

УДК 612.202

В. А. Березовский, Е. А. Гойда, И. О. Мукалов, Б. С. Сушко

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ КИСЛОРОДА В ИКРИНКАХ ВЬЮНА

Концентрация кислорода в клетке животного поддерживается двумя основными механизмами — потреблением кислорода и доставкой его. При возрастании скорости потребления кислорода в клетку поступает большее его количество. Согласно диффузионной теории, это обусловлено увеличением концентрационного градиента в клетке, что приводит к увеличению его массопереноса. Установлено, что условия, обеспечивающие доставку кислорода, могут изменяться. Так, клетки и ткани живых организмов не являются гомогенными по отношению к транспорту кислорода, а представляют собой сложное, гетерогенное по составу и структуре образование. Поступление и распределение кислорода может во многом зависеть от проницаемости цитоплазматической мембраны кислороду, скорости массопереноса его внутри клеток.

Мы изучали распределение кислорода внутри икринок речного вьюна (*Misgurnus fossilis*), проницаемость оболочек потоку кислорода и массоперенос его внутри икринок.

Методика исследований

Распределение кислорода в икринках определяли полярографическим методом с помощью платиновых микроэлектродов диаметром кончика 3—5 мкм [8]. Оценку проницаемости оболочек потоку кислорода и скорости массопереноса его внутри икринок осуществляли сравнением экспериментально регистрируемого профиля напряжения кислорода (P_{O_2}), создаваемого икринкой, с теоретическим профилем концентрации кислорода, рассчитанным по законам его диффузии [22].

Икру для опытов получали предварительной стимуляцией самок вьюна гонадотропином в расчете 120—140 ед. на одну самку. Оплодотворение икринок осуществлялось искусственно [3].

При попадании икринок в пресную воду от них отделяется желточная оболочка, образуя между желтком и цитоплазмой перивителлиновое пространство. В процессе дыхания икринки кислород поступает через ее внешнюю мукополисахаридную оболочку, затем проходит через однородное перивителлиновое пространство, и, наконец, через внутреннюю оболочку, включающую цитоплазматическую мембрану, поступает в цитоплазму, где происходит его потребление.

Отделившаяся оболочка вместе с перивителлиновым пространством ограничивает цитоплазму икринки от конвективных возмущений внешней среды, и в ходе экспериментов создаются условия диффузионного переноса кислорода внутрь цитоплазмы. Для измерений использовались как неоплодотворенные, так и оплодотворенные икринки. Диаметр их составлял в среднем 1,8 мм, при этом на цитоплазму приходилось 1,2 мм. В отличие от неоплодотворенных, оплодотворенные икринки имели более выраженное перивителлиновое пространство и практически не отличались размерами.

В опытах икринки располагались на крупноячеистой сетке (1×1 мм) внутри глубокой непроточной камеры с тонкой стеклянной боковой стенкой для оптического контроля. Камеру посредством агарового мостика соединяли с внешним хлорсеребряным референтным электродом. Рабочий платиновый микроэлектрод для определения P_{O_2} стереотаксически под микроскопическим контролем устанавливали в определенных точках над икринкой либо погружали в нее на необходимую глубину. Построение экспериментального профиля напряжения кислорода осуществляли в опытах по регистрируе-

тому диффузионному току (I_d), пропорциональному P_{O_2} в семи точках. Первой точке соответствовал I_d , измеренный на большом расстоянии от икринки, что соответствовало содержанию кислорода в среде. В дальнейшем диффузионный ток измеряли у поверхности икринки (вторая точка), непосредственно под внешней оболочкой при ее проколе (третья точка), в центре перивителлинового пространства (четвертая точка). В пятой точке I_d регистрировали над внутренней оболочкой и мембраной, отделяющей перивителлиновое пространство от цитоплазмы, в шестой — при проколе внутренней

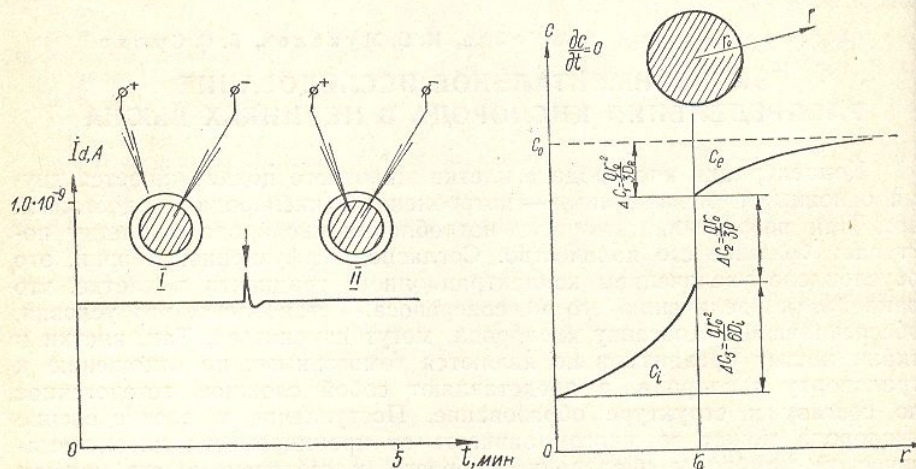


Рис. 1. Влияние положения референтного микроанода (+) на диффузионный ток кислорода (I_d) в икринке.

I — участок хроноамперограммы с внешним микроанодом; II — участок хроноамперограммы с внутренним микроанодом. Стрелкой обозначен момент помещения референтного электрода внутрь икринки.

