

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича

Архив журнала

Вопросы медицинской химии

ISSN 0042-8809

1989

Внимание! Распознавание текста проведено в автоматическом режиме для облегчения работы поисковых систем. Будьте внимательны при копировании, возможны ошибки и неточности. Используйте сканированный графический вариант.

Archive of journal

Voprosy meditsinskoi khimii

ISSN 0042-8809

1989

Attention! OCR has been performed automatically for search engines only. Be careful when copying, errors are possible. Use scanned picture as standard.

<http://pbmc.ibmc.msk.ru>

ТОМ 35

БЫПУСК 5

СЕНТЯБРЬ — ОКТЯБРЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.



МОСКВА · МЕДИЦИНА · 1989

ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. Б. СПИРИЧЕВ (зам. редактора), И. П. АШМАРИН, Т. Т. БЕРЕЗОВ, А. В. ВАСИЛЬЕВ, Е. Н. ГЕРАСИМОВА, В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗБАРСКИЙ, В. Л. КОЗЕЛЬЦЕВ (ответственный секретарь), А. Н. КЛИМОВ, Б. Ф. КОРОВКИН, Л. А. ЛОКШИНА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ, Е. Л. РОЗЕНФЕЛЬД, Ю. А. РОМАКОВ, В. А. САКС, С. Е. СЕВЕРИН, В. А. ТУТЕЛЬЯН

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

БАЕВ А. А. (Москва)
БЫЧКОВ С. М. (Москва)
КОНСТАНТИНОВ А. А. (Хабаровск)
КУДРЯШОВ Б. А. (Москва)
ЛЯХОВИЧ В. В. (Новосибирск)
ПАСХИНА Т. С. (Москва)

ТРОИЦКИЙ Г. В. (Симферополь)
ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)
ТЯХЕПЫЛД Л. Я. (Тарту)
ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)
ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)

Г. Г. Прохоров, А. М. Писаревский, Ю. И. Николаев

МЕТОДИКА РЕДОКСМЕТРИИ В КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Гос. университет, Ленинград

Окислительно - восстановительные процессы, имеющие в своем механизме перенос электронов, являются важной стороной жизнедеятельности биологических систем. В электрохимии общепризнаны возможности редоксметрии при количественном описании отдельных элементов окислительно-восстановительных реакций на основании уравнения Нернста [1, 7, 16]. В биологических и медицинских исследованиях неоднократно предпринимались попытки использовать методику прямого измерения окислительно-восстановительного потенциала индифферентными электродами, изготовленными из золота или платины и введенными в ткани для оценки их жизнеспособности, кровоснабжения, оксигенации и радиочувствительности [2, 4—6, 8—14, 19]. Возможность получения информации о состоянии тканевого дыхания без использования сложных биохимических методик определяет сохраняющийся интерес к результатам редоксметрических измерений для решения конкретных исследовательских задач. При этом естественно возникают пока нерешенные до конца вопросы о полученных величинах при количественном и качественном анализе, практической ценности результатов.

В данной работе ставилась задача применить методику измерения окислительно-восстановительного потенциала тканей в клинической практике, оценить ее возможности в диагностике и изучении механизмов ишемического синдрома с учетом тех требований и ограничений, предъявляемых к методике, которые в настоящее время сформулированы в теоретической редоксметрии.

Известно, что при условии достижения равновесия электронообменных

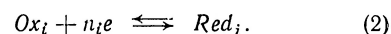
процессов в растворе и на электроде величины потенциалов индифферентных электродов (E) связаны с составом раствора следующим соотношением:

$$\begin{aligned} E &= E_1^0 + \frac{Q}{n_1} \lg \frac{C_{ox_1}}{C_{Red_1}} = \\ &= E_2^0 + \frac{Q}{n_2} \lg \frac{C_{ox_2}}{C_{Red_2}} = \dots = E_n^0 + \\ &+ \frac{Q}{n_n} \lg \frac{C_{ox_n}}{C_{Red_n}}, \end{aligned} \quad (1)$$

где $E_1^0, E_2^0, \dots, E_n^0$ — нормальные потенциалы, характеризующие свойства соответствующих редокс-систем; C_{ox} и C_{Red} — концентрации соответственно окисленных форм (рецепторов электронов) и восстановленных форм (доноров электронов);

$$Q = \frac{2,3 RT}{F} = 59,1 \text{ мВ при } 25^\circ \text{C};$$

n — число электронов, участвующих в редокс-реакции:



