистической обработке. Доверительный интервал, соответствующий группе практически здоровых людей, составил $-33,743 \pm 22,471$ мВ. Также было обнаружено, что при разделении практически здоровых людей на группы по характеристикам (группа крови, резус фактор, пол) диапазон варьируется незначительно (рис. 3.14).

В связи с тем, что 70% из группы практически здоровых людей находится в диапазоне величин потенциала при разомкнутой цепи от -60 до -20 мВ (рис. 3.13), было решено использовать указанный диапазон в качестве доверительного интервала.

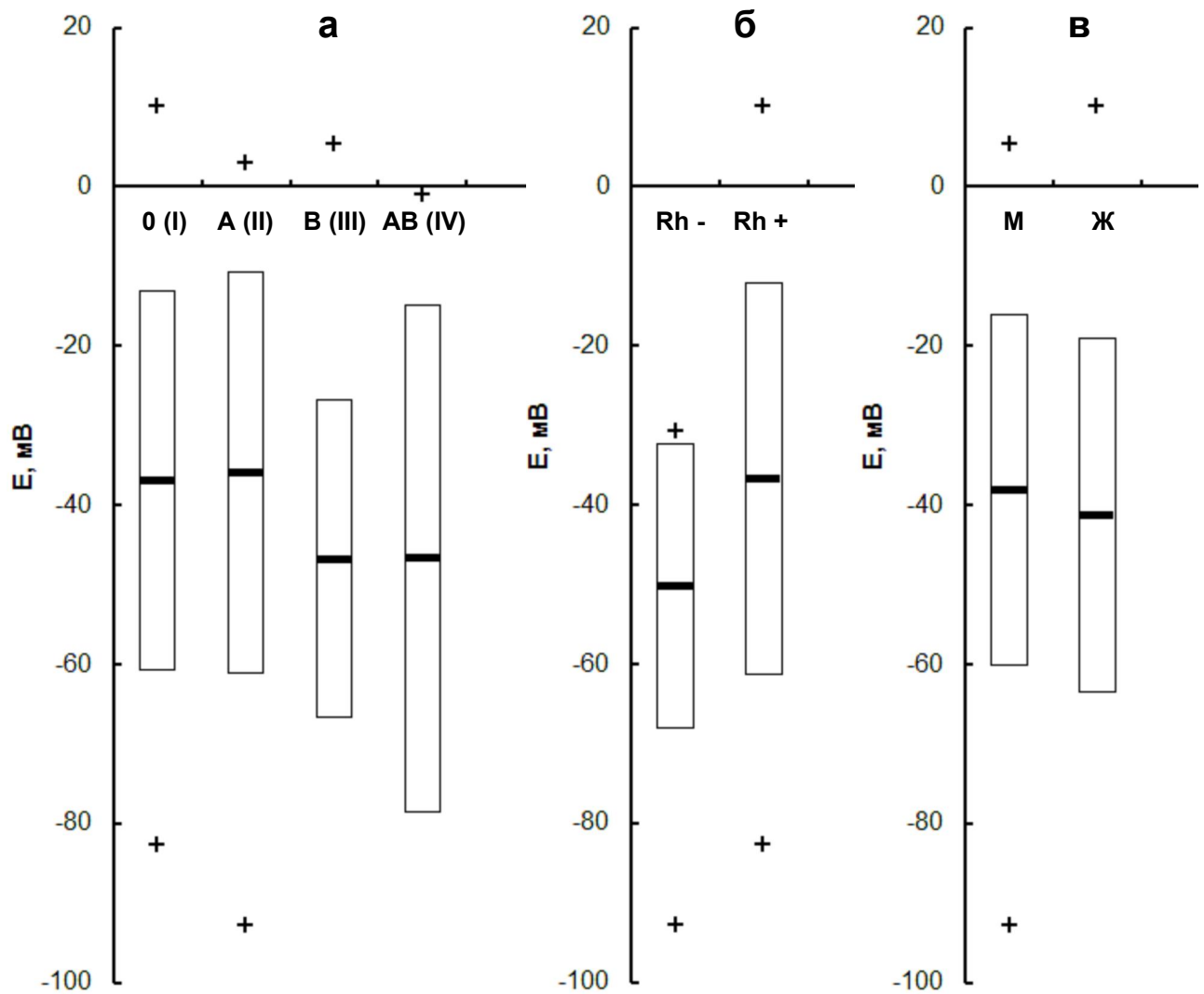


Рисунок 3.14 – Интервалы значений ПРЦ практически здоровых людей в зависимости от группы крови (а), резус фактора (б) и пола (в). + – экстремальные значения в группе.

При подборе простейшей зависимости, описывающей экспериментальные кривые, наилучшее приближение получили с помощью функции вида:

$$E = a \cdot \lg T + b \quad (3.5)$$

Оказалось, что при использовании всего временного интервала (0÷1800 сек), в начальный момент наблюдается значительное отклонение расчетной величины ПРЦ платинового электрода от экспериментальной (рис. 3.15), что вероятно связано с высокой долей нестационарности процесса при

погружении электрода в биологическую среду. Поэтому было решено использовать диапазон времени 60÷1800 сек.

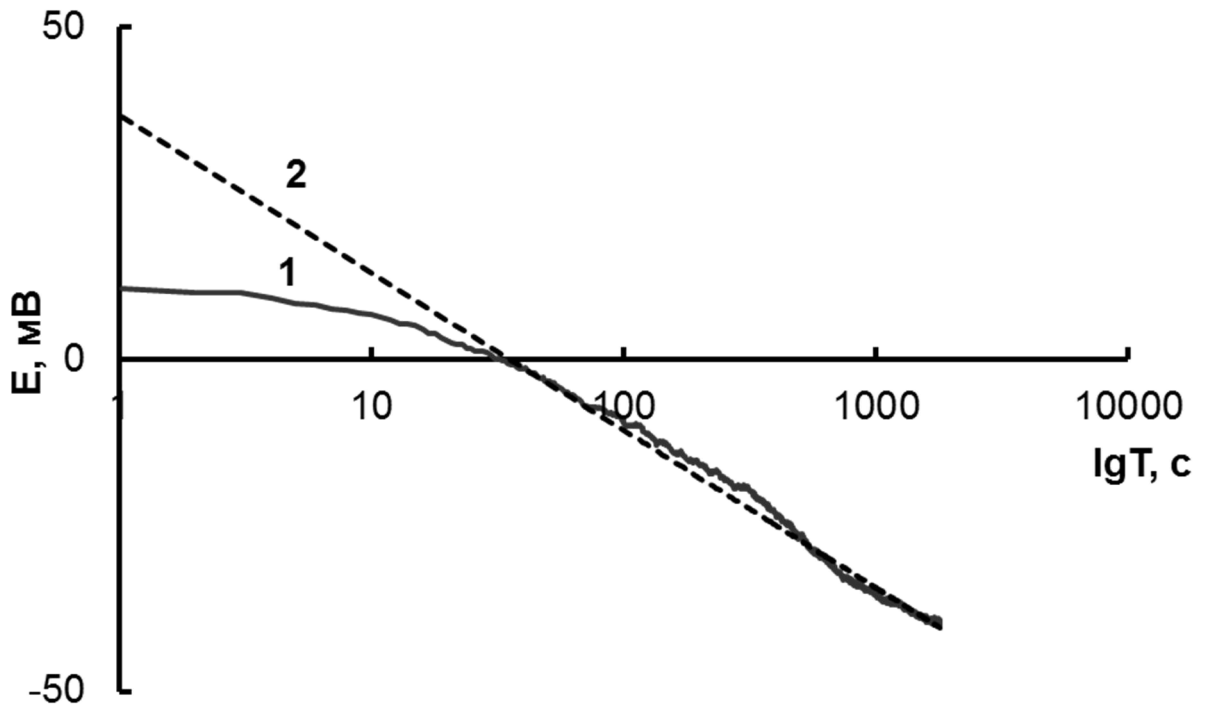


Рисунок 3.15 – Отличие экспериментальной (1) и расчетной (2) зависимостей ПРЦ от времени.

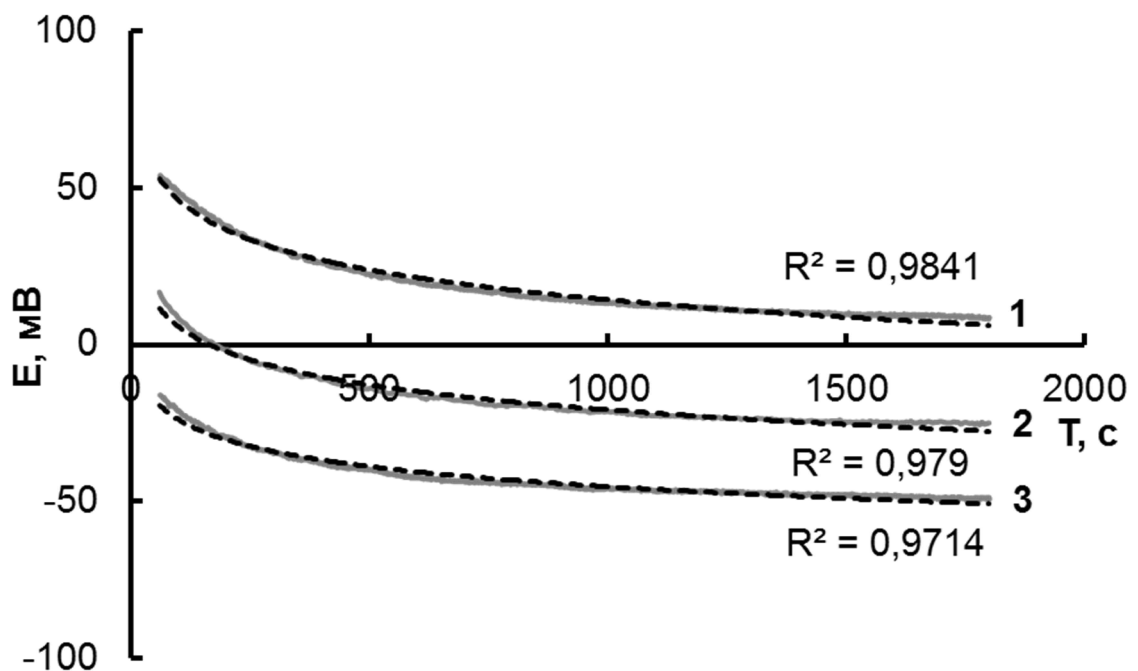


Рисунок 3.16 – Примеры линий трендов для практически здоровых людей.

На примерах сравнения линий трендов зависимости ПРЦ – время трех практически здоровых людей (рис. 3.16) было показано, что расчетная зависимость в большинстве случаев приближается к экспериментальной с вероятностью более 95%.

Полученные данные позволили построить зависимость коэффициента a в уравнении (3.5) от разницы в значениях величины ПРЦ платинового электрода в начальной точке (60 сек) и конечной точке (1800 сек) (рис. 3.17). Анализ данного массива точек показал, что имеется возможность отбросить экстремальные значения (область за пунктирными линиями на рис. 3.17). Таким образом, в конечном массиве данных осталось 59 точек.

Было рассчитано стандартное отклонение для коэффициента a и $\Delta(60-1800)$.

Таким образом, доверительные интервалы составили: $-10,496 \pm 2,619$ для коэффициента a и $37,243 \pm 10,006$ для $\Delta(60-1800)$, мВ.

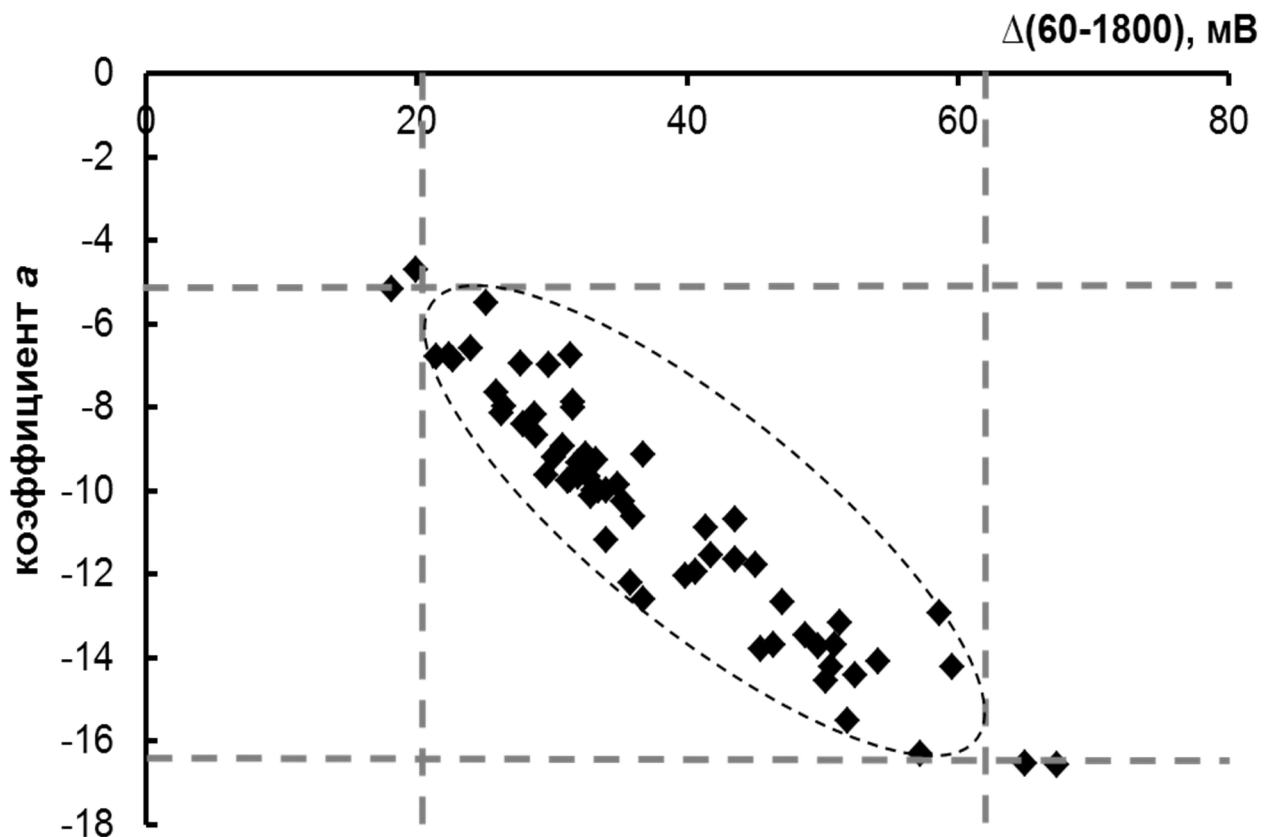


Рисунок 3.17 – Зависимость коэффициента a от $\Delta(60-1800)$ для группы практически здоровых людей.

Таким образом, исследование и анализ данных величин ПРЦ платинового электрода в сыворотке крови у группы практически здоровых людей позволил получить доверительные интервалы для значений ПРЦ, коэффициента a уравнения кривой, описывающей зависимость ПРЦ от времени, и $\Delta(60-1800)$. Эти данные могут быть использованы в качестве контрольных для анализа результатов, полученных при исследовании пациентов с различными патологиями.

3.3 Применение измерения потенциала при разомкнутой цепи в клинической практике

Наибольший интерес представляло применение предложенной методики измерения величин ПРЦ биологических сред в клинической практике. Величина ПРЦ является интегральным показателем, отражающим состояние баланса про- и антиоксидантов в организме, в то же время известно, что большинство острых патологических состояний различной этиологии сопровождаются ишемическими нарушениями органов и тканей [314-316], что должно сказываться на величине ПРЦ. В соответствии с этими соображениями для исследования влияния патологических состояний на величину ПРЦ и ее изменение при мониторинге ПРЦ в процессе лечения пациента были выбраны группы пациентов, указанные в главе 2.

3.3.1 Исследование пациентов с острой церебральной патологией

При исследовании данной группы пациентов было обнаружено различие в величинах ПРЦ в сыворотки крови до и после проведения сеанса ГБО (рис. 3.18). Как правило, после проведения сеанса ГБО ПРЦ в сыворотке крови смещается в сторону более отрицательных значений потенциала (рис. 3.18, кривые 1', 2', 4').

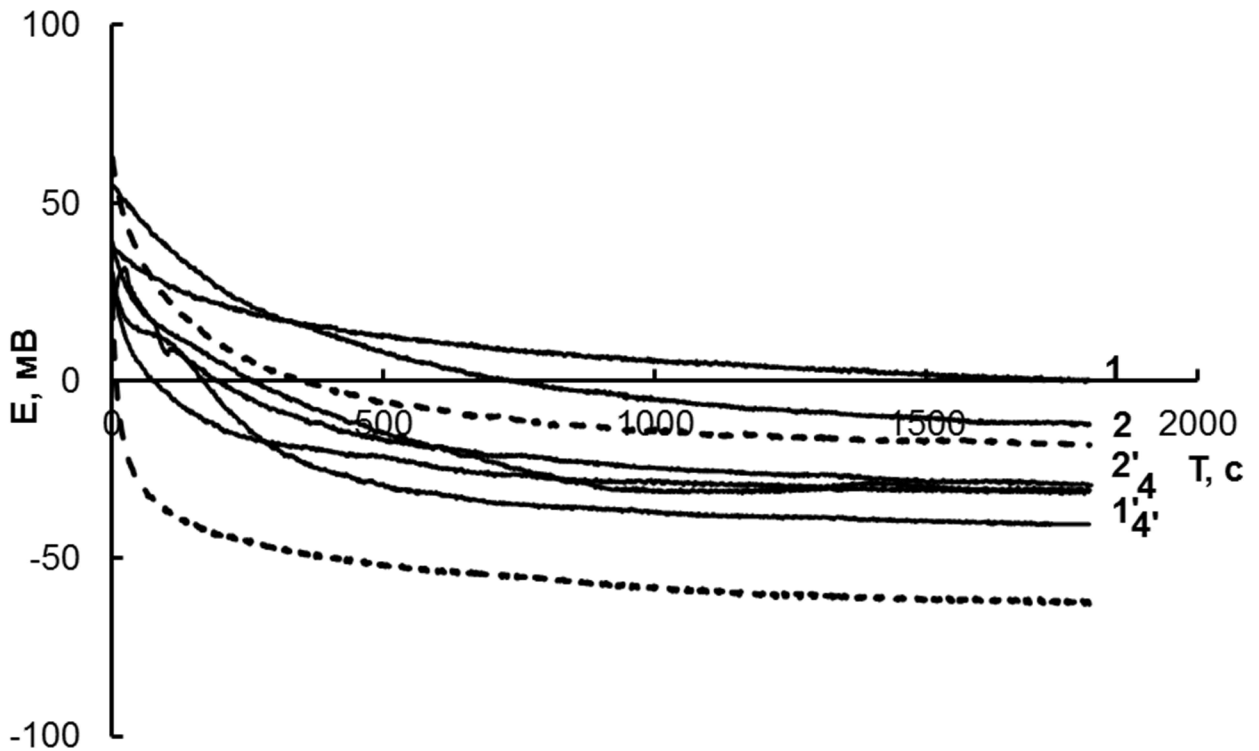


Рисунок 3.18 – Пациент Т., 28 лет. Зависимость ПРЦ в сыворотке крови от времени до (1,2,4) и после (1',2',4') сеанса лечения методом гипербарической оксигенации. Диагноз: клипирование левой внутренней сонной артерии. Область между пунктирными линиями – диапазон величин ПРЦ, характерных для практически здоровых людей.

Динамика изменения величины ПРЦ пациентов с острой церебральной патологией в процессе их лечения выявила, что лечение методом ГБО приводит к смещению величин ПРЦ в сыворотке крови в область потенциалов, характерных для практически здоровых людей, что может говорить о выравнивании баланса между про- и антиоксидантными свойствами крови. Эти данные представлены на (рис. 3.19–3.23)

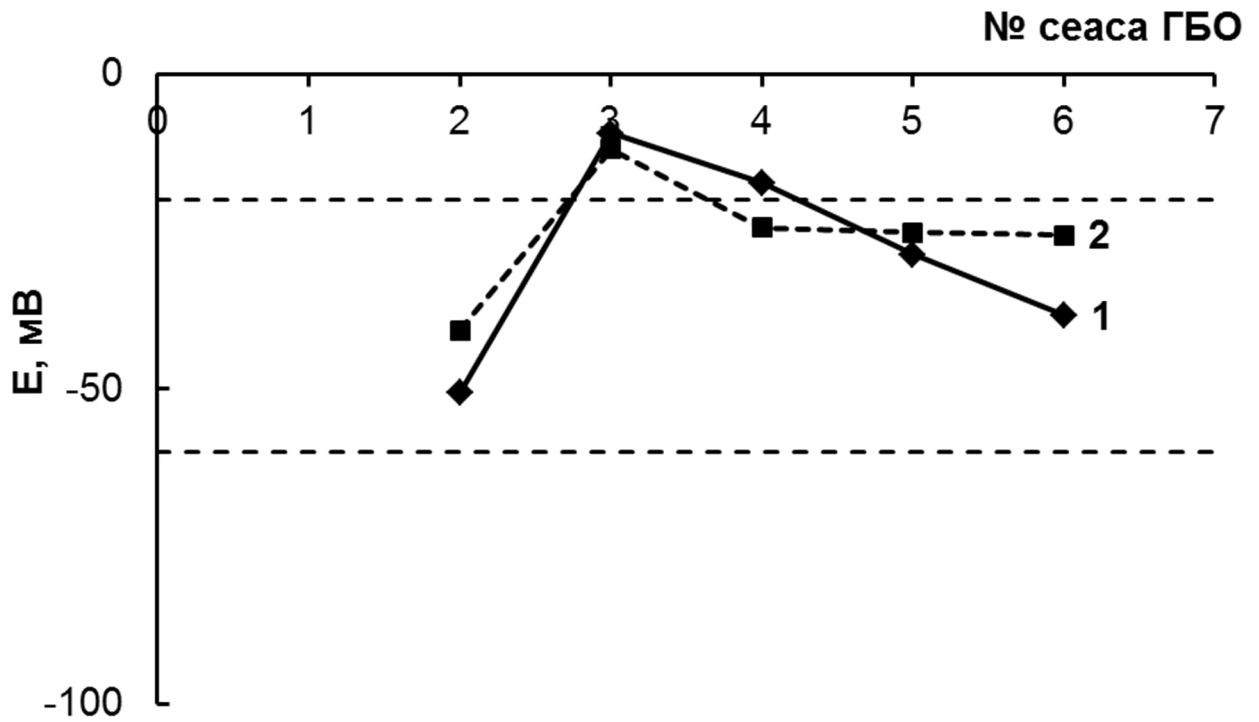


Рисунок 3.19 – Пациент К., 67 лет. Динамика изменения ПРЦ сыворотки крови по мере проведения лечения. Диагноз: клипирование множественных интракраниальных аневризм.

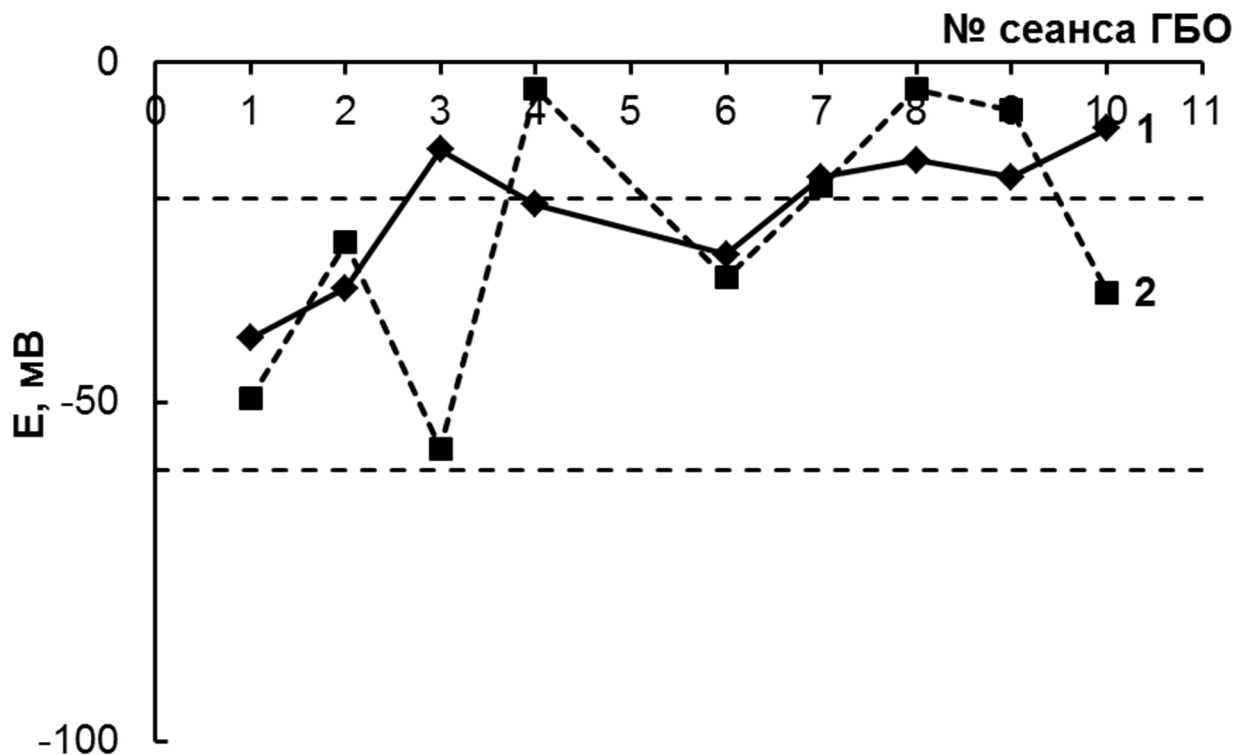


Рисунок 3.20 – Пациент Ц., 45 лет. Динамика изменения ПРЦ сыворотки крови по мере проведения лечения. Диагноз: удаление субдуральной и внутримозговой гематом левой височной доли.

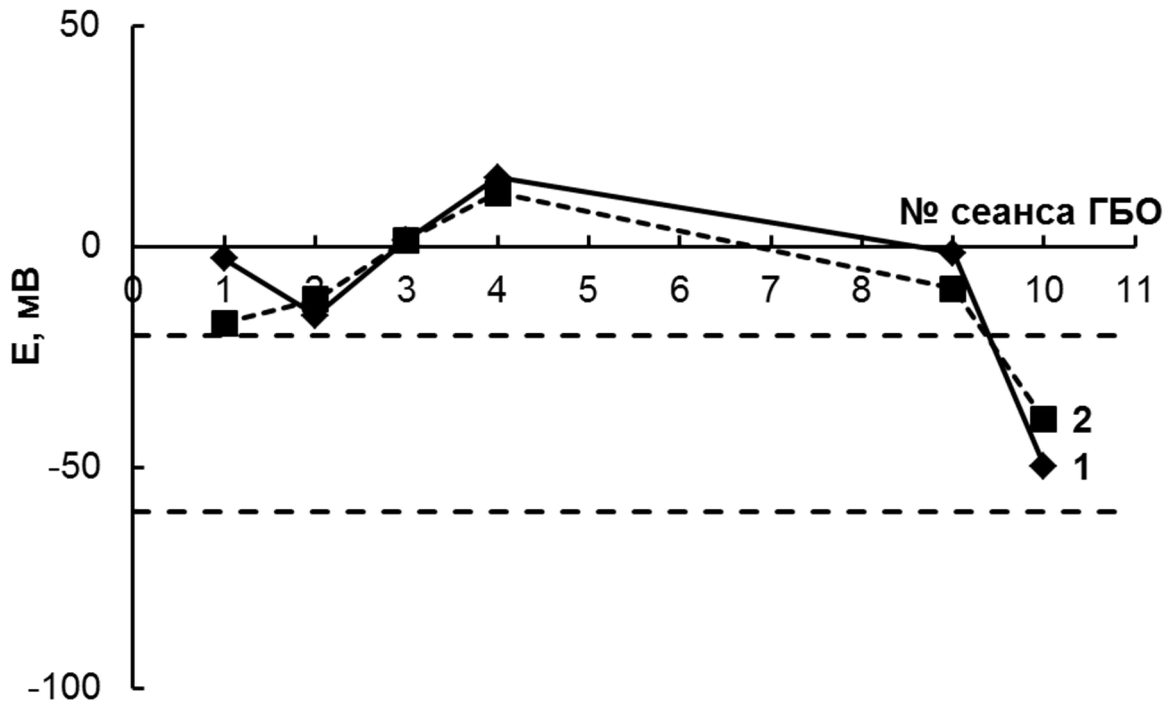


Рисунок 3.21 – Пациент Н., 40 лет. Динамика изменения ПРЦ сыворотки крови по мере проведения лечения. Диагноз: удаление внутримозговой гематомы и очага ушиба левой височной доли.

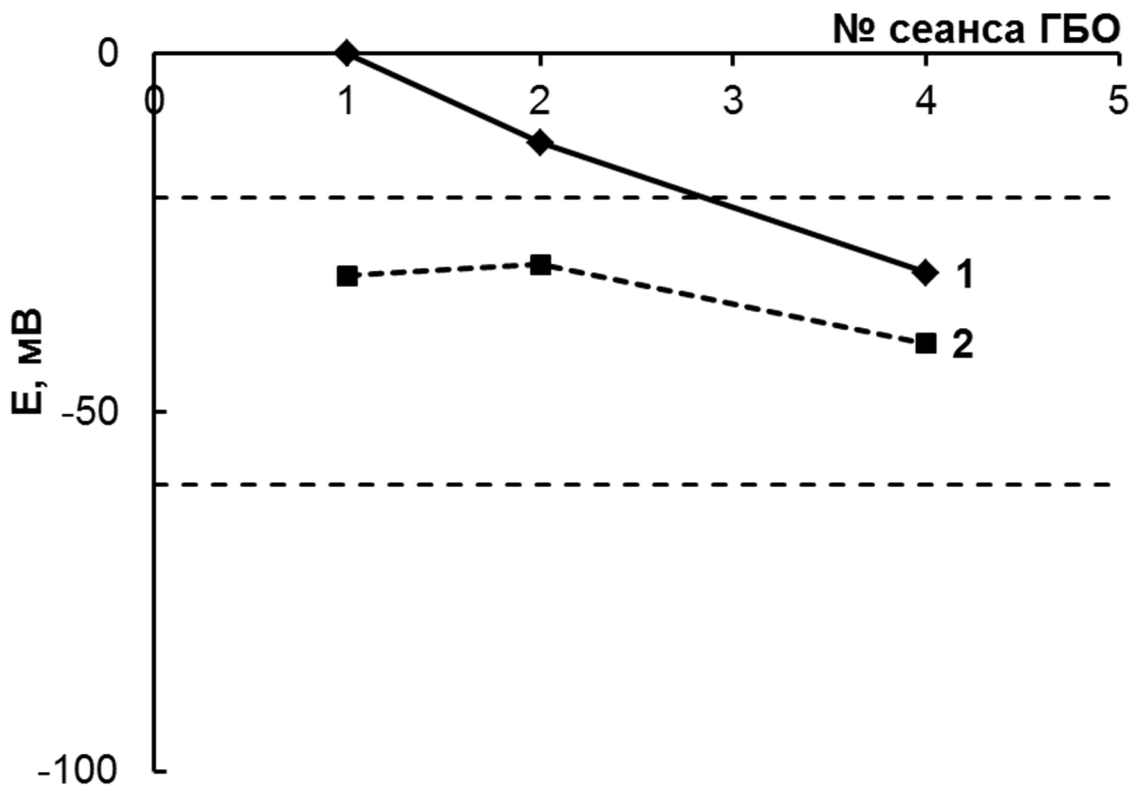


Рисунок 3.22 – Пациент Т., 28 лет. Динамика изменения ПРЦ сыворотки крови по мере проведения лечения. Диагноз: клипирование левой внутренней сонной артерии.

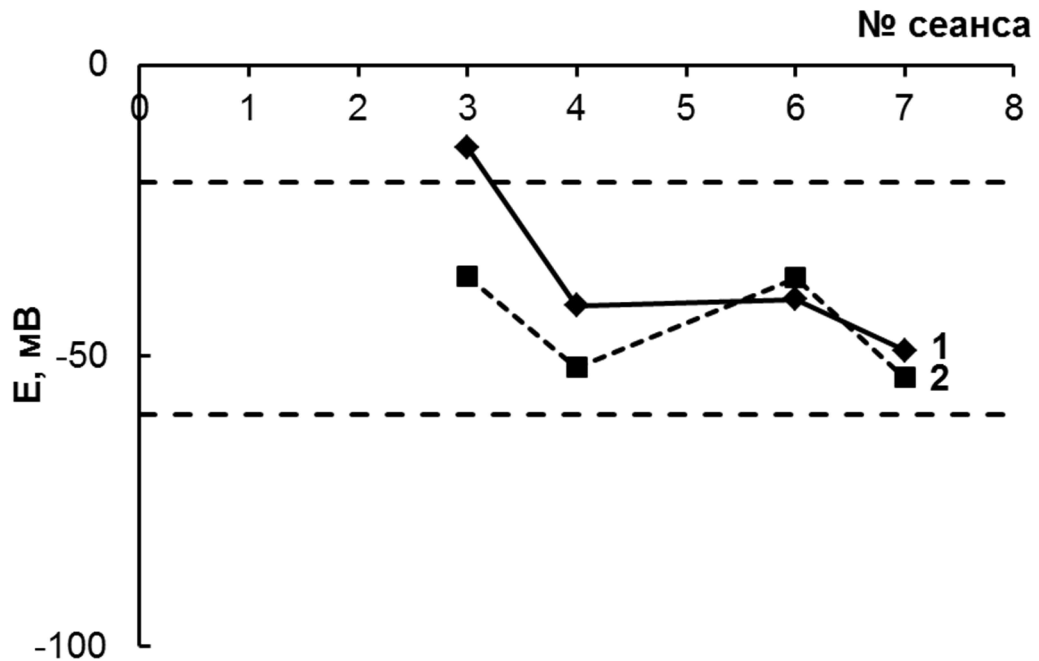


Рисунок 3.23 – Пациент А., 26 лет. Динамика изменения ПРЦ сыворотки крови по мере проведения лечения. Диагноз: клипирование аневризмы.

Таким образом, исследование пациентов с острой церебральной патологией показало, что величины ПРЦ этой группы смещены в область положительных значений по сравнению с группой практически здоровых людей. Этот факт говорит о повышенном содержании АФК у этих пациентов (то есть о смещении равновесия прооксиданты/антиоксиданты в сторону прооксидантов). Также было установлено, что лечение методом ГБО приводит к смещению величин ПРЦ в отрицательную область, то есть после сеансов ГБО величины РП плазмы крови больных с острой церебральной патологией сближаются с областью потенциалов, характерной для здоровых людей. Как видно из данных, представленных на рис. 3.18 измеренные величины после сеанса ГБО находятся в области от -23 мВ до -36 мВ, что соответствует диапазону РП группы практически здоровых людей.

Обнаруженный нами факт сдвига величин РП свидетельствует о нормализации равновесия окислительно-восстановительной системы гомеостаза вследствие лечения методом ГБО. На первый взгляд факт смещения величины ПРЦ в отрицательную область в результате лечения пациента методом ГБО вызывает удивление. Казалось бы, пребывание пациента с повышенным

количеством АФК в камере с избыточным парциальным давлением кислорода должно приводить к увеличению парциального давления кислорода в крови, что, в свою очередь должно повысить уровень АФК в крови. Полученные нами данные о смещении величины ПРЦ в отрицательную область потенциалов говорят об обратном – снижении уровня АФК в крови пациента. Это противоречие снимается, если учесть данные, полученные в работе [317]. В этом исследовании на экспериментальной модели ишемии мозга у животных, получавших ГБО, обнаружили его нейропротективное действие, доказав отсутствие усиления ПОЛ.

Эти экспериментальные данные подтверждают результаты, полученные в настоящей работе. Следовательно, можно предположить, что в результате проведения ГБО при повышении содержания в организме содержания кислорода активизируется выработка антиоксидантов, которые должны ликвидировать избыток АФК в организме.

Данное предположение было проверено с помощью измерения антиоксидантной активности сыворотки крови хемилюминесцентным методом [318]. Как видно из данных, представленных на (рис. 3.24), динамика изменения ПРЦ совпадает с динамикой изменения антиоксидантной активности, что подтвердило наше предположение об иницировании продуцирования антиоксидантов с помощью лечения методом ГБО.

Увеличение антиоксидантной активности в организме пациента должно приводить к снижению уровня эндогенной интоксикации организма поскольку детоксикационный эффект ГБО хорошо известен и не вызывает сомнений [319-321]. Действительно, сопоставление изменения ПРЦ (рис. 3.19) и изменение токсичности сыворотки крови пациента до и после сеанса ГБО (рис. 3.25) выявило корреляцию между указанными величинами. Это наблюдение может быть использовано для разработки теста на токсичность крови с помощью измерения величины ПРЦ.

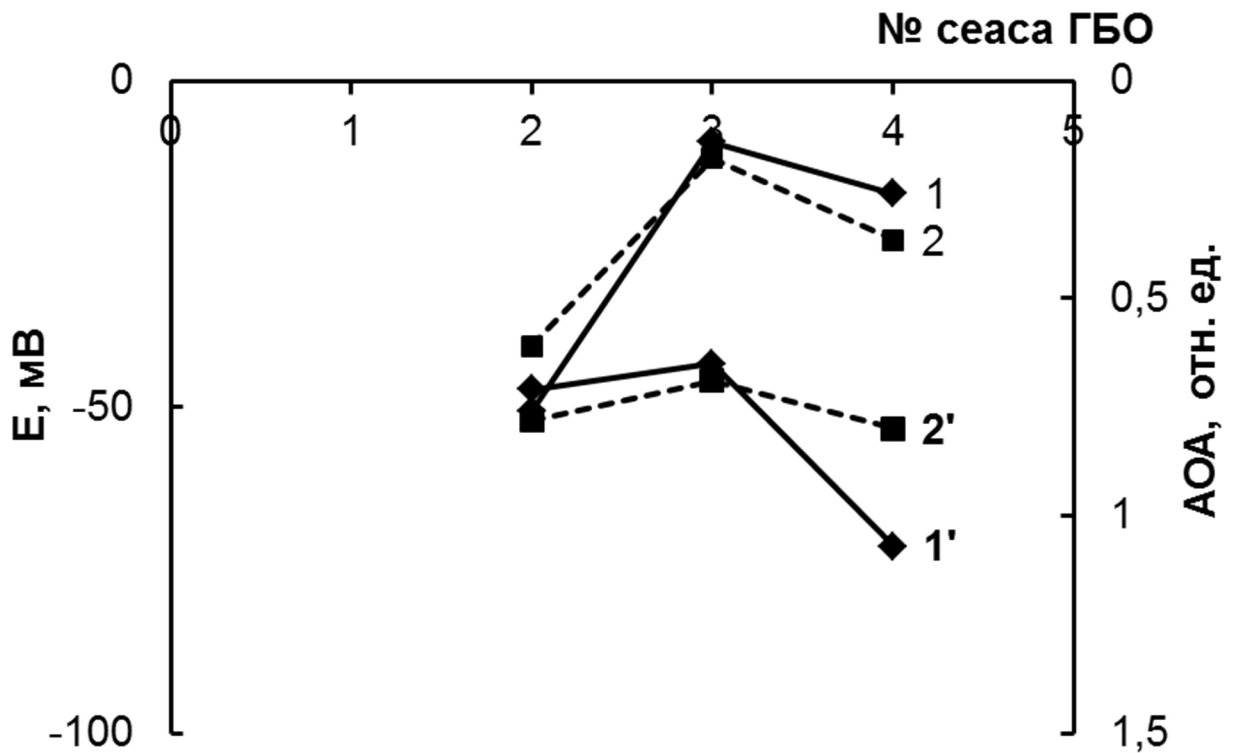


Рисунок 3.24 – Пациент К., 67 лет. Динамика изменения ПРЦ (1,2) и уровня антиоксидантов сыворотки крови (1',2').

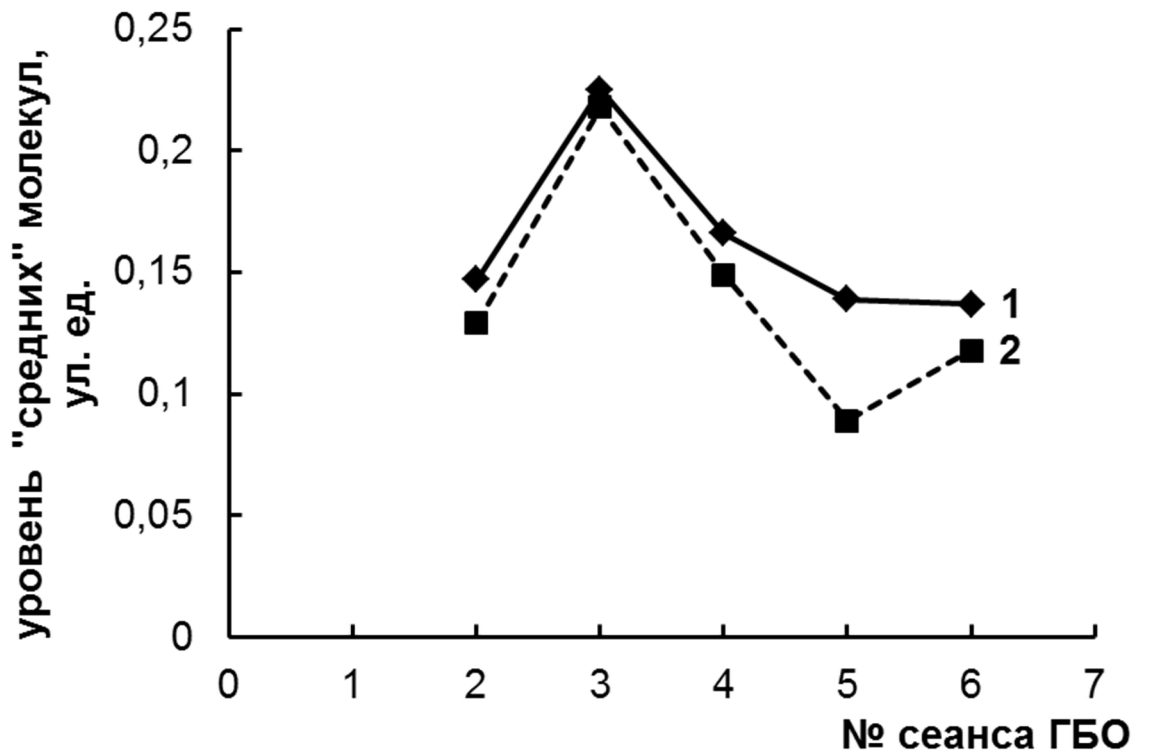


Рисунок 3.25 – Пациент К., 67 лет. Динамика изменения уровня среднемолекулярных пептидов.

На основании данных по исследованию ПРЦ в сыворотке крови пациентов с острой церебральной патологией были показаны возможности использования метода измерения ПРЦ платинового электрода в сыворотке крови для оценки состояния пациентов с острой церебральной патологией и оценки эффективности ГБО, а также в качестве одного из критериев индивидуального подбора адекватных режимов проведения ГБО.

3.3.2 Исследование пациентов с острыми септическими состояниями

У пациентов данной группы на фоне острого септического состояния может развиваться гипоксия, дисфункция органов и систем, в том числе полиорганная недостаточность, нарушение иммунного ответа организма и многое другое. В связи с этим стоит ожидать нарушения баланса про- и антиоксидантных систем организма. Более того, анализируя связи перечисленных выше основных осложнений септических состояний, можно предсказать, что нарушение баланса окислительно-восстановительного компонента системы гомеостаза будет направлено в сторону увеличения удельного веса окислительной составляющей. Поэтому у пациентов с септическими состояниями следует ожидать эффекта смещения величины ПРЦ в положительную область по сравнению с областью величин ПРЦ у здоровых людей.

Действительно, исследование пациентов данной группы показало, что величины ПРЦ смещены в положительную область по сравнению с практически здоровыми людьми (рис. 3.26).

Исследование зависимостей величины ПРЦ в сыворотке крови от времени у септических пациентов позволило обнаружить весьма необычный вид этих зависимостей, характеризующийся либо существенным отклонением от теоретической линии тренда, рассчитанной по уравнению (3.6) (рис. 3.26, кривая 1), либо наличием волнообразных участков на кривой (рис. 3.26, кривые 2, 3). Мониторинг зависимостей величин ПРЦ от времени по мере лечения септических пациентов показал, что волнообразные участки

начинают сглаживаться и исчезают со временем, а вид указанной зависимости приближается к обычному виду для практически здоровых людей (рис. 3.27–3.29).

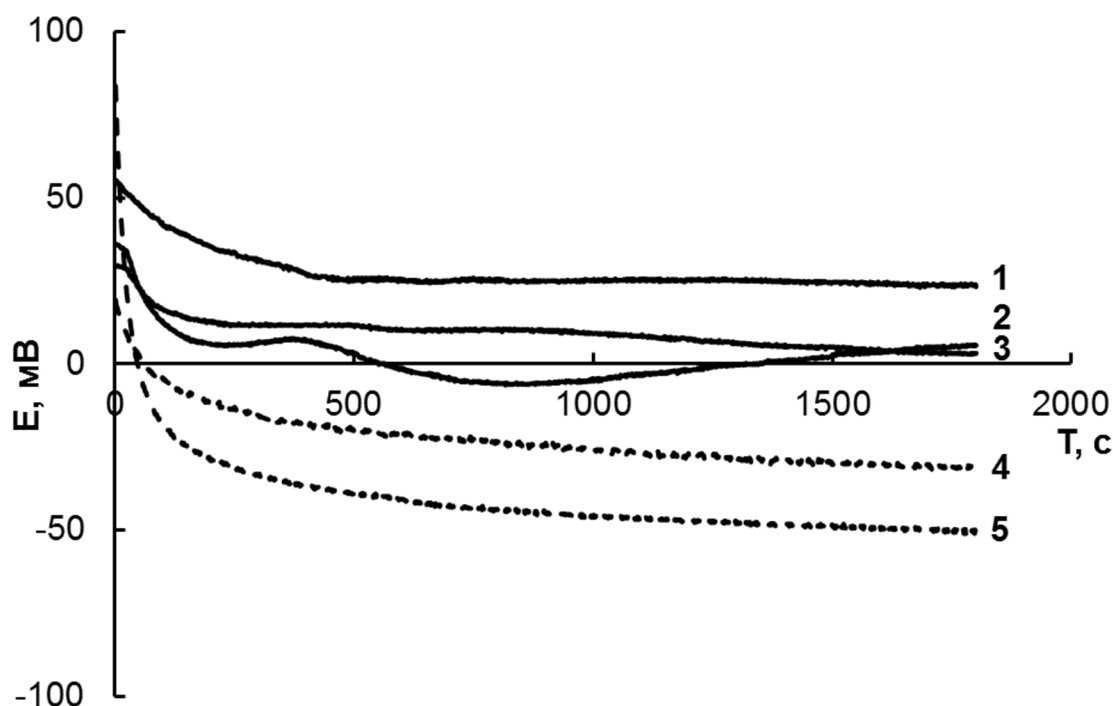


Рисунок 3.26 – Зависимость ПРЦ от времени в сыворотке крови пациентов с острым септическим состоянием (1–3) и практически здоровых людей (4,5).

Мы предположили, что появление волнообразных участков связано с образованием нейтрофилами активных форм кислорода (O_2^- , HO^{\cdot} , H_2O_2 , OCl^{\cdot} , OBr^{\cdot} , OI^{\cdot} , $OSCN^{\cdot}$) и метаболитов азота (NO , NO_2^- , NO_3^- , $ONOO^-$) во время кислородно-метаболического взрыва при взаимодействии с патогенными микроорганизмами [322]. В ходе данного процесса у поверхности электрода повышается концентрация короткоживущих окислителей, которые вступают во взаимодействие с антиоксидантами. Этот нестационарный процесс в тестируемом растворе, вероятно, является причиной наблюдаемых нами нестационарных колебаний потенциала платинового электрода: образование короткоживущих окислителей приводит к смещению ПРЦ в положительную область, тогда как нейтрализация указанных частиц компонентами антиоксидантной системы приводит к смещению ПРЦ в обратную сторону.

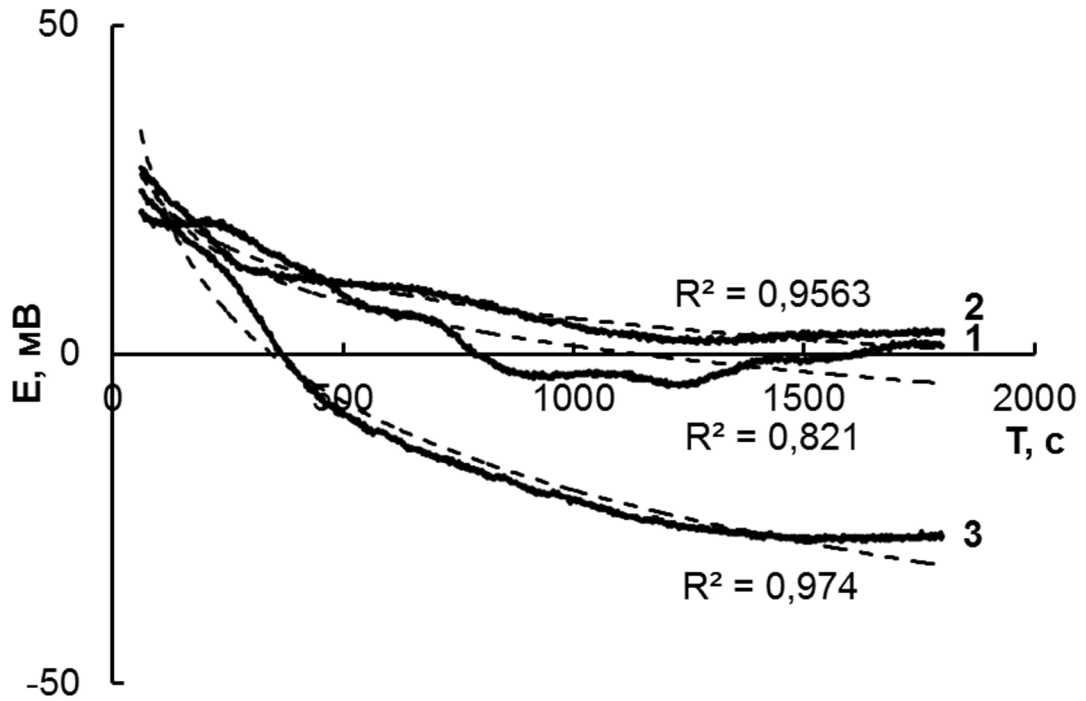


Рисунок 3.27 – Пациент Н., 53 года. Зависимость ПРЦ в сыворотке крови от времени. 1 – 1 сутки, 2 – 9 сутки, 3 – 16 сутки.

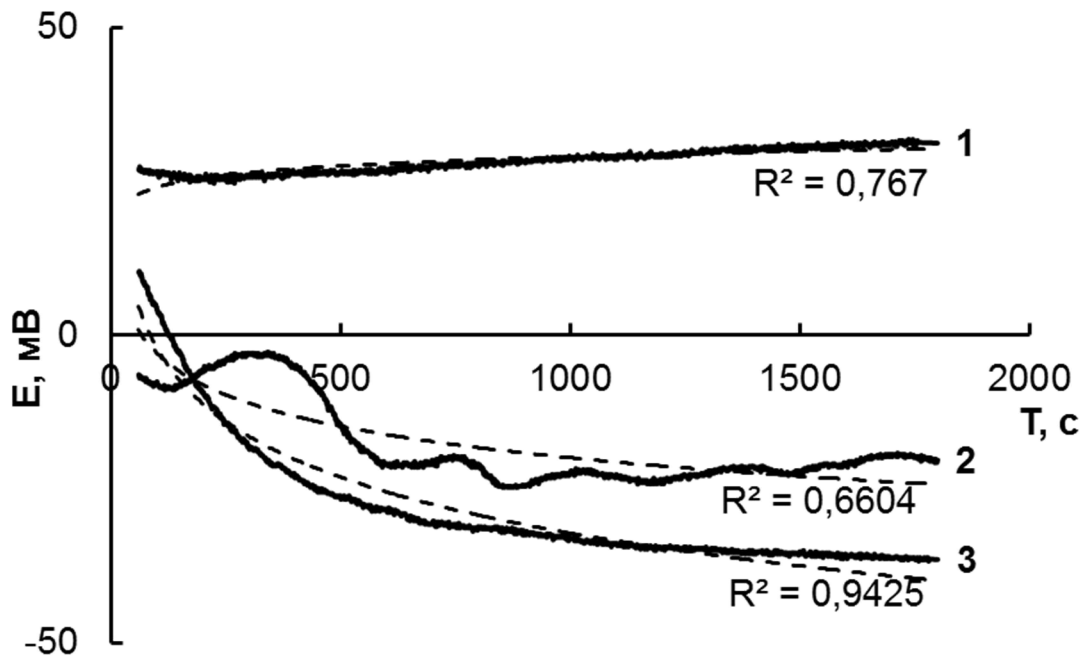


Рисунок 3.28 – Пациент С., 39 лет. Зависимость ПРЦ в сыворотке крови от времени. 1 – 1 сутки, 2 – 15 сутки, 3 – 24 сутки.

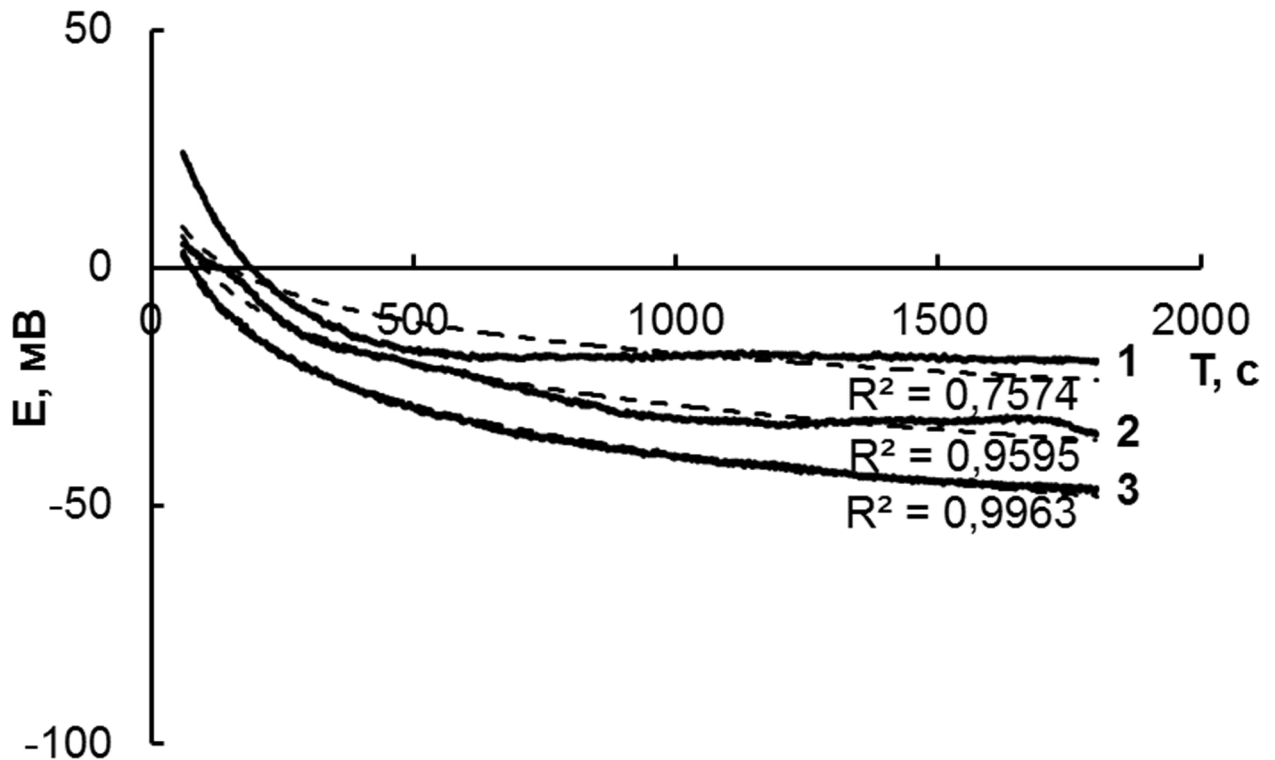


Рисунок 3.29 – Пациент К., 34 года. Зависимость ПРЦ в сыворотке крови от времени. 1 – 1 сутки, 2 – 13 сутки, 3 – 29 сутки.

Таким образом, волнообразный характер зависимостей величин ПРЦ от времени и отклонение этих зависимостей от теоретической линии тренда, рассчитанной по уравнению, описывающему указанные зависимости у практически здоровых людей, предлагается использовать в качестве диагностического критерия септических состояний.

Кроме того, мониторинг ПРЦ в сыворотке крови в процессе лечения может позволить оценить эффективность применяемой пациенту терапии.

3.3.3 Исследование пациентов с трансплантированными органами

Группа пациентов с трансплантированными печенью, почкой и легкими в раннем послеоперационном периоде после трансплантации была исследована, поскольку у этих пациентов, подобно исследованным ранее с острыми черепно-мозговыми травмами и септическими состояниями, можно было ожидать изменений величины ПРЦ платинового электрода в плазме или сыворотке крови.

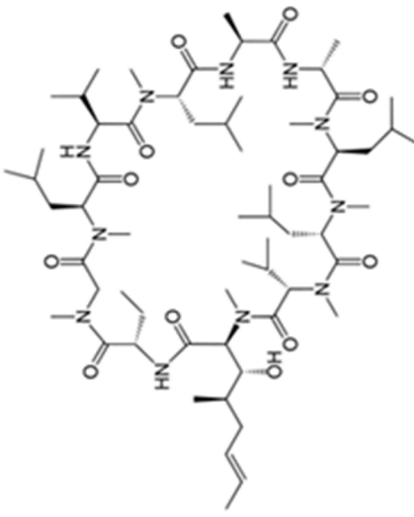
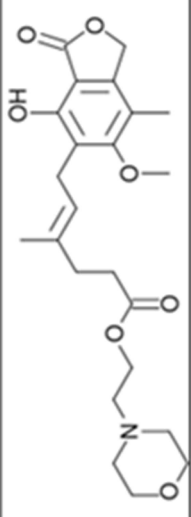
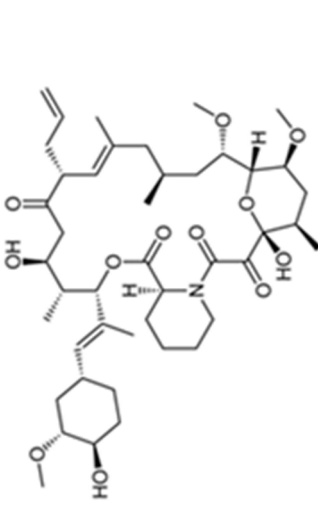
Такой прогноз имел большие шансы осуществиться, так как при трансплантации органов высока вероятность возникновения ишемии трансплантированного органа. Кроме того, чтобы избежать отторжения трансплантированного органа, пациенты получают терапевтическое медикаментозное лечение иммуносупрессивными препаратами. Действие этих препаратов заключается в подавлении иммунитета организма, то есть тесно связано со значительными изменениями равновесия про- и антиоксидантов [323].

Для выяснения влияния собственно препаратов на зависимость величины ПРЦ от времени и непосредственно на величину ПРЦ в средах, содержащих иммуносупрессоры, было предпринято исследование зависимости ПРЦ – время. В настоящее время в качестве иммуносупрессоров используют глюкокортикоиды, а также препараты на основе циклоспорина, микофенолата мофетила и такролимуса. Сводные данные по этим препаратам веществам приведены в таблице 3.4.

Нами были проведены исследования влияния добавок препаратов Сандиммун[®] Неорал[®] (циклоспорин, «Novartis Pharma», Швейцария) и CellCept (микофенолата мофетил, «Roche», Швейцария). Указанные препараты растворяли в физиологическом растворе, при этом концентрация иммуносупрессора в растворе составляла 0,5 мг/мл для Сандиммун[®] Неорала[®] и 2,5 мг/мл для CellCept. Затем указанные концентрированные растворы разбавляли физиологическим раствором либо плазмой крови в соотношении 1:5, таким образом получали концентрации препаратов в растворе 0,1 мг/мл для Сандиммун[®] Неорала[®] и 0,5 мг/мл для CellCept.

При добавлении иммуносупрессоров к физиологическому раствору (рис. 3.30) отмечается смещение ПРЦ в сторону более отрицательных значений потенциала (около 84 мВ в обоих случаях).

Таблица 3.4 – Данные по иммуносупрессорам

№	Наименование	Описание	Формула	Структурная формула	Препараты
1	циклоспорин	циклический пептид, состоящий из 11 аминокислот, продуцируется почвенными грибами вида <i>Beauveria nivea</i>	$C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$		Циклоспорин, Гексал, Сандиммун® Нсорал®, Экорал®
2	микофенолата мофетил (ММФ)	морфолиноэтиловый эфир микрофиноловой кислоты, продуцируемой грибом <i>Penicillium stoloniferum</i>	$C_{23}H_{31}NO_7$		Микофенолата мофетил, Супреста, Майсепт
3	такролимус	природный макролид, продуцируется актиномицетом <i>Streptomyces tsukubaensis</i>	$C_{44}H_{69}NO_{12}$		Програф, Фуджиминин, Протопик, Адваграф

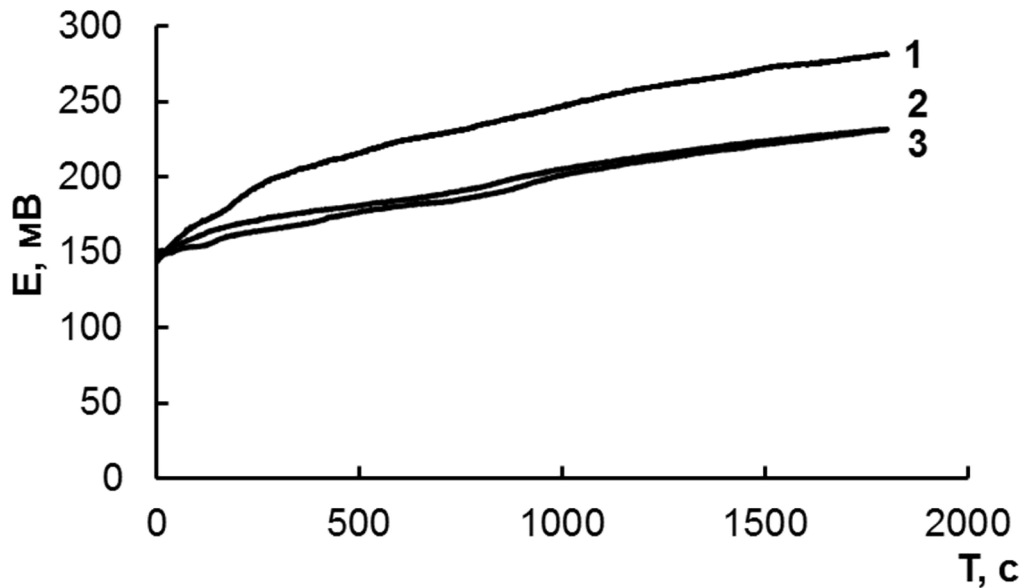


Рисунок 3.30 – Зависимость ПРЦ от времени. 1 – физ. раствор, 2– физ. раствор + 0,5 мг/мл CellSept, 3 – физ. раствор + 0,1 мг/мл Сандиммун® Неорал®.

В то же время добавление иммуносупрессоров к плазме крови (рис. 3.31) приводит к смещению ПРЦ в положительную сторону. Отклонение от исходной величины составляет +33,1 мВ для препарата CellSept и +20,3 мВ для препарата Сандиммун® Неорала®.