Рис. 2. Теоретический профиль концентрации кислорода вне и внутри сферической клетки. По вертикали — концентрация кислорода, по горизонтали — расстояние от центра клетки. r_0 — радиус клетки.

оболочки, у ее поверхности, и I_d в центре икринки соответствовал седьмой точке. Измерения и внедрение икринок проводили при температуре инкубационной среды (речная вода) 21—22°C.

Микроэлектроды для измерения кислорода стабилизировались по показаниям путем электрохимического и биологического состаривания [1]. Калибровку микроэлектродов проводили в двух пробах речной воды с известным содержанием кислорода. Измерение диффузионного тока осуществляли в хроноамперометрическом режиме при подаче на полярографическую ячейку напряжения 0,65 В. Диффузионный ток, пропорциональный напряжению кислорода, усиливался (усилитель типа ОР—925, «Radelkis») и регистрировался на самопишущем потенциометре КСП-4. Чувствительность по току в зависимости от размеров активной поверхности рабочей части микроэлектрода составляла 10^{-11} — 10^{-10} А · Торр⁻¹.

С целью минимальной травматизации клетки референтный электрод целесообразно помещать вне икринки. Для проверки правомочности такого методического приема мы использовали микроанод, который при желании располагался либо вне, либо внутри икринки. Референтный микроанод представлял собой стеклянную микропипетку, заполненную 2,8 М КСl, соединение которой с электрической цепью осуществлялось через хлорированную серебряную проволоку. Исследование показало (рис. 1), что при внутриклеточном измерении диффузионного тока кислорода, месторасположение референтного электрода (внутри или вне икринки) не сказывается на величине I_d . Объяснение этому, по-видимому, вытекает из большого сопротивления платинового микроэлектрода в измерительной цепи. При токе силой 10^{-9} А, который близок к максимальным значениям I_d , сопротивление рабочего электрода достигает 650 МОм.

Теоретический профиль концентрации кислорода для икринок мы строили на основании диффузионной теории транспорта кислорода при стационарных условиях диффузии [22]. Для сферической клетки радиусом r_0 , находящейся в перемешиваемой среде с концентрацией кислорода C_0 , уравнения распределения концентрации кислорода

внутри клетки (C_i) и в растворе

$$C_i =$$

где r — расстояние от центра объема клетки ($q < 0$); D_i , в среде; P — коэффициент проницаемости. Профиль концентрации P , q , D_e и D_i , соответствующего следует, что разности точки среды и концентрации (ΔC_2), и разности концентрации и центром клетки (ΔC_3) равны

Зная коэффициент диффузии, используя систему уравнений, можно рассчитать концентрацию кислорода, проникающего в клетку при разности концентраций ΔC_1 , ΔC_2 , ΔC_3 .

Диффузионный ток непосредственно поступает в воду, уравнивая концентрацию кислорода в речной воде с концентрацией в икринке. Через минуту после начала инкубации (напряжения ≈ 150 Торр) напряжению диффузионного тока соответствует P_{O_2} в икринке 40—45 Торр и стабильно желточной оболочке. Регистрация I_d при развитии икринки 5 ч развития, регистрируется кислородом в речной воде.

Результаты исследования являются симметричными, представляя область цитоплазматического пространства.

Приближение микроэлектрода к диффузионному току кислорода на 5—6 Торр сопровождалось изменением

внутри клетки (c_i) и в растворе над клеткой (c_e) имеют вид:

$$c_i = c_0 + \frac{qr_0}{3P} + \frac{q}{6D_i} (r_0^2 - r^2) + \frac{qr_0^2}{3D_e} \quad (1)$$

$$c_e = c_0 + \frac{qr_0^3}{3D_e} \frac{1}{r}, \quad (2)$$

где r — расстояние от центра клетки; q — скорость потребления кислорода единицей объема клетки ($q < 0$); D_i , D_e — коэффициенты диффузии кислорода внутри клетки и в среде; P — коэффициент проницаемости оболочки клетки.

Профиль концентрации кислорода с произвольно выбранными значениями величин P , q , D_e и D_i , соответствующий уравнениям (1) и (2), представлен на рис. 2, из которого следует, что разности концентраций кислорода между концентрацией в удаленной точке среды и концентрацией у поверхности клетки (Δc_1), по обе стороны от мембраны (Δc_2), и разность концентраций кислорода между внутренней поверхностью мембраны и центром клетки (Δc_3) равны соответственно:

$$\Delta c_1 = \frac{qr_0^2}{3D_e}, \quad (3)$$

$$\Delta c_2 = \frac{qr_0}{3P}, \quad (4)$$

$$\Delta c_3 = \frac{qr_0^2}{6D_i}. \quad (5)$$

Зная коэффициент диффузии кислорода в окружающей среде, радиус клетки и используя систему уравнений (3—5), мы можем определить скорость потребления кислорода, проницаемость цитоплазматической мембраны и коэффициент диффузии кислорода внутри клетки при экспериментально измеренных разностях концентраций кислорода Δc_1 , Δc_2 , Δc_3 .

