



Оценку профилей концентрации кислорода осуществляли полярографически, с помощью остекленного платинового микроэлектрода с диаметром кончика 3–5 мкм при температуре 21 °С. Электроды изготавливали, состаривали и калибровали по методу, описанному ранее [3, 15, 16]. Диффузионный ток кислорода при потенциале поляризации 0,55–0,65 В регистрировали с помощью усилителя постоянного тока ОР-925 фирмы «Раделикс» и потенциометра КСП-4. В зависимости от размеров рабочей поверхности микроэлектрода чувствительность установки по току составляла  $10^{-12}$ – $10^{-11}$  А/Па. Интенсивность потребления кислорода икринкой изменяли путем помещения ее в среду с добавлением 2,4-динитрофенола в концентрации  $10^{-4}$  моль на 15 и 30 мин. Контроль интенсивности дыхания осуществляли в полярографической ячейке. Экспериментальный профиль концентрации строили на основании измерения диффузионных токов кислорода в 7–8 точках стационарной системы, среда инкубации — икринка. Принималось, что коэффициенты растворимости кислорода в среде, перивителлиновом пространстве и цитоплазме отличаются незначительно. В этом случае концентрация кислорода  $1 \cdot 10^{-3}$  мл/см<sup>3</sup> создается при парциальном давлении кислорода около 35 гПа. Ожидаемый профиль концентрации кислорода строили на основании диффузионной теории при стационарных условиях [34]. Для сферической клетки радиусом  $r_0$ , находящейся в неперемешиваемой среде с концентрацией кислорода  $C_0$ , уравнение распределения концентрации кислорода в растворе над клеткой имеет вид:

$$C_e = C_0 + \frac{qr_0^3}{3D_e} \cdot \frac{1}{r} \quad (1)$$

внутри клетки определяется выражением:

$$C_i = C_0 + \frac{qr_0}{3p} + \frac{q}{6D_i} (r_0^2 - r^2) + \frac{qr_0^2}{3D_e} \quad (2)$$

где:  $r$  — расстояние от центра клетки,  $q$  — скорость потребления кислорода единицей объема клетки,  $D_i$ ,  $D_e$  — коэффициенты диффузии кислорода внутри клетки и в среде инкубации,  $p$  — коэффициент проницаемости оболочки клетки.

Сопоставление экспериментально измеренных и рассчитанных профилей концентрации осуществляли графически.

**Результаты и их обсуждение.** В процессе дыхания икринки свободный кислород среды, уравновешенной с атмосферным воздухом, поступает внутрь клетки через внешнюю оболочку, однородное водное перивителлиновое пространство, внутреннюю оболочку, включающую плазматическую мембрану и прилежащие к ней неперемешиваемые слои. Парциальное давление кислорода в среде инкубации при атмосферном давлении 992 гПа и температуре 21 °С составляет около 200 гПа.

По мере приближения кончика микроэлектрода к поверхности икринки, находящейся в состоянии относительного покоя, отмечается небольшое снижение концентрации кислорода, которое свидетельствует о наличии дыхания клетки. При проколе микроэлектродом внешней оболочки существенных изменений парциального давления кислорода не происходит, но при дальнейшем продвижении электрода в перивителлиновом пространстве к внутренней оболочке (рис. 1), парциальное давление кислорода отчетливо снижается. Степень этого снижения составляет около 33 гПа. Снижение регистрируется на расстоянии 0,03 см, а средний градиент  $P_{O_2}$  на этом участке составляет  $1,1 \cdot 10^3$  гПа/см.

При проколе микроэлектродом внутренней оболочки, включающей цитоплазматическую мембрану, регистрируется наиболее резкий перепад парциального давления кислорода, достигающий 48 гПа. Поскольку этот перепад локализуется на расстоянии не более 0,002 см, градиент  $P_{O_2}$  на этом участке оказывается в 25 раз больше, чем в перивителлиновом пространстве, достигая  $2,4 \cdot 10^4$  гПа/см.

Дальнейшее продвижение микроэлектрода от периферии до геометрического центра клетки позволило обнаружить, что парциальное давление кислорода в различных участках цитоплазмы, равноудаленных от источника кислорода, характеризуется ничтожно малым снижением, порядка 3 гПа на расстоянии 0,06 см, что соответствует среднему градиенту около  $0,09 \cdot 10^3$  гПа/см. Таким образом, максимальный градиент  $P_{O_2}$  в покоящейся клетке зарегистрирован на участке, включающем плазматическую мембрану. Минимальные величины градиен-

та, характеризующиеся в центре цитоплазмы. Проведение  $P_{O_2}$  в неоплодотворенной икринке при напряжении кислорода около 300 гПа.