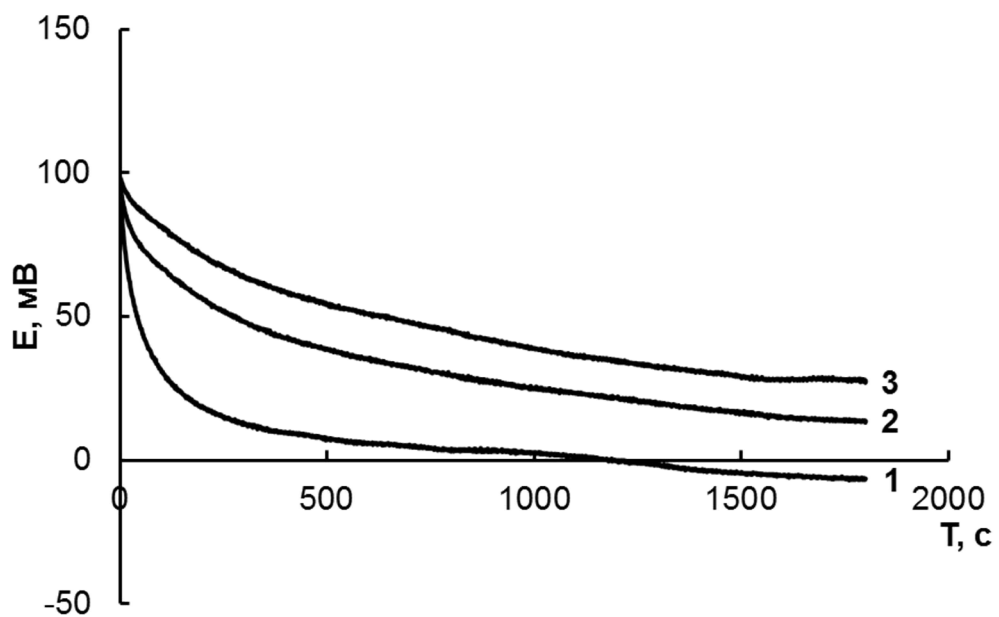


Рисунок 3.31 – Зависимость ПРЦ от времени в плазме крови. 1 – плазма крови + физ. раствор (5:1), 2– плазма крови + 0,1 мг/мл CellSept (5:1), 3 – плазма крови + 0,1 мг/мл Сандиммун® Неорал® (5:1).

Изменение направления сдвигов величин ПРЦ и смещения кривых зависимостей ПРЦ – время можно объяснить наличием в плазме крови антиоксидантов, которые вступают во взаимодействие с добавленным иммуносупрессором. Это взаимодействие приводит к уменьшению уровня антиоксидантов в плазме и соответствующему сдвигу равновесия про- и антиоксидантов в сторону увеличения вклада прооксидантов. Поэтому добавление к плазме иммуносупрессора приводит к смещению величины ПРЦ в положительную область потенциалов. В водном растворе, содержащем тот же электролит, что и плазма (0,15 М NaCl), наблюдается смещение кривой в противоположную сторону (в отрицательную область потенциалов). В этом случае мы наблюдаем влияние на кривую зависимости ПРЦ - время только добавленного органического вещества. Поэтому эффект, наблюдаемый в плазме (смещение значения ПРЦ в положительную область), на самом деле следует увеличить на отклонение величины ПРЦ в водном растворе при добавлении иммуносупрессора.

Это открывает возможность вносить поправки для измеренной величины ПРЦ сыворотки крови или плазмы крови при проведении иммуносупрессивной терапии.

С помощью мониторинга пациентов в раннем послеоперационном периоде после трансплантации почки и печени было обнаружено смещение диапазона величин ПРЦ в положительную область значений потенциала относительно величин ПРЦ у практически здоровых людей для групп пациентов после трансплантации печени (от -14,6 до +32,8 мВ) и почки (от -16,7 до +32,3 мВ).

Мониторинг ПРЦ позволил выявить весьма важную закономерность. Если постоперационный период лечения указанных групп пациентов протекал без осложнений, величина ПРЦ характеризовалась небольшими изменениями в процессе мониторинга (рис. 3.32). Однако если у пациента возникали осложнения, величина ПРЦ резко смещалась, как правило, в положительную область. Анализ данных мониторинга ПРЦ в сопоставлении с клиническими данными привел нас к

выводу о том, что резкое изменение величины ПРЦ в сыворотке или плазме крови более, чем на 25 мВ связано с различного рода осложнениями у пациента.

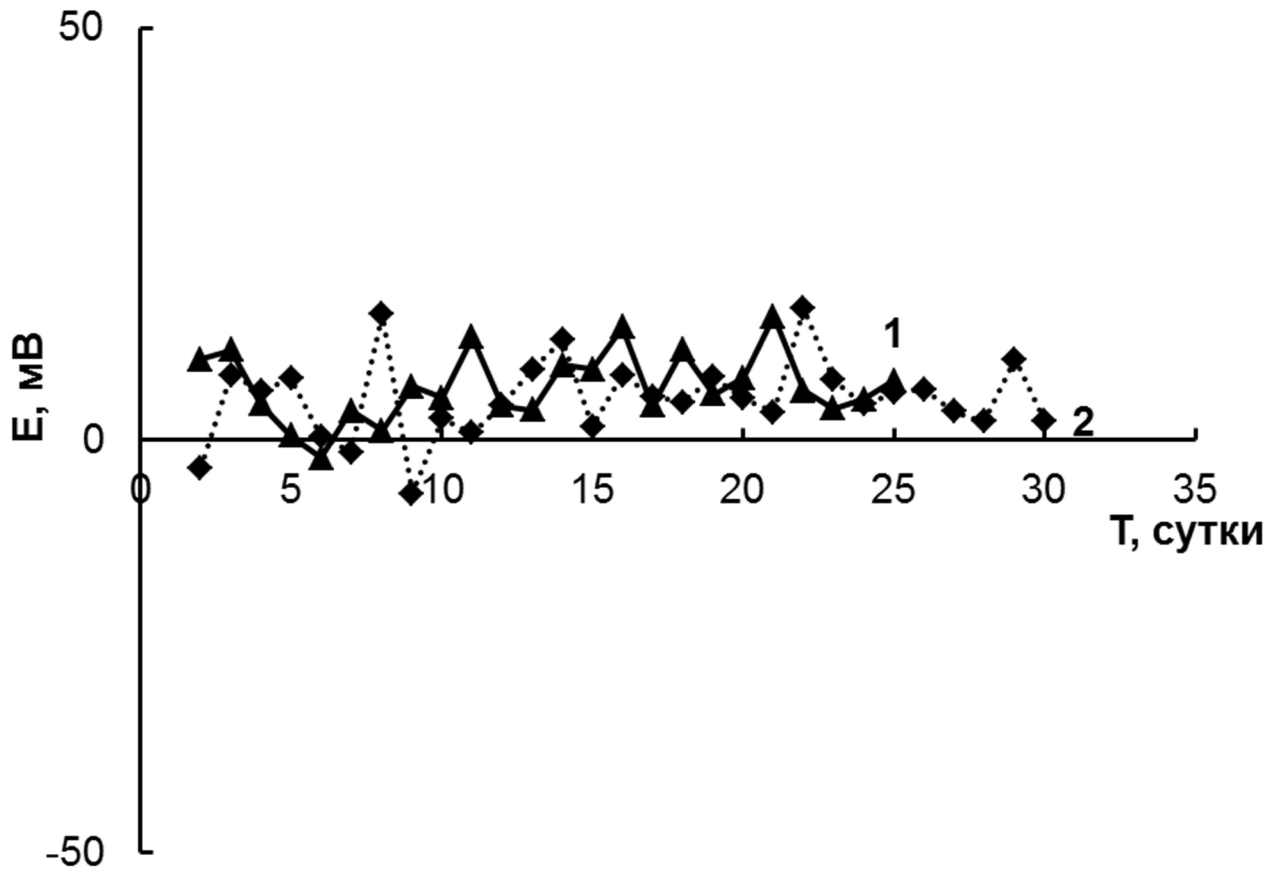


Рисунок 3.32 – Мониторинг ПРЦ пациента Б. (1) после трансплантации почки и пациента К. (2) после трансплантации печени. Послеоперационный период протекал без осложнений.

Так, у пациента П. (рис. 3.33) на с 14-х по 18-е сутки было отмечено смещение величины ПРЦ в положительную область потенциалов на 41 мВ. Эти данные позволили предположить наличие осложнения у данного пациента в указанный период. Действительно, при сопоставлении данных мониторинга величины ПРЦ с клиническими данными, на 25-е сутки имел место криз отторжения трансплантированного органа, подтвержденный гистологически после процедуры биопсии. Таким образом, резкий сдвиг величины ПРЦ, наблюдавшийся с 14-х по 18-е сутки, служит сигналом для медиков о высокой вероятности возникновения осложнений у пациента, которые проявились на 7

суток позже. Таким образом, была выявлена прогностическая ценность мониторинга ПРЦ плазмы крови.

Дальнейший мониторинг ПРЦ пациента П выявил незначительные величины изменения величин РП вплоть до выписки пациента на 40-е сутки, что может свидетельствовать об отсутствии осложнений при дальнейшем лечении. Эти данные, как и криз отторжения на 25-е сутки, также подтверждены клиническими данными. Подтверждено и отсутствие острой симптоматики, и изменения биохимических параметров пациента П. при дальнейшем лечении после купирования криза отторжения вплоть до его выписки из стационара, поскольку своевременно было предпринято проведение пациенту П. экстренного лечения состояния криза.

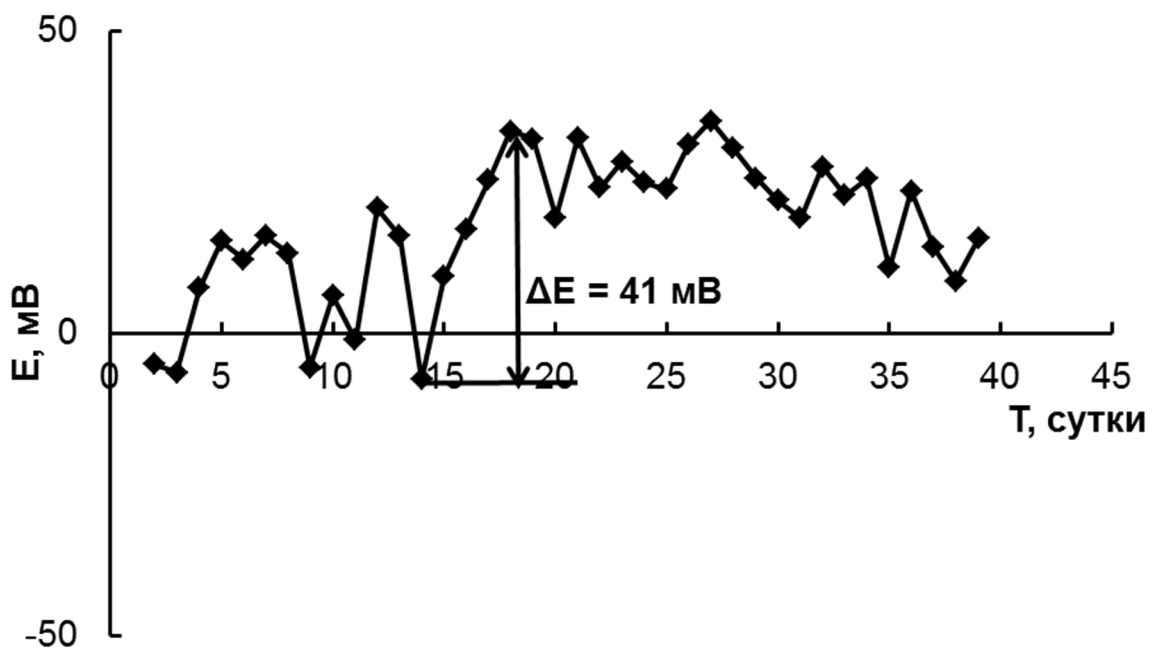


Рисунок 3.33 – Послеоперационный мониторинг ПРЦ в плазме крови пациента П. после аллотрансплантации почки.

Отметим, что в случае дисфункции в виде отторжения трансплантированного органа, отмечаются резкие сдвиги величины ПРЦ в сторону более положительных значений потенциала, локализация сдвигов протекала в течение 2-4 дней мониторинга. Однако в ряде случаев наблюдалось

длительное постоянное смещение величины ПРЦ в сторону более положительных значений потенциала, которое приводило к значительным сдвигам величины ПРЦ. Так, у пациента Б. (рис. 3.34, кривая 1) при сдвиге $\Delta E = +54$ мВ с 4-х по 13-е сутки в послеоперационном периоде имел место воспалительный процесс в виде пиелонефрита трансплантата, в то время как у пациента В. (рис. 3.34, кривая 2) сдвиг величины ПРЦ $\Delta E = +63$ мВ с 3-х по 13-е сутки удалось связать с накоплением в организме иммуносупрессора циклоспорина, одним из распространенных побочных эффектов которого является нефротоксичность [324]. Подчеркнем, что успешное лечение пиелонефрита привело к обратному сдвигу величины ПРЦ ($\Delta E = -18$ мВ), выведение иммуносупрессивного препарата из организма пациента В. также привело к обратному сдвигу величины ПРЦ (за 7 суток уменьшения концентрации иммуносупрессора суммарный сдвиг редокс потенциала составил $\Delta E = -23$ мВ).

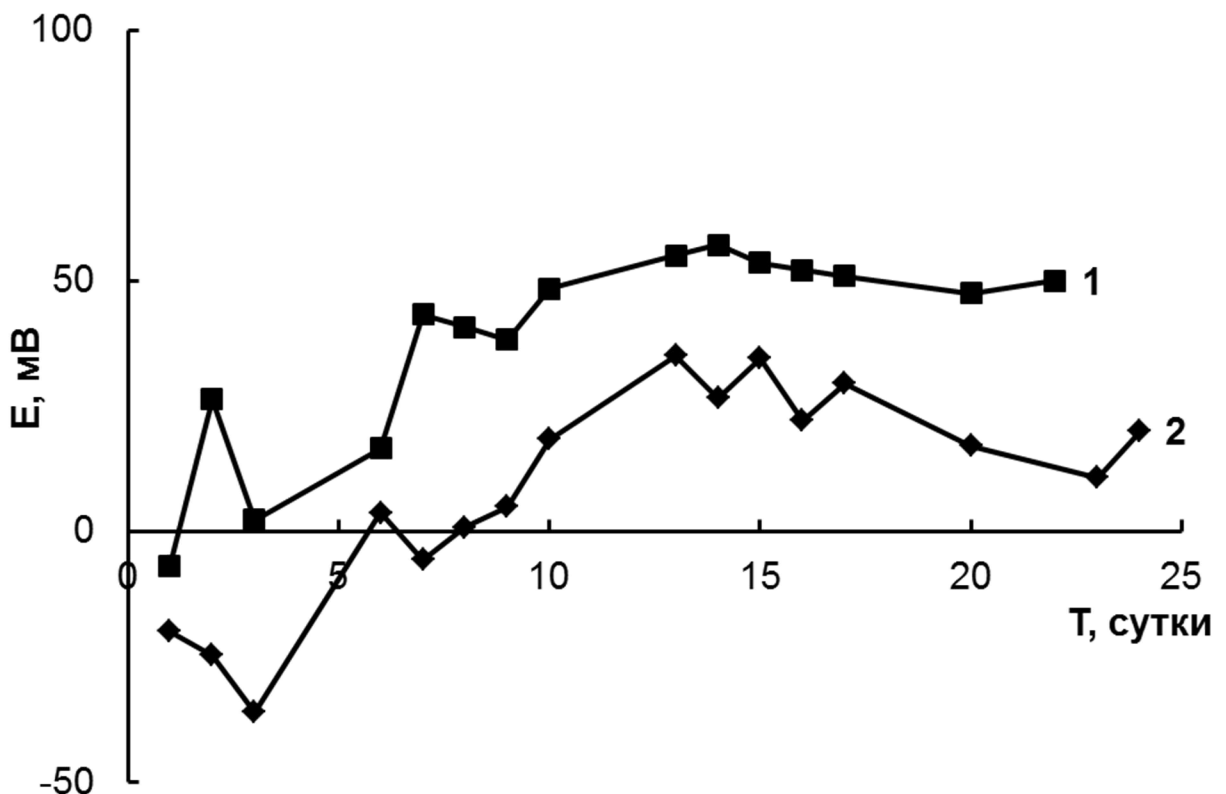


Рисунок 3.34 – Послеоперационный мониторинг ПРЦ в плазме крови пациента Б. (1) и В. (2) после аллотрансплантации почки.

Схожие данные были получены у пациентов с осложнениями после трансплантации печени. Так, у пациентов Ш. и К. в послеоперационном периоде была диагностирована дисфункция трансплантированного органа в виде холестаза. Как видно из данных, представленных на (рис. 3.35, кривая 1), у пациента Ш. наблюдалось смещение ПРЦ в область положительных значений потенциала с 6-х по 31-е сутки ($\Delta E = +71$ мВ), после чего был отмечен спад величины ПРЦ. По клиническим данным у пациента Ш. на 13-е сутки отмечен подъем температуры, в ходе дальнейшего наблюдения было подозрение на криз отторжения трансплантированного органа, которое не подтвердилось после гистологического исследования материала биопсии на 17-е сутки, и с 23-х суток диагностирован холестаз, уменьшение которого зафиксировано на 31-е сутки.

У пациента К. (рис. 3.35, кривая 2) наблюдалось смещение ПРЦ в область положительных значений с 6-х по 12-е сутки ($\Delta E = +61$ мВ), после чего зафиксирован возврат величины ПРЦ в область первоначальных значений. Согласно клиническим данным, у пациента К. с 6-х по 14-е сутки был диагностирован холестаз, который начал уменьшаться начиная с 14-х суток.

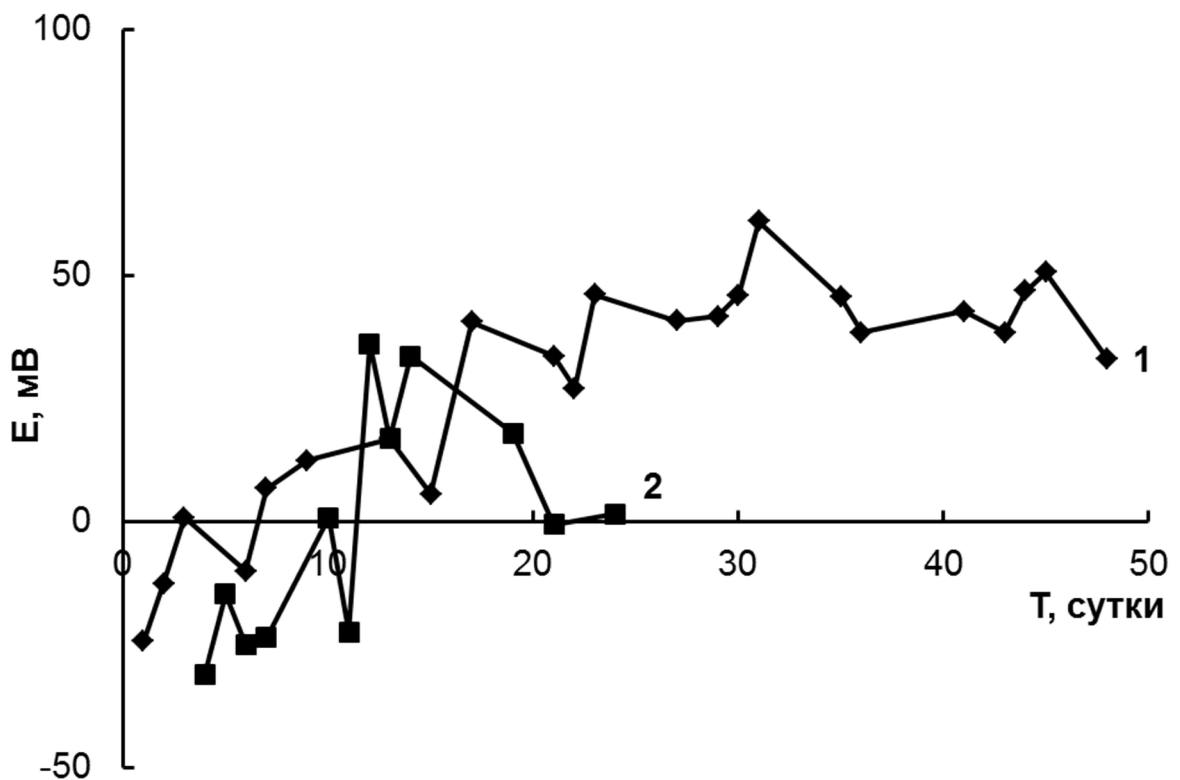


Рисунок 3.35 – Послеоперационный мониторинг ПРЦ в плазме крови пациента Ш. (1) и К. (2) после ортотрансплантации печени.

Помимо осложнений в виде дисфункции трансплантированного органа, было обнаружено, что сдвиги ПРЦ в положительную область наблюдаются также при воспалительных процессах, которые могут быть косвенно связаны с иммуносупрессивной терапией. Так, у пациента К. (рис. 3.36, кривая 1) послеоперационный период был осложнен пневмонией (с 3-х по 7-е сутки). В это же время наблюдалось смещение величины ПРЦ в область положительных значений, причем сдвиг величины ПРЦ ΔE составил +25 мВ. Отметим также, что сдвиг величины ПРЦ совпадает по времени с повышением уровня прокальцитонина с 0,5 нг/мл до 12,3 нг/мл. В тот же период у пациента были выявлены клинические признаки инфекционного заболевания (повышение температуры, лейкопения, увеличение уровня креатинина и мочевины в крови). Важно, что при мониторинге ПРЦ плазмы крови была обнаружена взаимосвязь динамики сдвига ПРЦ с подбором антибактериальной терапии. На 8-е сутки препарат Меронем был заменен на Инванз, а на 9-е сутки в антибактериальную терапию дополнительно включили Ванкомицин, что выразилось в сдвиге величины ПРЦ в область более отрицательных значений.

Таким образом, выявленные нами изменения величины ПРЦ в процессе мониторинга четко совпадали с клиническими признаками ухудшения (1-8 сутки) и улучшения (8-14 сутки) состояния в результате проведенного лечения пациента (рис. 3.36, кривая 1).

Подобная картина имела место у пациента С. (рис. 3.36, кривая 2), послеоперационный период которого был осложнен кандидозом, повышенной температуры и лейкоцитозом, что сопровождалось смещением величины ПРЦ в положительную область ($\Delta E = +23$ мВ). В данном случае параллельно с коррекцией антибактериальной терапии менялась динамика изменения величины ПРЦ. Замена Максипима на Меранем и Ванкомицин на 10-е сутки привело к смещению величины ПРЦ к начальным значениям, что совпало ухудшением (1-10 сутки) и улучшением (10-15) клинической картины.

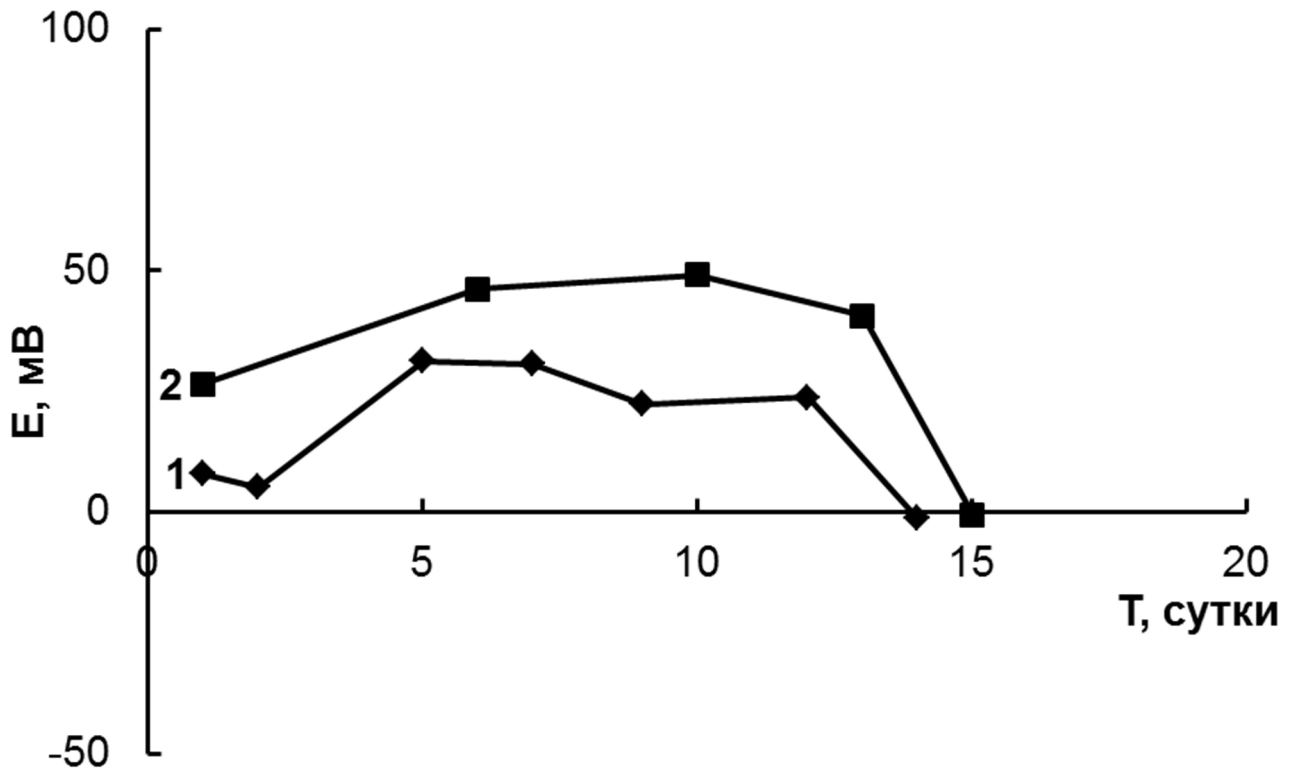


Рисунок 3.36 – Послеоперационный мониторинг ПРЦ в плазме крови пациента К. (1) и С. (2) после ортотрансплантации печени.

При воспалительных процессах в ряде случаев было отмечено не только смещение величины ПРЦ в область положительных значений, но и появление волнообразных участков на кривых зависимости ПРЦ от времени.

Например, у пациента 3. (рис. 3.37) с 3-х суток была диагностирована пневмония, которая разрешилась после 37-х суток, что отразилось в постепенном сглаживании волнообразного характера зависимости ПРЦ – время вплоть до полного исчезновения волнообразного характера кривых и приближении вида кривых к логарифмической зависимости, характерной для практически здоровых людей.

Подчеркнем, что эти данные совпадают с данными, полученными у пациентов с острыми септическими состояниями (рис. 3.27–3.29). Таким образом, оказалось, что наличие волнообразных участков свидетельствует не только о наличии у пациента острых септических состояний, но и являться маркером наличия воспалительных процессов в организме.

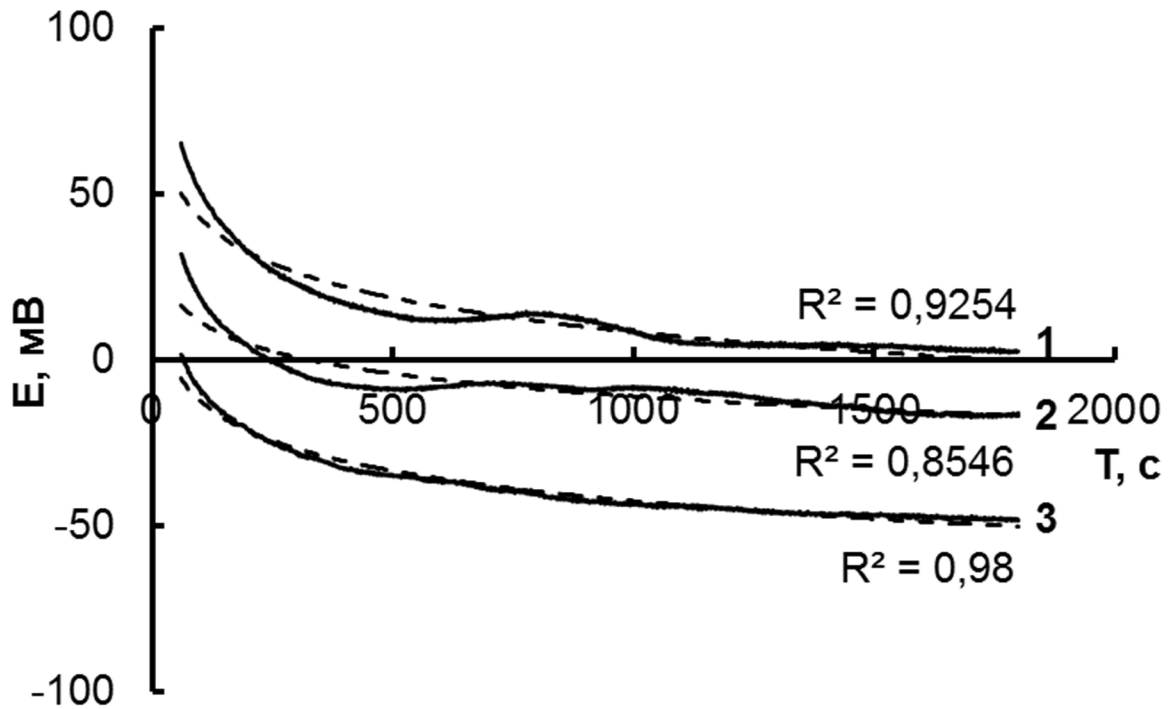


Рисунок 3.37 – Пациент 3. Зависимость ПРЦ в сыворотке крови от времени. 1 – 9 сутки, 2 – 37 сутки, 3 – 40 сутки.

Весьма интересные данные были получены при мониторинге ПРЦ плазмы крови пациентов, которым проводились активные методы лечения (например, плазмаферез и гемодиализация). Как правило, проведение активных методов лечения приводило к сдвигу значений ПРЦ в область отрицательных значений потенциала (рис. 3.38 и 3.39).

Эти данные следует связать с процессом выведения токсичных продуктов из организма, т.е. снижению вероятности развития окислительного стресса, что совпадает с данными по детоксикационному эффекту процедуры ГБО у пациентов с острой церебральной патологией (рис. 3.25).

Очевидно, что данные о динамике изменения величины ПРЦ у пациентов до и после проведения активных методов лечения могут быть полезны в качестве еще одного диагностического критерия – критерия оценки эффективности проводимой процедуры.

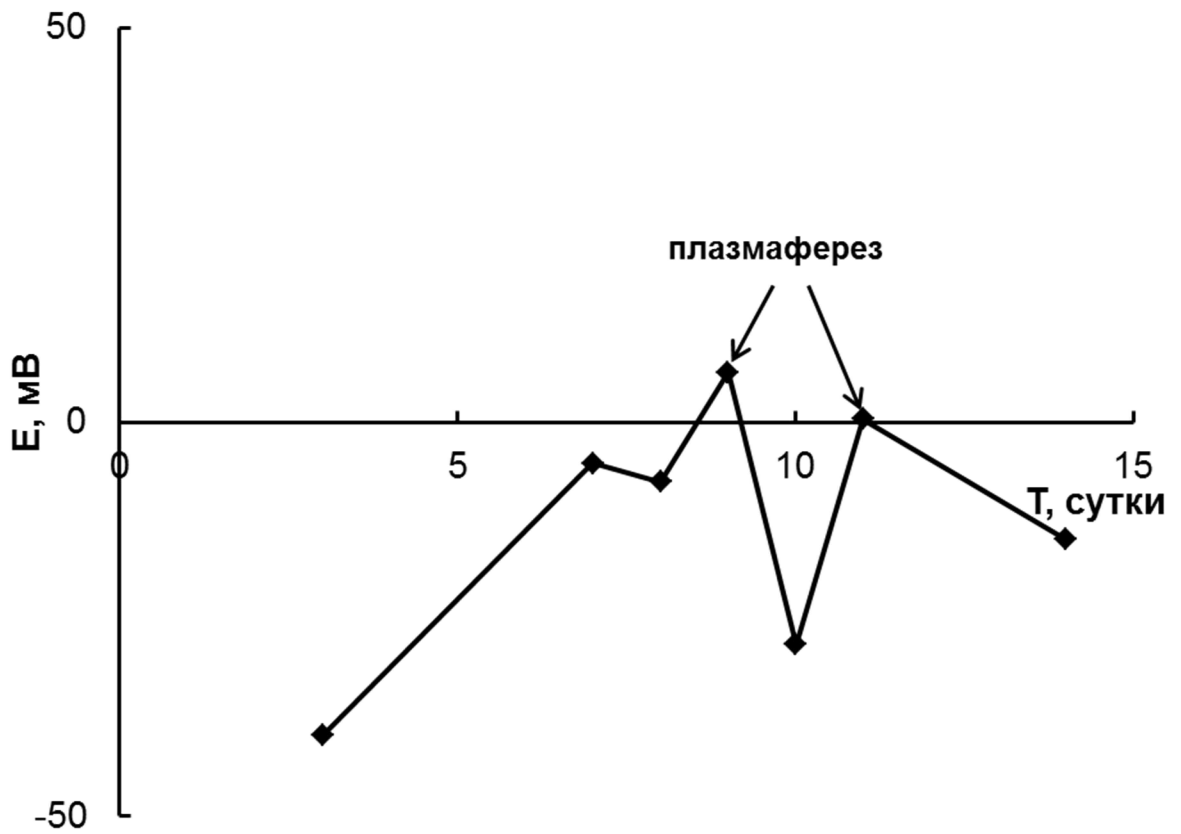


Рисунок 3.38 Послеоперационный мониторинг ПРЦ в плазме крови пациента Д. после аллотрансплантации почки.

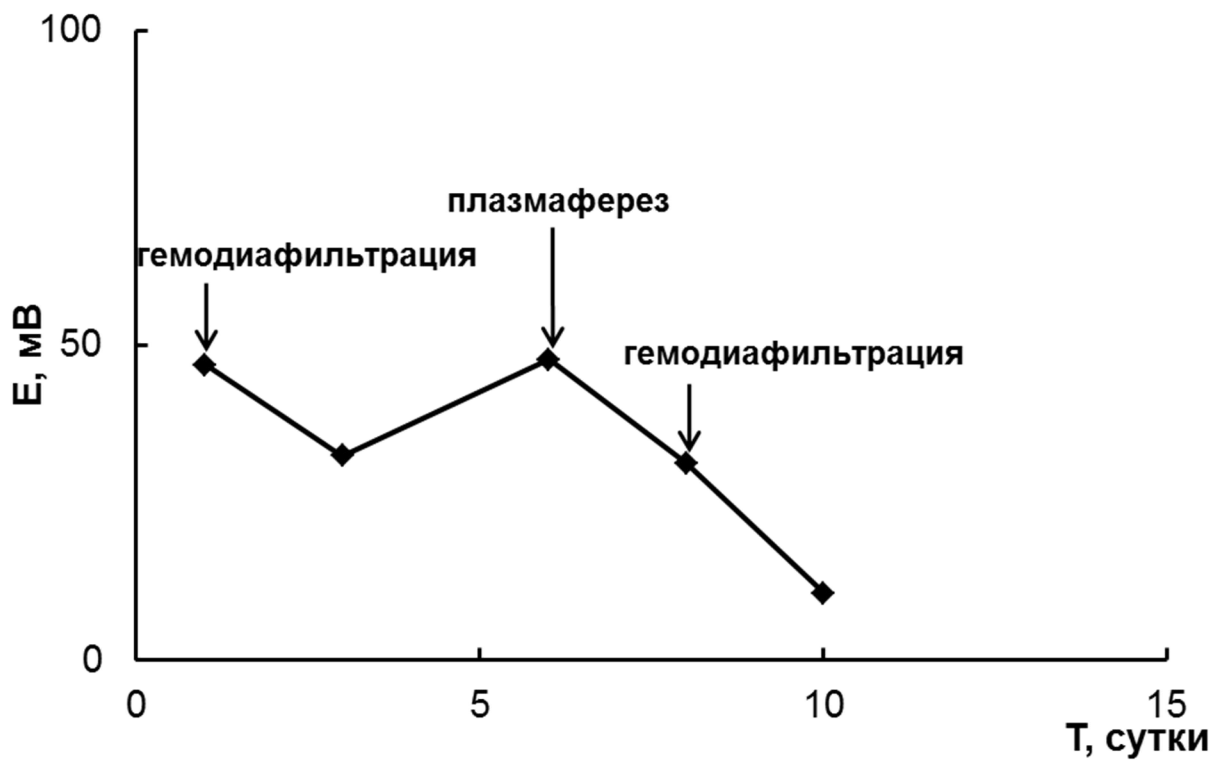


Рисунок 3.39 – Послеоперационный мониторинг ПРЦ в плазме крови пациента С. после ортотрансплантации печени.

Как уже отмечалось выше, в ряде случаев при наличии осложнений в послеоперационном периоде имеет место появление не характерных зависимостей ПРЦ от времени, которые проявляются, как в виде возникновения волнообразных участков, так и в отклонении величин, характеризующих зависимость ПРЦ от времени (коэффициент a в уравнении (3.4) и $\Delta(60-1800)$). Например, у пациента С. (рис. 3.40) с 8-х по 17-е сутки был отмечен пиелонефрит, что в свою очередь отразилось на значении коэффициента a в уравнении, описывающем зависимость ПРЦ от времени.

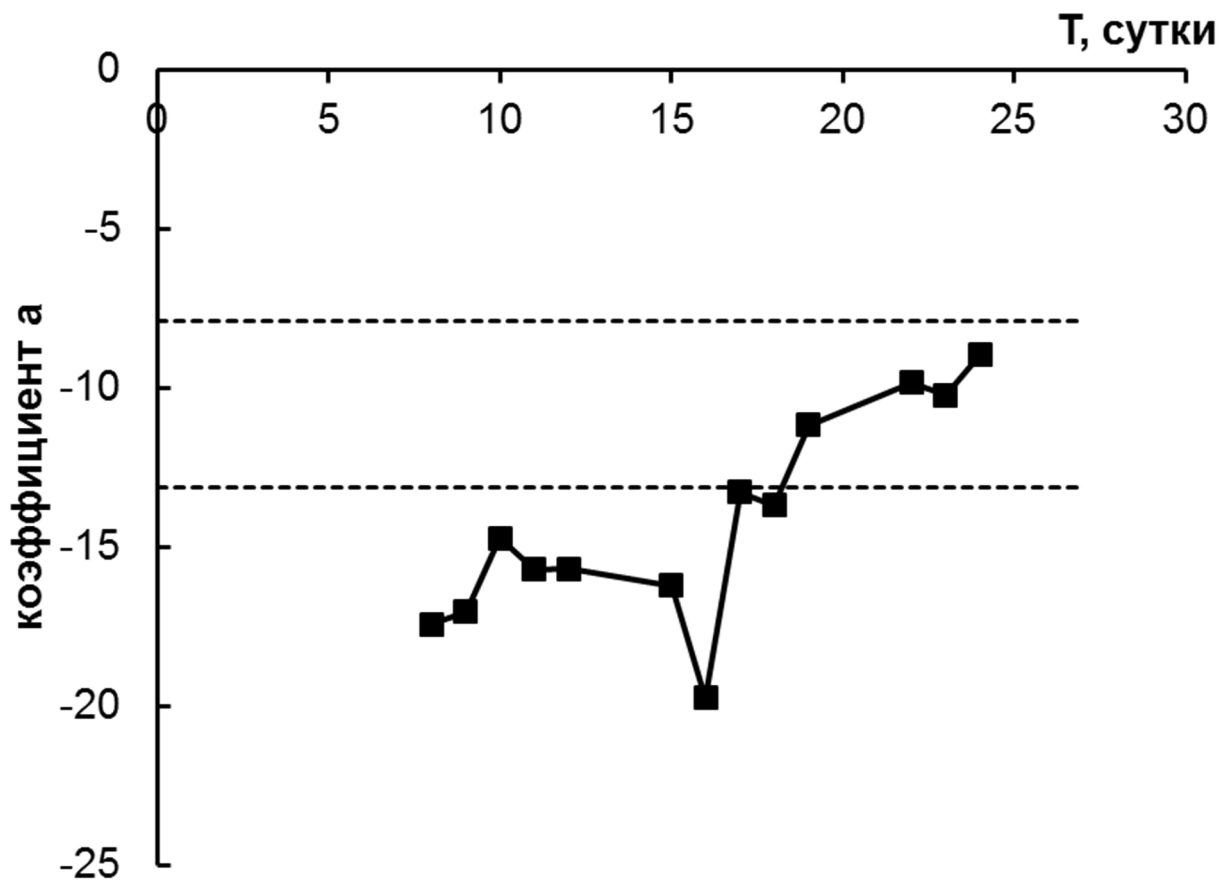


Рисунок 3.40 – Изменение коэффициента a в процессе послеоперационного мониторинга пациента С. после аллотрансплантации почки. Пунктирными линиями обозначены границы области для практически здоровых людей.

Подчеркнем, что при благоприятном протекании послеоперационного периода величина коэффициента a , как правило, находятся в границах интервала для практически здоровых людей (рис. 3.41). Это еще один пример полезного использования зависимости величина ПРЦ – время.

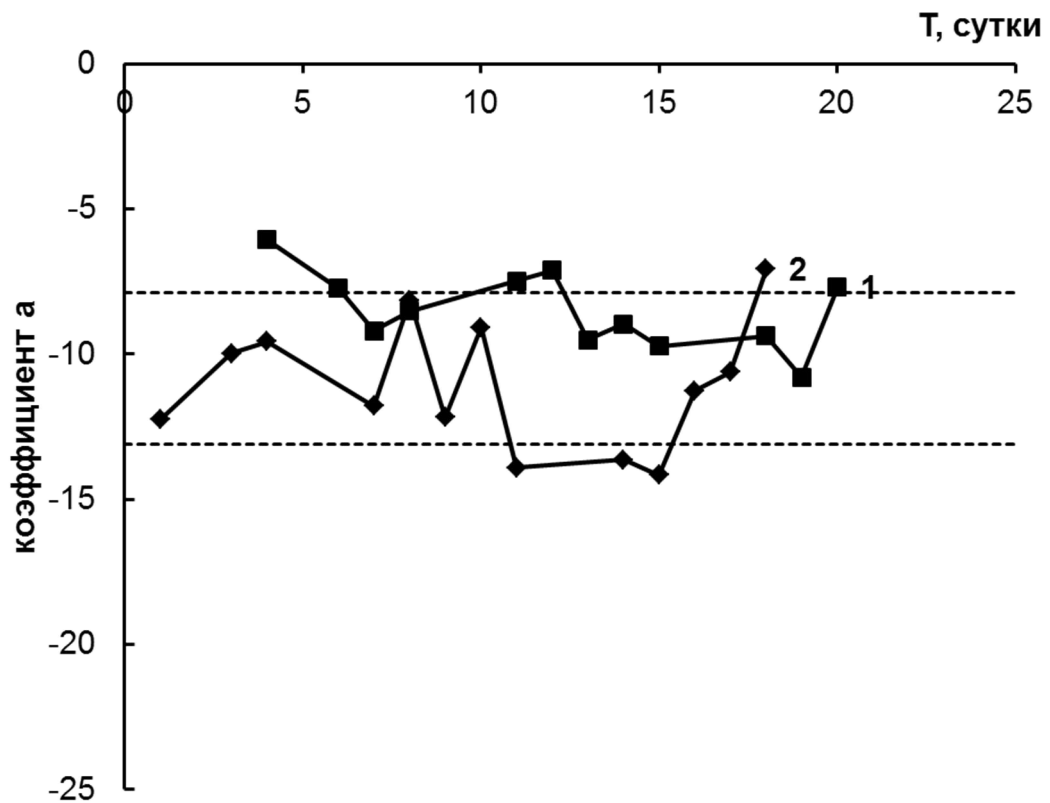


Рисунок 3.41 – Изменение коэффициента a в процессе послеоперационного мониторинга пациента Л. (1) и пациента Е. (2) после аллотрансплантации почки. Пунктирными линиями обозначены границы области для практически здоровых людей.

В целом, при анализе данных, полученных в раннем послеоперационном периоде у пациентов с трансплантированными почкой и печенью, обнаружено, что ПРЦ смещается в область положительных значений потенциала по сравнению со значениями, характерными для практически здоровых людей. Это, вероятно, можно связать, как с комплексным влиянием иммуносупрессивной терапии, так и с дисфункцией систем организма.

В то же время у пациентов с двухсторонней трансплантацией легких имеет место иной характер изменения величины ПРЦ плазмы крови в раннем послеоперационном периоде: величины ПРЦ плазмы крови данной группы пациентов (рис. 3.42) смещены в область отрицательных значений по сравнению с величинами ПРЦ у пациентов с трансплантированной почкой и печенью (рис. 3.32).

Столь отрицательные значения ПРЦ в плазме крови, возможно, связаны с тем, что в раннем послеоперационном периоде у пациентов с трансплантированными легким в связи с нарушением функции дыхательной системы наблюдается гипоксигенация и, как следствие, смещение про- и антиоксидантного баланса в сторону антиоксидантов. Кроме того, как видно из полученных данных, в процессе проведения лечения таких пациентов величина ПРЦ смещается в область положительных значений потенциала, причем границы этой области близки к границам области значений ПРЦ пациентов с трансплантированной почкой и печенью. Данное наблюдение может свидетельствовать о нормализации функции дыхательной системы и выравнивании баланса про- и антиоксидантов в процессе лечения пациентов с трансплантированными легкими.

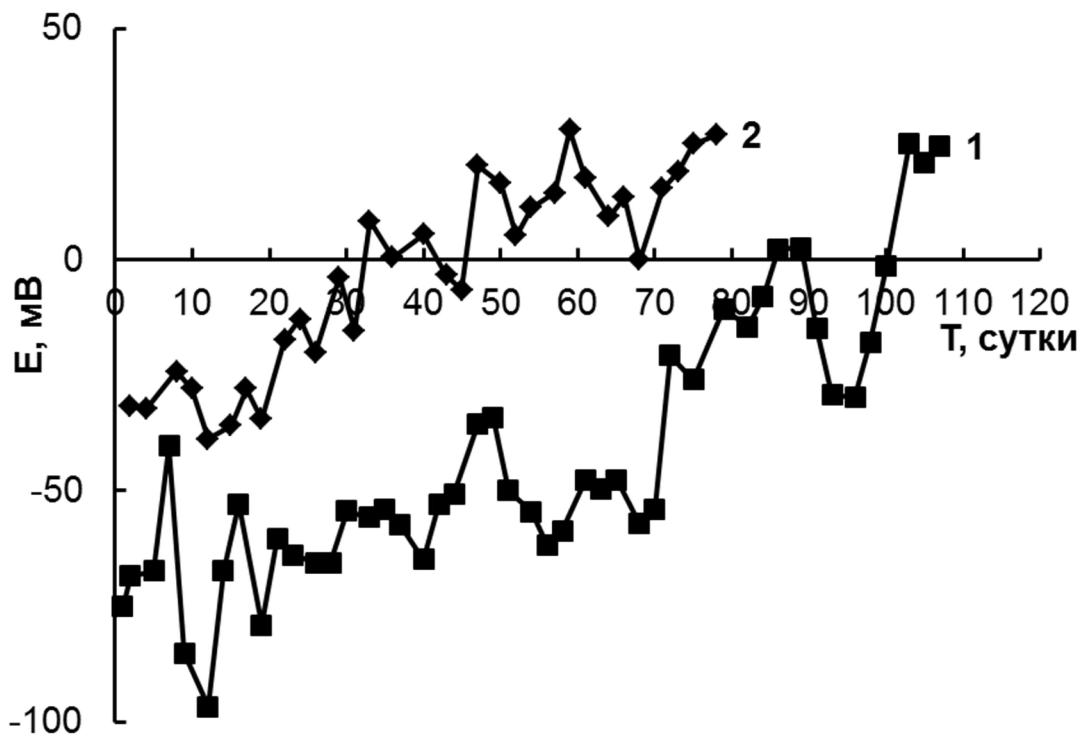


Рисунок 3.42 – Послеоперационный мониторинг ПРЦ в плазме крови пациента М. (1) и Б. (2) после двухсторонней трансплантации легких.

Отметим, что при наличии осложнений в раннем послеоперационном периоде значения ПРЦ в плазме крови находятся в области более положительных потенциалов (рис. 3.43), чем было отмечено выше.

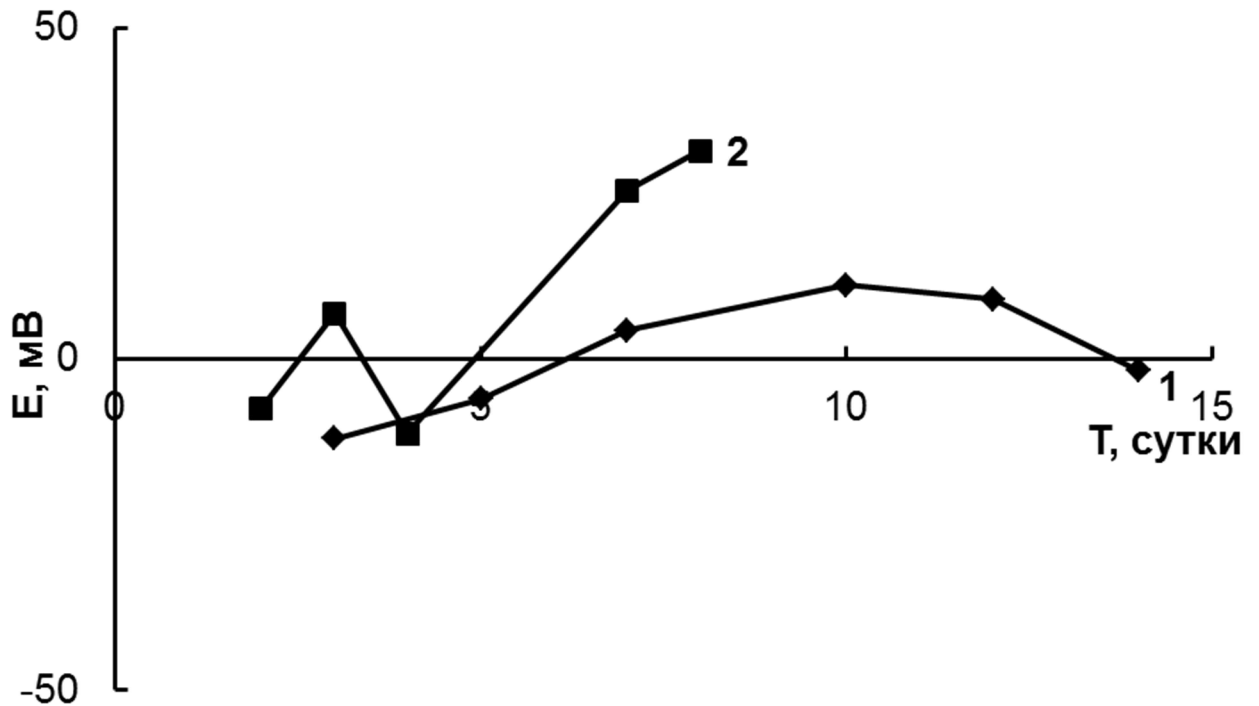


Рисунок 3.43 – Послеоперационный мониторинг ПРЦ в плазме крови пациента А. (1) и С. (2) после двухсторонней трансплантации легких.

Таким образом, можно сделать вывод, что данные мониторинга величин ПРЦ плазмы крови у пациентов с трансплантированными легкими, как и для пациентов с трансплантированными печенью и почкой, могут служить критерием тяжести состояния. Предлагаемый диагностический критерий тяжести состояния пациентов, используемый в комплексе с другими клиническими признаками, может позволить своевременно принять необходимые меры для коррекции проводимого лечения.

В целом, можно сделать вывод, что измерение ПРЦ в плазме или сыворотке крови может служить не только дополнительным диагностическим критерием состояния пациентов после трансплантации органов и прогностическим критерием развития осложнений, включая дисфункции трансплантированных органов или криза их отторжения. Таким образом, измерение ПРЦ может позволить своевременно принимать меры по предотвращению осложнений или минимизирования их характера.

3.3.4 Сравнительный анализ данных мониторинга потенциала при разомкнутой цепи у различных групп пациентов

Анализ массива данных величин ПРЦ показал, что значения ПРЦ в плазме крови исследованных нами групп пациентов отличаются от значений, характерных для практически здоровых людей (табл. 3.5), а также выявил разницу областей потенциалов, характерных для групп пациентов с различными патологическими состояниями (рис. 3.44 и табл. 3.6). Эти наблюдения подтверждают данные многих исследователей, хотя часть патологических состояний была исследована нами впервые.

Можно предположить, что величина сдвига ПРЦ является отражением степени окислительного стресса, однако стоит принимать во внимание, что для некоторых групп пациентов (например, после трансплантации органов) на фоне иммуносупрессивной терапии отмечается более высокое значение ПРЦ в послеоперационном периоде при отсутствии осложнений.

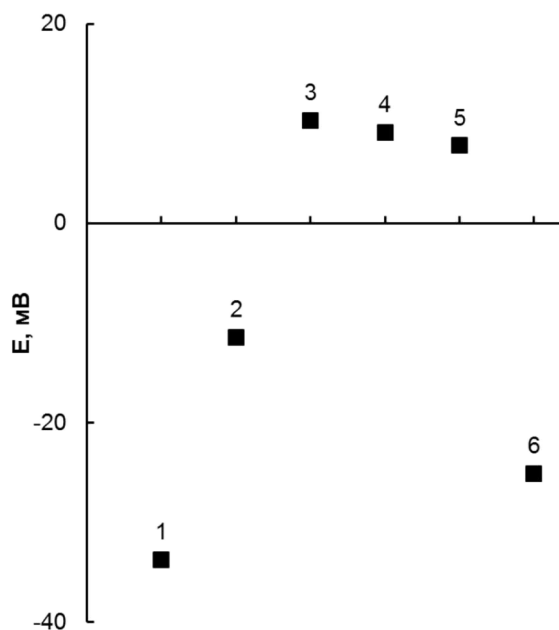


Рисунок 3.44 – Зависимость средней величины ПРЦ сыворотки крови от этиологии заболевания. 1 – практически здоровые люди, 2 – пациенты церебральной патологией, 3 – пациенты с септическими состояниями, 4 – пациенты с трансплантированной печенью, 5 – пациенты с трансплантированной почкой, 6 – пациенты с трансплантированными легкими.

Таблица 3.5 – Величины ПРЦ у различных групп пациентов

	Практически здоровые люди	ГБО	ООЭ	ЦТП	ОТПИЖ	ОТЛ
Пациентов в группе	63	16	23	64	59	7
Количество анализов	63	116	70	615	967	143
Среднее значение РЦ, мВ	-33,7	-11,4	10,3	9,1	7,8	-25,1
Стандартное отклонение, мВ	22,5	26,7	20,2	23,7	24,5	29,0

Таблица 3.6 – Сдвиг средней величины ПРЦ у различных групп пациентов относительно группы практически здоровых людей

Отделение	Величина сдвига ПРЦ, мВ
Отделение гипербарической оксигенации (ГБО)	22,3
Отделение острых эндотоксикозов (ООЭ)	44,0
Центр трансплантации печени (ЦТП)	42,8
Отделение трансплантации почки и поджелудочной железы (ОТПИЖ)	41,5
Отделение трансплантации легкого (ОТЛ)	8,6

Таблица 3.7 – Величины ГРЦ у пациентов после трансплантации органов при наличии и отсутствии осложнений в послеоперационном периоде

	ЦТП		ОТПИДЖ		ОТЛ	
	без осложнений	с осложнениями	без осложнений	с осложнениями	без осложнений	с осложнениями
Пациентов в группе	42	22	35	24	3	4
Количество анализов	291	324	506	461	70	73
Среднее значение РП, мВ	-1,5	25,8	0,1	24,7	-12,2	-37,4
Стандартное отклонение, мВ	19,4	19,6	20,9	14,1	20,6	30,6

Таблица 3.8 – Сопоставление данных для пациентов с различными патологическими состояниями с доверительным интервалом для практически здоровых людей

	Практически здоровые люди	ГБО	ООЭ	ЦТП	ОТПИДЖ	ОТЛ
Количество анализов	63	116	70	615	967	143
Количество анализов в доверительном интервале	44 (70%)	46 (40%)	3 (4%)	62 (10%)	121 (12%)	63 (44%)
Количество анализов выше доверительного интервала	16 (25%)	68 (59%)	67 (96%)	549 (89%)	842 (87%)	63 (44%)
Количество анализов ниже доверительного интервала	3 (5%)	2 (1%)	0 (0%)	4 (1%)	4 (1%)	17 (12%)

Сравнение сдвигов средних значений ПРЦ в ходе мониторинга у пациентов после трансплантации почки (рис. 3.45) показало, что для группы пациентов с осложнениями в послеоперационном периоде (рис. 3.45, кривая 2) в течение первой недели отмечается существенное изменение величин ПРЦ в отличие от группы пациентов, послеоперационный период которых протекал без осложнений (рис. 3.45, кривая 1). Динамика изменения величины ПРЦ в отмеченное время составила 3,6 мВ/сутки и 0,3 мВ/сутки для групп пациентов с осложнениями и без осложнений соответственно. В дальнейшем динамика изменения величин ПРЦ у группы пациентов с осложнениями замедлялась, однако разница в средних величинах ПРЦ составляла порядка 15-20 мВ и сохранялась достаточно продолжительное время. Схожие данные были получены при сравнении пациентов без осложнений и с осложнениями в послеоперационном периоде при трансплантации печени и легких (табл. 3.7).

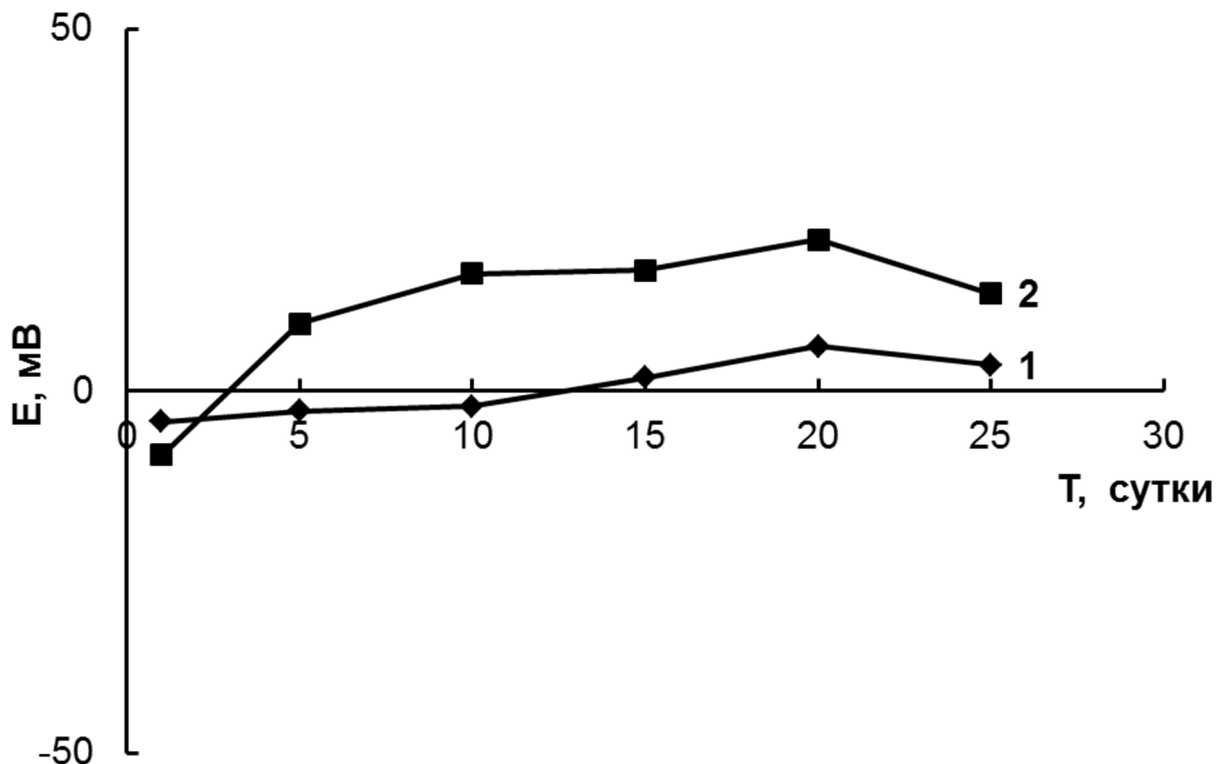


Рисунок 3.45 – Средние величины ПРЦ при отсутствии (1) и наличии (2) осложнений у пациентов в послеоперационном периоде после трансплантации почки.

Таким образом, мониторинг величин ПРЦ плазмы крови пациентов в раннем послеоперационном периоде может быть полезным для прогнозирования возможных осложнений в послеоперационном периоде на основании характера изменения величины ПРЦ в ходе мониторинга. Возможность прогнозирования осложнений на 5 сутки после операции трансплантации, судя по литературе, является уникальной и весьма полезной для своевременной коррекции лечения.

Важнейшими характеристиками диагностических методов являются чувствительность, специфичность, точность, а также прогностическая ценность положительного результата теста и прогностическая ценность отрицательного результата теста.

Как было указано выше, в качестве доверительного интервала был выбран диапазон величин ПРЦ от -60 до -20 мВ, в который попадает 70% практически здоровых людей. В ходе анализа массива данных по измеренным величинам ПРЦ было рассчитано процентное соотношение пациентов попадающих в выбранный нами доверительный интервал (табл. 3.8). Подчеркнем, что ниже доверительного интервала находится не более 1% анализов у пациентов, за исключением пациентов с трансплантированными легкими (12%), что связано с индивидуальными особенностями данной группы, отмеченными выше, и возможно с относительно небольшой группой пациентов, участвовавшей в настоящем исследовании. В то же время в доверительный интервал попадает от 4 до 44% анализов, причем имеет место значительное различие между группами. Так, в диапазон для практически здоровых людей попало 40% результатов анализа среди пациентов с церебральной патологией и 44% результатов среди пациентов с трансплантированными легкими. С другой стороны, в данный диапазон попало не более 12% результатов анализа среди пациентов с септическими состояниями и пациентов с трансплантированными печенью и почкой.

В ходе обобщения данных для группы практически здоровых людей и пациентов с различными патологическими состояниями была получена сводная таблица для расчета важнейших характеристик метода (табл. 3.9).

Таблица 3.9 – Данные по результатам анализа величин ПРЦ

		БОЛЕЗНЬ	
		присутствует	отсутствует
ТЕСТ	положительный	1616	19
	отрицательный	295	44

Используя представленные в табл. 3.9 данные, были рассчитаны характеристики диагностического метода измерения ПРЦ (3.6-3.11).

$$Se = \frac{1616}{1616+295} = 84,6\% \quad (3.6)$$

$$Sp = \frac{44}{19+44} = 69,8\% \quad (3.7)$$

$$Ac = \frac{1616+44}{1616+19+295+44} = 84,1\% \quad (3.8)$$

$$+PV = \frac{1616}{1616+19} = 98,8\% \quad (3.9)$$

$$-PV = \frac{44}{295+44} = 13,0\% \quad (3.10)$$

Полученные данные позволили сделать вывод, что разработанный метод обладает высокой точностью и чувствительность порядка 85%, прогностическая ценность положительного результата теста около 99%, что говорит о высокой диагностической эффективности предлагаемого метода.

3.4 Разработка новых направлений измерения потенциала при разомкнутой цепи в биологических средах и тканях

Описанные выше примеры применения метода измерения ПРЦ в биологических средах в клинической практике показывает широкие возможности данного метода. Однако помимо исследования биологических сред (плазма крови, сыворотка крови) данный метод может быть востребованным и при определении ПРЦ в тканях, поскольку известно, что потенциал здоровой ткани отличается от

потенциала ткани при ряде патологических состояниях (опухоль, некроз и др.) [23].

С другой стороны, сложность процессов, протекающих на платиновом электроде при проведении измерений ПРЦ в биологических средах, приводит к выводу о перспективности замены платины как материала измерительного электрода на иной материал, который позволил бы увеличить чувствительность электрода к степени окисления поверхности, а также упростить и ускорить методику предварительной подготовки электрода к перед измерением.