Результаты исследований

Диффузионный ток в первой серии опытов измеряли у икринок непосредственно после попадания их из организма рыбы в речную воду, уравновешенную с воздухом. За счет более высокой концентрации кислорода в речной воде по отношению к внутренней среде рыбы количество кислорода внутри икринок некоторое время увеличивалось. Через минуту после пребывания икринки во внешней среде ($P_{O_2} = 150$ Торр) напряжение кислорода в ее центре, соответствующее измеряемому диффузионному току, не превышало 10—15 Торр. В дальнейшем P_{O_2} в икринке возрастало; через 5 мин P_{O_2} составляло уже 40—45 Торр и стабилизировалось через 15—20 мин после отделения желточной оболочки и образования перивителлинового пространства. Регистрация I_d , проведенная на оплодотворенных инкринках в течение 5 ч развития, не обнаружила существенных различий в напряжении кислорода внутри икринки по отношению к неоплодотворенным.

Результаты исследований показали, что распределение P_{O_2} в икринках является симметричным относительно центра. Исключение составляла область цитоплазматического бугорка на уровне перивителлинового пространства из-за несимметричности этого участка.

Приближение микроэлектрода к поверхности икринки несколько уменьшало диффузионный ток, что соответствовало снижению напряжения кислорода на 5—6 Торр. Прокол электродом внешней оболочки икринки не сопровождался изменением I_d , то есть разность P_{O_2} на этом участке оказа-

лась пренебрежительно малой (менее 1 *Torr*). По мере дальнейшего углубления электрода происходило все более возрастающее снижение P_{O_2} , что свидетельствовало об увеличении градиента P_{O_2} с глубиной погружения. У поверхности внутренней оболочки и цитоплазматической мембраны напряжение кислорода было в среднем на 31 ± 2 *Torr* ниже, чем в окружающей среде. В области цитоплазматического бугорка этот перепад был на 1—2

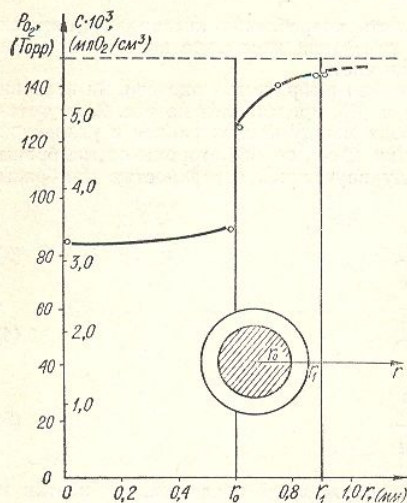


Рис. 3. Суммарный экспериментальный профиль напряжения (концентрации) кислорода икринки.

r_0 — расстояние от центра икринки до внутренней оболочки, r_1 — радиус икринки.

Рис. 4. График зависимости скорости потребления кислорода от времени развития икринки при стимуляции дыхания 2,4-ДНФ.

По вертикали — скорость потребления кислорода в расчете на одну икринку, по горизонтали — время развития. Стрелкой отмечен момент начала инкубации икринок в 10^{-4} М растворе 2,4-ДНФ.

Torr меньше. Наибольшая разность P_{O_2} была зафиксирована на внутренней оболочке, отделяющей цитоплазму и желток икринки от перивителлинового пространства. Средний перепад напряжения кислорода на ней составил 33 ± 5 *Torr*. Разность P_{O_2} внутри цитоплазмы (от внутренней поверхности оболочки до центра икринки) оказалась равной всего лишь 4 ± 2 *Torr*. Напряжение кислорода в центре икринки варьировало от 80 до 90 *Torr*, что при усреднении составило 85 ± 3 *Torr*. На рис. 3 представлен экспериментальный суммарный профиль P_{O_2} (концентрации кислорода) икринки в уравновешенной с воздухом среде.

При возрастании скорости потребления кислорода напряжение кислорода в измеряемых точках внутри и над поверхностью икринки снижалось. Для усиления интенсивности дыхания, после образования перивителлинового пространства, икринку помещали в среду, содержащую 10^{-4} М 2,4-ДНФ. На рис. 4 представлены зависимости скорости потребления кислорода от времени инкубации икринок в растворе 2,4-ДНФ и от времени их развития. Данные получены в прямых опытах по измерению интенсивности дыхания икринок в полярографической ячейке. Вначале скорость дыхания активируется, а после получасовой экспозиции икринок в 2,4-ДНФ начинает снижаться. В связи с этим для исследований были выбраны две группы икринок в период

первых часов развития икринки в среде 2,4-ДНФ. В последующих исследованиях.

С возрастанием скорости потребления кислорода напряжение кислорода увеличивается. Через 15 мин P_{O_2} в центре икринок снижалось до 64 ± 5 и 17 ± 8 *Torr*. Напряжение кислорода остается постоянным, общий перепад (разница напряжений кислорода между внешней средой и центром икринки) возрастает. Профили P_{O_2} после этого действия также изменяются (рис. 5). Достоверное снижение P_{O_2} у поверхности икринки (возле ее внешней оболочки) наблюдалось для икринок, обработанных 2,4-ДНФ в течение 30

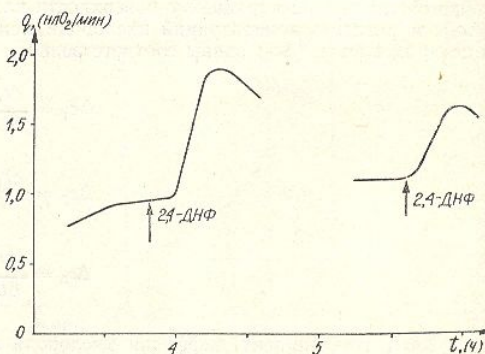


Рис. 5. Суммарные профили напряжения (концентрации) кислорода икринки при 15 мин (а) и 30 мин инкубации икринок в 2,4-ДНФ. Обозначения см. рис. 2.