Если равновесие гомогенных и гетерогенных реакций не достигается, количественные расчеты, связанные с использованием уравнения (1), становятся некорректными. В таких условиях допустимо обсуждать возможность реализации частных равновесий, учитывая при этом свойства используемых индикаторных электродов. В связи с этим для условий, при которых равновесие заведомо либо вероятно не достигается, целесообразно использовать термин «электронный потенциал» вместо «окислительный» («окислительно-восстановительный»).

Потенциометрические измерения в тканях инъекционными макроэлектро-

дамп имеют свои специфические трудности, среди которых необходимо отметить следующие.

1. Большие размеры органических молекул-участников окислительно-восстановительных взаимодействий — часто создают стерические препятствия электронному обмену на индикаторном электроде.

2. Фиксированная морфологическая структура живых клеток, наличие органелл определяют неоднородность пространственного размещения редокс-компонентов и процессов. Кроме того, различная гистологическая принадлежность клеток и тканей, наличие гистогематических барьеров разобщают компоненты окислительно-восстановительных систем.

3. Введение электродов в ткани вызывает их механическое повреждение.

Вместе с тем накопленный в биологических и медицинских исследованиях опыт показывает, что потенциалы индикаторных электродов в нормально функционирующих клетках и тканях находятся на примерно постоянных уровнях и при определенных воздействиях обратимо изменяются. Это обстоятельство подтверждает существование динамического равновесия в жизнедеятельных биологических окислительно-восстановительных системах.

Сопоставление внешне противоречивых фактов заставляет полагать, что потенциал интерстициальной жидкости живых тканей, зарегистрированный измерительным платиновым или золотым инъекционным электродом, по своей природе является смешанным (компромиссным). Он зависит от pO_2 , pH_2 , pH , состояния поверхности индифферентного электрода. При этом понятно, что зарегистрированный потенциал по смыслу следует определить как «электродный». Термины «окислительный», «окислительно-восстановительный» потенциал также могут быть применимы, если при этом признается существенность перечисленных выше положений и не предпринимаются количественные расчеты отдельных составляющих его факторов.

При оценке электродного (окислительно-восстановительного) потенциала на качественном уровне его смещение в сторону увеличения положительных значений может рассматриваться как относительное повышение концентрации окисленных форм, в том числе

возрастание содержания кислорода, смещение в сторону менее положительных значений — как относительное преобладание восстановленных форм, уменьшение концентрации кислорода.

Потенциометрические измерения обычно проводят с использованием гальванического элемента, включающего индикаторный электрод (платина, золото или другие индифферентные материалы), который вводится в исследуемую ткань, и электрод сравнения с известным по паспорту потенциалом (например, хлорсеребряный электрод сравнения ЭВЛ-1М1). Электрический контакт последнего с кожей пациента осуществляется через прокладку, смоченную раствором хлористого калия. Электроды подключаются к соответствующим клеммам измерительного прибора, в качестве которого следует использовать высокоомные милливольтметры (рН-метры, иономеры) с входным сопротивлением не менее 10^9 Ом. Перед началом исследования проводится калибровка электродов в растворах с известным значением редокс-потенциала. Рецептуры таких растворов приведены в литературе [13].

При измерении окислительно-восстановительного потенциала в живых тканях для исключения ошибки и получения случайных величин необходимо соблюдать ряд условий. В частности, результаты измерения можно регистрировать, если потенциал электрода стабилизировался на постоянных величинах. При работе с платиновым электродом в безусловно жизнеспособных тканях его потенциал при вдыхании пациентом кислорода должен смещаться в сторону положительных значений, а при однократном вдохе газобразного водорода — в сторону отрицательных величин. После кислородного или водородного сдвига он должен возвращаться к исходным цифрам.