3.4.1 Применение метода измерения потенциала при разомкнутой цепи для оценки состояния желудочно-кишечного тракта

Одной из важных задач при проведении диагностики состояния желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) является своевременное выявление изменений в тканях стенки ЖКТ, которые могут привести к развитию язвенных осложнений или онкологических заболеваний. Как уже отмечалось выше, для оценки состояния ткани может быть применен метод измерения ПРЦ, имеются сведения о попытках реализовать данный метод на практике [325, 326]. Однако метод измерения ПРЦ в тканях, описанный в указанных работах, обладает рядом недостатков, наиболее существенным из которых является повреждение стенки ЖКТ при проведении измерения ПРЦ, поскольку метод подразумевает прокалывание стенки желудка. Очевидно, что это может привести к неблагоприятным последствиям, в том числе развитию воспалений и язвенных осложнений. Кроме того, измерительная схема, включающая транскутанный (чрезкожный) контакт с электродом сравнения, обладает высокой погрешностью измерения за счет высокого электрического сопротивления зоны измерения.

Нами был предложен электрохимический датчик для определения ПРЦ стенки ЖКТ, который позволяет избежать указанных выше недостатков. Во-первых, электрод сравнения был размещен рядом с измерительным электродом. Во-вторых, во избежание травмирования стенки ЖКТ предполагается

прижимание электродов к стенке в исследуемом месте без нарушения целостности покрова за счет использования плоских электродов. Платиновый электрод является измерительным, а серебряный – электродом сравнения. Сложность задачи создания измерительного блока состояла в том, что изолированные друг от друга электроды необходимо было поместить в узкий канал эндоскопа (диаметр канала не более 3 мм). Схема и внешний вид разработанного и изготовленного датчика представлены на рис. 3.46.

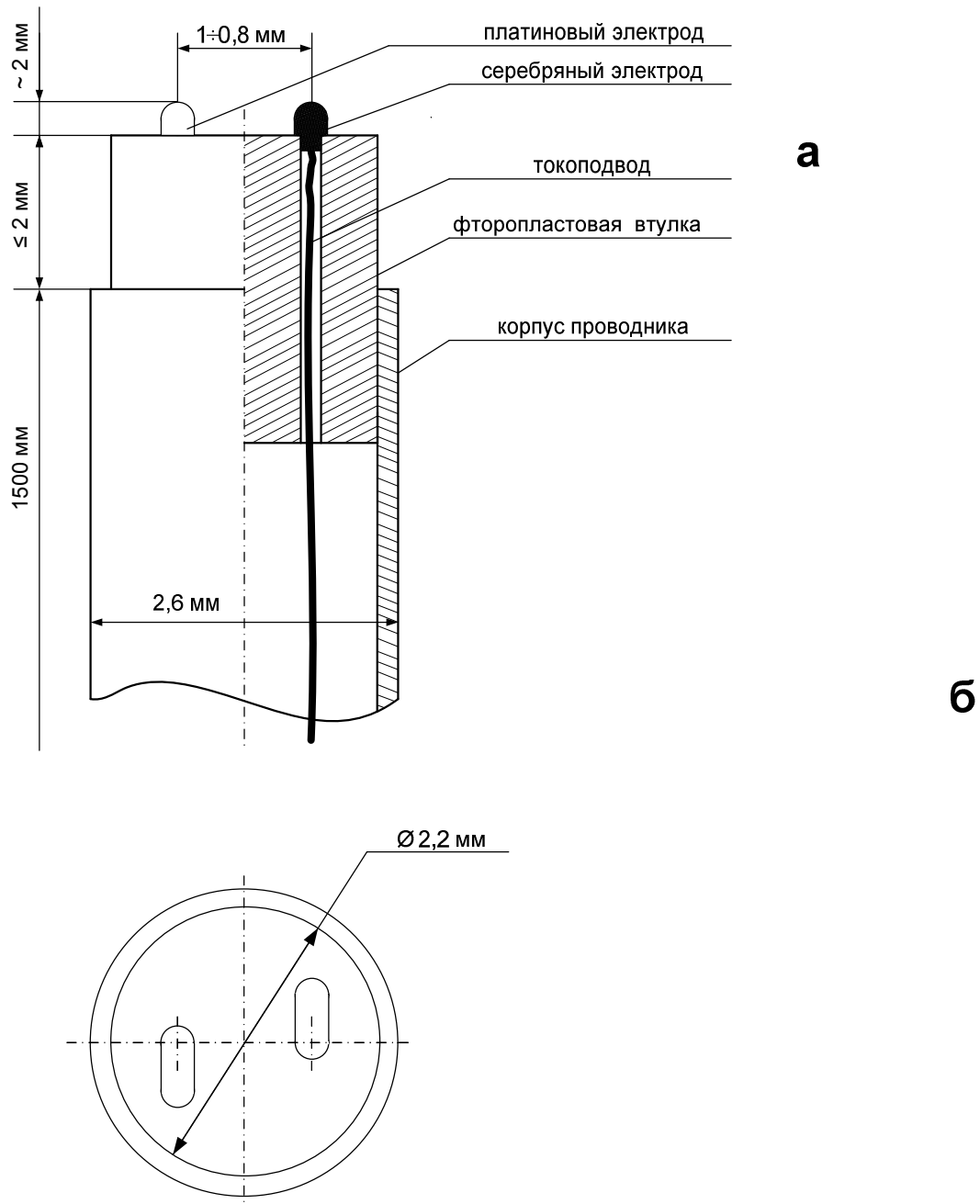


Рисунок 3.46 – Схема (а) и внешний вид (б) электрохимического датчика для определения ПРЦ стенки ЖКТ.

Прежде всего были проведены исследования возможности применения датчика в экспериментах *in vivo* с использованием лабораторных животных (крыс). Все манипуляция осуществлялись под наркозом. Измерения ПРЦ проводилось на вскрытых участках ЖКТ (рис. 3.47). Измерение на каждом участке ЖКТ проводили трижды, потенциал регистрировали с помощью потенциостата РС Сомраст (НПФ «Вольта», Россия) (табл. 3.10).

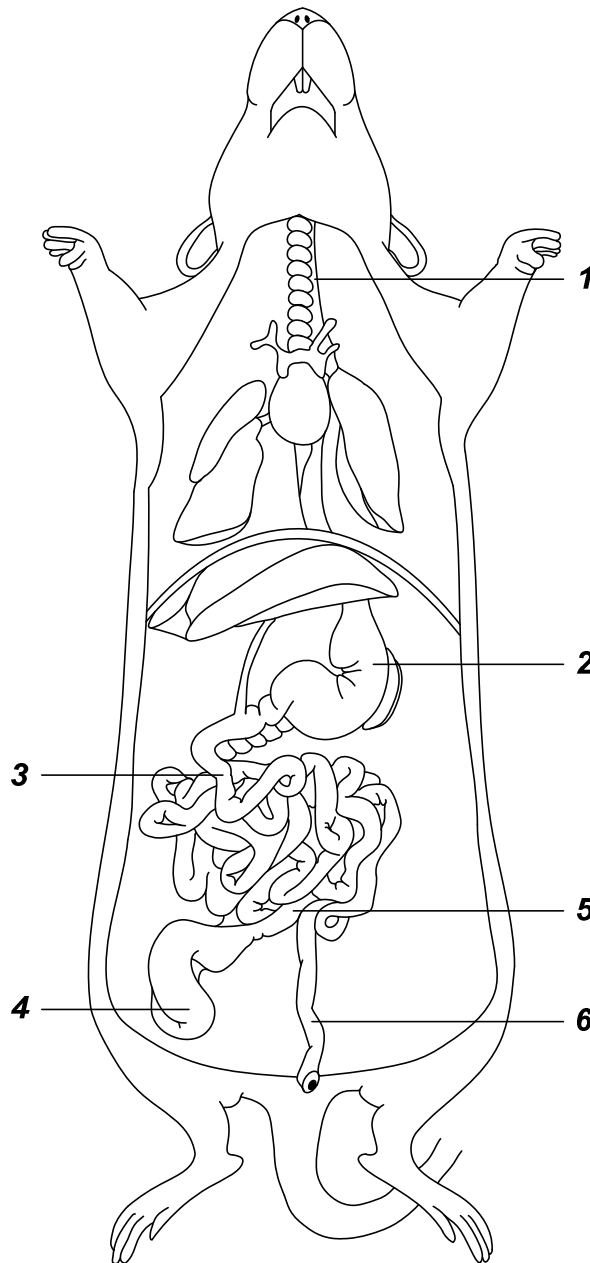


Рисунок 3.47 – Схема расположения точек измерения ПРЦ ЖКТ крысы. 1 – пищевод, 2 – желудок, 3 – средняя часть тонкой кишки, 4 – слепая кишка, 5 – толстая кишка, 6 – прямая кишка.

Таблица 3.10 – Измерение величины ПРЦ стенки ЖКТ крысы

№	Участок ЖКТ	ПРЦ, мВ	ПРЦ _{ср} , мВ
1	Пищевод	-238	-242
2		-244	
3		-244	
4	Желудок	-179	-175
5		-171	
6		-176	
7	Средняя часть тонкой кишки	-201	-205
8		-207	
9		-206	
10	Слепая кишка	-223	-223
11		-224	
12		-223	
13	Толстая кишка	-226	-226
14		-228	
15		-224	
16	Прямая кишка	-249	-251
17		-252	
18		-251	

Из данных, представленных в табл. 3.10 видно, величина ПРЦ стенки зависит от расположения в ЖКТ. Так, стенке желудка соответствуют самые высокие значения ПРЦ, в то время как наиболее низкие были получены для стенки пищевода и прямой кишки.

В то же время была отмечена достаточно высокая воспроизводимость результатов измерений (стандартное отклонение не превышало 4 мВ).

При исследовании влияния патологических состояний стенки ЖКТ были выбраны группы пациентов с изменениями стенки пищевода и желудка (язва, ожог, рубцовые изменения). Датчик подводился к исследуемому участку ЖКТ с помощью эндоскопа Evis Exera II CV-180 (Olympus, Япония) с выведением изображения на монитор. Перед проведением процедуры датчик подвергался химической стерилизации. При сопоставлении данных, полученных на практически здоровых участках стенки и пораженных участках, было обнаружено, что ПРЦ стенки ЖКТ на здоровых участках, отличается от ПРЦ стенки с осложнениями. Так у пациента В. с наличием рубцов и язв на стенке желудка (рис. 3.48) отмечается сдвиг величины ПРЦ в местах дефектов и на краю язвы более чем на 200 мВ относительно здорового участка стенки желудка.



Рисунок 3.48 – Мониторинг ПРЦ стенки желудка пациент В. с рубцами и язвами стенки желудка.

У пациента К. с ожогом пищевода наблюдается схожая картина (рис. 3.49), разница в величине ПРЦ стенки пищевода в месте ожога и стенки без ожога

составляет около +100 мВ. Экстремальные значения ПРЦ в месте ожога колебались от +80 до +150 мВ, что вероятно вызваны мышечными сокращениями стенки пищевода во время измерения в ответ на введение постороннего предмета (эндоскопа).



Рисунок 3.49 – Мониторинг ПРЦ стенки желудка пациент К. с ожогом пищевода.

Также было обнаружено, что у пациентов с положительной динамикой в результате лечения имела место незначительная разница величин ПРЦ участков стенки с залечиваемыми язвами и здоровых участков стенки желудка (рис. 3.50). Данное наблюдение можно связать с тем, что по мере проведения лечения состояние стенки приближается в норме.

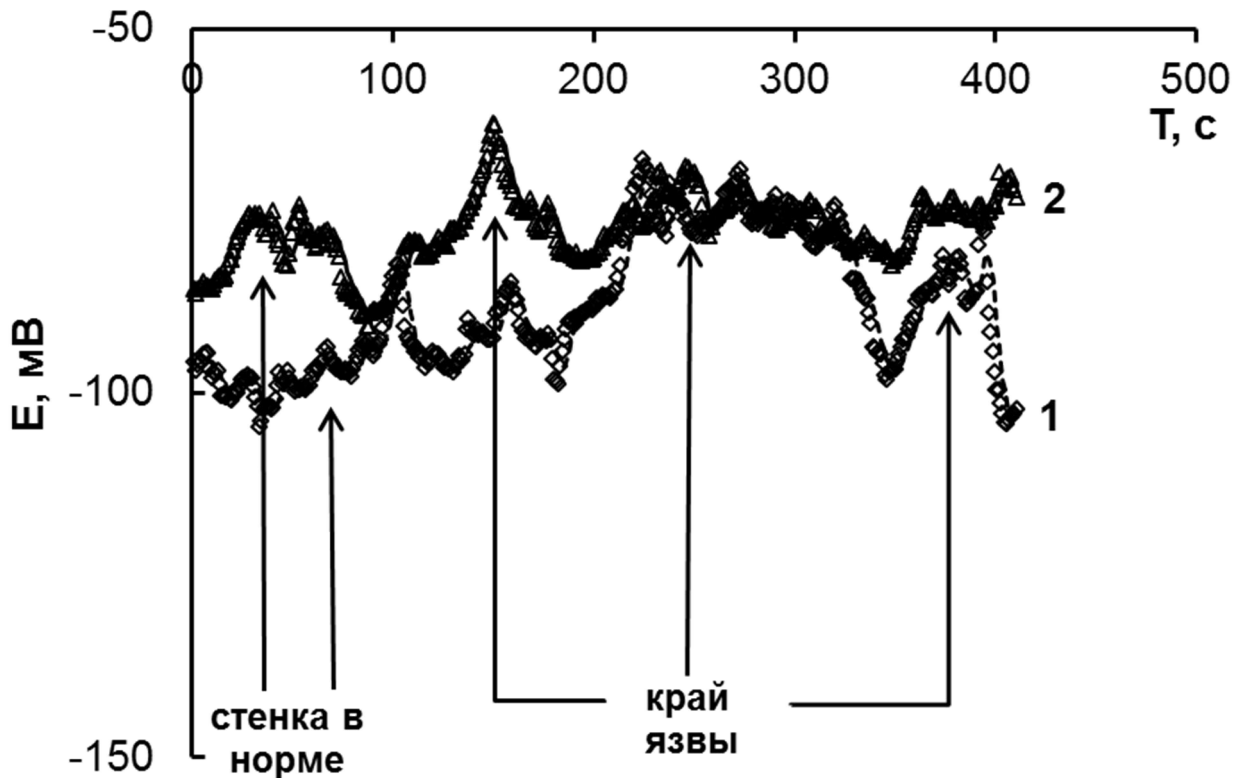


Рисунок 3.50 – Мониторинг ПРЦ стенки желудка пациентов М. (1) и пациента С. (2) с положительной динамикой.

Применение метода измерения ПРЦ стенки ЖКТ с помощью разработанного датчика открывает возможность не только диагностики наличия патологических изменений стенки ЖКТ, но и сможет помочь создать новый независимый критерий оценки состояния стенки в процессе лечения пациента, т.е. данные об изменении величин ПРЦ диагностируемых пораженных участков стенки пищевода, желудка и кишечника могут служить дополнительным критерием оценки качества проводимого лечения.

При исследовании патологий ЖКТ немаловажным является возможность измерения величины рН диагностируемых пораженных участков. В настоящее время для оценки величины рН в ЖКТ в основном используют так называемый «аспирационно-титрационный» метод, основанный на извлечении желудочного содержимого и последующего его тестирования, а также метод непосредственного определения кислотности с помощью соприкосновения измерительного электрода рН-метрического зонда со слизистой оболочкой [327]. Однако использование данных методов связано с рядом недостатков. Так при

использовании «аспирационно-титрационного» метода возникают сложности извлечения желудочного содержимого при небольшом его количестве и невозможность локального измерения рН пораженного участка. Что касается использования рН-метрического зонда с сурьмяным электродом, здесь имеются ограничения, связанные с тем, что сурьмяный электрод может быть использован лишь для приближенных определений рН в умеренно кислых и в нейтральных растворах [328]. Кроме того, использование внешнего электрода сравнения в имеющихся устройствах для измерения рН в желудке и желудочно-кишечном тракте снижает точность измерения.

Сравнение предлагаемого метода с имеющимися обнаруживает прежде всего такое очевидное преимущества нового метода, как возможность непосредственного определения кислотности в локальной точке пищевода, желудка или ЖКТ с помощью рН-метрического зонда. Более того, нами была разработана конструкция и изготовлен рабочий образец комбинированного датчика, включающий, как электрод для измерения ПРЦ, так и электрод для измерения кислотности среды. В качестве измерительного электрода для определения величины рН было предложено использовать вольфрам, который, как известно, обладает рН-зависимыми свойствами в водных средах [329] и уже нашел применение в качестве измерительного электрода для рН-метрии [330]. В качестве электрода сравнения, как и в описанном выше датчике, для измерения ПРЦ тестируемых участков стенки ЖКТ, использован серебряный электрод. Общий вид датчика представлен на рис. 3.51.

При исследовании модельных сред было показано, что потенциал данного электрода линейно снижается с увеличением рН ($-37,8 \text{ мВ/рН}$, $R^2 = 0,95$) (рис. 3.52).

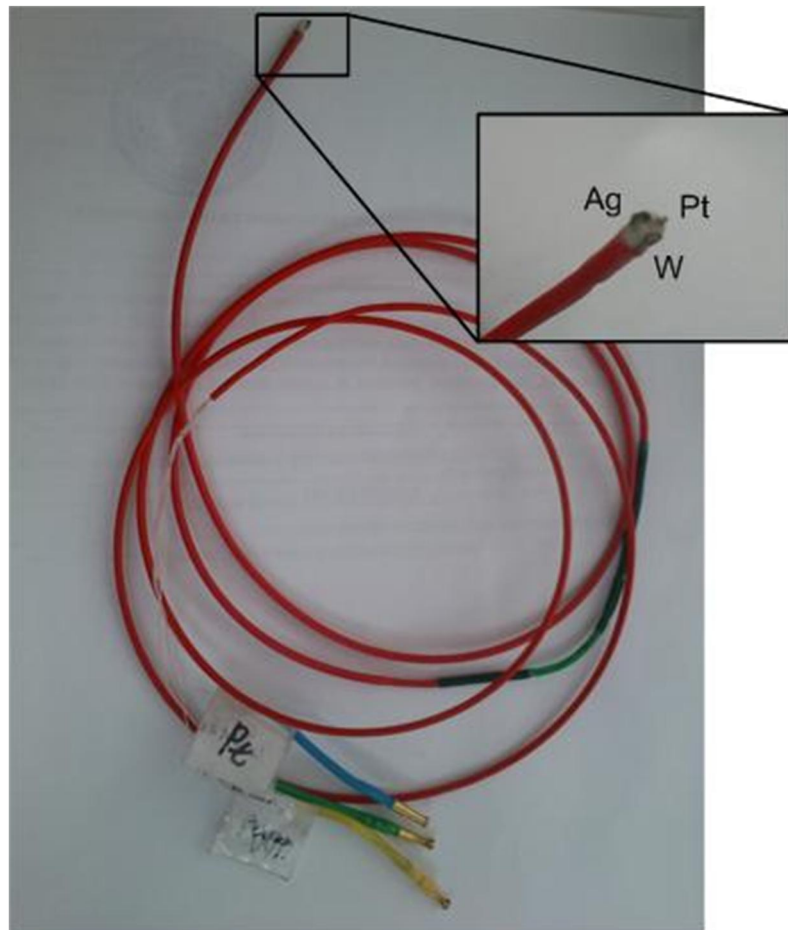


Рисунок 3.51 – Общий вид комбинированного датчика для измерения ПРЦ и рН в ЖКТ.

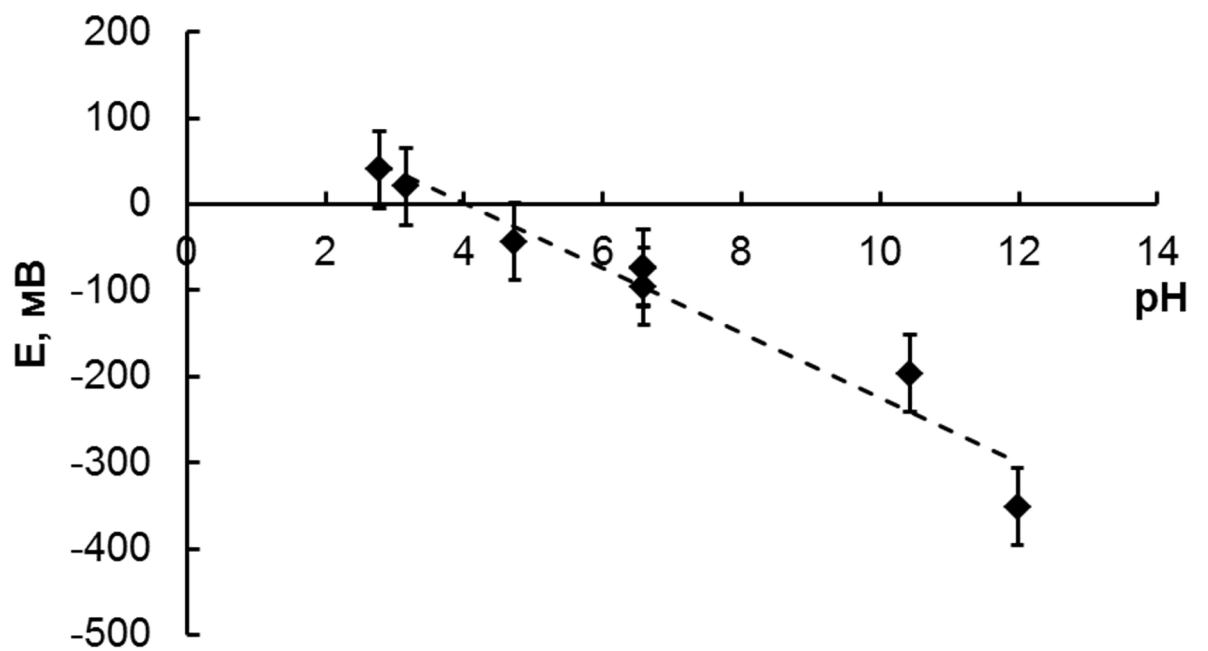


Рисунок 3.52 – Зависимость потенциал вольфрамового электрода от величины рН раствора.

Таким образом, была доказана применимость вольфрамового электрода для измерений рН в широкой области от 2,5 до 12 единиц рН. Эта область вполне соответствует задаче измерений рН в двенадцатиперстной кишке и желудке, поскольку эта область составляет диапазон рН от 1,5 до 7,9 ед. рН.

В целом, как следует из полученных результатов, можно сделать вывод о перспективности использования предложенных электрохимических датчиков для измерения ПРЦ стенки ЖКТ и рН в ЖКТ. Использование современных приборов для регистрации измерения потенциала измерительного электрода с визуальным контролем показаний датчика в режиме реального времени, открывает возможности создания портативных устройств, предназначенных для дополнительной диагностики состояния ЖКТ в условиях клинической практики.

3.4.2 Исследование новых электродных материалов с целью замены платины при измерении потенциала при разомкнутой цепи в биологических средах

Как уже было отмечено выше, для обеспечения воспроизводимости измерения ПРЦ с помощью платинового электрода необходимо проводить предварительную электрохимическую обработку электрода перед каждым измерением с целью очистки поверхности электрода от адсорбированных компонентов тестируемых сред и приведения состава поверхностных оксидов к определенному соотношению. Сложность анализа процессов, протекающих на поверхности платины, приводит к выводу о перспективности поиска нового электродного материала для измерения ПРЦ, процессы на котором являются менее сложными, что может привести к упрощению и ускорению методики предварительной обработки электрода. Помимо этого, следует обратить внимание на возможность увеличения чувствительности сигнала к изменению окислительно-восстановительных свойств тестируемой системы.

Наше внимание было обращено на оксидные электроды, а именно на электроды из оксида индия-олова [331], известного как ИТО (indium tin oxide).

Этот электрод представляет собой твердый раствор оксида индия (In_2O_3) и оксида олова (SnO_2), обычно 90% первого и 10% второго компонента [332]. Данный материал нашел широкое распространение в качестве биосенсоров [333], электродов для измерения pH [334, 335], электрода, используемого в солнечных батареях [336, 337], покрытия жидкокристаллических мониторов [338] и др. Однако в доступной литературе не обнаружены попытки использовать ИТО электроды для измерений ПРЦ.

Испытания ИТО электрода в качестве электрода для измерений величины ПРЦ были проведены на стеклянных пластинах, покрытых пленкой ИТО (производитель Praezisions Glas & Optik GmbH, Германия). В качестве токоподвода использовали терморасширенный графит (ТРГ), который прижимали к поверхности электрода с помощью винтового зажима (рис. 3.53).

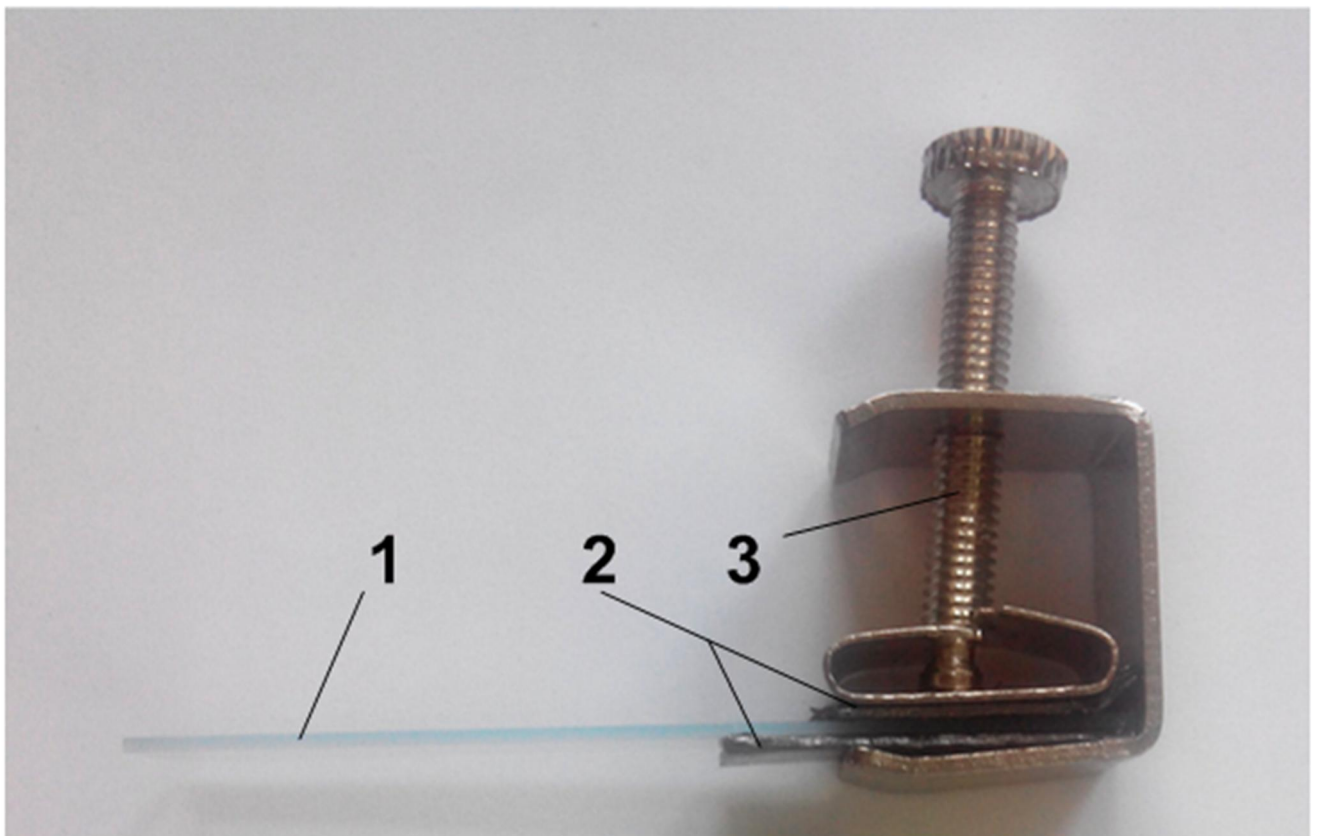


Рисунок 3.53 – Общий вид электрода с зажимом. 1 – ИТО электрод, 2 – токоподвод из ТРГ, 3 – винтовой зажим.

Для предварительной обработки ИТО было предложено использовать циклическую потенциодинамическую обработку, как и в случае платины. Однако при подборе условий предварительной обработки, необходимо было учитывать вероятность восстановления оксидов в определенной катодной области потенциалов, что могло бы привести к разрушению оксидного покрытия или выраженному изменению его свойств из-за частичного или полного восстановления оксидного электрода. Поэтому было решено ограничить диапазон развертки в катодной области величиной потенциала -300 мВ и исключить использование для предварительной обработки растворов восстановителей, в частности сульфита натрия. При подборе условий предварительной обработки была выбрана циклическая потенциодинамическая обработка в $0,1$ М растворе Na_2SO_4 в диапазоне потенциалов от -300 до $+500$ мВ (х.с.э.) в течение 50 циклов со скоростью развертки потенциала 500 мВ/с, а затем в диапазоне потенциалов от $+250$ до $+270$ мВ (х.с.э.) в течение 50 циклов со скоростью развертки потенциала 500 мВ/с (рис. 3.54). Эта обработка приводила к стабилизации значения потенциала ИТО электрода при разомкнутой цепи в водном растворе $0,1$ М Na_2SO_4 , который был выбран нами в качестве контроля, на уровне 234 ± 5 мВ (рис. 3.55).

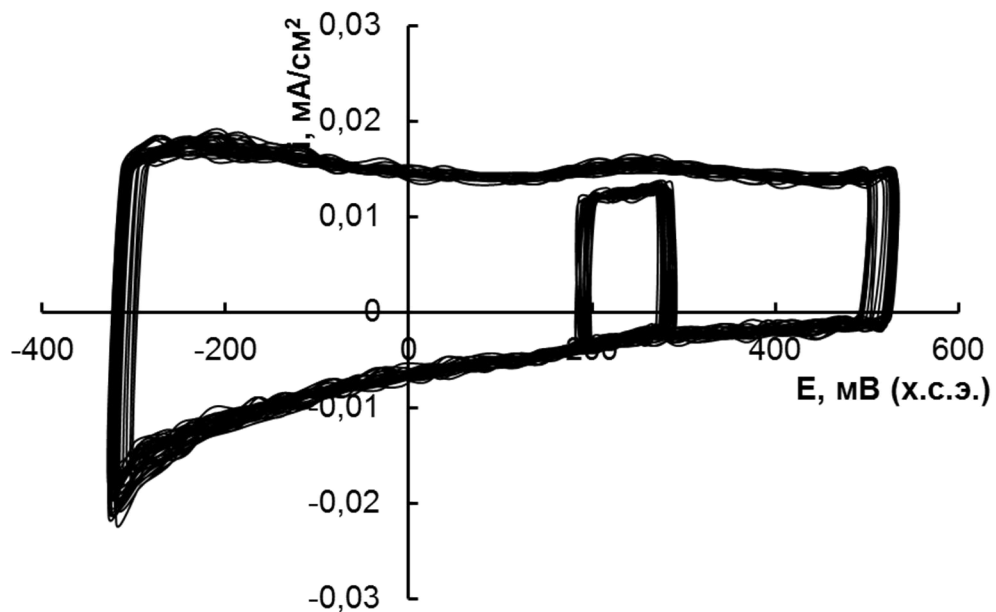


Рисунок 3.54 – Циклическая вольтамперограмма обработки ИТО электрода в $0,1$ М Na_2SO_4 .

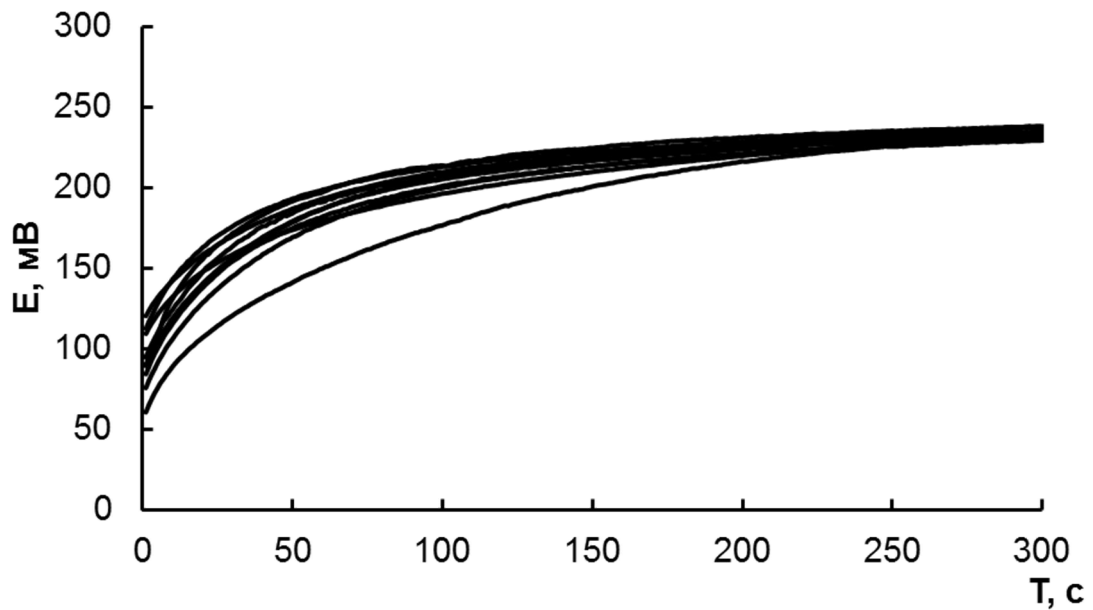


Рисунок 3.55 – Проверка ПРЦ ИТО электрода в 0,1 М Na₂SO₄ (n = 10).

При статистической обработке полученных данных при уровне значимости более 95% были рассчитаны стандартное отклонение и стандартная ошибка измерения, которые составили 2,65 и 0,84, соответственно (табл. 3.11).

Таблица 3.11 – Данные по статистической обработке результатов измерения ПРЦ ($p \leq 0,05$)

N	ПРЦ, мВ	ПРЦ _{ср} , мВ	S, мВ	SE, мВ
1	238,05	233,00	2,65	0,84
2	231,15			
3	229,43			
4	233,28			
5	233,40			
6	233,62			
7	237,70			
8	235,42			
9	234,65			
10	233,28			

Полученные величины S и SE позволяют сделать вывод о хорошей воспроизводимости результатов, полученных с помощью испытанных ИТО электродов и правильности выбора граничных условий, скорости сканирования и количества циклов сканирования потенциала для разработанной нами предварительной электрохимической обработки электрода.

Используя разработанную методику предобработки ИТО электродов, мы исследовали возможности использования ИТО электродов для измерения ПРЦ в биологических средах. Для этого были проведены измерения величин ПРЦ ИТО электродов в сыворотке крови практически здоровых добровольцев. Сыворотку крови получали из цельной крови 18 практически здоровых людей добровольцев в возрасте 19-40 лет (15 мужчин, 3 женщин). Каждый образец сыворотки крови разделяли на две пробы и проводили измерение ПРЦ с помощью платинового и ИТО электродов. После каждого измерения в биологической среде ИТО электрод промывали в растворе 0,1 М NaOH согласно [339].

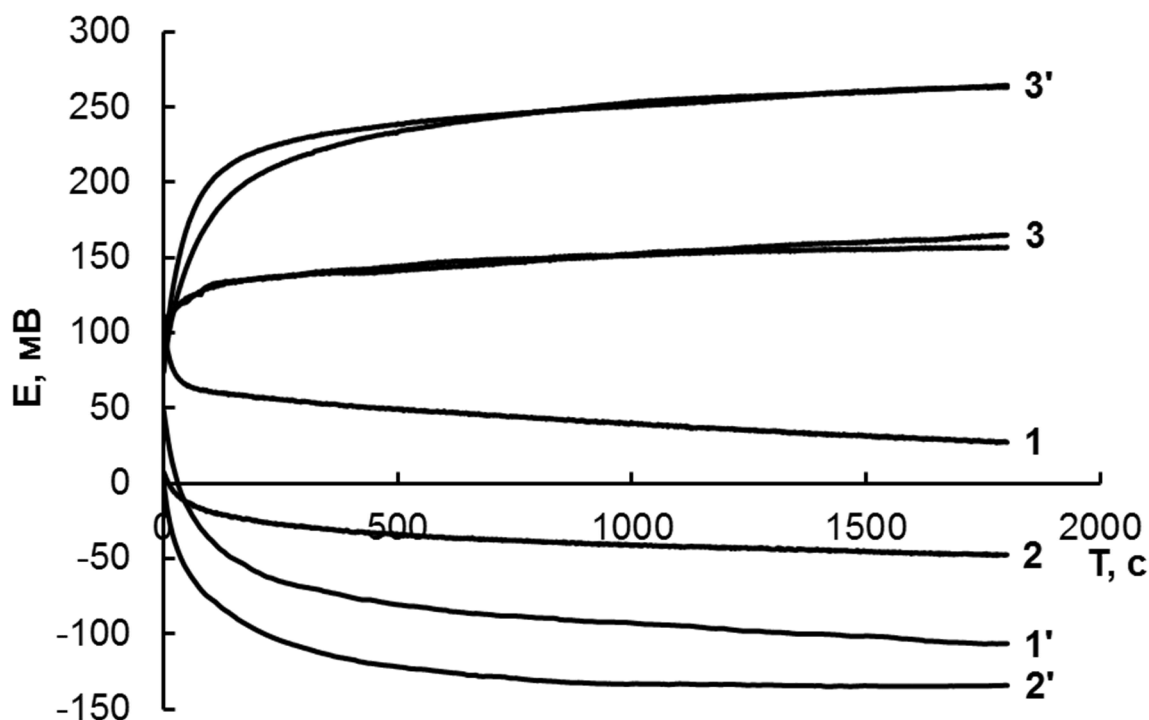


Рисунок 3.56 – Зависимость потенциала от времени платинового (1,2,3) и ИТО (1',2',3') электродов в: 1,1' – сыворотка крови пациента А., 2,2' – сыворотка крови пациента Б.; 3,3' – 0,1 М раствор Na₂SO₄ перед измерениями в сыворотке.

При сравнении данных величин ПРЦ, полученных на платиновом и ИТО электродах в одних и тех же средах (рис. 3.56), оказалось, что формы кривых для обоих электродов близки, направления откликов совпадают, как для водных растворов, так и для сыворотки крови реального пациента. Важно, что величина отклика для сыворотки крови на ИТО электроде более чем в два раза превышает величину отклика на платиновом электроде, что свидетельствует о более высокой чувствительности оксидного электрода по сравнению с платиновым.

Анализ зависимостей ПРЦ от времени, полученных в сыворотке крови практически здоровых людей, показал, что разница величин ПРЦ, измеренных на платиновом и ИТО электродах составила $48,8 \pm 10,9$ мВ (рис. 3.57).

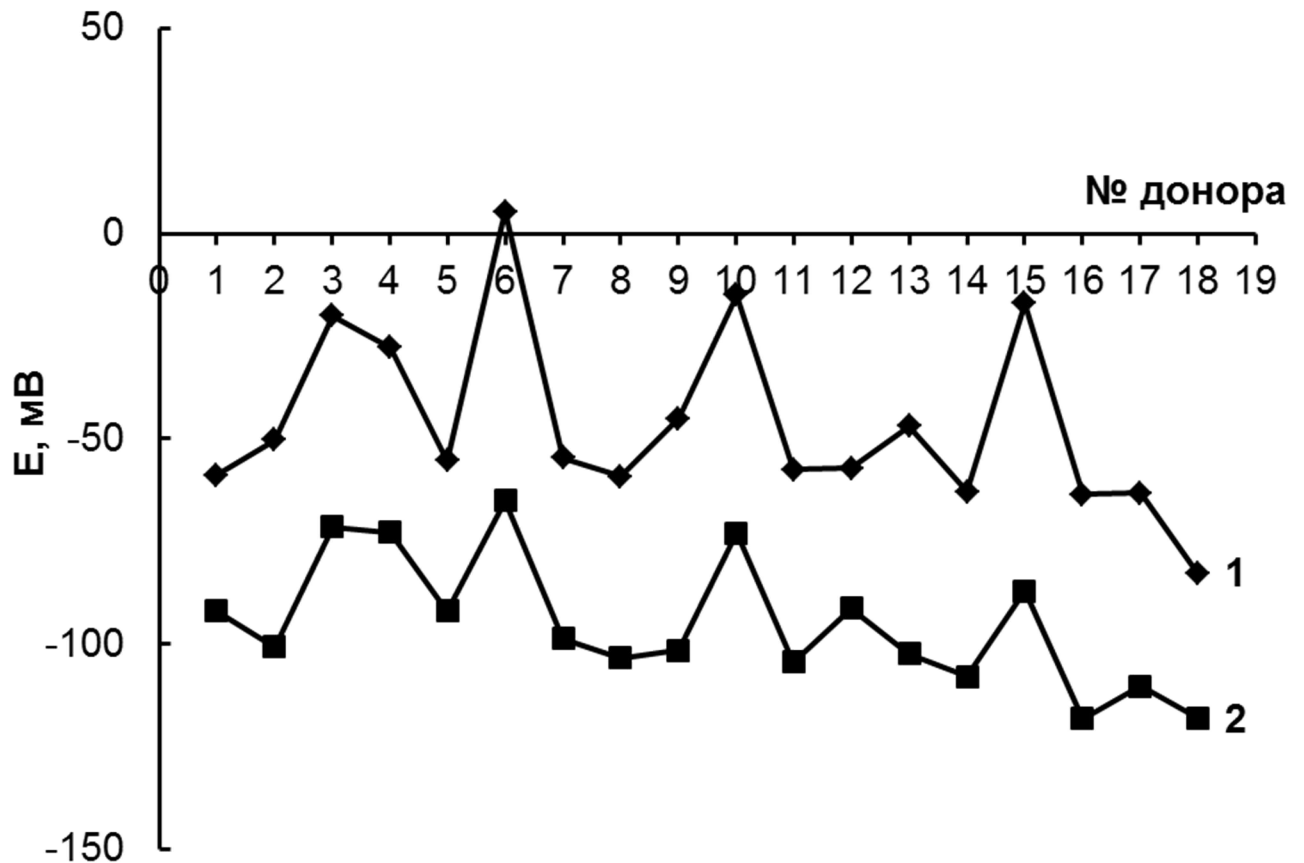


Рисунок 3.57 – Сравнение величины ПРЦ в сыворотке практически здоровых людей. 1 – Pt электрод, 2 – ИТО электрод.

Таким образом, величины ПРЦ, измеренные на ИТО электроде в биологических средах, являются более отрицательными по сравнению с теми же величинами, измеренными на платиновом электроде. В то же время измерения в водном растворе сульфата натрия показали обратную картину. Вероятно, этот эффект можно объяснить большей реакционной активностью смешанных оксидов индия и олова, как по отношению к антиоксидантам, содержащимся в сыворотке крови, так и по отношению к молекулярному кислороду, растворенному в водных растворах сульфата натрия.

В целом, исходя из представленных выше данных, можно сделать вывод о перспективности применения электрода ИТО для анализа биологических сред, поскольку данный электрод позволяет получать воспроизводимые данные, а кроме того обладает более высокой чувствительностью по отношению к окислительно-восстановительному компоненту гомеостаза по сравнению с платиновым электродом.

4 Измерение антиоксидантной активности биологических сред

Одним из перспективных направлений в настоящее время является разработка электрохимических методов определения антиоксидантной активности. Преимуществами электрохимических методов являются простота, экспрессность, высокая точность. Электрохимические методы позволяют проводить как прямое, так и косвенное (с использованием медиатора) определение концентрации антиоксидантов. Однако в большинстве случаев предлагаемые исследователями методы, обладающие хорошими характеристиками при анализе модельных водных растворов антиоксидантов, оказываются несостоятельными при анализе биологических сред. Данное явление можно объяснить сложностью состава и процессов, протекающих в биологических средах, что требует особых подходов к решению проблемы определения антиоксидантов, включающих понимание гомеостатических окислительно-восстановительных процессов, учета проблем взаимодействия рабочего электрода с компонентами биологической среды как путем реакций с поверхностью электрода, так и адсорбцией на поверхности электрода белков, ферментов и других природных соединений, входящих в состав тестируемой биологической среды.

В настоящее время интерес к методам определения антиоксидантной активности в биологических средах обусловлен необходимостью разработки новых электрохимических сенсоров, развивающих свойства чувствительности и селективности сенсора, а с другой стороны интерес исследователей также направлен сегодня на разработку простых, дешевых и экспрессных электрохимических методов косвенного анализа различных компонентов гомеостаза.

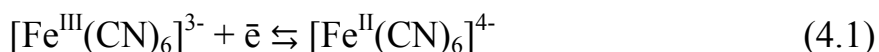
В рамках настоящей работы создание электрохимического метода определения уровня антиоксидантов в плазме и сыворотке крови представлялось весьма полезным в качестве дополнения к электрохимическому методу определения так называемых «редокс» потенциалов, или, точнее, методу

определения потенциалов при разомкнутой цепи. Электрохимический метод определения уровня антиоксидантов мог бы дать весьма ценную дополнительную информацию для коррекции трактовки результатов измерений интегрального показателя работы окислительно-восстановительной системы организма ПРЦ в соответствии с величиной уровня антиоксидантов, которая выделит вклад восстановительной части редокс системы.

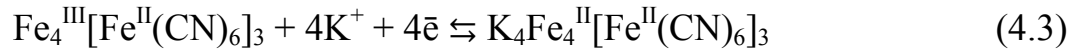
4.1 Разработка метода определения антиоксидантной активности на электродах, модифицированных гексацианоферратами

Среди электрохимических сенсоров привлекают внимание материалы, которые могут быть получены электрохимическим путем, поскольку это позволяет более тонко регулировать характеристики получаемых активных материалов, лежащих в основе работы электрохимического сенсора. В частности, к таким материалам относят гексацианоферраты $M[Fe(CN)_6]$ (МНСФ), где М может быть ионом Fe [340, 341], Co [342-344], Ni [345-347], Cu [348, 349], Zn [350], Cd [351], Ru [352], V [353], Pd [354], In [355] и другие. Кроме того, могут быть получены гексацианоферраты содержание одновременно несколько ионов, как, например, в соединениях типа $CuCo[Fe(CN)_6]$ [356].

Считается, что процесс электроосаждения МНСФ в большинстве случаев протекает в несколько стадий. На примере электрохимического получения Берлинской лазури можно представить механизм электрохимического получения пленок на основе гексацианоферратов (4.1-4.3):



При этом в процессе электровосстановления пленки происходит внедрение в кристаллическую решетку иона щелочного металла для компенсации заряда, в то время как при электроокислении ион катиона выходит из решетки [340]:



В общем случае, слой гексацианоферрата переходного металла выступает в роли медиатора в электродном процессе. Данное взаимодействие можно проиллюстрировать схемой (рис. 4.1).

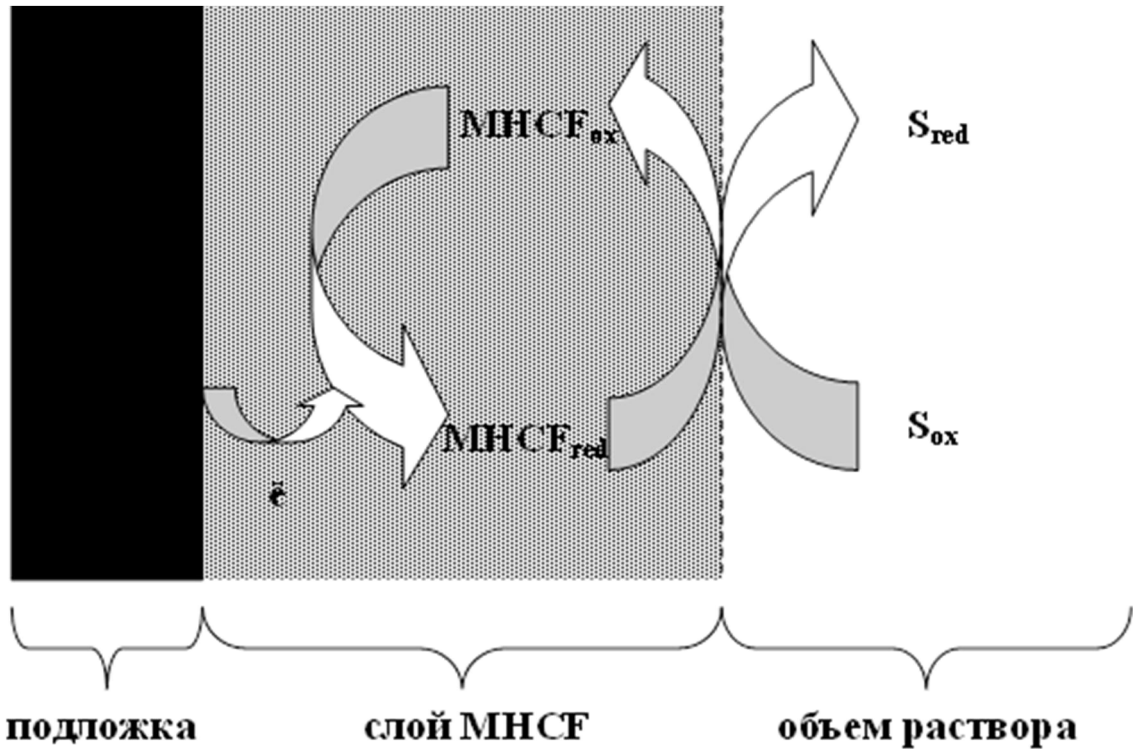
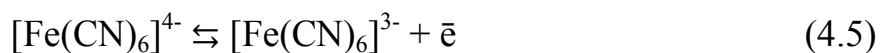
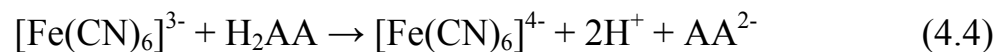


Рисунок 4.1 – Схема взаимодействия гексацианоферрата с субстратом.

При взаимодействии с антиоксидантами (например, аскорбиновой кислотой (H_2AA)) происходит восстановление пленки, что, в свою очередь, может быть зафиксировано электрохимически:



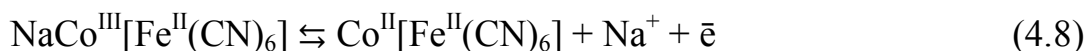
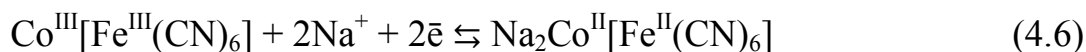
Именно благодаря своим медиаторным свойствам, пленки гексацианоферратов переходных металлов нашли широкое применение в качестве сенсоров.

Нами было решено исследовать сенсоры на основе электросинтезированных пленок гексацианоферратов кобальта и никеля, поскольку данные материалы уже нашли применение в качестве электрохимических сенсоров для определения антиоксидантов в водных растворах [357].

4.1.1 Электросинтез пленок NiHCF и CoHCF

Одной из особенностей электрохимического поведения гексацианоферратов является возможность замены одного вида катиона на другой с целью увеличения чувствительности сенсора [351, 358]. Поскольку биологические среды содержат 0,15 М NaCl, было предложено использовать указанные растворы хлорида натрия в качестве фонового электролита с целью минимизировать влияние замены иона при последующем использовании сенсора в биологических средах.

Стехиометрия протекающих реакций может быть представлена на примере CoHCF [359]:



О росте пленки на поверхности стеклоуглерода может свидетельствовать возрастание пиков окисления/восстановления на ЦВА (рис. 4.2).

После проведения электросинтеза с целью проверки характеристик полученного покрытия проводили потенциодинамическую обработку по методике [344] в 0,15 М растворе NaCl в течение 10 циклов в диапазоне потенциалов от -400 до +1000 мВ (х.с.э.) при скорости развертки потенциала 250 мВ/с (рис. 4.3).

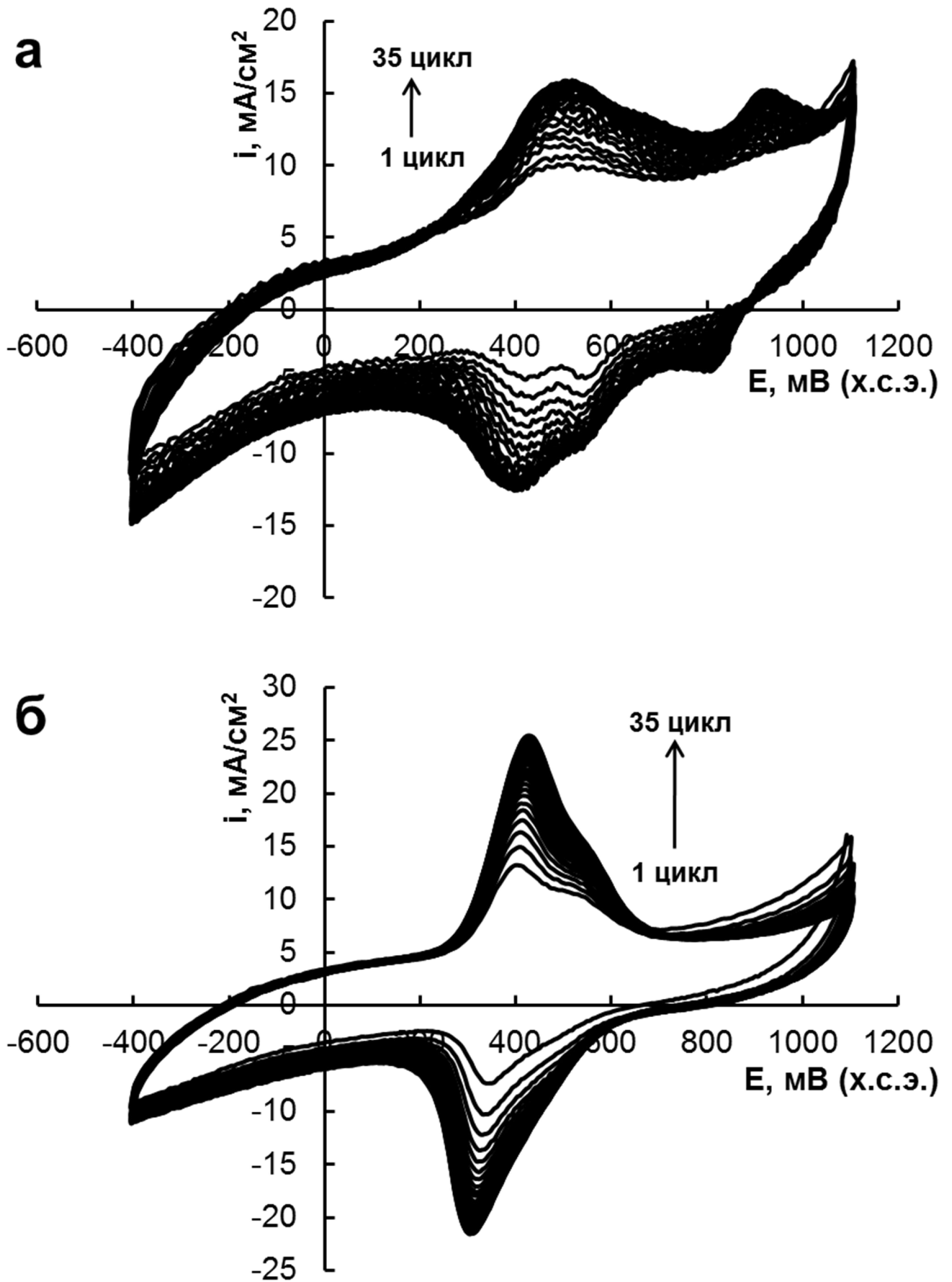


Рисунок 4.2 – Циклические вольтамперограммы электрохимического синтеза CoHCF (а) и NiCHF (б).

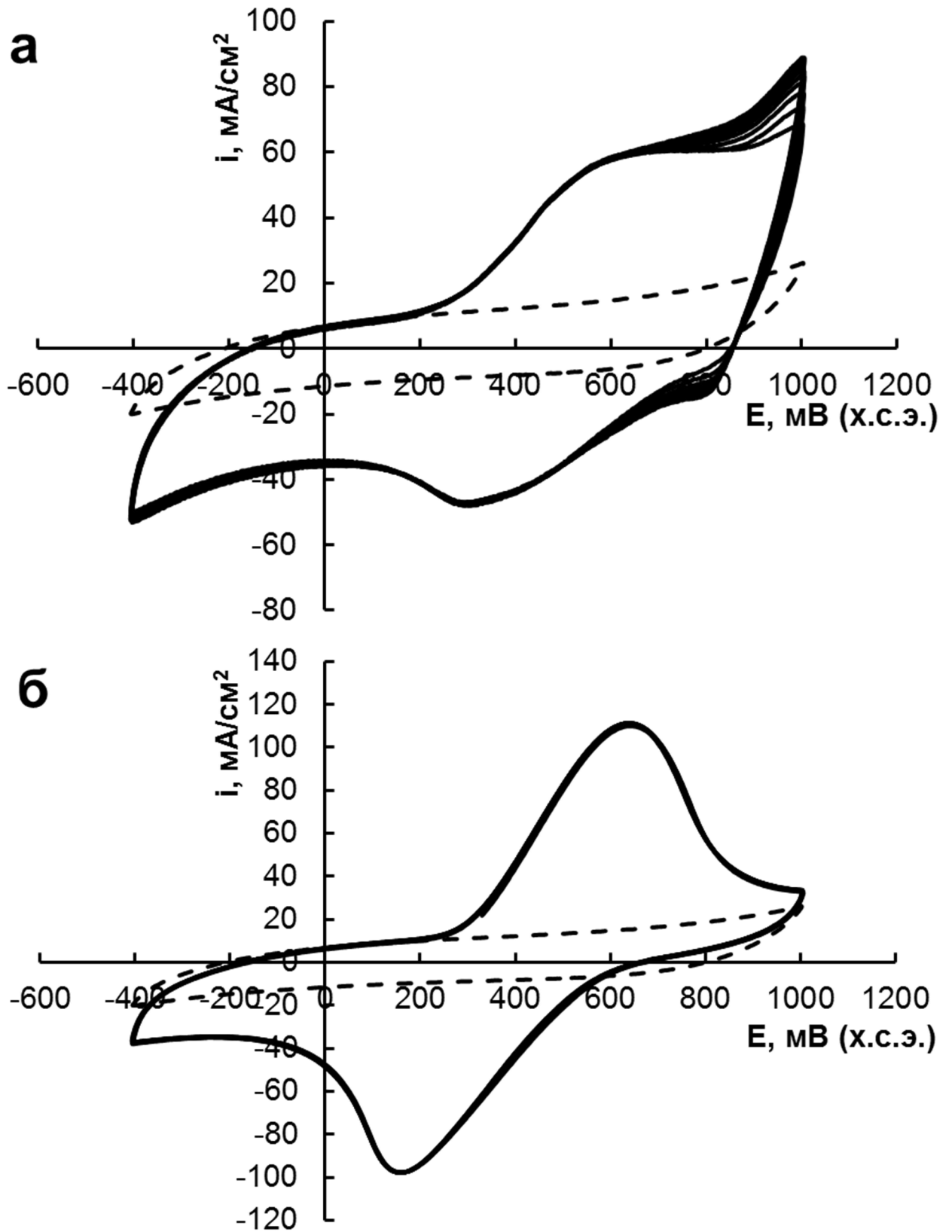


Рисунок 4.3 – Циклическая вольтамперограмма стеклоуглерода с покрытием CoHCF (а) и NiHCF (б). Пунктир – чистый стеклоуглерод.

4.1.2 Исследование водных растворов антиоксидантов

Вначале было исследовано электрохимическое поведение модифицированных электродов в водных растворах антиоксидантов. Известно, что концентрация аскорбиновой кислоты в крови находится в диапазоне $6 \cdot 10^{-6} \div 1 \cdot 10^{-4}$ М [360]. Поскольку выбранный нами диапазон концентраций должен охватывать физиологические пределы концентраций антиоксидантов, в качестве модели использовали физиологический раствор (водный раствор 0,15 М NaCl), содержащий смесь аскорбиновой кислоты ($1,42 \cdot 10^{-6} \div 1,42 \cdot 10^{-3}$ М) и рутина ($4,10 \cdot 10^{-7} \div 4,10 \cdot 10^{-4}$ М) в соотношении 1:1. Исследование водных растворов проводилось в режиме ЦВА в диапазоне потенциалов от -200 до +1000 мВ (х.с.э.) при скорости развертки потенциала 250 мВ/с.

При использовании электродов, модифицированных пленками NiHCF, в модельных растворах антиоксидантов было обнаружено, что увеличение концентрации антиоксидантов сопровождается увеличением тока в области анодного пика $\sim +650$ мВ (рис. 4.4).

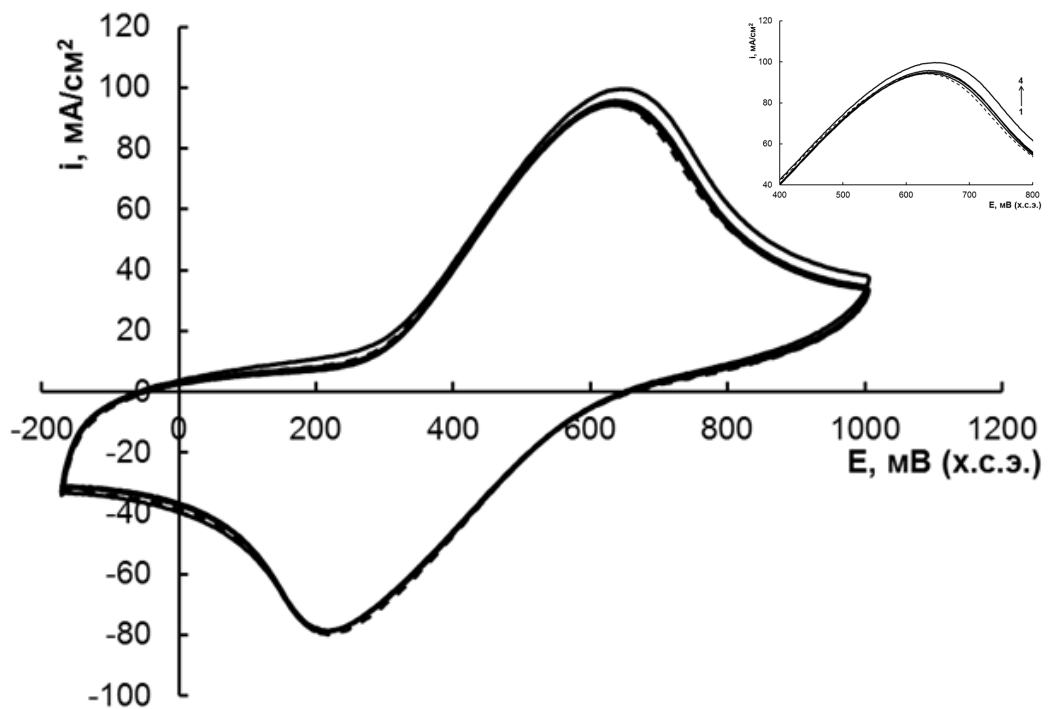


Рисунок 4.4 – Циклическая вольтамперограмма стеклоуглерода с покрытием NiHCF в водных растворах антиоксидантов с концентрацией, М: 1 – $1,83 \cdot 10^{-6}$; 2 – $1,83 \cdot 10^{-5}$; 3 – $1,83 \cdot 10^{-4}$; 4 – $1,83 \cdot 10^{-3}$. Пунктирная линия – 0,15 М NaCl.

При построении полулогарифмической зависимости концентрации антиоксидантов от плотности тока (рис. 4.5) оказалось, что линейный характер зависимости наблюдается в диапазоне концентраций $10^{-6} \div 10^{-4}$ М. При более высокой концентрации зависимость становится нелинейной. Кроме того, поскольку электролит для модифицирования электрода оказался нестойким, невозможно получить качественное покрытие на электроде. В связи с этим дальнейшее исследование электродов, модифицированных пленками NiCHF, было прекращено.

