

УДК 543.253: 612.2

ã Э. И. Лежнев, И. И. Попова, В. П. Лавровская

**КОРРЕКЦИЯ ПОГРЕШНОСТИ АТОПОТРЕБЛЕНИЯ
КИСЛОРОДНОГО ЭЛЕКТРОДА КЛАРКА**

Приведена методика коррекции показаний электрода Кларка с учетом автопотребления. Автопотребление может вносить существенную погрешность при измерении скорости потребления кислорода клетками. Показано, что учет автопотребления значительно уменьшает эту погрешность при исследовании физиологии дыхания клеток.

ВВЕДЕНИЕ

В исследованиях физиологии дыхания на тканевом, клеточном и субклеточном уровнях закрытые полярографические электроды нашли широкое применение благодаря простоте конструкции, удобству в эксплуатации, удачному решению Л. Кларка закрыть катод и анод единой мембраной, проницаемой для кислорода, [1–5] и сравнительно их невысокой стоимости. Разнообразие условий, в которых применяются электроды, возрастающие эксплуатационные требования, в том числе требования к точности измерений, создание новых материалов, возможность электронной стабилизации режимов работы и оперативной обработки результатов измерений привели к разработке большого числа конструкций приборов, программ, методик работы: ISO2 Dissolved Oxygen Meter & Electrode, Rank Dissolved O₂ Electrode ATA SCIENTIFIC, Sable Systems: ReadOx-4 4-Channel Dissolved Oxygen Analyzer, OROBOROS INSTRUMENTS high-resolution respirometry Oxygraph-2k, THE OXYGEN SENSOR, анализатор жидкости МУЛЬТИТЕСТ ИПЛ-513. Область применения электродов полностью не сформирована, и во многих предприятиях и лабораториях изготавливаются электроды для решения частных задач. Применение кислородных электродов Кларка встречает ограничения при измерении слабых сигналов, например при респирометрических исследованиях гипоксии на клеточном уровне. За кажущейся простотой электрода скрываются достаточно сложные физико-химические процессы, допускающие, как правило, их приближенное рассмотрение. Некоторые систематические погрешности электродов, ограничивающие их применение, могут быть устранены или уменьшены путем использования корректирующих алгоритмов на основе анализа природы этих погрешностей. В ряде случаев уменьшение погрешностей может быть предусмотрено в конструкциях электрода и изме-

рительной камеры. Необходимо отметить следующее обстоятельство: некоторые погрешности электрода — динамическая погрешность, причина которой состоит в инерционности электрода, и погрешность, вызванная кислородной емкостью деталей электрода и электродной измерительной ячейки ("обратная диффузия") — устранены в приборе Охуgraph-2k (Австрия) [6–9]. Это сделало возможным проведение респирометрических исследований как быстротекущих процессов, так и процессов по содержанию кислорода, близких к гипоксии, что расширило представления о физиологии митохондрий и о дыхательной активности клеток и наметило перспективы дальнейших исследований [9–12].

Полярографическим методам определения содержания кислорода посвящена обширная литература, в перечне которой содержатся патенты, монографии, оригинальные статьи и обзоры. Необходимость работы, обобщающей материалы по конструированию и применению измерителей содержания кислорода в биологических средах, назрела и была бы полезна как разработчикам приборов медико-биологического применения, так и исследователям, работающим с респирометрической аппаратурой. Мы считаем возможным рекомендовать в настоящем кратком сообщении несколько публикаций с элементами теории, описанием различных конструкций и методик работы [1–5, 13–19].

Нами же ставится конкретная задача — анализ погрешности автопотребления электрода Кларка и пути ее коррекции.

