

Arbeidsforskningsinstituttene

Arbeidsfysiologisk institutt - Arbeidspsykologisk institutt - Muskelfysiologisk institutt
Yrkeshygienisk institutt

Kontoradresse: Gydas vei 8, tlf. 02/46 68 50
Postadresse: P.b. 8149 Dep Oslo 1

Tittel: Endringer i venøs kaliumkonsentrasjon under arbeid,
målt med intravasale elektroder

Forfatter(e): Jostein Hallén

Prosjektansvarlig: Ole M. Sejersted

Prosjektmedarbeidere:

Arbeidsfysiologisk seksjon,

Utgiver (institutt): Forskningsenteret AMY

Hovudfagsoppgåve i Biologi

Dato: 8/9-87

Antall sider:

79

ISSN:

0800-3777

Serie:

HD 967/87 FOU

Sammendrag:

Det blei laga elektroder for måling av kaliumkonsentrasjonen i lårvena. Kaliumkonsentrasjonen blei målt under sykling ved ulike belastningar.

Resultatene viser at det skjer store og raske endringar i kaliumkonsentrasjonen under og etter arbeid, og at kontinuerleg måling er nødvendig for å plukke opp desse.

Stikkord: Kaliumelektroder

Lårvena

Sykling

Plasma kaliumkonsentrasjon

Key words:

Potassium-electrodes

Vena-femoralis

Bicycling

Plasma potassium concentration

Arbeidsforskningsinstituttene

Arbeidsfysiologisk institutt - Arbeidspsykologisk institutt - Muskelfysiologisk institutt
Yrkeshygienisk institutt

Kontoradresse: Gydas vei 8, tlf. 02/46 68 50
Postadresse: P.b. 8149 Dep Oslo 1

Tittel: Endringer i venøs kaliumkonsentrasjon under arbeid,
målt med intravasale elektroder

Forfatter(e): Jostein Hallén

Prosjektansvarlig: Ole M. Sejersted

Prosjektmedarbeidere:

Arbeidsfysiologisk seksjon,

Utgiver (institutt): Forskningsenteret AMY

Hovudfagsoppgåve i Biologi

Dato: 8/9-87

Antall sider:

79

ISSN:

0800-3777

Serie:

HD 967/87 FOU

Sammendrag:

Det blei laga elektroder for måling av kaliumkonsentrasjonen i lårvena. Kaliumkonsentrasjonen blei målt under sykling ved ulike belastningar.

Resultatene viser at det skjer store og raske endringar i kaliumkonsentrasjonen under og etter arbeid, og at kontinuerleg måling er nødvendig for å plukke opp desse.

Stikkord: Kaliumelektroder

Lårvena

Sykling

Plasma kaliumkonsentrasjon

Key words:

Potassium-electrodes

Vena-femoralis

Bicycling

Plasma potassium concentration

<u>Kapittel</u>	<u>Side</u>
fors. METODE	
2.2 Forsøksmodell	29
2.2.1 Forsøkspersonar	29
2.2.2 Undersøkingar før forsøksdagen	29
2.2.3 Forsøket	31
2.2.4 Etter forsøket	32
2.3 Fysiologiske metodar	32
2.4 Statistiske metodar	33
3. RESULTAT	34
3.1 Elektrodane	34
3.1.1 Konstruksjon	34
3.1.2 Signalet	35
3.2 Endringer i $[K^+]_v$	39
3.2.1 Initiell fase	39
3.2.2 Etter knekkpunktet	39
3.2.3 Etter arbeidsslutt	43
4. DISKUSJON	44
4.1 Elektrodane	44
4.1.1 Kalibrering	44
4.1.2 Selektivitet og tidskonstant	45
4.1.3 Drift	46
4.1.4 Blodprøvar og etterjustering	46
4.1.5 Oscillering	46
4.1.6 Bruk av elektroden	48

<u>Kapittel</u>	<u>Side</u>
fors. DISKUSJON	
4.2 Måling i blodbana	48
4.2.1 Ekvilibrering mellom interstitiet og blod	48
4.2.2 Forseinking	50
4.2.3 Fortynning	51
4.2.4 Oppsummering	52
4.3 Endringer i $[K^+]$ i lårvena under og etter arb	52
4.3.1 Starten på arbeidet	52
4.3.1.1 AP-avhengig kaliumeffluks	53
4.3.1.2 Reguleringsmekanismene	55
4.3.1.3 T-tubuli systemet (TT)	58
4.3.1.4 Andre mekanismer	59
4.3.1.5 Oppsummering	59
4.3.2 Etter knekkpunktet	60
4.3.2.1 Depolarisert av cellemembran endrer AP	60
4.3.2.2 Regulering etter knekkpunktet	60
4.3.2.3 Oppsummering	62
4.3.3 Etter arbeidsslutt	63
4.4 Oppsummering og konklusjonar	64
4.4.1 Problemstilling og metode	64
4.4.2 Konklusjoner	65
LITTERATURLISTE	66

O. SAMANDRAG

Tidlegare undersøkingar har vist at muskelarbeid fører til auka ekstracellulær kaliumkonsentrasjon. P.g.a. at kalium er svært viktig for membranpotensialet, kan det tenkjast at endringar i kaliumkonsentrasjonen kan vere årsak til muskeltrøtthet. Sidan muskeltrøtthet er nær knytt til arbeidsbelastning, ønskte eg å svare på følgjande problemstilling: Korleis blir kaliumkonsentrasjonen i muskel regulert under arbeid ved ulike arbeidsbelastningar?