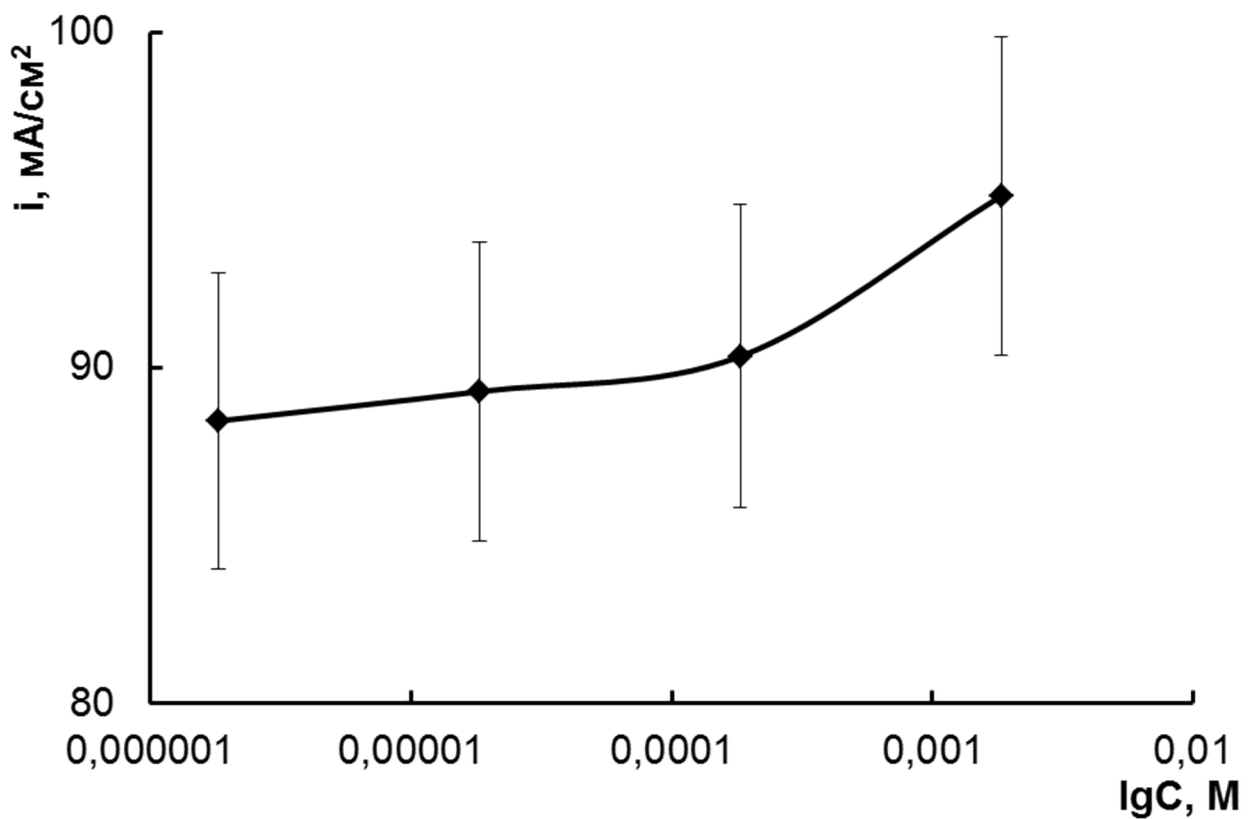


Рисунок 4.5 - Зависимость плотности тока на модифицированном NiCHF электроде от концентрации антиоксидантов.

Дальнейшие эксперименты показали, что электроды, модифицированные пленками CoHCF, оказались более пригодными для определения антиоксидантов в водных растворах. Однако было обнаружено, что, в отличие от NiHCF, с увеличением концентрации антиоксидантов в исследованном диапазоне концентраций отмечается снижение тока (рис. 4.6).

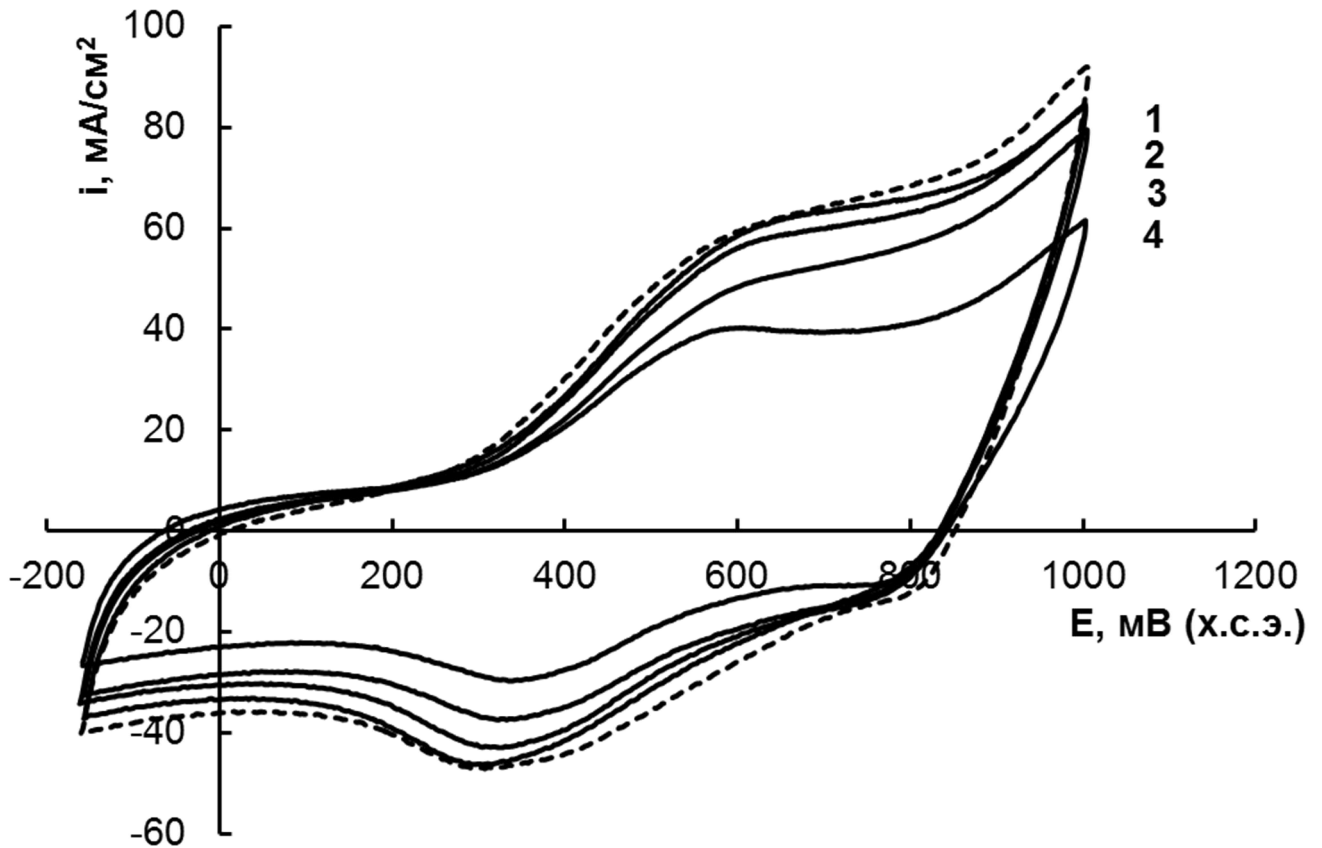


Рисунок 4.6 – Циклическая вольтамперограмма стеклоуглерода с покрытием CoHCF в водных растворах антиоксидантов с концентрацией, моль/л: 1 – $1,83 \cdot 10^{-6}$; 2 – $1,83 \cdot 10^{-5}$; 3 – $1,83 \cdot 10^{-4}$; 4 – $1,83 \cdot 10^{-3}$. Пунктирная линия – 0,15 М NaCl .

Вероятно, при использовании электрода, модифицированного производными кобальта, происходит взаимодействие антиоксидантов с пленкой CoHCF , что приводит к снижению ее электрохимической активности. Отметим, что обработка электрода по методике, описанной выше (потенциодинамическое сканирование в 0,15 М растворе NaCl в течение 10 циклов в диапазоне потенциалов от -400 до +1000 мВ при скорости развертки потенциала 250 мВ/с), возвращало электрод к исходному состоянию (рис. 4.7).

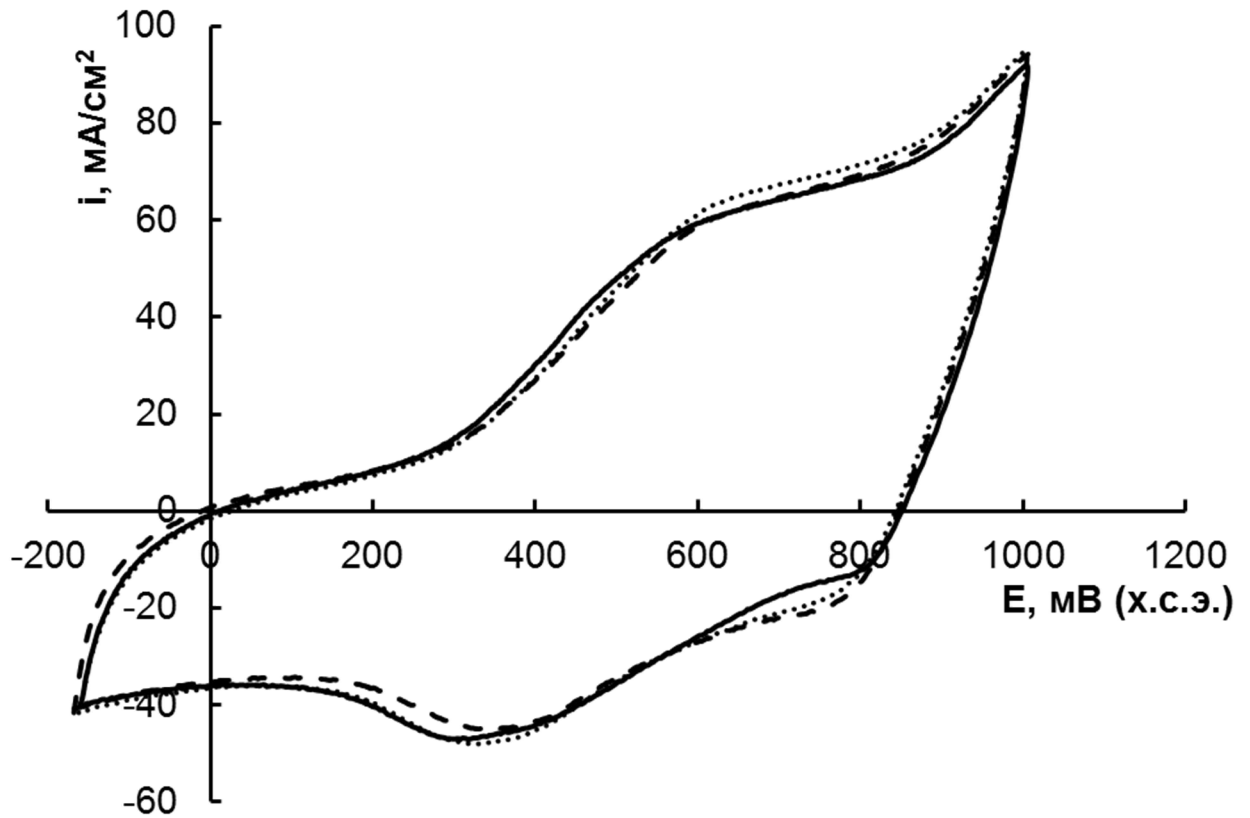


Рисунок 4.7 – Циклическая вольтамперограмма стеклоуглерода с покрытием CoHCF в 0,15 М NaCl после 1 (—), 5 (- -) и 10 (···) измерений в растворе антиоксидантов.

В качестве точки отчета было предложено использовать величину анодного пика при потенциале +600 мВ. Таким образом, была получена полулогарифмическая зависимость концентрации антиоксидантов от плотности тока (рис. 4.8). Однако чтобы учесть возможное снижение активности модифицированного электрода целесообразнее оперировать величиной разницы между плотностью тока в фоновом электролите и анализируемом растворе. С учетом этого допущения, была получена скорректированная зависимость концентрации антиоксидантов от плотности тока (рис. 4.9). При этом было получено уравнение (4.9) ($R^2 = 0,9994$), которое можно использовать для расчета концентрации антиоксидантов в растворе:

$$C = e^{(\Delta i - 35,631)/2,6535} \quad (4.9)$$

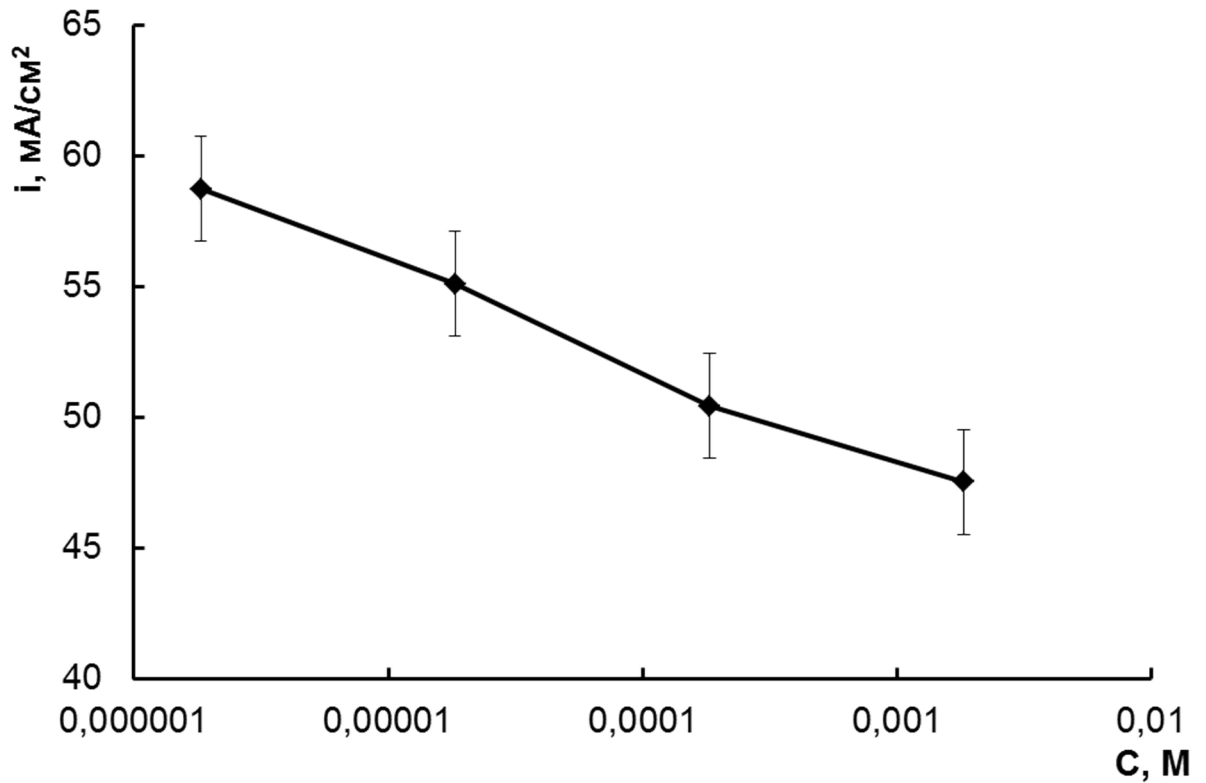


Рисунок 4.8 – Зависимость плотности тока на модифицированном CoCHF электроде от концентрации антиоксидантов.

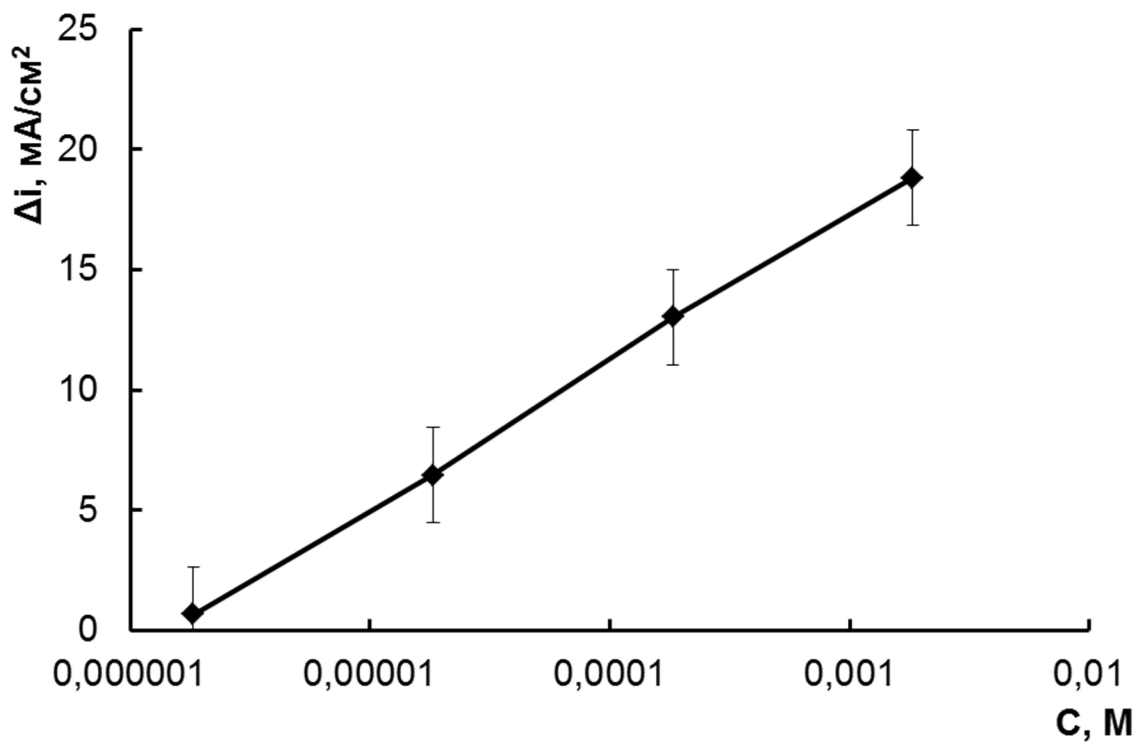


Рисунок 4.9 – Зависимость разницы плотности тока фона и анализируемого раствора на модифицированном CoCHF электроде от концентрации антиоксидантов.

Таким образом, при проведении исследований электродов, модифицированных пленками CoHCF , в водных растворах антиоксидантов была обнаружена линейная зависимость электрохимических параметров (величина разницы между плотностью тока в фоновом электролите и анализируемом растворе) и концентрацией антиоксидантов в исследуемом диапазоне концентраций.

4.1.3 Применение модифицированных электродов для анализа биологических образцов

Одной из проблем при проведении электрохимических исследований в биологических средах, как уже говорилось выше, является сложность их состава. На поверхности электрода при его погружении в биологическую среду возможно протекание процессов адсорбции компонентов анализируемой среды (например, белков). Кроме того, при внешней поляризации адсорбция может усиливаться, что в свою очередь может сказаться на воспроизводимости результатов измерения.

В связи с этим, прежде всего необходимо было исследовать влияние биологической среды на воспроизводимость результатов измерений.

С целью снижения влияния компонентов биологической среды, нами было предложено разбавлять анализируемый образец в 10 раз физиологическим раствором.

Исследование проводили в плазме крови, которая была получена из цельной крови 15 практически здоровых людей добровольцев (9 мужчин и 6 женщин). Объем образцов для исследования составлял 2 мл. После каждого измерения проводилась обработка в 0,15 М растворе NaCl с целью возвращения электрода к исходному состоянию. Таким образом, в связи с разбавлением, в формулу для расчета концентрации антиоксидантов (4.9) вводится поправочный коэффициент:

$$C = 10 \cdot e^{(\Delta i - 35,631)/2,6535} \quad (4.10)$$

Было обнаружено, что при исследовании растворов, содержащих плазму крови, наличие биологической среды не приводит к существенному снижению активности модифицированного электрода (рис. 4.10). Так, после 10 последовательных экспериментов в растворах, содержащих плазму крови, снижение активности модифицированного электрода не превышает 5%.

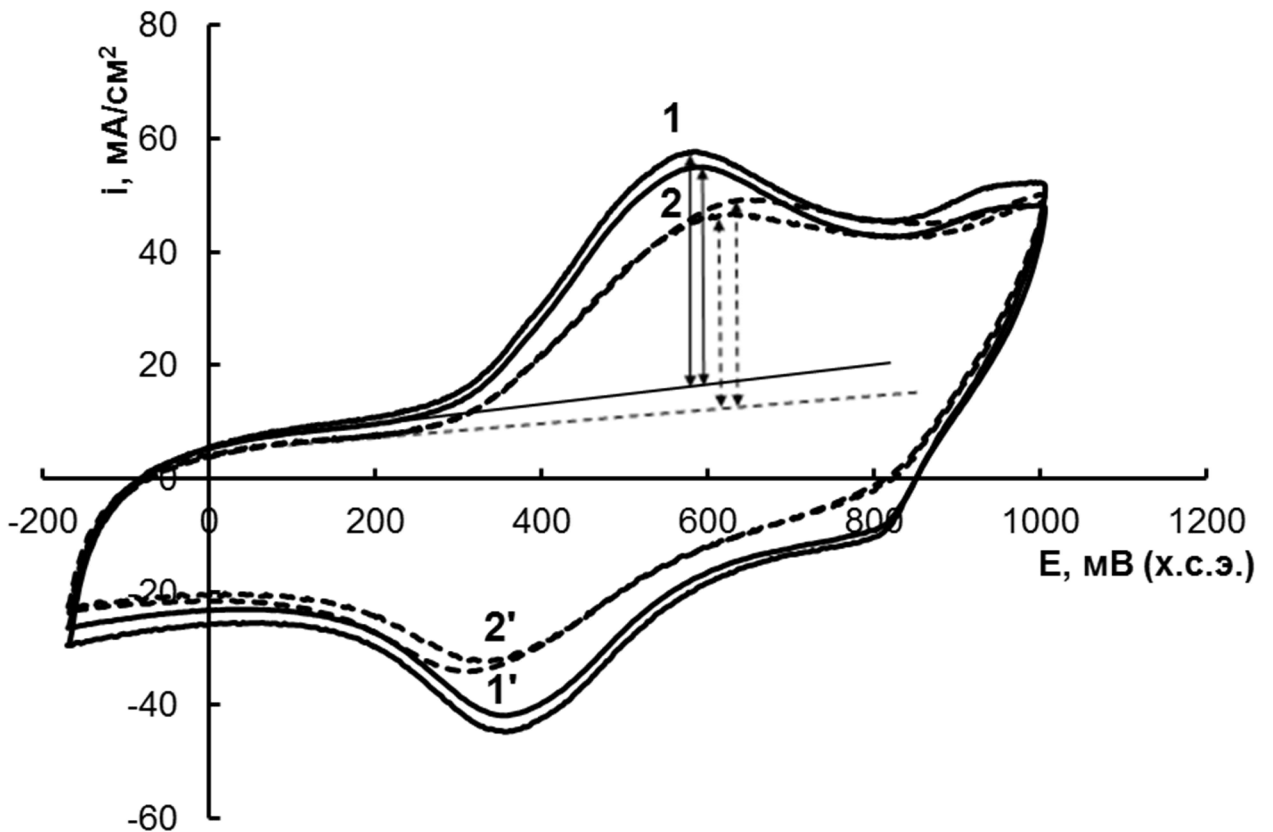


Рисунок 4.10 – Циклическая вольтамперограмма стеклоуглерода с покрытием CoHCF в фоновом растворе (—) и анализируемом растворе плазмы крови (- -): 1,1' – 1-е измерение; 2,2' – 10-е измерение.

При исследовании плазмы крови практически здоровых людей (рис. 4.11) было обнаружено, что в большинстве случаев результаты измерения концентрации антиоксидантов лежат в указанном выше диапазоне концентраций, соответствующим физиологическим (нормальным) значениям для аскорбиновой кислоты $6 \cdot 10^{-6} \div 1 \cdot 10^{-4}$ М [360] (рис. 4.11, область между пунктирными линиями).

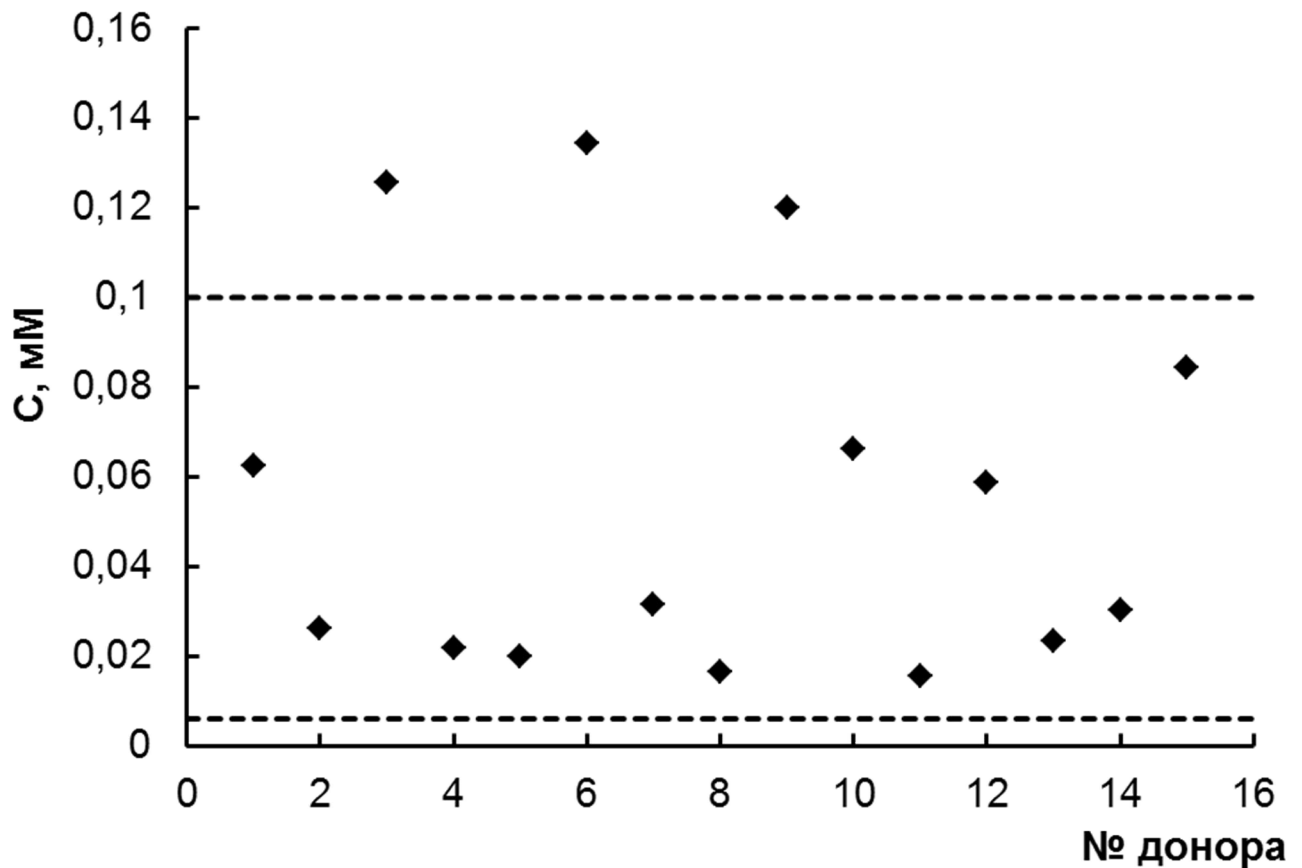


Рисунок 4.11 – Значение суммарной концентрации антиоксидантов практически здоровых людей ($n = 15$). Область между пунктирными линиями – диапазон физиологических значений концентрации аскорбиновой кислоты.

Можно сделать вывод, что предлагаемый электрохимический метод определения антиоксидантной активности биологических сред с помощью электрода, модифицированного пленкой гексацианоферрата кобальта, позволил получить данные об уровне антиоксидантов в плазме крови в хорошем согласии с данными, полученными стандартным колориметрическим методом.

4.2 Разработка метода определения антиоксидантной активности с помощью медиатора

В качестве альтернативы имеющимся методам, а также методу прямого определения антиоксидантной активности в биологических средах с помощью электрода, модифицированного пленкой CoHCF , было решено разработать

электрохимический метод косвенного определения антиоксидантной активности в плазме крови с помощью медиатора. В качестве такого вещества было предложено использовать п-бензохинон, который уже нашел применение для определения витамина С в фармацевтических продуктах [361].

Суть метода заключается в определении исходной концентрации электрохимически активного бензохинона с помощью метода ЦВА и сравнении исходной концентрации бензохинона с его остаточной концентрацией после добавления к исходному раствору биологической среды, и взаимодействия бензохинона с антиоксидантами, содержащимися в биологической среде (рис. 4.12).

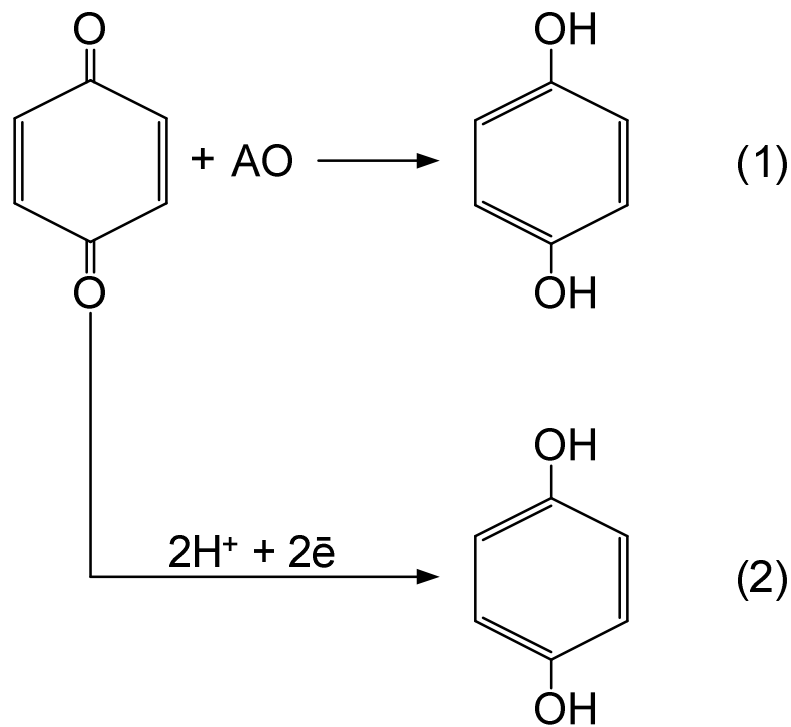


Рис. 4.12 – Схема реакций при определении антиоксидантной активности с помощью п-бензохинона.

4.2.1 Исследование водных растворов антиоксидантов

В качестве антиоксидантов были выбраны аскорбат натрия, кверцетин дигидрат и Тролокс. Антиоксидантная активность указанных соединений может быть выражена с помощью широко используемого стандарта – антиоксидантной

активности эквивалента Тролокса (ТЕАС) (табл. 4.1), т.е. концентрация Тролокса, необходимая для обеспечения такой же антиоксидантной активности, как раствор исследуемого соединения с концентрацией 1 мМ [303].

Таблица 4.1 – Активность антиоксидантов, выраженная в активности эквивалента Тролокса

Соединение	ТЕАС, мМ
Аскорбат натрия	0,99 [303]
Тролокс	1,00 [303]
Кверцетин дигидрат	2,13[362]

Известно [303], что антиоксидантная активность плазмы крови практически здоровых людей, выраженная в эквиваленте Тролокса, составляет $1,46 \pm 0,14$ мМ. Было понятно, что концентрация п-бензохинона должна превышать указанное значение концентрации Тролокса, чтобы охватить более широкий диапазон возможных концентраций антиоксидантов в организме. Поэтому, прежде всего, были исследованы растворы п-бензохинона в PBS в диапазоне концентраций $1 \cdot 10^{-2} \div 8 \cdot 10^{-5}$ М. Использование растворов п-бензохинона с более высокой концентрацией нецелесообразно в связи его малой растворимостью (1,5 г/100 мл [363]).

Для анализа использовали растворы, содержащие 4 мл PBS и 1 мл раствора п-бензохинона. Циклические вольтамперные кривые были сняты в диапазоне потенциалов от -600 до +800 мВ (х.с.э.) при скорости развертки потенциала 25 мВ/с (рис. 4.13).

Как видно из представленных на рис. 4.14 данных, на циклических вольтамперограммах отмечается характерный пик восстановления п-бензохинона при потенциале $\sim +150$ мВ (х.с.э.), который увеличивается с ростом концентрации п-бензохинона. Обнаружено, что величина катодного пика линейно зависит от концентрации п-бензохинона во всем диапазоне исследованных концентраций.

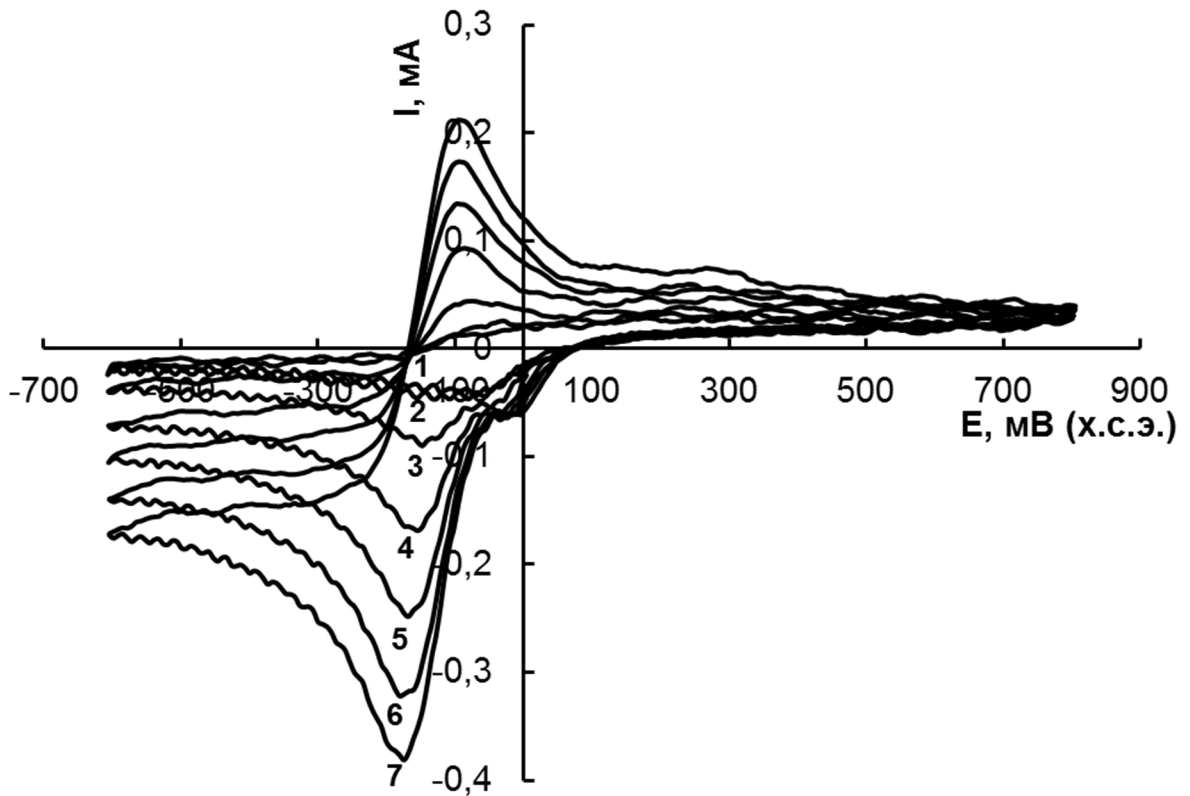


Рис. 4.13 – Циклические вольтамперограммы в растворах п-бензохинона с концентрацией, моль/л: 1 – $8 \cdot 10^{-4}$, 2 – $1 \cdot 10^{-3}$, 3 – $2 \cdot 10^{-3}$, 4 – $4 \cdot 10^{-3}$, 5 – $6 \cdot 10^{-3}$, 6 – $8 \cdot 10^{-3}$, 7 – $1 \cdot 10^{-2}$. Скорость развертки потенциала – 25 мВ/с.

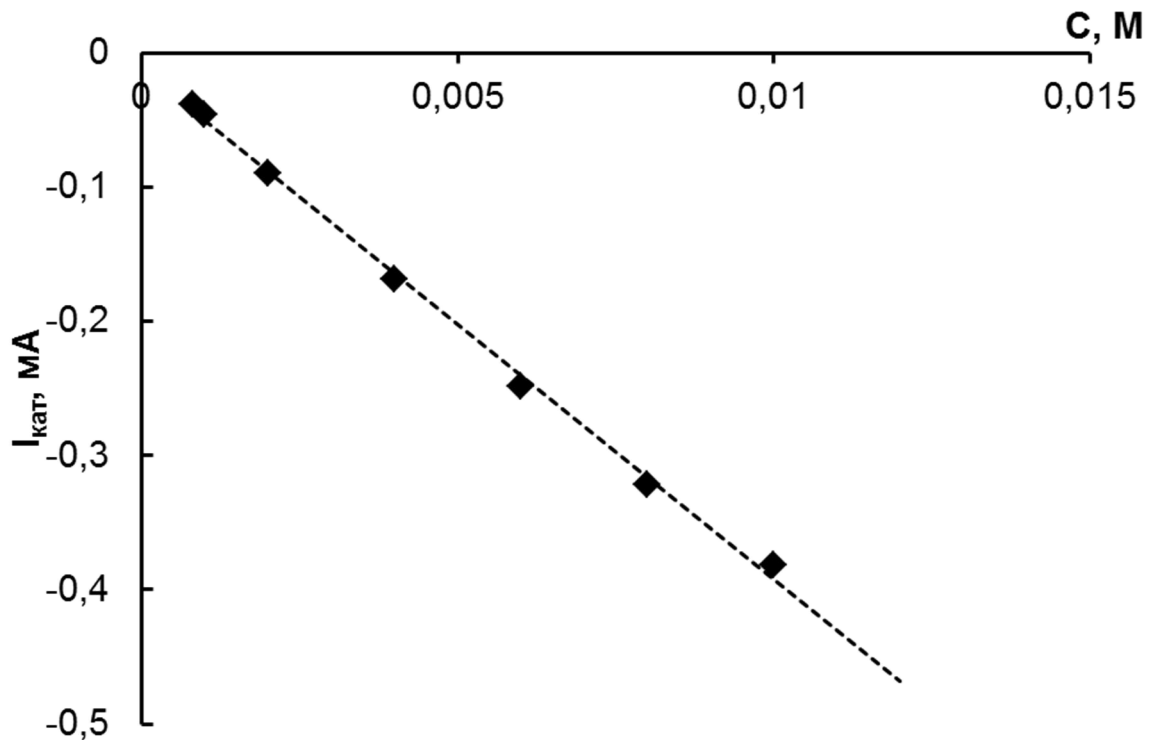


Рисунок 4.14 – Зависимость величин максимума катодного тока от концентрации п-бензохинона.

На основании этих данных в качестве рабочей была выбрана концентрация п-бензохинона $1 \cdot 10^{-2}$ М.

Важным для проведения анализа является выбор скорости развертки потенциала. Результаты исследования влияния скорости развертки потенциала на величину катодного пика восстановления п-бензохинона представлены на рис. 4.15.

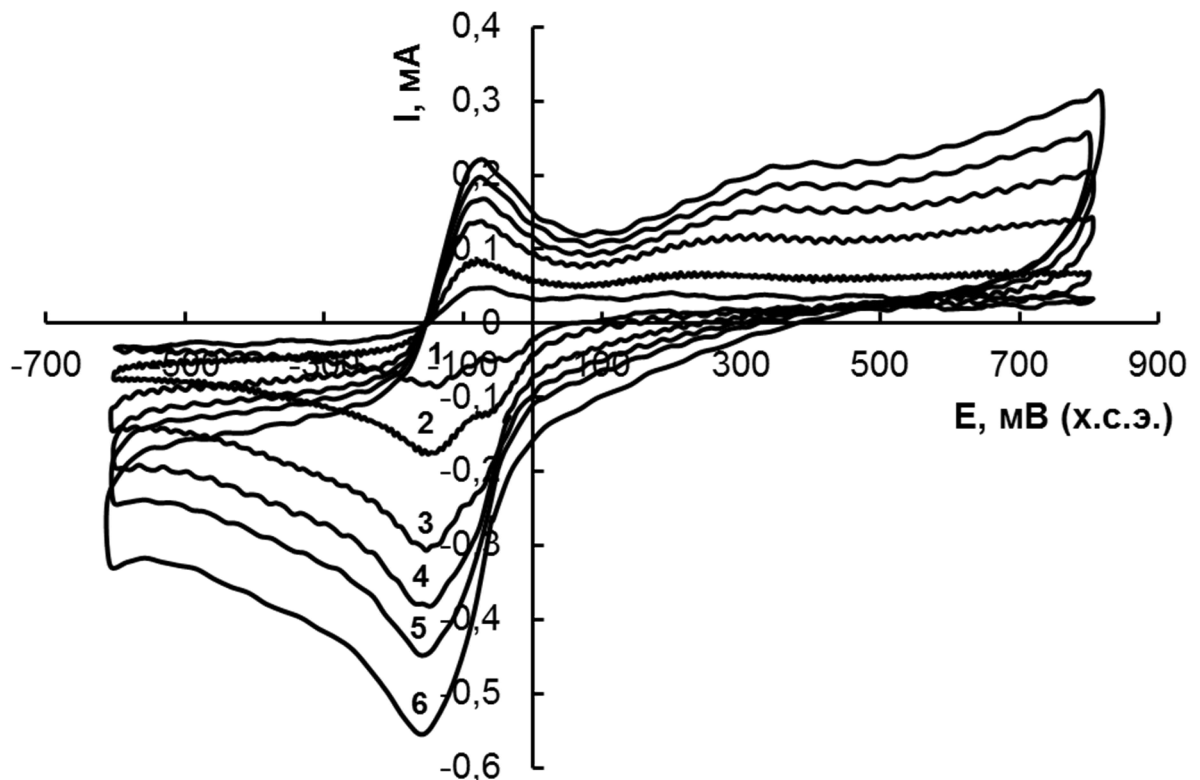


Рисунок 4.15 – Циклическая вольтамперограмма в растворе п-бензохинона с концентрацией $1 \cdot 10^{-2}$ М при скорости развертки, мВ/с: 1 – 25, 2 – 100, 3 – 300, 4 – 500, 5 – 700, 6 – 1000.

Оказалось, что линейная зависимость величины катодного пика от скорости развертки потенциала наблюдается в диапазоне от 100 до 1000 мВ/с (рис. 4.16). Нами была выбрана скорость развертки потенциала 500 мВ/с.

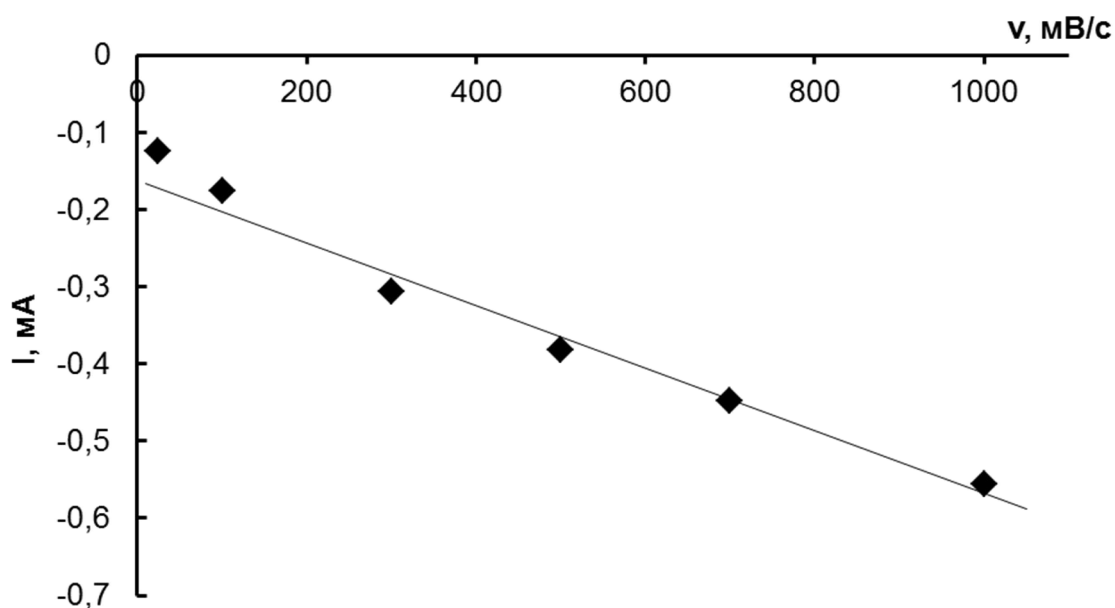


Рисунок 4.16 – Зависимость катодного тока от скорости развертки потенциала. Раствор $1 \cdot 10^{-2}$ М п-бензохинона.

При добавлении к раствору п-бензохинона растворов аскорбата натрия различной концентрации отмечено снижение катодного пика на ЦВА (рис. 4.17). В случае Тролокса и кверцетин дигидрата отмечается подобный эффект.

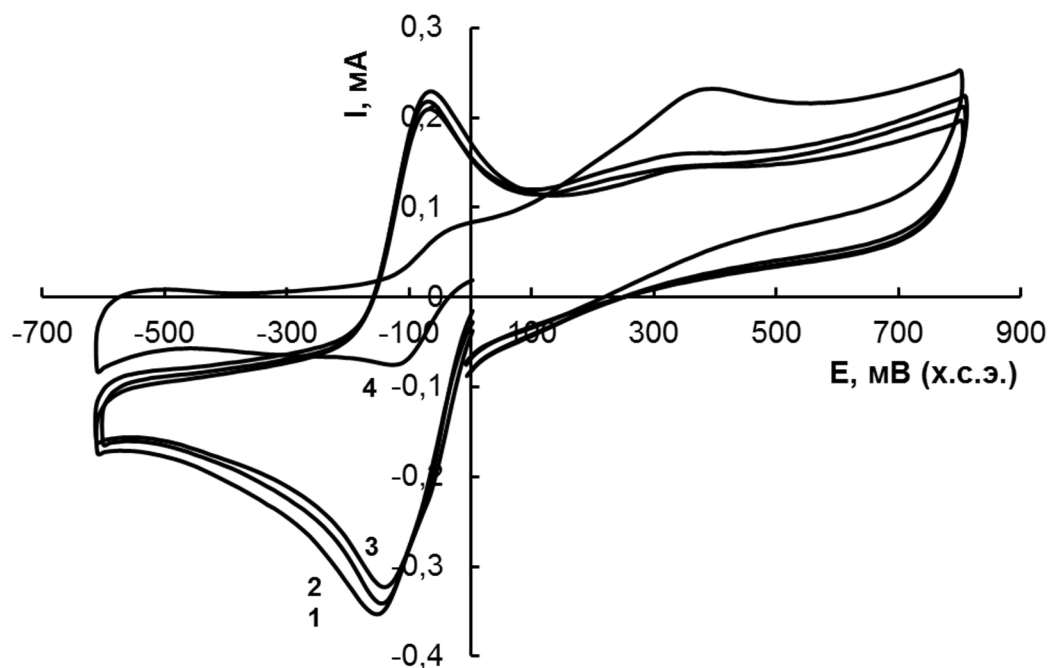


Рисунок 4.17 – ЦВА в растворе $1 \cdot 10^{-2}$ М п-бензохинона с добавками аскорбата натрия, моль/л: 1 – фон, 2 – $1 \cdot 10^{-4}$, 3 – $1 \cdot 10^{-3}$, 4 – $1 \cdot 10^{-2}$. Скорость развертки 500 мВ/с.

При обработке данных использовали разность между величинами катодного пика в фоновом и анализируемом растворе. Таким образом, были получены зависимости разности токов при потенциалах катодного пика ΔI от концентрации антиоксидантов (аскорбата натрия, Тролокса и кверцетин дигидрата) (рис. 4.18).

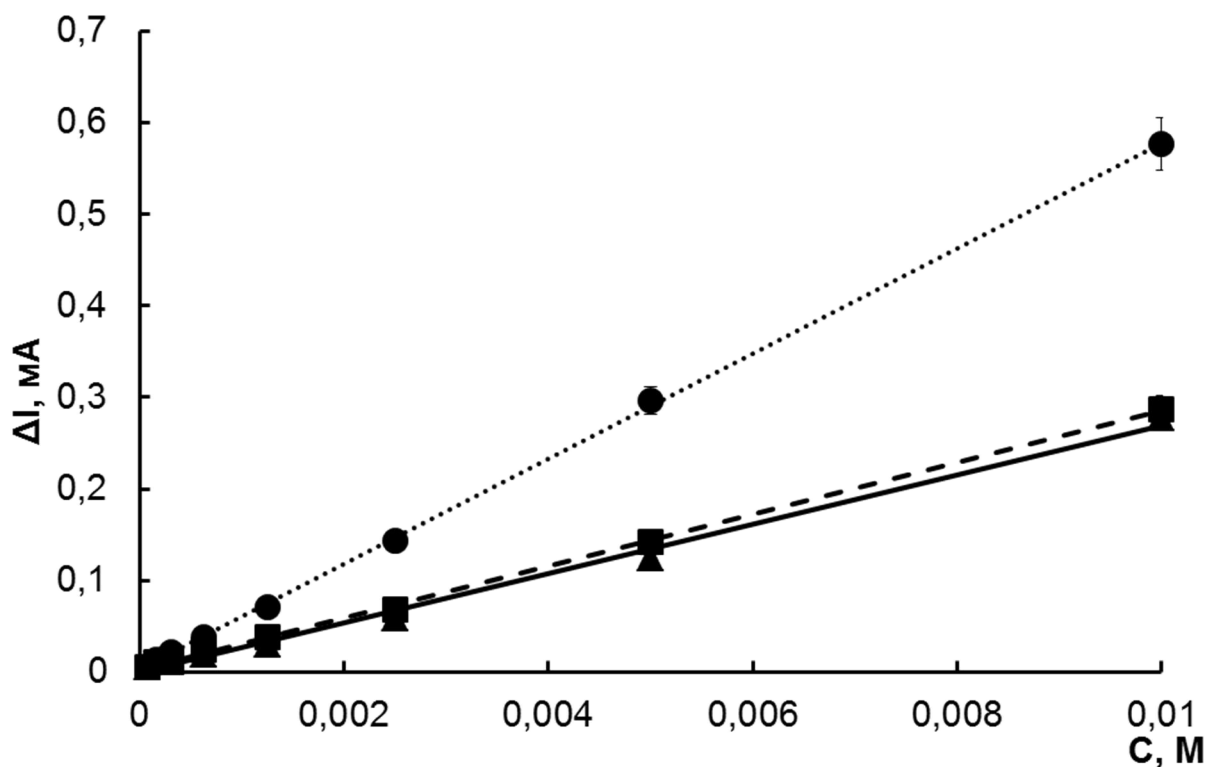


Рисунок 4.18 – Зависимость ΔI от концентрации антиоксиданта ($8 \cdot 10^{-5} \div 5 \cdot 10^{-3}$ М): ▲ – аскорбат натрия, ■ – тролокс, ● – кверцетин дигидрат. Концентрация п-бензохинона $1 \cdot 10^{-2}$ М.

Как видно из данных, представленных на рис. 4.18, для всех исследованных антиоксидантов отмечается линейный характер зависимости ΔI от концентрации во всем диапазоне исследованных концентраций.

Из данных представленных в табл. 4.2 видно, что полученные калибровочные зависимости имеют высокие значения коэффициента детерминации, наиболее высокая величина коэффициента детерминации была получена для зависимости тока от концентрации кверцетин дигидрата ($R^2 = 0,9997$). Поэтому было предложено пересчитывать полученные в дальнейшем данные на эквивалент активности кверцетин дигидрата.

Таблица 4.2 – Данные калибровочных зависимостей ΔI от концентрации антиоксиданта

Соединение	Уравнение калибровочной кривой	R^2
Аскорбат натрия	$y = 26,955x + 0,0001$	0,9945
Тролокс	$y = 28,252x + 0,0031$	0,9992
Кверцетин дигидрат	$y = 57,597x + 0,0024$	0,9997

Различия в наклоне калибровочных кривых могут быть связаны с активностью антиоксидантов. Действительно, наклоны калибровочных зависимостей для аскорбата натрия и Тролокса являются близкими, что соответствует их схожей антиоксидантной активности (Табл. 4.1). В тоже время, для кверцетин дигидрата наклон зависимости в 2,1 раза превышает ту же величину для аскорбата натрия и Тролокса, что соответствует литературным данным.

4.2.2 Исследование биологических образцов

Для получения референсных значений антиоксидантной активности в норме было проведено исследования плазмы крови. Плазма крови была получена из цельной крови 32 практически здорового добровольца (23 мужчины и 8 женщин) (рис. 4.19). Для анализа использовали 3 мл PBS, 1 мл $1 \cdot 10^{-2}$ М раствора п-бензохина и 1 мл анализируемой плазмы крови. В качестве контроля использовали смесь 4 мл PBS и 1 мл $1 \cdot 10^{-2}$ М раствора п-бензохина.

При статистической обработке данных был получен диапазон значений антиоксидантной активности для практически здоровых людей в норме в расчете на кверцетин дигидрат, который составил $0,45 \pm 0,13$ мМ (рис. 4.19, область между пунктирными линиями) ($0,89 \pm 0,26$ мМ в расчете на Тролокс).

Наличие выбросов из коридора референсных значений можно использовать в качестве дополнительно критерия при анализе биологических сред на станциях переливания крови.

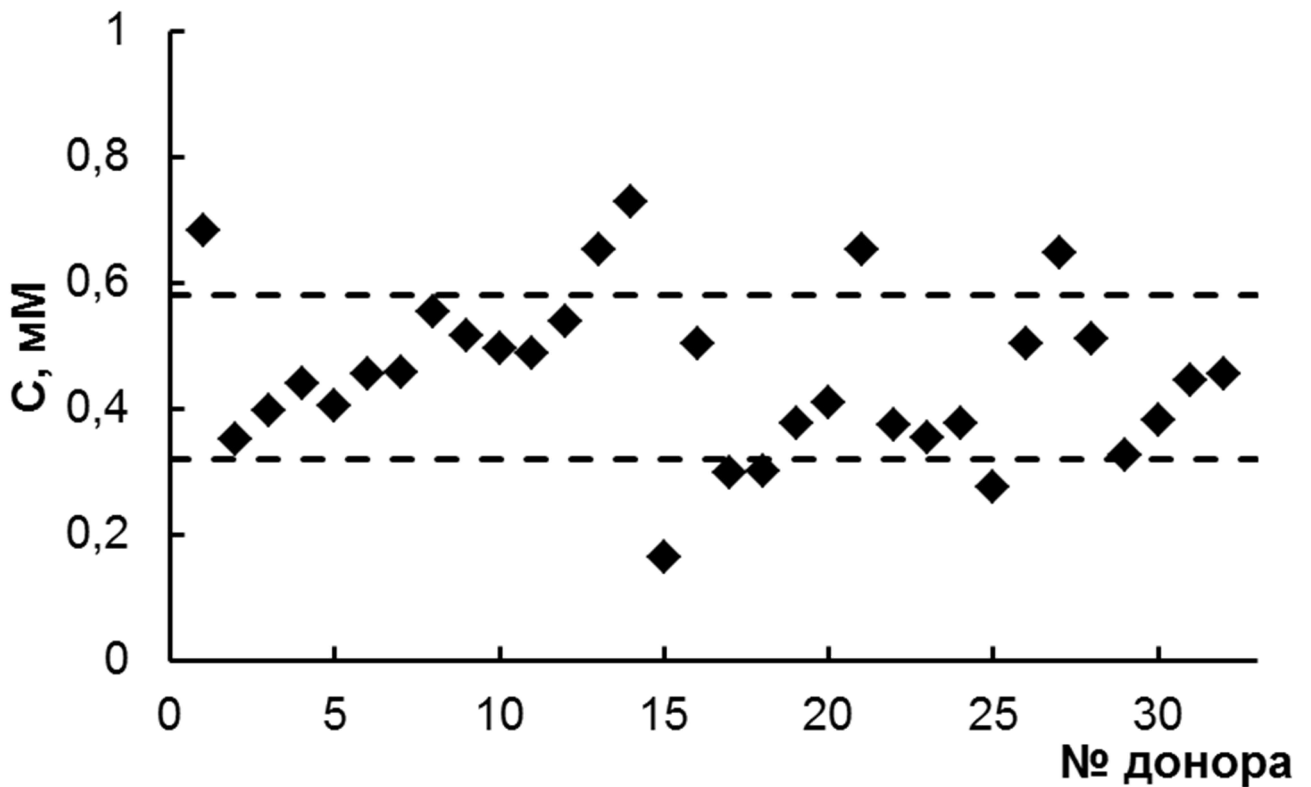


Рисунок 4.19 – Антиоксидантная активность плазмы крови практически здоровых добровольцев ($n = 32$) в расчете на кверцетин дигидрат.

Также было проведено сравнительное исследование предложенного метода с применяемым в настоящее время набором TAS Randox[®] kit для спектрофотометрического анализа.

Для исследования использовали плазму крови пациентов с острыми септическими состояниями. Плазма крови была получена из цельной крови 8 пациентов (6 мужчин и 2 женщин). Для анализа использовали 3 мл PBS, 1 мл $1 \cdot 10^{-2}$ М раствора п-бензохина и 1 мл анализируемой плазмы. В качестве контроля использовали смесь 4 мл PBS и 1 мл $1 \cdot 10^{-2}$ М раствора п-бензохина. Таким образом, были получены данные по сравнению предложенного метода с методом TAS (рис. 4.20).

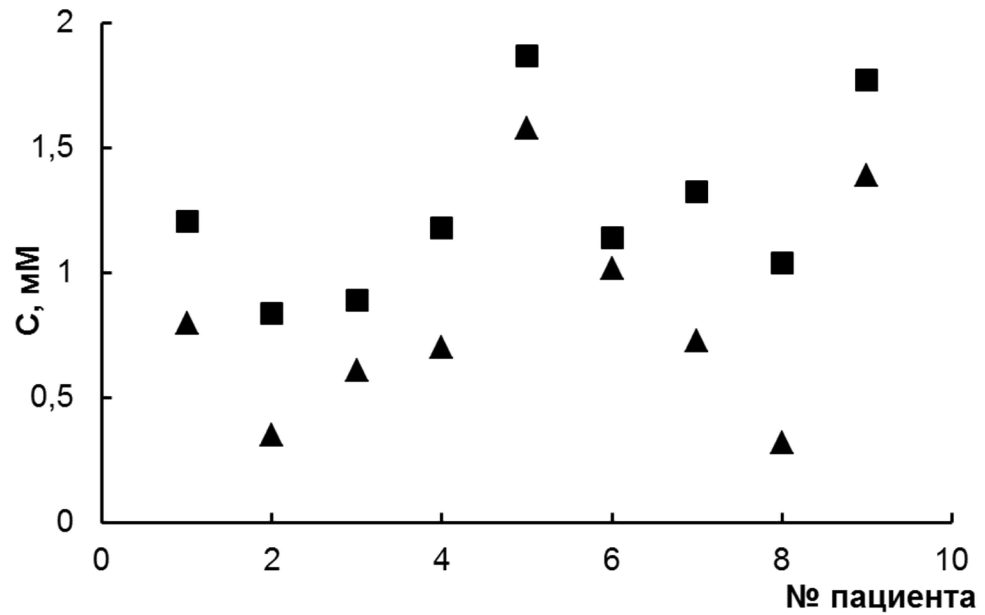


Рисунок 4.20 – Антиоксидантной активности плазмы крови пациентов с острыми септическими состояниями, определенный спектрофотометрическим (■) и электрохимическим (▲) методами.

Было обнаружено, что коэффициент корреляции между данными, полученными используемым в настоящее время спектрофотометрическим методом и разработанным нами электрохимическим методом, составляет не менее 0,84 (Рис. 4.21).

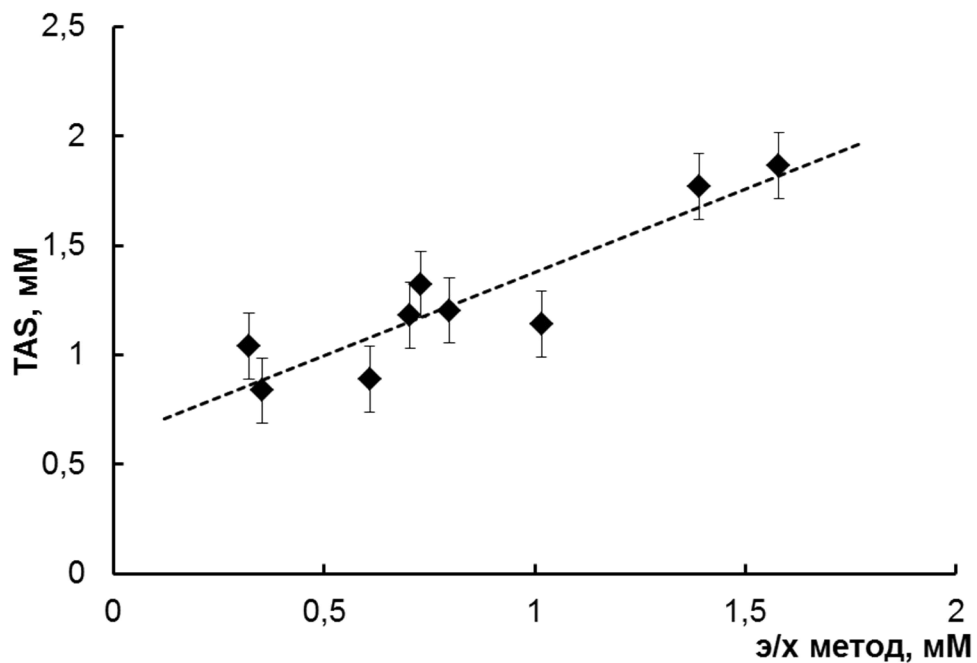


Рисунок 4.21 – Сравнение антиоксидантной активности плазмы крови, определенных спектрофотометрическим и электрохимическим методами.

Таким образом, предлагаемый метод вполне может быть использован в качестве независимого метода определения уровня антиоксидантов в биологических средах благодаря простоте, экспрессности, отсутствием дорогостоящих реактивов и отсутствию необходимости в высокой квалификации оператора.

4.3 Совместное определение ПРЦ и антиоксидантной активности биологических сред

Диагностические и прогностические критерии, основанные на использовании мониторинга величин ПРЦ платинового электрод в плазме или сыворотке крови опираются на отражение интегрального состояния окислительно-восстановительного баланса организма пациента. Разработанные нами электрохимические методы оценки уровня антиоксидантной составляющей указанного баланса можно было бы использовать в сочетании с данными о величинах ПРЦ для оценки степени окислительного стресса у пациента. Можно ожидать, что изменение вклада окислительных процессов, протекающих в организме, в равновесие про-/антиоксиданты должно повлечь снижение вклада антиоксидантной системы организма.

Благодаря простоте и доступности, был использован описанный выше метод непрямого электрохимического определения антиоксидантной активности для параллельного проведения мониторинга ПРЦ и антиоксидантной активности плазмы крови у пациентов с различными патологическими состояниями. В качестве исследуемой группы были выбраны пациенты с трансплантированными печенью и почкой в ранние послеоперационные сроки, потому что накопленный материал измерений величин ПРЦ в совокупности с клиническими данными показал, что у выбранных групп пациентов в послеоперационном периоде имели место осложнения, связанные с увеличением вклада окислительных процессов в баланс про-/антиоксидантов, либо с увеличением вклада антиоксидантной системы (см. главу 3).

Действительно, при сопоставлении данных мониторинга ПРЦ и антиоксидантной активности была обнаружена общая динамика. Из данных представленных на рис. 4.22–4.27 видно, что имеет место смещение ПРЦ в сторону более отрицательных значений потенциала при увеличении антиоксидантной активности, в то время как при снижении уровня антиоксидантной активности ПРЦ смещается в сторону более положительных потенциалов.

При мониторинге величин ПРЦ и уровня антиоксидантной активности у пациента Б. (рис. 4.22) после операции трансплантации почки без осложнений в послеоперационном периоде было отмечено, что уровень антиоксидантов в основном находится в диапазоне 1–1,5 мМ.

В то же время, для пациентов с осложнениями в послеоперационном периоде характерны более низкие значения уровня антиоксидантной активности (рис. 4.23–4.25). Одной из причин, снижения уровня антиоксидантов может являться проведение активных методов лечения (гемодиализ, плазмаферез, гемодиофильтрация и др.). Отмечено, что при проведении активных методов лечения уровень антиоксидантов не превышает, как правило, значения 1 мМ.

