

Мониторинг быстрых вариаций содержания эндогенного CO в выдыхаемом воздухе методами диодной лазерной спектроскопии

© А.И. Дьяченко¹, Е.В. Степанов¹, Ю.А. Шулагин²

¹ Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН,
119991 Москва, Россия

² Институт медико-биологических проблем РАН,
119991 Москва, Россия

e-mail: eugenestepanov@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.12.2019 г.

В окончательной редакции 31.01.2020 г.

Принята к публикации 28.02.2020 г.

Для мониторинга быстрых физиологических вариаций содержания эндогенной монооксида углерода CO в выдыхаемом воздухе были применены методы диодной лазерной спектроскопии. Для этих целей был создан анализатор CO на базе перестраиваемого диодного лазера, излучающего в районе $2.35 \mu\text{m}$ при комнатной температуре. Для определения концентрации CO в выдыхаемом воздухе измерялась величина резонансного поглощения этой молекулой в линии $R(6)$ полосы 0–2, расположенной вблизи 4285 cm^{-1} . Использование этой линии, хорошо изолированной от близлежащих линий поглощения H_2O , позволяет обеспечить высокую селективность анализа CO в условиях высокой влажности анализируемого воздуха. Возможности мониторинга быстрых физиологических вариаций содержания CO в выдыхаемом воздухе человека и животных с помощью разработанной системы были продемонстрированы в исследованиях с применением ряда физиологических нагрузочных тестов, таких как дыхание чистым кислородом (как у человека, так и крыс), физическая нагрузка и гипервентиляция. Также наблюдалась динамика выделения CO, обусловленная применением некоторых фармацевтических препаратов. Показано, что лазерный анализ CO в спектральном диапазоне $2.35 \mu\text{m}$ позволяет детектировать в выдыхаемом воздухе быстрые динамические процессы выделения этой газообразной молекулы, являющейся одной из сигнальных молекул-метаболитов, при проведении различных физиологических и медицинских исследований, изучать закономерности и взаимосвязи процессов, отвечающих за продукцию, транспорт, буферирование и выделение CO в организме.

Ключевые слова: диодная лазерная спектроскопия, лазерный спектральный анализ, выдыхаемый воздух, эндогенная моноокись углерода, мониторинг состава выдыхаемого воздуха.

DOI: 10.21883/OS.2020.07.49579.71-20

1. Введение

Лазерные спектральные методы широко применяются для решения различных задач анализа газообразных молекул. В этом случае для детектирования достаточно легких молекулярных газов используются их спектры поглощения, имеющие колебательно-вращательную структуру и лежащие в ИК диапазоне. Одним из объектов анализа методами лазерной спектроскопии является выдыхаемый воздух [1–5]. Определение микросодержания выдыхаемого воздуха является достаточно сложной аналитической задачей, подчас более сложной, чем анализ атмосферного воздуха. Это обусловлено прежде всего низкими концентрациями в выдыхаемом воздухе газообразных молекул-метаболитов, которые образуются в организме и могут представлять интерес для каких-либо диагностических целей (на уровне относительных концентраций от 10^{-9} до 10^{-6}), высокой (близкой к 100%) относительной влажностью выдыхаемого воздуха и содержанием CO_2 , на 2 порядка превышающим атмосферное (более 3% вместо атмосферных $\sim 0.03\%$). Таким образом, применяемый для высокочувствительно-

го анализа выдыхаемого воздуха метод должен обладать определенной совокупностью характеристик: высокой концентрационной чувствительностью (порядка 1 ppb), высокой селективностью относительно паров воды, CO_2 и других составляющих выдыхаемого воздуха, содержание которых в выдыхаемом воздухе может быть сравнимо с содержанием исследуемой молекулы, достаточным быстродействием, возможностью работы в режиме непрерывного долговременного мониторинга, универсальностью при применении к различным молекулярным объектам.

В настоящее время для анализа микросостава выдыхаемого воздуха используются несколько инструментальных подходов, основанных на различных физико-химических принципах [1,6–12]. Среди них масс-спектрометрический анализ, электрохимические сенсоры, методы хемилюминесценции, а также методы спектрального анализа, включая лазерные. В числе достаточно чувствительных лазерных методов, которые могут быть использованы в анализе микросостава выдыхаемого воздуха, можно отметить фотоакустическую спектроскопию и спектроскопию с использованием затухания света в

резонансных кюветах (CRDS) [13–16]. С точки зрения сочетания таких характеристик как чувствительность, точность, селективность, скорость анализа и простота проведения анализа одним из наиболее перспективных является подход, основанный на спектральном анализе с использованием перестраиваемых диодных лазеров (ПДЛ) [17–23]. Именно он был использован нами для разработки системы, предназначенной для мониторинга быстрых по физиологическим меркам вариаций эндогенной окиси углерода (СО) в выдыхаемом воздухе.

2. Актуальность анализа эндогенного СО в выдыхаемом воздухе

Актуальность определения содержания эндогенного СО в выдыхаемом воздухе, а также разработок аналитических устройств, предназначенных для подобных измерений, обусловлена тем, что моноокись углерода является одним из эндогенных газообразных соединений, играющих значительную роль в жизнедеятельности организма [24–30]. Особенности процессов ее образования в организме и транспорта от тканей и органов в выдыхаемый воздух в настоящий момент недостаточно хорошо изучены, поэтому разработка методов использования эндогенного СО в качестве молекулы-биомаркера требует тщательных предварительных исследований.

В организме эндогенный СО образуется в результате ферментативно-управляемого катаболизма гемсодержащих соединений. Основная его продукция обусловлена гемолизом эритроцитарного гема и миоглобина в ходе эритропоза, направленного на устранение стареющих клеток крови [24–26]. Кроме того, некоторая доля эндогенного СО образуется при деградации цитохромов и ряда металлосодержащих ферментов, таких как каталаза, пероксидаза, триптофанпирролаза, гуанилатциклаза, NO-синтаза и других. Также возможно образование относительно малого количества СО негемовой природы за счет перекисного окисления липидов, фотоокисления, а также активности ксенобиотиков и некоторых бактерий. Результаты недавних биохимических исследований показывают, что СО в организме является не только конечным продуктом метаболических превращений упомянутых выше соединений, но и сигнальной молекулой (так называемым вторичным мессенджером), участвующей в механизме преобразования сигналов, регуляции клеточного метаболизма и в передаче информации [24–26].

Во избежание избыточного накопления СО интенсивно выводится из организма. Для этих целей, помимо диффузии, транспорта в растворенном состоянии и конвективного газообмена, используется специальный механизм обратимого связывания этих молекул гемсодержащими белковыми структурами (гемоглобин, миоглобин, цитоглобин, нейроглобин, цитохром *a3*), гемсодержащего кратковременного буферирования на них и транспорта по градиенту концентраций O_2 —

от клеток и тканей в легкие. Для выведения СО используется та же цепочка механизмов, с помощью которой осуществляется транспорт кислорода из легких и обеспечение дыхания клеток, только действующая в обратном направлении. В клетках СО может быть связан цитоглобином, нейроглобином или цитохромами *a3* (в митохондриях клеток). В тканях СО накапливается на миоглобине, а в крови — на гемоглобине. За счет потока кислорода, проникающего с кровью в ткани и клетки, между этими системами буферирования СО происходит постоянный обмен, так что молекулы СО постепенно продвигаются в направлении от клеток к легким. В легких СО диффундирует из крови в воздушное пространство легких и затем за счет вентиляции при дыхании выводится в атмосферу. На заключительном этапе пребывания эндогенного СО в крови, т.е. в альвеолярных капиллярах, темп его выделения в воздушное пространство легких находится в непосредственной зависимости от перфузии и эффективности доставки кислорода к альвеолярной мембране легких. Эта эффективность может меняться за счет вариации как газодинамических, так и диффузионных характеристик используемых дыхательных смесей.

Можно выделить несколько наиболее важных процессов, в которых эндогенный СО участвует в организме [24–26]. Во-первых, СО является вторичным мессенджером для нейромедиаторов и гормонов, поскольку активизирует работу фермента гуанилат-циклазы, участвующей в образовании циклического гуанизинмонофосфата. Последним определяется уровень кальция в клетке, от которого в конечном счете зависит активность протеин-киназ и некоторых биохимических процессов. Кроме того, СО участвует в механизме регуляции тонуса кровеносных сосудов и, возможно, влияет на внутриклеточные механизмы формирования долговременной памяти. Во-вторых, СО разделяет с O_2 общую систему транспорта и буферирования, что позволяет использовать его как маркер при исследовании механизмов и самого транспорта кислорода. В-третьих, существуют предположения, что СО выделяется при воспалительных процессах, и поэтому может быть использован как маркер работы антиоксидантной системы. Наконец, в-четвертых, основная функция молекул СО определяется их ролью в регуляции обновления клеток крови, т.е. СО может служить индикатором и маркером катаболизма.