Sidan endringar i kaliumkonsentrasjonen skjer svært raskt under og etter arbeid, var det ønskeleg å måle konsentrasjonen kontinuerleg. Vidare problemstilling blei difor: Er det muleg å måle kaliumkonsentrasjonen kontinuerleg i lårvena under sykling, og gir dette noko ekstra bidrag til løysing av problemstillinga nemd ovanfor?

Eg konstruerte elektrodar til bruk intravasalt. Elektroden er eit polyvinyklorid (PVC) kateter med ein PVC-valinomysin membran i eine enden som berre er permeabel for kalium. Elektroden blei sett inn i lårvena ved Seldinger teknikk. Eit ytre kateter fungerte som referanse-elektrode, men blei og brukt til å trekke blodprøvar frå. Forsøkspersonane kunne utan problem sykle med elektrodene montert.

Fire forsøkspersonar gjennomførte tilsaman ni forsøk med inntil fire ulike belastningar pr.forsøk. Arbeidsbelastningane var mellom 40% og 140% av det maksimale oksygenopptaket.

Frå ein utgangsverdi på 4.02 ± 0.15 mM var det ingen endring i kaliumkonsentrasjonen dei første 6 - 8 s av arbeidet. Dei neste 8 - 11 s auka konsentrasjonen til-

nærma rettlina med $60 - 140 \mu\text{M s}^{-1}$ avhengig av arbeidsbelastninga. Auken var raskast ved dei høgaste arbeidsbelastningane og samanhengen mellom belastninga og auken var rettlina.

Etter, denne første initielle auken avtok stigninga. Ved arbeidsbelastningar under 100% av det maksimale oksygenopptaket, nådde kaliumkonsentrasjonen først ein topp før den stabiliserte seg på ein verdi mindre enn toppunktet. Konsentrasjonen var då frå $4.54 \pm 0.01 \text{ mM}$ til $5.63 \pm 0.09 \text{ mM}$ (middel \pm SEM). Ved arbeidsbelastningar like over 100% (<120%), forsette konsentrasjonen å stige inntil arbeidsslutt, men nådde ein nesten stabil verdi på $6.63 \pm 0.13 \text{ mM}$. Den stabile eller nesten stabile sluttkonsentrasjonen ved arbeidsbelastningar under 120% av det maksimale oksygenopptaket auka med aukande belastning, og samanhengen var eksponentiell.

Ved den høgaste arbeidsbelastninga sykla forsøkspersonen til utmatting i ca 70 s. Kaliumkonsentrasjonen auka til nærma rettlina også etter den første stigninga med $38 \pm 3 \mu\text{M s}^{-1}$. Sluttkonsentrasjonen var $7.19 \pm 0.15 \text{ mM}$.

Forsøka viser at sjølv ved lette arbeidssbelastningar (<40% av det maksimale oksygenopptaket) aukar kaliumkonsentrasjonen i blod raskt og blir over kvileverdi inntil arbeidet stoppar. Ved arbeid over 100% av det maksimale oksygenopptaket er effluksen større enn tilbakepumpingsmekanismane sin maksimale kapasitet (under desse vilkåra), slik at konsentrasjonen aukar gjennom heile arbeidet.

Kontinuerleg måling av kaliumkonsentrasjonen med elektrode er eit naudsynt hjelpemiddel i kartlegging av kaliumbalansen i muskel. Metoden gir nøyaktige resultat, og er enkel i bruk.

1. INNLEIING

Muskelcella si evne til å kontrahere seg gjer muskelen ansvarleg for det mest karakteristiske fenomen i dyre-riket: Rørsler. Muskelen og kontraksjonsmekanismen er av dei mest studerte fenomen innan anatomi og fysiologi. Emilo Veratti, som var ein anerkjent muskelanatom skreiv i 1902: "Det er gjort hundrevis av studiar på muskel opp gjennom åra både av anatomar og fysiologar. Desse studiane representerer generasjonar sin målbevisste søking etter løysinga på eit stort problem innan biologi. Men enno er vi langt frå å nå målet."

Sidan dette blei skrive for 85 år sidan, er det gjort hundrevis av nye studiar på muskel, og spesielt dei siste tiåra er det gjort nye viktige funn. Likevel kan ein trekke den same konklusjonen i dag som Veratti gjorde: Det er langt igjen til vi kjenner muskelen sin virkemåte i detalj. Mesteparten av den forståinga vi har av muskelen bygger på teoriar og ikkje på provde fakta. I 30 år har til dømes Kryssbru-teorien vore den dominerande for sjølve kontraksjonsmekanismen. Likevel blir det framleis publisert arbeid som går mot denne teorien.

1.1 Muskeltrøtthet

Dei viktigaste spørsmåla knytt til muskelen er spørsmåla kring trøtthet. Når ein muskel ikkje klarer å oppretthalde eller utvikle same kraftproduksjonen over tid, blir dette definert som muskeltrøtthet. Årsaka eller årsakene til muskeltrøtthet er langt frå klarlagt. Her finn vi ikkje ein gong nokon leiande teoriar. Det er imidlertid brei semje om at det fins fleire typar muskeltrøtthet (Edwards, 1981).

Alle detaljane kring ein muskelkontraksjon er ikkje

Innleiing

kjend, men ein kjenner systema som er involvert og at muskeltrøtthet kan oppstå på ulike steg. Utanom sjølv kontraksjonsmekanismen er det to andre viktige "system", eitt som styrer kontraksjonen, dei eksitatoriske/aktiverande prosessane, og eitt som forsyner kontraksjonsmekanismen med energi, metabolismen. Trøtthet kan vere at dei metabolske prosessane ikkje klarer å produsere nok ATP, eller at dei elektriske prosessane ikkje klarer å oppretthalde eit tilstrekkelegt høgt Ca-nivå i cytosol. Begrensningar knytt til sjølv kontraksjonsmekanismen kan vere som foreslått av Hermansen (1981) at lav intracellulær pH p.g.a. mjølkesyreakkumulasjon kan påverke bindinga av Ca^+ til troponin og senke kraftutviklinga.

