

УДК 616.008.922.1- 073.55

© Л. П. Кислякова, Ю. Я. Кисляков, К. В. Ромашов, Д. А. Серпинский

АВТОМАТИЗИРОВАННЫЙ КОМПЛЕКС ДЛЯ ПОЛЯРОГРАФИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ СОДЕРЖАНИЯ O₂ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДАХ

Описан автоматизированный, управляемый компьютером, аналитический комплекс, имеющий в своем составе датчики кислорода, температуры и атмосферного давления, а также электронный блок со встроенным микроконтроллером. Комплекс обеспечивает возможность эффективных количественных исследований, направленных на оптимизацию характеристик кислородных электродов, а также разработку, совершенствование и применение неинвазивных или малотравматичных методов полярографического анализа для изучения распределения парциальных давлений кислорода в биологических системах. Приводятся примеры применения комплекса для выбора материала катода и мембран кислородного датчика, а также для неинвазивного измерения парциальных давлений кислорода в организме.

ВВЕДЕНИЕ

В живом организме кислород является первичным окислителем в реакциях энергообразования, а также синтеза и деградации разнообразных структурных, регуляторных и других веществ, необходимых для поддержания целостности и функциональной активности биосистем различного уровня организации [1, 2]. Содержание кислорода в органах, тканях, выдыхаемом воздухе и окружающей среде, характеризуемое уровнями его парциальных давлений (pO_2), в интегральной форме отражает состояние энергетического и пластического метаболизма. Поэтому на протяжении многих десятилетий интенсивно исследуются механизмы транспорта и потребления O₂ в биологических средах на основе результатов изучения этого показателя. В существующей научной, медицинской и производственной практике для измерений содержания кислорода в различных средах широко используются разнообразные методы: газожидкостной хроматографии, газообъемного, активационного, масс-спектрометрического, оптического, химического, электрохимического анализов [1–3]. Сравнительная оценка аналитических, эксплуатационных и других характеристик этих методов показывает, что каждому из них присущи те или иные достоинства и недостатки. При этом наибольшее распространение в медико-биологических исследованиях получили полярографические методы, основанные на хроноамперометрическом принципе работы сенсорной ячейки при внешнем источнике поляризующего напряжения. Они характеризуются наибольшей селективностью, чувствительностью, воспроизводимостью, динамичностью, стабильностью рабочих характеристик датчиков, малыми размерами, от-

носительной простотой конструктивных решений и процедуры измерений.

Многолетний опыт применения этих методов в аналитических измерениях позволил достаточно полно сформулировать их теоретические основы и принципы конструктивных решений применяемых сенсоров [4, 5]. Тем не менее каждый раз при изменении сферы приложения метода или условий регистрации содержания O₂ в биологических средах приходится осуществлять большой объем исследовательской работы, направленной на приведение в соответствие технических характеристик применяемых сенсоров физиологическим параметрам самого объекта. Эффективность этого этапа во многом зависит от соответствия используемой регистрирующей аппаратуры и способов обработки получаемой информации общим требованиям, которые заключаются в обеспечении:

- большого диапазона регистрируемых токов и напряжений;
- широкого спектра частотных колебаний регистрируемых показателей;
- постоянного контроля рабочих характеристик используемых датчиков;
- автоматического управления процессами калировки и измерения;
- одновременной регистрации нескольких показателей;
- возможности регистрации параметров в автономном режиме и в составе лабораторной установки;
- непрерывной математической обработки результатов измерения, их систематизации и графического отображения.

Некоторым из указанных выше требований удовлетворяют существующие полярографические

анализаторы [3, 5]. Однако их высокая стоимость и неполное соответствие указанным требованиям ограничивают их использование при разработке и практическом применении методов, специализированных сенсоров и приборов для медико-биологических исследований механизмов транспорта кислорода в организме. Учитывая все вышесказанное, в настоящей работе была поставлена цель — создание автоматизированного аналитического комплекса, обеспечивающего возможность реализации различных полярографических методов, исследования и оптимизации характеристик сенсорных элементов, а также непосредственного анализа распределения парциальных давлений кислорода в биологических системах.

ОСНОВНЫЕ МЕДИКО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ К АВТОМАТИЗИРОВАННОМУ КОМПЛЕКСУ

В основу медицинских требований к разрабатываемому комплексу положены критерии безопасности здоровья испытуемого и персонала при проведении исследований и информативности получаемых данных. В целях безопасности предусмотрена работа измерительной системы в автономном режиме и подключение ее к компьютеру через оптоизолированный вход, а также использование, соответственно инструкциям, химических средств для калибровки сенсоров, обработки кожи перед измерениями и дезинфицирование поверхности датчиков.

Информативность, или медико-биологическая значимость результатов измерений в значительной мере зависит от достигнутых показателей правильности и воспроизводимости измерений, которые в свою очередь зависят от адекватности используемых способов калибровки датчиков и проведения измерений в биосредах. Следует подчеркнуть, что, к сожалению, до сих пор в мировой практике не установлена действующая общепринятая система метрологического обеспечения средств и методов амперометрических измерений напряжения кислорода в биосредах, включающая унифицированные способы стандартизации эталонных образцов и оценки правильности измерений при определении содержания кислорода в биологических средах. Поэтому оценка параметров стандартных образцов, используемых при калибровке или метрологическом контроле качества измерений, выполняется исходя из фактически произвольного выбора эталонного метода или аттестованного газометрического оборудования. Этим объясняются имеющиеся в литературе данные о значительных различиях показаний кислородных анализаторов разных производителей при параллельных измерениях одного и того же

образца биосреды, достигающих, например, для проб крови ± 6 и более мм рт. ст. [6–8]. Обсуждается вопрос о несоответствии этих значений медицинским требованиям к точности измерений в пределах ± 3 мм рт. ст. и стимулировании работ, направленных на разработку способов изготовления эталонных образцовых сред, унифицированных на мировом уровне. На сегодняшний день в системе метрологического контроля медицинской техники РФ ситуация соответствует описанной.