Таким образом, для использования эндогенного СО в качестве биомаркера физиологических процессов существенным является то, что интенсивность выделения СО с выдыхаемым воздухом зависит от скорости продукции СО в организме, биохимических параметров среды в клетках и тканях организма и химического состава вдыхаемой газовой среды. Благодаря этому использование высокочувствительного, высокоточного и селективного мониторинга эндогенного СО в выдыхаемом воздухе актуально и перспективно для исследований:

– интенсивности метаболических, индуцированных и патологических процессов, связанных с образованием СО;

– диффузионных и конвективных процессов переноса кислорода в легких;

– эффективности процессов переноса кислорода кровью от легких к тканям, включая перфузию и тканевую микроциркуляцию;

– интенсивности основного обмена, образования и накопления кислых продуктов в условиях тканевой гипоксии и, возможно, ряда других процессов.

Особый интерес представляет мониторинг относительно быстрых вариаций содержания эндогенного СО в выдыхаемом воздухе. Быстрыми по меркам физиологии человека вариациями можно считать изменения параметров организма за времена, сопоставимые с временем одного полного оборота крови в организме, т.е. около 0.5–1 min. Быстрая динамика содержания СО может наблюдаться при проведении стандартных нагрузочных тестов, при исследовании функциональных способностей организма (например, измерении диффузионной способности легочной мембраны), занятиях на тренажерах, изменении химического состава вдыхаемой газовой смеси (например, в гипербарической физиологии), при введении и принятии перорально некоторых фармпрепаратов. Ранее для исследования таких динамических процессов нами была создана и испытана система, основанная на использовании ПДЛ среднего ИК диапазона, работающих в районе $4.7\ \mu\text{m}$ при криогенных температурах [31,32]. С ее помощью был проведен обширный круг исследований, направленных на изучение основных закономерностей выделения эндогенного СО с выдыхаемым воздухом в норме, при различных нагрузках и патологиях. Однако необходимость использования жидкого азота для охлаждения лазера и фотоприемников существенно ограничивала практическое применение разработанной аналитической методики.

Задача данного исследования состояла в демонстрации возможности применения перестраиваемых диодных лазеров, работающих в районе $2.35\ \mu\text{m}$ при комнатных температурах, для мониторинга эндогенного СО и, в том числе, быстрых физиологических вариаций его содержания в выдыхаемом воздухе. Для этих целей нами был проведен анализ колебательно-вращательных спектров поглощения СО, СО₂ и Н₂О вблизи $2.35\ \mu\text{m}$ там, где расположен первый обертоном основного колебания СО, и выбран аналитический участок спектра. Был разработан и создан лазерный анализатор СО в выдыхаемом воздухе, проведен ряд экспериментов с участием человека и малых лабораторных животных, в ходе которых наблюдались быстрые вариации содержания СО в выдыхаемом воздухе, обусловленные действием различных факторов.

3. Спектры поглощения выдыхаемого воздуха в районе $2.35\ \mu\text{m}$

Как было отмечено выше, одна из важных проблем, которую необходимо решить при разработке спектральных методов и средств анализа содержания микроколичеств эндогенного СО в выдыхаемом воздухе, связана с высоким содержанием в выдыхаемом воздухе СО₂ и паров воды. Содержание СО₂, являющегося основным газом-метаболитом, по сравнению с атмосферным воздухом увеличено в выдохе на два порядка (с 330 ppm до 3%), а содержание паров Н₂О — в несколько раз, поскольку выдыхаемый воздух представляет собой насыщенную парами воды газовую смесь. Содержание Н₂О в выдыхаемом воздухе может достигать до $\sim 5\%$. Таким образом, концентрации эндогенного СО в выдыхаемом воздухе, составляющие около 1 ppm, необходимо анализировать на фоне более чем в 10000 раз более высоких концентраций СО₂ и Н₂О. При этом в случае применения методов спектрального анализа высокого разрешения становится существенным то, что обе эти молекулы (СО₂ и Н₂О) обладают достаточно сложной структурой спектров поглощения, формируемой помимо основных колебательно-вращательных полос их обертонами, составными колебаниями и „горячими“ полосами. Спектры поглощения этих молекул охватывают практически весь ИК диапазон.

Применение спектральных методов, основанных на использовании лазерного излучения и обладающих высоким спектральным разрешением, позволяет тем не менее решить эту проблему за счет тщательного предварительного анализа спектров поглощения мешающих (интерферирующих) газов (СО₂ и Н₂О). Проблема выбора оптимального для анализа спектрального диапазона в условиях интерференции спектров поглощения различных молекулярных газов и методы ее решения были детально рассмотрены ранее в нашей работе [33]. Нами был проведен сравнительный анализ спектров поглощения СО₂ и Н₂О в различных спектральных областях, которые могут быть использованы для измерения концентраций эндогенного СО. Для этих целей было проведено моделирование спектров поглощения этих молекул с использованием базы данных по молекулярным ИК спектрам высокого разрешения HITRAN [34] и специализированных пакетов программного обеспечения.

На рис. 1,а показано относительное расположение основных полос поглощения СО, СО₂ и паров Н₂О в ИК диапазоне ($1800\text{--}7000\ \text{cm}^{-1}$). Видно, что полосы 0–1 и 0–2 СО попадают в области относительной прозрачности, т.е. туда, где поглощение СО₂ и Н₂О не слишком велико. Тем не менее полоса 0–1 интерферирует как с полосами СО₂, так и Н₂О. В области $4500\ \text{cm}^{-1}$, куда попадает полоса 0–2 СО, основное мешающее влияние будет оказывать поглощение паров Н₂О. Поглощение СО₂ тут практически отсутствует.

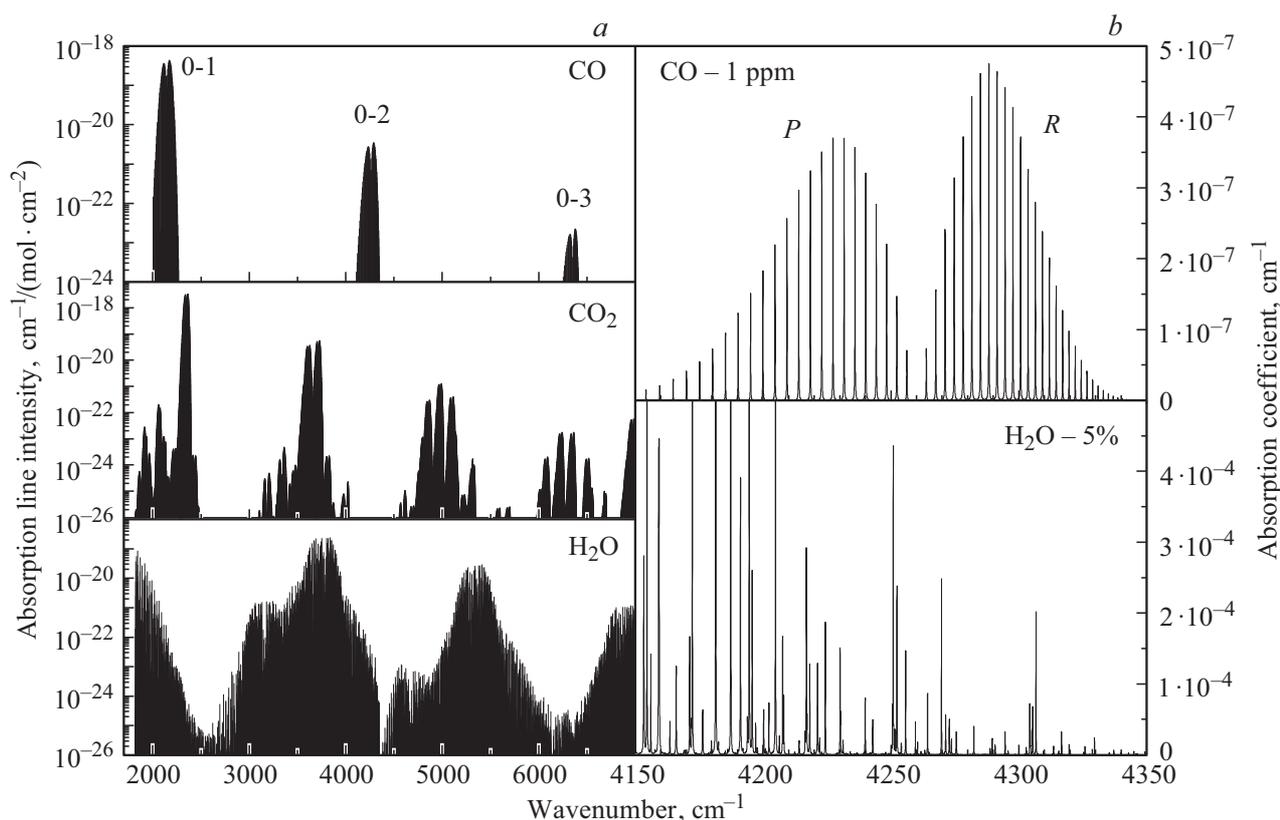


Рис. 1. Расположение наиболее интенсивных полос поглощения CO, CO₂ и H₂O в ИК диапазоне от 1800 до 7000 см⁻¹ (a). Спектры коэффициента поглощения полосы 0–2 CO и интерферирующей с ней полосы H₂O в спектральном диапазоне 4150–4350 см⁻¹ (b) в условиях, соответствующих составу выдыхаемого воздуха: суммарное давление — 760 mm Hg, относительное содержание CO — 1 ppm, H₂O — 5%, температура — 296 K.

