

ВЛИЯНИЕ ВЯЗКОСТИ БЕСКИСЛОРОДНОЙ ДОБАВКИ НА КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ «ЭФФЕКТА БЫСТРОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА»

М.В. Миняев, Т.А. Степанова

Тверской государственный университет

Моделировалось явление «эффекта быстрого потребления кислорода» при внесении вязкой суспензии митохондрий в среду инкубации. В качестве модели использовалась прогретая до 37⁰С бескислородная добавка с повышенной вязкостью. Показано, что даже при полторакратном увеличении относительной вязкости реакционной смеси значение кажущегося количества потребленного кислорода практически не меняется.

Ключевые слова: эффект быстрого потребления кислорода, ЭБПК, эффект введения, потребление кислорода, среда инкубации, полярографический кислородный датчик.

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. 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; 5; 7 – 9]. Исследования, проведенные авторами ранее [3; 6], показали, что наиболее вероятными причинами возникновения эффекта являются снижение концентрации кислорода и температуры реакционной смеси в результате внесения в среду инкубации холодной митохондриальной суспензии, содержание кислорода в которой существенно ниже, чем в среде.

Существует еще один фактор, теоретически способный вызвать подобный эффект или повлиять на количественные характеристики ЭБПК, вызванного иными факторами – это повышение вязкости реакционной смеси, связанное с внесением гомогената или митохондриальной суспензии [7]. В этом случае ЭБПК развивается как снижение предельного диффузионного тока полярографической ячейки из-за увеличения толщины диффузионного слоя.

Несмотря на то, что в работе [7] приводятся экспериментальные подтверждения данного положения, остается открытым вопрос о количественном вкладе повышения вязкости в суммарную величину ЭБПК, а также о ее влиянии на работу закрытых кислородных датчиков, которые благодаря наличию мембраны характеризуются гораздо более стабильной толщиной диффузионного слоя.

Поэтому целью данной работы явилось изучение влияния вязкости бескислородной добавки, имитирующей суспензию митохондрий, на количественные характеристики ЭБПК при использовании закрытого кислородного датчика.

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 N 5221 (пр-во ПНР) и регистратором ЭПП-09 мЗ. Чтобы исключить искажения результатов, связанные 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 37°C. ЭБПК моделировался путем введения в среду инкубации вязкой бескислородной добавки, в качестве которой служил раствор КС1 (60 г/л), приготовленный на 10% растворе крахмала (крахмал картофельный для нефелометрии). При выборе концентрации крахмала для загущающей добавки руководствовались возможностями микродозатора (более вязкие растворы приводили к систематическим отказам в работе) и итоговой вязкостью реакционной смеси (добавление менее концентрированных растворов не приводило к заметному повышению вязкости смеси при объеме добавки 100 мкл). Относительная вязкость реакционной смеси определялась капиллярным вискозиметром ВК-4. Кислород из добавки удалялся путем непрерывной (на протяжении всего эксперимента) продувки азотом прогретого до 37°C раствора. Для восстановления исходных условий измерительная ячейка после каждого замера дважды промывалась средой инкубации, после чего заполнялась свежей насыщенной кислородом средой и выдерживалась 10 мин.

Для предварительной оценки загущающей способности добавки были проведены 5 серий по 5 замеров вязкости реакционной смеси после внесения в 3,5 мл среды инкубации добавок различного объема. Конструкция вискозиметра ВК-4 не позволяет измерять вязкость при температуре инкубации (37°C), поэтому замеры проводились при комнатной температуре ($\approx 20^{\circ}\text{C}$), а так как температура оказывает существенное влияние на вязкость раствора, полученные результаты рассматривались как ориентировочные и в дальнейших расчетах не использовались. Результаты предварительного измерения относительной вязкости реакционной смеси при использовании загущающих добавок различного объема приведены на рис.1.

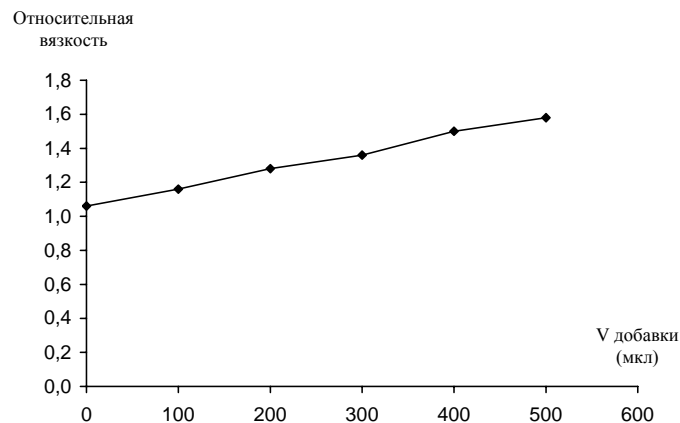


Рис. 1. Усредненная кривая зависимости относительной вязкости реакционной смеси от объема загущающей добавки ($\approx 20^{\circ}\text{C}$)