При формировании технических требований к средствам измерений напряжения кислорода в биосредах важен учет физиологической значимости этих требований и существующих технических возможностей. Проведенный ранее анализ [5–10] показывает, что наблюдаемая точность измерений парциального давления кислорода в сосудах кровеносной системы и тканях организма составляет примерно 10 %, что соответствует 3–7 мм рт. ст. Такая точность измерений не соответствует потребностям клинической практики, в связи с чем клинические критерии контроля состояния больных прежде всего учитывают направление и скорость изменения pO_2 . Поэтому общепринятыми требованиями к воспроизводимости и дрейфу показаний являются ± 3 % и около 1 % в час [9].

ПРИНЦИПИАЛЬНОЕ УСТРОЙСТВО И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АВТОМАТИЗИРОВАННОГО КОМПЛЕКСА

Разработанный комплекс обеспечивает реализацию принципа полярографического измерения содержания O_2 в исследуемой среде. Его сущность заключается в измерении и анализе величины тока, проходящего через электродную систему (кислородный электрод), включающую поляризующийся катод (измерительный, или рабочий, электрод) и неполяризующийся анод (вспомогательный, или электрод сравнения).

В состав автоматизированного комплекса входят: электронный блок; сенсорный блок, включающий датчики кислорода, температуры и атмосферного давления (рис. 1); персональный компьютер; а также комплект программного обеспечения.

Электронный блок используется как составной элемент автоматизированного комплекса или как автономный измеритель на базе встроенного микропроцессора. Электронный блок осуществляет снятие и первичную обработку информации с датчиков, передачу ее в персональный компьютер, выработку напряжения поляризации, а также общее управление прибором в режиме автономного измерителя. В обоих случаях обеспечена возможность применения различных типов открытых и закрытых электродных систем с источником

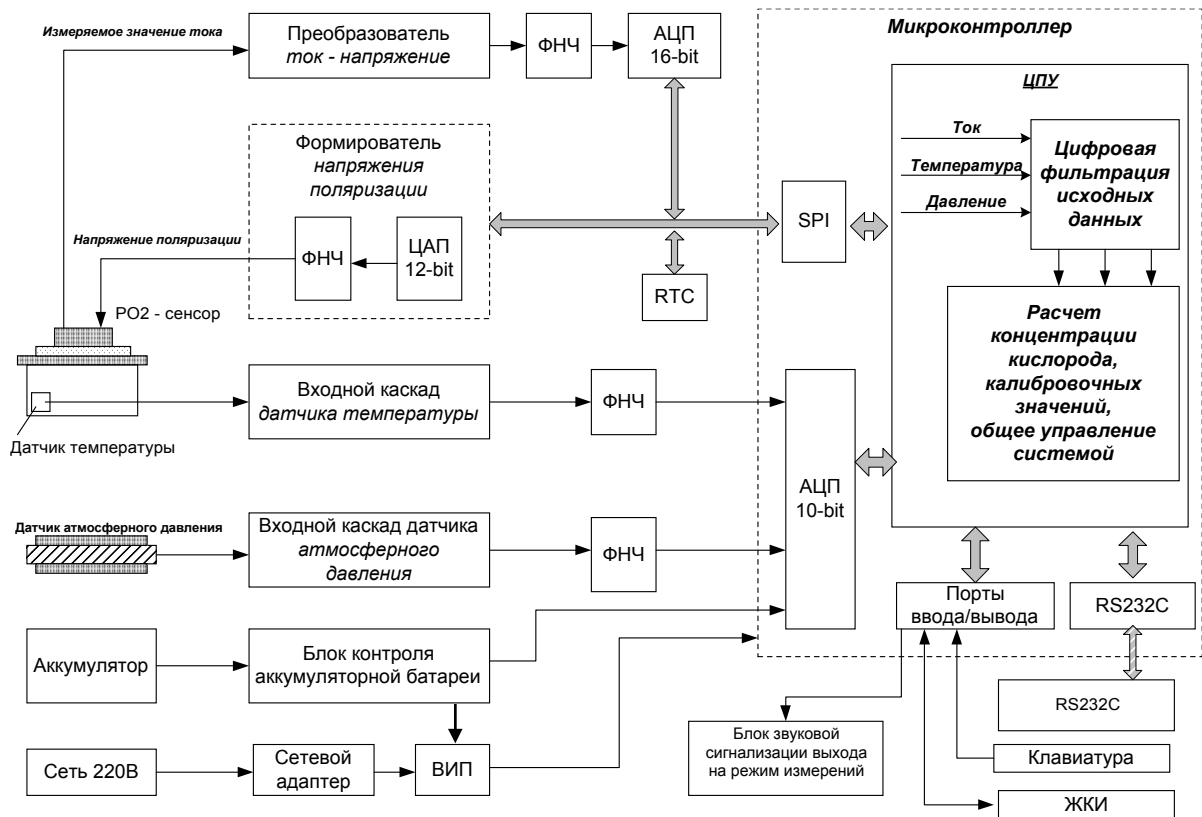


Рис. 1. Структурная схема электронного и сенсорного блоков автоматизированного комплекса

поляризирующего напряжения, позволяющего использовать хроноамперметрический или импульсный режим работы электродной системы. При этом измерения выполняются при постоянном контроле основных рабочих характеристик датчиков на основе автоматических калибровок по модельным средам с учетом соответствующих поправок на вид модельной среды, уровень параллельно измеряемых температуры и атмосферного давления.

Широкий спектр функциональных возможностей автоматизированного комплекса обеспечивается рациональным использованием современной элементной базы и схемотехнических решений электронного блока. Его основой является высокоточный измеритель со стабильными характеристиками, при разработке которого использовались операционные усилители с входными токами порядка единиц пикоампер, малым дрейфом и низким энергопотреблением.

Ядром электронного блока является современный CMOS-микроконтроллер с AVR-усовершенствованной RISC-архитектурой, который

осуществляет общее управление измерителем.

Выходной сигнал кислородного электрода, пропорциональный содержанию кислорода, поступает на вход преобразователя ток—напряжение, встроенного в корпус кислородного датчика. Затем полученное на его выходе значение напряжения через фильтр низких частот (ФНЧ) поступает на вход 16-разрядного прецизионного АЦП, соединенного с микроконтроллером, посредством SPI-интерфейса. Далее этот сигнал, поступив в микроконтроллер, подвергается цифровой обработке для исключения нежелательных сигналов и шумов вне полосы пропускания. Источник звуковой сигнализации подает звуковой сигнал при выходе электрода на стационарный уровень показаний в соответствии с критерием, введенным оператором для режима определения содержания кислорода.