Особо отметим, что в силу различной симметрии молекул CO и H₂O по-разному изменяется интенсивность линий поглощения при переходе от низких оптических частот к более высоким — относительная доля поглощения линий паров H₂O возрастает по сравнению с поглощением линиями CO [33]. Очевидно, что с точки зрения чувствительности детектирование CO в полосе 0–1, расположенной в районе 4.7 μm, предпочтительнее, так как здесь можно реализовать более высокую селективность анализа за счет более низкого относительного поглощения паров воды. С точки зрения влияния интерференции с другими газами спектральный диапазон 4280–4300 см⁻¹ (~ 2.35 μm) более сложен для детектирования CO, чем диапазон 2100–2130 см⁻¹ (4.7 μm). Однако область вблизи 2.35 μm привлекательна с точки зрения практического применения, так как перестраиваемые диодные лазеры и фотоприемники в этом спектральном диапазоне работают практически при комнатных температурах.

Для более тщательного анализа проблемы интерференции вблизи 2.35 μm и выбора подходящей аналитической линии CO были рассчитаны спектры коэффициентов поглощения CO и H₂O. Результаты расчетов в спектральном диапазоне 4150–4350 см⁻¹, там

где расположены линии P- и R-ветвей полосы 0–2 CO, представлены на рис. 1, b. Как видно, в этой спектральной области линии P-ветви полосы 0–2 CO наиболее подвержены влиянию интерференции с линиями поглощения паров H₂O. Кроме того, линии P-ветви имеют меньшую интенсивность. Поэтому на этом этапе предпочтение было отдано R-ветви полосы 0–2 CO. Для более точного выбора рабочих линий CO были проведены расчеты спектров поглощения вблизи его наиболее интенсивных линий поглощения.

На рис. 2, a приведены рассчитанные спектры пропускания CO и H₂O в диапазоне 4275–4283 см⁻¹, где расположено несколько линий R-ветви полосы 0–2 CO. Приведенные спектры были рассчитаны для условий, соответствующих выдыхаемому воздуху. Содержание рассматриваемых газов в выдыхаемом воздухе составляло: CO — 1 ppm, CO₂ — 3%, H₂O — 5%, остальное — атмосферный воздух. Температура — 296 K, длина оптического пути — 20 m. В этой области наблюдается очень сильная интерференция линий CO и H₂O, а поглощение CO₂ практически отсутствует, и потому не представлено на рисунке. Практически каждая из наблюдаемых линий CO расположена в непосредственной близости от

линий H_2O . Некоторые из них сильно перекрываются. Из рис. 2, *a* видно, что в *R*-ветви полосы 0–2 CO удовлетворительной для проведения анализа является только линия *R*(6), которая расположена вблизи гораздо более интенсивных линий поглощения H_2O . Величина резонансного поглощения CO в этой линии при концентрации 1 ppm и длине оптического пути 20 м составляет, как видно, около 0.05%. На рис. 2, *b* представлена первая производная спектра пропускания выдыхаемого воздуха, зарегистрированного с помощью перестраиваемого диодного лазера. Данный участок спектра далее использовался нами для анализа содержания эндогенного CO в выдыхаемом воздухе.

4. Лазерный анализатор эндогенного CO на основе ПДЛ

Для мониторинга быстрых вариаций содержания эндогенного CO в выдыхаемом воздухе нами был создан специальный анализатор, основанный на использовании ПДЛ. В этом анализаторе был использован ПДЛ с распределенной обратной связью, работающий при комнатных температурах вблизи $2.35 \mu\text{m}$ (Laser Components, Германия). Точная настройка оптической частоты лазера проводилась за счет изменения его температуры в диапазоне -10 – $+50^\circ\text{C}$ с помощью термоэлектрического охладителя. Для сканирования частоты использовался импульсно-периодический режим накачки ПДЛ. Частота повторения импульсов составляла 200–300 Hz, а длительность импульсов генерации — 3–4 ms. Для накачки лазера применялись импульсы тока с линейным нарастанием амплитуды, что позволяло линеаризовать скорость перестройки частоты в течение импульса. В таком режиме скорость перестройки лазера составляла $\sim 2 \text{ cm}^{-1}/\text{ms}$, а в течение импульса генерации лазер перестраивался на 5 – 8 cm^{-1} . Ширина линии генерации подобных лазеров составляет менее 10^{-4} cm^{-1} , что существенно меньше столкновительной ширины линии поглощения исследуемых молекулярных газов при нормальных условиях [32]. Средняя мощность лазерного излучения оценивалась величиной $\sim 0.5 \text{ mW}$. Средняя температура ПДЛ стабилизировалась с точностью $\sim 10^{-3} \text{ degree}$. Такая точность стабилизации температуры была возможна за счет близкого размещения миниатюрного лазерного кристалла и датчика температуры на термоэлектрическом охладителе внутри единого корпуса лазера. Для стабилизации температуры ПДЛ использовались цифровые методы регулирования. Формирование периодических импульсов тока накачки ПДЛ также осуществлялось с применением цифровых методов, что позволяло получить высокую воспроизводимость временных параметров ($\sim 10^{-8}$) и амплитудных характеристик ($\sim 10^{-6}$). Все это обеспечивало высокую воспроизводимость частотной перестройки ПДЛ (лучше 10^{-3} cm^{-1}), амплитуды его излуче-

ния (лучше 10^{-3}) и регистрируемых спектров пропускания.

На рис. 3 представлена оптическая схема лазерного анализатора. Она достаточно традиционна для подобных систем. Выходящий из лазерного кристалла луч фокусируется с помощью микрообъектива из двух асферических линз на вход многоходовой аналитической кюветы. С помощью делительного зеркала часть излучения направляется в референсный канал, содержащий короткую кювету с известным содержанием CO . Длина многоходовой кюветы, собранной по схеме Уайта, составляет $\sim 250 \text{ mm}$. При 82 проходах луча через кювету суммарная длина оптического пути составляет $\sim 20 \text{ m}$. После выхода из кюветы лазерное излучение фокусируется на охлаждаемые до -50°C фотоприемники типа InGaAs компании „Hamamatsu“. Внутренний объем многоходовой кюветы составляет $\sim 800 \text{ cm}^3$. Кювета снабжена патрубками для прокачки газа.

Работа спектрофотометра базируется на использовании специально разработанного нами программно-аппаратного комплекса [22,23], который состоит из 3 цифровых блоков: стабилизации температуры ПДЛ, накачки ПДЛ и регистрации спектров пропускания. Схема блока управления и регистрации основана на использовании программируемых логических матриц компании „Altera“ и быстродействующих высокоразрядных АЦП компании „Texas Instruments“. Частота оцифровки лазерного сигнала составляет 5 MHz, дискретность — 16 Bit. Этот блок обеспечивает одновременную и независимую регистрацию лазерных спектров в двух оптических каналах. Высокая скорость оцифровки сигнала и обмена данными между системой регистрации и управляющим компьютером, осуществляемого по протоколу USB 3.0, позволяет регистрировать с временным разрешением $0.2 \mu\text{s}$ без пропусков все лазерные импульсы и соответственно исследуемые спектры пропускания в двух регистрирующих каналах одновременно. С помощью программного обеспечения управляющего ПК, работающего под ОС WindowsXP/Vista/7/10, осуществляется визуализация терминала управления системой, управление комплексом, введение и установка параметров системы, выбор алгоритмов обработки спектральных данных, визуализация регистрируемых спектров в режиме реального времени и визуализация результатов обработки спектральных данных.