Sjølv om ein under in vitro studiar klarer å isolere ein enkelt faktor som årsak til funksjons-nedsetting under spesielle vilkår, er det viktig å vere klar over den nære samanhengen det er mellom dei forskjellige prosessane in vivo. Både for kvar muskelcelle og for heile muskelen er det nær samanheng mellom dei eksitatoriske/aktiverande prosessane og energimetabolismen (Edwards, 1981). Det vil seie at begrensningar i det eine systemet kan påverke det andre og på den måten forårsake muskeltrøtthet. Dette kan illustrerast ved dei aktive pumpe-mekanismane i membranane i muskelcella. Dei er avhengige av metabolsk energi og det er bl.a. vist at Na/K-pumpa i kvile står for 6 - 10% av ATP-forbruket i muskelcella (Chinet, 1984). Under arbeid vil det totale behovet vera større. Ein situasjon der produksjon av ATP ikkje strekk til vil kunne føre til redusert evne til å regulere kalium og natrium over cellemembranen som igjen kan føre til nedsett eksitabilitet (sjå nedanfor). Begrensningane i reguleringa av desse ionene kan sjølvsgt også inn-treffe ved at pumpene når sin maksimale kapasitet, sjølv om ATP-produksjonen er tilstrekkeleg.

1.2 Kaliumbalanse og muskeltrøtthet

Membranpotensialet er avhengig av elektrolyttkonsentrasjonane inne i og rundt cella, og i kvile er forskjellen i kaliumkonsentrasjonen ($[K^+]$) over cellemembranen den viktigaste (Hodgkin og Horowicz, 1959). Ufullstendig regulering av kalium vil føre til auka ekstracellulær og minka intracellulær konsentrasjon. Konsekvensen av det er ein kontinuerleg depolarisert membran.

Om muskelcellemembranen plutselig blir depolarisert, vil det aktivere Na-kanalar og dermed auke natrium influks og starte eit aksjonspotensial (AP) (Hodgkin og Huxley, 1952). Desse kanalane blir altså aktivert av ei depolarisering, men Hodgkin og Huxley viste også at Na-kanalane blei inaktive om depolariseringa vedvarte. Inaktive Na-kanalar vil blokkere for AP. Na-kanalane kan vera komplett inaktiv ved 20-30 mV depolarisering (Sjøgaard, 1986).

Dette betyr at begrensningar i reguleringa av kalium kan føre til nedsett membranpotensial og at denne depolariseringa kan medføre redusert eksitabilitet. Dette vil føre til nedsett muskelkraft sidan eksitering av cellemembranen er naudsynt for å aktivere det kontraktile apparat. Manglande evne til å aktivere det kontraktile apparatet vil redusere kravet for ATP. Det er blitt foreslått av Nassar-Gentina og medarb. (1978) og Kugelberg og Lindegren (1979) at dette kan vera ein sikringsmekanisme som hindrar at muskelen skal "gå i rigor" på grunn av ATP-tømming. Er dette tilfelle, kan det gjere det vanskeleg å skilje mellom metabolske og elektriske årsaker til trøtthet. Det kan også forklare kvifor det ikkje er påvist nokon større reduksjon i ATP konsentrasjonen, sjølv i situasjonar der det var fullstendig manglande evne til å kontrahere muskelen (Dawson og medarb., 1978; Knuttgen og Saltin, 1972).

1.3 Måling av ekstracellulær $[K^+]$ in vivo

In vitro studiane tyder på at elektrolyttendringar i muskelen kan føre til muskeltrøtthet. Men kan det skje store endringar i t.d. $[K^+]$ in vivo? Fenn (1936) viste at det totale kaliuminnhaldet i muskelen blei redusert i samband med muskelarbeid. Seinare studiar viser at muskelarbeid fører til auka $[K^+]$ i blod (Costill og Saltin, 1975; Hermansen og medarb., 1984; Hnik og medarb., 1972; Kjellmer, 1965; Lind og medarb., 1966; Medbø og Sejersted, 1985) og at denne auka $[K^+]$ skuldast utslepp frå muskelen (Sjøgaard og Saltin, 1982; Vøllestad og Sejersted, 1985). Det er også målt auka interstitiell $[K^+]$ under muskelaktivitet hjå katt og kanin (Gebert, 1972; Hnik og medarb., 1976; Hirche, 1980) og hjå menneske (Vyskocil og medarb., 1983).

1.4 Arsak til auka $[K^+]$ i blod

Kva er årsaken til den auka $[K^+]$ i blod? Forsøka nemd ovanfor viste at kaliumet kjem frå muskel. Fenn (1936) meinte at dette skjedde under eksitering av muskelcellemembranen og at kalium "fossa" ut av cella på grunn av den store konsentrasjonsforskjellen. På den tida var Bernstein (1902) sin teori om membranpotensial og eksitering den aksepterte. Denne gjekk ut på at membranen i kvile berre var permeabel for kalium og at membranpotensialet såleis berre var bestemt av $[K^+]$ inne i og utanfor cella. Under eit AP braut membranen saman og ionene kunne strøyme fritt etter sin konsentrasjonsgradient. Ut frå dette var Fenn si forklaring svært naturleg. På same tid - i 1935, starta "Den klassiske biofysiske perioden" (Hille, 1984). Ein teknikk som gjorde det muleg å sette elektrodar inn i store nerveceller (spesielt frå blekksprut) gjorde Cole og Curtis i USA og Hodgkin og Huxley i England i stand til å registrere membranpotensialet. Ein annan nødvendig teknikk i desse studiane var "spennings-kontroll teknikken"