Датчик температуры выполнен в виде термистора с отрицательным температурным коэффициентом сопротивления (ТКС) и нелинейной характеристикой. Выходной сигнал датчика температуры, пройдя через входной каскад, поступает

на ФНЧ, а затем на внутреннее АЦП микроконтроллера, где также подвергается цифровой обработке.

Датчик атмосферного давления представляет собой интегральную микросхему, установленную внутри прибора, выдающую напряжение, пропорциональное значению атмосферного давления. Выходной сигнал датчика давления также подвергается цифровой обработке в микроконтроллере.

Установка значения поляризирующего напряжения осуществляется формирователем напряжения поляризации, представляющим собой 12-разрядный ЦАП и ФНЧ. Благодаря наличию ЦАП существует возможность программно изменять значение поляризирующего напряжения от 0 до 2.5 В с шагом 0.6 мВ. ЦАП подключен к микроконтроллеру посредством SPI-интерфейса.

Питание электронного блока осуществляется либо от сети 220 В через адаптер, либо от встроенного источника питания (ВИП) — аккумуляторной батареи (9 В), которая обеспечивает его работу в качестве самостоятельного измерителя, работающего в автономном режиме в течение 8–10 часов. Предусмотрены автоматический контроль состояния аккумулятора и его подзарядка в период работы от сети.

Электронный блок оснащен оптоизолированным выходом по интерфейсу RS232C, по которому осуществляется дистанционный вывод информации о токе, температуре, давлении на компьютер, а также внешнее управление электронным блоком с компьютера. В то же время независимо от того, в каком режиме он работает (автономном как измеритель или в составе комплекса), информация об измеряемых, вычисляемых и устанавливаемых оператором параметрах отображается на 2-строчном, знаковосинтезирующем ЖКИ измерителя. При этом управление электронным блоком осуществляется с помощью собственной клавиатуры в диалоговом режиме, а в условиях работы измерителя в составе комплекса — компьютером по специальной программе.

Комплект программного обеспечения автоматизированного комплекса позволяет устанавливать режим работы комплекса и включать дополнительные модули, осуществляющие специфические алгоритмы обработки информации. Стандартный комплект позволяет полностью автоматизировать процедуру калибровки и измерений выходных сигналов датчиков кислорода, температуры и атмосферного давления, обеспечивает сохранение данных в виде файлов, их математическую обработку, графическое отображение на дисплее и распечатку на принтере в виде протокола измерения или отчета, передачу данных по каналам компьютерной связи. Файл данных имеет формат, совместимый с такими математиче-

скими пакетами, как MATLAB, MathCAD.

Программное обеспечение позволяет задавать величину поляризирующего напряжения, вид и скорость его нарастания или частоту (линейно нарастающее, синусоидальное, импульсное одно- или биполярное в диапазоне частот 0.0–1.0 кГц), тип O₂-сенсора, методику проведения эксперимента. Базовые варианты методик измерений хранятся в памяти компьютера; кроме того, могут быть добавлены новые методики, разработанные пользователем при помощи установленного редактора методик.

В то же время при условиях автономного режима работы, благодаря применению микроконтроллера, измеритель обладает следующими, заложеными в электронном блоке, возможностями:

- одноточечной или двухточечной калибровки в автоматическом режиме;
- контроля рабочих характеристик кислородного датчика по калибровочным данным и сигнализации (ЖКИ и звуковой) в случае их выхода за установленные пределы;
- сохранения в памяти параметров последней калибровки (токов, напряжения кислорода, температуры, атмосферного давления, наклона характеристики кислородного электрода, установленных критериев, параметров поляризирующего напряжения и поправочных коэффициентов, даты) с возможностью их просмотреть на ЖКИ или вывести на компьютер;
- исследования характеристик датчиков со значительным разбросом параметров; все паспортные данные датчика заносятся пользователем в память прибора и сохраняются;
- автоматической поправки значений pO₂ на текущую температуру и давление;
- регистрации, отображения на ЖКИ и передачи в компьютер текущих значений тока, температуры, давления;
- работы в режиме полярографа;
- звуковой сигнализации выхода показаний кислородного электрода на стационарный режим;
- автоматического контроля и индикации текущего заряда батареи в процентах; при разрядке аккумулятора — звуковой сигнал и сообщение на ЖКИ об этом.

К основным техническим характеристикам автоматизированного комплекса, так же как и в автономном режиме работы, относятся диапазоны измерений: pO₂ — 0...1000 мм рт. ст., тока — 0.1...1000 нА, температуры — 0...40 °С. Предел основной абсолютной погрешности электронного блока для канала измерений напряжения кислорода составляет ± 0.1–0.5 мм рт. ст.; рабочих токов в поддиапазонах с верхними пределами 10, 100, 1000 нА — ± (0.1–0.5)%; температуры —

± 0.1 °С. В зависимости от типа датчика предел основной погрешности измерений напряжения кислорода составляет $\pm 1...2$ мм рт. ст., воспроизводимость измерений — $1...2$ %, время отклика — до 3 мин.

Калибровка показаний — двухточечная или одноточечная; модельная среда для калибровки —

воздух, газовая смесь или жидкая среда с известным уровнем парциального давления кислорода в ней.

Разработанный интерфейс позволяет одновременно с графическим отображением динамики изменения pO_2 визуально наблюдать и регистрировать текущие значения показаний всех датчиков.