В состоянии относительного покоя икринка находится на минимальном уровне потребления кислорода, который может быть достигнут.

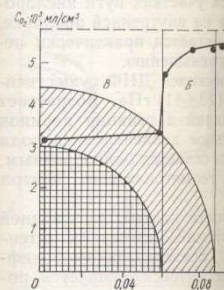


Рис. 1. Профиль концентрации кислорода в перивителлиновом пространстве и в цитоплазме икринки до снятия профиля  $O_2$  над клеткой.

Рис. 2. Профили концентрации кислорода в перивителлиновом пространстве и в цитоплазме икринки после снятия профиля  $O_2$  над клеткой.

ли распределения и величины парциального давления кислорода в клетке существенно меняются после стимуляции дыхания. После 15 и 30 мин апликации микроэлектрода к поверхности икринки парциальное давление кислорода практически отсутствует, а градиент  $P_{O_2}$  увеличивается в 2 раза, достигая  $2,2 \cdot 10^3$  гПа/см. При этом же, как и в состоянии покоя, на значительное увеличение парциального давления кислорода в цитоплазме не происходит.

После 15 мин стимуляции микроэлектрода к поверхности икринки парциальное давление кислорода практически отсутствует, а градиент  $P_{O_2}$  увеличивается в 2 раза, достигая  $2,2 \cdot 10^3$  гПа/см. При этом же, как и в состоянии покоя, на значительное увеличение парциального давления кислорода в цитоплазме не происходит.

После 30 мин стимуляции микроэлектрода к поверхности икринки парциальное давление кислорода практически отсутствует, а градиент  $P_{O_2}$  увеличивается в 2 раза, достигая  $2,2 \cdot 10^3$  гПа/см. При этом же, как и в состоянии покоя, на значительное увеличение парциального давления кислорода в цитоплазме не происходит.

существовали полярографически, с по-  
да с диаметром кончика 3—5 мкм  
составляли и калибровали по мето-  
ток кислорода при потенциале поля-  
усилителя постоянного тока ОР-925  
в зависимости от размеров рабочей по-  
новки по току составляла 10—12  
икринки изменяли путем помещения  
центрации 10<sup>-4</sup> моль на 15 и 30 мин.  
полярографической ячейке. Экспери-  
ровании измерения диффузионных то-  
и, среда инкубации — икринка. При-  
рода в среде, перивителлиновом про-  
). В этом случае концентрация кис-  
давления кислорода около 35 гПа.  
строили на основании диффузион-  
сферической клетки радиусом  $r_0$ , на-  
ицей кислорода  $C_0$ , уравнение рас-  
клетки имеет вид:

$$\frac{1}{r} \quad (1)$$

$$r^2 + \frac{qr_0^2}{3D_e} \quad (2)$$

потребления кислорода единицей  
кислорода внутри клетки и в среде  
и клетки.

рассчитанных профилей концент-

ессе дыхания икринки сво-  
с атмосферным воздухом,  
оболочку, однородное водное  
ую оболочку, включающую  
к ней неперемешиваемые  
среде инкубации при атмо-  
21°C составляет около

электрода к поверхности  
тельного покоя, отмечается  
ода, которое свидетельству-  
микроэлектродом внешней  
льного давления кислорода  
жени электрода в периви-  
ючке (рис. 1), парциальное  
степень этого снижения со-  
трируется на расстоянии  
этом участке составляет

ней оболочки, включающей  
ся наиболее резкий пере-  
игающий 48 гПа. Посколь-  
и не более 0,002 см, гра-  
б раз больше, чем в пери-  
гПа/см.

ода от периферии до гео-  
аружить, что парциальное  
цитоплазмы, разноудален-  
ся ничтожно малым сни-  
ем, что соответствует сред-  
м образом, максимальный  
ирован на участке, вклю-  
ельные величины градиен-

та, характеризующиеся в 100 раз меньшими значениями, обнаружены  
внутри цитоплазмы. Проведенные измерения показали, что среднее  
 $P_{O_2}$  в неоплодотворенной икринке вьюна при инкубации в среде с на-  
пряжением кислорода около 200 гПа составляет  $(113 \pm 4)$  гПа.