Innleiing

(Hille, 1984). Denne perioden enda opp med Hodgkin og Huxley (1952) sitt klassiske arbeid som beskriv AP som ein kontrollert straum meir enn eit kaotisk samanbrot. Tidlegare hadde Goldmann (1942) skildra membranpotensialet som eit "samansett" potensial; sjølv om kaliumpermeabiliteten var dominerande, var membranen i tillegg permeabel for andre ion. Det var Hodgkin (1951) som først forslo slik det er kjent idag, at depolariseringsfasen under eit AP skuldast at membranen blir meir permeabel for natrium og at den straumen ein måler er ein influks av natrium. På same måte er hyperpolariseringsfasen ein effluks av kalium.

Aktivering av muskelen vil altså føre til ein auka effluks av kalium. Dette vil kunne vere årsak til den auka konsentrasjonen som er blitt målt ekstracellulært under og like etter muskelarbeid. Utrekningar på dette skal eg kome tilbake til i diskusjonen. Det er også blitt foreslått at kalium blei bytt ut med hydrogen p.g.a. produksjon av mjølkesyre og at dette skulle vera årsak til auka ekstracellulær $[K^+]$. Det er imidlertid blitt vist at kalium og mjølkesyre i blod har eit svært ulikt konsentrasjonsforløp under og etter tredemølleløping (Hermansen og medarb., 1984). Det viser at i alle fall ved denne typen arbeid er K^+ og H^+ uavhengige av kvarandre.

Kalium er i visse vev ein aktiv volumregulator (Gilles, 1983; Hoffmann, 1977; Tosteon og Hoffmann, 1960). Sidan ein observerer volumendringar i muskel under arbeid (Sjøgaard og medarb., 1985), kunne kaliumeffluksen skuldast at kalium var volumregulerande også i muskel under arbeid. Den manglande samanhengen med H^+ styrkjer ikkje denne hypotesen.

1.5 Styring av kaliumflukser over cellemembranen

Uansett kva for ein overordna faktor som styrer kaliumforflyttingar over cellemembranen, kan dette berre skje på tre måtar. Kalium kan (1) bli driven av den elektrokjemiske drivkrafta for kalium (summen av krafta som skuldast konsentrasjonsforskjellar og krafta som skuldast det elektriske feltet), (2) bli dreven av den elektrokjemiske drivkrafta til eit anna ion gjennom såkalla utvekslingsmekanismer, (3) eller bli transportert aktivt ved forbruk av metabolsk energi (ATP).

1.5.1 Elektrokjemiske drivkrefter

Forutsett at membranen er permeabel for kalium vil kalium diffundere ut av cella om membranpotensialet er mindre negativt enn kalium sitt likevektspotensial (utrekna frå Nernst likning), og inn i cella om membranpotensialet er meir negativt.

Det er ofte antatt at det ekstracellulære og det intracellulære miljøet er i Donnan likevekt. Det vil seie at når $[K^+]_e$, $[Cl^-]_e$, $[K^+]_i$ og $[Cl^-]_i$ er respektive kalium- og kloridkonsentrasjonen i interstitiet (e) og intracellulært (i) har vi at:

$$[K^+]_e/[K^+]_i = [Cl^-]_i/[Cl^-]_e$$

sidan cellemembranen i kvile stort sett berre er permeabel for kalium og klorid. Det betyr at likevektspotensiala for dei to iona er like og at membranpotensialet er nær dette. D.v.s. at uansett forholdet mellom permeabilitetane vil det i kvile normalt ikkje finnast elektrokjemiske krefter på kalium eller kun små slike krefter. I tilfelle små krefter vil desse verka utover sidan dei andre iona som kan ha betydning for membranpotensialet vil gjere dette mindre negativt.

Innleiing

Ved å endre permeabiliteten for kalium kan ein endre på storleiken på kaliumfluksen over membranen, men retnin- gen på denne passive diffusjonen kan kun endrast ved å endre forholdet mellom membranpotensialet og kalium sitt likevektspotensial. Under eit AP endrar membranpoten- sialet seg dramatisk (depolarisering), og drivkrafta for kalium blir betydeleg. Når permeabiliteten aukar "fos- sar" kalium ut av cella.

Aukar $[K^+]$ på utsida av cella frå 4 til 5 mM, vil kalium sitt likevektspotensial vere mindre negativt enn klorid sitt. Dette kan skje trass i Donnan-likevekta om auken i $[K^+]$ skjer så raskt at klorid ikkje får tid til å følgje på, m.a.o. at likevekt ikkje har inntreft. Om til dømes kalium-auken skuldast repeterte AP, har den gjenom- snittlege permeabiliteten for kalium vore større enn klorid sin i det same tidsromet, og dermed har kalium- fluksen vore størst. Kvilemembranpotensialet vil då, ved høg permeabilitet for klorid, vera meir negativt enn kalium sitt likevektspotensial. Dermed vil den elektro- kjemiske drivkrafta for kalium verke innover. Denne ef- fekten blir sjølvstørrer ved mindre konsentrasjons- forskjellar for kalium over membranen og ved høgare permeabilitet for klorid. Eg kjenner ikkje til om ein slik mekanisme er aktiv in vivo, men ein kan tenkja seg at dette kan vera viktig i det transversale tubuli systemet (sjå diskusjon).