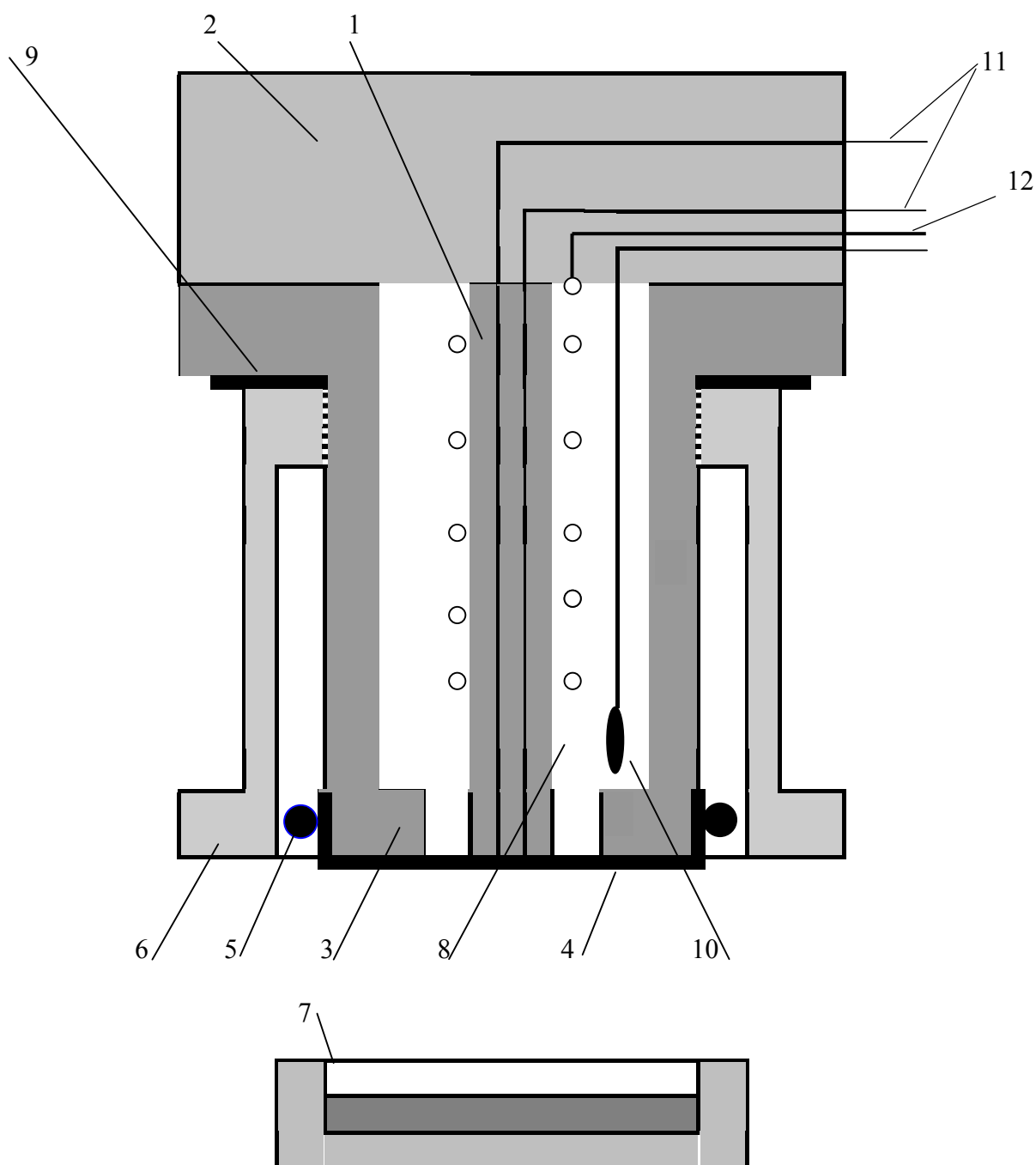


Рис. 2. Схематическое изображение принципиального устройства мембранного кислородного электрода (объяснение в тексте)

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ХАРАКТЕРИСТИК КИСЛОРОДНЫХ ЭЛЕКТРОДОВ

С помощью автоматизированного измерительного комплекса выполнены исследования характеристик кислородных электродов с целью их оптимизации. В качестве кислородных сенсоров использовали мембранные кислородные электроды с моно- или мультикатодом, принципиальное устройство которых соответствует существующим представлениям [2, 5].

Основными элементами их конструкции (рис. 2) являются: 1 — внутренний стеклянный корпус катода; 2 — основание, содержащее входной каскад электронного преобразователя и выводной кабель; 3 — съемный "стаканчик" для крепления мембраны; 4 — мембрана; 5 — резиновое крепежное кольцо; 6 — съемное крепежное устройство для установки датчика на кожу; 7 — съемный стаканчик для хранения электрода и его калибровки; 8 — электролит; 9 — герметизирующие прокладки; 10 — миниатюрный датчик температуры, 11 — катод; 12 — анод. Рассматривали следующие характеристики датчиков: параметры полярограммы в различных средах с различным содержанием кислорода, величину остаточного тока и тока плато, время отклика, дрейф показаний, чувствительность, воспроизводимость измерений, зависимость выходного тока от температуры среды.

Конструкция кислородного сенсора и используемые материалы в значительной мере определяют качество его работы. Так, основные показатели качества измерений — чувствительность и воспроизводимость показаний в значительной степени зависят от материала катода и свойств используемой полимерной мембраны. Поэтому была исследована зависимость характеристик кислородных датчиков от этих параметров.

Электроды из благородных металлов можно считать идеально поляризующимися. Плотность тока обмена реакции восстановления кислорода на них имеет порядок 10^{-12} А/см². Выбор материала катода определяется особенностями кинетики процесса электровосстановления кислорода и механизмов реакций восстановления кислорода на поверхности различных благородных металлов. Этот вопрос сложен в связи с большим числом отдельных стадий и участвующих промежуточных продуктов, зависимостью скорости промежуточных реакций от состава электролита и состояния поверхности катода. При выборе катода важно, чтобы поддерживался достаточно большой интервал значений потенциалов, соответствующих предельному току восстановления кислорода (рабочий диапазон напряжений). Этот интервал ограни-

чен главным образом величиной перенапряжения выделения водорода, которое на гладкой платине начинается при 0.8 В, а на золоте — при 1.2 В при условиях работы в растворе 0.1 М КСl с хлорсеребряным электродом сравнения [2, 5, 11]. С целью выбора материала для катода были исследованы две серии образцов электродных систем с разными катодами: из остеклованных в фабричных условиях фрагментов платиновой ($n = 5$) и золотой ($n = 5$) проволоки диаметром 50 мкм. В качестве электрода сравнения использовали хлорсеребряный электрод, площадью 30 мм², в качестве электролита — 0.8 М КСl в боратном буфере при рН 9.18. Исследование вольтамперной характеристики этих электродных систем показало, что диапазон напряжений, соответствующий предельному току восстановления кислорода, для ячеек с платиновым электродом равен 0.5–0.9 В, а для ячеек с золотым катодом — 0.5–1.2 В (рис. 3).