Спектральный анализ эндогенного CO в выдыхаемом воздухе осуществляется следующим образом. За счет перестройки частоты ПДЛ в течение каждого импульса сканируется предварительно выбранный участок спектра протяженностью $\sim 5 \text{ cm}^{-1}$, показанный на рис. 2, *b*, в который попадают линии поглощения CO . Частотная привязка спектра осуществляется по характерному спектру поглощения газовой смеси CO и H_2O , имеющему уникальное сочетание относительного расположения линий поглощения и их интенсивностей. Для повышения контрастности спектра поглощения и чувствительности измерения резонансного поглощения в аналитической

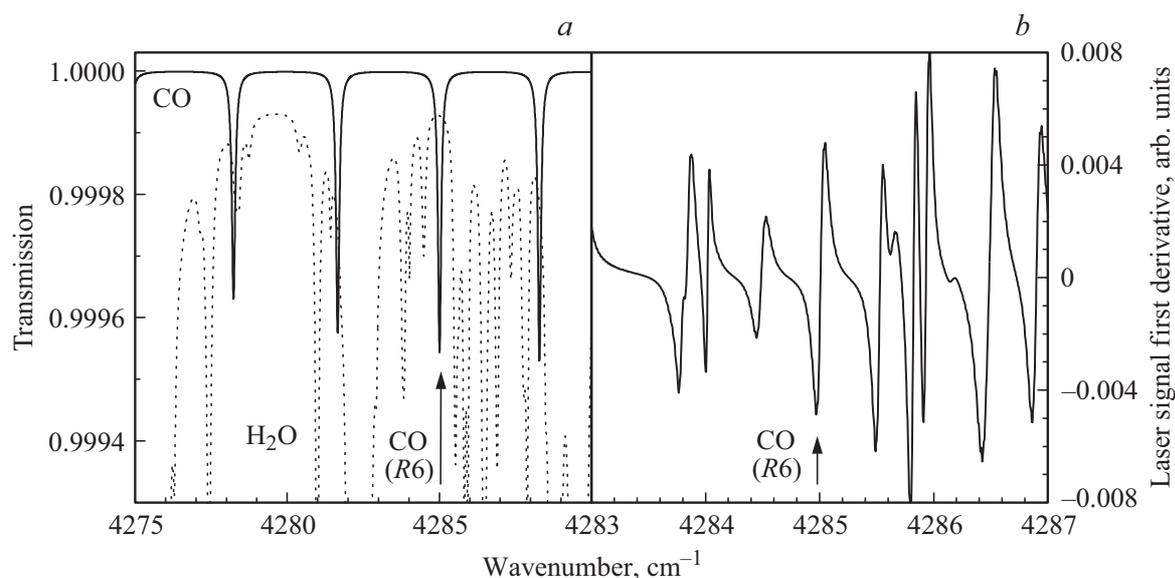


Рис. 2. Спектры пропускания CO и H₂O вблизи 4280 см⁻¹ (a), рассчитанные с использованием базы спектральных данных высокого разрешения HITRAN [34]: CO — сплошная линия, H₂O — штрихи. Первая производная лазерного спектра пропускания выдыхаемого воздуха в районе 4288 см⁻¹ (b). Стрелкой показана линия CO, использованная для проведения анализа содержания этого соединения в выдыхаемом воздухе.

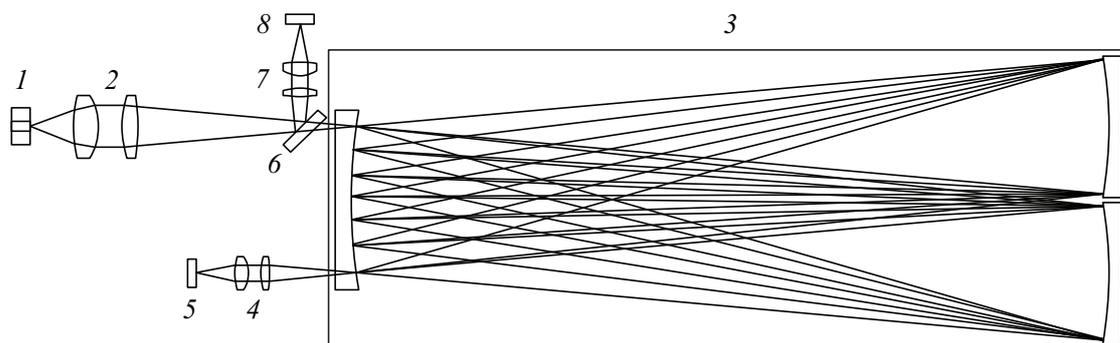


Рис. 3. Оптическая схема лазерного анализатора эндогенного СО в выдыхаемом воздухе. 1 — диодный лазер; 2 — микрообъектив формирования пучка; 3 — многоходовая кювета; 4 — приемный микрообъектив аналитического канала; 5 — фотоприемник аналитического канала; 6 — полупрозрачное поворотное зеркало; 7 — приемный микрообъектив референсного канала; 8 — фотоприемник референсного канала.

линии используется цифровое дифференцирование регистрируемого спектра пропускания, как показано на рис. 2, b. Кроме того, используется около 100 накоплений регистрируемых спектров пропускания, что дополнительно повышает отношение сигнал/шум при регистрации спектров. При частоте повторения лазерных импульсов ~ 100 Hz время измерения поглощения составит ~ 1 s, при этом отношение сигнал/шум лучше $5 \cdot 10^4$. Эта величина определяется в основном уровнем дробовых шумов предусилителя и фотоприемника. Дополнительное использование цифровой фильтрации этих случайных шумов, основанной на преобразовании Фурье, позволяет повысить отношение сигнал/шум ре-

гистрации резонансного поглощения на фоне случайных шумов до $\sim 2 \cdot 10^6$.

В регистрируемом лазерном спектре измеряется размах сигнала производной, соответствующий величине поглощения в линии R(6) CO. Измеряемая величина пропорциональна содержанию CO в анализируемом воздухе. Коэффициент пропорциональности устанавливается на основании сравнения с калибровочными смесями, а также на основании параметров линии, приводимых в базе данных HITRAN. Поскольку коэффициент поглощения в линии при измеряемых концентрациях CO существенно меньше 1, то размах производной с хорошей точностью линейно меняется с концентрацией анализируемого газа.

5. Мониторинг быстрых вариаций эндогенного СО

5.1. Порядок проведения анализа выдыхаемого воздуха

При проведении долговременного непрерывного мониторинга содержания эндогенного СО в выдохе испытуемые подключаются к специальной системе сбора выдыхаемого воздуха. Она состоит из буферной емкости с мягкими стенками, стандартной дыхательной клапанной коробки, разделяющей вдыхаемый и выдыхаемый воздух, нескольких патрубков с обратными клапанами и при необходимости системы подачи вдыхаемой газовой смеси. Система сбора выдыхаемого воздуха обеспечивает свободное дыхание испытуемого при проведении любых нагрузочных тестов и тестов с дыханием различными газовыми смесями. Выдыхаемый воздух из буферной емкости с помощью небольшой помпы непрерывно подается в многоходовую кювету лазерного анализатора. Скорость прокачки анализируемого воздуха через кювету подбирается в зависимости от глубины и частоты дыхания обследуемого и составляет от 1 до 5 л/мин. При исследовании содержания СО в выдохе малых животных (крыс) животное помещалось в специальную камеру объемом ~ 1.3 л, через которую продувалась дыхательная смесь. Скорость потока дыхательной смеси через камеру составляла ~ 3 л/мин, что приблизительно в 3 раза больше минутного дыхательного объема животных. Выходящий из камеры воздух напускался в многоходовую кювету лазерного анализатора. При необходимости дополнительно используется аппаратура для измерения скорости и объема дыхания испытуемого, что позволяет пересчитывать измеряемые значения концентрации СО в выдыхаемом воздухе в молярные объемы газа, выделяемого организмом за единицу времени.

5.2. Динамика эндогенного СО при дыхании чистым кислородом

Один из достаточно динамично-протекающих процессов выделения эндогенного СО с выдыхаемым воздухом наблюдается, как нами было ранее показано [31,32], при изменении содержания кислорода во вдыхаемом воздухе. С диагностической точки зрения представляет интерес динамика выделения СО с выдыхаемым воздухом как у человека, так и у лабораторных животных при ступенчатом изменении концентрации O_2 во вдыхаемом воздухе. В условиях гипероксии содержание O_2 во вдыхаемом воздухе может составлять до 100%, а при гипоксии (в экспериментах на лабораторных животных) понижаться до 6%. Разработанный лазерный анализатор был испытан нами применительно к диагностике таких процессов. Типичная динамика выделения СО с выдыхаемым воздухом, наблюдаемая при дыхании чистым кислородом у практически здоровых людей,

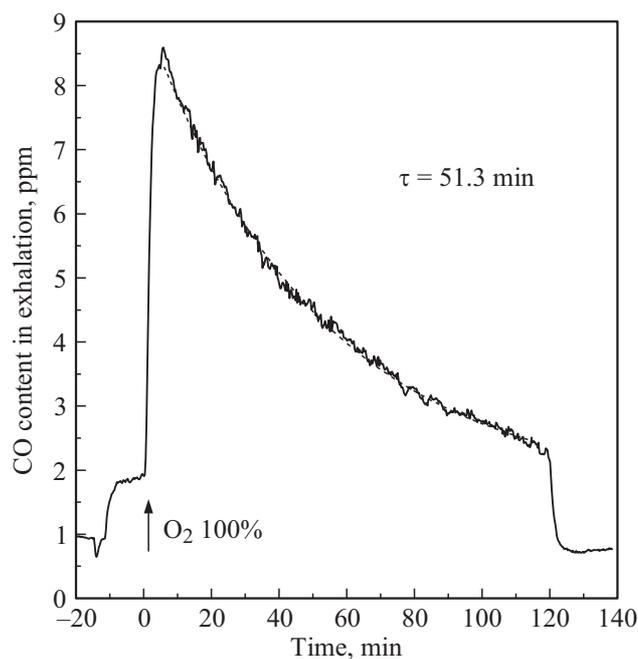


Рис. 4. Динамика выделения СО с выдыхаемым воздухом при ступенчатом повышении содержания кислорода во вдыхаемом воздухе от нормального (20.9%) до 100%. Штрихами показаны результаты модельного расчета. Постоянная времени экспоненциального снижения составляет 51.3 мин.