1.5.2 Utvekslingsmekanismer

At eit ion flyttar seg med den elektrokjemiske driv- krafta, er isolert sett tap eller rettare forbruk av potensiell energi. Dette forbruket kan nyttast til å utføre eit arbeid, til dømes flytta eit anna ion mot si elektrokjemiske drivkraft. Dette blir nytta i såkalla utvekslingsmekanismer. Det er ikkje isolert nokon meka- nisme i cellemembranen der det elektrokjemiske poten- sialet for kalium er drivkrafta. Dette kan skuldast at

Innleiing

membranpotensialet for det meste er nær kalium sitt likevektspotensial og dermed at nytten av ein slik utvekslings-mekanisme er liten. Utvekslings-mekanismer vil søkje å utlikna elektrokjemiske forskjellar over membranen. For å oppretthalda/gjennoppretta dei elektrokjemiske forskjellane må cella til sist forbruka metabolske energi.

1.5.3 Aktiv transport

Som ein ser ovanfor, er det teoretisk muleg for kalium å gå både ut og inn av cella utan direkte forbruk av metabolsk energi. Dette er ikkje tilfelle for natrium. For natrium verkar både den kjemiske og den elektriske drivkrafta innover, slik at det må store og ufysiologiske konsentrasjonsendringar til for å snu desse.

Sjølv om det er isolert utvekslingsmekanismer for natrium, er det klart at dei har avgrensa kapasitet, fordi den store elektrokjemiske krafta som verkar på natrium vil kreve mykje potensiell energi. Hodgkin (1951) konkluderte med følgjande: "Det er nødvendig å anta at natrium kontinuerleg blir pumpa ut av eksiterbare celler av ein prosess som er avhengig av metabolismen." Denne "prosessen" blei seinare isolert og identifisert som ein ATPase og blei kalla Na/K-ATPasen eller Na/K-pumpa fordi den transporterte både natrium og kalium (Skou, 1957). Under fysiologiske vilkår pumpar den tre natrium ut av cella og to kalium inn for kvart ATP forbrukt. Det er i dag klart at eksiterbare celler si evne til å regulere desse iona er heilt avhengig av denne pumpa. Dessutan er kalsium sin store konsentrasjonsforskjell over celle-membranen avhengig av natrium sin konsentrasjonsforskjell over membranen via ein utvekslingsmekanisme mellom natrium og kalsium. Andre prosessar er avhengig av kalsium sin konsentrasjonsforskjell. Dette viser for det første kor samansett ionemønsteret i nerve og muskel er, og for det andre kor viktig Na/K-pumpa er, ikkje berre

for natrium og kalium, men for konsentrasjonsforholda i muskelen generelt.

1.6 Kaliumbalansen og arbeidsbelastning

Dei metabolske prosessane under arbeid er mykje studert. Energikravet aukar rettlinja med aukande arbeidsbelastning, og begrensingar vil inntre når energikravet nærmar seg individets maksimale evne til å produsere ATP. Det er derimot ikkje klarlagt korleis dei ulike elektrolyttane blir regulert ved ulike arbeidsbelastningar. Det ville vera spesielt viktig å kartleggje reguleringa av kalium sidan $[K^+]$ har så stor betydning for membranpotensialet.

Som før nemd er det fleire som har vist at $[K^+]$ i blod aukar under muskelarbeid. Det er også vist at auken er størst ved dei største arbeidsbelastningane (Sjøgaard, 1986; Vøllastad og Sejersted, 1985). Forholdet mellom arbeidsbelastning og auken av $[K^+]$ er imidlertid ikkje nærare klarlagt.

1.7 Kontinuerleg måling av $[K^+]$

Endringar i $[K^+]$ skjer svært raskt i samband med muskelarbeid. For å kunne studere desse endringane med tilstrekkeleg oppløysing, er det naudsynt med kontinuerleg registrering. Det er tidlegare gjort målingar med elektrode i blodbana på anestiserte forsøksdyr (Lim og medarb., 1982; Hnik og medarb., 1973) og i muskel på dyr (Gebert, 1972; Hnik og medarb., 1976; Hirche og medarb., 1980) og menneske (Vyskocil og medarb., 1983). Linton og medarb. (1984) har dessutan målt på menneske med ein elektrode som låg i eit kammer utanfor forsøkspersonen der blodet frå ei katetrisert arterie kontinuerleg rann gjennom.

Kaliumkonsentrasjonen i muskel på menneske er kun målt av Vyskocil og medarb. (1983). Dette var gjort ved statiske kontraksjonar med ein glasselektrode. Det er fleire metodiske problem ved måling i muskel. Det største problemet er faren for mekanisk å øydeleggje celler som dermed vil lekke kalium. Dette vil kunne tolkast som kaliumutslepp.

Vyskocil og medarb. (1985) har seinare ikkje klart å gjenta forsøka på menneske.

1.8 Problemstilling

Ønskje om å kartlegge korleis kalium blir regulert under arbeid ved ulike arbeidsbelastningar var bakgrunnen for å starte på dette arbeidet. Eg ville måle under dynamisk arbeid på sykkelergometer. Grunnen er at sykkel er mykje brukt i samband med metabolske studiar. Vidare var det målt elektrolyttar under sykling ved instituttet tidlegare (Vøllestad og Sejersted, 1985), og sidan oppgava mi også er ein metodestudie ville det kunne vera nyttig å ha bakgrunn for eventuelle samanlikningar. Det var lite håp om å etablere ein metode for måling i muskel, og eg valde difor å arbeide med ein elektrode for måling i vene like etter muskelen. Ingen av metodane nytta i dei tidlegare arbeida kunne overførast direkte til dette føremålet. Måling i lårvena i lysken sette andre krav til utforminga av både sjølvvelektroden, referansesystemet og forsterkarutstyret.