Величины электродного потенциала принято выражать в милливольтх относительно стандартного водородного электрода (мВ н. в. э.) и обозначать величиной E_n . Перерасчет в шкалу E_n проводится следующим путем:

$$E_n = E - E_{cp}, \quad (3)$$

где E_{cp} — потенциал электрода сравнения, указанный в его паспорте (для

Величины потенциалов платиновых электродов, введенных в ткани здоровых людей и больных облитерирующим атеросклерозом (II стадия ишемии) до и после поясничной симпатэктомии ($\bar{x} \pm m$)

Показатель	Здоровые люди (n=20)	Больные (n=120)	
		до операции	после операции
Электродный потенциал, мВ н. в. э.: кожи голени	239,0±6,0	225,0±8,5*	237,5±10,5
мышц голени	214,0±12,5	162,0±9,0*	163,0±12,5*
Амплитуда смещения потенциала, мВ: кожи при ингаляции кислорода	13,5±1,5	5,0±0,5*	5,0±0,5*
мышц при ингаляции кислорода	13,5±0,5	3,5±0,5*	5,5±1,0*
Скорость локального тканевого кровотока, мл/мин на 100 г ткани: в коже голени	29,0±2,5	7,0±1,5*	10,5±2,0*
в мышцах голени	34,5±2,0	6,5±1,0*	4,0±0,5*

Примечание. Звездочка — $p < 0,05$ по сравнению со здоровыми.

насыщенного хлорсеребряного электрода 199—201 мВ н. в. э. при 298°K); E — показания милливольтметра. Например, если при измерении окислительного потенциала парой электродов — насыщенным хлорсеребряным и платиновым — зарегистрировано значение +60 мВ в точке № 1 и — 20 мВ в точке № 2, то значения E_n составят соответственно 260 и 180 мВ.

Проведенное нами измерение потенциала платиновых электродов в коже и в мышцах здоровых людей показало, что значения E_n в интерстициальной жидкости кожи колебались от 218 до 270 мВ, в мышцах — от 170 до 220 мВ при соответствующих средних значениях $239,0 \pm 6,0$ и $214,0 \pm 12,5$ мВ.

Дозированная ингаляция кислорода в объеме одного максимального вдоха вызывала временное смещение потенциала в положительную сторону на 10—30 мВ, продолжавшееся в течение 5—7 мин. До внедрения в практику исследований методики полярографической регистрации напряжения кислорода названное смещение потенциала использовали для косвенной оценки состояния оксигенации тканей [17]. На данном этапе описанная реакция потенциала в ответ на ингаляцию кислорода может рассматриваться как достоверный критерий, подтверждающий наличие кровообращения в точке измерения, лабильности и активного функционирования биологического окисления в тканях, устойчивости окислительно-восстановительного равновесия.

Аналогичные измерения у больных с выраженным ишемическим синдро-

мом нижних конечностей при облитерирующем атеросклерозе выявили достоверное снижение электродного потенциала, уменьшение амплитуды ответной реакции при ингаляции кислорода. Характер изменений, представленных в таблице, позволил заключить, что в ишемизированных тканях окислительно-восстановительное равновесие смещалось в сторону относительного уменьшения концентрации окислителей, при этом нарушения в большей степени захватывали мышцы. Снижение амплитуды смещения потенциала в ответ на ингаляцию кислорода показывало, что динамическое равновесие и подвижность окислительно-восстановительных процессов сохраняются, несмотря на заметное угнетение их интенсивности.

В оценке результатов поясничной симпатэктомии можно констатировать нормализующее влияние операции на соотношение окисленных и восстановленных форм в коже, где величина электродного потенциала заметно возрастала и достигала исходных цифр, но малую эффективность в отношении мышечной ткани (см. таблицу). Высота кислородного смещения потенциала после операции оставалась сниженной во всех точках измерения. Это свидетельствовало о том, что доставка кислорода тканям существенно не улучшилась и нарушения регионарного кровообращения сохранялись.

Сформулированное выше заключение было подтверждено результатами оксигенометрии закрытым электродом Кларка (прибор ТСМ-2 фирмы «Radiometer»), рН-метрии крови на аппа-

рате АВЛ-3 той же фирмы и определения скорости локального тканевого кровотока. Результаты последнего представлены в таблице.

Представленные клинические данные показывают конкретную вспомогательную роль редоксметрии в диагностике ишемического синдрома, в изучении его механизмов и объективной оценке эффективности проводимого лечения.