показана на рис. 4. Стрелкой отмечено начало дыхания гипероксической смесью, которое продолжалось в данном исследовании в течение ~ 120 мин. Как видно, при проведении данного исследования содержание СО в атмосферном воздухе было на уровне ~ 1 ppm, а эндогенная составляющая СО при дыхании атмосферным воздухом была ~ 0.9 ppm. Сразу после начала дыхания кислородом наблюдается резкое возрастание выделения СО, которое после достижения максимума сменяется экспоненциальным снижением. Специально отметим, что на представленной кривой хорошо различимы два типа шумов, с которыми приходится сталкиваться при проведении анализа. Высоочастотные помехи малой амплитуды обусловлены шумами собственно процесса спектрального анализа. Они дают ошибку измерений концентрации на уровне 0.01 ppm. Более интенсивные низкочастотные флуктуации сигнала обусловлены так называемыми „физиологическими шумами“, связанными с неравномерностью глубины и ритма дыхания испытуемого.

Кривая, регистрируемая при дыхании смесями, обогащенными кислородом, имеет два характерных параметра: максимальное значение содержания СО в выдыхаемом воздухе, достигаемое в самом начале дыхания кислородом, и постоянная времени процесса выведения эндогенного СО. Как было показано в [31,32], эти две величины связаны с очень важными физиологическими характеристиками организма. Амплитуда пика $P_{\text{пик}}^{\text{CO}}$ содержит информацию о вентиляционно-перфузионном

соотношении K , которое в свою очередь зависит от диффузионной способности легочной мембраны D_L :

$$P_{\text{pik}}^{\text{CO}} = \left(P_{\text{Av}}^{\text{EndoCO}} + P_{\text{Atm}}^{\text{CO}} \frac{P_B}{\dot{V}} \frac{1}{K} \right) \left(\frac{P_{\text{Art}}^{\text{O}_2(2)}}{P_{\text{Art}}^{\text{O}_2(1)}} - 1 \right).$$

Здесь $P_{\text{Av}}^{\text{EndoCO}}$ — усредненное по фазе выдоха парциальное давление эндогенного СО при нормальном дыхании атмосферным воздухом, $P_{\text{Atm}}^{\text{CO}}$ — парциальное давление СО в атмосферном воздухе, $P_{\text{Art}}^{\text{O}_2(a)}$ — парциальное давление кислорода в атмосферном воздухе, $P_{\text{Art}}^{\text{O}_2}$ — парциальное давление кислорода в гипероксической дыхательной смеси, P_B — барометрическое давление, $\dot{V}(t)$ — вентиляция легких. Из приведенной выше формулы вытекает выражение для вентиляционно-перфузионного соотношения:

$$K = \frac{P_B}{\dot{V}} \frac{P_{\text{Atm}}^{\text{CO}} \left(\frac{P_{\text{Art}}^{\text{O}_2(2)}}{P_{\text{Art}}^{\text{O}_2(1)}} - 1 \right)}{P_{\text{pik}}^{\text{CO}} - P_{\text{Av}}^{\text{EndoCO}} \left(\frac{P_{\text{Art}}^{\text{O}_2(2)}}{P_{\text{Art}}^{\text{O}_2(1)}} - 1 \right)}.$$

Поскольку по определению величина вентиляционно-перфузионного отношения K связана с коэффициентом диффузии легочной мембраны D_L соотношением

$$K(t) = \frac{S(t)P_B(t)}{\dot{V}(t)} + \frac{1}{D_L} \frac{N_A}{V_\mu},$$

где N_A — число Авогадро, V_μ — молярный объем, $S(t)$ — коэффициент разбавления альвеолярной фракции, принимающий в норме значения от 1.5 до 1.8, то это позволяет из экспериментальных данных получить значение величины диффузионной способности легочной мембраны D_L . В случае, представленном на рис. 4, значение D_L составило $\sim 30.2 \text{ ml/mm Hg} \cdot \text{min}$, а $K \sim 199 \text{ min} \cdot \text{mm Hg/l}$.

Постоянная времени процесса, наблюдаемого при дыхании чистым кислородом, пропорциональна общему количеству гемовых связей на гемоглобине $\langle Hb \rangle_{\text{Tot}}$ [31,32]

$$\tau_{\text{Hb}} = \frac{\langle Hb \rangle_{\text{Tot}} A_{\text{Hb}}^{\text{CO}}}{P_{\text{Art}}^{\text{O}_2(2)}} \frac{V_\mu}{N_A} K,$$

где $A_{\text{Hb}}^{\text{CO}}$ — относительное сродство СО к гемоглобину. Таким образом, при использовании данного подхода уровень гемоглобина в крови может быть определен неинвазивно. В приведенном на рис. 4 случае постоянная времени составила $\sim 51.3 \text{ min}$, что соответствует общему количеству гемоглобина в крови около $1.8 \cdot 10^{22}$. В норме различия в скорости релаксации могут достигать нескольких раз. Этот разброс может определяться как вариацией содержания гемоглобина в организме, так и различием вентиляторно-диффузионных характеристик респираторных систем испытуемых.

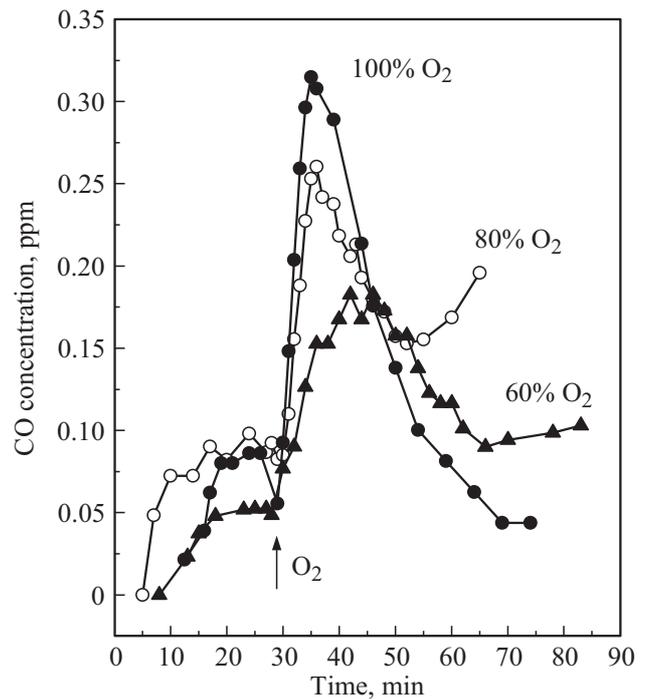


Рис. 5. Динамика содержания СО в выдыхаемом воздухе у крыс при ступенчатом увеличении концентрации кислорода во вдыхаемом воздухе для различных концентраций O_2 .