Как видно из рис. 1, относительная вязкость смеси заметно повышалась уже при добавлении 100 мкл загустителя и практически линейно возрастала с увеличением объема добавки до 500 мкл. При этом максимальное значение ($1,58 \pm 0,02$) вплотную приближалось к нижней границе нормы для вязкости плазмы крови.

Для выявления влияния вязкости реакционной смеси на количественные характеристики ЭБПК было проведено четыре серии по 10 замеров изменения парциального давления кислорода в среде инкубации при внесении вязкой бескислородной добавки. Серии различались только объемом добавки: 100, 200, 300 и 400 мкл. В результате были получены регистрационные кривые, которые по своему характеру практически не отличались от представленных в литературных источниках записей ЭБПК. Величину ЭБПК рассчитывали по минимальным значениям парциального давления кислоро-

да на регистрационных кривых, а затем корректировали [4] на поступление кислорода из атмосферы во время замера.

Результаты обработки регистрационных кривых приведены в таблице. В этой же таблице для сравнения представлены ранее опубликованные результаты [6], где ЭБПК вызывался внесением прогретой до 37⁰С бескислородной добавки, вязкость которой не отличалась от вязкости среды инкубации.

Средние значения ЭБПК при внесении вязких бескислородных добавок различного объема (n = 10)

Добавка	V добавки (мкл)	ЭБПК (моль·10 ⁻⁸)	m	Cv (%)
КСI	100	0,91	±0,05	17,52
	200	2,15	±0,03	4,73
	300	3,08	±0,05	4,44
	400	4,20	±0,06	4,60
КСI + крахмал	100	0,72	±0,09	36,25
	200	1,73	±0,06	9,69
	300	2,83	±0,08	8,47
	400	4,16	±0,13	9,08

Как видно из таблицы, результаты, полученные при использовании вязких добавок, характеризуются гораздо более высоким разбросом, о чем свидетельствует повышение коэффициента вариации более чем в два раза. Это объясняется конструктивными особенностями микродозатора, который плохо приспособлен для измерения объема вязких жидкостей. В то же время сами средние значения ЭБПК при использовании вязких добавок изменились незначительно.

Для выявления более тонких тенденций влияния вязкости добавки на величину ЭБПК результаты экспериментов были отображены как графическая зависимость величины ЭБПК от объема добавки, представленная на рис. 2.

Как видно из рис. 2, результаты, полученные с использованием вязкой добавки, вопреки литературным данным [7] оказались даже несколько заниженными по сравнению с полученными при внесении бескислородной добавки обычной вязкости. Причем отклонение имело явную тенденцию к снижению с увеличением объема добавки и соответственно вязкости реакционной смеси.

Подобное поведение измерительной системы, на наш взгляд, может объясняться несколькими причинами:

во-первых, высокая вязкость могла затруднить удаление кислорода в процессе продувки добавки азотом, поэтому содержание кислорода в вязкой добавке могло оказаться несколько выше, чем при обычной вязкости;

во-вторых, вязкость добавки могла затруднять набор и приводить к неполному выливанию жидкости из микродозатора в процессе внесения добавки в среду несмотря на то, что наконечник дозатора при внесении добавки дважды промывался инкубационной средой;

в-третьих, смешивание вязкой добавки со средой инкубации происходило заметно медленнее, чем добавки с обычной вязкостью, что также могло приводить к занижению величины ЭБПК.

