

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ БЕСКИСЛОРОДНОЙ ДОБАВКИ НА КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭФФЕКТА БЫСТРОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА

М.В. Миняев, Е.Б. Бабалова, Л.И. Ворончихина

Тверской государственный университет

Моделировалось явление «эффекта быстрого потребления кислорода» путем внесения в насыщенную кислородом при 37⁰С среду инкубации бескислородной добавки того же состава, что и среда. Показано, что при снижении температуры добавки с 37⁰С до 0⁰С значение кажущегося количества потребленного кислорода существенно возрастает.

При измерении потребления кислорода гомогенатами тканей или суспензиями митохондрий практически всегда проявляется эффект быстрого перемещения пера самописца полярографа от положения, указывающего начальную концентрацию кислорода, в сторону нуля в момент внесения препарата [1]. Это явление получило название «эффекта быстрого потребления кислорода» (ЭБПК) или «эффекта введения», величина которого может достигать 30 и более процентов от исходного содержания кислорода в среде инкубации. В связи с этим особое значение приобретает вопрос о механизме ЭБПК, только изучив который можно решить: следует ли учитывать значение ЭБПК при расчете окончательных результатов потребления кислорода или нет.

Вопрос о механизме ЭБПК в настоящее время окончательно не решен, так как в литературных источниках встречается несколько противоречивых точек зрения на причины его возникновения [1; 3; 5; 6; 7]. Исследования, ранее проведенные авторами настоящей публикации [4], показали, что одной из наиболее вероятных причин возникновения эффекта является снижение концентрации кислорода в среде инкубации в результате ее разведения митохондриальной суспензией, содержание кислорода в которой существенно снижено за счет эндогенного дыхания.

Не менее вероятной причиной возникновения ЭБПК может служить и резкое снижение температуры среды, возникающее при добавлении охлажденной практически до 0⁰С суспензии митохондрий к среде инкубации прогретой до 37⁰С, так как это ведет к повышению растворимости кислорода в среде и, как следствие, к снижению его парциального давления, которое также должно регистрироваться кислородным датчиком как ЭБПК. Поэтому целью данной работы явилось определение влияния температуры бескислородной добавки, имитирующей суспензию митохондрий, на количественные характеристики ЭБПК.

В работе использовалась термостатированная при 37⁰С открытая измерительная ячейка объемом 4 мл с вмонтированным в нее амперометрическим кислородным датчиком закрытого типа [2] совместно с кислородомером N5221 (пр-во ПНР) и регистратором ЭПП-09 мЗ. Чтобы исключить искажения результатов, связанного с осмотическими явлениями на мембране закрытого кислородного датчика, в качестве среды инкубации использовался раствор КСl с концентрацией 60 г/л (3,5 мл), который по составу и осмотическому давлению практически не отличался от электролита датчика. Инкубационная среда предварительно насыщалась атмосферным кислородом при температуре 37⁰С. ЭБПК моделировался путем введения в среду инкубации бескислородной добавки, в качестве которой служила та же среда инкубации, охлажденная до 0⁰С, кислород из которой удалялся путем непрерывной (на протяжении всего эксперимента) продувки раствора азотом. Для восстановления исходных условий измерительная ячейка после каждого замера заполнялась свежей насыщенной кислородом средой инкубации и выдерживалась 10 мин.

Было проведено четыре серии по 10 замеров изменения парциального давления кислорода в среде инкубации в результате внесения охлажденной бескислородной добавки. Серии различались объемом добавки: 100, 200, 300 и 400 мкл.

Величину эффекта введения рассчитывали по минимальным значениям парциального давления кислорода на регистрационных кривых, а затем корректировали на поступление кислорода из атмосферы во время замера.

Средние значения результатов обработки экспериментально полученных значений ЭБПК для различных объемов охлажденной бескислородной добавки (0°C) представлены в таблице. Для сопоставления в ней также приведены средние значения кажущегося снижения содержания кислорода в ячейке при добавлении бескислородной добавки, прогретой до 37°C , взятые из ранее опубликованной работы [4] и предварительно откорректированные на поступление кислорода из атмосферы.

Таблица

Зависимость ЭБПК от объема и температуры бескислородной добавки (n=10)