5.3. Динамика выделения эндогенного СО у крыс

Спектральный анализ может быть использован также для определения содержания эндогенного СО в выдыхаемом воздухе у крыс, несмотря на малый объем и скорость дыхания этих животных по сравнению с человеком. В одном из исследований разработанный лазерный анализатор был применен нами для определения содержания СО в выдыхаемом воздухе крыс при дыхании воздушными смесями с повышенным содержанием кислорода. На рис. 5 показана динамика выделения СО, получаемая при различном содержании кислорода во вдыхаемом воздухе, 60, 80 и 100%. Как видно, наблюдаемые вариации содержания СО имеют те же закономерности, что и для человека. При дыхании обычным воздухом и используемой скорости вентиляции кюветы с крысами концентрация СО в газовой среде кюветы находится на уровне $\sim 0.1 \text{ ppm}$. Это означает, что с учетом разбавления концентрация СО в выдыхаемом крысой воздухе составляет $\sim 0.3 \text{ ppm}$. Как и у человека, у крыс повышение содержания кислорода в газовой среде кюветы приводит к резкому увеличению выделения СО с выдыхаемым воздухом. При этом величина достигаемого максимума выделения СО $P_{\text{pik}}^{\text{CO}}$ и время релаксации зависят, как следует из приведенного выше соотношения, от концентрации кислорода во вдыхаемом воздухе, которой в свою очередь определяется содержание O_2 в артериальной крови. Описанный

выше подход позволяет исследовать зависимость эффективности транспорта кислорода в ткани организма от различных факторов, в том числе и от состава газовой смеси, используемой для дыхания. В частности, одной из актуальных задач такого рода является изучение влияния добавок в дыхательную газовую смесь химически инертных (благородных) газов, таких как He, Ar, Kr, которые могут изменять эффективность доставки кислорода к тканям. Использование данной технологии может быть продуктивно в гипербарической физиологии.

5.4. Влияние физической нагрузки

Влияние физической нагрузки на содержание CO в выдыхаемом воздухе человека обусловлено вариациями сразу нескольких параметров, определяющих газообмен, как во время самой физической нагрузки, так и в процессе релаксации. При этом наиболее значимыми для выделения CO с выдыхаемым воздухом являются такие параметры, как частота и глубина дыхания (вентиляция), частота сердечных сокращений, потребление кислорода, продукция CO₂ и других метаболических продуктов, например молочной кислоты, меняющих кислотно-основное состояние среды в тканях. Совокупность этих параметров и их зависимость от мощности и длительности нагрузки определяют достаточно сложную картину выделения CO с дыханием. Разработанная лазерная система была также использована нами для анализа основных закономерностей этого процесса. Были проведены в общей сложности десятки тестов с участием различных испытуемых при различных длительностях и интенсивностях физической нагрузки.

На рис. 6, а представлена типичная динамика выделения CO с дыханием у человека при коротких физических нагрузках. В данном случае длительность нагрузки составляла 1 min, а мощность 175 W. На рисунке представлены кривые для четырех здоровых испытуемых, что позволяет судить о возможной вариабельности наблюдаемого процесса. В частности, на представленных кривых хорошо видны „физиологические шумы“. Кривые, полученные для каждого испытуемого и представленные на рис. 6, а, были предварительно нормированы на величину концентрации эндогенного CO в покое до проведения теста.

Видно, что непосредственно во время физической нагрузки наблюдается снижение концентрации CO в выдыхаемом воздухе относительно нормы. Оно связано с усилением вентиляции легких и более интенсивным разбавлением выдыхаемого воздуха атмосферным. Сразу после окончания физической нагрузки наблюдается рост концентрации CO в выдыхаемом воздухе, причем при достаточно высоких уровнях нагрузки содержание CO заметно превышает нормальный уровень. При мощности ~ 175 W это превышение в точке максимума может

составлять более 25%. Его причиной является совокупность нескольких факторов. Во-первых, происходит постепенная нормализация вентиляции легких, т.е. уменьшается разбавление выдыхаемого воздуха. Кроме того, сразу после физической нагрузки обычно увеличивается потребление кислорода. Во-вторых, при достаточно высокой нагрузке наблюдается не только интенсивное выделение CO₂, но и продукция молочной кислоты. Оба эти вещества приводят к закислению среды в мышечных тканях, что способствует увеличенному высвобождению молекул кислорода гемоглобином в тканях и, таким образом, более интенсивному вытеснению кислородом молекул CO, связанных миоглобином.

Как видно на рис. 6, а, повышенные концентрации CO в выдыхаемом воздухе сохраняются в течение 10–12 min после окончания нагрузки. Далее, уже в нормальном спокойном состоянии вновь наблюдается снижение уровня CO в выдыхаемом воздухе, которое на этот раз обусловлено опустошением систем буферирования эндогенного CO в организме во время физической нагрузки и релаксации. Продуцируемое в это время в организме CO идет на восстановление равновесных концентраций миоглобина и гемоглобина, связанных CO. Отметим, что при кратковременной физической нагрузке низкой мощности (порядка 100 W) эти процессы не наблюдаются, что можно объяснить достаточной сбалансированностью в этих условиях процессов транспорта и потребления O₂, а также продукции и выделения CO₂, что предотвращает накопление CO₂ и других кислых продуктов в организме.

Приведенная выше трактовка получаемых экспериментальных кривых может быть поддержана как данными по измерению pH артериализованной крови, представленными в нижней части, рис. 6, б, так и результатами измерения лактата (молочной кислоты) в артериализованной крови, рис. 6, а. Уровень pH артериализованной крови, отбираемой из пальца испытуемого, а также концентрация в ней лактата измерялись нами в ходе ряда тестов с помощью традиционных биохимических методов. Видно, что росту концентрации CO в выдыхаемом воздухе, наблюдаемому сразу после физической нагрузки, соответствует уменьшение pH (закисление) крови с уровня 7.44 до 7.31. Скорость выделения CO с выдыхаемым воздухом также сильно коррелирует с уровнем лактата. Из рис. 6, а видно, что сразу после завершения физической нагрузки наблюдаются максимальные уровни как выделения CO, так и концентрации лактата в крови до значений ~ 7.0 mmol/l. Далее в течение ~ 15 min следует медленное снижение уровней как CO, так и лактата. Это также позволяет связать интенсивность выделения CO с выдыхаемым воздухом с закислением среды в мышечных тканях различными продуктами метаболических процессов, включая молочную кислоту. Данные результаты могут быть использованы для неинвазивной диагностики состояния спортсменов, контроля тренировочного процесса и уровня выносливости в спортивной медицине.

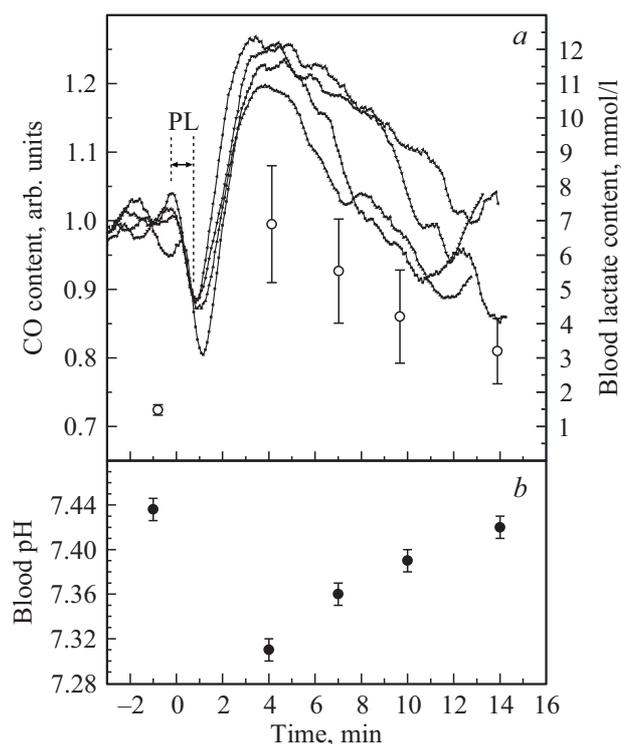


Рис. 6. Динамика содержания эндогенного СО в выдыхаемом воздухе для четырех испытуемых, обусловленная физической нагрузкой (PL) мощностью 175 W и длительностью 1 min, и типичные вариации значений pH капиллярной (артериализованной) крови (●) и концентрации лактата в крови (○) при выполнении данного теста.

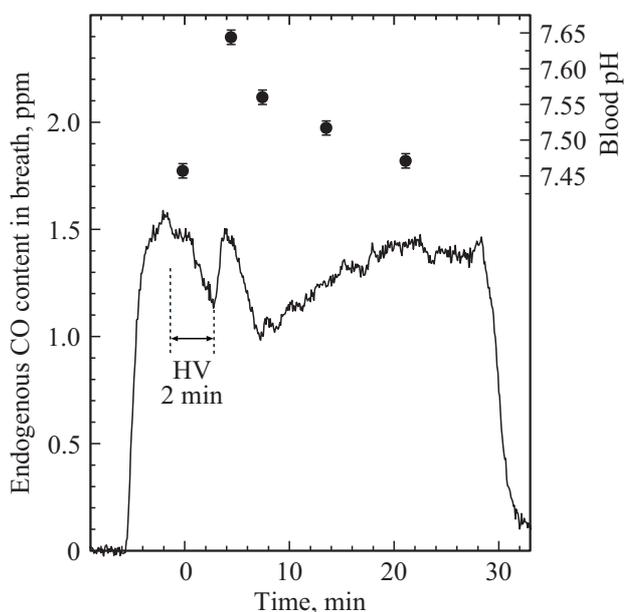


Рис. 7. Динамика содержания эндогенного СО в выдыхаемом воздухе и значений pH артериализованной крови (●) в ходе гипервентиляции (HV) интенсивностью 54 l/min и длительностью 2 min.