Перепад напряжения кислорода и скорости потребления. Это может говорить о том, что сопротивление потоку кислорода к цитоплазме.

Напряжение кислорода в фиброцитной оболочке после 15 и 30 мин инкубации

Объект исследования	1
Интактные икринки	150±1
Икринки в 2,4-ДНФ 15 мин	150±1
Икринки в 2,4-ДНФ 30 мин	150±1

Средние значения разности концентраций кислорода между окружающей средой и оболочкой ($\Delta P_{O_2}^I$) по мере

о углу-
Р_{О₂}, что
ения. У
напряже-
жающей
а 1—2

первых часов развития, подвергшиеся соответственно 15 и 30 мин обработке 2,4-ДНФ. В табл. 1 приведены результаты этих исследований.

С возрастанием скорости потребления кислорода градиент P_{O_2} увеличивается. Через 15 и 30 мин от начала воздействия 2,4-ДНФ P_{O_2} в центре икринок снижаются и в среднем достигают соответственно 64 ± 5 и 17 ± 8 Торр. В связи с тем, что в окружающей среде напряжение кислорода остается постоянным, общий перепад P_{O_2} (разница напряжений кислорода между внешней средой и центром икринки) возрастает. Профили P_{O_2} после этих воздействий также изменяются (рис. 5). Достоверное уменьшение P_{O_2} у поверхности икринки (возле ее внешней оболочки) наблюдалось только для икринок, обработанных 2,4-ДНФ в течение 30 мин.

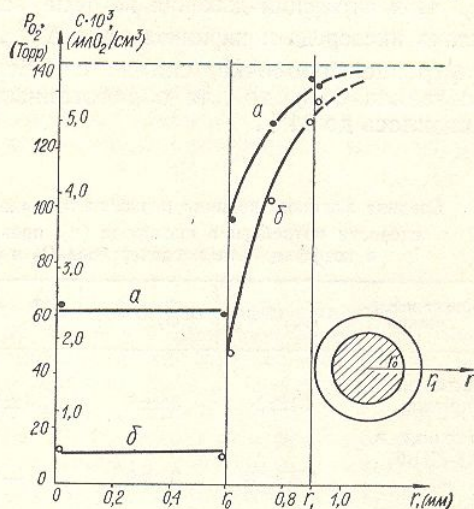


Рис. 5. Суммарные профили напряжения (концентрации) кислорода икринки при 15 мин (а) и 30 мин (б) инкубации икринок в 2,4-ДНФ.

Обозначения см. рис. 2.

Перепад напряжения кислорода на внешней оболочке при интенсификации скорости потребления кислорода оставался по-прежнему малым. Это может говорить о том, что внешняя оболочка не вносит существенного сопротивления потоку кислорода. Скачок P_{O_2} , как и у интактных икринок, наблюдается только на внутренней оболочке, прилегающей к цитоплазме.

Таблица 1

Напряжение кислорода в фиксированных точках измерения у интактных икринок выюна после 15 и 30 мин экспозиции их в 10^{-4} М растворе 2,4-ДНФ

Объект исследования	Точки измерений P_{O_2} (Торр)						
	1	2	3	4	5	6	7
Интактные икринки	150 ± 1	144 ± 1	144 ± 2	141 ± 2	125 ± 2	89 ± 2	85 ± 3
Икринки в 2,4-ДНФ 15 мин	150 ± 1	143 ± 1	145 ± 3	129 ± 5	95 ± 12	61 ± 9	64 ± 5
Икринки в 2,4-ДНФ 30 мин	150 ± 1	137 ± 1	129 ± 1	101 ± 7	47 ± 3	15 ± 7	17 ± 8

Средние значения разностей напряжения кислорода, соответствующие концентрационным перепадам его Δc_1 , Δc_2 , Δc_3 , приведены в табл. 2. Разность P_{O_2} между окружающей средой и поверхностным слоем внутренней оболочки ($\Delta P_{O_2}^1$) по мере увеличения срока пребывания икринок в 2,4-ДНФ

возрастала. На внутренней оболочке градиент напряжения кислорода при активации дыхания оставался без изменений, что выражалось в постоянности величины $\Delta P_{O_2}^2$ — разности P_{O_2} по обе стороны от внутренней оболочки. Внутри цитоплазмы перепад P_{O_2} в этих случаях не обнаруживался ($\Delta P_{O_2}^3 = 0$); напряжение кислорода во всей толще цитоплазмы практически одинаково.

При активации дыхания на фоне возрастания общего перепада напряжения кислорода в икринках доля $\Delta P_{O_2}^2$, приходящаяся на перепад P_{O_2} на внутренней оболочке, снижается. Если для интактных икринок она составила 54%, то для обработанных в течение 30 мин 2,4-ДНФ — снизилась до 24%.

Таблица 2

Средние значения величин разности напряжений кислорода ($\Delta P_{O_2}^1$, $\Delta P_{O_2}^2$, $\Delta P_{O_2}^3$), скорости потребления кислорода (q), проницаемости внутренней оболочки (P) и коэффициента массопереноса O_2 в цитоплазме для икринок вьюна

Объект исследования	$\Delta P_{O_2}^1$ (Торр)	$\Delta P_{O_2}^2$ (Торр)	$\Delta P_{O_2}^3$ (Торр)	$q \cdot 10^6$ (мл O_2 /см ³ ·с)	$P \cdot 10^4$ (см/с)	$D_i \cdot 10^5$ (см ² /с)
Интактные икринки	31±2	35±5	4±2	2,0±0,1	2,9±0,2	7,7±1,2
Икринки в 2,4-ДНФ 15 мин	55±18	34±9	—	3,5±1,2	5,4±0,3	—
Икринки в 2,4-ДНФ 30 мин	103±1	32±6	—	6,6±0,6	10,7±1,0	—

Примечание: $\Delta P_{O_2}^1$ — перепад напряжения кислорода в перивителлиновом пространстве; $\Delta P_{O_2}^2$ — на внутренней оболочке; $\Delta P_{O_2}^3$ — внутри цитоплазмы.