Величина предельного диффузионного тока у исследованных двух серий образцов электродов существенно не отличалась, составляя в среднем 10.5 ± 0.6 и 9.8 ± 0.7 нА (рис. 4, А). Средние уровни остаточного тока и тока, полученного в условиях удаления кислорода из электролита в результате добавления 0.1 % Na₂SO₃, при этом не превышали 1 % от тока плато, составляя в среднем 0.08 ± 0.03 и 0.09 ± 0.03 нА соответственно (рис. 4, б).

Полученные данные свидетельствуют о принципиальной пригодности каждого из этих металлов к использованию в качестве катода кислородного электрода, что соответствует литературным данным авторов [2, 5], отмечавших стабильность характеристик, биологическую инертность и другие достоинства этих металлов. При сравнительном анализе пригодности этих материалов следует учитывать, что платиновый катод обладает лучшими электрохимическими характеристиками с точки зрения механизма электровосстановления. Однако вследствие высокой каталитической активности платины и присутствия в электролите адсорбирующихся веществ возможно постепенное снижение чувствительности датчика. Поэтому при ее использовании потребуются меры, направленные не только на очистку электролита, но и выбор мембран с наиболее низкой проницаемостью к органическим и другим веществам, инактивирующим платину, а также на поиск оптимальных способов обновления поверхности платины.

Значительные сложности при этом связаны в основном с наличием в биологических средах разнообразных электрохимически активных веществ, которые способны интенсивно осаждаться и загрязнять поверхность электродов, приводя

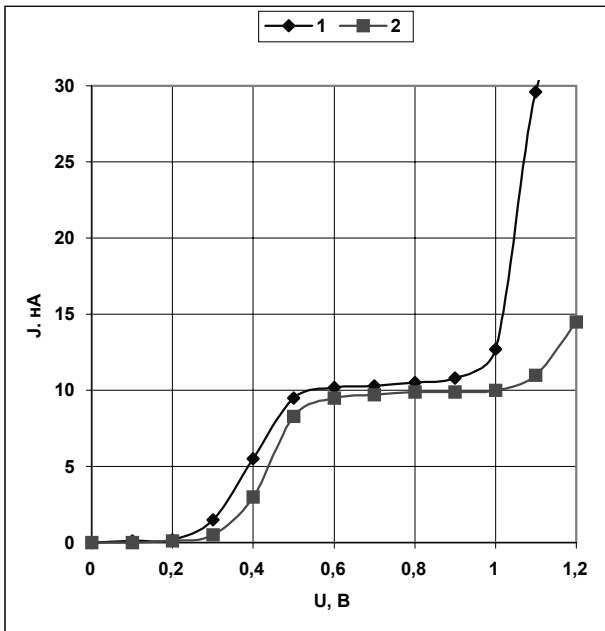


Рис. 3. Вольтамперные кривые для датчиков с платиновым (1) и золотым (2) катодами диаметром 50 мкм в растворе 0.8 М КС1 в боратном буфере при pH 9.18.

По оси абсцисс — величина поляризующего напряжения (U , В); по оси ординат — величина установившегося тока в цепи электродов (J , нА)

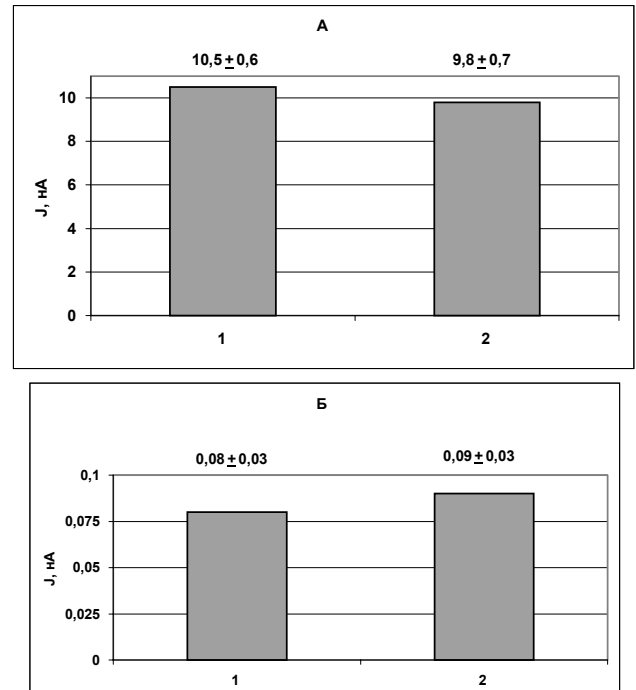


Рис. 4. Влияние материала катода на величину предельного (А) и остаточного (Б) тока амперометрического кислородного электрода.

По оси абсцисс: 1 — значения для датчика с платиновым катодом, 2 — значения для датчика с золотым катодом. По оси ординат — величина тока, нА

к быстрой инактивации каталитической способности катода и другим эффектам, конечный результат которых — снижение чувствительности датчика. Поэтому начиная с первой модели закрытого мембраной кислородного электрода для исследований в биологических средах основные усилия при разработке амперометрических сенсоров были направлены на улучшение свойств газопроницаемой мембраны [2, 5, 12].

Применение мембраны ведет к необходимости решения ряда теоретических и практических проблем. В идеальном случае она должна служить надежным изолятором, защищающим электроды от проникновения в приэлектродное пространство из внешней среды веществ. Однако введение мембраны в конструкцию датчика способно исказить механизмы и скорость осуществления электрохимических реакций на поверхности электродов, сокращая срок службы сенсора. В связи с этим накоплен значительный фактический материал по применению разнообразных полимеров в качестве мембраны кислородного электрода.

Анализ имеющихся данных показывает, что наиболее пригодными мембранами для измерений напряжения кислорода в биологических средах являются фторированные полимеры, которые отличаются высокой стойкостью к воздействию разнообразных веществ, хорошей проницаемостью к кислороду, биологической инертностью. Проницаемость мембран в значительной степени зависит от их толщины. Поэтому, используя возможности автоматизированного комплекса, нами были проведены исследования зависимости характеристик кислородных электродов от толщины использованной фторопластовой мембраны.