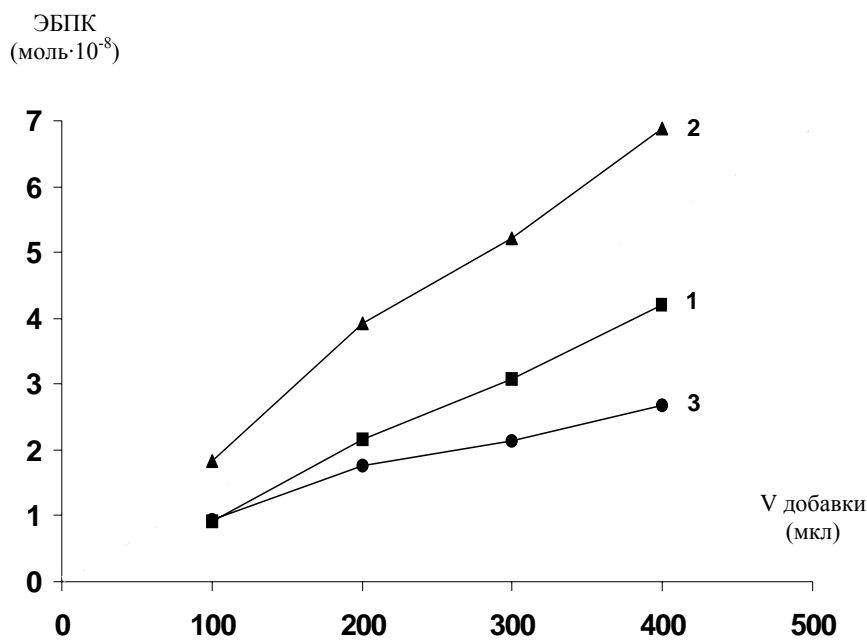
V _{доб.} (мкл)	ЭБПК (моль·10 ⁻⁸)		Отклонение (моль·10 ⁻⁸)
	0 ⁰ C	37 ⁰ C	
100	1,84±0,05	0,91±0,05	0,93±0,08
200	3,92±0,03	2,12±0,03	1,77±0,03
300	5,22±0,07	3,05±0,05	2,14±0,09
400	6,89±0,06	4,13±0,06	2,69±0,09

Из таблицы видно, что во всех случаях при снижении температуры добавки с 37°C до 0°C величина ЭБПК существенно возрастает. Таким образом, добавление к инкубационной среде объема жидкости с пониженной температурой приводит к возникновению эффекта кажущегося снижения содержания кислорода в среде, который по своему характеру практически не отличается от ЭБПК.

Для удобства сопоставления средние значения из таблицы в графической форме отображены на рисунке 1. Цифрами на рисунке обозначены:

- 1 – величины ЭБПК при температуре добавки 37°C ;
- 2 – величины ЭБПК при температуре добавки 0°C ;
- 3 – величина отклонения, характеризующая температурный фактор.

Из рисунка видно, что снижение температуры добавки от 37°C (1) до 0°C (2) ведет к значительному росту величины ЭБПК. Причем увеличение объема добавки усугубляет влияние температурного фактора. Таким образом, доля температурного фактора в величине ЭБПК оказалась сравнимой с эффектом разведения, а в ряде случаев даже достигла этой величины. По этой причине при проведении измерения потребления кислорода биологическими объектами во избежании серьезных ошибок необходимо следить не только за содержанием кислорода в добавках к среде инкубации (суспензии объектов, растворы субстратов и др.), но и за их температурой.



Зависимость эффекта быстрого потребления кислорода от объема и температуры бескислородной добавки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Котова Е.И., Ротенберг Ю.С. Исследование быстрого потребления O₂ митохондриями при введении их в аэробную среду инкубации. //Биохимия. 1975. Т.20, вып.4. С.746–747.
2. Миняев М.В. Гальванический кислородный датчик с пониженной собственной кислородной емкостью. Актуальные проблемы биохимии и биотехнологии. Тверь, 2001. С. 154 – 161.
3. Панченко Л.Ф., Шпаков А.А. и др. //Ферментная, электронномикроскопическая и полярографическая характеристики изолированных митохондрий мозга крыс. I. Новый метод выделения // Цитология. 1973. Т. 15, вып.12. С.1481 – 1486.
4. Разбавление среды инкубации бескислородной добавкой как вероятная причина «эффекта быстрого потребления кислорода» / М.Б. Белякова, М.В. Миняев, А.А. Егорова, Л.И. Ворончихина // Вестник ТвГУ: биология и экология. 2006. Т.22, №5. С. 57 – 60.
5. Шпаков А.А., Панченко Л.Ф. О природе эффекта «быстрого потребления» кислорода при внесении гомогената тканей или суспензии митохондрий в полярографическую ячейку // Биофизика. 1975. Т.20, вып.3. С.467 – 471.
6. Шпаков А.А., Косарев А.В. О механизме окислительного фосфорилирования. III. Зависимость функциональных показателей от состава среды инкубации митохондрий. //Биофизика. 1977. Т.22, вып.4. С.663 – 667.
7. Шпаков А.А., Панченко Л.Ф. Ферментная, электронномикроскопическая и полярографическая характеристики изолированных митохондрий мозга крыс. II. Влияние состава сред выделения // Цитология. 1974. Т.16, вып.9. С.1124 – 1129.

THE INFLUENCE OF ANOXIC ADDITIVE'S TEMPERATURE ON QUANTITATIVE CHARACTERISTICS OF FAST OXIGEN INTAKE EFFECT

M.V. Minyaev, E.B. Babalova, L.I.Voronchikhina

Tver State University

The phenomenon of “fast oxygen intake effect” was modeled by introduction of anoxic additive incubation of the same composition into the medium with the temperature of 37⁰C. It was proved that in case of decrease of additive’s temperature from 37⁰C until 0⁰C the value of apparent quantity of consumed oxygen essentially increased.