Принимая, что коэффициенты распределения кислорода в окружающей среде и икринке приблизительно равны, на основании разностей концентрации кислорода — Δc_1 , Δc_2 , Δc_3 мы рассчитали скорости потребления кислорода единицей объема цитоплазмы (q), коэффициенты проницаемости к кислороду со стороны внутренней оболочки (P) и коэффициенты диффузии кислорода внутри цитоплазмы (D_i) по формулам (3—5). В табл. 2 приведены значения полученных величин.

При увеличении сроков обработки икринок 2,4-ДНФ скорость потребления кислорода, рассчитанная на основании диффузионной теории, возрастала. Расчетная величина q оказалась близкой к данным, полученным в прямых опытах по измерению скорости дыхания икринок в полярографической ячейке.

Коэффициент проницаемости внутренней оболочки для кислорода у интактных икринок был относительно низким, его средняя величина составляла $(2,9 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$ см·с⁻¹. При усилении дыхания в 3,3 раза проницаемость внутренней оболочки к кислороду увеличилась в 3,7 раза. Расчет коэффициента диффузии кислорода в цитоплазме интактных икринок показал, что D_i гораздо выше коэффициента его диффузии в водном растворе при аналогичной температуре. Средняя величина для интактных икринок составляла $(7,7 \pm 1,2) \cdot 10^{-5}$ см²·с⁻¹. Из-за отсутствия концентрационного градиента кислорода рассчитать ко-

эффициент его диффузии в дыхания оказалось невозможным.

На основании измерений в икринках удалось установить, что в участках икринки отличаются сферическом гомогенном то внешней оболочке икринки в направлении потока кислорода, а также в то же время значительный перепад P_{O_2} на внутренней оболочке и цитоплазме. Полученный перепад P_{O_2} не соответствует предсказаниям диффузионной теории переноса в неподвижной среде.

Обсуждение

В настоящее время много теорий, объясняющих путь транспорта кислорода в клетке. Существуют теории облегченного пассивного транспорта его [18, 20], косвенные доказательства в цитоплазме крупных клеток. Цитоплазматической мемброне при этом не указывается, что клеточная мембрана не пропускает кислороду по отношению к диффузии и теоретически не может быть источником сопротивления диффузионного сопротивления.

Результаты проведенных исследований прилежащих к икринке слоев пространства кислород не проникает в это пространство. В этом внешняя оболочка икринки не пропускает кислород на этих участках. Резкий перепад P_{O_2} . Согласно теории, деление должно вызывать сопротивление, а в цитоплазматической мембране не происходит хождения молекул кислорода. Только диффузионное сопротивление на внутренней оболочке P_{O_2} регистрировалось при регистрации кислорода внутри цитоплазмы.

Высокий перепад P_{O_2} также при интенсивном дыхании при отсутствии существенного перепада P_{O_2} со стороны оболочек икринки экспериментально показано, нарушает явление циклического движения. Из этого следует, что на внутренней оболочке икринки сопротивление оболочки потоку кислорода в цитоплазме.

при коэффициент его диффузии в цитоплазме икринок с повышенным уровнем дыхания оказалось невозможным.

На основании измеренного в экспериментах профиля P_{O_2} в икринках удалось установить, что распределение кислорода в различных участках икринки отличается от его диффузионного распределения в сферическом гомогенном теле («идеальной клетке»). Градиент P_{O_2} на внешней оболочке икринки практически отсутствует даже при увеличении потока кислорода, обусловленного активацией дыхания. В то же время значительный перепад P_{O_2} оказался сосредоточенным на внутренней оболочке и цитоплазматической мембране, прилегающих к цитоплазме. Полученный на реальных икринках профиль распределения P_{O_2} не соответствует теоретически ожидаемому, вытекающему из диффузионной теории перемещения молекул кислорода в гомогенной и неподвижной среде.

Обсуждение результатов исследований

В настоящее время известно, что в живых системах диффузионный путь транспорта кислорода не является единственно возможным. Существуют теории облегченной диффузии кислорода, основанные на пассивном транспорте его посредством различных переносчиков [16, 18, 20], косвенные доказательства конвективного переноса кислорода в цитоплазме крупных клеток [5, 6, 19]. В отношении роли оболочек и цитоплазматической мембраны в транспорте кислорода в клетку высказываются противоположные взгляды. Некоторые исследователи считают, что клеточная мембрана не является существенным барьером кислороду по отношению к водной среде [13, 14]. Другие — экспериментально и теоретически доказывают наличие на мембране большого диффузионного сопротивления молекулам кислорода [4, 10, 11].

Результаты проведенных нами исследований показывают, что в прилежащих к икринке слоях водной среды и внутри перивителлинового пространства кислород транспортируется диффузионным путем. При этом внешняя оболочка не оказывает влияния на распределение кислорода на этих участках. На внутренней же оболочке наблюдается резкий перепад P_{O_2} . Согласно диффузионной теории, такое распределение должно вызываться тем, что на участке внешней оболочки отсутствует сопротивление потоку кислорода, а на внутренней оболочке и цитоплазматической мембране создаются условия затрудненного прохождения молекул кислорода по сравнению с водной средой. При наличии только диффузионного переноса кислорода и отсутствии сопротивления на внутренней оболочке икринки, вместо значительного перепада P_{O_2} регистрировалось бы лишь увеличение градиента напряжения кислорода внутри цитоплазмы (в результате потребления кислорода).