Проведенные исследования показали, что вольтамперные характеристики датчиков с тефлоновыми мембранами имеют хорошо выраженное плато в диапазоне 0.5–1.2 В и малую величину остаточного тока — в пределах 3 % от предельного диффузионного тока. На рис. 5 приведены две типичные вольтамперные характеристики, полученные в условиях применения тефлоновой мембраны толщиной 10 и 25 мкм. Видно, что уменьшение

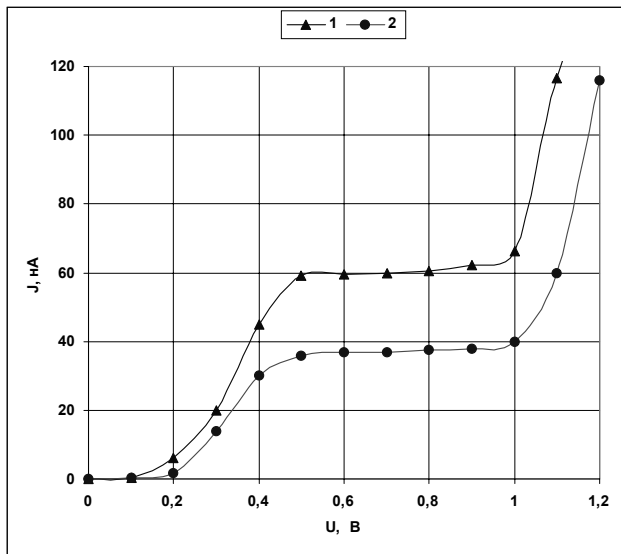


Рис. 5. Зависимость вольтамперной характеристики кислородного электрода от толщины полимерной мембраны: 1 — тефлон Ф4МБ-2 толщиной 10 мкм, 2 — толщиной 25 мкм

толщины пленки в 2,5 раза ведет к увеличению тока плато в 1,6 раза. Соответствие фторопластовых мембран требованиям измерений напряжения кислорода на поверхности биологических тканей подтверждено результатами оценки чувствительности датчиков, составляющей 0,1–0,5 нА/мм рт.ст., наилучшим показателем воспроизводимости выходного сигнала, в пределах 0,5–1,3 %, удовлетворительным значением времени отклика и дрейфа показаний, составивших соответственно 1–3 мин и 0,0–0,5 % в час. Чувствительность выходного сигнала к изменениям температуры составляет 2,5–4,2 % на один °С, что соответствует имеющимся литературным данным [4, 5]. Благодаря использованию измерителя с контроллером имеются возможности для введения достаточно надежной поправки на температурную зависимость показаний. Наблюдаемая умеренная степень чувствительности показаний к наличию процессов конвективного переноса в исследуемой среде может быть учтена при разработке методики измерений. Таким образом, выше представленные и ранее полученные данные [9] свидетельствуют о том, что фторопластовые мембраны толщиной 10–25 мкм обеспечивают получение кислородных электродов с вполне удовлетворительными характеристиками.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ НАПРЯЖЕНИЯ КИСЛОРОДА В СИСТЕМЕ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ ПОВЕРХНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ

Исследования возможностей экспериментального анализа напряжения кислорода в микроциркуляторном русле поверхности биологических тканей выполнены на печени лабораторных мышей и коже человека с применением вышеописанных мультикатодных амперометрических кислородных электродов и автоматизированного измерительного комплекса.

Печень — один из немногих внутренних органов, принимающих участие во всех биохимических процессах, протекающих в организме [14], в связи с чем изменения ее функции приводят к нарушениям трофики всех тканей. Вследствие высокой интенсивности и особенностей специфической деятельности клеток печени ее ткани потребляют 20–28 % кислорода, поступающего в организм. Они характеризуются относительно равномерным распределением на поверхности и в глубине паренхимы ее основных структурно-функциональных единиц, включающих клеточные ансамбли и особо сложную систему микроциркуляции, характеризующуюся весьма высокой плотностью расположения кровеносных сосудов. В связи с важностью получения информации о состоянии системы кислородного снабжения клеток печени для его оценки применялись открытые игольчатые электроды [2, 4, 5], повреждающие клетки и кровеносные сосуды в исследуемом участке тканей, что не позволяло получить адекватные данные и резко ограничивало сферу их применения. Учитывая это, мы исследовали возможность измерений напряжения кислорода в поверхностных слоях тканей печени с помощью неинвазивного мультикатодного ($n = 10$) датчика с диаметром катодных элементов 50 мкм. Расположение катодных элементов позволяло анализировать одновременно несколько соседних микроучастков тканей печени в слое глубиной до 300 мкм.

В качестве объекта исследований использовали 17 лабораторных белых мышей массой 27 ± 4 г в условиях анестезии гексеналом в дозе 0,1 мг/г массы тела, внутривенно.

Методика регистрации напряжения кислорода на поверхности тканей включала предварительную двухточечную калибровку датчиков в модельной среде — 20 %-м растворе глицерина в 0,9 %-м NaCl. Для выполнения калибровки одну порцию модельной среды уравнивали с воздухом, а во вторую для удаления кислорода добавляли 0,1 % сульфита натрия. Типичные результаты регистрации показателей в процессе калибровки кислородного датчика представлены на рис. 6. После калибровки тщательно обмытый электрод

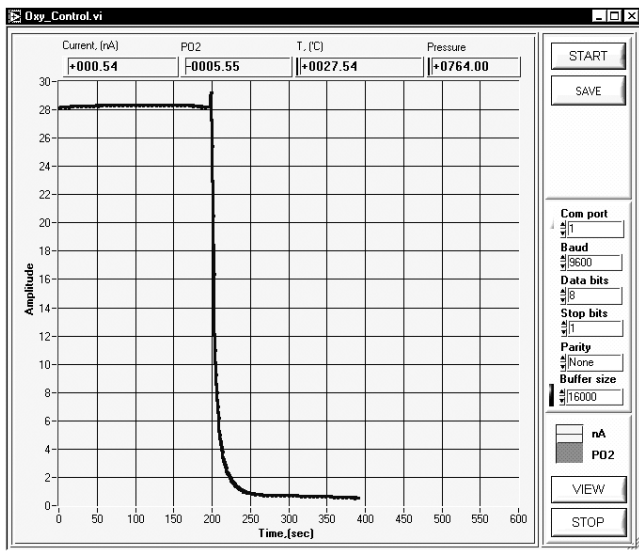


Рис. 6. Результаты регистрации предельного диффузионного тока при калибровке кислородного датчика, первоначально погруженного в уравновешенный с атмосферным воздухом раствор (20 % глицерина и 0.9 % NaCl), а затем — в тот же раствор после полного удаления кислорода с помощью добавления сульфита натрия. Показания датчиков температуры и атмосферного давления показаны в окнах меню

с помощью физиологического манипулятора подвели к освобожденному от соединительнотканной капсулы заданному участку поверхности печени, обеспечивая давление датчика на поверхность тканей в пределах 3 г/см^2 . Регистрацию показаний выполняли не ранее чем через 10 мин после установки датчика, что соответствует времени, необходимому для адаптации тканей к данному воздействию.