Имеется круг задач, решение которых сопряжено с необходимостью коррекции показаний кислородного электрода по автопотреблению. Под автопотреблением понимается уменьшение содержания растворенного кислорода в замкнутом объеме при включенном электроде [3, 4]. Электрод регистрирует содержание кислорода в измерительной камере ("индикаторная" кривая). В ряде

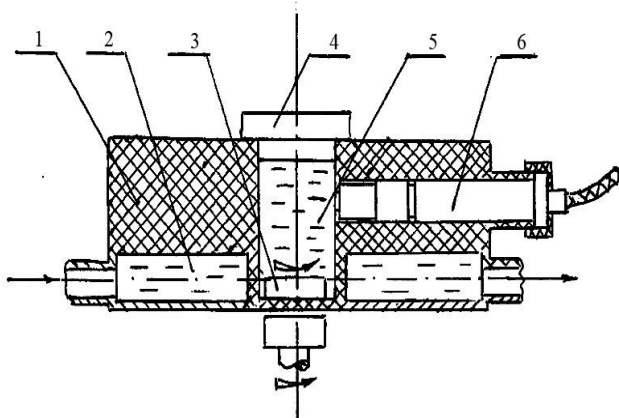


Рис. 1. Схема измерительной камеры.

1 — корпус, 2 — рубашка термостата, 3 — мешалка, 4 — пробка, 5 — герметизированная рабочая ячейка со средой и клетками (митохондриями), 6 — измерительный электрод

случаев цель исследований состоит в оценке дыхательной активности (скорости потребления кислорода клетками). Очевидно, что процедура дифференцирования индикаторной зависимости по времени может привести к значительной погрешности в определении скорости дыхания клеток.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Для количественной оценки погрешности измерения концентрации растворенного кислорода, вызванного автопотреблением, рассмотрим временные соотношения электровосстановления кислорода. На рис. 1 и 2 приведены схемы измерительной камеры и измерительного электрода. Электрод регистрирует концентрацию кислорода, растворенного в среде с клетками (митохондриями), заполняющей полностью герметизированный объем камеры $C_{\text{и}} = f(t)$. $C_{\text{и}}$ — текущая концентрация без учета инерционности электрода, нормированная по начальной концентрации C_0 . Если инерционность электрода соизмерима со скоростью исследуемого процесса, то следует полученную зависимость корректировать по времени запаздывания:

$$C(t) = C_{\text{и}} + \tau \cdot \frac{dC_{\text{и}}}{dt}, \quad (1)$$

где τ — постоянная электрода, определенная по отклику показаний электрода на ступенчатое изменение концентрации растворенного кислорода [3, 8], а $C_{\text{и}}$ — "индикаторная" кривая измерения

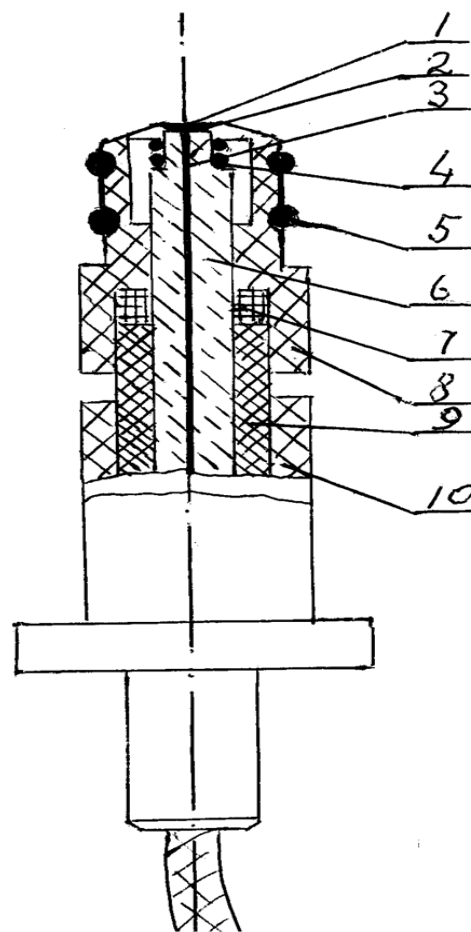


Рис. 2. Измерительный электрод.

1 — полупроницаемая мембрана, 2 — дистанционная мембрана, 3 — катод, 4 — анод, 5 — зажимные кольца, 6 — стеклянный держатель катода, 7 — прокладки, 8 — наконечник, 9 — корпус, 10 — втулка

растворенного кислорода в камере, учитывающая дыхание клеток и автопотребление электрода.