Высокий перепад P_{O_2} на внутренней оболочке может возникать также при интенсивном перемешивании содержимого клетки, даже при отсутствии существенного диффузионного сопротивления кислороду со стороны оболочек и цитоплазматической мембраны клетки. Экспериментально показано, что цитоплазма многих крупных клеток обнаруживает явление циклозиса — состояния непрерывного интенсивного движения. Из этого следует, что наличие высокого градиента P_{O_2} на внутренней оболочке икринки может быть результатом как сопротивления оболочки потоку кислорода, так и активного перемещения цитоплазмы.

Значительная разность P_{O_2} на внутренней оболочке икринок и низкие значения градиента P_{O_2} в цитоплазме, присущи не только исследуемому объекту. Так, в водной среде, уравновешенной с воздухом атмосферы ($P_{O_2}=150$ Торр), на оболочке яиц морского ежа (*Echinorachius mirabilis*) перепад напряжения кислорода составил 70–80 Торр [10], а на оболочке куриных ооцитов он достиг значений более 140 Торр [9]. Перепад P_{O_2} на мембране мышечных клеток теплокровного животного в зависимости от P_{O_2} межклеточной среды составлял 50 и более Торр [23].

Расчет, основанный на диффузионной теории, показал, что проницаемость внутренней оболочки для кислорода достаточно низкая; коэффициент проницаемости не превышает $3 \cdot 10^{-4}$ см $\cdot$ с $^{-1}$ для нативных икринок. В литературе есть данные о наличии существенного барьера для кислорода со стороны цитоплазматической мембраны клеток. Так некоторые исследователи оценивают коэффициент диффузии кислорода в цитоплазматической мембране в 10^{-10} – 10^{-11} см 2 ·с $^{-1}$ [4, 6].

При рассмотрении диффузии газов через различные тонкие органические пленки, было показано, что проницаемость пленок во многом зависит от структуры их материала. Чем более упорядочены молекулы и чем длиннее их цепи, тем менее проницаемы они для газов [7]. Существованию гораздо большего препятствия кислороду со стороны цитоплазматических мембран клеток придается определенный физиологический смысл. Благодаря гетерогенности проницаемости в живой ткани к кислороду, молекулы его могут более равномерно доходить до близлежащих и отдаленных от капилляров клеток [17]. Существует также теория, согласно которой порядок реакции потребления кислорода тканью является функцией проницаемости клеточных мембран кислороду [11]. Известные в настоящее время значения коэффициентов диффузии кислорода в различных тканях, характеризующие скорее суммарный коэффициент для всей толщи ткани без учета ее гетерогенности, отличаются большим разбросом — от 10^{-4} до 10^{-8} см 2 ·с $^{-1}$ [21].

Определенный интерес представляют результаты исследований P_{O_2} , проведенные на телях эритроцитов и искусственных мембранах [14]. Применяя оптический метод, основанный на гашении флуоресценции пирена кислородом, авторы приходят к выводу об отсутствии препятствия кислороду со стороны мембран. На наш взгляд, одним из недостатков этих экспериментов является то, что молекулам кислорода достаточно войти в фосфолипидную мембрану, чтобы вызвать гашение флуоресценции. В то же время, переход кислорода из слоя фосфолипидов, где он лучше растворяется, в раствор может быть затруднен [2].

Регистрируемую на внутренней оболочке икринок значительную разность P_{O_2} можно попытаться объяснить и с помощью других позиций. Прежде всего, исходя из предположения о неодинаковом коэффициенте абсорбции кислорода в различных точках измерения. Однако большой перепад P_{O_2} трудно отнести за счет различного распределения кислорода внутри и вне клетки. Известно, что липидные элементы клетки растворяют кислород в несколько раз лучше, чем вода [12], но их количество ничтожно — вода составляет около 80% веса клетки. Резкое уменьшение диффузионного тока на внутренней оболочке икринок может возникать и за счет увеличения омического сопротивления в полярнографической цепи, вносимого самой мембраной. Для проверки этого предположения в специальных опытах применяли референтный микроэлектрод, который помещали внутрь икринок. Пере-

шение такого микроан-

няло величину диффузии. Расчеты, основанные на этом, выполняются только путем деления разности потенциалов на коэффициент проницаемости. Практически, при усилении на внутренней оболочке увеличению проницаемости курицы также были. Причем, проницаемость рода уменьшалась при изменении проницаемости, вероятно, что проницаемости диффузионной цитоплазмы на фоне кислорода.

Незначительный перепад P_{O_2} , приводит к выводу, что проницаемость внутренней оболочки икринок. Расчетный коэффициент проницаемости $7,7 \cdot 10^{-5}$ см 2 ·с $^{-1}$ 2,4-ДНФ стремится к нулю. В экспериментах по изучению проницаемости и на основании полученных данных, показано, что D_{O_2} в ткани меньше, чем в воде. В связи с этим «активного» внутреннего переноса кислорода. Поздних работами имидости пассивного опосредования [15, 20].