5.5. Влияние гипервентиляции

Гипервентиляция также характеризуется достаточно сложной картиной выделения эндогенного СО с дыханием. В этом случае важными факторами, влияющими на уровень СО в выдыхаемом воздухе, являются увеличенное разбавление выдыхаемого воздуха атмосферным, повышение концентрации кислорода в альвеолах легких и артериальной крови и более интенсивное выведение CO_2 из организма.

На рис. 7 представлена типичная динамика концентрации СО в выдыхаемом воздухе человека, наблюдаемая при гипервентиляции длительностью 2 min и глубиной 54 l/min. Как видно, в покое (до гипервентиляции) уровень эндогенного СО в выдыхаемом воздухе составлял 1.5 ppm. Как и при физической нагрузке, непосредственно во время гипервентиляции наблюдается снижение концентрации СО в выдыхаемом воздухе, связанное с более интенсивным разбавлением выдыхаемого воздуха. После ее окончания наблюдается кратковременное нарастание уровня СО. В некоторых случаях (не показано на рис. 7) максимальное значение концентрации СО, достигаемое сразу после окончания вентиляции, может даже превышать уровень, наблюдаемый в покое. Это обусловлено тем, что в этот момент за счет более интенсивной вентиляции легких концентрация кислорода в альвеолярном воздухе и артериальной крови превышает нормальный уровень, т.е. наблюдается эффект, описанные выше в разд. 5.2. Далее наблюдается достаточно резкое уменьшение концентрации СО в выдыхаемом воздухе до значений ~ 1.0 ppm. Оно связано с тем, что за счет гипервентиляции резко снижается концентрация CO_2 , растворенного в крови, и организму требуется некоторое время, чтобы восстановить нормальный уровень за счет продукции CO_2 . Снижение концентрации CO_2 приводит к защелачиванию среды в тканях организма и менее интенсивной отдаче кислорода гемоглобином в тканевых капиллярах. В результате этого более интенсивно начинает расходоваться кислород, запасаемый на миоглобине. Это приводит к образованию дополнительных вакансий на миоглобинном буфере, которые заполняются эндогенным СО. Вследствие этого количество СО, переносимого эритроцитами крови в легкие и выделяемого с выдыхаемым воздухом, уменьшается. По мере восстановления нормальной равновесной концентрации CO_2 в тканях и крови восстанавливается и нормальный уровень СО в выдыхаемом воздухе.

Как видно из рис. 7, минимальное выделение СО наблюдается через 3–5 min после окончания гипервентиляции, а последующая релаксация содержания СО к нормальному уровню занимает 15–20 min. Отметим также, что степень снижения уровня СО в выдыхаемом воздухе, а также характерные времена достижения минимума и возвращения к нормальному уровню зависят от интенсивности гипервентиляции [31,32]. В верхней части рис. 7 приведена динамика pH артериализованной крови, отбираемой в ходе гипервентиляционного теста, которая

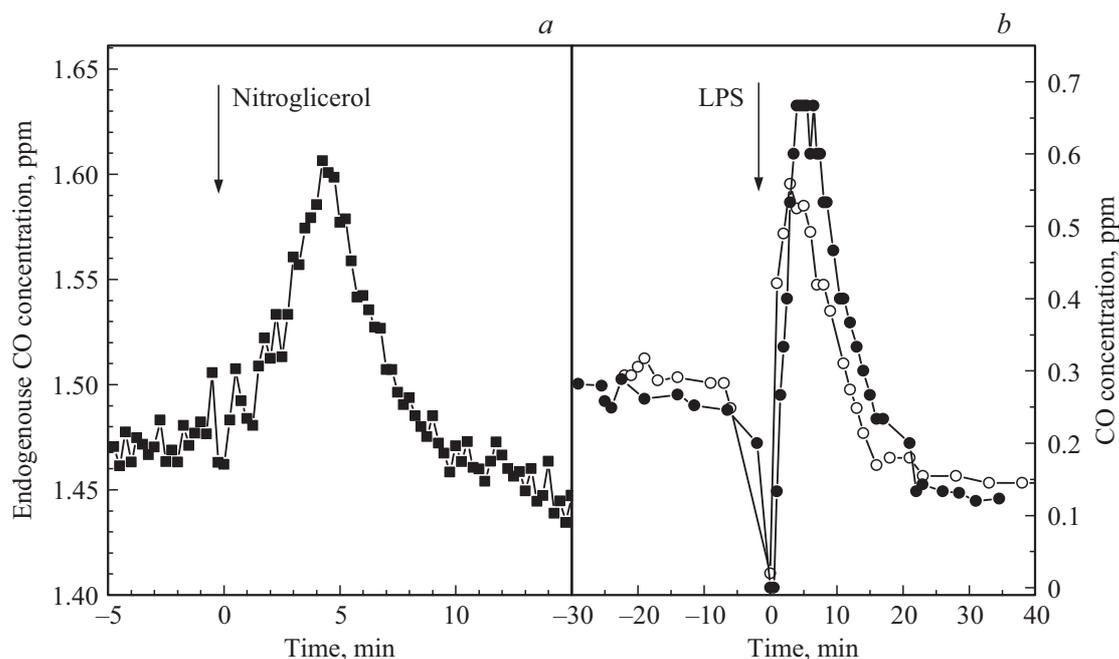


Рис. 8. Динамика выделения CO с выдыхаемым воздухом после приема нитроглицерина у человека (а). Динамика выделения CO с выдыхаемым воздухом у крыс при введении липополисахарида (ЛПС) (b).

подтверждает приведенную выше интерпретацию данных по выделению CO. Видно, в частности, что интенсивная гипервентиляция приводит к одновременному значительному снижению уровня CO в выдыхаемом воздухе и существенному (более 0.2) сдвигу кислотно-основного состояния (КОС) в щелочную сторону.

Сопоставление кривых, представленных на рис. 6 и 7, показывает, что динамические физиологические нагрузки, сопровождающиеся кратковременными и обратимыми изменениями КОС среды в организме, приводят также и к вариациям уровня CO в выдыхаемом воздухе. При этом повышение значений pH (защелачивание) среды вызывает снижение выделения CO, а понижение pH (закисление) приводит к более интенсивному выделению CO. Чем сильнее изменяется КОС, тем значительнее отклонения скорости выделения CO от нормальных значений. Таким образом, эндогенное CO может быть использовано в качестве индикатора слабых обратимых физиологических вариаций кислотно-основного состояния в организме, вызываемых различными причинами, а высокочувствительный лазерный анализ CO в выдыхаемом воздухе может быть применен для неинвазивного мониторинга этого жизненно важного параметра.

5.6. Влияние некоторых препаратов на динамику выделения CO с выдыхаемым воздухом

Благодаря взаимодействию миоглобинного и гемоглобинного буферов CO в организме, которое детально

рассмотрено нами в работах [31,32], прием фармацевтических препаратов, которые оказывают влияние на эффективность доставки кислорода в ткани, может также приводить к изменению концентрации CO в выдыхаемом воздухе. Как показывают проведенные нами исследования, эти процессы также могут изучаться средствами лазерного спектрального анализа. На рис. 8, а представлена динамика содержания CO в выдыхаемом воздухе человека, обусловленная пероральным приемом нитроглицерина. В частности, видно, что через несколько минут после приема нитроглицерина наблюдается повышение скорости выделения эндогенного CO. Концентрация CO в выдыхаемом воздухе поднимается от значения ~ 1.47 ppm до ~ 1.6 ppm. Подъем сменяется релаксацией к нормальному значению, происходящей в течение ~ 20 min. Такая динамика может быть связана с расширением тканевых капилляров и улучшением кровообращения в них, происходящем при приеме нитроглицерина. Последнее приводит к увеличению потока кислорода в расширенных капиллярах и более интенсивному выносу из них накопленного CO.

На рис. 8, b показано влияние подкожной инъекции липополисахарида (ЛПС) у крыс ($400 \mu\text{g}$ на 0.5 ml водного раствора) на уровень выделения эндогенного CO. Как известно, это вещество вызывает острую воспалительную реакцию и оксидативный стресс. Видно, что до введения ЛПС уровень эндогенного CO в выдыхаемом воздухе крыс составлял ~ 0.3 ppm. Сразу после инъекции наблюдается более чем двукратное увеличение содержания CO в выдыхаемом воздухе, а после 15 min релаксации устанавливается более низкий постоянный уровень со-

держания СО ~ 0.15 ppm. Последнее свидетельствует о том, что инъекция ЛПС вызывает резкое опустошение гемоглобинного буфера СО.