В первой серии опытов у каждого из 7 животных исследовали 3 локальных участка тканей центральной доли печени. По результатам измерений средние уровни напряжения кислорода в исследованных локальных участках печени находились в пределах 14–40 мм рт. ст. Средний уровень напряжения кислорода для всей совокупности исследованных микроучастков составил 22.4 ± 1.2 мм рт. ст. Вид распределения напряжения кислорода соответствовал нормальному. Следует отметить, что средние индивидуальные значения напряжения кислорода у животных характеризовались меньшим диапазоном варьирования — от 18 до 34 мм рт. ст., причем у каждого исследованного животного при перемещении электрода на соседний участок печени напряжение кислорода мало менялось в целом — на величину

не более 6 мм рт. ст. В то же время при непрерывных измерениях в одном и том же участке тканей длительностью до 30 мин не было обнаружено существенных отклонений текущих значений или колебаний фонового уровня напряжения кислорода. Эти данные свидетельствуют об однородном распределении среднего уровня локального напряжения кислорода в печени.

При анализе методом функциональных проб с применением принудительной задержки дыхания была зарегистрирована быстрая (в пределах 5–10 с) реакция на прекращение доставки кислорода с током крови. Дополнительное внутривенное введение животным дозы гексенала 1 мг/г массы тела, вызывающей реакцию угнетения дыхательного центра, сопровождалось резким падением напряжения кислорода до 1–3 мм рт. ст. в течение 2 мин после инъекции.

Сравнительный анализ результатов измерений, выполненных с помощью мультикатодных поверхностных датчиков, не вызывающих повреждений клеток и микрососудов печени, в общих чертах согласуется с данными, полученными на печени крыс и других млекопитающих с помощью открытых игольчатых электродов [5, 11]. Как известно, открытые электроды фактически измеряют содержание кислорода в прилежащем к электроду микропространстве, заполненном кровью, вытекающей из поврежденных сосудов, и содержимым клеток. В отличие от этого в настоящем исследовании с помощью малотравмирующих тканей печени датчиков получены значения парциального давления кислорода с меньшим диапазоном варьирования уровня локального напряжения кислорода и несколько более высокие средние величины напряжения кислорода в микроциркуляторных участках тканей печени. Вероятно, это обусловлено не столько видовыми особенностями исследованных животных, сколько отсутствием травмирования тканей и оптимальными характеристиками мультикатодного кислородного электрода. К их числу относятся: измерение среднего уровня напряжения кислорода в нескольких микроциркуляторных участках одновременно, низкое потребление кислорода самим электродом по сравнению с потреблением кислорода в тканях печени, минимальное механическое травмирование клеток и микрососудов, параллельный контроль текущей температуры тканей и автоматический учет соответствующей температурной поправки. Это позволяет считать, что представленный датчик способен повысить качество и информативность каждого отдельного измерения в системе микроциркуляции печени.

Следующая серия исследований выполнена на коже человека. Как известно, кожа выполняет многообразные функции: защитную, терморегуля-

торную, дыхательную, обменную, секреторную [14]. Она является обширным рецепторным полем болевой, тактильной, температурной кожной чувствительности. Поэтому, с одной стороны, нарушения функций того или иного органа отражаются на состоянии кожи, а с другой — повреждения кожи ведут к глубоким сдвигам функционального состояния различных тканей и органов. Поэтому возможность исследования механизмов кислородного снабжения тканей кожи и контроля его текущего состояния важна как в целях экспериментальной физиологии, так и для практической медицины, представляя собой инструмент адекватного контроля кислородного статуса и функционального состояния организма. В связи с этим нами было проведено исследование возможности неинвазивных измерений естественного уровня напряжения кислорода на поверхности кожи с помощью разработанного мультикатодного ($n = 5-10$) кислородного электрода с катодными элементами диаметром 50–100 мкм.

Методика измерений включала несколько этапов. Перед измерениями выполняли двухточечную калибровку датчика, используя в качестве модельной среды 20 %-й раствор глицерина в 0.9 %-м NaCl. Затем датчик обрабатывали дезинфицирующим средством (75 %-м этиловым спиртом или 3 %-й перекисью водорода) и помещали в емкость с небольшим количеством модельной среды. Далее обрабатывали участок кожи испытуемого эфирно-спиртовым раствором. Через 10 минут на исследуемый участок кожи наносили каплю модельной среды, уравновешенной с воздухом. Установив на корпус электрода крепежное кольцо, электрод располагали на коже так, чтобы торцевая поверхность находилась в нанесенной капле раствора. Установочное крепежное кольцо фиксировали с помощью липкой ленты для предотвращения смещений. Давление датчика на кожу, обеспеченное конструкцией корпуса электрода и устройством крепления датчика, соответствовало 3.0 г/см^2 . Через 10 мин после этого, когда обычно завершалась возникающая реакция кожи на процедуру установки датчика, начинали регистрацию уровня напряжения кислорода на поверхности кожи.