Удельное потребление кислорода клетками γ может быть представлено в виде соотношения, по форме аналогичного формуле Михаэлиса—Ментен [20, 21]:

$$g = g_0 \frac{C}{K_1 + C} \quad [\text{мкмоль}/(\text{кл.} \cdot \text{ч})], \quad (2)$$

где g_0 — максимальное значение удельного потребления; K_1 — безразмерная постоянная;

$$\begin{aligned} \text{при } K_1 \ll C \quad g &\approx g_0, \\ \text{при } K_1 \gg C \quad g &= g_0 \frac{C_{\text{и}}}{K_1}. \end{aligned} \quad (3)$$

Тогда (при этом) скорость потребления кислорода клетками можно записать в следующем виде:

$$\frac{dC_1}{dt} = \frac{C}{K_1 + C} \cdot \frac{1}{T_1}, \quad (4)$$

где $\frac{dC_1}{dt}$ — скорость потребления кислорода клетками из единицы объема, $T_1 = \frac{C_0}{g_0 \cdot n}$ [ч] — характеристическое время потребления, n [кл./мл] — концентрация клеток.

Скорость автопотребления в предположении, что поглощение кислорода электродом происходит по кинетике реакции первого порядка [3], может быть представлена уравнением

$$\frac{dC_2}{dt} = C \frac{1}{T_2}, \quad (5)$$

где

$$\frac{dC_2}{dt} \text{ — скорость автопотребления,} \quad (6)$$

$$\text{а} \quad T_2 = \frac{V}{K_2}, \quad (7)$$

где V — объем измерительной камеры (мл), а K_2 — константа автопотребления.

Очевидно, что имеются два пути коррекции автопотребления: увеличение объема измерительной камеры и учет автопотребления по характеристикам электрода. Материальный баланс по кислороду может быть представлен следующим образом:

$$C = 1 - C_1 - C_2. \quad (8)$$

Полученные соотношения, позволили оценить погрешность при определении скорости дыхания культуры клеток ВНК-21 (С-13), причиной которой является автопотребление.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Клетки ВНК-21 (С-13) культивировали в пластиковых флаконах Карреля площадью 25 см² фирмы Nunc в атмосфере воздуха с 5 % CO₂. Посевная концентрация составляла 400 тыс. клеток на флакон в 5 мл питательной среды. Для культивирования использовали питательные среды DMEM и RPMI-1640 в соотношении 1:1 с добавлением 10 % сыворотки крупного рогатого скота и 80 мкг/мл гентомицина.

С поверхности флакона клетки снимали при помощи раствора Трипсин-ЭДТА на 3-и сутки культивирования. После 2-кратного центрифуги-

рования (сначала в исходной среде, затем в среде без сыворотки) клетки помещали в респираторную среду, состоящую из среды Joklik (с добавлением 20 мМ Нерес) и митохондриальной среды MiR05 [22] (с добавлением BSA (1 г/л) и сахарозы (110 мМ)) в соотношении 1:1.

Респираторной средой, содержащей клетки в концентрации 1.8–2.0·10⁶ кл./мл, заполняли герметизированную термостатированную ячейку объемом 1 мл измерительной камеры (рис. 1), в которой обеспечивалось перемешивание, и измеряли концентрацию растворенного кислорода электродом (рис. 2) в течение 50 мин. Подсчет клеток проводили на гемокситометре. Подсчет живых и мертвых клеток в суспензии получали по их окрашиванию 0.5 % раствором трипанового синего по общепринятой методике [23, 24].

Особенности электрода состоят в том, что в нем использован платиновый катод, вмонтированный в стеклянный держатель (стекло № 29). В качестве полупроницаемой мембраны применена силиконовая пленка. Стабильность показаний электрода достигнута за счет применения дистанционной пористой мембраны (материал — лавсан, толщина 0.005 мм, пористость 7 %, средний диаметр пор 0.8·10⁻³ мм) и специальной заточки электрода, исключающей влияния пузырьков воздуха в электролите на показания. В электроде в качестве электролита использован 1 М раствор хлористого калия (ДИАМ), оттитрованный КОН до значения pH, равного 10 [3].