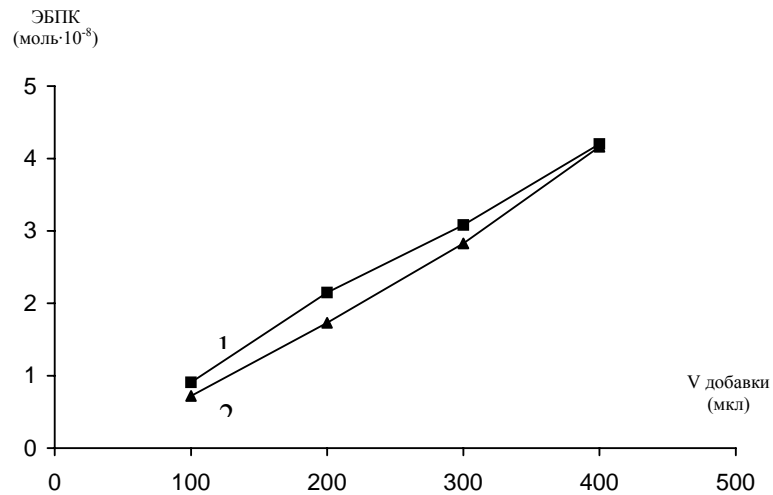


Рисунок 2. Зависимость величины ЭБПК от объема бескислородной добавки:

1 – добавка без загустителя; 2 – вязкая добавка

Тем не менее полученные результаты позволяют утверждать, что занижение показаний кислородного датчика, связанное с увеличением толщины диффузионного слоя индикаторного электрода, в изученном диапазоне вязкости реакционной смеси решающего значения не имеет. Данный эффект, по-видимому, может проявляться лишь при существенно более высокой вязкости смеси, о чем косвенно свидетельствует тенденция к сближению значений ЭБПК при использовании добавок различной вязкости с увеличением их объема.

В то же время следует отметить, что вязкость суспензии митохондрий или тканевого гомогената, вызывающих выраженный эффект быстрого потребления кислорода, значительно ниже, чем вязкость 10%-го раствора крахмала. Поэтому можно считать, что в биохимических исследованиях при использовании закрытых кислородных датчиков влияние вязкости реакционной смеси на результаты измерения потребления кислорода пренебрежимо мало.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Котова Е.И., Ротенберг Ю.С. Исследование быстрого потребления O_2 митохондриями при введении их в аэробную среду инкубации // Биохимия. 1975. Т.20, №4. С. 746 – 747.
2. Миняев М.В. Гальванический кислородный датчик с пониженной собственной кислородной емкостью // Актуальные проблемы биохимии и биотехнологии: сб. науч. тр. / Тверской гос. ун-т. 2001. С. 154 – 161
3. Миняев М.В., Бабалова Е.Б., Ворончихина Л.И. Влияние температуры бескислородной добавки на количественные характеристики эффекта быстрого потребления кислорода // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. 2007. №21(49). С. 75 – 77.
4. Миняев М.В., Ворончихина Л.И. Влияние атмосферного воздуха на результаты измерения потребления кислорода в жидких инкубационных средах с использованием открытых полярографических измерительных ячеек // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2007. Т.41, №2. С. 64 – 67.
5. Панченко Л.Ф., Шпаков А.А. Ферментная, электронномикроскопическая и полярографическая характеристики изолированных митохондрий мозга крыс. I. Новый метод выделения // Цитология. 1973. Т.15, №12. С. 1481 – 1486.

6. Разбавление среды инкубации бескислородной добавкой как вероятная причина «эффекта быстрого потребления кислорода» / М.Б. Белякова, М.В. Миняев, А.А. Егорова, Л.И. Ворончихина // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. 2006. Вып.5, №22. С. 57 – 60.

7. Шпаков А.А. О природе эффекта «быстрого потребления» кислорода при внесении гомогената тканей или суспензии митохондрий в полярографическую ячейку // Биофизика. 1975. Т.20, №3. С. 467 – 471.

8. Шпаков А.А., Косарев А.В. О механизме окислительного фосфорилирования. III. Зависимость функциональных показателей от состава среды инкубации митохондрий // Биофизика. 1977. Т.22, №4. С. 663 – 667.

9. Шпаков А.А., Панченко Л.Ф., Ферментная, электронномикроскопическая и полярографическая характеристики изолированных митохондрий мозга крыс. II. Влияние состава сред выделения // Цитология. 1974. Т.16, №9. С. 1124 – 1129.

THE INFLUENCE OF VISCOSITY OF ANOXIC ADMIXTURE ON QUANTITATIVE CHARACTERISTICS “EFFECT OF QUICK OXYGEN CONSUMPTION”

M.V. Minyaev, T.A. Stepanova

Tver State University

The phenomena of “effect of quick oxygen consumption” with introduction of viscous suspension of mitochondrium into the incubation medium have been modeled. Anoxic admixture with high viscosity heated under 37⁰C was used as a model. It was demonstrated that sesquialteral augmentation of comparative viscosity of reactionary mixture will not change the value of apparent quantity of consumed oxygen.