Результаты наших исследований показывают, что распределение кислорода в клетках исходит гораздо быстрее, чем коэффициент диффузии. Циклозиса следуют и гидродинамическое «коэффициент диффузии» «коэффициент диффузии» этому термину, по величине кислорода в клетках конвективным переносом, по облегченной диффузии.

1. Прямыми измерениями перепада внешней, уравновешенной с атмосферой сферической оболочки, который составил 65 Торр, который превышает 140 Торр.
2. На внешней оболочке.
3. Основной перепад.

шение такого микроанода за внутреннюю оболочку икринки не изменяло величину диффузионного тока.

Расчеты, основанные на предположении о том, что кислород перемещается только путем диффузии, указывают на изменчивость коэффициента проницаемости внутренней оболочки кислороду. Коэффициент проницаемости кислорода возрастает при стимуляции дыхания икринки. Практически, при усилении дыхания более чем в три раза перепад P_{O_2} на внутренней оболочке оставался без изменений, что эквивалентно увеличению проницаемости оболочки к кислороду. В опытах с ооцитами курицы также было обнаружено изменение величины P для оболочки. Причем, проницаемость для входящего в клетку потока кислорода уменьшалась при частичном подавлении скорости потребления кислорода цианидом [9]. В настоящее время причины, приводящие к изменению проницаемости клеточных оболочек, назвать не просто. Вероятно, что проницаемость к кислороду может быть сопряжена с изменениями диффузионного сопротивления оболочек, скорости движения цитоплазмы на фоне изменяющейся интенсивности потребления кислорода.

Незначительный перепад P_{O_2} , обнаруженный в цитоплазме икринок вьюна, приводит к мысли о том, что кислород, продиффундировав через внутреннюю оболочку, очень быстро транспортируется внутри икринки. Расчетный коэффициент диффузии достигает у интактных икринок $7,7 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$, а в отдельных случаях и при воздействии 2,4-ДНФ стремится к гораздо большим величинам. В известных экспериментах по изучению дыхания тканевых кусочков различной толщины и на основании измерений величин критического P_{O_2} было показано, что D_{O_2} в ткани печени, миокарда, почки в 3—7 раз выше, чем в воде. В связи с этим авторы высказали гипотезу о существовании «активного внутриклеточного транспорта кислорода» — конвективного переноса кислорода движущейся цитоплазмой [19], а в более поздних работах ими был представлен ряд доказательств возможности пассивного опосредованного транспорта кислорода в ткани и клетках [15, 20].

Результаты наших опытов также подтверждают то обстоятельство, что распределение кислорода в цитоплазме икринок вьюна происходит гораздо быстрее, чем в водной неперемешиваемой среде. Высокий коэффициент диффузии кислорода внутри клеток с учетом явления циклозиса следует рассматривать как комбинацию диффузионного и гидродинамического переноса кислорода. В таком случае понятие «коэффициент диффузии кислорода» целесообразно заменить понятием «коэффициент переноса кислорода». Величина, соответствующая этому термину, по-видимому, наиболее полно характеризует транспорт кислорода в клетках и живой ткани, где, наряду с диффузионным и конвективным переносом, возможно и распределение кислорода по типу облегченной диффузии.

Выводы

1. Прямыми полярографическими измерениями показано, что между внешней, уравновешенной с воздухом, средой и центральным участком сферической икринки вьюна существует перепад P_{O_2} около 65 Торр, который при стимуляции дыхания 2,4-ДНФ возрастает до 130 и более Торр.
2. На внешней оболочке перепад P_{O_2} не регистрируется.
3. Основной перепад напряжения кислорода (54%) происходит на

внутренней оболочке икрилки, которая, по-видимому, является диффузионным барьером для молекул кислорода. При стимуляции дыхания 2,4-ДНФ перепад P_{O_2} на внутренней оболочке не изменяется.

4. Коэффициент проницаемости внутренней оболочки интактных икринок для кислорода, рассчитанный исходя из теории диффузии, оказался равным $(2,9 \pm 0,2) \cdot 10^{-4} \text{ см} \cdot \text{с}^{-1}$ и возрастал по мере увеличения скорости потребления кислорода икринками при стимуляции дыхания 2,4-ДНФ.

5. В различных участках цитоплазмы икрилки напряжение кислорода практически одинаково.

6. Более высокие значения D_{O_2} в цитоплазме икрилки по сравнению с D_{O_2} в воде могут быть следствием комбинации диффузионного и гидродинамического переноса кислорода.