Практическая ценность методики регистрации потенциала платинового электрода, помимо названной, заключается в возможности изучения с ее помощью скорости кровотока. Методика регистрации скорости локального тканевого кровотока по клиренсу водорода с использованием полярографа подробно описана в литературе [15, 18]. В отличие от полярографической регистрации водорода потенциометрическое измерение более точно, так как не связано с расходом водорода на его окисление. Однако к поверхности платины здесь предъявляются более строгие требования.

Во время определения кровотока, как и при обычном редоксметрическом исследовании, на предплечье пациента через электролитическую прокладку накладывают электрод сравнения, измерительный электрод вводят в изучаемую ткань. Первоначально регистрируют исходный электродный потенциал, после чего пациент 1 раз вдыхает газообразный водород. С помощью самонисца, подключенного к рН-метру, регистрируют изменения потенциала в виде характерной кривой. По продолжительности периода полувыведения водорода определяют скорость локального тканевого кровотока по формуле:

$$X = \frac{69,3}{T_{1/2}} \text{ (мл/мин/100 г)}, \quad (4)$$

где X — величина тканевого кровотока на 100 г ткани; $T_{1/2}$ — период полувыведения водорода (в мин); 69,3 — постоянный коэффициент.

Теоретическое обоснование формулы приведено в работах [3, 15, 18, 20]. Определение скорости тканевого кровотока по клиренсу водорода в сравнении с радиоизотопными методами определения полувыведения расторов изотопов, инъецированных в ткани, технически проще и более доступно.

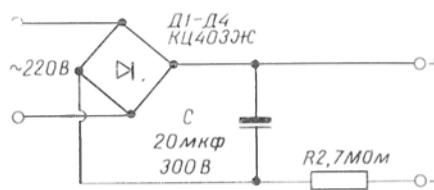


Рис. 1. Схема гальваностата для платинирования измерительных электродов.

Платиновый электрод-«донор» подключается к аноду (+), платинируемый измерительный — к катоду (—).

В условиях нарушенного кровообращения повышение чувствительности электрода к водороду достигается его дополнительной обработкой. Для этого два платиновых электрода помещают в среду для платинирования, которая представляет собой раствор платинохлористоводородной кислоты $\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10^{-3} М), приготовленной на фосфатном буферном растворе (рН 6,86) и 0,1 М растворе КСl. Измерительный электрод подключается к отрицательному полюсу гальваностата (рис. 1) и в ходе электролиза покрывается тонким слоем мелкодисперсной платины. При платинировании в представленном на рис. 2 гальваностате плотность тока составляет $10\text{—}20 \text{ мА} \cdot \text{см}^{-2}$, время 20 мин.

Измерительный электрод, обработанный по описанной выше методике, приобретает повышенную чувствительность к молекулярному водороду (рис. 2) и может быть использован при предельно малых величинах тканевого кровотока ($0,2\text{—}0,3$ мл/мин на 100 г ткани). После подготовки электрода его стерилизуют в пароформалиновой камере. Применение для стерилизации йода и других галлогенов в данном случае невозможно, так как платино-

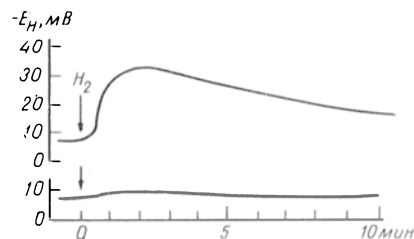


Рис. 2. Потенциометрические кривые клиренса водорода, зарегистрированные обычным (нижняя кривая) и «сенситизированным» к водороду (верхняя кривая) измерительными электродами.

вый электрод теряет чувствительность к водороду.

Необходимо отметить, что использование газообразного водорода требует соблюдения мер безопасности. Кроме того, вдыхание водорода приводит к кратковременной гипоксии, напряжение кислорода в коже предплечья у пациентов падает на 20—40 % от исходного. Хотя гипоксическая реакция продолжается не более 2 мин и не представляет опасности для больного, при отсутствии клинических показаний мы воздерживались от проведения такого исследования у больных со стенокардией покоя, выраженной сердечно-сосудистой и дыхательной недостаточностью.