Med bakgrunn i dette blei problemstillinga til denne oppgava:

Innleiing

1. Korleis blir $[K^+]_i$ i muskel regulert under arbeid ved ulike arbeidsbelastningar.

2. Er det muleg å måle $[K^+]_i$ kontinuerleg i lårvena under sykling, og gir dette noko ekstra bidrag til løysing av problem 1.

Resultata frå oppgava mi er i samhøve med problemstillinga todelt, knytt til elektroden og dei fysiologiske målingane. Resultat- og diskusjonskapitlet er difor delt i to knytt til kvar si problemstilling.

Eg ønskjer å gå vidare med dette arbeidet, og denne oppgava er såleis ein start i bruk av denne målemetoden til belysing av ioneregulering under arbeid.

2. METODE

Eg laga elektrodar for måling av kaliumkonsentrasjonen ($[K^+]$) i lårvena. Elektrodane blei brukt under sykling ved ulike arbeidsbelastningar.

2.1 Elektrodane

Kaliumelektroden er eit polyvinylklorid (PVC) kateter med ein membran i den eine enden som er selektivt permeabel for kalium. Kateteret er fylt med ei saltløyse (0.5 M KCl), og ein sølv/sølvklorid-elektrode (Ag/AgCl-elektrode) dannar den elektrokjemiske kontakten mellom saltløyse og måleapparaturen (figur 1).

2.1.1 Konstruksjon av elektrodane

Membranløyse blei laga ved å støype inn valinomycin i polyvinylklorid med høgt innhald av mykner (dibutylsebacat). Membranen har dette vektprosentlege innhald: Valinomycin 4%, kaliumtetraphenylborat (KTPB) 1%, dibutylsebacat (DBS) 74%, uplastisert polyvinylklorid pulver (PVC) 25% (Hill, 1978). KTPB laga eg ved ein utfellingsreaksjon mellom natriumtetraphenylborat (NaTPB) og kaliumklorid (KCl) i ionebyta vatn. Valinomycin, KTPB og PVC blei løyst i tetrahydrofuran (THF), og deretter tilsett mykner. DBS, THF og valinomycin er SIGMA-preparater, PVC og NaTPB kan kjøpast på vanleg apotek.

Både kateteret og membranen er hovudsakeleg av PVC og membranen kan difor "sveisast" på ved bruk av THF. På den måten vil ikkje det vere fare for at membranen skal løsne frå kateteret. Dette er sjølvstøtt svært viktig under humane forsøk.

Eg prøvde fleire metodar til å sette membranen på kateteret. Eg fann at den enklaste og den beste ved tynne kateter (<2 mm) var "dyppemetoden". Membranen blir lagt

Metode

på ved å dyppe kateteret i den viskøse membranløysninga.

Utstyr: Membranløysning, elektrodekaterer,
ståltrådmandreng (e.l.), skarp skapell.

Framgangsmåte:

1. Kateteret blir kuttet med ein skarp skapell i elektrodelen.
2. Mandrengen blir sett inn i kateteret slik at den er i flukt med kateterenden der membranen skal leggjast. Mandrengen må vere butt.
3. Kateteret med mandreng blir ført ned til overflata på membranløysninga og trekt forsiktig tilbake. Har løysninga riktig konsistens, slepp den ikkje kateteret før kateteret er trekt 5 - 10 mm tilbake. Denne prosessen gjentas umiddelbart to gonger, før membranen blir hengt til tork i 10 min.
4. Punkt 3 gjentas til membranen har fått ein tydeleg konveks form, vanlegvis 2-4 gonger
5. Membranen må tørke i minimum 24 timar.

Dette er elektrodens spesielle del. Den er etter torkinga klar til bruk, men kan lagrast i luft i fleire veker.

0.5 M KCl metta med sølvklorid (AgCl) blei brukt som elektolytt i elektroden. Elektroden blei fylt gjennom eit stålkaterer (ytre diameter 0.55 mm) som var ført heilt fram til membranen. Elektolytten blei såleis fylt innanfrå og pressa dermed lufta ut bakenden. Stålkateret blei dratt tilbake samstundes med at elektolytten blei spruta inn.

Som elektrokjemisk kontakt brukte eg Ag/AgCl-elektroder både i den kaliumselektive elektroden og i referanse-