Так, пациенту С. (рис. 4.23) с 4-х по 12-е сутки проводилось сеансы гемодиофильтрации, плазмафереза и гемодиализа, что в свою очередь могло повлиять на резкие изменения величин ПРЦ и уровня антиоксидантной активности.

Схожая картина наблюдалась при мониторинге пациента З. (рис. 4.24) после трансплантации почки, которому с 1-х по 10-е сутки проводили сеансы гемодиофильтрации, и пациента Щ. (рис. 4.25) после трансплантации почки, которому на протяжении всего курса лечения проводились активные методы детоксикации (гемодиофильтрация, плазмаферез, гемодиализ).

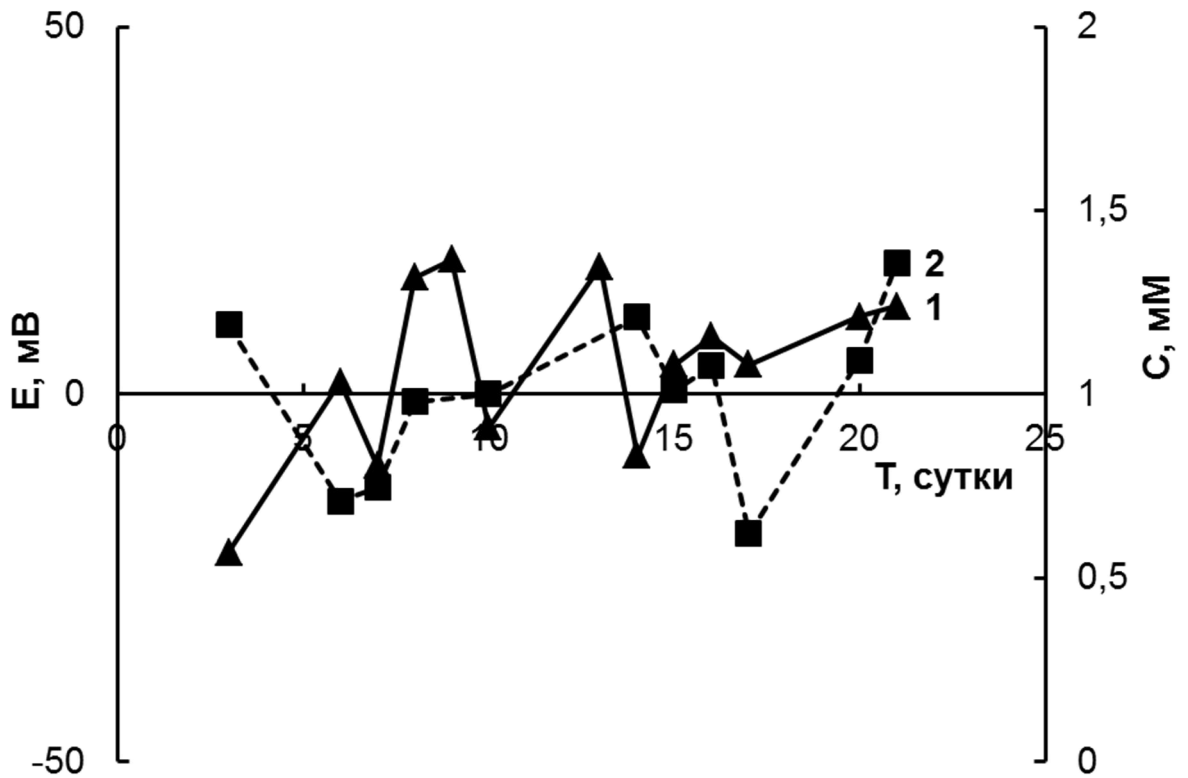


Рисунок 4.22 – Послеоперационный мониторинг ПРЦ (1) и АОА (2) в плазме крови пациента Б. после трансплантации почки.

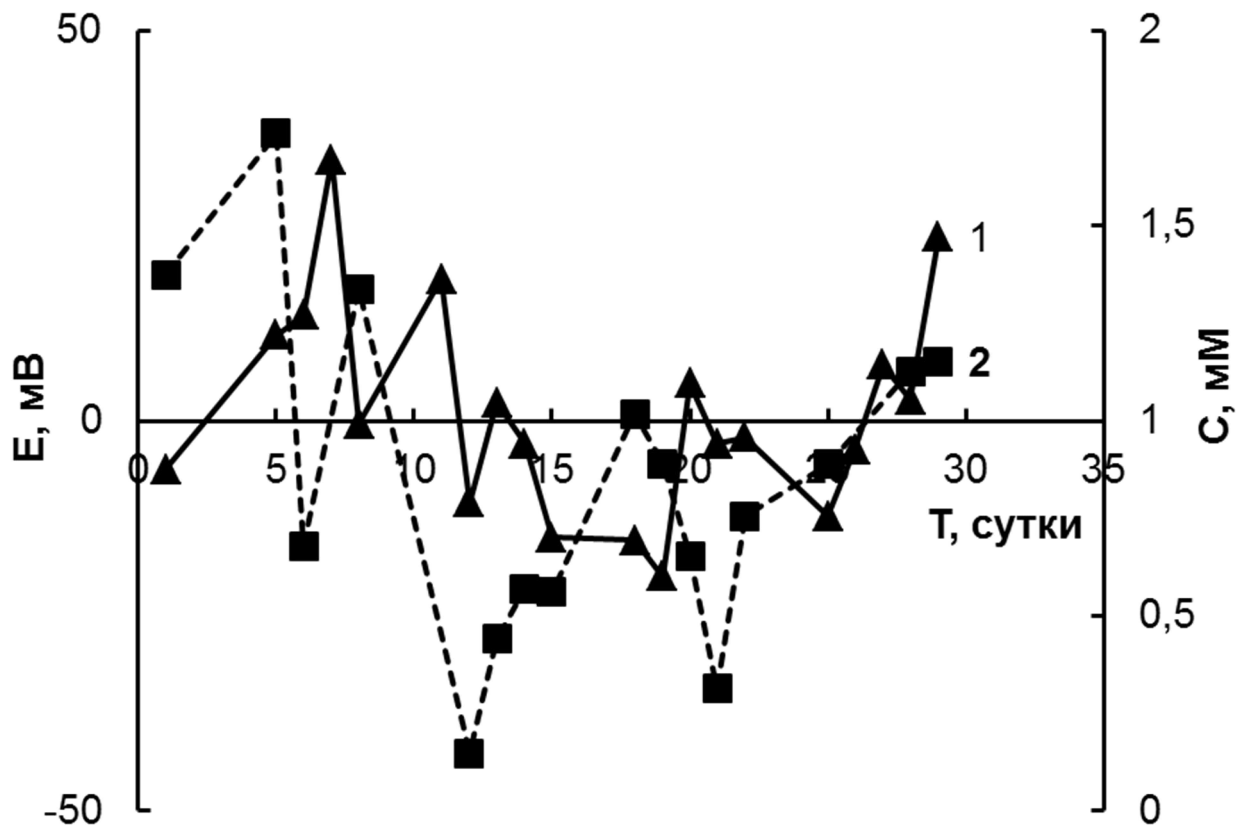


Рисунок 4.23 – Послеоперационный мониторинг ПРЦ (1) и АОА (2) в плазме крови пациента С. после трансплантации почки.

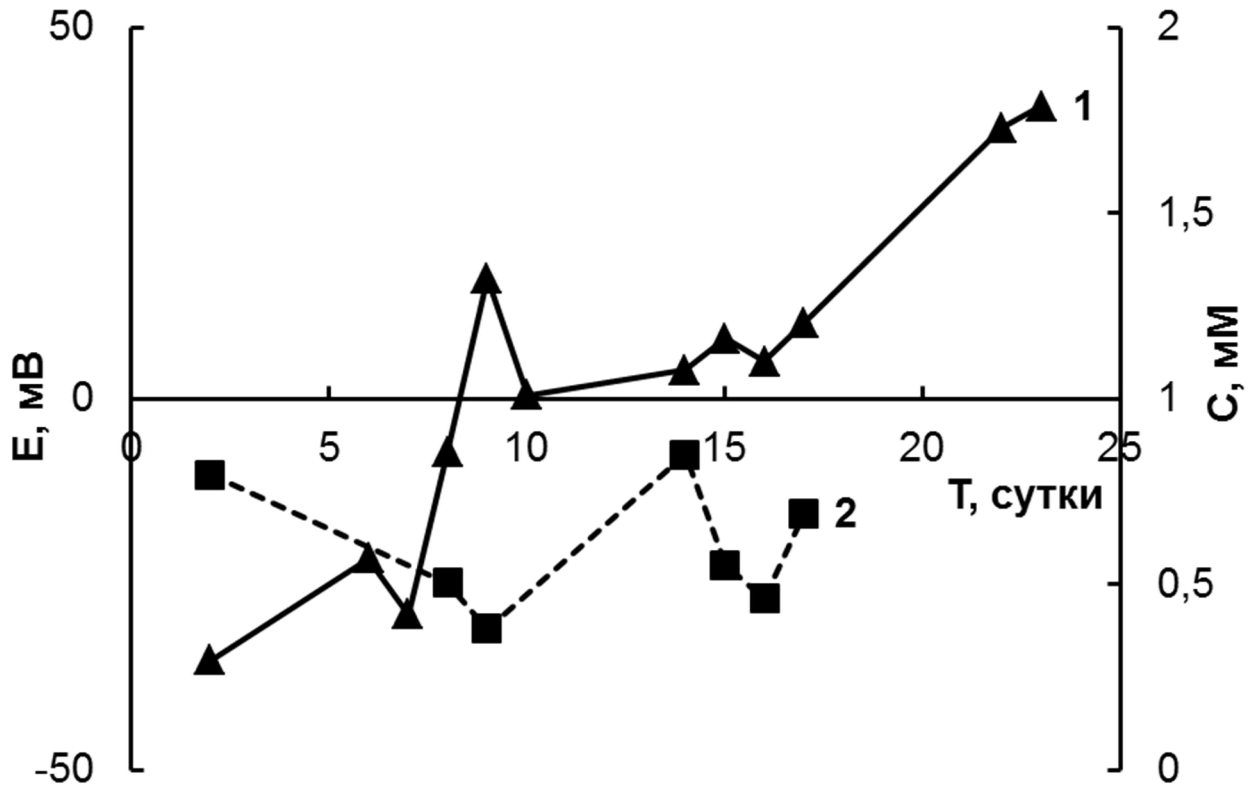


Рисунок 4.24 – Послеоперационный мониторинг ПРЦ (1) и АОА (2) в плазме крови пациента 3. после трансплантации почки.

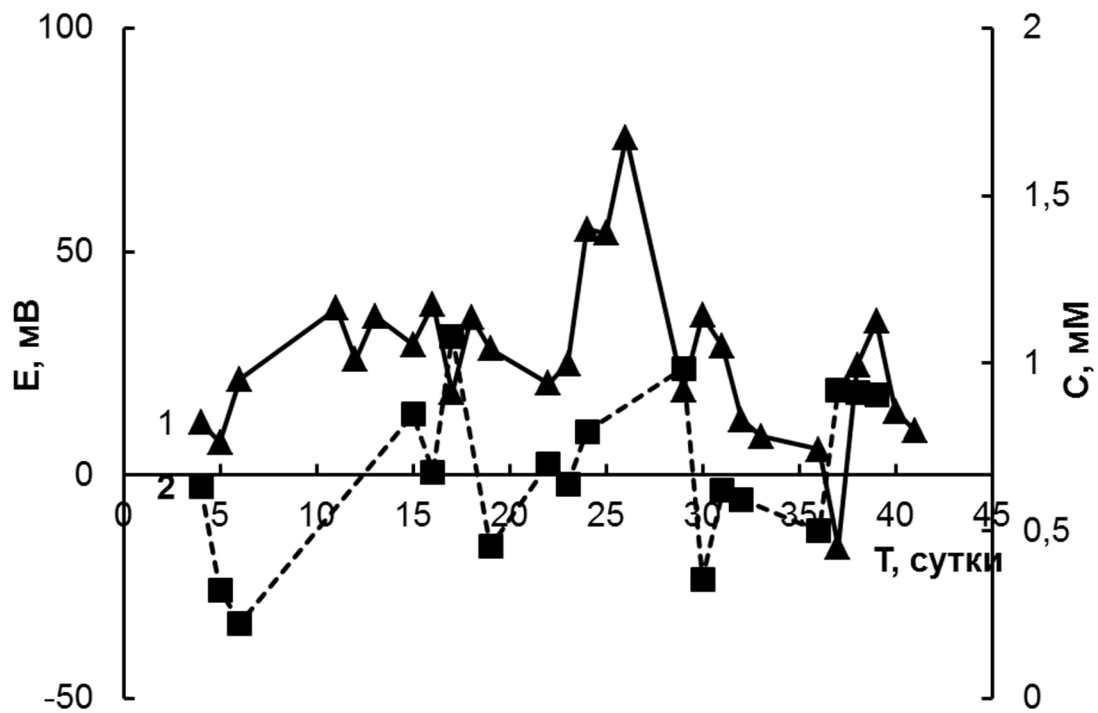


Рисунок 4.25 – Послеоперационный мониторинг ПРЦ (1) и АОА (2) в плазме крови пациента 3. после трансплантации почки.

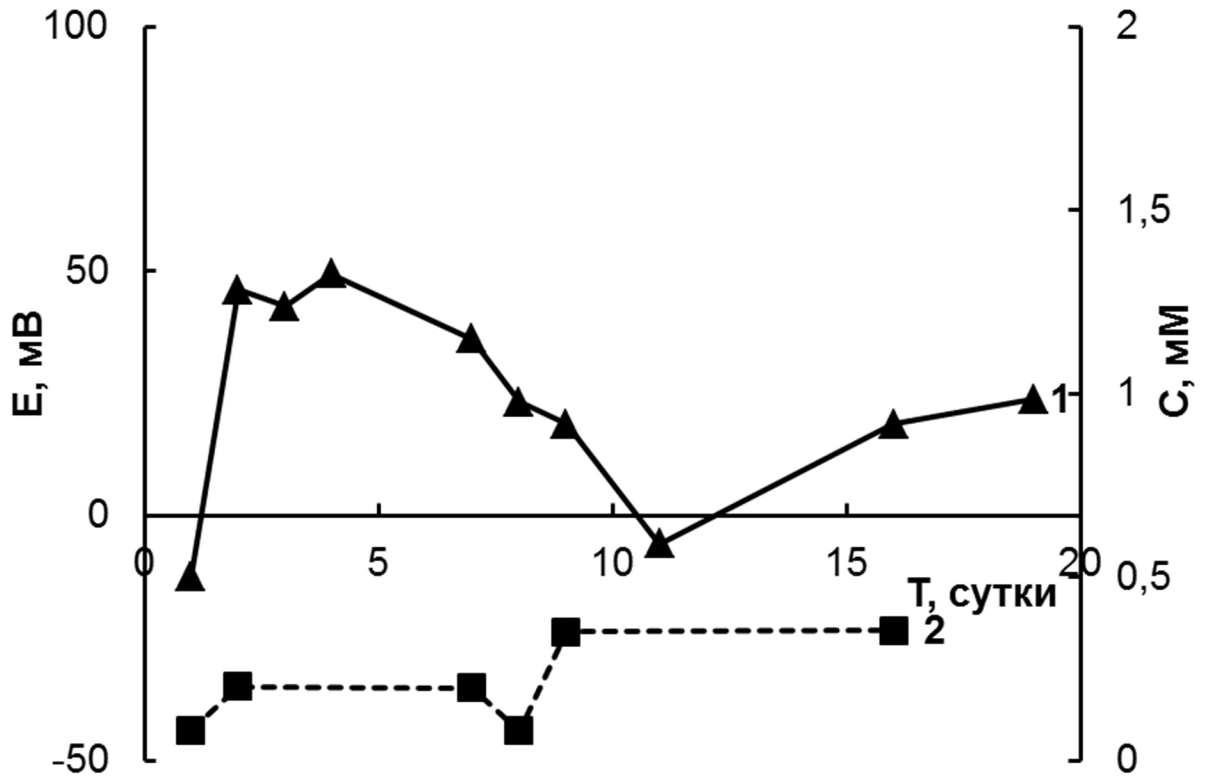


Рисунок 4.26 – Послеоперационный мониторинг ПРЦ (1) и АОА (2) в плазме крови пациента К. после трансплантации печени.

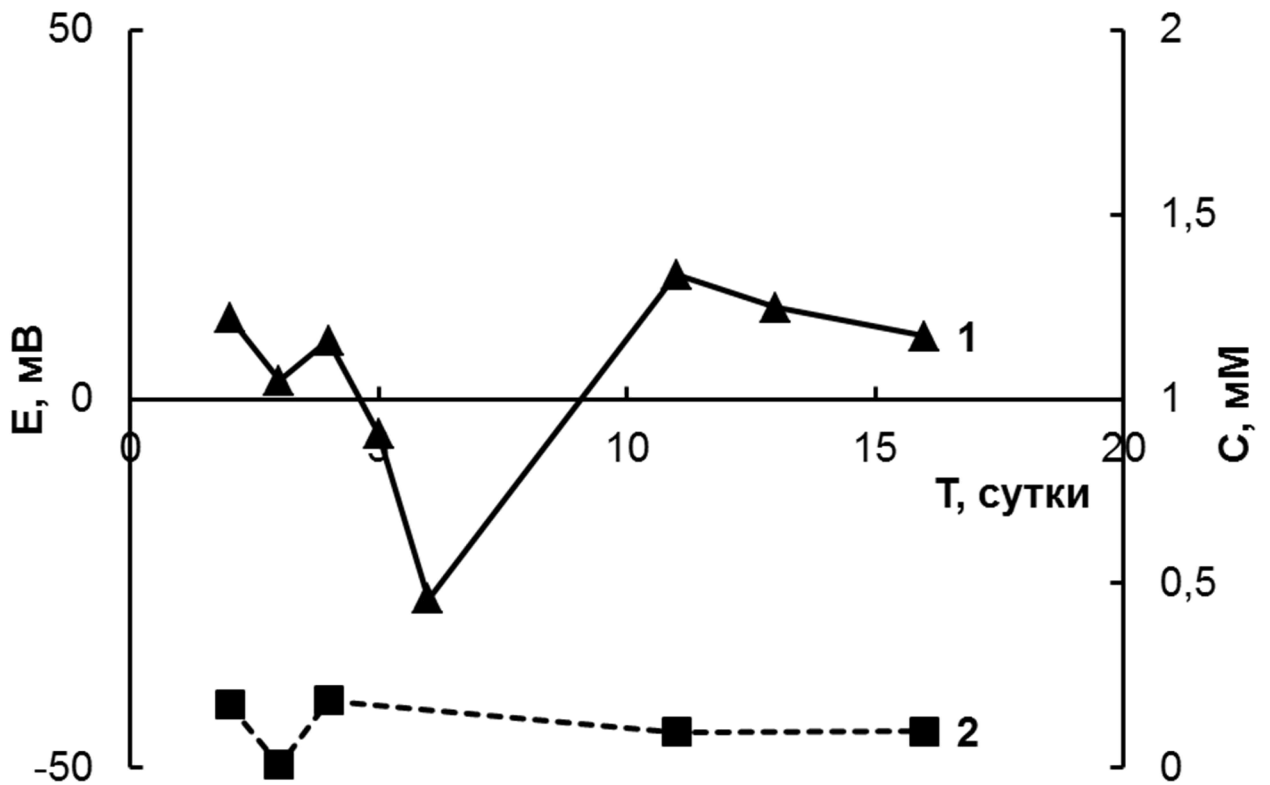


Рисунок 4.27 – Послеоперационный мониторинг ПРЦ (1) и АОА (2) в плазме крови пациентки Б. после трансплантации печени.

Одной из характерных особенностей пациентов с трансплантированной печенью по сравнению с пациентами с трансплантированной почкой являются значительное снижение величины антиоксидантной активности. Можно предположить, что данное наблюдение связано с низкой функциональной активностью трансплантированной печени после пересадки, что сказывается на накоплении в организме субстратов, которые могут взаимодействовать с антиоксидантами, что приводит к снижению их концентрации. Данное предположение подтверждается данными о снижении антиоксидантной защиты организма и усилении свободно радикальных процессов при трансплантации печени [364]

В целом, можно заключить, что совместный мониторинг ПРЦ и антиоксидантной активности может служить дополнительным критерием оценки не только баланса про- и антиоксидантной систем организма, но и функционирования антиоксидантной системы, что является важным диагностическим критерием.

На основании данных по изменениям антиоксидантной активности и ПРЦ платинового электрода в плазме крови можно корректировать медикаментозную терапию.

5 Электросинтез растворов доноров «активного» кислорода

5.1 Электросинтез растворов на основе сульфатно-хлоридных растворов

5.1.1 Выбор электродного материала

Ранее нами был исследован процесс электросинтеза персульфата натрия в разбавленных растворах сульфата натрия (0,07–0,28 М) на титановом аноде, покрытом диоксидом иридия [37-39]. Была показана принципиальная возможность применения указанных анодов для процесса получения раствора с мягким окисляющим действием персульфата. Доказано, что раствор, содержащий малые количества персульфата (1,25–1,48 мМ), обеспечивает окисление токсических веществ по механизмам, близким к физиологическим. Однако окисляющая активность этого раствора оказалась значительно ниже, чем у известного окисляющего лечебного раствора на основе электрохимически синтезированного гипохлорита натрия, что сузило область применения растворов на основе персульфата в клинической практике.

Известно, что важным показателем окисляющей активности растворов является величина «редокс потенциала» (потенциала платинового электрода при разомкнутой цепи). Для растворов персульфата натрия, синтезированных в разбавленных сульфатных растворах (0,14 М), величина ПРЦ составляла около 450 мВ [37].

Известно, однако [365], что для обеспечения дезинфекционного действия необходимо, чтобы раствор обладал величиной ПРЦ («редокс потенциалом», согласно медицинским публикациям) выше 750 мВ. Как было показано нами ранее, одним из преимуществ окисляющего раствора на основе персульфата является использование бесхлоридных электролитов для предотвращения образования в электролите хлорорганических соединений. Мы предположили, что введение малых количеств хлорида (до 0,0015 М против 0,15 М NaCl для синтеза гипохлорита натрия, что ниже на два порядка, чем концентрация хлорида в

электролите для синтеза гипохлорита натрия и в 6,5 раз ниже санитарных норм для питьевой воды) должно приводить к образованию хлорорганических соединений, в особенности, если использовать для электролита дистиллированную воду, освобожденную от органических веществ. Также было сделано предположение, что такие малые добавки хлорида натрия к водному электролиту из 0,14 М сульфата натрия смогут увеличить окислительную активность растворов персульфата. Обратим также внимание на факт использования добавок хлоридов в промышленном способе получения персульфата [268] для повышения перенапряжения кислорода и, как следствие, увеличения выхода по веществу персульфата.

Таким образом, открывалась возможность увеличить окислительную активность электрохимически синтезированного раствора персульфата не за счет окисления хлорида, а за счет увеличения выхода по току персульфата и, как следствие, увеличения его концентрации в синтезированном растворе при той же плотности тока.

Кроме того, в промышленности для электросинтеза персульфата в качестве анодного материала используют, как правило, платину [265]. В связи с этим было предложено, помимо IrO_2/Ti анода, исследовать и платинированный титан, поскольку известно, что на платине перенапряжение кислорода выше, чем на диоксиде иридия [366].

Действительно, поляризационные измерения в растворе 0,14 М сульфата натрия на указанных электродах показали, что разница в величине перенапряжения выделения кислорода на IrO_2/Ti и Pt/Ti составляет не менее 300 мВ (рис. 5.1).

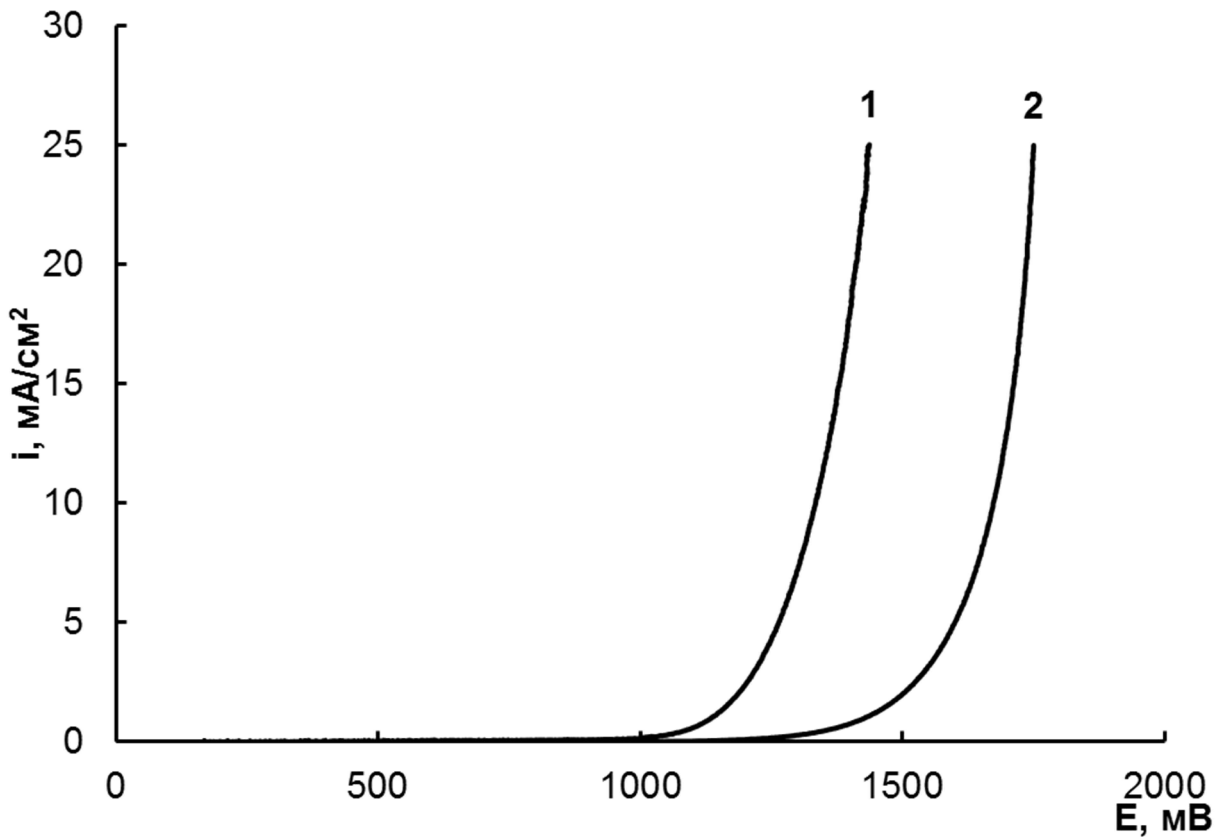


Рисунок 5.1 – Анодные поляризационные кривые в 0,14 М Na_2SO_4 , полученные на: 1 – IrO_2/Ti , 2 – Pt/Ti . Скорость развертки $\nu = 1$ мВ/с, перемешивание.

При проведении исследований в растворе 0,14 М Na_2SO_4 с добавками NaCl в диапазоне концентраций (0,0007–0,07 М) было обнаружено противоположное действие добавок хлорида на суммарный процесс (рис. 5.2). Так на IrO_2/Ti отмечено смещение поляризационной кривой в сторону менее положительных значений потенциала при увеличении концентрации хлорида (рис. 5.2, а). В то же время, поляризационная кривая для Pt/Ti смещается в сторону более положительных значений потенциала (рис. 5.2, б).

Однако можно сделать вывод, что существенное влияние на процесс добавки хлорид-иона оказывают только при высоких концентрациях хлорид-иона (0,07 М). Использование растворов электролитов с концентрацией хлорида натрия до 0,0015 М практически не влияет на ход поляризационной кривой.

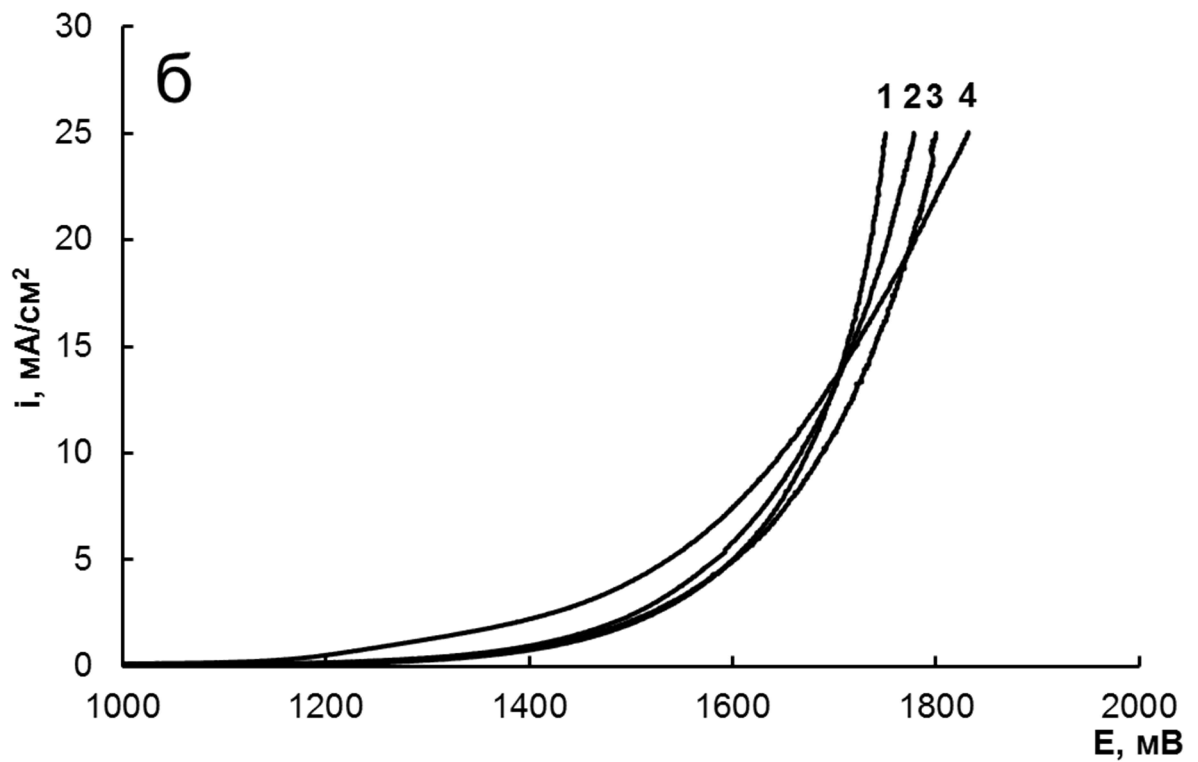
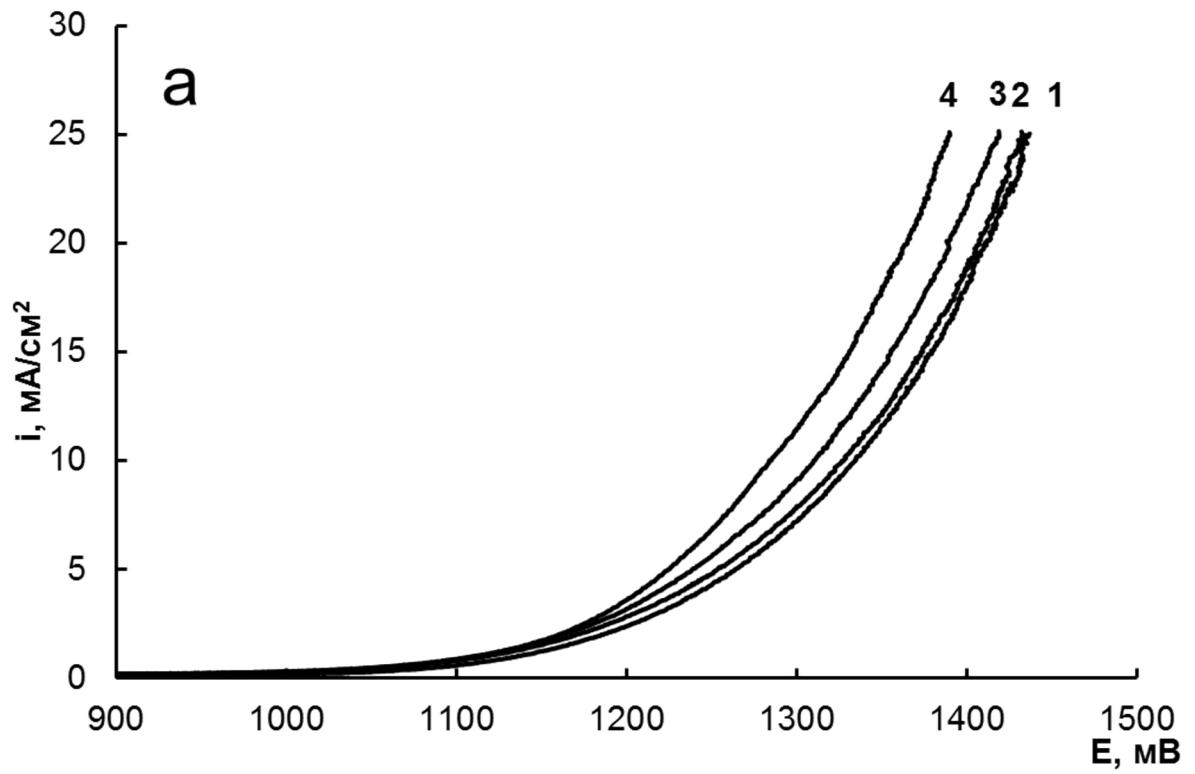


Рисунок 5.2 – Поляризационные кривые, полученные на IrO₂/Ti (а) и Pt/Ti (б), в 0,14 М Na₂SO₄ с добавками NaCl, моль/л: 1 – 0; 2 – 0,0007; 3 – 0,007; 4 – 0,07.

При проведении электроокисления в проточной фильтрпрессной ячейке также не было отмечено существенного различия в окислительной активности растворов, полученных из сульфатно-хлоридных растворов с концентрацией 0,0014 М на IrO₂/Ti и Pt/Ti (рис. 5.3).

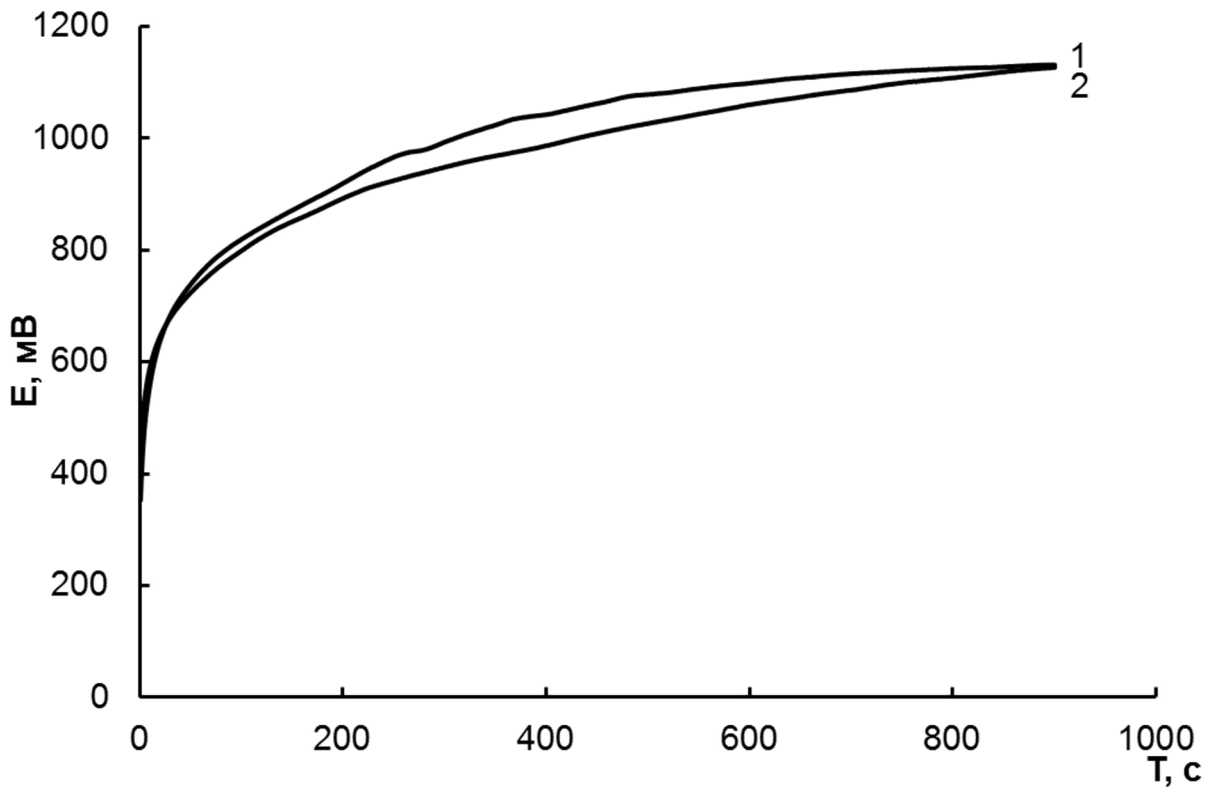


Рисунок 5.3 – Зависимость ПРЦ от времени в окисляющем растворе, полученном при электроокислении сульфатного-хлоридного электролита (0,14 М Na₂SO₄, 0,0014 М NaCl) с использованием IrO₂/Ti (1) и Pt/Ti (2) анода. $i = 35 \text{ А/дм}^2$, $v = 12,5 \text{ мл/мин}$.

В связи с этим, для осуществления процесса электроокисления сульфатно-хлоридных растворов с добавками хлорид-иона в концентрации, не превышающей 0,0015 М, более целесообразным является использование анодов на основе IrO₂/Ti вместо более дорогих анодов из Pt/Ti.

При исследовании влияния добавок хлорида натрия в диапазоне концентраций 0,68–1,54 мМ на окисляющую способность синтезированных растворов на основе 0,14 М сульфата натрия оказалось, что добавки хлорида с

концентрацией в 100–200 раз ниже концентрации сульфата приводят к значительному увеличению ПРЦ синтезированных растворов (до величин 1050–1140 мВ) (рис. 5.4).

Данные величины значительно превышают требуемые значения окислительной активности ПРЦ = 750 мВ, однако, поскольку эти растворы являются столь кислыми (диапазон рН составил 1,75–1,88), то при компенсировании рН до физиологических значений 7,2–7,4 следует ожидать снижения окисляющей способности.

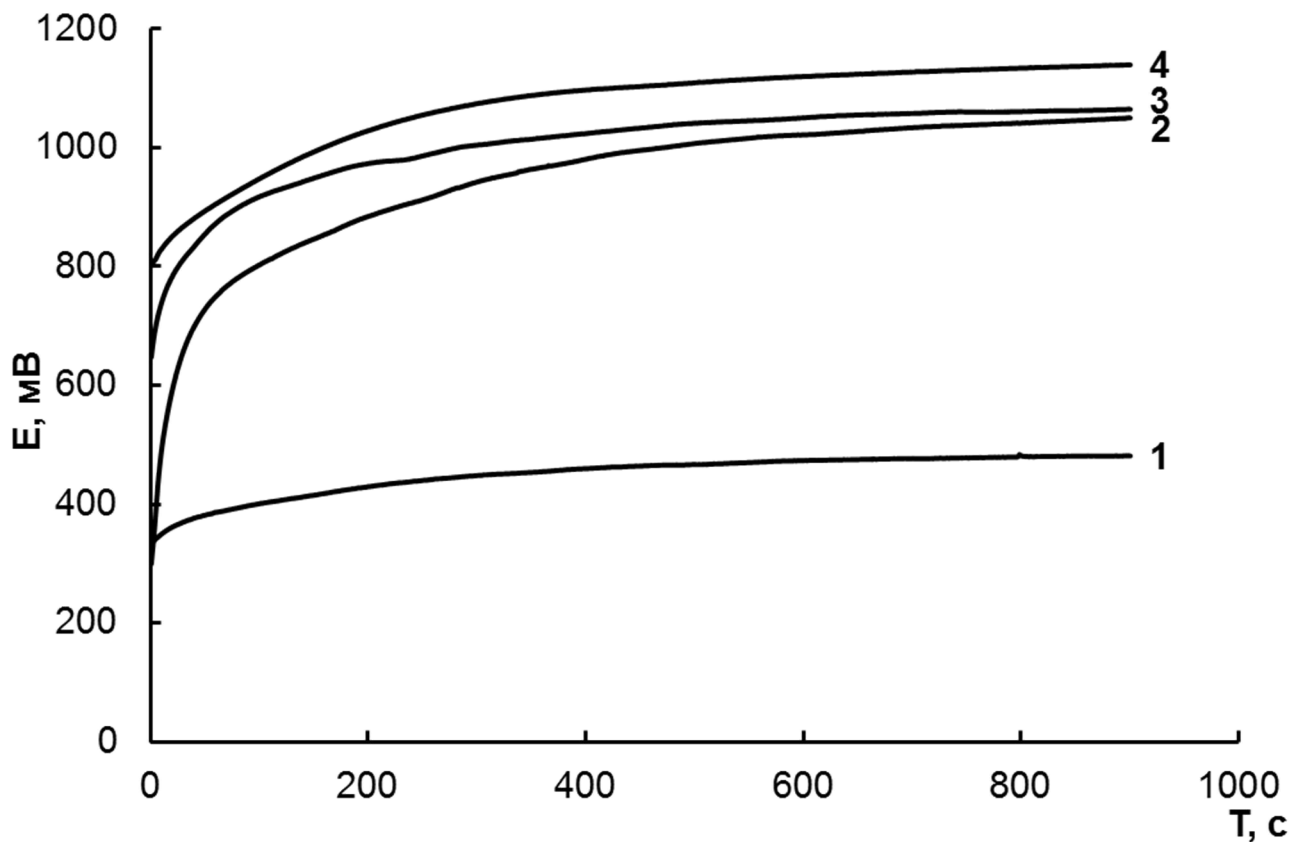


Рисунок 5.4 – Зависимость ПРЦ от времени в окисляющем растворе, полученном при электроокислении сульфатного-хлоридного электролита при концентрации сульфата натрия 0,14М и следующих добавках хлорида в виде NaCl, ммоль/л: 1 – 0, 2 – 0,68, 3 – 1,03, 4 – 1,54. Условия электролиза: $i = 35 \text{ А/дм}^2$; Объемная скорость протока электролита $v = 12,5 \text{ мл/мин}$.

5.1.2 Влияние pH исходного раствора электролита на окисляющие свойства синтезированных растворов

Ранее было показано [86], что электросинтез персульфата в нейтральных растворах сульфата натрия с pH 6,90–7,00 приводит к получению сильно кислых растворов с величинами pH в диапазоне 2,52–0,98 (рис. 5.5).

При использовании сульфатно-хлоридных растворов были получены еще более кислые окисляющие растворы с величиной pH в диапазоне 1,75–1,88 (рис. 5.6–5.8).

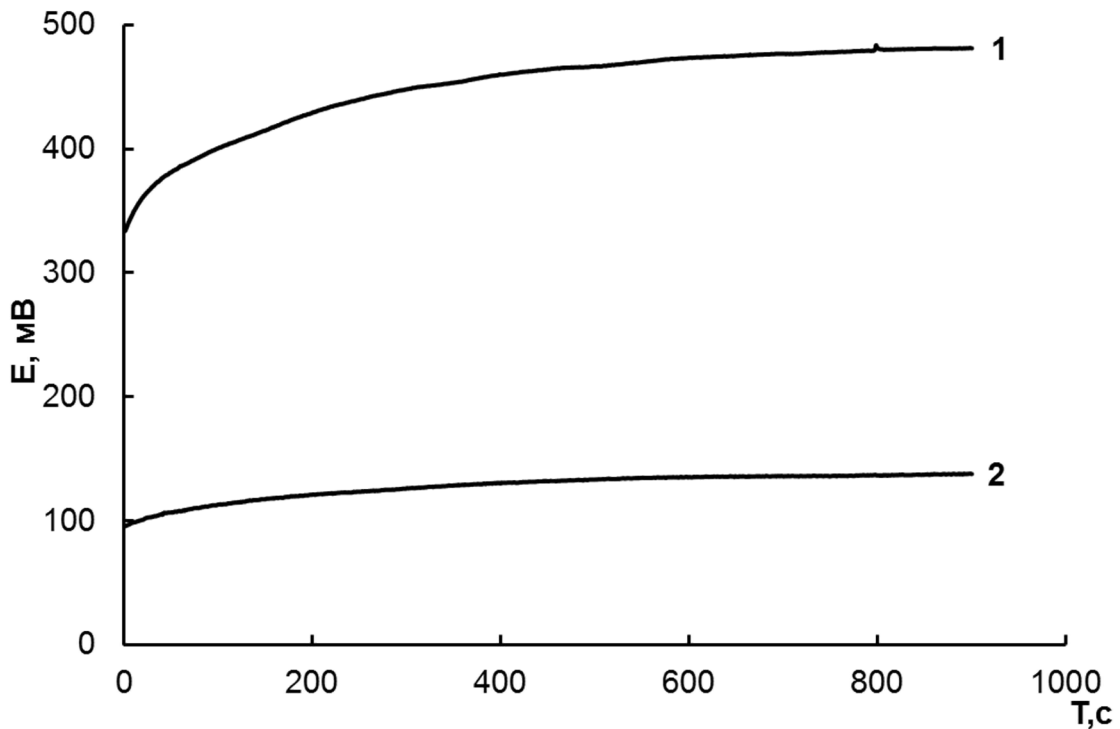


Рисунок 5.5 – Зависимость ПРЦ от времени в окисляющем растворе, полученном при электроокислении сульфатного раствора электролита. 1 – исходный окисляющий раствор (pH = 1,51), 2 – компенсированный окисляющий раствор (pH = 7,20). 0,14 М Na₂SO₄, i = 35 А/дм², v = 12,5 мл/мин.

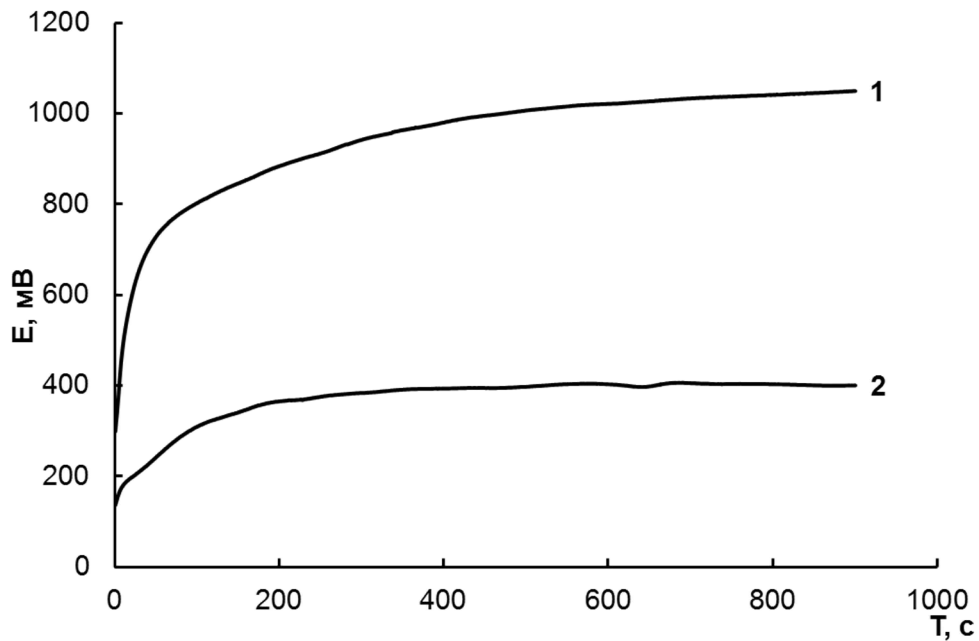


Рисунок 5.6 – Зависимость ПРЦ от времени в окисляющем растворе, полученном при электроокислении сульфатного-хлоридного раствора электролита. 1 – исходный окисляющий раствор ($\text{pH} = 1,75$), 2 – компенсированный окисляющий раствор ($\text{pH} = 7,29$). $0,14 \text{ M Na}_2\text{SO}_4 + 0,68 \text{ mM NaCl}$, $i = 35 \text{ A/дм}^2$, $v = 12,5 \text{ мл/мин}$.

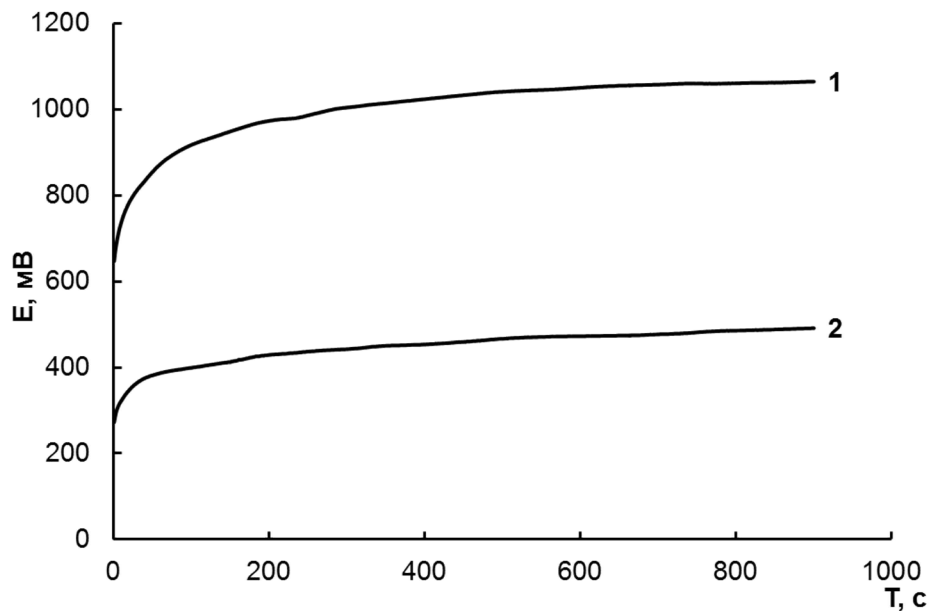


Рисунок 5.7 – Зависимость ПРЦ от времени в окисляющем растворе, полученном при электроокислении сульфатного-хлоридного раствора электролита. 1 – исходный окисляющий раствор ($\text{pH} = 1,75$), 2 – компенсированный окисляющий раствор ($\text{pH} = 7,24$). $0,14 \text{ M Na}_2\text{SO}_4 + 1,03 \text{ mM NaCl}$, $i = 35 \text{ A/дм}^2$, $v = 12,5 \text{ мл/мин}$.

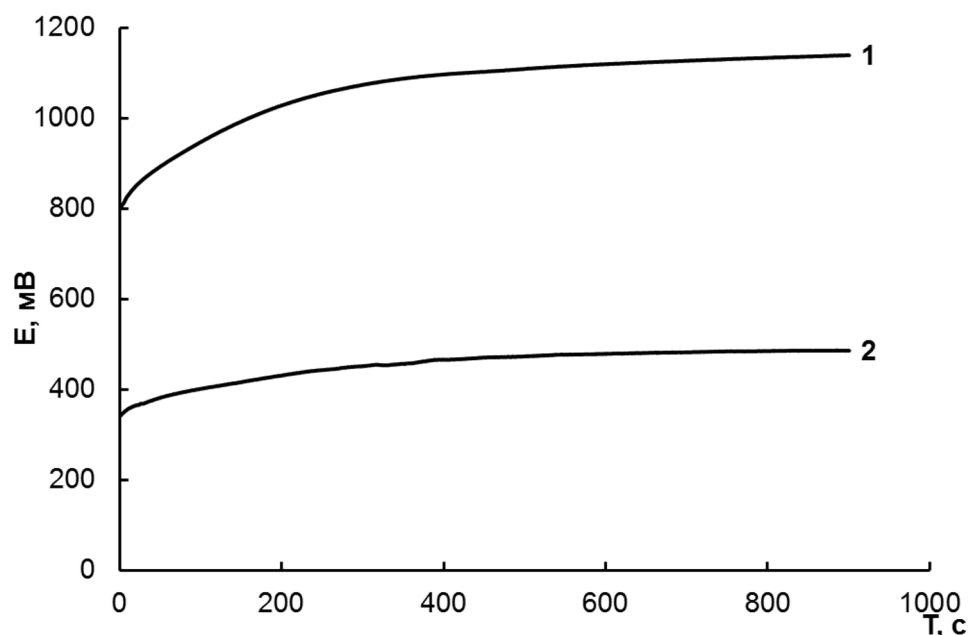


Рисунок 5.8 – Зависимость ПРЦ от времени в окисляющем растворе, полученном при электроокислении сульфатного-хлоридного раствора электролита. 1 – исходный окисляющий раствор (pH = 1,88), 2 – компенсированный окисляющий раствор (pH = 7,31). Раствор 0,14 М Na₂SO₄ + 1,54 мМ NaCl, $i = 35 \text{ А/дм}^2$, $v = 12,5 \text{ мл/мин}$.

Но поскольку, как указано выше, окисляющие растворы, полученные в сульфатных электролитах с микро добавками хлоридов, обладают значительно большей окисляющей способностью, компенсация pH до физиологических значений окисляющих растворов, полученных при плотностях тока 35 А/дм^2 (рис. 5.6–5.8), приводит к достаточно высоким величинам значений ПРЦ (до 400–500 мВ), что соответствует уровню кислых сульфатных электролитов, но все же ниже требуемой для проявления антисептических свойств величины (750 мВ).

В качестве альтернативного способа было предложено использование не нейтральных, а щелочных электролитов, которое в процессе электросинтеза, должно сместиться в область требуемых физиологических значений pH, указанных выше, без коррекции, только за счет подкисления анодного пространства.

Из сопоставления сдвигов величин рН при электросинтезе нейтральных растворов сульфата натрия видно, что величина сдвига в кислую область составляет около 5–6 единиц рН. Поэтому для электросинтеза было решено использовать щелочные растворы 0,14 М Na₂SO₄ с микро добавками хлорида натрия, подщелоченные до величины рН = 13,0. Указанные электролиты готовили с помощью добавок NaOH к нейтральному раствору указанного сульфатно-хлоридного электролита при постоянном контроле рН.

Было исследовано влияние скорости потока раствора электролита и анодной плотности тока на величину рН синтезированного раствора. Другие параметры электросинтеза соответствовали ранее принятым оптимальным величинам концентрации исходного электролита и скорости потока электролита через электролизер. Также были исследованы влияние параметров электросинтеза на окислительную активность синтезированных растворов. Данные этих экспериментов представлены в таблице 5.1.

Таблица 5.1 – Влияние параметров электросинтеза на величины рН и ПРЦ синтезированных растворов

№	Концентрация NaCl, ммоль/л	Скорость потока, мл/мин	i , А/дм ²	рН синтезированного раствора	ПРЦ, мВ
1	0,68	10	30	7,91	699,34
2			40	3,82	946,00
3			50	2,23	1115,80
4		12,5	30	9,70	503,18
5			40	5,91	857,62
6			50	2,31	1036,20
7		15	30	10,55	424,11
8			40	8,46	661,4
9			50	5,34	788,86

Продолжение таблицы 5.1

№	Концентрация NaCl, ммоль/л	Скорость протока, мл/мин	i , А/дм ²	pH синтезированного раствора	ПРЦ, мВ	
10	1,03	10	30	10,47	374,16	
11			40	4,27	937,29	
12			50	2,36	942,66	
13		12,5	30	11,12	316,66	
14			40	6,23	863,16	
15			50	2,50	1050,7	
16		15	30	11,72	227,49	
17			40	8,82	684,59	
18			50	2,76	1039,20	
19		1,54	10	30	11,84	213,46
20				40	3,03	1042,40
21				50	2,38	1106,00
22	12,5		30	11,86	190,31	
23			40	6,55	909,66	
24			50	2,47	1110,60	
25	15		30	12,04	187,95	
26			40	10,79	427,54	
27			50	2,87	1067,80	

При исследовании влияния условий электросинтеза на параметры окисляющих растворов были обнаружены режимы, при которых могут быть получены окисляющие растворы с необходимой величиной pH. Окисляющие растворы с величиной pH 7,20–7,40 могут быть получены в диапазоне величин плотностей тока 30–40 А/дм² и скорости протока 10–12,5 мл/мин, либо в диапазоне плотностей тока 40–50 А/дм² при скорости протока 15 мл/мин.

Для детального анализа данных (табл. 5.1) было предложено использовать трехмерные диаграммы зависимости рН окисляющего раствора от величины плотности тока, скорости протока электролита через ячейку и их влияние на состав продуктов (рис. 5.9–5.11). Такое представление данных позволяет наглядно оценить влияние параметров электросинтеза на свойства раствора.

Были обнаружены достаточно широкие области, в границах которых возможно получение окисляющих растворов с физиологическим значением рН. Кроме того, согласно диаграммам изменения параметров процесса (плотность тока, скорость протока электролита) в пределах $\pm 3\%$ не оказывают существенного влияния на величину рН окисляющего раствора. Так, например, при электросинтезе сульфатно-хлоридного раствора с концентрацией хлорида 1,03 мМ (рис. 5.10) при одной и той же скорости протока, окисляющий раствор с величиной рН, находящейся в диапазоне физиологических величин, может быть получен при изменении плотности тока в пределах $1 \text{ А/дм}^2 (\pm 2,8\%)$.

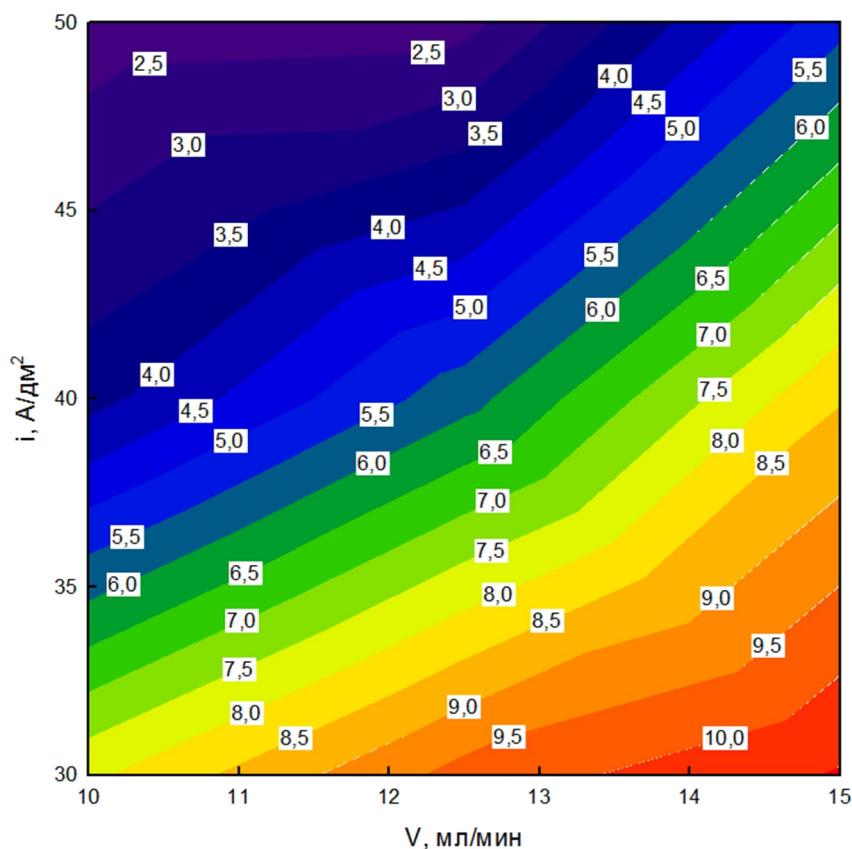


Рисунок 5.9 – Зависимость величины рН синтезированного раствора от плотности тока и скорости протока электролита (0,14 М Na_2SO_4 , 0,68 мМ NaCl).

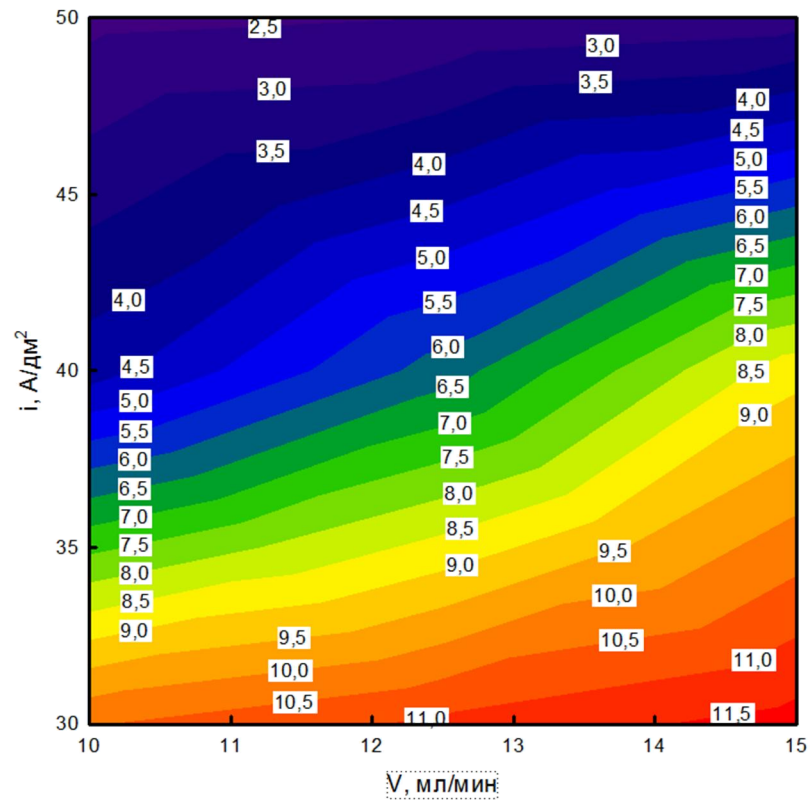


Рисунок 5.10 – Зависимость величины рН синтезированного раствора от плотности тока и скорости протока электролита (0,14 М Na₂SO₄, 1,03 мМ NaCl).

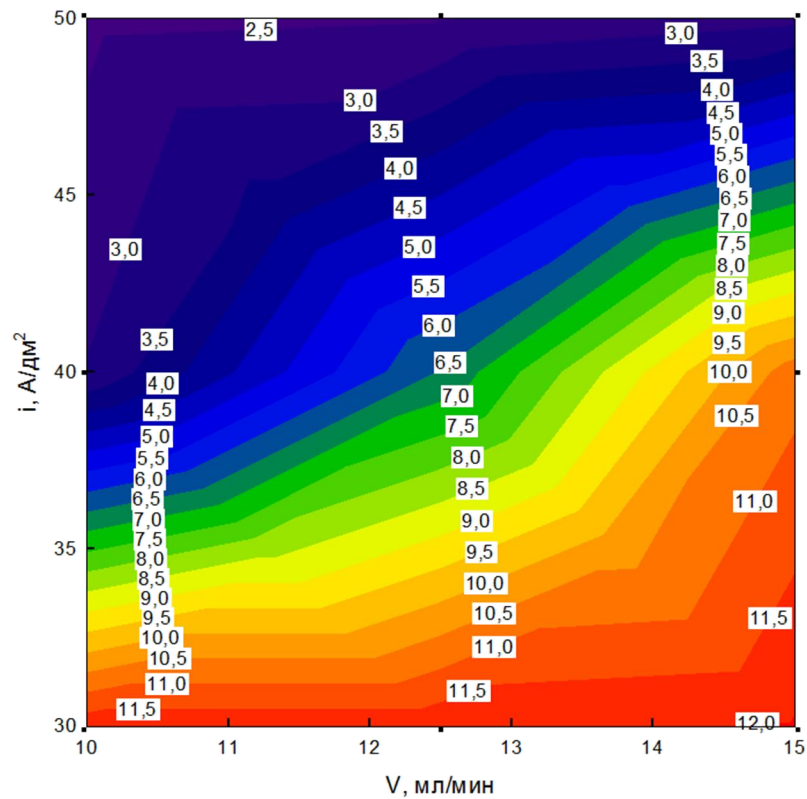


Рисунок 5.11 – Зависимость величины рН синтезированного раствора от плотности тока и скорости протока электролита (0,14 М Na₂SO₄, 1,54 мМ NaCl).