Накопленный опыт прямых измерений электродного потенциала в тканях позволяет сделать вывод о полезности использования редоксметрии при изучении механизмов ишемического синдрома, а также при определении скорости локального тканевого кровотока по клиренсу водорода. Редоксметрия из-за сложности исследования, необходимости применения специальных электродов не может быть рекомендована для широкого применения в целях диагностики и решения повседневных задач практической медицины. Тем не менее в условиях специализированных отделений ее результаты приобретают решающее значение в выборе рациональной хирургической тактики и существенно дополняют данные комплексных медицинских и биологических исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агасян П. К., Николаева Е. Р. Теория и практика потенциометрии и потенциометрического титрования. — М., 1972.
2. Вюрмзер Р. Биологическое окисление и восстановление: Пер. с франц. — М., 1935.
3. Кисляков Ю. Я., Лучиков Ю. М., Смирнов Г. К. // Физиол. журн. СССР. — 1986. — Т. 72. — № 11. — С. 1509—1514.
4. Кузнецов В. А. // Метаболические механизмы гипербарической оксигенации. — Воронеж, 1980. — Вып. 3. — С. 158—159.
5. Леонов А. И. // Там же. — С. 161—168.
6. Михаэлис Л. Окислительно-восстановительные потенциалы и их физиологическое значение: Пер. с нем. — М., 1936.
7. Никольский Б. П., Пальчевский В. В. Оксидометрия. — Л., 1975.
8. Перегудов Н. Г., Владимиров В. Г., Юси-

- нов В. С. // Радиобиология. — 1972. — Т. 12. — № 4. — С. 599—603.
9. Серов В. И., Барсуков В. А. // Метаболические механизмы гипербарической оксигенации. — Воронеж, 1980. — Вып. 3. — С. 42—45.
10. Скулачев В. П. // Биохимия. — 1986. — Т. 51. — № 12. — С. 1925—1929.
11. Сумаруков Г. В. Окислительное равновесие и радиочувствительность организмов. — М., 1970.
12. Сумаруков Г. В., Кудряшов Ю. Б. // Мед. радиол. — 1963. — № 6. — С. 42—44.
13. Шаргородский Б. М., Расторгуев Б. П. // Биофизика. — 1965. — Т. 10. — № 4. — С. 652—654.
14. Шаргородский Б. М., Расторгуев Б. П., Райкина М. Е. // Там же. — 1967. — Т. 12. — № 1. — С. 114—119.
15. Шахнович А. Р., Бежанов В. Т., Милованова А. С. // Вopr. нейрохир. — 1970. — № 6. — С. 18—21.
16. Шульц М. И., Писаревский А. М., Полозова И. П. Окислительный потенциал: Теория и практика. — Л., 1984.
17. Эпштейн И. М. // Бюл. экспер. биол. — 1960. — № 12. — С. 104—107.
18. Aukland K., Bower B. F., Berliner R. W. // Circulat. Res. — 1964. — Vol. 14, № 2. — P. 164—187.
19. Cater D. B., Silver J. A. // Ives D. J. G., Janz V. G. J. Reference Electrodes. — New York, 1961. — P. 464—523.
20. Kety S. S. // Pharmacol. Rev. — 1951. — Vol. 3, N 1. — P. 1—41.

Поступила 07.04.88

REDOX-ESTIMATION PROCEDURES IN CLINICAL STUDIES. THEORY AND PRACTICE

G. G. Prokhorov, A. M. Pisarevsky, Yu. I. Nikolaev

S. M. Kirov Medical-Military Academy, State University, Leningrad

Direct estimation of redox-potential in human skin and muscles using platinum electrodes enables to carry out dynamic evaluations of redox-state in these tissues. A similar technique might be used for potentiometric measurement of the rate of local tissue circulation using hydrogen clearance. Increase in the electrodes sensitivity, required for studies of circulation severe impairments, was possible by means of additional platinum overlaying. Examination of patients with obliterating atherosclerosis showed a considerable decrease of redox-potential in ischemic zone; this impairment was partially reduced after surgical operation. The validity of alterations in electrode potential was supported by means of oxymetry, blood pH-metry and rates of tissue circulation measurements. Interpretation of the data obtained is limited due to requirements of obligatory functional loading and theoretical considerations. However, the procedure of electrode potential registration allowed to obtain an information essential for choice of suitable treatment course.