В состоянии относительного покоя потребление кислорода клеткой  
находится на минимальном уровне, известном как «уровень поддержа-  
ния», который может быть в несколько раз ниже максимально возмож-  
ного потребления кислорода. Представляло интерес исследовать профи-

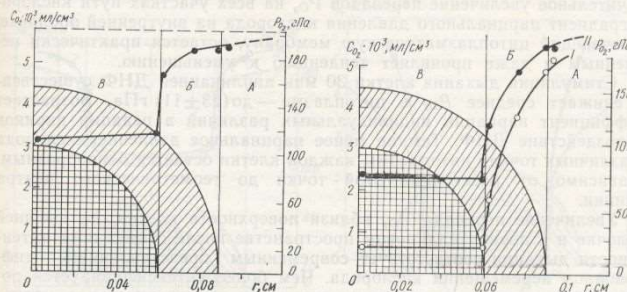


Рис. 1. Профиль концентрации (С) кислорода в нативной икринке вьюна при продви-  
жении микроэлектрода от поверхности ( $r=0,09$ ) до центра икринки ( $r=0$ ).

Одинарная штриховка — перивителлиновое пространство двойная штриховка — цитоплазма. А —  
среда инкубационная, Б — перивителлиновое пространство, В — цитоплазма.

Рис. 2. Профили концентрации (С) кислорода у икринок вьюна с повышенной ско-  
ростью потребления кислорода, стимулированной 2,4-ДНФ.

Икринки до снятия профиля  $O_2$  находились 15 мин в растворе с добавлением 2,4-ДНФ (темные  
кружочки) и 30 мин (светлые кружочки).

ли распределения и величины градиентов  $P_{O_2}$  при повышенной метабо-  
лической активности клетки. Проведенные эксперименты показали, что  
после стимуляции дыхания икринки ДНФ характер распределения  $P_{O_2}$   
в клетке существенно меняется. Сопоставление изменений, наступающих  
после 15 и 30 мин аппликации ДНФ, свидетельствует о том, что чем  
дольше клетка активируется с ДНФ ( $10^{-4}$  моль), тем больше активируется  
ее дыхание и тем ниже становится  $P_{O_2}$  в цитоплазме.

После 15 мин стимуляции (рис. 2 кривая II) приближение кончика  
электрода к поверхности клетки дает такое же снижение  $P_{O_2}$ , как и при  
исходном состоянии клетки. Перепад  $P_{O_2}$  на внешней оболочке клетки  
практически отсутствует, аналогично тому, что наблюдалось в исходном  
состоянии. В то же время перепад  $P_{O_2}$  в перивителлиновом пространстве  
увеличивается в 2 раза, градиент парциального давления кислорода  
достигает  $2,2 \cdot 10^3$  гПа/см. Перепад  $P_{O_2}$  на внутренней мембране остается  
таким же, как и в состоянии покоя, градиент  $P_{O_2}$  не меняется, несмотря  
на значительное увеличение потребления кислорода. В цитоплазме —  
парциальное давление кислорода статистически однообразно во всех ис-  
следованных точках, несмотря на постепенное удаление электрода от  
источника поступления свободного кислорода — инкубационной среды.  
Среднее  $P_{O_2}$  цитоплазмы по сравнению с состоянием относительного  
покоя оказывается сниженным —  $(85 \pm 7)$  гПа.

После 30 мин стимуляции дыхания икринки ДНФ приближение  
кончика электрода к поверхности клетки обнаруживает отчетливое сни-  
жение  $P_{O_2}$ , составляющее 17 гПа. Это подтверждает результаты прове-  
денных ранее исследований, показавших, что изменение интенсивности  
дыхания клетки может быть зарегистрировано внеклеточным индикатор-  
ным электродом, расположенным вблизи ее поверхности. Для срав-  
нения укажем, что в состоянии относительного покоя аналогичная ве-  
личина не превышала 2—3 гПа.

Стимуляция дыхания икринки в течение 30 мин приводит к тому, что на внешней оболочке также появляется выраженный перепад  $P_{O_2}$ , отсутствующий как в состоянии относительного покоя, так и после 15 мин стимуляции дыхания ДНФ. Абсолютное значение этого перепада на внешней оболочке икринки составляет около 11 гПа. Перепад  $P_{O_2}$  на следующем этапе пути кислорода в клетку — перивителлиновом пространстве — также значительно увеличивается и достигает 145 гПа, а соответствующий градиент  $P_{O_2}$  возрастает до  $7,2 \cdot 10^3$  гПа/см. Несмотря на значительное увеличение перепадов  $P_{O_2}$  на всех участках пути кислорода градиент парциального давления кислорода на внутренней оболочке, включающий цитоплазматическую мембрану, остается практически неизменным и даже проявляет тенденцию к уменьшению.

Стимуляция дыхания клетки 30 мин аппликацией ДНФ существенно снижает среднее  $P_{O_2}$  в цитоплазме — до  $(23 \pm 11)$  гПа. Возрастает коэффициент вариации индивидуальных различий в реакции икринок на воздействие ДНФ. Тем не менее парциальное давление кислорода в различных точках цитоплазмы каждой клетки остается однообразным, независимо от расстояния этой точки до геометрического центра икринки.