К этому времени первоначальное снижение показаний датчика сменялось постепенным повышением, после чего показания устанавливались на относительно устойчивом уровне, который можно считать соответствующим среднему текущему значению напряжения кислорода в находящейся в зоне действия электрода микроциркуляторных пространствах. Наблюдения выполнены на 3 испытуемых при трехкратных повторениях измерений длительностью около 20 мин в каждом исследованном участке. Типичные результаты измерений парциального давления кислорода

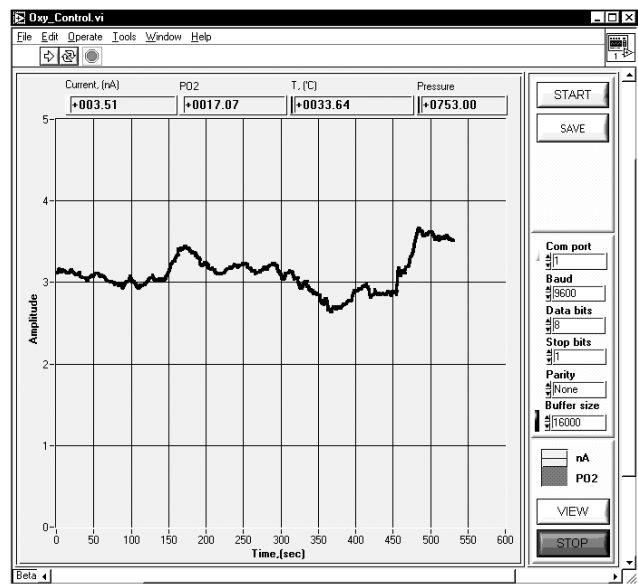


Рис. 7. Типичные результаты измерения тока кислородного датчика, характеризующего напряжение кислорода на поверхности кожи предплечья. Текущие значения тока, напряжения кислорода, температуры и атмосферного давления показаны в окнах

на поверхности кожи предплечья показаны на рис. 7.

По результатам измерений на поверхности кожи предплечья, средние индивидуальные значения напряжения кислорода варьировали от 3 до 19 мм рт. ст. Для кожи кистей рук наблюдались более низкие уровни напряжения кислорода, находившиеся в пределах 0.5–10 мм рт. ст. Следует отметить определенные индивидуальные особенности динамики локального напряжения кислорода (рис. 7). Они проявляются в наличии более или менее выраженных колебаний текущего значения напряжения кислорода, амплитуда которых составляла 3–20 % относительно фонового среднего уровня, а период 0.1–3.0 мин. Можно также отметить особенности топографического распределения напряжений кислорода на поверхности кожи. Содержание кислорода несколько выше в области расположения крупных вен и артерий. Оно значительно повышается при прогреве кожи и понижается при длительной задержке дыхания. Результаты измерений напряжения кислорода в коже соответствуют данным, полученным в аналогичных условиях [9]. В целом различия показаний между соседними участками кожи значительно выше, чем между соседними участками в печени, что может иметь как морфологические, так и физиологические основания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования свидетельствуют о том, что созданный управляемый компьютером аналитический комплекс обеспечивает возможность эффективных количественных исследований, направленных на оптимизацию характеристик сенсорных элементов, а также разработку, совершенствование и применение неинвазивных или малотравматичных методов полярографического анализа для изучения распределения парциальных давлений кислорода в биологических системах. Комплекс позволяет в автоматическом режиме проводить калибровку кислородных датчиков с учетом температуры исследуемой среды и атмосферного давления, осуществлять непрерывное измерение содержания кислорода в биологических средах, одновременно контролировать характеристики используемых электродов, применять различные способы математического и статистического анализа результатов измерений с параллельной графической иллюстрацией и формированием баз данных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лукьянова Л.Д., Балмуханов Б.С., Уголев А.Т. Кислородзависимые процессы в клетке и ее функциональное состояние. М.: Наука, 1982. 301 с.
2. Vanderkooi J.M., Erecinska M.M., Silver I.A. // *Am. J. Physiol.* 1991. V. 260. С. 1131–1150.
3. Захарченко А.В., Колотуша С.С., Лебедко Г.П. и др. // Приборы, средства автоматизации и системы управления, ТС-4, Аналитические приборы и приборы для научных исследований. 1987. Вып. 1. С. 1–40.
4. Хаваши Е. Ионно- и молекулярно-селективные электроды в биологических системах. М.: Мир, 1988. 221 с.
5. Коваленко Е.А., Березовский В.А., Эпштейн И.М. Полярографическое определение кислорода в организме. М.: Медицина, 1975. 231 с.
6. Clauson J., Murray R.M. // *J. Med. Tech.* 1985. V. 2. P. 19–22.
7. Clauson J. // *Progr. Notes.* 1992. V. 4, N 2. P. 13–15.
8. Porte P. // *Progr. Notes.* 1992. V. 4, № 2. P. 9.
9. Кислякова Л.П., Кисляков Ю.Я., Евдокимов Г.Р., Лазарев М.Е. // *Научн. приборостр.* 2000. Т. 10, № 3. С. 27–34.
10. Pungor E., Feher Zs., Varadi M. // *Crit. Rev. Anal. Chem.* CRC Press., 1980. V. 9. P. 97.
11. Березовский В.А. Напряжение кислорода в тканях животных и человека. Киев: Наукова думка, 1975. 280 с.
12. Clarc L.C., Wolf R., Granger D. // *J. Appl. Physiol.* 1953. V. 6. P. 189–193.
13. Кислякова Л.П. // *Физиол. ж. СССР.* 1983. Т. 69, № 11. С. 1479–1484.
14. Сапин М.Р., Билич Г.Л. *Анатомия человека.* М.: Высш. шк., 1989. 544 с.

Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург (Кислякова Л.П., Кисляков Ю.Я.)

Научно-производственный центр экологии и здоровья, Санкт-Петербург (Ромашов К.В., Серпинский Д.А.)

Материал поступил в редакцию 23.07.2002.

AUTOMATED SYSTEM FOR POLAROGRAPHIC INVESTIGATION OF THE O₂ CONTENT IN BIOLOGICAL MEDIA

L. P. Kislyakova, Yu. Ya. Kislyakov, K. V. Romashov*, D. A. Serpinsky*

*Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint-Petersburg
Scientific and Industrial Center of Ecology and Health, Saint-Petersburg

A universal automated system for polarographic investigation of the O₂ content in biological media is described. It consists of electronics and sensors parts connected with the computer. It can be used for measurement and control of the electrode characteristics and experimental conditions (temperature and atmospheric pressure). It can be used in stationary and field conditions in biological, medical, ecological and chemical research.