Литература

1. Березовский В. А. Электрохимические и биологические особенности хроноамперометрического определения кислорода в биологических объектах.— В кн. Полярографическое определение кислорода в биологических объектах. Киев: Наукова думка, 1968, с. 98—122.
2. Березовский В. Я., Горчаков В. Ю., Сушко Б. С. Кинетика транспорта кислорода через осадочные фосфолипидные пленки.— Физиол. журн. АН УССР, 1977, 23, № 5, с. 641—644.
3. Детлаф Т. А. (отв. ред.). Объекты биологии развития. М.: Наука, 1975.—579 с.
4. Динкевич Ф. Э. Исследование электрохимических свойств переносчиков кислорода. Автореф. дис. ... канд. хим. наук.—Днепропетровск, 1973.—29 с.
5. Камия М. Движение протоплазмы.— М.: ИЛ, 1962. 306 с.
6. Коваленко Е. А., Березовский В. А., Эпштейн И. М. Полярографическое определение кислорода в организме.— М.: Медицина, 1975.—232 с.
7. Рейтлингер С. А. Проницаемость полимерных материалов.— М.: Химия, 1974.—269 с.
8. Сушко Б. С. К методике изготовления открытых платиновых микроэлектродов для хроноамперометрического определения напряжения кислорода в клетках и тканях.— В кн.: Полярографическое определение кислорода в биологических объектах. Киев: Наукова думка, 1972, с. 108—109.
9. Сушко Б. С. Особенности транспорта кислорода через оболочку ооцита: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.—Киев, 1976.—24 с.
10. Сушко Б. С. Порівняльна оцінка проникності оболонки, цитоплазматичної мембрани та цитоплазми яєць морського їжака до кисню.— В кн.: Х з'їзд Респ. фізіол. т-ва. Одеса, 1977, с. 313.
11. Эпштейн И. М. Роль барьерной функции плазматической мембраны в механизме регулирования тканевого дыхания.— В кн.: Биологические мембраны в норме и патологии. М., 1972, с. 69—70.
12. Battiro R., Evans F. D., Donforth W. F. The solubilities of seven gases in olive oil with reference to theories of transport through the cell membrane.— J. Amer. Chem. Soc., 1968, 45, p. 830—833.
13. Chang B. H., Fleirthman M., Miller C. E. Oxygen mass transfer rates in intact red blood cells.— In: Intern. symp. on Oxygen Transport to Tissues. South Carolina USA, 1973, p. 24.
14. Fischhoff S., Vanderkooi J. M. Oxygen diffusion in biological and artificial membranes determined by the fluorochrome pyrene.— J. Gen. Physiol., 1975, 67, p. 663—676.
15. Gold H. J. Kinetics of facilitated diffusion of oxygen in tissue slices.— J. Theor. Biol., 1969, 23, p. 455—462.
16. Gurtner G., Burns B. Physiological evidence consistent with the presence of a specific O_2 carrier in the placenta.— J. Appl. Physiol., 1975, 39, N 5, p. 728—734.
17. Hills B. A. Respiration of tissues in a medium of heterogeneous permeability.— Bull. Wath. Biophys., 1970, 32, N 2, p. 219—235.
18. Kreuzer F. Theoretical and experimental aspects of oxygen transport in blood and muscle.— In: Biophys. of Membrane Transport. School proceedings, part 1. Wroclaw, 1976, p. 41—89.
19. Longmuir J. S., Bourke A. The measurement of the diffusion of oxygen through respiring tissue.— Biochem. J., 1960, 76, p. 225—229.
20. Longmuir J. S., Stella Sun, Soucie W. Possible role of cytochrome P-450 as a tissue oxygen carrier.— In: Oxydases and related redox systems. Baltimore, 1973, 2, p. 451—461.

21. McDongall, Cabe M. Diff. 215, N. 9, p. 1173—1178.
22. Rashevsky N. Mathematic Chicago: The University of Chicago Press, 1961.
23. Whalen W. J., Nair P. In guinea pig.—Circulation Res., 1968, 23, p. 1173—1178.

Отдел физиологии и биологии
Институт физиологии им. А.
АН УССР, Киев

V. A. Berezovskiy

EXPERIMENTAL
STUDY OF OXYGEN

The values of membrane permeability inside the *Misgurnus fossilis* oocyte. The results of studies are presented on the effect of oxygen pressure (P_{O_2}) on the rate of oxygen pressure (P_{O_2}) creation calculated by the laws of diffusion; the outer membrane adjoining the egg and internal membrane adjoining the cytoplasm. The distribution changes sharply. The effect of diffusion barrier on the dynamic transfer inside the cell.

Department of Physiology of
A. A. Bogomoletz Institute of
Academy of Sciences, Ukrainian

21. McDongall, Cabe M. Diffusion coefficient of oxygen through tissues.—Nature, 1967, 215, N. 9, p. 1173—1178.
22. Rashevsky N. Mathematical biophysics. Physicomathematical foundations of biology.—Chicago: The University of Chicago press,—1938.—340 p.
23. Whalen W. J., Nair P. Intracellular P_{O_2} and its regulation in resting skeletal of the guinea pig.—Circulation Res., 1967, 21, p. 251—261.

Отдел физиологии дыхания
Институт физиологии им. А. А. Богомольца
АН УССР, Киев

Поступила в редакцию
27.XII 1977 г.

V. A. Berezovsky, E. A. Goida, I. O. Mukalov, B. S. Sushko

EXPERIMENTAL STUDY OF OXYGEN DISTRIBUTION IN MISGURNUS FOSSILIS EGGS

Summary

The values of membrane permeability to the oxygen flow and rate of O_2 mass transfer inside the *Misgurnus fossilis* eggs are evaluated at different levels of oxygen uptake intensity. The results of studies are obtained by comparing the experimentally recorded profile of oxygen pressure (P_{O_2}) created by an egg with the theoretical profile of O_2 concentration calculated by the laws of oxygen diffusion. It is shown that in the aqueous medium layer adjoining the egg and inside the perivitelline cell space oxygen is transported by means of diffusion; the outer membrane has no effect on O_2 distribution. However beyond the internal membrane adjoining directly the yolk and cytoplasm of the egg the picture of O_2 distribution changes sharply. On the internal membrane a sharp overfall of P_{O_2} takes place and in the cytoplasm the P_{O_2} gradient approaches 0. A problem concerning the existence of diffusion barrier on the egg internal membrane and on the possibility of O_2 hydrodynamic transfer inside the cell under study is discussed.

Department of Physiology of Respiration,
A. A. Bogomoletz Institute of Physiology,
Academy of Sciences, Ukrainian SSR, Kiev