Для определения быстродействия электрода ячейку заполняли дистиллированной водой, устанавливали температуру 37 °С, продували воздухом, потом вносили 0.1 г сульфита натрия (SIGMA) и регистрировали показания электрода (рис. 3).

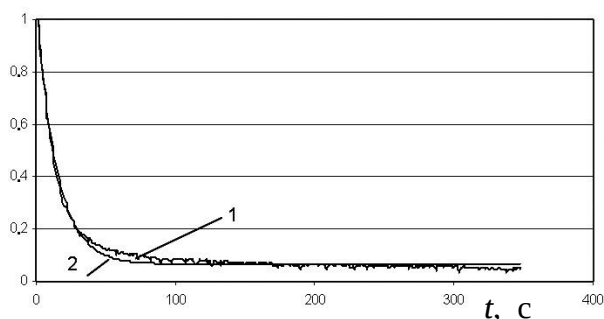


Рис. 3. Отклик электрода на ступенчатую деоксигенацию среды в измерительной ячейке.
1 — показания измерительного электрода,
2 — аппроксимирующая кривая

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Отклик электрода на ступенчатую деоксигенацию приведен на рис. 3. Полученная зависимость, нормированная по максимальной концентрации C_0 , хорошо аппроксимируется экспонентой с постоянной времени $\tau = 14.5$ с. Так как эта величина намного больше, чем скорость абсорбции кислорода сульфитом натрия (≈ 0.12 с [25]), то искажением, вызванным влиянием на скорость процесса восстановления кислорода, можно пренебречь.

Стандартное отклонение экспериментальной кривой дыхания $C_{\text{и}}$ от скорректированной по τ кривой $C(t)$ не превышает величины 0.018, что позволяет использовать электрод для исследуемых нами медленнопротекающих ($t > 50 \tau$) процессов.

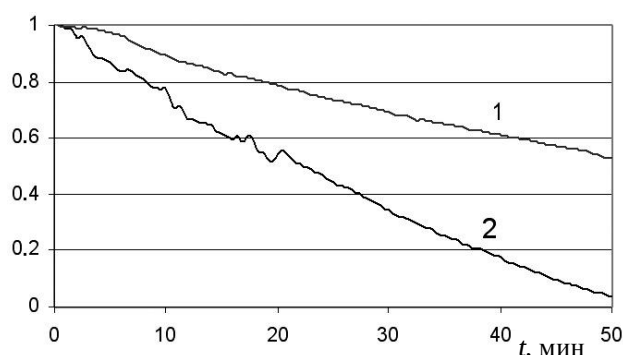


Рис. 4. Экспериментальные зависимости изменения содержания кислорода в измерительной ячейке.
1 — автопотребление электрода C_2 ,
2 — дыхание клеток $C_{\text{и}}$

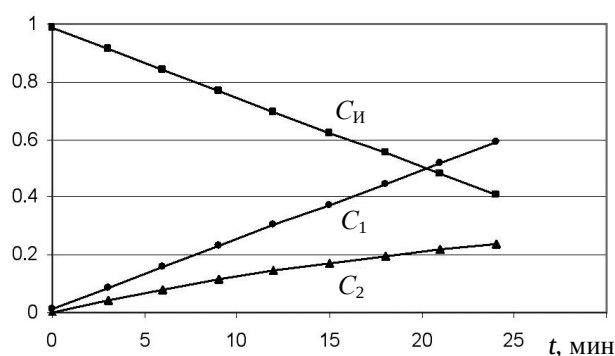


Рис. 5. Расчетные кинетические показатели измерения дыхания клеток в измерительной ячейке.
 $C_{\text{и}}$ — функция аппроксимации кривой изменения содержания кислорода в измерительной ячейке в процессе эксперимента,
 C_1 — кривая дыхания клеток, рассчитанная по формуле (8),
 C_2 — кривая автопотребления электрода, рассчитанная по формуле (5)

2. На рис. 4 показаны экспериментальные зависимости изменения содержания кислорода в измерительной ячейке в бесклеточной респираторной среде (автопотребление электрода) и в среде, содержащей клетки (автопотребление электрода и дыхание клеток).