6. Выводы

Для мониторинга содержания эндогенной монооксида углерода в выдыхаемом воздухе был создан анализатор СО на основе ПДЛ, излучающего в районе $2.35 \mu\text{m}$ при комнатной температуре. Для измерения концентрации СО в выдыхаемом воздухе измерялась величина резонансного поглощения этой молекулой в линии $R(6)$ полосы 0–2, расположенной вблизи 4285 cm^{-1} . Использование этой линии, хорошо изолированной от близлежащих линий поглощения H_2O , позволяет обеспечить высокую селективность анализа СО в условиях высокой влажности анализируемого воздуха.

Аналитические возможности разработанного спектрального прибора были продемонстрированы в применении к мониторингу быстрых физиологических вариаций содержания СО в выдыхаемом воздухе человека и лабораторных животных при проведении различных физиологических нагрузочных тестов. Продемонстрирована динамика содержания СО при дыхании чистым кислородом (как у человека, так и у крыс) под действием дозированной физической нагрузки и гипервентиляции.

Также наблюдалась динамика выделения СО, обусловленная приемом некоторых препаратов. Показано, что лазерный спектральный анализ СО в выдыхаемом воздухе в районе $2.35 \mu\text{m}$ позволяет исследовать выделение этой газообразной молекулы, являющейся одной из сигнальных молекул-метаболитов, при проведении различных физиологических и медицинских исследований, изучать закономерности и взаимосвязи процессов, отвечающих за продукцию, транспорт, буферирование и выделение СО в организме.

Финансирование работы

Работа выполнялась в рамках программы исследований, запланированных в Институте общей физики им. А.М. Прохорова РАН.

Соблюдение этических норм

Данное исследование с участием добровольцев и лабораторных животных было одобрено биоэтическим комитетом Института медико-биологических проблем РАН.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] Stepanov E.V. // Phys Wave Phen. 2007. V. 15. N 3. P. 149–181. doi 10.3103/S1541308X0703003X
- [2] Wang Ch., Sahay P. // Sensors. 2009. V. 9. N 10. P. 8230–8262. doi 10.3390/s91008230
- [3] Shorter J.H., Nelson D.D., McManus J.B., Zahniser M.S., Sama S.R., Milton D.K. // J. Breath Res. 2011. V. 5. N 3. 037108. doi 10.1088/1752-7155/5/3/037108
- [4] Stacewicz T., Bielecki Z., Wojtas J., Magryta P., Mikolajczyk J., Szabra D. // Opto-Electron. Rev. 2016. V. 24. P. 82–94. doi 10.1515/oere-2016-0011
- [5] Wojtas J., Bielecki Z., Stacewicz T., Mikolajczyk J., Nowakowski M. // Opto-Electron. Rev. 2012. V. 20. P. 26–39. doi 10.2478/s11772-012-0011-4
- [6] Di Francesco F., Fuoco R., Trivella M.G., Ceccarini A. // Microchem. J. 2005. V. 79. N 1–2. P. 405–410. doi 10.1016/j.microc.2004.10.008
- [7] Cao W., Duan Y. // Clinical Chem. 2006. V. 52. N 5. P. 800–811. doi 10.1373/clinchem.2005.063545
- [8] Ventrillard-Courtillot I., Gonthiez T., Clerici C., Romanini D. // J. Biomed. Opt. 2009. V. 14. N 6. 064026. doi 10.1117/1.3269677
- [9] Risby T.H., Tittel F.K. // Opt. Eng. 2010. V. 49. N 11. 111123. doi 10.1117/1.3498768
- [10] Kim K.-H., Jahan S.A., Kabir E. // Trends in Analytical Chem. 2012. V. 33. P. 1–8. doi 10.1016/j.trac.2011.09.013
- [11] Amann A., Miekisch W., Schubert J., Buszewski B., Ligor T., Jezierski T., Pleil J., Risby T. // Ann. Rev. Analytical Chem. 2014. V. 7. P. 455–482. doi 10.1146/annurev-anchem-071213-020043
- [12] Lourenço C., Turner C. // Metabolites. 2014. V. 4. P. 465. doi 10.3390/metabo4020465
- [13] Zalicki P., Zare R.N. // The J. Chem. Phys. 1995. V. 102. N 7. P. 2708–2717. doi 10.1063/1.468647
- [14] Berden G., Peeters R., Meijer G. // Intern. Rev. in Phys. Chem. 2000. V. 19. N 4. P. 565–607. doi 10.1080/014423500750040627
- [15] Bijnen F.G.C., Harren F.J.M., Hackestein J.H.P., Reuss J. // Appl. Opt. 1996. V. 35. P. 5357–5368.
- [16] Zuckermann H., Harren F.J.M., Reuss J., Parker D.H. // Plant. Physiol. 1997. V. 113. P. 925–932.
- [17] Stepanov E.V., Milyaev V.A., Selivanov Yu.G. // Physics-Uspekhi. 2000. V. 43. P. 417. doi 10.1070/PU2000v043n04ABEH000720
- [18] Stepanov E.V., Milyaev V.A. // Quantum Electron. 2002. V. 32. N 11. P. 987. doi 10.1070/QE2002v032n11ABEH002333
- [19] Bingi V.N., Stepanov E.V., Chuchalin A.G., Milyaev V.A., Moskalenko K.L., Shulagin Yu.A., Yangurazova L.R. // Trudy Inst. Obshch. Fiz., Ross. Akad. Nauk. 2005. V. 61. P. 189–210.

- [20] Wang Ch., Sahay P. // *Sensors*. 2009. V. 9. N 10. P. 8230–8262. doi 10.3390/s91008230
- [21] Henderson B., Khodabakhsh A., Metsälä M., Ventrillard I., Schmidt F.M., Romanini D., Ritchie G.A.D., Hekkert S., Briot R., Risby T., Marczin N., Harren F.J.M., Cristescu S.M. // *Appl. Phys. B*. 2018. V. 124. P. 161. doi 10.1007/s00340-018-7030-x
- [22] Ivashkin V.T., Kasoev S.G., Stepanov E.V. // *Opt. Spectrosc.* 2019. V. 126. N 6. P. 710–720. doi 10.1134/S0030400X19060109
- [23] Stepanov E.V., Kasoev S.G. // *Opt. Spectrosc.* 2019. V. 126. N 6. P. 736–744. doi 10.1134/S0030400X19060249
- [24] Piantadosi C.A. // *Antioxid Redox Signal*. 2002. V. 4. P. 59–270. doi 10.1089/152308602753666316
- [25] Ryter S.W., Otterbein L.E. // *Bioessays*. 2004. V. 26. P. 270–280. doi 10.1002/bies.20005
- [26] Kaczorowski D.J., Zuckerbraun B.S. // *Curr. Med. Chem.* 2007. V. 14. P. 2720–2725. doi 10.2174/092986707782023181
- [27] D'Amico G., Lam F., Hagen T., Moncada S. // *J. Cell. Sci.* 2006. V. 119. P. 2291–2298. doi 10.1242/jcs.02914
- [28] Almeida A.S., Figueiredo-Pereira C., Vieira H.L.A. // *Front. Physiol.* 2015. doi 10.3389/fphys.2015.00033
- [29] Motterlini R., Clark J.E., Foresti R., Sarathchandra P., Mann B.E., Green C.J. // *Circ. Res.* 2002. V. 90. P. E17–E24. doi 10.1161/hh0202.104530
- [30] Bilban M., Haschemi A., Wegiel B., Chin B.Y., Wagner O., Otterbein L.E. // *J. Mol. Med.* 2008. V. 6. P. 267–279. doi 10.1007/s00109-007-0276-0
- [31] Shulagin U.A., Stepanov E.V., Chuchalin A.G., Babarskov E.V., Diachenko A.I., Pavlov B.N. // *Trudy Inst. Obshch. Fiz., Ross. Akad. Nauk.* 2005. V. 61. P. 135–188.
- [32] Степанов Е.В. Диодная лазерная спектроскопия и анализ молекул-биомаркеров, М.: ФИЗМАТЛИТ, 2009. 416 с.
- [33] Stepanov E.V. // *Physics of Wave Phenomena*. 2007. V. 15. N 4. P. 241–262. doi 10.3103/S1541308X07040036
- [34] Rothman L.S., Jacquemart D., Barbe A., Chris B.D., Birk M., Brown L.R., Carleer M.R., Chackerian C., Chance Jr.K., Dana V., Devi V.M., Flaud J.-M., Gamache R.R., Goldman A., Hartmann J.-M., Jucks K.W., Maki A.G., Mandin J.-Y., Massie S.T., Orphal J., Perrin A., Rinsland C.P., Smith M.A.H., Tennyson J., Tolchenov R.N., Toth R.A., Vander A.J., Varanasi P., Wagner G. // *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer*. 2005. V. 96. N 2. P. 139. doi 10.1016/j.jqsrt.2004.10.008