Использование трехмерных диаграмм зависимости величины рН от плотности тока и скорости протока электролита через ячейку позволило сделать вывод, что наиболее оптимальными условиями электросинтеза растворов с требуемым значением рН является плотность тока в диапазоне 35–40 А/дм² и скорость протока электролита 12–13 мл/мин.

При данных условиях можно получать растворы с выраженной окислительной активностью: величинами РП в диапазоне 750–850 мВ, что вполне удовлетворяет требованиям, предъявляемым к дезинфицирующим растворам.

Сопоставление окисляющих свойств синтезированных растворов, полученных в нейтральных и щелочных сульфатных и сульфатно-хлоридных электролитах, было обнаружено, что использование щелочных электролитов позволяет получать нейтральные растворы с физиологическими величинами рН, окислительная активность которых превосходит растворы, полученные нейтрализацией кислых окисляющих растворов до физиологических значений рН. Кроме того, как можно было ожидать, увеличение концентрации хлоридов в щелочных электролитах приводило к увеличению окислительной активности синтезированных растворов и, соответственно, к увеличению положительных значений ПРЦ в указанных растворах (табл. 5.2).

Таблица 5.2 - Влияние величины рН электролита на значение ПРЦ синтезированного раствора

№	Исходный рН электролита	ПРЦ окисляющего раствора, мВ			
		Концентрация добавки NaCl, ммоль/л			
		0	0,68	1,03	1,54
1	6,93	481,14	1049,90	1064,40	1139,10
2	Скомпенсирован (7,20–7,40)	137,85	400,35	485,76	491,17
3	13,00	-	777,62	793,16	830,11

Вероятно, компенсация рН кислых окисляющих растворов приводит к разложению окислителей, находящихся в синтезированном растворе, что может

являться причиной снижения окисляющей активности растворов по сравнению с растворами, синтезированными при тех же условиях в щелочных электролитах. При определении концентрации окислителей в синтезированных растворах с помощью спектрофотометрической методики было обнаружено, что при компенсации рН кислых окисляющих растворов до нейтральных значений приводит к снижению на порядок концентрации окислителей (табл.5.3).

Таблица 5.3 – Влияние параметров электролиза на содержание окислителей в синтезированных растворах. (Исходный раствор 0,14 М Na₂SO₄ + 0,68 мМ NaCl, $i = 35 \text{ А/дм}^2$, $v = 12,5 \text{ мл/мин}$)

№	Исходный рН раствора	Конечный рН раствора	Концентрация окислителей, моль/л
1	6,93	1,75	$3,46 \cdot 10^{-4}$
2	1,75	7,24	$2,80 \cdot 10^{-5}$
3	13,00	7,21	$1,36 \cdot 10^{-4}$

Данные, представленные в таблице 5.3, также подтверждаются снижением окислительной способности кислого синтезированного раствора при корректировке его рН до нейтральных значений (табл. 5.2).

Таким образом, разработана гибкая электрохимическая технология получения нейтральных окисляющих растворов медицинского назначения, путем электролиза в щелочных сульфатно-хлоридных электролитах. В зависимости от условий электролиза синтезированные растворы могут быть использованы, как для детоксикационной терапии, если величина ПРЦ составляет 400 мВ, так и для использования в качестве антисептика, если величина ПРЦ составляет 750 мВ. Преимущество предложенной гибкой технологии состоит в одностадийном получении окисляющего раствора, в отличие от разработанной ранее технологии получения растворов персульфата натрия для детоксикации организма путем внутривенного использования, поскольку требовалась вторая стадия получения растворов, состоявшая в компенсации рН до нормальных физиологических

значений. Не менее важным преимуществом является возможность синтеза растворов с асептическими свойствами с величиной ПРЦ 750 мВ, что невозможно при синтезе этих растворов в нейтральных сульфатных электролитах.

Следующие исследования были посвящены изучению электрохимических, окислительных и биологических свойств растворов, синтезированных по разработанной гибкой технологии.

5.1.3 Исследование потенциала при разомкнутой цепи в окисляющих растворах, полученных в щелочных сульфатно-хлоридных растворах

Одним из важных критериев при получении окисляющих растворов является стабильность характеристик растворов при данных условиях электросинтеза, т.е. возможность получения окисляющих растворов, обладающих одними и теми же параметрами, в данном случае величиной ПРЦ, отражающей окислительную активность и pH.

Электросинтез растворов проводили в 0,14 М растворах Na_2SO_4 (pH = 13,00) с добавками NaCl в диапазоне концентраций 0,68–1,54 мМ при плотности тока 35 А/дм^2 и скорости протока 12,5 мл/мин. В каждой серии было проведено по 4 эксперимента, результаты которых представлены на рис. 5.12–5.14.

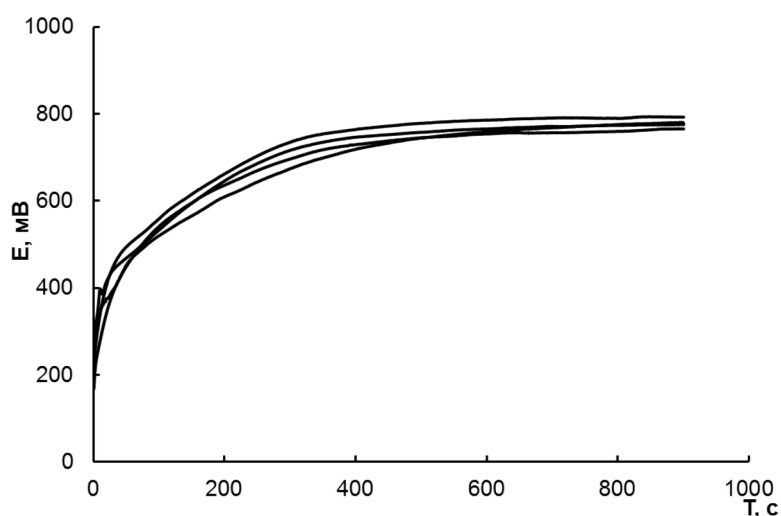


Рисунок 5.12 – Зависимость ПРЦ окисляющих растворов (pH $7,15 \pm 0,05$) от времени, полученных в щелочных сульфатно-хлоридных растворах электролитов ($C_{\text{NaCl}} = 0,68 \text{ мМ}$).

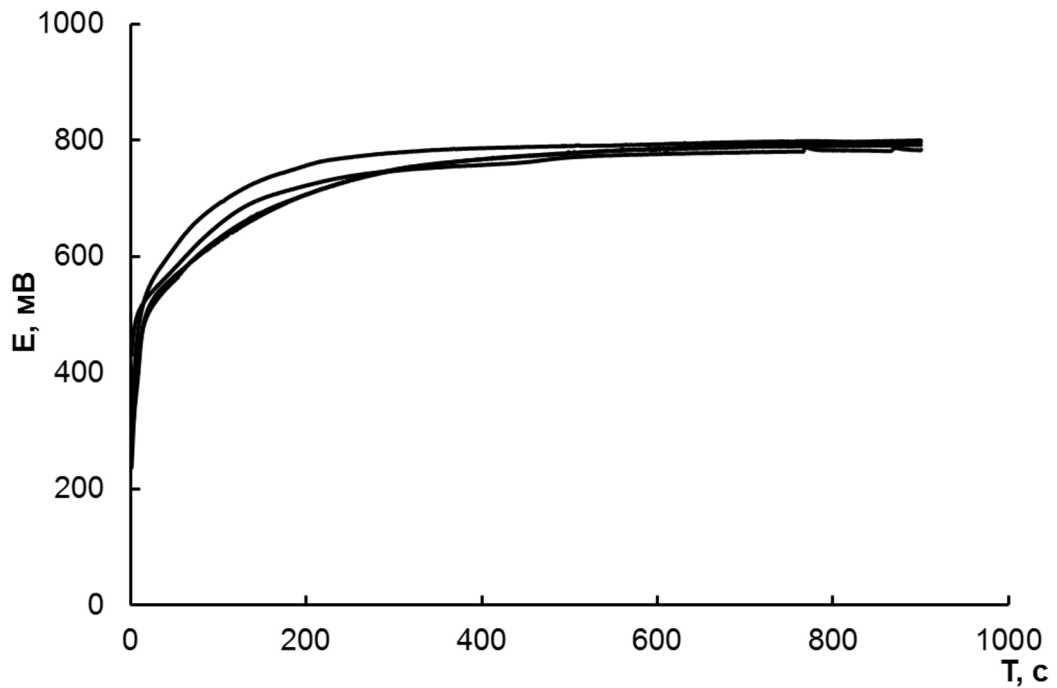


Рисунок 5.13 – Зависимость ПРЦ окисляющих растворов ($\text{pH } 7,19 \pm 0,08$) от времени, полученных в щелочных сульфатно-хлоридных электролитах ($C_{\text{NaCl}} = 1,03 \text{ mM}$).

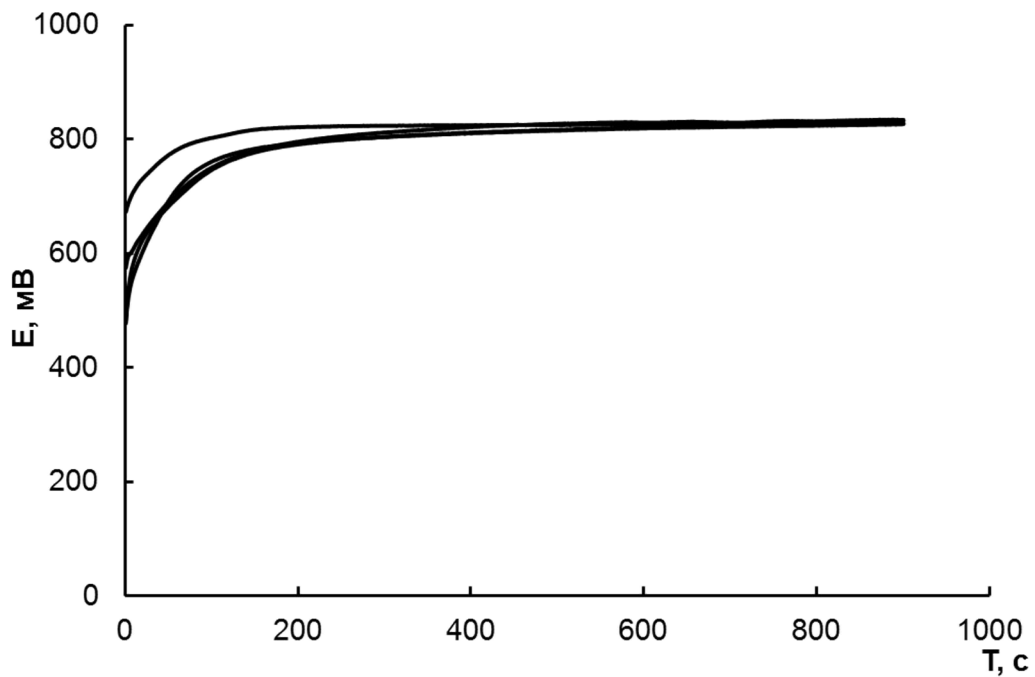


Рисунок 5.14 – Зависимость ПРЦ окисляющих растворов ($\text{pH } 7,15 \pm 0,11$) от времени, полученных в щелочных сульфатно-хлоридных электролитах ($C_{\text{NaCl}} = 1,54 \text{ mM}$).

Обнаружено, что увеличение концентрации хлорида (рис. 5.12–5.14) приводит не только к увеличению окислительной активности, но и к увеличению воспроизводимости параметров окисляющих растворов (определенных величин рН и ПРЦ при заданной концентрации добавки хлорида к сульфатному электролиту).

Действительно, в ходе статистической обработки полученных данных было найдено, что увеличение концентрации хлорида приводит к увеличению величины ПРЦ с 777 до 830 мВ, в то время как стандартное отклонение снижается более чем в три раза с 11,10 до 3,44. (табл. 5.4).

Таблица 5.4 –Свойства синтезированных растворов

№	Концентрация NaCl, ммоль/л	ПРЦ, мВ	$\overline{\text{ПРЦ}}$, мВ	s, мВ	SE, мВ
1	0,68	777,00	777,62	11,10	5,55
2		765,58			
3		775,44			
4		792,44			
5	1,03	783,94	793,16	6,99	3,49
6		791,76			
7		799,73			
8		797,21			
9	1,54	826,65	830,11	3,44	1,72
10		832,02			
11		827,83			
12		833,93			

Таким образом, для получения стабильных характеристик нет необходимости на несколько порядков увеличивать концентрацию NaCl, поскольку величин ПРЦ, необходимых для достижения окислительной активности, достаточной для придания синтезируемому раствору асептических

свойств, мы можем достичь уже при концентрации добавки хлорида к сульфатному раствору 0,68 мМ NaCl.

5.1.4 Исследование окисляющих и биологических свойств окисляющих растворов, синтезированных в сульфатно-хлоридных растворах

Увеличение значения ПРЦ окисляющих растворов, синтезированных в щелочных сульфатно-хлоридных электролитах по сравнению с окисляющими растворами на основе персульфата, синтезированных из сульфатных электролитов, по-видимому, должно привести к увеличению окисляющей активности раствора по отношению к психотропным препаратам, острые отравления которыми в настоящее время являются наиболее распространенными [208].

Исследование окисляющих свойств указанных растворов, синтезированных при плотности тока 35 А/дм^2 и скорости протока раствора электролита 12,5 мл/мин в щелочных сульфатных электролитах состава 0,14 М Na_2SO_4 и 0,68 мМ NaCl, было проведено на примере окисления раствора хлорпротиксена ((Z)-4-[3-(2-Хлортиоксантен-9-илиден)-пропил]-1-диметиламин). Было зафиксировано снижение концентрации хлорпротиксена на 33% при добавлении окисляющего раствора к раствору хлорпротиксена концентрацией 22,5 мг/л в соотношении 1:10. Обнаружено, что наиболее существенное снижение концентрации хлорпротиксена наблюдается в первые 5 минут и составляет 30%, после чего скорость изменения концентрации резко замедляется и в течение последующих 2 часов концентрация снижается лишь на 3% (рис. 5.15).

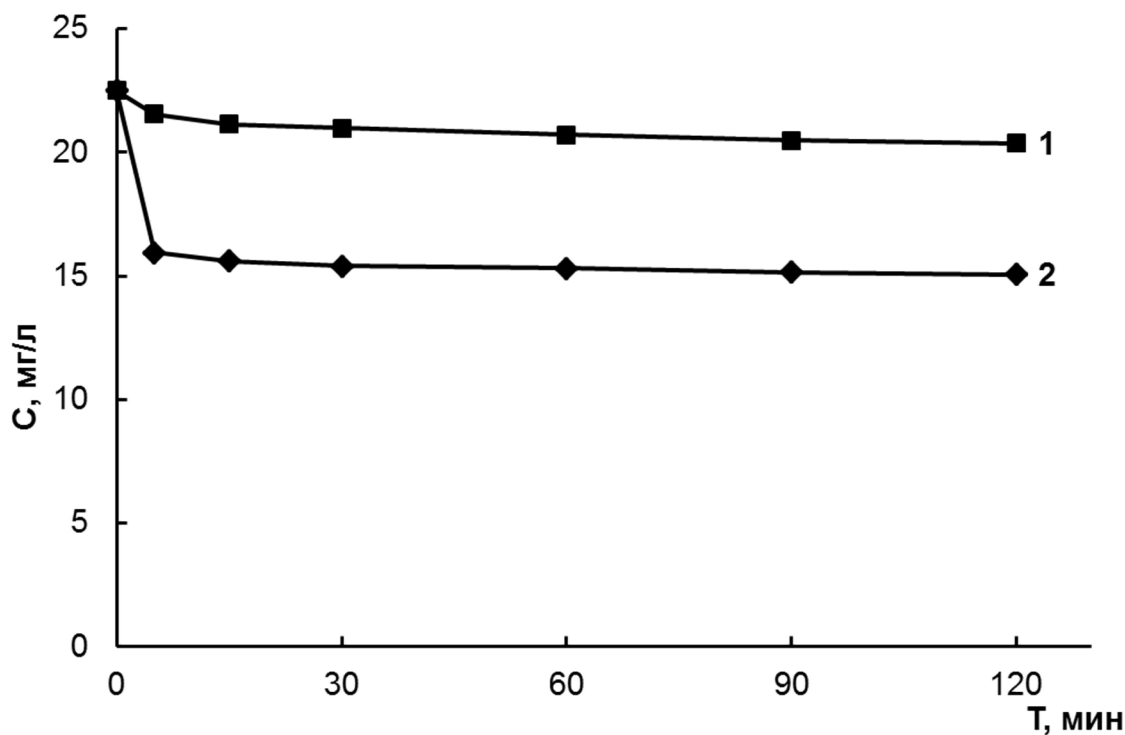


Рисунок 5.15 – Динамика изменения концентрации хлорпротиксена при взаимодействии с нейтральным окисляющим раствором персульфата синтезированного в сульфатном (1) и сульфатно-хлоридном (2) электролите.

Введение хлорида действительно повысило окислительную активность синтезированных растворов по сравнению с растворами на основе сульфата. Так, при взаимодействии раствора хлорпротиксена с окисляющим раствором, синтезированным в разбавленном растворе сульфата натрия, приводило к снижению концентрации хлорпротиксена не более чем на 10%, что в три раза ниже чем при действии окисляющего раствора на основе сульфатно-хлоридного раствора.

Поскольку предполагается использование синтезированных растворов в качестве внутривенных лекарственных препаратов, необходимо было исследовать взаимодействие синтезированных растворов с биологическими средами.

Ранее было показано [38], что добавление к плазме крови раствора персульфата, полученного электролизом сульфатного раствора с величиной ПРЦ +150, приводит к сдвигу потенциала при разомкнутой цепи в положительную сторону на 3,5 мВ, в то время, как добавление того же количества 0,06% раствора

гипохлорита натрия с величиной ПРЦ +810 приводит к смещению потенциала при разомкнутой цепи в положительную сторону более чем на 100 мВ.

При использовании окисляющих растворов на основе сульфатно-хлоридных растворов, ввиду их более высокой окислительной активности, следует ожидать увеличения сдвигов потенциала по сравнению с растворами на основе сульфатных электролитов.

Действительно, добавление окисляющего раствора с величиной ПРЦ +775, полученного в электролите состава 0,14 М Na_2SO_4 и 0,68 мМ NaCl при плотности тока 35 А/дм^2 и скорости протока раствора электролита 12,5 мл/мин, к плазме крови в соотношении 1:10 привело к сдвигу потенциала при разомкнутой цепи в положительную область на 13,7 мВ (рис. 5.16) против 3,5 мВ для раствора, синтезированного в сульфатном электролите, но в то же время величина сдвига ПРЦ для растворов гипохлорита натрия, как мы видели, значительно превышает эти значения (100 мВ).

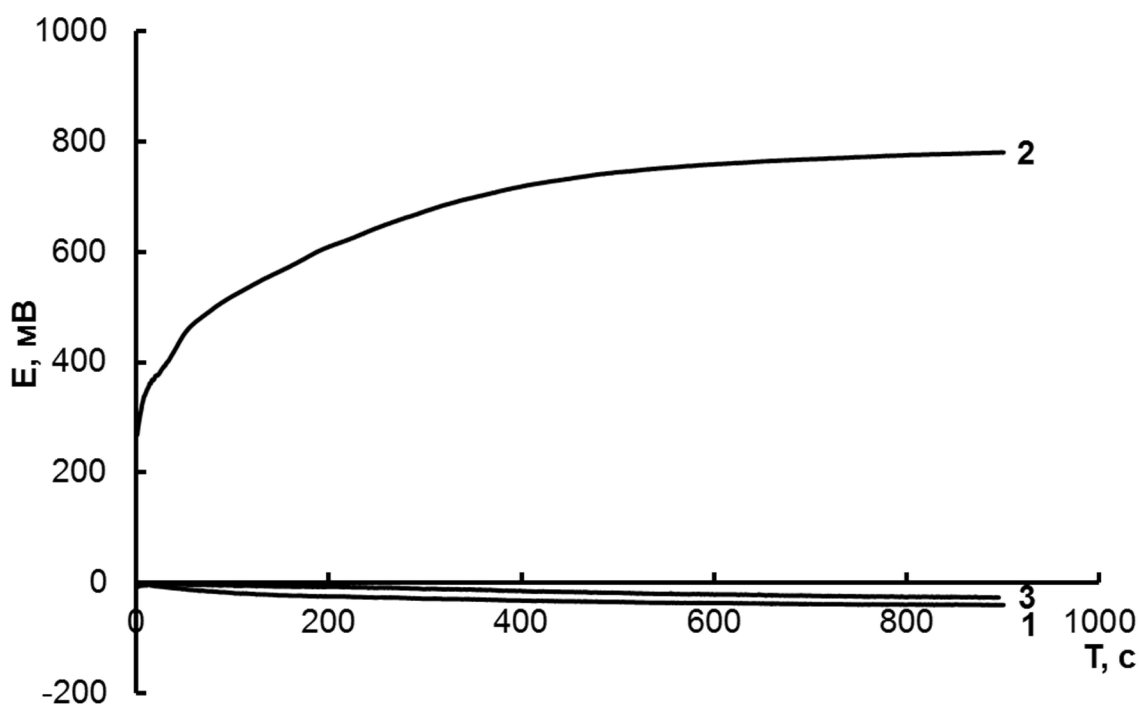


Рисунок 5.16 – Зависимость ПРЦ от времени: 1 – плазма крови + физиологический раствор (10:1), 2 – исходный окисляющий раствор (0,14 М Na_2SO_4 и 0,68 мМ NaCl при плотности тока 35 А/дм^2 и скорости протока раствора электролита 12,5 мл/мин), 3 – плазма + окисляющий раствор (10:1).

Таким образом, можно предположить, что синтезированные нами в сульфатно-хлоридных электролитах окисляющие растворы, как гораздо более мягкие окислители, не должны приводить к неблагоприятным воздействиям на плазму крови, однако, при этом они остаются, как мы видели, достаточно активными окислителями по отношению к ксенобиотикам.

Учитывая, что основное применение этих растворов – детоксикация организма с помощью внутривенного введения, то исследование только взаимодействия окисляющего раствора с плазмой крови и ксенобиотиками является не корректным. Поэтому было также необходимо исследовать воздействие синтезированных окисляющих растворов с форменными элементами крови. В качестве модели форменного элемента были исследованы эритроциты, разрушение которых приводит к весьма опасному явлению гемолизу, который можно зафиксировать с помощью определения свободного гемоглобина.

Таблица 5.5 – Результаты спектрофотометрического определения свободного гемоглобина

№	Наименование	Светопоглощение при длине волны, отн. ед.			C _{Нб} , г/л	$\bar{C}_{Нб}$, г/л
		380 нм	415 нм	450 нм		
1	цельная кровь + физиологический раствор (10:1)	0,0166	0,0701	0,0065	0,0980	0,0981
		0,0150	0,0695	0,0065	0,0983	
		0,0163	0,0701	0,0065	0,0981	
2	цельная кровь + синтезированный раствор (10:1)	0,0161	0,0699	0,0062	0,0983	0,0982
		0,0163	0,0701	0,0065	0,0981	
		0,0153	0,0696	0,0067	0,0982	

Было обнаружено, что контакт, синтезированного в щелочном электролите с рН = 7,20, содержащего 0,14 М Na₂SO₄ и 0,68 мМ NaCl при плотности тока 35 А/дм² и скорости протока раствора электролита 12,5 мл/мин, добавленного к цельной крови в соотношении 1:10 (табл. 5.5), не приводит к разрушению

эритроцитов: содержание свободного гемоглобина составило около 0,1 мг/л при норме 0,22 г/л [427].

Более того, морфологические исследования эритроцитов до и после контакта крови с окисляющим раствором показали отсутствие видимых изменений морфологических форм эритроцитов (рис. 5.17).

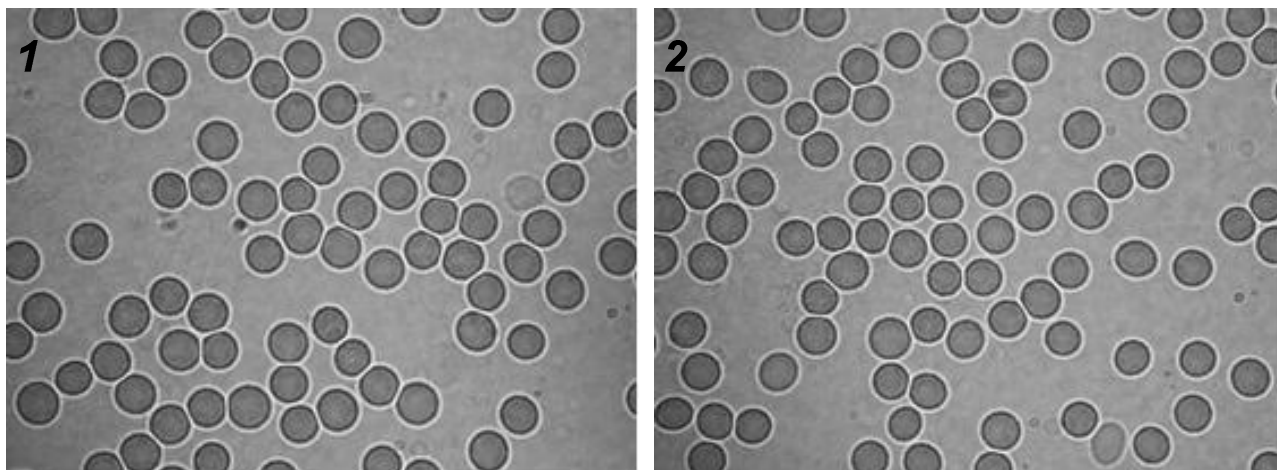


Рисунок 5.17 – Морфологическое исследование эритроцитов человека до (1) и после (2) контакта с синтезированным раствором.

Взаимодействие плазмы крови с растворами, обладающими окисляющим действием, должно приводить к снижению антиоксидантной активности среды, поскольку одной из функциональных задач антиоксидантов является нейтрализация в организме любых окислителей, включая свободные радикалы.

Влияние синтезированных нами окисляющих растворов на уровень антиоксидантов в биологических средах. В качестве биологической среды была исследована плазма крови, в качестве антиоксиданта – кверцетин дигидрат, исследуемым раствором служил окисляющий раствор, полученный в растворе состава 0,14 М Na_2SO_4 и 0,68 мМ NaCl при плотности тока 35 А/дм² и скорости протока раствора электролита 12,5 мл/мин, который добавляли в соотношении 1:10 к плазме крови (табл. 5.6).

Таблица 5.6 – Антиоксидантная активность плазмы крови при контакте с окисляющим раствором

№	Концентрация антиоксидантов, ммоль/л (по кверцетин дигидрату)		
	плазма	плазма + физиологический раствор (10:1)	плазма + окисляющий раствор (10:1)
1	1,50	1,34	0,67
2	1,21	1,03	0,31
3	1,34	1,14	0,44

Из данных, представленных в табл. 5.6, видно, что взаимодействие плазмы крови с синтезированным раствором приводит к снижению содержания антиоксидантов в плазме. Однако обнаружено, что не происходит полной нейтрализации антиоксидантов, а, принимая во внимание тот факт, что при добавлении в плазму крови происходит сдвиг ПРЦ в положительную область потенциалов (рис. 5.16), можно сделать вывод о смещении равновесия между про- и антиоксидантами в сторону преобладания оксидантов. Данное смещение может свидетельствовать об увеличении окисляющей активности плазмы крови.

Важной характеристикой синтезированных растворов является бактерицидное действие. При исследовании взаимодействия окисляющего раствора, полученного в раствор состава 0,14 М Na₂SO₄ и 0,68 мМ NaCl при плотности тока 35 А/дм² и скорости протока раствора электролита 12,5 мл/мин, с образцом биологической среды, содержащей микрофлору. В качестве биологической среды с микрофлорой была использована кровь пациентов с сепсисом. В одну из проб (контрольную) был добавлен физиологический раствор в соотношении 1:10, в другую синтезированный раствор в таком же соотношении. Бактериологический анализ показал, что кровь пациента была обсеменена *Staphylococcus coagulase (-)*, устойчивым к большинству виду антибиотиков. При этом, по сравнению с контролем в пробе с окисляющим раствором, рост микрофлоры не происходил в течение 7 суток (приложение 1, табл. 1). Таким образом, была установлена стерильность синтезированных растворов и

зафиксирована бактерицидная активность окисляющего раствора по отношению к *Staphylococcus coagulase* (-). Аналогичные результаты были получены при исследовании крови, содержащей *Micrococcus spp.* (приложение 1, табл. 2).

На основании представленных выше данных, в связи с наличием у синтезируемого раствора стерилизующих свойств, открывается возможность использования окисляющих растворов не только в качестве детоксицирующих и дезинфицирующих, но и бактерицидных растворов, что существенно расширяет область применения синтезированных растворов.

5.2 Электросинтез растворов на основе карбонатных и карбонатно-хлоридных растворов

Помимо использования в качестве донора активного кислорода персульфат-иона, было предложено исследовать возможность получения окисляющих растворов на основе растворов карбоната натрия. Данное предположение основано на том, что при анодном окислении карбоната происходит образование перкарбоната [270-272]. Однако существующие методы электросинтеза основаны на применении растворов с концентрацией карбоната не менее 0,5 М.

Для использования в качестве раствора медицинского назначения необходимо, чтобы раствор был близок к физиологическим по значениям рН и осмоляльности. На основании наших работ по электросинтезу персульфат-иона в разбавленных сульфатных растворах [38, 39], нами было предложено использовать в качестве исходного раствора электролита 0,14 М Na_2CO_3 .

5.2.1 Электросинтез растворов на основе карбонатных растворов

Как и в случае электроокисления сульфатно-хлоридных растворов электролиз проводился в проточной фильтрпрессной ячейке. В качестве материала анода был выбран титан, покрытый диоксидом иридия. Скорость протока электролита через ячейку составляла 12,5 мл/мин.

Как видно, из представленных данных (табл. 5.7, рис. 5.18), при выбранных условиях электролиза не удается получить растворы с величинами pH, близкими к физиологическим. Кроме того, отмечено, что синтезированные растворы обладают достаточно низким значением ПРЦ, что делает их малопригодными для использования в практических целях.

Таблица 5.7 – Данные по свойствам синтезированных растворов

№	i , А/дм ²	pH	ПРЦ, мВ
1	0	11,32	31,392
2	20	10,86	87,186
3	30	10,74	93,364
4	40	10,63	109,580
5	50	10,54	139,700
6	60	10,40	179,280

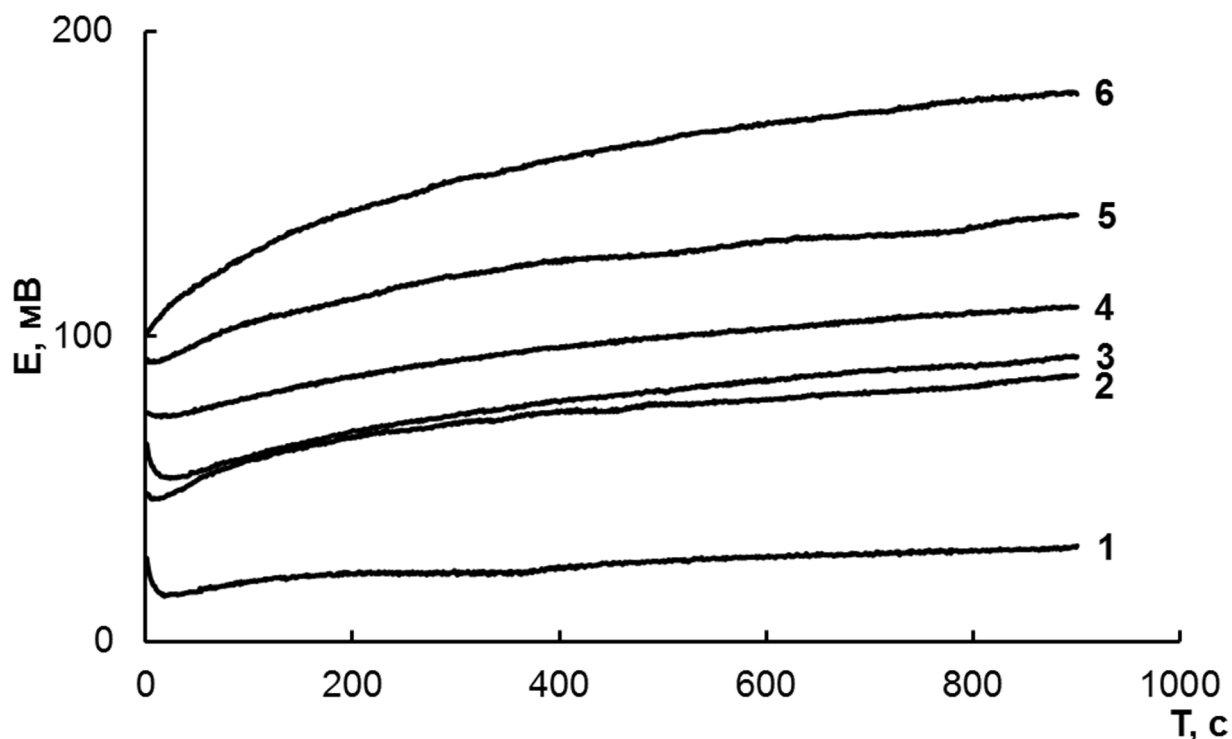


Рисунок 5.18 – Зависимость ПРЦ от времени в окисляющем растворе, полученном при электроокислении 0,14 М Na₂CO₃ при плотности тока, А/дм²: 1 – 0, 2 – 20, 3 – 30, 4 – 40, 5 – 50, 6 – 60.

Для получения растворов с величинами рН близкими к физиологическим было решено подвергать электроокислению карбонатные растворы со скорректированным значением рН с помощью подкисления исходного раствора 1 М серной кислотой.

Как видно из представленных данных (рис. 5.19, табл. 5.8), подкисление исходного раствора до рН 8,99 позволяет получить растворы с величинами рН от 7,57 до 7,91. Однако значения ПРЦ синтезированных растворов являются весьма низкими.

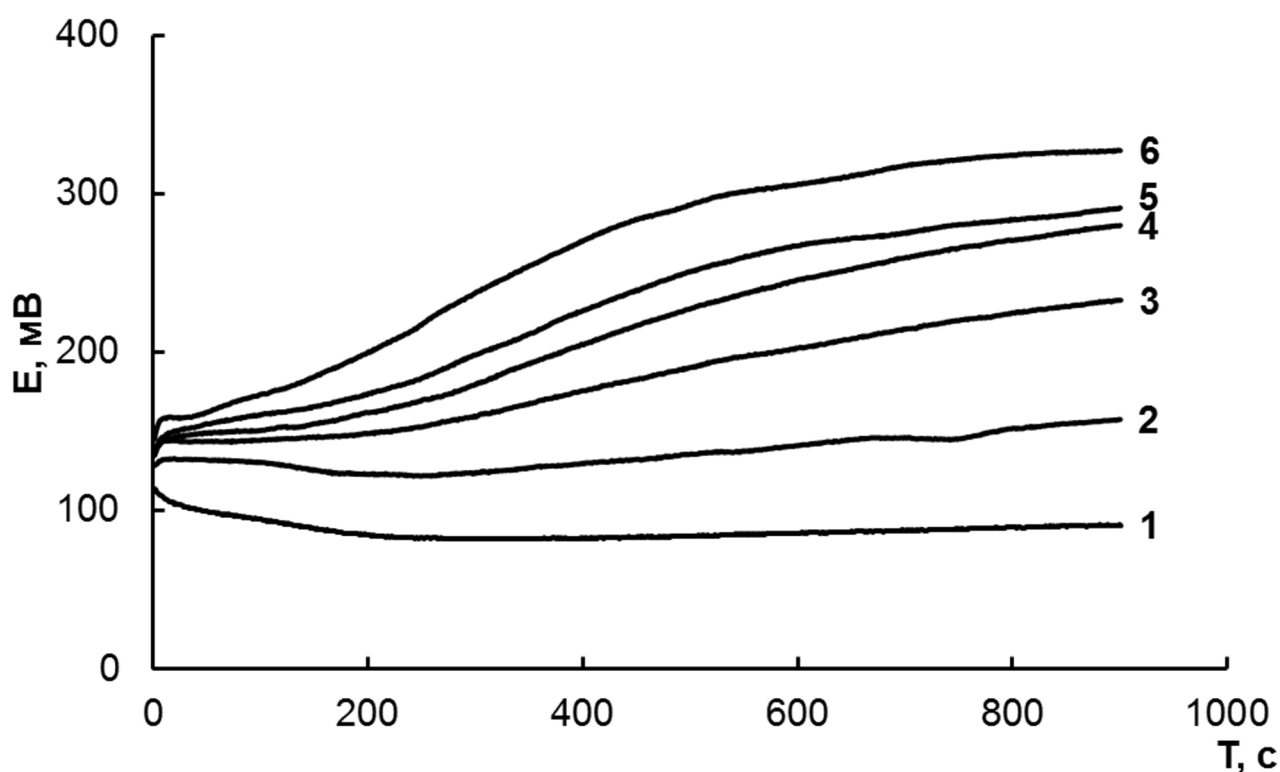


Рисунок 5.19 – Зависимость ПРЦ от времени в окисляющем растворе, полученном при электроокислении 0,14 М Na_2CO_3 при плотности тока, А/дм^2 : 1 – 0, 2 – 20, 3 – 30, 4 – 40, 5 – 50, 6 – 60.

Таблица 5.8 – Данные по свойствам синтезированных растворов

№	i , А/дм ²	pH	ПРЦ, мВ
1	0	8,99	90,661
2	20	7,91	157,460
3	30	7,81	232,750
4	40	7,70	280,050
5	50	7,61	291,060
6	60	7,57	327,160

5.2.2 Электросинтез растворов на основе карбонатно-хлоридных растворов

Для повышения окисляющей активности синтезированных растворов на основе разбавленных растворов карбоната натрия было предложено проводить электросинтез в карбонатных растворах с добавками хлорида натрия, как это описано выше в случае сульфатно-хлоридных растворов.

Электроокислению подвергались растворы, содержащие 0,14 М Na₂CO₃ и 0,68 мМ NaCl.

При электроокислении карбонатно-хлоридных растворов величина pH окисляющих растворов также оказалась близкой к физиологическим значениям и составила 7,33–7,49 (табл. 5.9). В тоже время величина ПРЦ синтезированных растворов составила 298,97–370,410 мВ (рис. 5.20), что близко к значениям, полученным для окисляющих растворов на основе карбонатных растворов. Данное явление может быть объяснено с тем, что наличие карбоната снижает активность гипохлорита [367], который образуется по реакции (5.1,5.2).

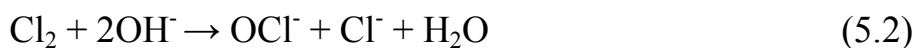


Таблица 5.9 – Данные по свойствам синтезированных растворов

№	i , А/дм ²	pH	ПРЦ, мВ
1	0	8,52	92,206
2	20	7,49	298,970
3	30	7,44	337,970
4	40	7,38	350,710
5	50	7,36	370,410
6	60	7,33	366,160

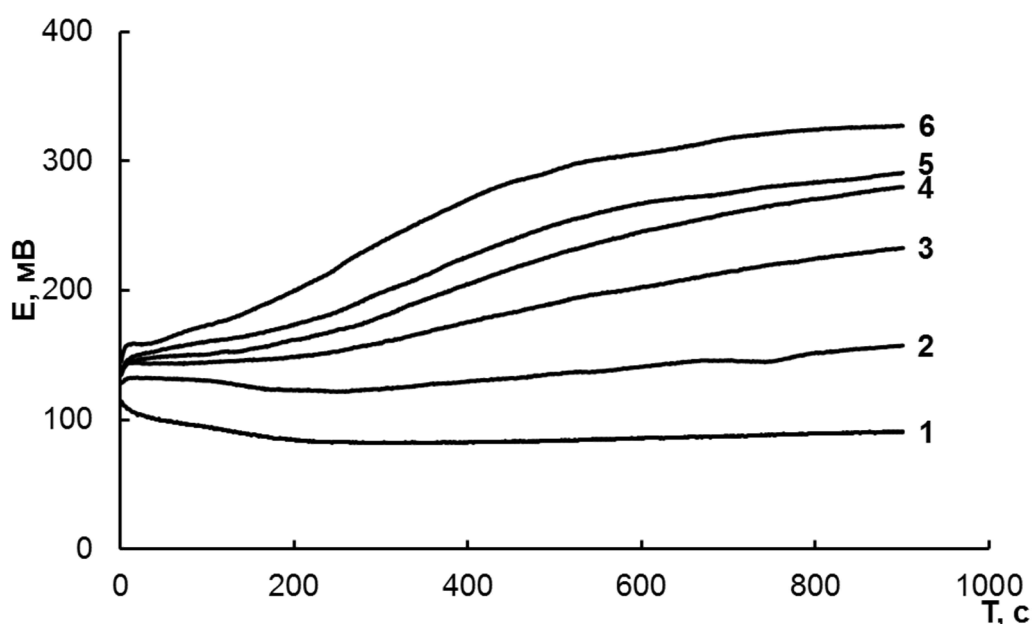


Рисунок 5.20 – Зависимость ПРЦ от времени в окисляющем растворе, полученном при электроокислении 0,14 М Na₂CO₃ + 0,68 мМ NaCl при плотности тока, А/дм²: 1 – 0, 2 – 20, 3 – 30, 4 – 40, 5 – 50, 6 – 60.

Таким образом, можно сделать вывод, что растворы, полученные, как на основе карбонатных, так и карбонатно-хлоридных электролитов, обладают значительно меньшей окислительной активностью, что ограничивает области применения указанных растворов в медицинской практике. К одному из возможных применений синтезированных растворов можно отнести использование их в качестве мягких окисляющих растворов для детоксикации организма.

6 Электрохимический эндоваскулярный гемостаз (остановка кровотечений)

Проблема экстренной остановки кровотечений является весьма актуальной, несмотря на наличие большого числа способов хирургической и лекарственной остановки кровотечений (гемостаза) [273-275]. Использование широко применяемых в настоящее время методов коагуляции (например, лазерная коагуляция) сопровождается созданием высокой температуры в месте локализуемого дефекта сосуда, что часто приводит к некрозам [368]. Альтернативным способом является электрохимическая коагуляция крови с использованием постоянного тока, впервые предложенная Sawyer [28, 29].

Метод электрохимической коагуляции может быть определен как «холодный» процесс, поскольку при его использовании отсутствует эффект термического повреждения сосудистой стенки и других тканей. Важной проблемой для внедрения этого «мягкого» метода в клинику до настоящего времени является проблема выбора материала рабочего электрода.

Использование электродов из нержавеющей стали в условиях анодной поляризации вызывает сомнение, поскольку при травлении нержавеющей стали в организм также могут попадать тяжелые металлы.

Имеется также ряд работ, в которых использован медно-бериллиевый сплав и нержавеющая сталь, покрытая медью, однако использование данного типа электродов не представляется возможным в виду высокой опасности отравления организма медью, которая является гемолитическим ядом [208, 369, 370].

Наиболее подходящими материалами для использования в качестве рабочих электродов в процессе электрохимической коагуляции крови являются благородные металлы. Имеющиеся в настоящее время проводники с рабочей частью, выполненной полностью из благородного металла, являются весьма дорогостоящими, особенно принимая во внимание, что данные электроды предназначены для одноразового применения. Проводники из нержавеющей стали, торец которых электролитически покрыт благородными металлами, обладают низкой коррозионной стойкостью из-за анодного растворения подложки

из нержавеющей стали вследствие высокой пористости осадка благородного металла. Очевидно, что пористые осадки не могут предотвратить коррозии подложки из нержавеющей стали при анодной поляризации.

Мы предположили, что только плотные беспористые покрытия благородными металлами подложки из нержавеющей стали позволят существенно повысить эффективность процесса электрохимической коагуляции, снизив при этом риск попадания тяжелых металлов в организм человека из-за анодного растворения, а также стоимость рабочих электродов за счет снижения количества используемого благородного металла. Таким образом, поиск подходящей технологии гальванического покрытия и испытания полученных электродов были основной задачей настоящей части данного исследования.

6.1 Подбор электродного материала

Для реализации процесса электрохимической коагуляции было изготовлено устройство, состоящее из ангиографического проводника (проволока из нержавеющей стали диаметром около 1 мм), торец которого покрывался электрохимически слоем благородного металла (Au, Ru, Rh, Pd). В сосуд вводится рабочий электрод (анод) в виде проволоки или пружины (рис. 6.1), вспомогательный электрод (катод) в виде пластины с рабочей площадью поверхности порядка 100 см^2 помещается на кожный покров. Поляризация анода приводит к иницированию процесса образования сгустка в месте локализации электрода, сгусток затем преобразуется в тромб, который перекрывает сосудистое русло, что и приводит к остановке кровотечения.

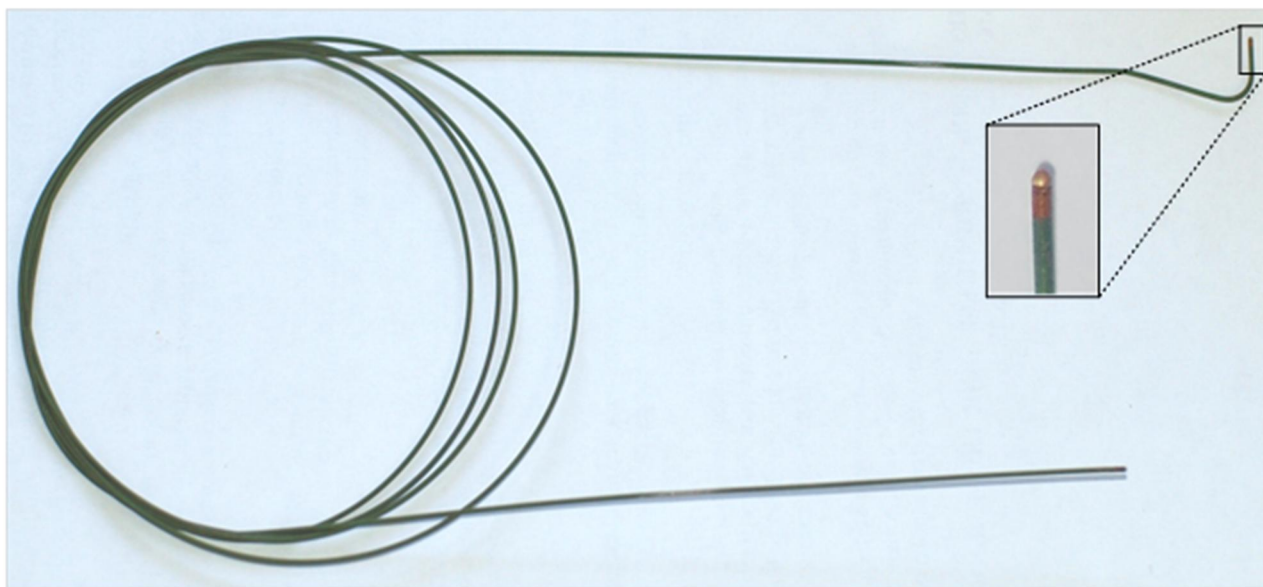


Рисунок 6.1 – Фоторафия рабочего электрода (ангиографического проводника).

6.2 Поляризационные измерения

Для определения параметров, необходимых для реализации метода электрохимической внутрисосудистой коагуляции было предварительно проведено исследование процесса образования сгустка крови на платиновом электроде площадью $5 \cdot 10^{-4}$ дм² в физиологическом растворе и биологических средах (рис. 6.2).

Как видно из данных, представленных на (рис. 6.2), существуют значительные различия между измерениями в модельной среде (физиологический раствор) и измерениями в биологических средах (плазма крови, цельная кровь). Обнаружено, что в биологических средах область потенциалов, соответствующая началу электрохимического процесса, сдвигается в анодную область примерно на 20 мВ в плазме относительно физиологического раствора, в крови, наряду с еще большим сдвигом потенциала анодного процесса, имеет место уменьшение наклона поляризационной кривой, что можно связать с увеличением омического сопротивления в результате протекания анодных процессов, протекающих на платине в крови.

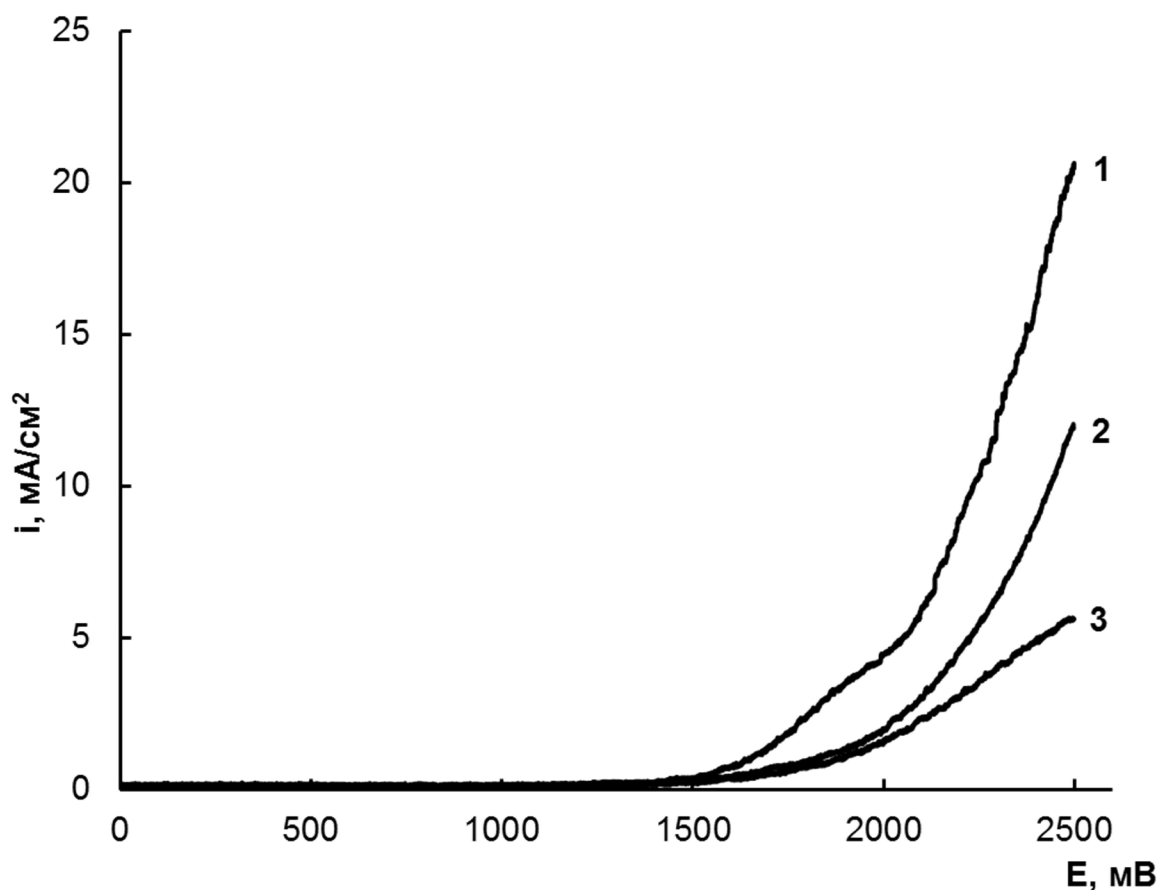


Рисунок 6.2 – Анодные поляризационные кривые на платиновом электроде в растворе: 1 – физиологический раствор (0,15 М NaCl), 2 – плазма крови, 3 – цельная кровь. Скорость развертки потенциала 10 мВ/с.

Основными анодными процессами, протекающими при потенциалах более 1,5 В в водном растворе 0,15 М NaCl на платиновом электроде, являются реакция выделения хлора и частично кислорода. При переходе к биологическим средам, помимо этих реакций имеет место взаимодействие электрода с белками, что приводит к их денатурированию [35], форменными элементами крови и другими компонентами крови, что, как нами было предположено, приводит к блокировке поверхности электрода. Таким образом, следует считать, что область потенциалов положительнее 2,0 В является пригодной для образования сгустков на аноде.

Действительно, при проведении исследований в гальваностатических условиях (рис. 6.3) было обнаружено, что, как в плазме крови, так и в цельной крови на поверхности электрода происходит образование объемных структур.

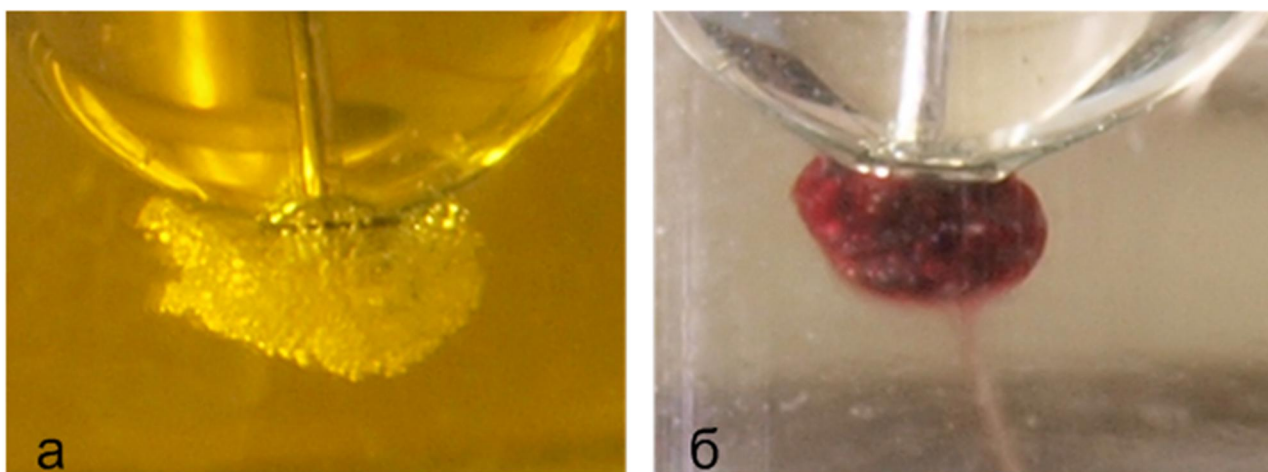


Рисунок 6.3 – Сгустки, образованные на поверхности электрода в гальваностатических условиях ($I = 500 \text{ мкА}$, $T = 60 \text{ с}$): а – плазма крови, б – цельная кровь.

Можно предположить, что данные образования состоят из нитей фибрина, пузырьков газа и форменных элементов (в случае цельной крови). По-видимому, в использованной нами области анодных потенциалов на поверхности электрода происходят процессы активации некоторых компонентов свертывающей системы крови, что и запускает механизмы образования сгустка (рис. 6.4).

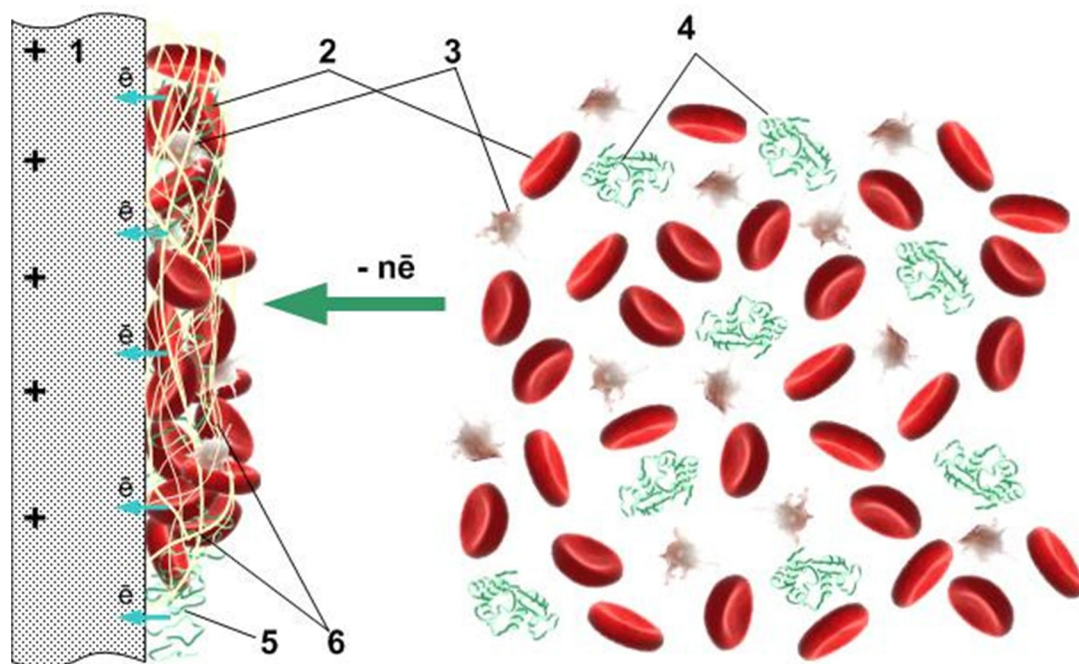


Рисунок 6.4 - Схема взаимодействие компонентов крови с заряженной поверхностью электрода. 1 – электрод, 2 – эритроцит, 3 – тромбоцит, 4 – молекула белка, 5 – денатурированный белок на поверхности электрода, 6 – нити фибрина.

6.3 Моделирование процесса электрокоагуляции на платиновом электроде

Процесс образования сгустка в цельной крови проводили в гальваностатических условиях в диапазоне величин силы тока от 100 до 750 мкА при потенциале электрода от 1,8 до 3,5 В и времени процедуры образования сгустка от 15 до 120 сек. Следует сразу подчеркнуть, что измеренные величины потенциалов не учитывают омических падений, имеющих место в виду образования на электроде пузырьков газа и блокировки электрода адсорбированными на нем нитями фибрина и продуктами денатурации белков.

При проведении процесса было обнаружено, что при величине тока выше 500 мкА на зависимости ток – время наблюдались волнообразные участки (рис. 6.5, кривые 3 и 4), что может быть связано с более интенсивным газообразованием с увеличением плотности тока на поверхности электрода, что может приводить к отрыву сгустка (табл. 6.1, фотография внизу справа). Исходя из этих данных, было решено установить величину тока 750 мкА в качестве верхней границы при проведении процесса электрокоагуляции крови.

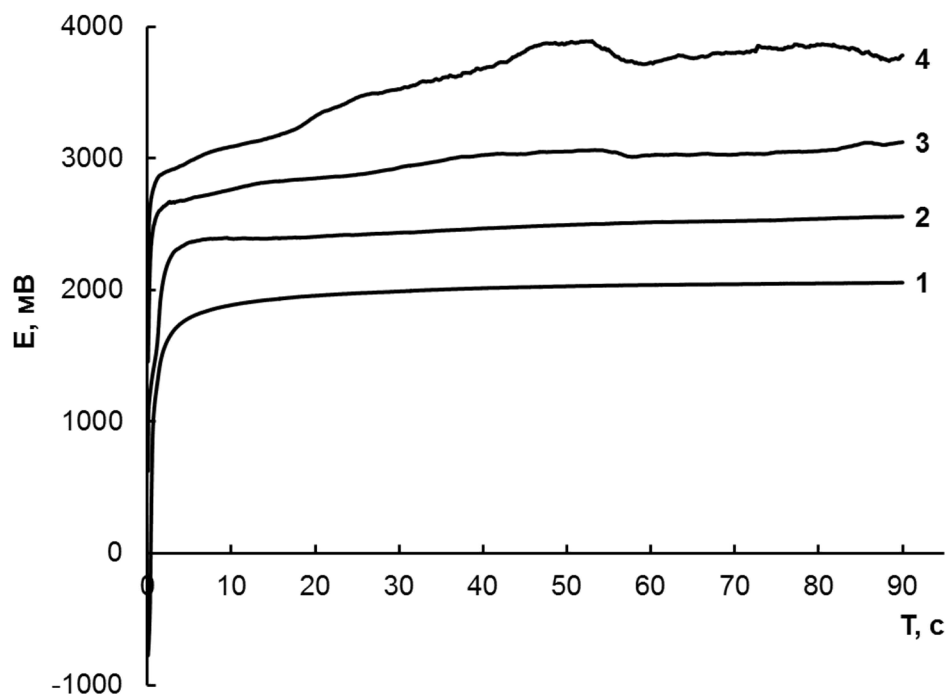


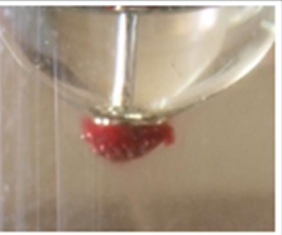
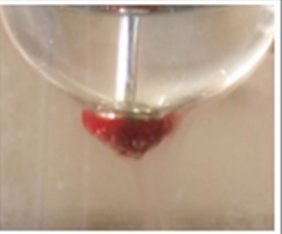

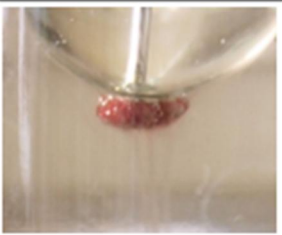
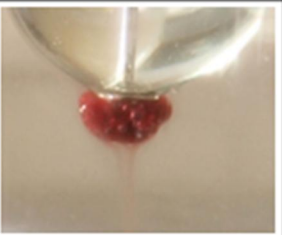
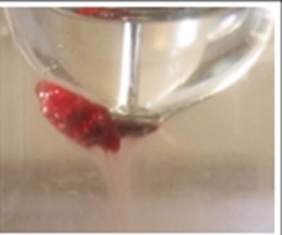

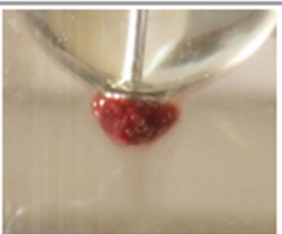
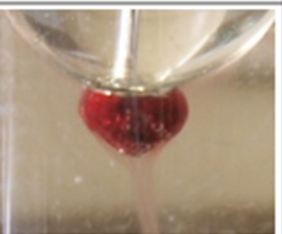
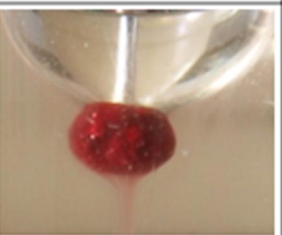
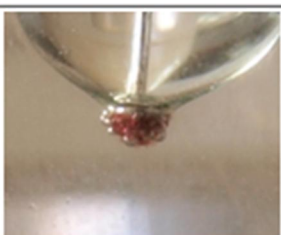
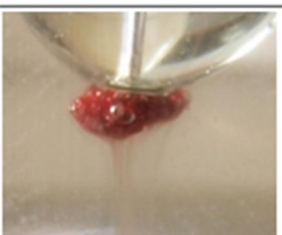
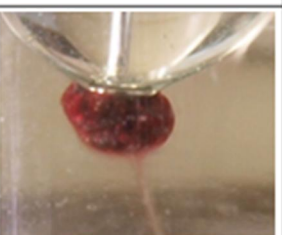
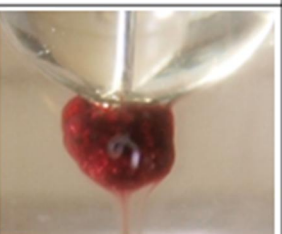

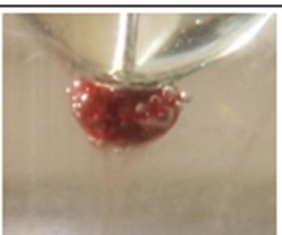
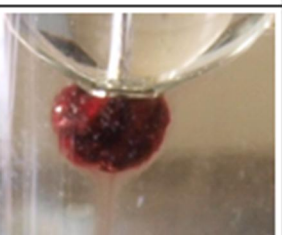
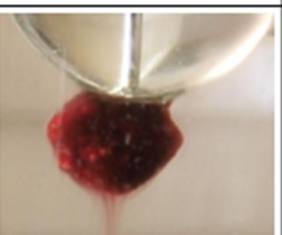

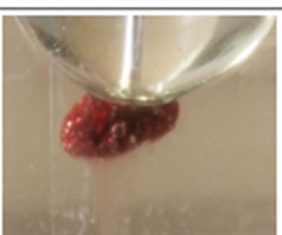
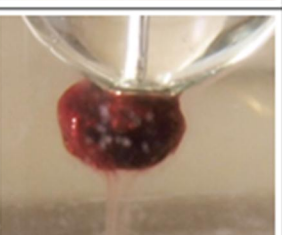
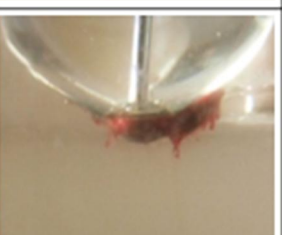


Рисунок 6.5 – Зависимость потенциала от времени в крови в гальваностатических условиях, мкА: 1 – 100, 2 – 250, 3 – 500, 4 – 750.