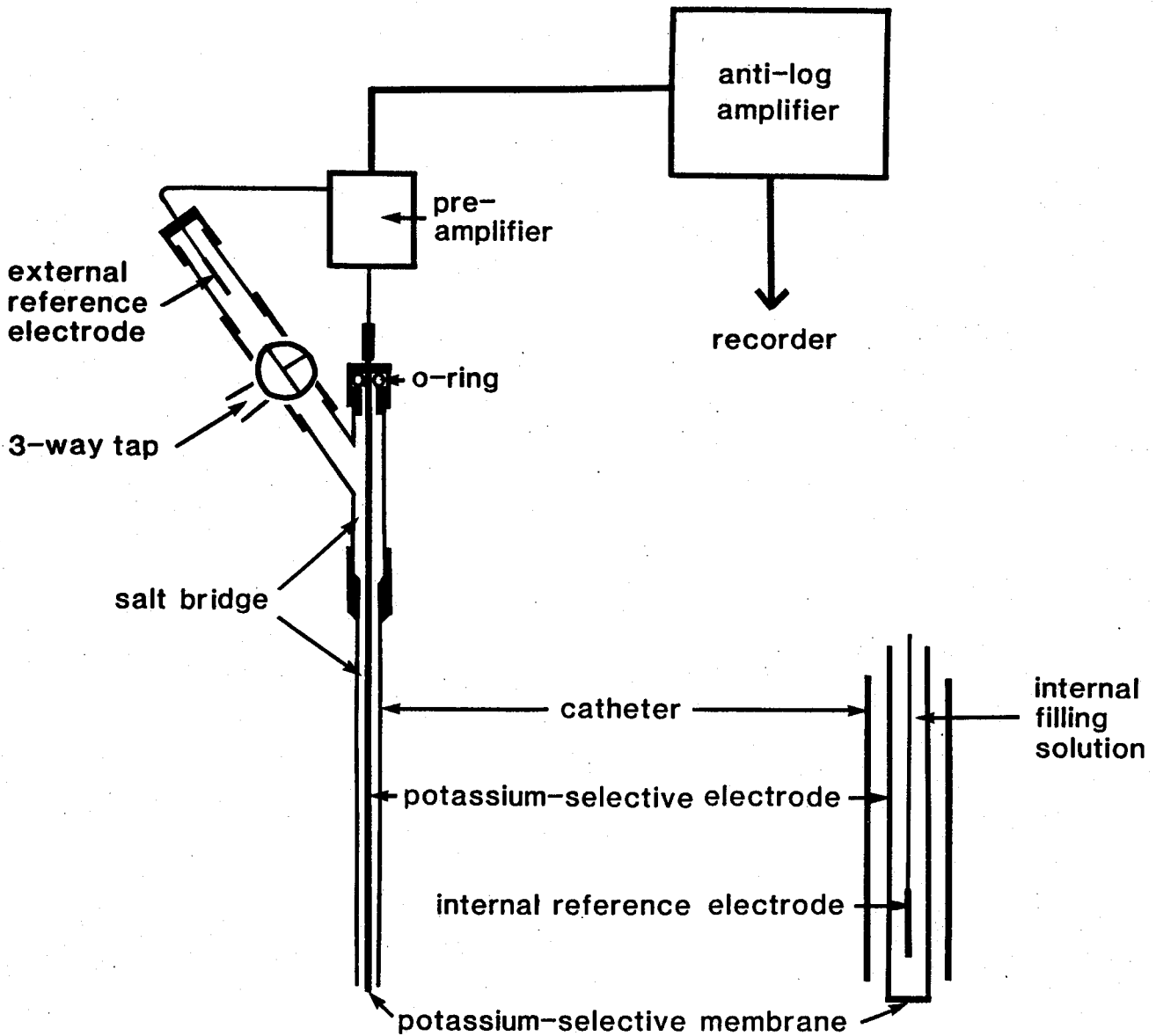
Metode

elektroden. Disse var ikkje å få kjøpt i rett dimensjon, og eg laga dei difor i eit sjølvlagde elektrolyseapparat. Ein teflonisolert sølvtråd med diameter 0.2 mm blei forsiktig avisolert 1.6 cm i eine enden med ein skarp skapell. Isoleringsrester, striper og anna blei fjerna ved å koble sølvtråden opp i elektrolyseapparatet sin positive pol i 1 min med straumstyrke på ca 5 mA cm^{-2} . Sølvtråden blei så løfta opp av elektolytten (0.5 M KCl) for å fjerna gassbobler, straumen blei snudd og tråden sett ned i elektolytten att. Fyrst blei den kloridisert i 2 min med straumstyrke på 5 mA cm^{-2} , deretter avkloridisert (straumen snudd) i 0.5 min med same straumstyrke.

Når elektrodekateret er fylt med elektolytt, og Ag/AgCl-elektroden er sett på plass, kan den forseglast i den bakre enden med ei PVC-hette, og elektroden er ferdig til testing. Levetida var vanlegvis 2 - 5 veker, avhengig av kvaliteten til Ag/AgCl-elektroden.

Referanse-elektroden er eit kammer (verkstaden, AFI) med ein Ag/AgCl-elektrode (figur 1). Kammeret er fylt med 0.9% NaCl. Referanse-elektroden er sett i kontakt med blodet gjennom ei saltbru (0.9% NaCl). Saltbrua er eit silikonkateter (VYGON: nutricath "s", 2.0-3.2) kobla til han-enden av eit Y-stykket (COOK) via eit spesiallaga kobling (verkstaden, AFI). Referansekammeret er kobla til Y-stykket via ein treveiskran (t.d. COOK), som gjer det muleg å skifte ut saltbrua og trekke blodprøver gjennom kateteret. 0.9% NaCl kan fritt injiserast i blodbanen utan konsekvensar for forsøkspersonen.

Den kaliumsensitive elektroden blei lagt inn i saltbrua gjennom den ledige armen i Y-stykket. Ein O-ring som blir skrudd til rundt elektroden sørga for tettinga.



Figur 1: Den kalium-sensitive elektroden. Skjema over elektrodeoppsett med referanseelektrode.

2.1.2 Testing av elektrodane

Signalet frå desse elektrodane er ei elektrisk like-spending. Spendinga var direkte proporsjonal med logaritmen til ioneaktiviteten i målemediet gitt ved Nernst likning:

$$E = E_1 + RT/nF \ln a_{K^+}$$

a_{K^+} er den termodynamiske aktiviteten til kaliumionet. E er den målte spendinga, E_1 er eit standard potensial som måles empirisk for kvar elektrode. RT/nF er Nernst-konstanten, ved $37^{\circ}C$ lik 26.7 mV. Seinare i oppgava brukar eg $(2.303 \log_{10} a_{K^+})$ i staden for $(\ln a_{K^+})$ og den teoretiske konstanten blir då 61.5 mV ved $37^{\circ}C$. Aktiviteten er direkte proporsjonal med konsentrasjonen ved konstant ionestyrke. Aktivitetskonstanten γ gir sammenhengen mellom konsentrasjon og aktivitet:

$$a_{K^+} = \gamma [K^+]$$

γ er for fysiologiske konsentrasjonar konstant (Band, 1978) og vi kan difor setta at $E_0 = (E_1 + \log \gamma)$. Vi har då at:

$$E = E_0 + a \log [K^+]$$

Denne likninga gir kalibreringslina for elektrodane. a er den aktuelle "Nernst-konstanten" for elektrodene. E_0 og a blir målt empirisk for kvar elektrode ved å kalibrere dei før og etter kvart forsøk. Fire kalibreringsløysningar blei blanda av kalium- og natriumkloridsalt slik at ionestyrken alltid var 150 mM medan kaliumkonsentrasjonane var henholdsvis 2 , 4 , 8 , og 16 mmol/l. Løysningane blei kontrollerte på MT 33/E2 Elektrolytt Analysator (Eschweiler, Kiel).