Учитывая, что в бесклеточной среде $C_{\text{и}} = 1 - C_2$, из уравнения (5) получаем

$$C_2 = 1 - e^{\frac{-t}{T_2}}. \quad (9)$$

Находим, что на участке $t = 0 \div 50$ мин кривой 1 $T_2 = 1.169$ мин. Отметим, что T_2 зависит от характеристик электрода (K_2) и измерительной ячейки (V) и не зависит от процессов дыхания в ячейке.

Далее, имея зависимость содержания кислорода от времени (рис. 4) в среде, содержащей клетки, и зная значение T_2 , можем, используя уравнение (5), определить расход кислорода в ячейке на автопотребление $C_2(t)$. На начальном участке зависимость $C(t)$ в уравнении (5) аппроксимирована линейной функцией (рис. 5). На рис. 5 приведена также зависимость $C_2(t)$, найденная из уравнения (5) при принятом допущении относительно линейности $C(t)$. Из соотношения (8) находим $C_1(t)$ (рис. 5).

Скорость потребления кислорода клетками, найденная путем дифференцирования зависимости $C_1(t)$ существенно отличается от аналогичного значения, найденного по кривой $C(t)$ (рис. 6). Очевидно, что погрешность измерений скорости дыхания может быть уменьшена за счет конструкции электрода и объема измерительной ячейки.

Полученная зависимость dC_1/dt позволяет, используя соотношения (3) и (4), найти T_1 ,

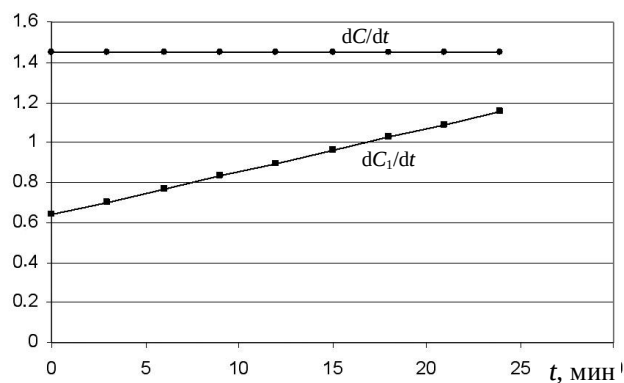


Рис. 6. Скорости потребления кислорода культурой клеток в измерительной ячейке, полученные из кривой дыхания $C(t)$ без учета автопотребления электрода и кривой $C_1(t)$, учитывающей влияние автопотребления электрода, в относительных единицах

а следовательно, и удельное потребление клетками кислорода для различных условий инкубации.

Все вычислительные процедуры и обработка результатов экспериментов осуществлены в системе Mathcad 2000 Professional.