Таблица 6.1 – Фотографии сгустков на платиновом электроде. Режим процесса гальваностатический

Т, с	I, мкА			
	100	250	500	750
15				
30				
45				
60				
90				
120				

Если принять форму образовавшегося сгустка за эллипсоид, то приблизительный объем может быть рассчитан по формуле:

$$V_{\text{сгустка}} = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot a \cdot b \cdot c \quad (6.1)$$

где $V_{\text{сгустка}}$ – объем сгустка, мм^3 ,

a, b, c – полуоси эллипсоида, мм .

Таким образом, были рассчитаны размеры сгустка в зависимости от параметров проведения процесса электрокоагуляции (табл. 6.2).

Таблица 6.2 – Зависимость объема сгустка (мм^3) от параметров процесса

I, мкА	T, сек					
	15	30	45	60	90	120
100	-	0,05	0,10	0,31	0,51	0,68
250	0,16	0,27	1,03	1,18	1,61	1,74
500	0,32	0,62	1,47	1,97	2,88	3,21
750	0,45	0,72	2,51	2,93	4,56	(6,03)

Если представить полученные данные в виде плоской диаграммы зависимости объема сгустка от силы тока и времени воздействия (рис. 6.6), то можно выделить область значений силы тока и времени, соответствующую оптимальным условиям проведения процесса электрокоагуляции. Так, в диапазоне сил тока 450–600 мкА за время электрокоагуляции 70–100 сек на точечном электроде диаметром 1 мм могут быть образованы сгустки объемом 2–3,5 мм^3 .

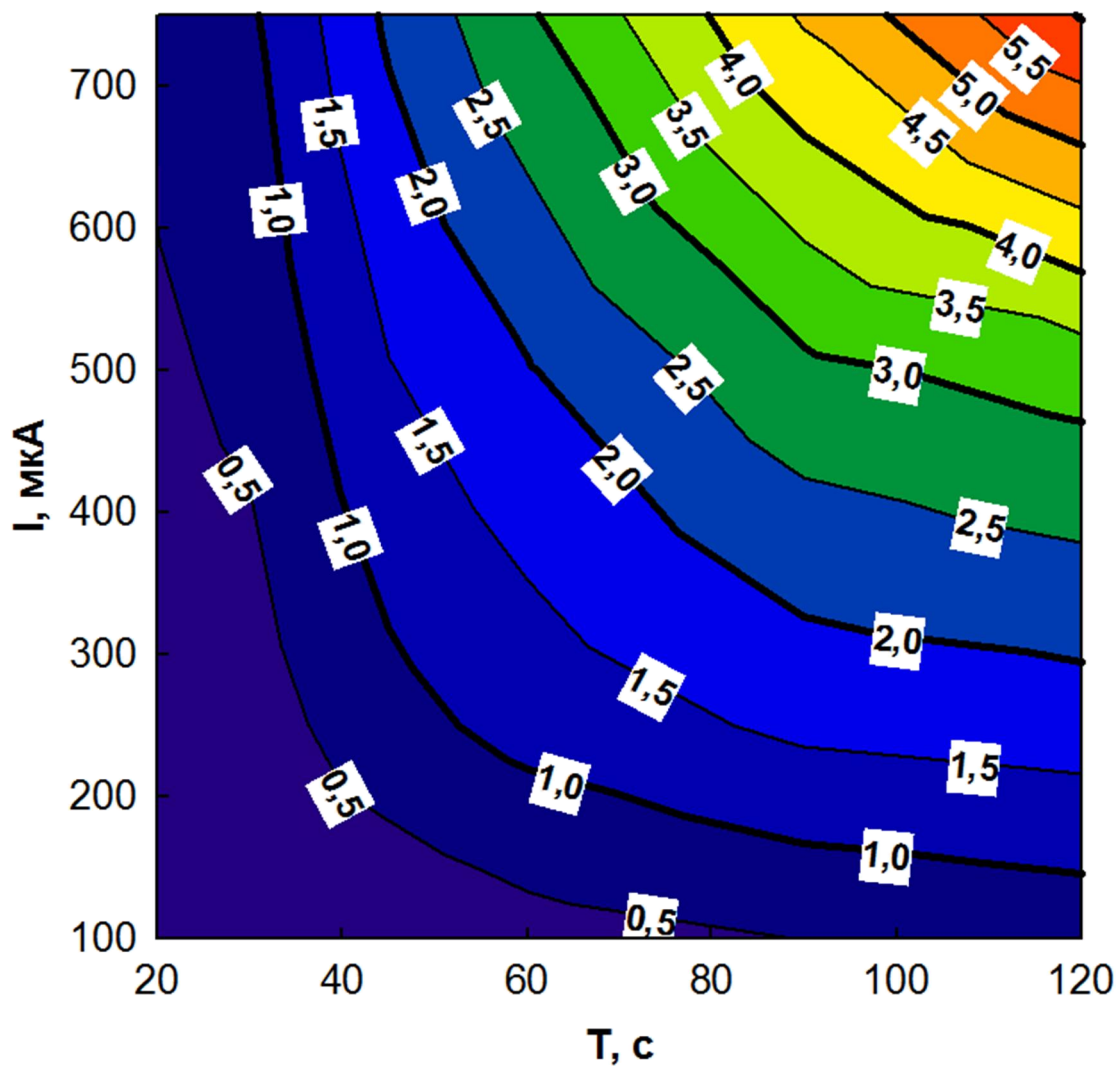


Рисунок 6.6 – Диаграмма зависимости объема сгустка (mm^3) от силы тока и времени воздействия.

6.4 Оценка защитной способности покрытий благородными металлами

В ходе коррозионных испытаний в плазме крови было установлено, что потенциал стальных образцов с различными покрытиями смещался в область положительных значений потенциалов в течение сравнительно короткого промежутка времени (200 сек) и далее практически не менялся (табл. 6.3).

Таблица 6.3 – Значение стационарного (бестокового) потенциала в плазме крови

E, мВ	подложка	подложка с покрытием, мкм		чистый металл
		0,01	0,1	
Au	119	125	153	268
Ru	119	201	209	283
Pd	119	174	193	278
Rh	119	236	253	277

Согласно этим данным, наилучшие коррозионные характеристики наблюдались у образцов из нержавеющей стали, покрытой родием. Действительно, как видно из данных, приведенных в табл. 6.3, величина разности стационарных потенциалов подложки и образца нержавеющей стали, покрытой родием толщиной 0,01 мкм, составила 117 мВ, что превышает указанную разницу для образца, покрытого рутением, на 35 мВ (то есть на 30%). Увеличение толщины до 0,1 мм (то есть на порядок) практически не повлияло на соотношение коррозионной стойкости образцов, покрытых родием и рутением (30% против 33%).

Таким образом, был выбран способ покрытия родием толщиной 0,01 мкм.

Данные о плотности токов коррозии в плазме крови, представленные в таблице 6.4, подтверждают правильность сделанного выбора.

Таблица 6.4 – Плотность тока коррозии покрытий благородными металлами в плазме крови

i, А/дм ²	подложка	подложка с покрытием, мкм	
		0,01	0,1
Au	0,00123	0,00118	0,00098
Ru	0,00078	0,00043	0,00029
Pd	0,00101	0,00092	0,00067
Rh	0,00062	0,00033	0,000019

6.5 Электрокоагуляция *in vitro* на электродах из благородных металлов

При проведении электрокоагуляции *in vitro* в цельной крови практически здоровых добровольцев с применением ангиографических проводников, с покрытием рабочей части благородными металлами (золото, палладий, родий, рутений) толщиной 0,01 мкм (рис. 6.7) в гальваностатическом режиме при силе тока 500 мкА и времени воздействия 90 сек, было обнаружено различное поведение исследованных покрытий (рис. 6.8).

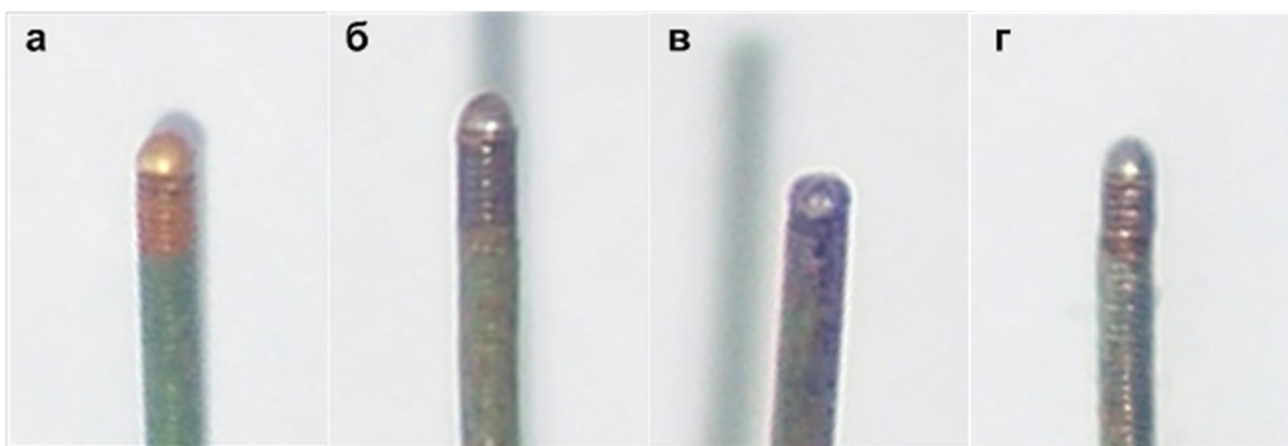


Рисунок 6.7 – Фотографии ангиографических проводников с покрытием металлами платиновой группы. а – золото, б – палладий, в – родий, г – рутений.

Так, для золотого покрытия характерно образование сгустков в виде небольших островков размером не более $0,8 \text{ мм}^2$ (рис. 6.8, а). Было сделано предположение, что данное явление может быть связано с низкой степенью адгезии образующихся сгустков к поверхности электрода, что приводит к их отрыву в процессе электрокоагуляции.

Для покрытий рутением (рис. 6.8, б) и палладием (рис. 6.8, в) были получены схожие результаты. На указанных электродах размер сгустков мог достигать $2,5 \text{ мм}^2$ при толщине около 0,3 мм.

В связи с этим, использование указанных металлов в качестве покрытий электрода при проведении процесса электрокоагуляции внутри реального сосуда с

необходимостью формирования достаточно больших сгустков (более нескольких мм), способных перекрывать кровоток, представляется маловероятным.

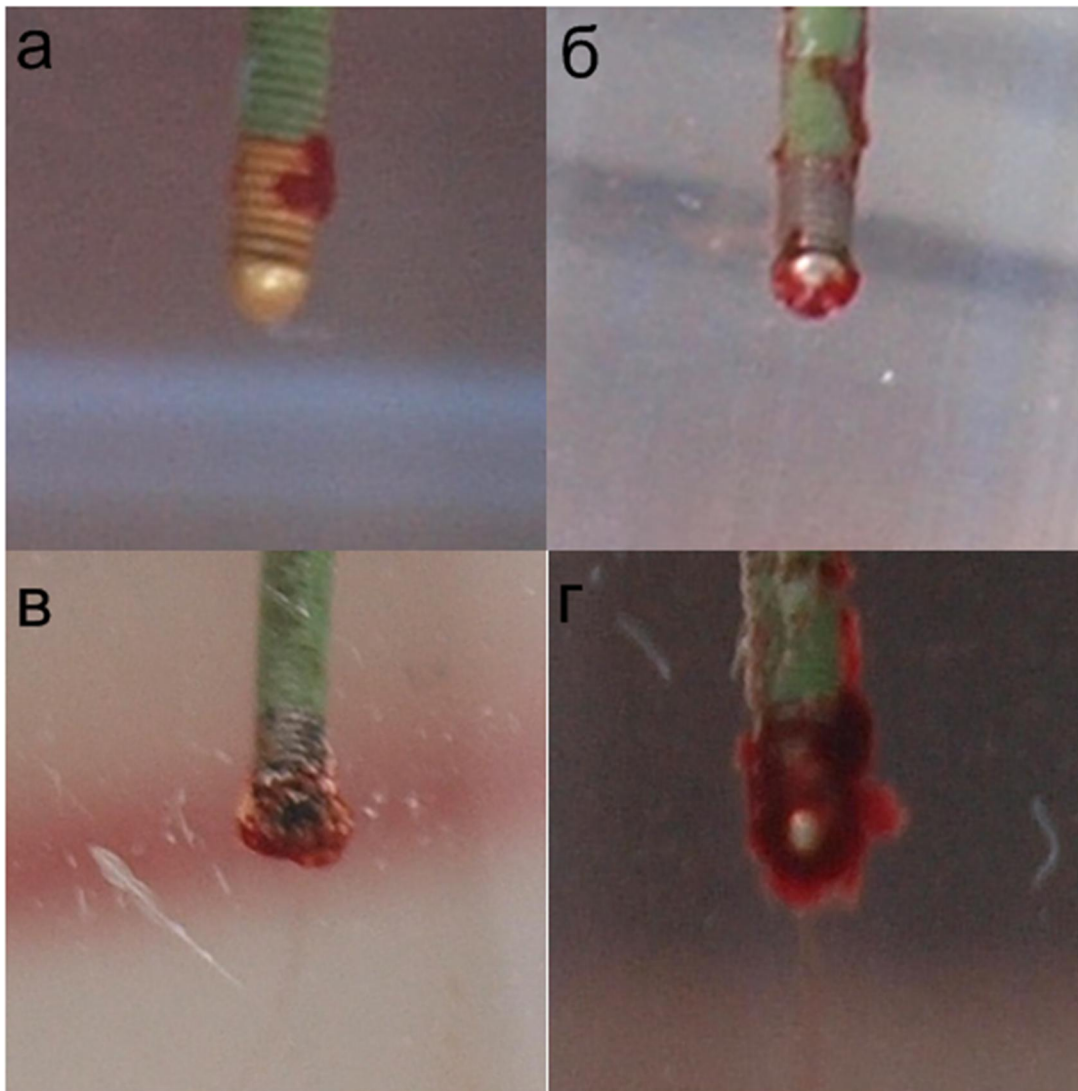


Рисунок 6.8 – Фотографии сгустков, полученных в гальваностатических условиях на электроде с покрытием: а - золото, б – палладий, в – рутений, г – родий.

При использовании родиевого покрытия (рис. 6.8, г) сгусток образовывался практически на всей поверхности электрода (около 5 мм^2 при толщине $0,3 \text{ мм}$), что позволяет сделать предположение о возможности использования указанного покрытия для проведения электрокоагуляции.

Таким образом, сделанный нами выбор в пользу родиевого покрытия, как наиболее коррозионностойкого, подтвердился наибольшей эффективностью в опытах *in vitro* среди исследованных покрытий.

6.6 Электрокоагуляция *in vivo*

Эксперименты *in vivo* выполняли на двух беспородных собаках. Исследования проводили с соблюдением принципов гуманного обращения с животными. С целью премедикации перед операцией вводили внутримышечно 4 мл 0,5% *S.Relanium*, 2 мл *S.Droperidoli*. С целью обезболивания во время операции вводили внутривенно 20 мл 1% *S.Thiopenthal*. Из эксперимента животных выводили введением летальной дозы наркоза.

В качестве рабочего электрода был использован ангиографический проводник TSCF-35-145-3 (Cook Medical Inc., США), неизолированная рабочая часть которого была электролитически покрыта слоем родия толщиной 0,01 мкм. В качестве противоэлектрода использовали платину из титана с площадью поверхности 100 см², которую накладывали на бедро. Стабильность электрического контакта обеспечивали с помощью использования электропроводного геля Элкогель (ООО «Кирлена», Россия).

Электрохимическая коагуляция крови *in vivo* была поведена на брыжеечных венах и их ветвях. Каждая вена предварительно травмировалась для появления кровотечения путем прокола, затем пораженный участок пережимали кровоостанавливающим зажимом, через брыжеечную вену и ее ветви вводили электрод и поляризовали его для коагуляции крови внутри исследуемых сосудов.

Проводник продвигали вдоль сосуда с периодическими остановками на 15 с для проведения коагуляции при величине тока 15 мА и последующим перемещением на 3–5 мм в течение 5 с. Таким образом, в результате процедуры, которая осуществлялась в течение 80 с, был образован тромб длиной около 18 мм (рис. 6.9).

Результаты оценивали по наличию или отсутствию кровотечения из пораженного сосуда при снятии кровоостанавливающего зажима.

Всего была проведена электрохимическая эндоваскулярная коагуляция 14 экспериментально поврежденных вен у двух собак, в результате чего во всех случаях была зафиксирована полная остановка экспериментально вызванного кровотечения.

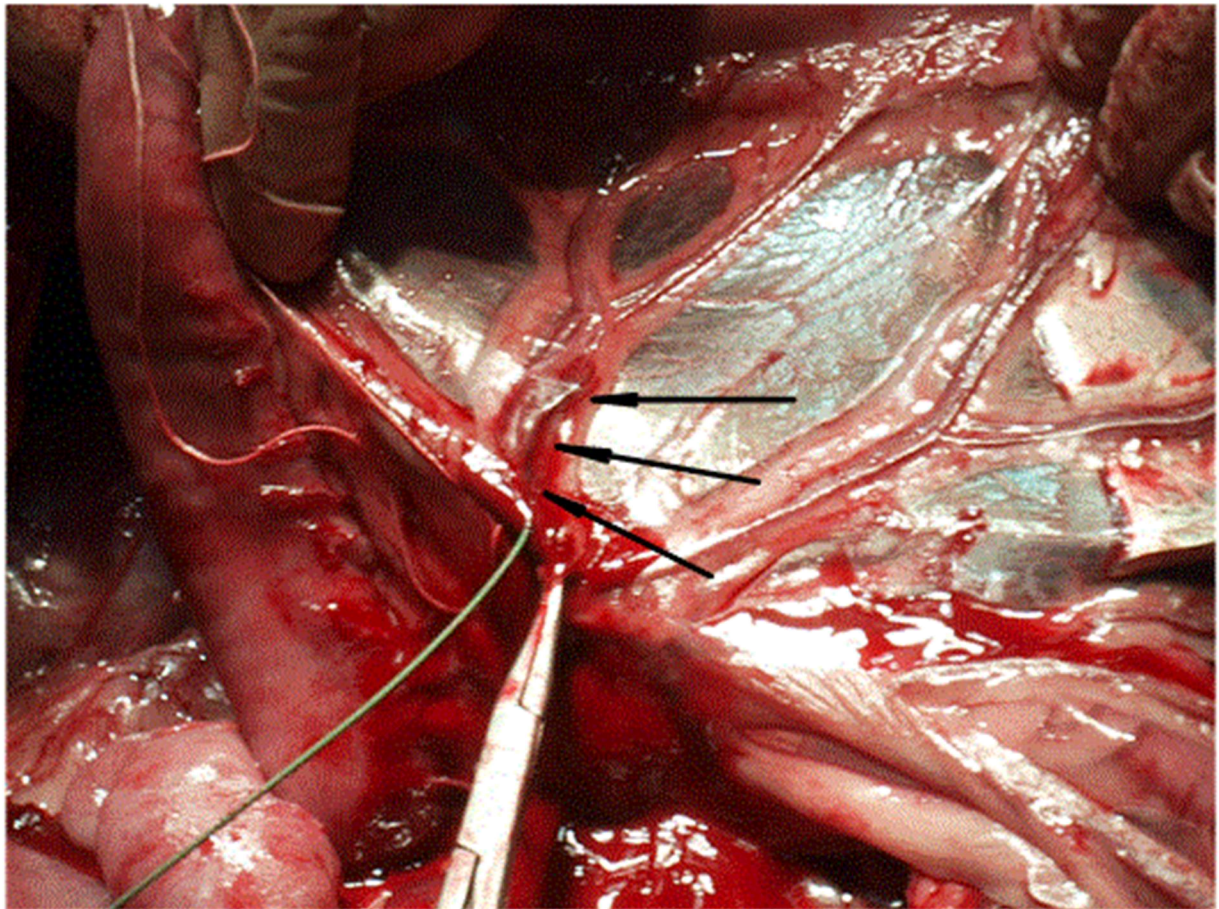


Рисунок 6.9 – Участок брыжеечной вены с электрохимически образованным сгустком (отмечен стрелками).

С нашей точки зрения, применение проводника с родиевым покрытием имеет перспективы внедрения в клиническую практику, поскольку обеспечивает остановку кровотечений в короткие сроки, что является важным в экстренных ситуациях.

ВЫВОДЫ

1. Разработана электрохимическая методика стандартизации состояния поверхности платинового электрода для измерения величины ПРЦ в плазме и сыворотке крови.

2. С помощью измерения величин ПРЦ платинового электрода в сыворотке крови практически здоровых добровольцев установлено, что статистически достоверный диапазон этих величин составляет от -60 до -20 мВ относительно хлорсеребряного электрода сравнения.

3. Статистический анализ величин ПРЦ сыворотки крови 232 пациентов (1974 измерения) показал, что предложенная электрохимическая методика обладает чувствительностью 84,6%, специфичностью 69,8% и точностью 84,1%.

4. Обнаружено, что волнообразные участки на зависимости ПРЦ платинового электрода в плазме крови от времени совпадают с клиническими данными наличия воспалительных процессов в организме.

5. Обнаружено, что величину смещения ПРЦ платинового электрода в сыворотке или плазме крови при ежедневном мониторинге можно использовать в качестве диагностического и прогностического критериев состояния пациента. Получены клинические доказательства применимости указанных критериев.

6. Разработан метод прямого определения антиоксидантной активности биологических сред с помощью ЦВА на стеклоуглеродном электроде, электрохимически модифицированном гексацианоферратом кобальта.

7. Разработан вольтамперометрический экспресс метод определения антиоксидантной активности биологических сред на платиновом электроде с использованием п-бензохинона в качестве медиатора. Коэффициент корреляции результатов анализа с известным спектрофотометрическим методом TAS Randox[®], составил 0,84.

8. Показано, что результаты одновременного мониторинга величин ПРЦ платинового электрода в плазме крови и ее антиоксидантной активности могут служить дополнительным критерием оценки состояния пациента, что важно для

своевременной коррекции лечения.

9. Разработан процесс электросинтеза гемосовместимых окисляющих растворов с физиологическим значением рН (7,2–7,4) в разбавленных сульфатно-хлоридных электролитах с содержанием хлорид-иона в электролите менее 1,5 мМ.

10. Доказана бактерицидная активность синтезированных нами окисляющих растворов по отношению к биологическим средам, содержащим грамотрицательную и грамположительную патогенную микрофлору.

11. Разработан метод «холодного» электрохимического эндоваскулярного гемостаза электродами из нержавеющей стали, покрытыми родием толщиной 0,01 мкм.

12. Предложен метод оптимизации процесса внутрисосудистой электрохимической коагуляции в зависимости от диаметра сосуда.

13. Эффективность использования метода электрохимического эндоваскулярного гемостаза с помощью проводников с родиевым покрытием доказана в экспериментах на животных *in vivo*.

Список используемых источников

1. Чизмаджев, Ю.А. Биоэлектрохимия: из прошлого в будущее [Текст] / Ю.А. Чизмаджев // Соровский образовательный журнал. – 2000. – Т. 6, № 3. – С. 23-27.
2. Казаринов, В.Е. Электрохимия и медицина [Текст] / В.Е. Казаринов, Ю.М. Лопухин // Итоги науки и техники. ВИНТИ. Сер. Электрохимия. – 1990. – Т. 31. – С. 3-9.
3. Volkov, A.G. Liquid Interfaces in Chemical, Biological, and Pharmaceutical Applications [Text] / A.G. Volkov // Surfactant Science Series. – N.Y.: M. Dekker. – 2001. – V. 95. – 853 p.
4. Bullock, T.H. Conduction and transmission of nerve impulses [Text] / T.H. Bullock // Annual Review of Physiology. – 1951. – V. 13. – P. 261-280.
5. Фрумкин, А.Н. Избранные труды: Электродные процессы [Текст] / А.Н. Фрумкин. – М.: Наука, 1987. – 336 с.
6. Walz, D. Bioelectrochemistry of Cells and Tissues [Text] / D. Walz, H. Berg, G. Milazzo. – Basel: Birkhäuser, 1995. – 305 p.
7. Опритов, В.А. Электричество в жизни животных и растений [Текст] / В.А. Опритов // Соросовский Образовательный Журнал. – 1996. – № 9. – С. 40-46.
8. Volkov, A.G. Signal transduction in *Mimosa pudica*: biologically closed electrical circuits [Text] / A.G. Volkov, J.C. Foster, V.S. Markin // Plant, cell & environment. – 2010. – Vol. 33, N 5. – P. 816-827.
9. Богуславский, Л.И. Биоэлектрохимические явления и граница раздела фаз [Текст] / Л.И. Богуславский. – М.: Наука, 1978. – 360 с.
10. Chizmadzhev, Yu.A. Single membrane in electric field [Text] / Yu.A. Chizmadzhev // Bioelectrochemistry: Principles and Practice. Volume 6: Bioelectrochemistry of Membranes. – Basel: Birkhauser Verlag. – 2004. – P. 1-21.
11. Маркин, В.С. Физика нервного импульса [Текст] / В.С. Маркин, В.Ф. Пастушенко, Ю.А. Чизмаджев // Успехи физ. наук. – 1977. – Т. 123. – С. 289-332.
12. Коган, А.Б. Электрофизиология [Текст] / А.Б. Коган. – М.: Высшая

Школа, 1969. – 368 с.

13. Findl, E. Electrochemical Techniques in the Biological Science [Text] // E. Findl, E.R. Strope, J.C. Conti // Bioelectrochemistry: Comprehensive Treatise of Electrochemistry / S. Srinivasan, Yu.A. Chizmadzhev, J.O'M. Bockris [et al.]. – NY.: Plenum Press. – 1985. – Vol. 10. – P. 491-529.

14. Ahmed, M.U. Electrochemical Biosensors for Medical and Food Applications [Text] / M.U. Ahmed, M.M. Hossain, E. Tamiya // Electroanalysis. – 2008. – Vol. 20, N 6. – P. 616-626.

15. Sun, C.L. The simultaneous electrochemical detection of ascorbic acid, dopamine, and uric acid using graphene/size-selected Pt nanocomposites [Text] / C.L. Sun, H.H. Lee, J.M. Yang, C.C. Wu // Biosensors and Bioelectronics. – 2011. – Vol. 26, N 8. – P. 3450-3455.

16. Goyal, R.N. Electrochemical sensor for the simultaneous determination of caffeine and aspirin in human urine samples [Text] / R.N. Goyal, S. Bishnoi, B. Agrawal // Journal of Electroanalytical Chemistry. – 2011. – Vol. 655, N 2. – P. 97-102.

17. Mandal, S.S. Titania nanotube-modified screen printed carbon electrodes enhance the sensitivity in the electrochemical detection of proteins [Text] / S.S. Mandal, V. Navratna, P. Sharma, B. Gopal [et al.] // Bioelectrochemistry. – 2014. – Vol. 98. – P. 46-52.

18. Salamifar, S.E. Fabrication of electrochemical DNA sensors on gold-modified recessed platinum nanoelectrodes [Text] / S.E. Salamifar., R.Y. Lai // Analytical Chemistry. – 2014. – Vol. 86, N 6. – P. 2849-2852.

19. Слепченко, Г.Б. Электрохимические методы контроля в медицинской диагностике [Текст] / Г.Б. Слепченко, Н.П. Пикула, Н.М. Дубова, И.А. Хлусов [и др.] // Сибирский медицинский журнал. – 2009. – Т. 24, № 2. – С. 102-105.

20. Богдановская, В.А. Ферментные электроды для анализа биологических жидкостей [Текст] / В.А. Богдановская, М.Р. Тарасевич, В.С. Боровков // Итоги науки и техники. ВИНТИ. Сер. Электрохимия. – 1990. – Т. 31. – С. 167-202.

21. Grosz, H.J. Reduction–Oxidation Potential of Blood as a Function of Partial Pressure of Oxygen [Text] / H.J. Grosz, B.B. Farmer // Nature. – 1967. Vol. 213, N

5077. – P. 717-718.

22. Ziegler, E. The Redox Potential of the Blood in Vivo and in Vitro [Text] / E. Ziegler. – Springfield: Charles C. Thomas Publ., 1965. – 197 p.

23. Nordenström, B.E.W. Biologically Closed Electric Circuits: Clinical, Experimental and Theoretical Evidence for an Additional Circulatory System [Text] / B.E.W. Nordenström. – Stockholm: Nordic Medical Publications, 1983. – 358 p.

24. Nordenström, B.E.W. Exploring BCEC-Systems [Text] / B.E.W. Nordenström. – Stockholm: Nordic Medical Publications, 1992. – 112 p.

25. Nordenström, B.E. Survey of Mechanisms in Electrochemical treatment (ECT) of Cancer [Text] / B.E.W. Nordenström // European Journal of Surgery. – 1994. – Suppl. 574. – P. 93-109.

26. Lao, Y.H. Electrochemical therapy for intermediate and advanced liver cancer: a report of 50 cases [Text] / Y.H. Lao, T.G. Ge, X.L. Zheng, J.Z. Zhang [et al.] // European Journal of Surgery. – 1994. – Suppl. 574. – P. 51-53.

27. Борсуков, А.В. Электрохимический лизис метастазов печени под ультразвуковым контролем (возможности и перспективы) [Текст] / А.В. Борсуков, А.В. Бельков, Р.А. Алибегов, А.С. Ефимкин [и др.] // SonoAce-Ultrasound. – 2004. – № 12. – С. 25-29.

28. Sawyer, P.N. The role of electrochemical surface properties in thrombosis at vascular interfaces: cumulative experience of studies in animals and man [Text] / P.N. Sawyer, S. Srinivasan // Bulletin of the New York Academy of Medicine. – 1972. – Vol. 48, N 2. – P. 235-256.

29. Sawyer, P.N. The use of direct current coagulation in surgery [Text] / P.N. Sawyer, S.A. Wesolowski // Irish journal of medical science. – 1962. – Vol. 37, N 6. – P. 255-257.

30. Тарасевич, М.Р. Электрохимически управляемая гемосорбция [Текст] / М.Р. Тарасевич, М.М. Гольдин, Е.А. Лужников, В.А. Богдановская // Итоги науки и техники. ВИНТИ. Сер. Электрохимия. – 1990. – Т. 31. – С. 127-150.

31. Okner, R. Electrocoating of stainless steel coronary stents for extended release of Paclitaxel [Text] / R. Okner, M. Oron, N. Tal, D. Mandler [et al.] // Materials

Science and Engineering C. – 2007. – Vol. 27. – P. 510-513.

32. Khan, W. Covalent attachment of proteins to functionalized polypyrrole-coated metallic surfaces for improved biocompatibility [Text] / W. Khan, M. Kapoor, N. Kumar // *Acta biomaterialia*. – 2007. – Vol. 3, N 4. – P. 541-549.

33. Widge, A.S. Self-assembled monolayers of polythiophene conductive polymers improve biocompatibility and electrical impedance of neural electrodes [Text] / A.S. Widge, M. Jeffries-El, X. Cui, C.F. Lagenaur [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2007. – Vol. 22. – P. 1723-1732.

34. Пат. 3878564 США, МПК³ А 61 F 2/00, А 61 М 1/16, А 61 М 1/36. Blood And Tissue Detoxification Method [Text] / Wolfson S.K., Yao S.J.; заявитель и патентообладатель Wolfson S.K., Yao S.J. – № 352070; заявл. 17.04.73; опубл. 22.04.75.

35. Васильев, Ю.Б. Эффект белковой защиты при электрохимическом воздействии на кровь и другие биологические жидкости [Текст] / Ю.Б. Васильев, В.А. Гринберг, А.К. Мартынов, Т.В. Булыгина [и др.] // *Электрохимия*. – 1988. – Т. 24, № 3. – С. 295-299.

36. Sergienko, V.I. Electrochemical methods of detoxification for medical use [Text] / V.I. Sergienko, Yu.B. Vasiliev // *Soviet Medical Reviews B: Physicochemical Aspects of Medicine Reviews*. – 1989. – Vol. 2. – P. 1-54.

37. Евсеев, А.К. Электрохимическое получение пероксодисульфатов из разбавленных растворов сульфатов для детоксикации биологических сред [Текст] / А.К. Евсеев, М.Ш. Хубутия, М.М. Гольдин, А.Г. Волков [и др.] // *Электрохимия*. – 2008. – Т. 44, № 8. – С. 972-980.

38. Лужников, Е.А. Окислительная активность электрохимически синтезированных растворов персульфата натрия по отношению к некоторым психотропным препаратам [Текст] / Е.А. Лужников, В.А. Колесников, М.М. Гольдин, А.К. Евсеев [и др.] // *Анестезиология и реаниматология*. – 2008. – № 6. – С. 19-22.

39. Goldin, M.M. Indirect electrochemical synthesis of active oxygen in dilute sulfate solutions [Text] / M.M. Goldin, M.Sh. Khubutiya, V.A. Kolesnikov, M.M.

Abakumov [et al.] // Journal of Applied Electrochemistry. – 2009. – Vol. 39, N 2. – P. 185-189.

40. de Robillard, G. Electrosynthesis of imidazolium carboxylates [Text] / G. de Robillard, C.H. Devillers, D. Kunz, H. Cattey [et al.] // Organic Letters. – 2013. – Vol. 15, N 17. – P. 4410-4413.

41. Harrington, P.J. Pharmaceutical Process Chemistry for Synthesis: Rethinking the Routes to Scale-Up [Text] / P.J. Harrington. – Hoboken: John Wiley&Sons, 2011. – 448 p.

42. Marquez, E.A. An improved electrosynthetic preparation of the female housefly sex pheromone [Text] / E.A. Marquez, A.J. Zara, J. Trcio, B. Ferreira [et al.] // Organic Preparations and Procedures International: The New Journal for Organic Synthesis. – 1994. – Vol. 26, N 6. – P. 680-682.

43. Li, W. Paired electrosynthesis of aminoiminomethane-sulfonic acids [Text] / W. Li, T. Nonaka // Electrochimica Acta. – 1999. – Vol. 44. – P. 2605-2612.

44. Великородов, А. В. Зеленая химия. Методы, реагенты и инновационные технологии [Текст]: монография / А. В. Великородов, А. Г. Тырков. – Астрахань : Астраханский государственный университет, Издательский дом «Астраханский университет», 2010. – 258 с.

45. Платонов, В.Е. Применение фторорганических соединений в технике, сельском хозяйстве, медицине [Текст] / В.Е. Платонов // Сборник докладов 4ой научно-технической конференции Сибирского химического комбината, Северск, 1996. – С. 3-33.

46. Авруцкая, И.А. Исследование процесса электрохимического окисления глюкозы [Текст] / И.А. Авруцкая, М.Я. Фиошин // Журнал Прикладной Химии. – 1969. – Т. 42. – С. 2294-2301.

47. Goldin, Mark M. Electrochemical Aspects of Hemosorption [Text] / Mark M. Goldin, A.G. Volkov, Yu.S. Goldfarb, Mikhail M. Goldin // Journal of Electrochemical Society. – 2006. – Vol. 153, N 8. – P. J91-J99.

48. Хубутя, М.Ш. Измерения потенциала платинового электрода в крови, плазме и сыворотке крови [Текст] / М.Ш. Хубутя, А.К. Евсеев, В.А. Колесников,

М.М. Гольдин [и др.] // Электрохимия. – 2010. – Т. 46, № 5. – С. 569-573.

49. Bartlett, P.N. Bioelectrochemistry: Fundamentals, Experimental Techniques and Applications [Text] / P.N. Bartlett. – Chichester: John Wiley & Sons, 2008. – 494 p.

50. Volkov, A.G. Interfacial Catalysis [Text] / A.G. Volkov. – New York: M.Dekker, 2003. – 674 p.

51. Осипов, А.Н. Активные формы кислорода и их роль в организме [Текст] / А.Н. Осипов, О.А. Азизова, Ю.В. Владимиров // Успехи биологической химии. – 1990. – Т. 31. – С. 180-208.

52. Ланкин, В.З. Свободнорадикальные процессы в норме и при патологических состояниях [Текст] / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе, Ю.Н. Беленков. – М.: РКНПК МЗ РФ, 2001. – 78 с.

53. Чеснокова, Н.П. Источники образования свободных радикалов и их значение в биологических системах в условиях нормы [Текст] / Н.П. Чеснокова, Е.В. Понукалина, М.Н. Бизенкова // Современные наукоемкие технологии. – 2006. – № 6. – С. 28-34.

54. Grune, T. Oxidative stress and anemia [Text] / T. Grune, O. Sommerburg, W.S. Siems // Clinical Nephrology. – 2000. – Vol. 53. – P. S18-S22.

55. Подколзин, А.А. Система антиоксидантной защиты организма и старение [Электронный ресурс] / А.А. Подколзин, А.Г. Мегреладзе, В.И. Донцов, С.Д. Арутюнов [и др.] // Профилактика старения. – 2000. – № 3. URL: <http://medi.ru/doc/700032.htm> (дата обращения 10.04.2013).

56. Baehner, R.L. Reduced oxygen by-products and white blood cells [Text] / R.L. Baehner, L.A. Boxer, L.M. Ingraham // Free Radical Biology and Medicine. – 1982. – Vol. 5. – p. 91-113.

57. Grisham, M.B. Modulation of leukocyte-endothelial interaction by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease [Text] / M.B. Grisham, D.N. Granger, D.J. Lefer // Free Radical Biology and Medicine. – 1998. – Vol. 25. – P. 404-433.

58. Karlsson, J. Antioxidants and exercise [Text] / J. Karlsson. – Champaign:

Human Kinetics Publication, 1997. – 221 p.

59. Rael, L.T. Oxidation-reduction potential and paraoxonase-arylesterase activity in trauma patients [Text] / L.T. Rael, R. Bar-Or, R.M. Aumann, D.S. Slone [et al.]// Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2007. – Vol. 361, N 2. – P. 561-565.

60. Rael, L.T. Plasma Oxidation-Reduction Potential and Protein Oxidation in Traumatic Brain Injury [Text]/ L.T. Rael, R. Bar-Or, C.W. Mains, D.S. Slone [et al.]// Journal of Neurotrauma. – 2009. – Vol. 26. – P.1203-1211.

61. Дамаскин, Б.Б. Электрохимия [Текст]/ Б.Б. Дамаскин, О.А. Петрий, Г.А. Цирлина. – М.: Химия, «КолосС», 2006. – 672 с.

62. Михаэлис, Л. Окислительно-восстановительные потенциалы и их физиологическое значение [Текст] /Л. Михаэлис; под ред. С.Н. Скадовского. – М.: ГХТИ, 1932. – 160 с.

63. Standard Reduction Potentials (E^0), 25°C [Electronic resource] / URL: <http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/oxphos/standredpotentialtab.htm> (дата обращения 21.02.2013).

64. Шилов, В.Н. Молекулярные механизмы структурного гомеостаза [Текст] / В.Н. Шилов. – М.: «Интерсигнал», 2006. – 288 с.

65. Whiteacre, C.A. Oxygen free radical generation and regulation of proliferative activity of human mononuclear cells responding to different mitogens [Text] / C.A. Whiteacre, M.K. Cathcart // Cellular Immunology. – 1992. – Vol. 144, N 2. – P. 287-295.

66. Hewitt, L.F. Oxidation-reduction potential in bacteriology and biochemistry [Text] / L.F. Hewitt. – Edinburg: Living stone, 1950. – 215 p.

67. Katz, J.Y. An electrolytic method for controlling oxidation-reduction potential and its application on study of anaerobiosis [Text] / J.Y. Katz // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 1943. – Vol. 2, N 2. – P. 183-200.

68. Stefánsson, A. Redox reactions and potentials in natural waters at disequilibrium [Text] / A. Stefánsson, A. Arnórsson, A.E. Sveinbjörnsdóttir // Chemical Geology. – 2005. – Vol. 221, N 3-4. – P. 289-311.

69. Søndergaard, M. Redox Potential [Text] / Søndergaard M. // Encyclopedia of Inland Waters / Eds. G.E. Likens. – NY: Academic Press, 2009. – P. 852-859.
70. Thompson, Y. Redox Potential and Seasonal Porewater Biogeochemistry of Three Mountain Wetlands in Southeastern Kentucky, USA [Text] / Y. Thompson, B.C. Sandefur, A.D. Karathanasis, E. D'Angelo // Aquatic Geochemistry. – 2008. – Vol. 15, N 3. – P. 349-370.
71. Vorenhout, M. Automated and Continuous Redox Potential Measurements in Soil [Text] / M. Vorenhout, H.G. van der Geest, D. van Marum K. Wattel [et. al.] // Journal of Environmental Quality. – 2004. – Vol. 33, N 4. – P. 1562-1567.
72. Goncharuk, V.V. The use of redox potential in water treatment processes [Text] / V.V. Goncharuk, V.A. Bagrii, L.A. Mel'nik, R.D. Chebotareva [et. al.] // Journal of Water Chemistry and Technology. – 2010. – Vol. 32, No 1. – P. 1-9.
73. Holman, J.B. Oxidation-Reduction Potential as a Monitoring Tool in a Low Dissolved Oxygen Wastewater Treatment Process [Text] / J.B. Holman, D.G. Warehem // Journal of Environmental Engineering. – 2003. – Vol. 129, N 1. – P. 52-58.
74. Inniss, E.C. Use of Redox Potentials in Wastewater Treatment [Text] / E.C. Inniss // Water Encyclopedia: Domestic, Municipal, and Industrial Water Supply and Waste Disposal / Eds. J.H. Lehr, J. Keeley. – Hoboken: John Wiley & Sons, 2005. – P. 399-403.
75. Li, B. Oxidation-reduction potential (ORP) regulation of nutrient removal in activated sludge wastewater treatment plants [Text] / B. Li, P. Bishop // Water Science & Technology. – 2002. – Vol. 46, N 1-2. – P. 35-39.
76. Wait, I.W. The influence of oxidation reduction potential and water treatment processes on quartz lamp sleeve fouling in ultraviolet disinfection reactors [Text] / I.W. Wait, C.T. Johnston, E.R. Blatchley // Water Research. – 2007. – Vol. 41, N 11. – P. 2427-2436.
77. Suslow, T.V. Ozone Applications for Postharvest Disinfection of Edible Horticultural Crops [Electronic resource] / T.V. Suslow // University of California, Division of agriculture and Natural Resources. – 2004. – ANR Publication 8149. URL: <http://anrcatalog.ucdavis.edu/pdf/8133.pdf> (дата обращения 13.02.2013).

78. Muller, C. Continuous measurement of chlorine and chlorine dioxide in the beverage industry [Text] / C. Muller, E. Stadelmann // Brauwelt international. – 2004. – Vol. 5. – P. 374-376.

79. Bernard, C. Interrelation between the blood redox potential and exercise induced variations of the biochemical characteristics of blood [Text] / C. Bernard, J.P. Gallinet, C. Conde, J.J. Girardot [et al.] // Bioelectrochemistry and Bioenergetics. – 1991. – Vol. 25. – P. 45-70.

80. Rück, A. Nonlinear dynamics of intracellular methylene blue during light activation of cell cultures [Text] / A. Rück, K. Heckelsmiller, N. Akgün, G. Beck [et al.] // Photochemistry and photobiology. – 1997. – Vol. 66, N 6. – P. 837-841.

81. Denis Kasozi D. Real-Time Imaging of the Intracellular Glutathione Redox Potential in the Malaria Parasite Plasmodium falciparum [Text] / D. Kasozi, F. Mohring, S. Rahlfs, A.J. Meyer [et al.] // PLoS Pathogens. – 2013. Vol. 9, N 12. – P. 1-18.

82. Rael, L.T. Injury severity and serum amyloid A correlate with plasma oxidation-reduction potential in multi-trauma patients: a retrospective analysis [Text] / L.T Rael, R. Bar-Or, K. Salottolo, C.W. Mains [et al.] // Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine. – 2009. – Vol.17. – P. 57-63.

83. Azad, A.K. Effects of various water on early growth in komatsuna seedlings [Text] / A.K. Azad, K. Ishikawa // Acta Horticulturae (ISHS). – 2003. – Vol. 609. – P. 487-492.

84. Guyton, A. Textbook of Medical Physiology [Text] / A. Guyton. – Philadelphia: Saunders, 1991. – 1014 p.

85. Kim, H. New ORP/pH based control strategy for chlorination and dechlorination of wastewater: pilot scale application [Text] / H. Kim, S. Kwon, S. Han, M. Yu [et al.] // Water Science & Technology. – 2006. – Vol. 53, N 6. – P. 145–151

86. Marmasse, C. Direct Experimental Evidence of a Functionally Active Electron Transport System in Human Blood [Text] / C. Marmasae, H.J. Grosz // Nature. – 1964. – Vol. 202, N 4927. – P. 94.

87. Кузнецова, И.Н. Динамика измеряемого окислительного потенциала в консервированной крови [Текст] / И.Н. Кузнецова, А.А. Пендин // Биофизика. –

1976. – T. 21, № 5. – С. 867-869.

88. Yoshimura, N. Carbohydrate metabolism and insulin release during ether and halothane anaesthesia [Text] / N. Yoshimura, K. Kodama, J. Yoshitake // *British Journal of Anaesthesia*. – 1971. – Vol. 43, N 11. – P. 1022-1026.

89. White, N.J. Redox Monitoring Reveals Increased Susceptibility of Whole Blood to Oxidative Stress During Hemorrhagic Shock [Text] / N.J. White, M.M. Collinson, R.A. Boe, K.R. Ward // *Circulation*. – 2008. – Vol. 118. – P. 1488.

90. Jellinek, M. The effect of shock on blood oxidation-reduction potential [Text] / M. Jellinek, B. Chandel, R. Abdulla, M. J. Shapiro [et. al.] // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 1992. – Vol. 48, N 10. – P. 980-985.

91. Reddy, K.R. Biogeochemistry of Wetlands [Text] / R.D. DeLaune, K.R. Reddy. – Boca Raton: CRC Press, 2008. – 800 p.

92. Schuring, J. Redox: Fundamentals, Processes and Applications [Text] / J. Schüring H.D. Schulz W.R. Fischer J. Böttcher. – NY: Springer-Verlag, 1999. – 251 p.

93. Никольский, Б.П. Оксредметрия [Текст] / Б.П. Никольский, В.В. Пальчевский, А.А. Пендин, Х.М. Якубов. – Л.: Химия, 1975. – 304 с.

94. Hoare, J.P. The electrochemistry of oxygen [Text] / J.P. Hoare. – NY: John Wiley & Sons, 1968. – 423 p.

95. Li, R. Insights into the adsorption of oxygen and water on low-index Pt surfaces by molecular dynamics simulations [Text] / R. Li, L. Wang, Q. Yue, H. Li // *New Journal of Chemistry*. – 2014. – Vol. 38. – P. 683-692.

96. Lim, Y. An Electrochemical Quartz Crystal Microbalance Study of Adsorption on a Platinum Electrode in Sulfuric Acid [Text] / Y. Lim, E. Hwang // *Bulletin of the Korean Chemical Society*. – 1997. – Vol. 18, N 1. – P. 6-8.

97. Laitinen, H.A. The Electrolytic Formation and Dissolution of Oxide Films on Platinum [Text] / H.A. Laitinen, C.G. Enke // *Journal of Electrochemical Society*. – 1960. – Vol. 107, N 9. – P. 773-781

98. Roman, T. Structure of water layers on hydrogen-covered Pt electrodes [Text] / T. Roman, A. Groß // *Catalysis Today*. – 2013. – Vol. 202. – P. 183–190.

99. Povarov, Yu.M. Surface inhomogeneity of platinum-metal electrodes in

redox reactions [Text] / Yu.M. Povarov, P.D. Lukovtsev // *Electrochim. Acta.* – 1973. – Vol. 18, N 1. – P. 13-18.

100. Подловченко, Б.И. Адсорбция монооксида углерода на платинированном платиновом электроде в присутствии предварительно адсорбированных иода и иодид-анионов [Текст] / Б.И. Подловченко, Е.А. Колядко // *Электрохимия.* – 2003. – Т. 39, № 8. – С. 915-919.

101. Whitfield, M. Thermodynamic limitations on the use of the platinum electrode in Eh measurements [Text] / M. Whitfield // *Limnology and Oceanography.* – 1974. – Vol. 19. – P. 857-865.

102. Anzai, J. Electrochemically accelerated adsorption of serum albumin on the surface of platinum and gold electrodes [Text] / J. Anzai, B. Guo, T. Osa // *Chemical and pharmaceutical bulletin (Tokyo).* – 1994. – Vol. 42, N 11. – P. 2391-2393.

103. Dolatshahi-Pirouz, A. Bovine serum albumin adsorption on nano-rough platinum surfaces studied by QCM-D [Text] / A. Dolatshahi-Pirouz, K. Rechendorff, M.B. Hovgaard, M. Foss [et al.] // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* – 2008. – Vol. 66, N 1. – P. 53-59.

104. Moulton, S.E. Investigation of protein adsorption and electrochemical behavior at a gold electrode [Text] / S.E. Moulton, J.N. Barisci, A. Bath, R. Stella [et al.] // *Journal of Colloid and Interface Science.* – 2003. – Vol. 261, N 2. – P. 312-319.

105. Phillips, R.K.R. Electrochemical studies of the effect of temperature on the adsorption of yeast alcohol dehydrogenase at Pt [Text] / R.K.R Phillips, S. Omanovic, S.G. Roscoe // *Langmuir.* – 2001. Vol. 17, N 8. – P. 2471-2477.

106. Teasdale, P. R. Practical improvements for redox potential (E_H) measurements and the application of a multiple-electrode redox probe (MERP) for characterising sediment in situ [Text] / P.R. Teasdale, A. I. Minett, K. Dixon, T.W. Lewis [et al.] // *Analytica Chimica Acta.* – 1998. – Vol. 367, N 1-3. – P. 201-213.

107. Марвет, Р.В. О состоянии поверхности платинированного платинового электрода при потенциалах двойнослойной области [Текст] / Р.В. Марвет, О.А. Петрий // *Электрохимия.* – 1967. – Т. 3. – С. 901-904.

108. Фрумкин, А.Н. Термодинамика поверхностных явлений на платиновых

металлах в щелочных растворах и при потенциалах адсорбции кислорода [Текст] / А.Н. Фрумкин, О.А. Петрий, А.М. Косая // Электрохимия. – 1968. – Т. 4. – С. 475-478.

109. Пат. 6992488 В2 США, МПК⁷ G 01 N 27/38, G 01 N 27/416. Self-cleaning probe system [Text] / Lin S.H.; заявитель и патентообладатель Biolab Services, Inc. – № 10/221393; заявл. 04.06.2002; опубл. 31.01.2006.

110. Anderson, T. Nature of fresh metal surfaces in aqueous solutions [Text] / T. Anderson, J. Anderson, H. Eyring // The Journal of Physical Chemistry. – 1969. – Vol. 73, N 11. – P. 3562–3570.

111. Томашов, Н.Д. Применение метода непрерывного обновления поверхности металла под раствором для изучения электродных процессов [Текст] / Н.Д. Томашов, Н.М. Струков, К.П. Вершинина // Электрохимия. – 1969. – Т. 5, № 1. – С. 26–31.

112. Frumkin A.N. Hydrogen overvoltage and adsorption phenomena [Text] / A.N. Frumkin // Advances in Electrochemistry and Electrochemical Engineering. – 1963, Vol. 3. – P. 287-491.

113. Untereker, D.F. A Dissolution-Redeposition Mechanism for the Roughening of Platinum Electrodes by Cyclic Potential Programs [Text] / D.F. Untereker, S. Bruckenstein // Journal of Electrochemical Society. – 1974. – Vol. 121, N 3. – P. 360-362.

114. Петухова, Р.П. Оже-спектрометрическое исследование влияния анодно-катодной поляризации на состав поверхности платиновых и родиевых электродов [Текст] / Р.П. Петухова, Б.И. Подловченко, А.М. Гаськов // Электрохимия. – 1985. – Т. 21, № 10. – С. 1414-1418.

115. Петрий, О.А. О природе анодно-катодной активации платинового электрода [Текст] / О.А. Петрий, И.Г. Щигорев // Электрохимия. – 1968. – Т. 3. – С. 370-376.

116. Nordstrom, D.K. Thermochemical redox equilibria of ZoBell's solution [Text] / D.K. Nordstrom // Geochimica et Cosmochimica Acta. – 1977. – Vol. 41, N 12, pp.1835-1841.

117. Application Data: Fundamentals of ORP Calibration [Electronic resource] // Emerson Process Management. – 2008. URL: http://www2.emersonprocess.com/siteadmincenter/PM%20Rosemount%20Analytical%20Documents/Liq_ADS_43-023.pdf (дата обращения 03.04.2013).

118. Ланда, В.А. О некоторых показателях окислительных процессов при переломах длинных трубчатых костей [Текст] / В.А. Ланда, Э.В. Тюрина, И.С. Худайдатов // Ортопедия, травматология и протезирование. – 1989. – № 3. – С. 17-20.

119. Steiner, B. Redox potential and survival of virulent *Treponema pallidum* under microaerophilic conditions [Text] / B. Steiner, I. McLean, S. Graves // The British Journal of Venereal Diseases. – 1981. – Vol. 57, N 5. – P. 295-301.

120. Reichart, O. Redox potential measurement as a rapid method for microbiological testing and its validation for coliform determination [Text] / O. Reichart, K. Szakmár, A. Jozwiak, J. Felföldi [et al.] // International Journal of Food Microbiology. – 2007. – Vol. 114, N 2. – P. 143-148.

121. Gillespie, L.J. Reduction potentials of bacterial cultures and of water logged soils [Text] / L.J. Gillespie // Soil Science. – 1920. – Vol. 9. – P. 199-216.

122. Cannan, R.K., Reduction potentials in cell suspensions [Text] / R.K. Cannan, B. Cohen, W.M. Clark // Public Health Reports. – 1926. – Suppl. 55. – 34 p.

123. Bembé, C. Zur Messung oxydoreductiver Potentiale im Blut [Text] / C. Bembé, S. Dietrich // Zeitschrift für Die Gesamte Experimentelle Medizin. – 1941. – Vol. 109, N 4. – P. 546-565.

124. Reiss, P. L'action du potential d'oxydation-réduction du milieu sur l'autolyse protéique du cristallin et du corps vité [Text] / P. Reiss // Archives de Physique Biologique. – 1940. – Vol. 15, N 4. – P. 39-40.

125. Reiss, P. Action du potential d'oxydation-réduction du milieu sur l'activité de différentes protéinases: Hydrolyse et condensation [Text] / P. Reiss. - Clermont-Ferrand: Imprimerie générale, J. de Bussac, 1942. – 134 p.

126. Bembé, C. Ueber den Einfluss von L-Ascorbinsäure auf das oxydoreduktive Potential in Serum und Blut [Text] / C. Bembé, S. Dietrich // Zeitschrift für Die Gesamte

Experimentelle Medizin. – 1941. – Vol. 109, N 4. – P. 566-576.

127. Meier, L. Die bestimmung des Redoxpotentials im Blut (*in vitro*) und seine Beeinflussung durch Zuführen sogenannter Redoxsubstanzen [Text] / L. Meier // Biochemische Zeitschrift. – 1939. – Vol. 303. – P. 32-39.

128. Betke, K. Oxydation menschlicher und tierischer Oxyhämoglobine durch Kaliumferricyanid [Text] / K. Betke, J. Greinacher, F. Hecker // Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie. – 1956. – Vol. 229, N 3. – P. 207-219.

129. Oivine, I.A. Potential oxydo-réducteur (E_h) du sang [Text] / I.A. Oivine, // Bulletin of Experimental Biology and Medicin (USSR). – 1937. – Vol. 3. – P. 542-544.

130. Oivine, I.A. Controversial Problems of the Oxidation-Reduction Potential of the Blood [Text] / I.A. Oivine, // Bulletin of Experimental Biology and Medicin (USSR). – 1939. – Vol. 7. – P. 344-347.

131. Akcay, M. The oxidation-reduction potential and redox capacity of blood and plasma (*in vitro*) in different conditions [Text] / M. Akcay // Acta Medica Turcica. – 1956. – Vol. 8. – P. 3.

132. Seyderhelm, R. Bestimmung des Redoxpotentials im strömenden Blut [Text] / R. Seyderhelm, K. Mulli, J. Thyssen // Münchener medizinische Wochenschrift. – 1937. – Vol. 84. – P. 620-623.

133. Beckmann, P. Intravitale Messungen des Redoxpotentials [Text] / P. Beckmann // Deutsche Medizinische Wochenschrift. – 1939. – Vol. 65. – P. 507-508.

134. Legresti, L. Contribución experimental al potencial redox. VII. Potencial redox sanguíneo normal humano [Text] / L. Legresti // Acta argentina de fisiología y fisiopatología. – 1952. – Vol. 2. – P. 11-24.

135. Legresti, L. Contribución experimental al potencial redox. 8. Tuberculosis, estreptomycin y potencial redox [Text] / L. Legresti // Acta argentina de fisiología y fisiopatología. – 1953. – Vol. 3. – P. 17-29.

136. Waterman, N. Ueber Aenderungen des Redoxpotentials im Serum durch Röntgenbestrahlung [Text] / N. Waterman // Zeitschrift für Krebsforschung. – 1933. – Vol. 38. – P. 301-311.

137. Brauner R. Le potentiel d'oxydoréduction du sang normal et pathologique [Text] / R. Brauner, E. Soru // Compte rendu hebdomadaire des seances et memoires de la Societe de biologie (Paris). – 1934. – Vol. 116. – P. 1176.

138. Cater, D.B. Measurement of electrode potentials in living and dead tissues [Text] / D.B. Cater, A.F. Phillips // Nature. – 1954. – Vol. 174, N 4420. – P. 121-123.

139. Cater, D.B. The Measurement of Oxidation-Reduction Potentials, pH, and Oxygen Tension in Tumours [Text] / D. Cater, A.F. Phillips, I.A. Silver // Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences. – 1957. – Vol. 146. – P.: 382-399.

140. Jalavisto, E. Plasma oxidation-reduction potential and the hypoxic stimulus of blood-formation [Text] / E. Jalavisto // Annales medicinae experimentalis et biologiae Fenniae. – 1954. – Vol. 32, N 2. – P. 178-185.

141. Serejski, M. Die Bedeutung des sogenannten redoxpotentials für die pathologie (speziell für die Schizophrenie) [Text] / M. Serejski, S. Snejerson // Zeitschrift für die Gesamte Experimentelle Medizin. – 1937. – Vol. 100. – P. 621-630.

142. Vincent, L.C. Bio-electronics [Text] / L.C. Vincent // Revue de Pathologie Générale et de Physiologie Clinique. – 1954. – Vol. 54, N 663. – P. 1464-1472.

143. Vincent, L.C. Bio-Electronique; définition des trois facteurs prhoniques pH, rH^2 et. [Text] / L.C. Vincent // Revue de Pathologie Générale et de Physiologie Clinique. – 1956. – Vol. 56, N 667. – P. 643-656.

144. Vincent, L.C. Potentiel d'oxydo-réduction et rH^2 [Text] / L.C. Vincent // Revue de Pathologie Générale et de Physiologie Clinique. – 1956. – Vol. 56, N 667. – P. 657-678.

145. Taniguchi, S. The significance of arterial redox potential measurement by Vincent's method in evaluating the hemorrhagic shock state of rabbits [Text] / S. Taniguchi // Masui. – 1993. – Vol. 42, N 3. – P. 387-393.

146. Bio-electronic terrain analysis: BE-T-A [Electronic resource] / Occidental Institute Research Foundation, Med-Tronic GmbH. URL: <http://www.oirf.com/inst-beta.html> (дата обращения 16.05.2013).

147. BE-T-A: Bio-Elektronische Terrain-Analyse durch Messung von Blut,

Speichel und Urin [Electronic resource] / Med-Tronic GmbH. URL: <http://www.med-tronik.de/labordiagnostik.html> (дата обращения 16.05.2013).

148. Bio-elektronigramm Vincent [Electronic resource] / Med-Tronic GmbH. URL: <http://www.oirf.com/images/chartlarge.gif> (дата обращения 16.05.2013).

149. Margină, D. Development of a potentiometric method for the evaluation of redox status in human serum [Text] / D. Margină, D. Grădinaru, N. Mitrea // *Revue Roumaine de Chimie*. – 2009. – Vol. 54, N 1. – P. 45-48.

150. van Rossum J.P. Oxidation-reduction (redox) potentiometry in blood in geriatric conditions: A pilot study [Text] / J.P. van Rossum, D.H.J. Schamhart // *Experimental Gerontology*. – 1991. – Vol. 26, N 1. – P. 37-43.

151. Kolls, J.K. Oxidative stress in sepsis: a redox redux [Text] / J.K. Kolls // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2006. – Vol. 116, N 4. – P. 860-863.

152. Джикия, И.В. Окислительно-восстановительный потенциал крови и состоятельность системы энергообеспечения при цитомегаловирусной инфекции у беременных [Текст] / И.В. Джикия, М.А. Рижвадзе, М.А. Джангидзе // *Georgian medical news*. – 2006. – Т. 134, № 5. – С. 28-31.

153. Серов, В.И. Изменения кровотока, напряжения и диффузии кислорода, окислительно-восстановительного потенциала в коре головного мозга при геморрагическом шоке и гипербарической оксигенации [Текст] / В.И. Серов // *Бюллетень гипербарической биологии и медицины*. – 1994. – № 2. – С. 5-9.

154. Taniguchi, S. Contribution of Arterial redox potential measurement to the care of critically ill patients [Text] / S. Taniguchi, K. Kodama, H. Matsuyama, K. Irita [et al.] // *Journal of Anesthesia*. – 1987. – Vol. 1, N 2. – P. 125-131.

155. Rae, S.K. Redox Potential Measurements of Plasma in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Graft and Its Clinical Significance [Text] / S.K. Rae, R.S. Palazzo, H.N. Metz, D.W. Wilson [et al.] // *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. – 1997. – Vol. 38, N 3. – P. 151-156.

156. Jellinek, M. Oxidation-reduction maintenance in organ preservation [Text] / M. Jellinek, M. Castaneda, P.J. Garvin, M. Niehoff [et al.] // *Archives of surgery*. – 1985. – Vol. 120, N 4. – P. 439-442.

157. Jellinek, M. Electrochemical Control of Redox Potential in Perfusate for Prolonged Heart Storage [Text] / M. Jellinek, J.W. Hahn; T.P. Layloff, G.H. Kuhls [et al.] // Transactions - American Society for Artificial Internal Organs. – 1974. – Vol. 20, N 1. – P. 533-537.

158. Bar-or, R. Raman spectral signatures of human liver perfusates correlate with oxidation reduction potential [Text] / R. Bar-or, L.T. Rael, C.G. Curtis, C.W. Mains // Molecular Medicine Reports. – 2009. – Vol. 2, N 2. – P. 175-180.

159. Sen, C.K. Handbook of Oxidants and antioxidants in exercise [Text] / C.K. Sen, L. Packer, O. Hanninen. – Amsterdam: Elsevier Science, 2000. – 1207 p.

160. Kelly, F.J. Vitamin E supplementation in the critically ill patient: Too narrow a view? [Text] / F.J. Kelly // Nutrition in Clinical Practice. – 1994. – Vol. 9, N 4. – P. 141-145.

161. Gutteridge, J.M.C. Redox imbalance in the critically ill [Text] / J.M.C. Gutteridge, J. Mitchell // British Medical Bulletin. – 1999. – Vol. 55, N 1. – P. 49-75.

162. Ioskevich, N.N. Prooxidant-antioxidant balance in blood during the surgical treatment of obliterating arterial atherosclerosis in the lower extremities [Text] / N.N. Ioskevich, V.V. Zinchuk // Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku. – 2004. – Vol. 49. – P. 222-226.