Metode

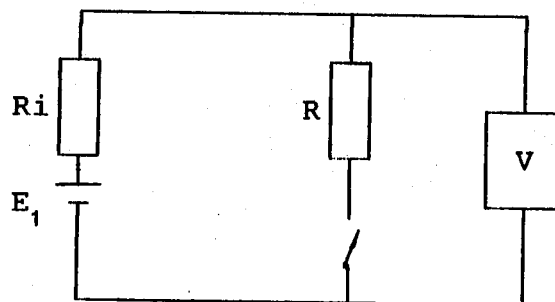
Kvar elektrodens sin indre motstand (R_i) blei rekna ut ved å måle den reduksjonen i spenninga ein får ved å koble inn ein kjent motstand (R) i parallell med elektrodene (figur 2).

$$E_1 = (R_i + R)E_2 / R$$

Løyst med hensyn på R_i

$$R_i = (E_1 / E_2 - 1) R$$

E_1 er elektrodespenninga målt utan R innkobla, og E_2 er spenninga over R når den er innkobla.



Figur 2: Koblingsskjema for måling av den indre motstanden til elektrodene. E_1 og R_i er henholdsvis elektroden sin elektromotoriske kraft og indre motstand, R den ytre motstanden og V voltmeteret.

Metode

Tidskonstanten (τ) blei rekna ut frå utskrifta av elektrodespenninga (figur 3, resultat), når eg flytta elektroden frå ei standard løysning til ei anna gjennom ein kort luftfase.

$$\tau = 1.44(t_{1/2})$$

Formelen er utleia frå

$$E_y = E_x e^{t/\tau}$$

der E_x er elektrodespenninga i løysning x (lav konsentrasjon) og E_y er spenninga i løysning y (høg konsentrasjon) etter tida t.

Elektrodens selektivitet for kalium blir vist med selektivitetskonstanter (K_{M^+}) der M^+ er Na^+ , H^+ eller NH_4^+ .

$$\log K_{M^+} = (E_{M^+} - E_{K^+}) / (2.303 RT/nF)$$

der E_{K^+} og E_{M^+} er spenninga målt i løysningar med henholdsvis rein KCl og rein MCl der $a_{K^+} = a_{M^+}$. Denne metoden blir referert til som "den separate løysnings teknikk".

Trykkresponen blei målt ved å plassere elektroden i eit kammer der eg kunne variere trykket ved hjelp av eit stempel styrt av ein elektromotor. Trykket i kammer blei målt med ein AE 840 Fysisk trykkmåler (Aksjeselskapet Mikroelektronikk, Horten).

2.1.3 Kalibrering in vivo

Etter at elektroden er lagt inn i åra stiller vi anti-logforsterkeren inn på 4.0 mM (sjå kap. 2.1.5), og tar ein blodprøve. Utover i forsøket tar vi fleire blodprøvar både ved relativt høge konsentrasjonar og ved konsentrasjonar under 4 mM. Desse prøvane blir brukt til

Metode

å korrigere konsentrasjonskurva etter forsøk. Prøvar rundt 4 mM viser eventuell drift medan prøvar langt fra 4 mM viser om elektroden sin elektriske respons samvarer med forsterkerinnstillinga. Drift og eventuell unøyaktig forsterkarinnstilling kan det etter blodprøvane korrigerast for på følgjande måte:

Vi har at

$$E = E_{01} + a_1 \log [K^+]_1.$$

der E_{01} er elektrodespenninga i mV ved kaliumkonsentrasjon i målemediet på 1 mM, a_1 er elektrodens rette dekaderespons og $[K^+]_1$ er blodets rette kaliumkonsentrasjon ved elektrodespenninga E.

Vi har også at

$$E = E_{02} + a_2 \log [K^+]_2$$

der E_{02} er den elektrodespenninga som gir forsterkerverdi på 1 mM, a_2 er forsterkaren sin innstilte dekaderespons, og $[K^+]_2$ er den konsentrasjonen forsterkaren viser ved elektrodespenninga E.

Om konsentrasjonen i blodprøven målt med flammefotometri ikkje samsvarar med konsentrasjonen målt med elektroden på det tidspunktet prøven blir tatt ($[K^+]_2 \neq [K^+]_1$) viser det at $E_{02} \neq E_{01}$ og/eller $a_2 \neq a_1$. Samanhengen mellom $[K^+]_1$ og $[K^+]_2$ er gitt ved

$$E_{01} + a_1 \log [K^+]_1 = E_{02} + a_2 \log [K^+]_2$$

Løyst med omsyn på $[K^+]_1$, altså den konsentrasjonen blodet eigentleg hadde (målt med flammefotometri), får vi

$$\log [K_1^+] = A + B \log [K_1^+]$$

der $A = E_{01} - E_{02}/a_1$ og $B = a_2/a_1$. Denne likninga gir oss