ВЫВОДЫ

Полученные результаты позволяют скорректировать погрешность измерений, возникающую в результате автопотребления электрода, и тем самым предусмотреть возможности повышения объективности респирометрических исследований с использованием электрода Кларка.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Лакиминараянайах Н.* Мембранные электроды. Л.: Химия, 1979. 360 с.
2. *Хаваши Е.* Ионно- и молекулярно-селективные электроды в биологических системах. М.: Мир, 1988. 224 с.
3. *Зеленский М.И.* Полярографическое определение кислорода в исследованиях по фотосинтезу и дыханию. Л.: Наука, 1986. 140 с.
4. *Березовский В.А.* Напряжение кислорода в тканях животных и человека. Киев: Наукова думка, 1975. 280 с.
5. *Коваленко Е.А., Березовский В.А., Энштейн И.М.* Полярографическое определение кислорода в организме. М.: Медицина, 1975. 232 с.
6. *Erich Gnaiger et al.* High-Resolution Respirometry — Optimum Permeabilization of the Cell Membrane by Digitonin // *BioThermoKinetics in the Post Genomic Era*. 1998. P. 89–95.
7. *Erich Gnaiger et al.* High Phosphorylation Efficiency and Depression of Uncoupled Respiration in Mitochondria under Hypoxia // *PNAS*. September 26, 2000. V. 97, N 20. P. 11080–11085.
8. *Erich Gnaiger.* Bioenergetics at Low Oxygen: Dependence of Respiration and Phosphorylation on Oxygen and Adenosine Diphosphate Supply // *Respiration Physiology*. 2001. V. 128. P. 277–297.
9. *Steiger Druck.* Mitochondrial Pathways and Respiratory Control // *OROBOROS MiPNet Publications 2007* / Ed. E. Gnaiger. (www.oroboros.at).
10. *Kuznetsov A.V. et al.* Mitochondrial Defects and Heterogeneous Cytochrome C Release after Cardiac Cold Ischemia and Reperfusion // *Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol*. 2004. V. 286. H1633–H1641.
11. *Kathrin Renner et al.* Changes of Mitochondrial Respiration, Mitochondrial Content and Cell Size after Induction of Apoptosis in Leukemia Cells // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2003. V. 1642. P. 115–123.
12. *Boushel R. et al.* Patients with Type 2 Diabetes Have Normal Mitochondrial Function in Skeletal Muscle // *Diabetologia*. 2007. V. 50. P. 790–796.
13. *Clarence W. et al.* Patent USA 3,449,231. June 10, 1969.
14. *O'Brien W.J.* A Continuous Flow Automatically Recording Respirometer // *Biotechnology and Bioengineering*. 1971. V. 13. P. 721–739.
15. *Kok R.* An in Situ Dissolved Oxygen Probe Calibrator // *Biotechnology and Bioengineering*. 1976. V. 18. P. 729–735.
16. *Merta K., Dunn I.J.* Oxygen Electrode Characteristics // *Biotechnology and Bioengineering*. 1976. V. 18. P. 591–593.
17. *Ohashi M. et al.* Sensors and Enstrumentation: Steam-Sterilizable Dissolved Oxygen Sensor and Cell Mass Sensor for On-line Fermentation System Control // *Biotechnology and Bioengineering Symp*. 1979. N 9. P. 103–116.
18. *Takao Akatsuka* Patent USA N 4,323,440. Apr. 6, 1982.
19. *Anthony D.S. et al.* Patent USA N 4,324,632. Apr. 13, 1982.
20. *McElwain D.L.S.* A Re-examination of Oxygen Diffusion in a Spherical Cell with Michaelis-Menten Oxygen Uptake Kinetics // *J. Theor. Biol*. 1978. V. 71. P. 255–263.
21. *Перт С.Дж.* Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир, 1978. 336 с.
22. *Kuznetsov A. et al.* Handbook on Mitochondrial Physiology. Mitochondria Respiration Medium-MiR05 // *Mitochondrial Physiology. Network 8*, 5. 2003/2004. P. 1–4.
23. *Пол Дж.* Культура клеток и тканей. Медгиз, 1963. 348 с.
24. *Культура животных клеток. Методы* / Под ред. Р. Фрешни. М.: Мир, 1989. 336 с.
25. *Yagi S. and Inoue H.* The Absorption of Oxygen into Sodium Sulphite Solution // *Chemical Engineering Science*. 1962. V. 17. P. 411–421.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино (Лежнев Э.И., Попова И.И., Лавровская В.П.)

Пущинский государственный университет (Лежнев Э.И., Лавровская В.П.)

Материал поступил в редакцию 19.10.2007.

MEASUREMENT ERROR CORRECTION OF CLARK OXYGEN ELECTRODE AUTOCONSUMPTION

E. I. Lezhnev^{1,2}, I. I. Popova¹, V. P. Lavrovskaya^{1,2}

¹*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino,*

²*Pushchino State University*

The paper presents a technique for correcting Clark electrode readings with consideration of autoconsumption. Autoconsumption can introduce a considerable error in measurements of the rate of oxygen consumption by the culture cells. It has been shown that consideration of autoconsumption in studying the cell respiration physiology reduces markedly this error.