163. Halliwell, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? [Text] / B. Halliwell // The Lancet. – 1994. – Vol. 344, N 8924. – P. 721-724.

164. Хасанов, В.В. Методы исследования антиоксидантов [Текст] / В.В. Хасанов, Г.Л. Рыжова, Е.В. Мальцева // Химия растительного сырья. – 2004. – №3. – С. 63–75.

165. Яшин, Я.И. Проблема определения содержания антиоксидантов [Текст] / Я.И. Яшин, А.Я. Яшин // Компетентность. – 2009. – Т. 69, № 8. – С. 50-53.

166. Wayner, D.D.M. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins [Text] / D.D.M. Wayner, G.W. Burton, K.U. Ingold, S. Locke // FEBS Letters. – 1985. – Vol. 187. – P.33-37.

167. Pisoschi, A.M. Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review / A.M. Pisoschi, G.P. Negulescu // *Biochemistry & Analytical Biochemistry*. – 2011. – Vol. 1, N 1. – P. 1-10.

168. Stephanson, C.J. Antioxidant capability and efficacy of Mega-H silica hydride, an antioxidant dietary supplement, by in vitro cellular analysis using photosensitization and fluorescence detection [Text] / C.J. Stephanson, A.M. Stephanson, G.P. Flanagan // *Journal of Medicinal Food*. – 2002. – Vol. 5, N 1. – P. 9-16.

169. Hodder, P.S. Equilibrium and Kinetic Measurements of Muscarinic Receptor Antagonism on Living Cells Using Bead Injection Spectroscopy [Text] / P.S. Hodder, C. Beeson, J. Ruzicka // *Analytical Chemistry*. – 2000. – Vol. 72, N 14. – P. 3109–3115.

170. Shacter, E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples [Text] / E. Shacter // *Drug Metabolism Reviews*. – 2000. – Vol. 32, N 3-4. – P. 307–326.

171. Devanboyina, U. Sensitive detection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA by ³²P-postlabeling assay and the basal levels in rat tissues [Text] / U. Devanboyina, R.C. Gupta // *Carcinogenesis*. – 1996. – Vol. 17, N 5. – P. 917-924.

172. Nakagawa, K. Differential Effects of Flavonoid Quercetin on Oxidative Damages Induced by Hydrophilic and Lipophilic Radical Generators in Hepatic Lysosomal Fractions of Mice [Text] / K. Nakagawa, M. Kawagoe, M. Yoshimura, H. Arata [et al.] // *Journal of Health Science*. – 2000. – V. 46, N 6. – P. 509-512.

173. Brainina, Kh.Z. New electrochemical method of determining blood and blood fractions antioxidant activity [Text] / Kh.Z. Brainina, L.V. Alyoshina, E.L. Gerasimova, Ya.E. Kazakov [et al.] // *Electroanalysis*. – 2009. – Vol.21, N 3-5. – P. 618-624.

174. 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 [Text] / Kh.Z. Brainina, E.L. Gerasimova, D.P. Varzakova, S.L. Balezin [et al.] // *The Open Chemical and*

Biomedical Methods Journal. – 2012. – Vol. 5. – P. 1-7.

175. Psotová, J. Determination of total antioxidant capacity in plasma by cyclic voltammetry. Two case reports [Text] / J. Psotová, J. Zahálková, J. Hrbáč, V. Simánek [et al.] // Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czech Republic. – 2001. – Vol. 145, N 2. – P. 81-83.

176. Campanella, L. Antioxidant capacity of dry vegetal extracts checked by voltammetric method [Text] / L. Campanella, E. Martini, E. Rita, M. Tomassetti // Journal of Food, Agriculture and Environment. – 2006. – Vol. 4, N 1. – P. 135-144.

177. Cosio, M.S. Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extracts from the Labiatae family [Text] / M.S. Cosio, S. Buratti, S. Mannino, S. Benedetti // Food Chemistry. – 2006. – Vol. 97, N 4. – P. 725-731.

178. Chevion, S. The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity / S. Chevion, M.A. Roberts, M. Chevion // Free Radical Biology and Medicine. – 2000. – Vol. 28, N 6. – P. 860-870.

179. Sabela, M.I. Evaluation of Antioxidants in Herbal Tea with a Laccase Biosensor [Text] / M.I. Sabela, N.J. Gumede, P. Singh, K. Bisetty // International Journal of Electrochemical Science. – 2012. – Vol. 7, N 6. – P. 4918-4928.

180. Bisetty, K. Multivariate Optimization of Voltammetric Parameters for the Determination of Total Polyphenolic Content in Wine Samples Using an Immobilized Biosensor / K. Bisetty, M.I. Sabela, S. Khulu, M. Xhakaza [et al.] // International Journal of Electrochemical Science. – 2011. – Vol. 6, N 8. – P. 3631-3643.

181. Passos, M.A. Micellar Effects of Cetyl Pyridinium Chloride on Antioxidant Capacity, Voltammetric Response of Serum and Saliva Samples [Text] / M.A. Passos, D.V. Macedo, R.C.S. Luz, L.A.S. Nunes [et al.] // Journal of Biosensors and Bioelectronics. – 2012. – Vol. 3, N 6. – P. 1-7.

182. Ziyatdinova, G.K. Determination of total antioxidant capacity of human plasma from patients with lung diseases using constant - current coulometry [Text] / G.K. Ziyatdinova, H.C. Budnikov, V.I. Pogorel'tzev // Eurasian Journal of Analytical Chemistry. – 2006. – Vol. 1, N 1. – P. 19-30.

183. Lete, C. Voltammetric determination of antioxidant capacity in plasma

samples from stroke patients [Text] / C. Lete, M. Marin, B. Manolescu, E. Oprea // Materials of 219th ECS Meeting, Montreal. – 2011. – Abs. 1021.

184. Martin, H.B. Hydrogen and Oxygen Evolution on Boron-Doped Diamond Electrodes [Text] / H.B. Martin, A. Argoitia, U. Landau, A.B. Anderson [et al.] // Journal of the Electrochemical Society. – 1996. – Vol. 143, N 6. – P. L133-L136.

185. Короткова, Е.И. Новый способ определения активности антиоксидантов [Текст] / Е.И. Короткова // Журнал физической химии. – 2000. – Т. 74, №9. – С. 1544-1546.

186. Korotkova, E.I. Study of antioxidant properties by voltammetry [Text] / E.I. Korotkova, Y.A. Karbainov, A.V. Shevchuk // Journal of Electroanalytical Chemistry. – 2002. – Vol. 518, N 1. – P. 56-60.

187. Krishnan, C.V. Electrochemical Behavior of the Super Antioxidant, α -Lipoic Acid [Text] / C.V. Krishnan, M. Garnett // International Journal of Electrochemical Science. – 2011. – Vol. 6, N 8. – P. 3607-3630.

188. Abbasi, S. Quantification of Sub-Nanomolar Levels of Gallic Acid by Adsorptive Stripping Voltammetry [Text] / S. Abbasi, A. Daneshfar, S. Hamdghadareh, A. Farmany // International Journal of Electrochemical Science. – 2011. – Vol. 6, N 10. – P. 4843-4852.

189. Chýlková, J. Differentiation between phenol- and amino-substances in voltammetry determination of synthetic antioxidants in oils [Text] / J. Chýlková, R. Šelešovská, J. Machalíková, L. Dušek // Central European Journal of Chemistry. – 2010. – Vol. 8, N 3. – P. 607-616.

190. Yosypchuk, B. Solid Amalgam Composite Electrode as a New Sensor for the Determination of Biologically Active Compounds [Text] / B. Yosypchuk, T. Navrátil, A.N. Lukina, K. Peckova [et al.] // Chemia Analityczna (Warsaw). – 2007. – Vol. 52. – P. 897-910.

191. Selesovska-Fadrna, R. Liquid-Mercury Free Solid Silver Amalgam Electrode - Tool for Electroanalysis of Organic Compounds [Text] / R. Selesovska-Fadrna R., T. Navrátil, M. Vlcek // Chemia Analityczna (Warsaw). – 2007. – Vol. 52. – P. 911-929.

192. Bandžuchová, L. Voltammetric Determination of Folic Acid Using Liquid Mercury Free Silver Amalgam Electrode [Text] / L. Bandžuchová, R. Šelešovská // *Acta Chimica Slovenica*. – 2011. – Vol. 58, N 4. – P. 776-784.

193. Bandžuchová, L. Electrochemical behavior of folic acid on mercury meniscus modified silver solid amalgam electrode [Text] / L. Bandžuchová, R. Šelešovská, T. Navrátil, J. Chýlková // *Electrochimica Acta*. – 2011. – Vol. 56, N 5. – P. 2411-2419.

194. Šelešovská, R. Voltammetric Behavior of Methotrexate Using Mercury Meniscus Modified Silver Solid Amalgam Electrode [Text] / R. Šelešovská, L. Bandžuchová, T. Navrátil // *Electroanalysis*. – 2011. – Vol. 23, N 1. – P. 177-187.

195. Šelešovská, R. Voltammetric determination of leucovorin using silver solid amalgam electrode [Text] / R. Šelešovská, L. Bandžuchová, T. Navrátil, J. Chýlková // *Electrochimica Acta*. – 2012. – Vol. 60. – P. 375-383.

196. Apetrei, C. Carbon Paste Electrodes Made from Different Carbonaceous Materials: Application in the Study of Antioxidants [Text] / C. Apetrei, I.M. Apetrei, J.A. De Saja, M.L. Rodriguez-Mendez // *Sensors*. – 2011. – Vol. 11, N 2. – P. 1328-1344.

197. Raouf, J.B. Voltammetric determination of ascorbic acid and dopamine in the same sample at the surface of carbon paste electrode modified with polypyrrole/ferrocyanide films [Text] / J.B. Raouf, R. Ojani, S. Rashid-Nadimi // *Electrochimica Acta*. – 2005. – Vol. 50, N 24. – P. 4694-4698.

198. Raouf, J.B. Voltammetric sensor for glutathione determination based on ferrocene modified carbon paste electrode [Text] / J.B. Raouf, R. Ojani, M. Kolbadinezhad // *Journal of Solid State Electrochemistry*. – 2009. – Vol. 13, N 9. – P. 1411-1416.

199. Mailley, P. Amperometric detection of phenolic compounds by polypyrrole-based composite carbon paste electrodes [Text] / P. Mailley, E.A. Cummings, S. Mailley, S. Cosnier [et al.] // *Bioelectrochemistry*. – 2004. – Vol. 63, N 1-2. – P. 291-296.

200. Navrátil, T. Composite Solid Electrodes - Tool for Organic Electrochemistry

[Text] / T. Navrátil // *Current Organic Chemistry*. 2011. – Vol. 15, N 17. – P. 2996-3013.

201. Barek, J. Nontraditional Electrode Materials in Environmental Analysis of Biologically Active Organic Compounds [Text] / J. Barek, J. Fischer, T. Navrátil, K. Pecková [et al.] // *Electroanalysis*. – 2007. – Vol. 19, N 19-20. – P. 2003-2014.

202. Navrátil, T. Analytical Applications of Composite Solid Electrodes [Text] / T. Navrátil, J. Barek // *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. – 2009. – Vol. 39, N 3. – P. 131-147.

203. Пат. 0031134 A1 США, МПК⁷ B 01 J 21/00, G 01 N 27/26, B 01 J 23/44, G 01 N 27/403. Electrochemical antioxidant sensors based on metallic oxide modified electrodes for the generation of hydroxyl radicals and the subsequent measurement of antioxidant activities [Text] / Tacchini P., Lager G., Girault H.H., Liu J.; заявитель и патентообладатель Edel Therapeutics S.A. – № 12/680725; заявл. 08.09.2008; опубл. 10.02.2011.

204. Bučková, M. Detection of damage to DNA and antioxidative activity of yeast polysaccharides at the DNA-modified screen-printed electrode [Text] / M. Bučková, J. Labuda, J. Šandula, L. Křížková [et al.] // *Talanta*. – 2002. – Vol. 56, N 5. – P. 939-947.

205. Korotkova, E.I. Investigation of antioxidant and catalytic properties of some biologically active substances by voltammetry [Text] / E.I. Korotkova, Y.A. Karbainov, O.A. Avramchik // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2003. – Vol. 375, N 1-3. – P. 465-468.

206. Плотников, Е.В. Исследование суммарной антиоксидантной активности сыворотки крови человека в норме и патологии алкоголизма методом вольтамперометрии [Текст] / Е.В. Плотников Е.В., Е.И. Короткова, Е.В. Дорожко, М.В. Букель [и др.] // *Заводская лаборатория. Диагностика материалов*. – 2009. – Т. 75, №12. – С. 14-17.

207. Zielinska, D. Comparison of spectrophotometric and electrochemical methods for the evaluation of the antioxidant capacity of buckwheat products after hydrothermal treatment [Text] / D. Zielinska, D. Szawara-Nowak, H. Zielinski //

- Journal of agricultural and food chemistry. – 2007. – Vol. 55, N 15. – P. 6124-6131.
208. Лужников, Е.А. Клиническая токсикология [Текст] / Е.А. Лужников. – М.: Медицина, 1982. – 368 с.
209. Arieff A.I. Hypoxia, Metabolic Acidosis and the Circulation [Text] / A.I. Arieff. – NY: Oxford University Press, 1992. – 232 p.
210. Лужников, Е.А. Детоксикационная терапия (руководство) [Текст] / Е.А. Лужников, Ю.С. Гольдфарб, С.Г. Мусселиус. – СПб.: Лань, 2000. – 192 с.
211. Бураковский, В.И. Руководство по сердечно-сосудистой хирургии [Текст] / В.И. Бураковский, Л.А. Бокерия. – М.: Медицина, 1996. – 768 с.
212. Kindwall, E.P. Hyperbaric Medicine Practice [Text] / E.P. Kindwall, H.T. Whelan. – Flagstaff: Best Publishing, 2002. – 952 p.
213. Altman, N. Oxygen Healing Therapies [Text] / N. Altman. – Rochester: Healing Arts Press, 1998. – 272 p.
214. Ackerman, N.B. Comparison of Effects on Tissue Oxygenation of Hyperbaric Oxygen and Intravascular Hydrogen Peroxide [Text] / N.B. Ackerman, F.B. Brinkley // Surgery. – 1968. – Vol. 63. – P. 285-290.
215. Bocci, V. Ozonization of blood for the therapy of viral diseases and immunodeficiencies. A hypothesis [Text] / V. Bocci // Medical Hypotheses. – 1992. – Vol. 39, N 1. – P. 30-34.
216. Bocci V. Biological and clinical effects of ozone. Has ozone therapy a future in medicine? [Text] / V. Bocci // The British Journal of Biomedical Science. – 1999. – Vol. 56, N 4. – P. 270-279.
217. Oliver, L. Sodium hypochlorite perturbation of a graywater treatment system [Text] / L. Oliver, T. Zakharova, A. Konopka, R.F. Turco // Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. – 2000. – Vol. 24, N 3. – P. 191–197.
218. Snowden-Swan, L. Disinfection Technologies for Potable Water and Wastewater Treatment: Alternatives to Chlorine Gas [Electronic resource] / L. Snowden-Swan, J. Piatt, A. Lesperance // Pacific Northwest National Laboratory, 1998. – 45 p. URL: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd25/chlorine.pdf> (дата обращения 07.06.2013).

219. Wagner, M. Disinfection of Wastewater by Hydrogen Peroxide or Peracetic Acid: Development of Procedures for Measurement of Residual Disinfectant and Application to a Physicochemically Treated Municipal [Text] / M. Wagner, D. Brumelis, R. Gehr // *Water Environment Research*. – 2002. – Vol. 74, N 1. – P. 33-50.

220. Rutala, W.A. Stability and bactericidal activity of chlorine solutions [Text] / Rutala W.A., Cole E.C., Thomann C.A., Weber D.J.// *Infection Control and Hospital Epidemiology*. – 1998. – Vol. 19, N 5. – P. 323-327.

221. Clarkson, R.M. The shelf-life of sodium hypochlorite irrigating solutions [Text] / R.M. Clarkson, A.J. Moule, H.M. Podlich // *Australian Dental Journal*. – 2001. – Vol. 46, N 4. – P. 269-276.

222. Bastian, T. Do Traditional Measures of Water Quality in Swimming Pools and Spas Correspond with Beneficial Oxidation Reduction Potential? [Electronic resource] / T. Bastian, J. Brondum // *Public Health Reports*. – 2009. – Vol. 124, N 2. – P. 255-261. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2646482/> (дата обращения 07.06.2013).

223. Carlson, S. The evaluation of the disinfectant action of chlorinated water in swimming pools through determination of the redox potential [Text] / S. Carlson, U. Hässelbarth, P. Mecke // *Archiv für Hygiene und Bakteriologie*. – 1968. – Vol. 152, N 4. – P. 306-320.

224. Steininger, J.M. PPM or ORP: Which Should Be Used? [Electronic resource] / J.M. Steininger // *Swimming Pool Age & Spa Merchandiser*. – 1985. URL <http://www.sbcontrol.com/ppmorp.pdf> (дата обращения 08.06.2013).

225. McPherson, L.L. Understanding ORP's Role in the Disinfection Process [Text] / L.L. McPherson // *Water Engineering and Management*. – 1993. – Vol. 140, N 11. – P. 29-31.

226. Kim, Y.H. Effective control of chlorination and dechlorination at wastewater treatment plants using redox potential [Text] / Y.H. Kim, R. Hensley // *Water Environment Research*. – 1997. – Vol. 69, N 5. – P. 1008-1014.

227. Bergendahl, J.A., Stevens L. Oxidation Reduction Potential as a Measure of Disinfection Effectiveness for Chlorination of Wastewater [Text] / J.A. Bergendahl, L.

Stevens // Environmental Progress. – 2005. – Vol. 24, N 2. – P. 214-222.

228. Kimbrough, D.E. The effect of electrolysis and oxidation-reduction potential on microbial survival, growth, and disinfection [Text] / D. E. Kimbrough, Y. Kouame, P. Moheban // International Journal of Environment and Pollution. – 2006. – Vol. 27, N 1-3. – P. 211-221.

229. Тронстад, Л. Клиническая эндодонтия [Текст] / Л. Тронстад. – М.: МЕДпресс-информ, 2006. - 288 с.

230. Федоровский, Н.М. Непрямая электрохимическая детоксикация: Пособие для последипломной подготовки врачей [Текст] / Н.М. Федоровский. – М.: Медицина, 2004. – 144 с.

231. Жолнеревич, И.И. Влияние гипохлорита натрия на агрегационные свойства нейтрофилов [Текст] / И.И. Жолнеревич, Г.Н. Семенкова // Вестник Белорусского государственного университета. Сер. 1, Физика. Математика. Информатика. – 2010. – № 2. – С. 58 -60.

232. Yao, S.J. Detoxification by Electrochemico-Auto-Oxidation I: Deammonation [Text] / S.J. Yao, S.K. Wolfson // Transactions - American Society for Artificial Internal Organs. – 1972. – Vol. 18, N 1. – P. 60-64.

233. Yao, S.J. Anodic oxidation of urea and an electrochemical approach to de-uration [Text] / S.J. Yao, S.K. Wolfson, B.K. Ahn, C.C. Liu // Nature. – 1973. – Vol. 241, N 5390. – P. 471-472.

234. А.с. 1053833 СССР, МПК³ А 61 М 1/03. Способ детоксикации организма [Текст] / Лопухин Ю.М., Арчаков А.И., Жирнов Г.Ф., Сергиенко В.И., Мартынов А.К., Молоденков М.Н., Хапилов Н.В., Халилов Э.М. (СССР). – № 3381971/28-33; заявл. 07.12.1981; опубл. 15.11.1983, Бюл. № 12. – С. 27.

235. Лопаткин, Н. А. Эфферентные методы в медицине [Текст] / Н.А. Лопаткин, Ю.М. Лопухин. – М.: Медицина, 1989. – 352 с.

236. Васильев, Ю.Б. Непрямое электрохимическое окисление с использованием переносчиков кислорода в моделировании функции монооксигенез печени [Текст] / Ю.Б. Васильев, Б.И. Сергиенко // Электрохимия. – 1987. – Т. 23. – С. 661-662.

237. Васильев, Ю.Б. Электрохимические методы детоксикации в медицине [Текст] / Ю.Б. Васильев, В.И. Сергиенко, В.А. Гринберг // Итоги науки и техники. ВИНТИ. Сер. Электрохимия. – 1990. – Т. 31. – С. 10-54.

238. Holleman, A.F. Lehrbuch der Anorganische Chemie [Text] / A.F. Holleman, E. Wiberg, N. Wiberg. – Berlin: Walter de Gruyter, 1985. – 1451 p.

239. Панасенко, О.М. Исследование методом спиновых зондов изменения структуры липопротеинов крови человека под действием гипохлорита натрия [Текст] / О.М. Панасенко, С.А. Евгина, В.И. Сергиенко // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1993. – Т.116, № 8. – С.153-155.

240. Лопухин, Ю.М. Подготовка и проведение эфферентных методов лечени. Методическое письмо для врачей [Текст] / Ю.М. Лопухин // Эфферентная терапия. – 1996. – № 4. – С. 2.

241. Schiller, J. The action of hypochlorous acid on polymeric components of cartilage [Text] / J. Schiller, J. Arnhold, W. Grunder, K. Arnold // Biological chemistry Hoppe-Seyler. – 1994. – Vol. 375, N 2. – P. 167-172.

242. Winterbourn, C.C. Comparative reactivities of various biological compounds with myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride, and similarity of the oxidant to hypochlorite [Text] / C.C. Winterbourn // Biochimica et Biophysica Acta. – 1985. – Vol. 840, N 2. – P. 204-210.

243. Albrich, J.M. Biological reactivity of hypochlorous acid: implications for microbicidal mechanisms of leukocyte myeloperoxidase [Text] / J.M. Albrich, C.A. McCarthy, J. Hurst // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. – 1981. – Vol. 78, N 1. – P. 210-214.

244. Говорова, Н.Ю. Влияние низкомолекулярных соединений на хемилюминесценцию люминола, обусловленную действием продуктов миелопероксидазного катализа и экзогенного гипохлорита [Текст] / Н.Ю. Говорова, Б.П. Шаронов, С.Н. Лызлова // Биохимия. – 1988. – N 53. – С. 2025-2032.

245. Arnhold, J. Mechanisms of inhibition of chemiluminescence in the oxidation of luminol by sodium hypochlorite [Text] / J. Arnhold, S. Mueller, K. Arnold, K.

Sonntag // Journal of bioluminescence and chemiluminescence. – 1993. – Vol. 8, N 6. – P. 307-313.

246. Soriani, M. Oxidation of desferrioxamine to nitroxide free radical by activated human neutrophils [Text] / M. Soriani, S. Mazzuca, V. Quaresima, M. Minetti // Free Radical Biology and Medicine. – 1993. – Vol. 14, N 6. – P. 589-599.

247. Vissers, M.C. Inhibition of hypochlorous acid-mediated reactions by desferrioxamine. Implications for the mechanism of cellular injury by neutrophils [Text] / M.C. Vissers, J.C. Fantone // Free Radical Biology and Medicine. – 1990. – Vol. 8, N 4. – P. 331-337.

248. Евгина, С.А. Перекисное окисление липопротеинов крови человека, индуцированное гипохлорит-анионом [Текст] / С.А. Евгина, О.М. Панасенко, В.И. Сергиенко, Ю.А. Владимиров // Биологические мембраны. – 1992. – Т. 9, № 9. – С. 946-953.

249. Winterbourn, C.C. Myeloperoxidase-dependent loss of malondialdehyde: a limitation for detecting neutrophil-mediated lipid peroxidation [Text] / C.C. Winterbourn, A.C. Carr // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 1993. – Vol. 302, N 2. – P. 461-467.

250. Aruoma, O.I. Carnosine, homocarnosine and anserine: could they act as antioxidants in vivo? [Text] / O.I. Aruoma, M.J. Laughton, B. Halliwell // Biochemical Journal. – 1989. – Vol. 264, N 3. – P. 863-869.

251. Sharonov, B.P. Carnosine as a potential scavenger of oxidants generated by stimulated neutrophils [Text] / B.P. Sharonov, N.I. Govorova, S.N. Lyzlova // Biochemistry international. – 1990. – Vol. 21, N 1. – P. 61-68.

252. Panasenko, O.M. Hypochlorite induces lipid peroxidation in blood lipoproteins and phospholipid liposomes [Text] / O.M. Panasenko, S.A. Evgina, E.S. Driomina, V.S. Sharov [et al.] // Free Radical Biology and Medicine. – 1995. – Vol. 19, N 2. – P. 133-140.

253. Ванников, Л.Л. Тканевая гипоксия и её коррекция [Текст] / Л.Л. Ванников. – Новосибирск: Наука, 1981. – 80 с.

254. Тимочко, М.Ф. Метаболічні аспекти формування кисневого гомеостазу

в екстремальних станах [Текст] / М.Ф. Тимочко, О.П. Єлісеєва, Л.І. Кобилінська, І.Ф. Тимочко. – Львів: "Місіонер", 1998. – 142 с.

255. Кобилінська, Л.І. Роль окисно-відновних реакцій персульфату натрію в підтриманні кисневого гомеостазу організму [Текст] / Л.І. Кобилінська, М.Ф. Тимочко, Я.І. Алексеви́ч // Експ. та клін. Фізіологія, г. Львів, 10 - 14 жовтня, 1995. – С. 174-175.

256. Goldin, M.M. Electrochemical generation of active oxygen into aqueous solutions for organism detoxification [Text] / M.M. Goldin, A.G. Volkov, Yu.S. Goldfarb, E.A. Luzhnikov // Toxicology in Vitro. – 2004. – Vol. 18, N 6. – P. 791-795.

257. Якименко, Л.М. Электрохимический синтез неорганических соединений [Текст] / Л.М. Якименко, Г.А. Серышев. – М.: Химия, 1984. – 158 с.

258. Федотьев, Н.П. Прикладная электрохимия [Текст] / Н.П. Федотьев, А.Ф. Алабышев, А.П. Ротинян, П.М. Вячеславов [и др.]. – Л.: Химия, 1967. – 600 с.

259. Алабышев, А.Ф. Прикладная электрохимия [Текст] / А.Ф. Алабышев, П.М. Вячеславов, А.А. Гальнбек, П.Б. Животинский [и др.]. – Л.: Химия, 1974. – С. 536 с.

260. Haenni, W. Production of oxidants on diamond electrodes [Electronic resource] / Haenni W., Borel M., Perret A., Michaud P.A. [et al.] // CSEM Scientific Report. – 1999. URL: http://csnej106.csem.ch/detailed/pdf/b_421-SR1999_production%20oxidants.pdf (дата обращения 20.10.2012).

261. Michaud, P.A. Preparation of Peroxodisulfuric Acid Using Boron-Doped Diamond Thin Film Electrodes [Text] / P.A. Michaud, E. Mahé, W. Haenni, A. Perret [et al.] // Electrochemical and Solid-State Letters. – 2000. – Vol. 3, N 2. – P. 77-79.

262. Пат. 4310394 А США, МПК⁷ С 25 В 1/28. Process for preparing peroxydisulfates of alkali metals and ammonium [Text] / Malafosse J., Rignon M.; заявитель и патентообладатель L'air Liquide, Societe Anonyme Pour L'etude Et L'exploitation Des Procédes Georges Claude. – № 06/225456; заявл. 15.01.1981; опубл. 12.01.1982.

263. Пат. 6214197 В1 США, МПК⁷ С 25 В 1/28. Process for producing

persulfate [Text] / Kimizuka K., Kajiwara S., Tsuruga T.; Mitsubishi Gas Chemical Company, Inc. – № 09/275026; заявл. 30.03.1998; опублик. 24.03.1999.

264. Пат. 6200454 В1 США, МПК⁷ С 25 В 1/28. Process for producing sodium persulfate [Text] / Kimizuka K., Kajiwara S., Tsuruga T.; заявитель и патентообладатель Mitsubishi Gas Chemical Company, Inc. – № 09/498614; заявл. 07.02.2000; опублик. 13.03.2001.

265. Агладзе Р.И. Прикладная электрохимия [Текст] / Р.И. Агладзе, Т.А. Ваграмян, Гофман Н.Т., Кудрявцев Н.Т.[и др.]. / Под ред. А.П. Томилова. – М.: Химия. – 1984. – 520 с.

266. Пат. 4144144 А США, МПК⁷ С 25 В 11/10, С 25 В 1/28. Electrolytic production of sodium persulfate [Text] / Radimer K.J., McCarthy M.J.; заявитель и патентообладатель Fmc Corporation. – № 05/839538; заявл. 05.10.1977; опублик. 13.03.1979.

267. Пат. 6503386 В2 США, МПК⁷ С 25 В 1/28, С 25 В 11/04, С 25 В 11/06, С 25 В 1/30, С 01 В 15/08. Process for the production of alkali metal- and ammonium peroxodisulfate [Text] / Lehmann T., Stenner P.; заявитель и патентообладатель Degussa Ag. – № 09/825352; заявл. 04.04.2001; опублик. 07.01.2003.

268. Бахчисарайцыян, Н.Г. Практикум по прикладной электрохимии: Учебное пособие для вузов [Текст] / Н.Г. Бахчисарайцыян, Ю.В. Борисоглебский, Г.К. Буркат, В.Н. Варыпаев [и др.] / Под ред. В.Н. Варыпаева, В.Н. Кудрявцева. – Л.: Химия, 1990. – 304 с.

269. Торопко, В.В. Медико-биологические аспекты активированной воды [Текст] / В.В. Торопко, В.И. Прилуцкий, В.М. Бахир, Э.Б. Альтшуль. – Спб.: «ВИФ «Балт-Норд», 2003. – 112 с.

270. Manoharan, G. Electrolytic preparation of sodium and potassium percarbonate [Text] / G. Manoharan, M.M. Mohamed, N.S. Raghavendran, K.C. Narasimham // Transactions of the SAEST. – 2000. – Vol. 35, N 2. – P. 69-72.

271. Zhang, J. Electro-oxidation of carbonate in aqueous solution on a platinum rotating ring disk electrode [Text] / J. Zhang, C.W. Oloman // Journal of Applied Electrochemistry. – 2005. – Vol. 35, N 10. – P. 945-953.

272. Velazquez-Peña, S. Production of oxidants via electrolysis of carbonate solutions with conductive-diamond anodes [Text] / S. Velazquez-Peña, C. Sáez, P. Cañizares, I. Linares-Hernández [et al.] // *Chemical Engineering Journal*. – 2013. – Vol. 230. – P. 272-278.

273. Плоткин, Д.В. Современные средства лекарственной гемостатической терапии [Текст] / Д.В. Плоткин, О.А. Поварихина // "ФАРМиндекс-Практик". – 2004. – № 6. – С. 40-46.

274. Arand, A.G. Intraoperative chemical hemostasis in neurosurgery [Text] / A.G. Arand, R. Sawaya // *Neurosurgery*. – 1986. – Vol. 18, N 2. – P. 223-233.

275. Чуманевич, О.А. Эндоскопический гемостаз при гастродуоденальных кровотечениях [Текст] / О.А. Чуманевич, В.Н. Бордаков, В.Н. Гапанович, В.А. Стельмах [и др.] // *Медицинские новости*. – 2006. – № 8, Т. 1. – С. 7-14.

276. Ji, C. Endovascular Electrocoagulation: Concept, Technique, and Experimental Results [Text] / C. Ji, G. Guglielmi, H. Chen // *American Journal of Neuroradiology*. – 1997. – Vol. 18, N 9. – P. 1669-1678.

277. Грицаенко, Д.П. Использование современных электрохирургических аппаратов в практической хирургии. Пособие для врачей [Текст] / Д.П. Грицаенко, А.С. Лапшин, Ю.Д. Нетеса, П.И. Орловский. – Спб.: СпбГМУ, 2005. – 43 с.

278. Шаповалова, Ю.А. Современные электрохирургические методики гемостаза в лапароскопической хирургии (обзор литературы) [Текст] / Ю.А. Шаповалова // *Вестник неотложной и восстановительной медицины*. – 2011. – Т. 12, № 3. – С. 415-419.

279. Henkes, H. The Underlying Mechanisms of Endovascular Exclusion of Intracranial Aneurysms by Coils. How Important is Electrothrombosis? [Text] / H. Henkes, S. Brew, E. Miloslavski, S. Fischer [et al.] // *Interventional Neuroradiology*. – 2003. – Vol. 9, N 2. – P. 127-140.

280. Sawyer, P.N. Relations of Abnormal and Injury Electric Potential Differences to Intravascular Thrombosis [Text] / P.N. Sawyer, J.W. Pate, C.S. Weldon // *The American journal of physiology*. – 1953. – Vol. 175, N1. – P.108-112.

281. Sawyer, P.N. Electrical Hemostasis in Uncontrollable Bleeding States [Text] / P.N. Sawyer, C. Dennis, S.A. Wesolowski // *Annals of Surgery*. – 1961. – Vol. 54, N 4. – P. 556-562.

282. Sawyer, P.N. The Electric Current of Injured Tissue and Vascular Occlusion [Text] / P.N. Sawyer, S.A. Wesolowski // *Annals of Surgery*. – 1961. – Vol. 153, N 1. – P. 34-42.

283. Sriniveopa, S. Electrochemical Reactions of Blood Coagulation Factors - Their Role in Thrombosis [Text] / S. Sriniveopa, L. Duic, N. Ramasamy, P.N. Sawyer [et al.] // *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie*. – 1973. – Vol. 77, N 10-11. – P. 798-804.

284. Duic, L. Electrochemical Behavior of Blood Coagulation Factors: Prothrombin and Thrombin [Text] / L. Duic, S. Srinivasan, P.N. Sawyer // *Journal of Electrochemical Society*. – 1973. – Vol. 120, N 3. – P. 348-353.

285. Ramasamy, N. Electrochemical Behavior of Blood Coagulation Factors: Fibrinogen [Text] / N. Ramasamy, M. Ranganathan, L. Duic, S. Srinivasan [et al.] // *Journal of Electrochemical Society*. – 1973. – Vol. 120, N 3. – P. 354-361.

286. Henkes, H. In vitro and in vivo Studies of the Extent of Electrothrombotic Deposition of Blood Elements on the Surface of Electrolytically Detachable Coils [Text] / H. Henkes, S. Brew, S. Felber, E. Miloslavski [et al.] // *Interventional Neuroradiology*. – 2004. – Vol. 10, N 3. – P. 189-201.

287. Handa, H. Large varix of the superior ophthalmic vein: demonstration by angular phlebography and removal by electrically induced thrombosis. Case report [Text] / H. Handa, K. Mori // *Journal of Neurosurgery*. – 1968. – Vol. 29, N 2. – P. 202-205.

288. Miller, M.D. Clinical use of transcatheter electrocoagulation [Text] / M.D. Miller, I.S. Johnsrude, A.J. Limberakis, D.C. Jackson [et al.] // *Radiology*. – 1978. – Vol. 129, N 1. – P. 211-214.

289. Piton, J. Embolisation par courant électrique continu: ECEC. Applications thérapeutiques [Text] / J. Piton, J. Billerey, F. Guibert, J.M. Caillé // *Journal de radiologie*. – 1979. – Vol. 60, N 12. – P. 799-808.

290. Salazah, A.E. Experimental myocardial infarction. Induction of coronary thrombosis in the intact closed-chest dog [Text] / A.E. Salazah // *Circulation Research*. – 1961. – Vol. 9. – P. 1351-1356.

291. Mullan, S. Electrically induced thrombosis in intracranial aneurysms [Text] / S. Mullan, A.J. Raimondi, G. Dobben, G. Vailati [et al.] // *Journal of Neurosurgery*. – 1965. – Vol. 22, N 6. – P. 539-547.

292. Gold, R.E. Transarterial electrocoagulation therapy of a pseudoaneurysm in the head of the pancreas [Text] / R.E. Gold, D.C. Blair, J.B. Finlay, D.W.B. Johnston // *The American journal of roentgenology, radium therapy, and nuclear medicine*. – 1975. – Vol. 125, N 2. – P. 422-426.

293. Mullan, S. Stereotactic copper electric thrombosis of intracranial aneurysms [Text] / S. Mullan, C. Reyes, J. Dawley, G. Dobben // *Progress in Neurological Surgery* / Eds. H. Krayenbühl, P.E. Maspes, W.H. Sweet. – Basel: Karger Publisher, 1969. – Vol. 3. – P. 193-211.

294. Ogawa, Y. Electrothrombosis as a treatment of cirroid angioma in the face and scalp and varicosis of the leg [Text] / Y. Ogawa, K. Inoue // *Plastic and Reconstructive Surgery*. – 1982. – Vol. 70, N 3. – P. 310-318.

295. Yoneda, S. Electrothrombosis of arteriovenous malformation [Text] / S. Yoneda, M. Matsuda, Y. Shimizu, H. Goto [et al.] // *Neurologia medico-chirurgica (Tokyo)*. – 1977. – Vol. 17, N 1. – P. 19-28.

296. Ishikawa, M. Management of spontaneous carotid-cavernous fistulae [Text] / M. Ishikawa, H. Handa, W. Taki, S. Yoneda // *Surgical Neurology*. – 1982. – Vol. 18, N 2. – P. 131-139.

297. Peterson, W. Electrically induced thrombosis of the cavernous sinus in the treatment of carotid cavernous fistula [Text] / W. Peterson, J. Valbert, D. Whittingham // *Proceedings of the Fourth International Congress of Neurological Surgery, New York, 1969*. – Vol. 193. – P. 105.

298. Pedrosa, V.A. Electrochemical Behavior of Thin Ruthenium Modified Cobalt-Hexacyanoferrate Films Immobilized on Self Assembled Monolayer Gold Electrodes [Text] / V.A. Pedrosa, M. Bertotti // *International Journal of Electrochemical*

Science. – 2007. – Vol. 2. – P. 113-122.

299. Розенфельд, И.Л. Защита металлов от коррозии лакокрасочными покрытиями [Текст] / И.Л. Розенфельд, Ф.И. Рубинштейн, К.А. Жигалова. – М.: Химия, 1987. – 224 с.

300. Королев, Г.Т. Спектрофотометрическое определение персульфата аммония с использованием кинетического метода [Электронный ресурс] / Г.Т. Королев, Р.Г. Сафина, Я.Ю. Черпинская, Л.Г. Харитоновна // Тезисы Поволжской конференции по аналитической химии, Казань, 2001. URL http://chem.kstu.ru/butlerov_comm/vol3/cd-a5/data/jchem&cs/russian/n9/appl9/analit2001/pdf/1ach63.pdf (дата обращения 22.09.2012)

301. Габриэлян Н.И., Дмитриев А.А., Кулаков Г.П. Диагностическая ценность определения средних молекул в плазме крови при нефрологических заболеваниях//Клин. мед. -1981. -№ 10. -С. 38-42.

302. Harboe, M. A method for determination of hemoglobin in plasma by near-ultraviolet spectrophotometry [Text] / M. Harboe // Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. – 1959. – Vol. 11. – P. 66-70.

303. Miller, N.J. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates [Text] / N.J. Miller, C. Rice-Evans, M.J. Davies, V. Gopinathan [et al.] // Clinical science. – 1993. – Vol. 84, N 4. – P. 407-412.

304. Пат. 2485502 Российская Федерация, МПК⁷ G 01 N 33/48. Способ оценки морфофункционального статуса тромбоцитов человека [Текст] / Хубутия М.Ш., Макаров М.С., Хватов В.Б., Высочин И.В., Кобзева Е.Н., Боровкова Н.В., Конюшко О.И.; заявитель и патентообладатель Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы – № 2012105560/15; заявл. 17.02.12; опубл. 20.06.13, Бюл. № 17.

305. Trolox[®] Solution[©] General approach [Electronic resource] // CCHL Laboratory. – 2002. URL <http://www.cardoso->

lab.org/protocols/microscopy/Solutions/Trolox.doc (дата обращения 20.02.2012)

306. Флетчер, Р. Клиническая эпидемиология. Основы доказательной медицины [Текст] / Р. Флетчер, С. Флетчер, Э. Вагнер. – М.: Медиа Сфера, 1998. – 346 с.

307. Власов, В.В. Эффективность диагностических исследований [Текст] / В.В. Власов. – М.: Медицина, 1988. – 256 с.

308. Gilman, S. Studies of Anion Adsorption on Platinum by the Multipulse Potentiodynamic (M.p.p.) Method. I. Kinetics of Chloride and Phosphate Adsorption and Associated Charge at Constant Potential [Text] / S. Gilman // The Journal of Physical Chemistry. – 1964. – Vol. 68, N 8. – P. 2098-2111.

309. Birss, V.I. Platinum oxide film formation-reduction: an in-situ mass measurement study [Text] / V.I. Birss, M. Chang, J. Segal // Journal of Electroanalytical Chemistry. – 1993. – Vol. 355, N 1-2. – P. 181-191.

310. Nart, F.C. On the adsorption of sulfate species on polycrystalline platinum: An FTIR study in fluoride base electrolyte [Text] / F.C. Nart, T. Iwasita // Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry. – 1991. – Vol. 308, N 1-2. – P. 277-293.

311. Gamboa-Aldeco, M. Coadsorption of hydrogen and sulfate ions and urea on single crystal surfaces [Text] / M. Gamboa-Aldeco, C.K. Rhee, A. Nahlé, Q. Wang [et al.] // Proceedings of the Symposium on Electrochemistry and Materials Science of Cathodic Hydrogen Absorption and Adsorption / B.E. Conway, G. Jerkiewicz. – Pennington: The Electrochemical Society Ink. – 1995. – P. 184-206.

312. Дамаскин Б.Б. Введение в электрохимическую кинетику [Текст] / Б.Б. Дамаскин, О.А. Петрий. – М.: Высшая школа, 1975. – 416 с.

313. Yeşiloğlu, Y. Antioxidant properties of various solvent extracts from purple basil [Text] / Y. Yeşiloğlu, L. Sit // Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy. – 2012. – Vol. 95. – P.100-106.

314. Bramlett, H.M. Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: Similarities and differences [Text] / H.M. Bramlett, W.D. Dietrich // Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. – 2004. – Vol. 24. – P. 133-150.

315. Love, S. Oxidative Stress in Brain Ischemia [Text] / S. Love // Brain Pathology. – 1999. – Vol. 9. – P. 119-131.

316. Halazun, K.J. Warm ischemia in transplantation: search for a consensus definition [Text] / K.J. Halazun K.J., A. Al-Mukhtar, A. Aldouri, S. Willis [et al.] // Transplantation proceedings. – 2007. – Vol. 39, N 5. – P. 1329-1331.

317. Schäbitz, W.R. Neuroprotection by Hyperbaric Oxygenation After Experimental Focal Cerebral Ischemia Monitored by MRI // W.R. Schäbitz, H. Schade, S. Heiland, R. Kollmar [et al.] // Stroke. – 2004. Vol. 35, N 5. – P. 1175-1179.

318. Теселкин, Ю.О. Определение антиоксидантной активности плазмы крови с помощью системы гемоглобин - пероксид водорода – люминол [Текст] / Ю.О. Теселкин, И.В. Бабенкова, О.Б. Любицкий, Г.И. Клебанов [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 1998. – Т. 44, № 1. – С. 70-76.

319. Граменицкий, А.Б. ГБО в лечении хирургической инфекции [Текст] / А.Б. Граменицкий, В.В. Рыбачков // Гипербарическая физиология и медицина. – 2002. – № 4. – С. 31-40.

320. Леонов, А.Н. Гипербарическая оксигенация как метод интенсивной терапии [Текст] / А.Н. Леонов // Анестезиология и реаниматология. – 1996. – № 5. – С. 17-20.

321. Benson, R.M. Hyperbaric oxygen inhibits stimulus-induced proinflammatory cytokine synthesis by human blood-derived monocyte-macrophages [Text] / R.M. Benson, L.M. Minter, B.A. Osborne, E.V. Granowitz // Clinical and experimental immunology. – 2003. – Vol. 134, N 1. – P. 57-62.

322. Долгушин, И.И. Нейтрофильные внеклеточные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов [Текст] / И.И. Долгушин, Ю.С. Андреева, А.Ю. Савочкина. – М.: Издательство РАМН, 2009. – 208 с.

323. Iyer, A. Is Mycophenolate more than just an Immunosuppressant? – An Overview [Text] / A. Iyer, L. Brown // Indian journal of biochemistry & biophysics. – 2009. – Vol. 46, N 1. – P. 25-30.

324. Shihab, F.S. Cyclosporine nephropathy: pathophysiology and clinical impact

[Text] / F.S. Shihab // *Seminars in nephrology*. – 1996. – Vol. 16, N 6. – P. 536-547.

325. Пат. 2241997 Российская Федерация, МПК⁷ G 01 N 33/50. Способ определения окислительно-восстановительного потенциала стенки желудка и двенадцатиперстной кишки [Текст] / Евсеев М.А., Гостищев В.К., Николаев С.Г.; заявитель и патентообладатель Евсеев М.А. - № 2003133377/15; заявл. 18.11.2003; опубл. 10.12.2004.

326. Гостищев, В.К. Патогенез рецидива острых гастродуоденальных язвенных кровотечений [Текст] / В.К. Гостищев, М.А. Евсеев // *Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова*. – 2004. – №4. – С. 46-51.

327. Сотников, В.Н. Значение эндоскопической рН-метрии в определении кислотопродуцирующей функции желудка. Пособие для врачей [Текст] / В.Н. Сотников, Т.К. Дубинская, А.В. Волова, Г.А. Яковлев. – М.: РМАПО, 2005. – 35с.

328. Антропов, Л.И. Теоретическая электрохимия [Текст] / Л.И. Антропов. – М.: Высшая школа, 1984. – с. 165.

329. Fenster, C. Single tungsten nanowires as pH sensitive electrodes [Text] / C. Fenster, A.J. Smith, A. Abts, S. Milenkovic [et al.] // *Electrochemistry Communications*. – 2008. – Vol. 10, N 8. – P. 1125-1128.

330. Przybyt, M. Potentiometric tungsten electrodes with enzymes immobilised by the sol-gel technique [Text] / M. Przybyt // *Materials Science*. – 2003. – Vol. 21, N 4. – P. 417-429.

331. Ota, R. Fabrication of indium–tin-oxide films by dip coating process using ethanol solution of chlorides and surfactants [Text] / R Ota, S Seki, M Ogawa, T Nishide [et al.] // *Thin Solid Films*. – 2002. – Vol. 411, N 1. – P. 42-45.

332. Choi, C.K. Opto-Electric Cellular Biosensor Using Optically Transparent Indium Tin Oxide (ITO) Electrodes [Text] / C.K. Choi, C.H. Margraves, S.I. Jun, A.E. English [et al.] // *Sensors*. – 2008. – Vol. 8, N 5. – P. 3257-3270.

333. Choi, C.K. An endothelial cell compatible biosensor fabricated using optically thin indium tin oxide silicon nitride electrodes [Text] / C.K. Choi, A.E. English, S.I. Jun, K.D. Kihm [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2007. – Vol. 22, N 11. – P. 2585-2590.

334. Lin, J.-L. Study of Sodium Ion Selective Electrodes and Differential Structures with Anodized Indium Tin Oxide [Text] / J.-L. Lin, H.-Y. Hsu // *Sensors*. – 2010. – Vol. 10, N 3. – P. 1798-1809.

335. Goicoechea, J. Utilization of white light interferometry in pH sensing applications by mean of the fabrication of nanostructured cavities [Text] / J. Goicoechea, C.R. Zamarreño, I.R. Matias, F.J. Arregui // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2009. – Vol. 138, N 2. – P. 613-618.

336. Hotovy, J. Sputtered ITO for application in thin-film silicon solar cells: Relationship between structural and electrical properties [Text] / J. Hotovy, J. Hüpkes, W. Böttler, E. Marins [et al.] // *Applied Surface Science*. – 2013. – Vol. 269. – P. 81–87

337. Park, Y.S. Characteristics of ITO films with oxygen plasma treatment for thin film solar cell applications [Text] / Y.S. Park, E. Kim, B. Hong, J. Lee // *Materials Research Bulletin*. – 2013. – Vol. 48, N 12. – P. 5115–5120

338. Lee, J.-H. Fabrication of an organic light-emitting diode inside a liquid crystal display [Text] / J.-H. Lee, W.-F. Chang, C.-C. Wu, C.-F. Lin [et al.] // *Thin Solid Films*. – 2013. – Vol. 545. – P. 471–475.

339. Yun, Y.-H. Surface treatment of Indium Tin Oxide (ITO) thin films synthesized by chemical solution deposition [Text] / Y.-H. Yun, J.-W. Choi, S.-C. Choi // *Journal of Ceramic Processing Research*. – 2004. – Vol. 5, N 4. – P. 395-398.

340. Karyakin, A.A. Prussian Blue and Its Analogues: Electrochemistry and Analytical Applications [Text] / A.A. Karyakin // *Electroanalysis*. – 2001. – Vol. 13, N 10. – P. 813-819.

341. Ricci, F. Prussian Blue Modified Carbon Nanotube Paste Electrodes: A Comparative Study and a Biochemical Application [Text] / F. Ricci, A. Amine, D. Moscone, G. Palleschi // *Analytical Letters*. – 2003. – Vol. 36, N 9. – P. 1921-1938.

342. Dobre, A.S. Electrochemical preparation and characterization of poly (3-methylthiophene)-cobalt hexacyanoferrate–modified platinum electrode using cyclic voltammetry [Text] / A.S. Dobre, M. Dascalu, C. Mihailciuc // *Analele Universitatii Bucuresti: Chimie*. – 2008. – Vol. II. – P. 07-12.

343. Sandu, I. Electrosynthesis and characterization of a cobalt hexacyanoferrate–

poly(3-methylthiophene) modified platinum electrode using cyclic voltammetry [Text] / I. Sandu, I. Vlaicu, A. Cristian, C. Mihailciuc // *Analele Universitatii Bucuresti: Chimie.* – 2008. – Vol. II. – P. 25-32.

344. Pedrosa, V.A. Electrochemical Behavior of Thin Ruthenium Modified Cobalt-Hexacyanoferrate Films Immobilized on Self Assembled Monolayer Gold Electrodes [Text] / V.A. Pedrosa, M. Bertotti // *International Journal of Electrochemical Science.* – 2007. – Vol. 2. – P. 113-122.

345. Sauter, S. Localisation of electrochemical oxidation processes in nickel and cobalt hexacyanoferrates investigated by analysis of the multiplet patterns in X-ray photoelectron spectra [Text] / S. Sauter, G. Wittstock, R. Szargan // *Physical Chemistry Chemical Physics.* – 2001. – Vol. 3. – P. 562-569.

346. Ju, J. Electrochemically Controlled Ion Separation Performances of Electrodeposited Nickel Hexacyanoferrate Thin Films in Alkaline Earth Metal Solution [Text] / J. Ju, X.-G. Hao, Z.-L. Zhang, S.-B. Liu [et al.] // *Journal of Inorganic Materials.* – 2008. – Vol. 23, N 6. – P. 1115-1120.

347. Steen, W.A. Structure of Cathodically Deposited Nickel Hexacyanoferrate Thin Films [Text] / W.A. Steen, S.W. Han, Q. Yu, R.A. Gordon [et al.] // *Langmuir.* – 2002. – Vol. 18, N 20. – P. 7714-7721.

348. Baioni, A.P. Copper hexacyanoferrate nanoparticles modified electrodes: A versatile tool for biosensors [Text] / A.P. Baioni, M. Vidotti, P.A. Fiorito, S.I.C. de Torresi // *Journal of Electroanalytical Chemistry.* – 2008. – Vol. 622, N 2. – P. 219-224.

349. Makowski, O. Electrochemical identity of copper hexacyanoferrate in the solid-state: evidence for the presence and redox activity of both iron and copper ionic sites [Text] / O. Makowski, J. Stroka, P.J. Kulesza, M.A. Malik [et al.] // *Journal of Electroanalytical Chemistry.* – 2002. – Vol. 532, N 1-2. – P. 157-164.

350. Joseph, J. Modification of carbon electrodes with zinc hexacyanoferrate [Text] / J. Joseph, H. Gomathi, G.P. Rao // *Journal of Electroanalytical Chemistry.* – 1997. – Vol. 431, N 2. – P. 231-235.

351. Düssel, H. Hexacyanoferrate-based composite ion-sensitive electrodes for voltammetry [Text] / H. Düssel, A. Dostal, F. Scholz // *Analytical and bioanalytical*

chemistry. – 1996. – Vol. 355, N 1. – P. 21-28.

352. Kumar, A.S. Characteristic and electrocatalytic behavior of ruthenium Prussian blue analogue film in strongly acidic media [Text] / A.S. Kumar, J.-M. Zen // Journal of Molecular Catalysis A: Chemical. – 2006. – Vol. 252, N 1-2. – P. 63-69.

353. Liu, C. Electrochemistry of vanadium hexacyanoferrate film [Text] / C. Liu, S. Dong // Electroanalysis. – 2005. – Vol. 9, N 11. – P. 838-842.

354. Razmi, H. Electrochemical characteristics of dopamine oxidation at palladium hexacyanoferrate film, electroless plated on aluminum electrode [Text] / H. Razmi, A. Azadbakht // Electrochimica Acta. – 2005. – Vol. 50, N 11. – P. 2193-2201.

355. Gruszecki, T. Indium hexacyanoferrate(III) coating for stabilizing polycrystalline CdSe photoelectrodes [Text] / T. Gruszecki, B. Holmström // Journal of Applied Electrochemistry. – 1991. – Vol. 21, N 5. – P. 430-434.

356. Cui, X. Hybrid copper-cobalt hexacyanoferrate films modified glassy carbon electrode as an electrochemical sensor for hydrogen peroxide [Text] / X. Cui, X. Lin // Analytical letters. – 2002. – Vol. 35, N 4. – P. 663-675.

357. Kumar, S.S. Amperometric Sensor for the Determination of Ascorbic Acid Based on Cobalt Hexacyanoferrate Modified Electrode Fabricated through a New Route [Text] / S.S. Kumar, S.S. Narayanan // Chemical and pharmaceutical bulletin (Tokyo). – 2006. – Vol. 54, N 7. – P. 963–967.

358. de Tacconi, N.R. Metal Hexacyanoferrates: Electrosynthesis, in Situ Characterization, and Applications [Text] / N.R. de Tacconi, K. Rajeshwar // Chemistry of Materials. – 2003. – Vol. 15, N 16. – P. 3046-3062.

359. Pauliukaite, R. Characterization of cobalt- and copper hexacyanoferrate-modified carbon film electrodes for redox-mediated [Text] / R. Pauliukaite, M. Florescu, C.M.A. Brett // Journal of Solid State Electrochemistry. – 2005. – Vol. 9, N 5. – P. 354–362.

360. Семенов, Н.В. Биохимические компоненты и константы жидких сред и тканей человека [Текст] / Н.В. Семенов. – М.: Медицина, 1971. – 152 с.

361. Hossu, A.M. Determination of vitamin C in pharmaceutical products with physico-chemical and bioanalytical technics [Text] / A.M. Hossu, V. Magearu //

Roumanian Biotechnological Letters. – 2004. – Vol. 9. N 1. – P. 1497-1504.

362. Koleva, I.I. Application of ABTS Radical Cation for Selective On-Line Detection of Radical Scavengers in HPLC Eluates [Text] / I.I. Koleva, H.A.G. Niederländer, T.A. van Beek // Analytical Chemistry. – 2001. – Vol. 73, N 14. – P. 337

363. Pradyot, P. A Comprehensive Guide to the Hazardous Properties of Chemical Substances [Text] / Pradyot P. – New Jersey: John Wiley & Sons Inc., 2007. – P. 587.

364. Goode, H.F. Reperfusion injury, antioxidants and hemodynamics during orthotopic liver transplantation [Text] / H.F. Goode, N.R. Webster, P.D. Howdle, J.P. Leek [et al.] // Hepatologie. – 1994. – Vol. 19, N 2. – P. 354-359.

365. Steininger, J.M. PPM or ORP: Which Should Be Used? [Electronic resource] / J.M. Steininger // Swimming Pool Age & Spa Merchandiser. – 1985. URL <http://www.sbcontrol.com/ppmorp.pdf> (дата обращения 08.06.2013).

366. Felix, C. Synthesis and optimisation of IrO₂ electrocatalysts by Adams fusion method for solid polymer electrolyte electrolyzers [Text] / C. Felix, T. Maiyalagan, S. Pasupathi, B.Bladergroen [et al.] // Micro and nanosystems. – 2012. – Vol. 4, N 3. – P. 186-191.

367. Пат. 5281280 А США, МПК⁷ С 11 D 7/24, С 11 D 7/12, С 11 D 7/50, С 11 D 3/395. Composition for removing mildew containing hypochlorite, bicarbonate and d-limonene [Text] / Lisowski M.J., Jones R.D.; заявитель и патентообладатель Lisowski M.J., Jones R.D. - № 08/023616; заявл. 26.02.1993; опубл. 25.01.1994.

368. Lubashevsky, I.A. Effect of blood vessel discreteness on necrosis formation during laser induced thermal coagulation limited by heat diffusion [Text] / I.A. Lubashevsky, A.V. Priezzhev // Journal of biomedical optics. – 1999. – Vol. 4, N 2. – P. 248-255.

369. Филов, В.А. Вредные химические вещества. Неорганические соединения элементов I-IV групп: Справочник [Текст] / под ред. В.А.Филов. – Л.: Химия, 1988. – С. 66-73.

370. Helman, R.G. The role of lysosomes in the pathogenesis of copper-induced hepatotoxicity: II. Intracellular distribution of copper in hepatocytes [Text] / R.G.

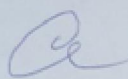
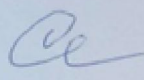
Helman, L.G. Adams, K.R. Pierce, C.H. Bridges [et al.] // Toxicology and applied pharmacology. – 1983. – Vol. 67, N 2. – P. 238-245.

Результаты микробиологического анализа взаимодействия крови, содержащей патогенную микрофлору, с окисляющим раствором

Таблица 1 – Результаты микробиологического исследования взаимодействия крови пациента П., содержащей *Staphylococcus coagulase (-)*, с окисляющим раствором

До контакта	<p style="text-align: center;">НИИ СП им. Н.В.Склифосовского Лаборатория клинической микробиологии</p> <p style="text-align: center;">Результаты микробиологического исследования</p> <p>Микробиолог <i>Семенова А.В.</i> № анализа <i>8370</i> Получено <i>22-май-2012</i> Выдано <i>25-май-2012</i> Проба <i>кровь</i></p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 33%;">Пациент</td> <td style="width: 33%;">Возраст</td> <td style="width: 33%;"></td> </tr> <tr> <td>№ истории <i>9012</i></td> <td>Отделение <i>РОЭ</i></td> <td>Палата</td> </tr> </table> <p style="text-align: center;">S - чувствительно, I - промежуточно устойчиво, R - устойчиво. Дополнительную информацию по клинической микробиологии и чувствительности к антибиотикам можно получить в лаборатории.</p> <p>Микроорганизм <i>Staph. coag (-)</i></p> <table style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr><td>эритромицин</td><td>R</td></tr> <tr><td>ципрофлоксацин</td><td>R</td></tr> <tr><td>оксациллин</td><td>R</td></tr> <tr><td>линезолид</td><td>S</td></tr> <tr><td>доксциклин</td><td>R</td></tr> <tr><td>ванкомицин</td><td>S</td></tr> </table>	Пациент	Возраст		№ истории <i>9012</i>	Отделение <i>РОЭ</i>	Палата	эритромицин	R	ципрофлоксацин	R	оксациллин	R	линезолид	S	доксциклин	R	ванкомицин	S
Пациент	Возраст																		
№ истории <i>9012</i>	Отделение <i>РОЭ</i>	Палата																	
эритромицин	R																		
ципрофлоксацин	R																		
оксациллин	R																		
линезолид	S																		
доксциклин	R																		
ванкомицин	S																		
После контакта	<p style="text-align: center;">НИИ СП им. Н.В.Склифосовского Лаборатория клинической микробиологии</p> <p style="text-align: center;">Результаты микробиологического исследования</p> <p>Микробиолог <i>Семенова А.В.</i> № анализа <i>8371</i> Получено <i>22-май-2012</i> Выдано <i>28-май-2012</i> Проба <i>кровь</i></p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 33%;">Пациент</td> <td style="width: 33%;">Возраст</td> <td style="width: 33%;"></td> </tr> <tr> <td>№ истории <i>9012</i></td> <td>Отделение <i>РОЭ</i></td> <td>Палата</td> </tr> </table> <p style="text-align: center;">S - чувствительно, I - промежуточно устойчиво, R - устойчиво. Дополнительную информацию по клинической микробиологии и чувствительности к антибиотикам можно получить в лаборатории.</p> <p>Микроорганизм <i>нет роста</i></p>	Пациент	Возраст		№ истории <i>9012</i>	Отделение <i>РОЭ</i>	Палата												
Пациент	Возраст																		
№ истории <i>9012</i>	Отделение <i>РОЭ</i>	Палата																	

Таблица 2 – Результаты микробиологического исследования взаимодействия крови пациента З., содержащей *Micrococcus spp.*, с окисляющим раствором

До контакта	<p style="text-align: center;">НИИ СП им. Н.В. Склифосовского Лаборатория клинической микробиологии</p> <p style="text-align: center;">Результаты микробиологического исследования</p> <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td>Микробиолог</td> <td>Семенова А.В.</td> <td>№ анализа</td> <td>10106</td> </tr> <tr> <td>Получено</td> <td>22-июн-2012</td> <td>Выдано</td> <td>27-июн-2012</td> </tr> <tr> <td>Проба</td> <td colspan="3">кровь</td> </tr> </table> <table border="1" style="width: 100%; margin-top: 10px;"> <tr> <td style="width: 33%;">Пациент</td> <td style="width: 33%;">Возраст</td> <td style="width: 33%;"></td> </tr> <tr> <td>№ истории 8033</td> <td>Отделение РОЭ</td> <td>Палата</td> </tr> </table> <p style="text-align: center; margin-top: 20px;">S – чувствительно, I – промежуточно устойчиво, R – устойчиво. Дополнительную информацию по клинической микробиологии и чувствительности к антибиотикам можно получить в лаборатории.</p> <p>Микроорганизм <u><i>Micrococcus sp.</i></u> </p>	Микробиолог	Семенова А.В.	№ анализа	10106	Получено	22-июн-2012	Выдано	27-июн-2012	Проба	кровь			Пациент	Возраст		№ истории 8033	Отделение РОЭ	Палата
Микробиолог	Семенова А.В.	№ анализа	10106																
Получено	22-июн-2012	Выдано	27-июн-2012																
Проба	кровь																		
Пациент	Возраст																		
№ истории 8033	Отделение РОЭ	Палата																	
После контакта	<p style="text-align: center;">НИИ СП им. Н.В. Склифосовского Лаборатория клинической микробиологии</p> <p style="text-align: center;">Результаты микробиологического исследования</p> <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td>Микробиолог</td> <td>Семенова А.В.</td> <td>№ анализа</td> <td>10039</td> </tr> <tr> <td>Получено</td> <td>21-июн-2012</td> <td>Выдано</td> <td>27-июн-2012</td> </tr> <tr> <td>Проба</td> <td colspan="3">кровь</td> </tr> </table> <table border="1" style="width: 100%; margin-top: 10px;"> <tr> <td style="width: 33%;">Пациент</td> <td style="width: 33%;">Возраст</td> <td style="width: 33%;"></td> </tr> <tr> <td>№ истории 8033</td> <td>Отделение РОЭ</td> <td>Палата</td> </tr> </table> <p style="text-align: center; margin-top: 20px;">S – чувствительно, I – промежуточно устойчиво, R – устойчиво. Дополнительную информацию по клинической микробиологии и чувствительности к антибиотикам можно получить в лаборатории.</p> <p>Микроорганизм <u>нет роста</u> </p>	Микробиолог	Семенова А.В.	№ анализа	10039	Получено	21-июн-2012	Выдано	27-июн-2012	Проба	кровь			Пациент	Возраст		№ истории 8033	Отделение РОЭ	Палата
Микробиолог	Семенова А.В.	№ анализа	10039																
Получено	21-июн-2012	Выдано	27-июн-2012																
Проба	кровь																		
Пациент	Возраст																		
№ истории 8033	Отделение РОЭ	Палата																	