Увеличение перепада  $P_{O_2}$  вблизи поверхности клетки, на внешней оболочке и в перивителлиновом пространстве после стимуляции интенсивности дыхания соответствует современным представлениям о диффузионном перемещении кислорода. Чем более интенсифицируется поток кислорода через определенную структуру, тем значительнее становится перепад  $P_{O_2}$  на данном участке пути кислорода в клетку. При этом принимается допущение, что изменение потока кислорода через структуру не меняет ее проницаемости для кислорода, [40], аналогично тому, что имеет место при диффузии идеального газа через водные растворы или полупроницаемые мембраны. Полученные факты полностью соответствуют постулату Варбурга.

Максимальный перепад  $P_{O_2}$  и значительно более высокий градиент  $P_{O_2}$  зарегистрирован на внутренней мембране, включающей непроницаемые примембранные слои и плазматическую мембрану. Но самым неожиданным оказалось то, что этот перепад  $P_{O_2}$  не меняется при стимуляции дыхания, в то время как перепады  $P_{O_2}$  на других участках пути кислорода в клетку значительно возрастают. Это не укладывается в классические диффузионные представления о механизмах перемещения кислорода и требует специального рассмотрения, так же, как и данные о том, что парциальное давление кислорода в различных точках цитоплазмы статистически однообразно.

Исходя из приведенных выше математических закономерностей диффузионного распространения кислорода (1), (2) и допуская, что потребление кислорода происходит с одинаковой интенсивностью во всех участках цитоплазмы, а коэффициент диффузии кислорода в клетке является постоянной величиной, не превышающей коэффициента диффузии кислорода в среде инкубации ( $2,1 \cdot 10^{-5}$  см<sup>2</sup>/с), можно построить теоретический профиль распределения  $P_{O_2}$  для клетки в состоянии относительного покоя (рис. 3, кривая I). Если на этот же график нанести экспериментально полученные данные (рис. 3, кривая II), то обнаруживаются расхождения, локализующиеся в двух участках — во внеклеточной и внутриклеточной среде. Различия профиля распределения  $P_{O_2}$  во внеклеточной среде могут возникать за счет испарения с поверхности среды инкубации, что создает вертикальный градиент температуры раствора, приводящий к трудно учитываемым конвективным потокам жидкости. Такие потоки могут возникать также за счет горизонтально ориентированных температурных градиентов в среде инкубации.

Различия теоретического и экспериментального профилей концентрации  $P_{O_2}$  внутри клетки, находящейся в состоянии относительного покоя, требуют более пристального внимания. Согласно диффузионным представлениям, парциальное давление кислорода должно уменьшаться по мере удаления от внешней оболочки и в геометрическом центре сфе-

рической клетки должно быть те данные дают однообразно, а в центре — значительно выше, чем на поверхности. Это расхождение между наружной оболочкой и внутренней оболочкой является одной из задач, требующей дальнейшего исследования. Это может быть связано с наличием дополнительных факторов, влияющих на диффузию, например, с уменьшением молекул свободной энергии при химической диффузии. Поско-

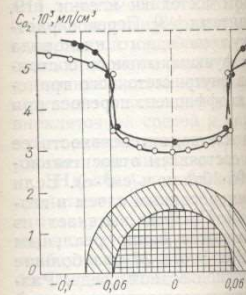


Рис. 3. Экспериментальный профиль концентрации кислорода (кривая II) и теоретический профиль (кривая I) в состоянии покоя.

Рис. 4. Сравнение теоретического профиля (кривая I) с экспериментальным (кривая II).

фициента диффузии  $2,1 \cdot 10^{-5}$  см<sup>2</sup>/с. Этот коэффициент переноса, так и возможные источники потребления кислорода. Эта величина оказалась больше коэффициента диффузии в среде инкубации.

Если рассчитать профиль распределения  $P_{O_2}$  в клетке, интенсивно потребляющей кислород (кривая II), то расхождения между теоретическим и экспериментальным профилем будут более резкими. Расчеты, проведенные автором, показывают, что лишь теоретический профиль распределения  $P_{O_2}$  в клетке, интенсивно потребляющей кислород, при диаметре сферы, равном диаметру внутренней оболочки, может соответствовать экспериментальным данным. Это означает, что около 6% кислорода, оставшегося в клетке, не участвует в окислительных процессах, а уходит в другие процессы, не связанные с окислением.

Экспериментально установлено, что под внутренней оболочкой клетки находится слой толщиной порядка  $0,65 \cdot 10^{-3}$  см, в котором концентрация кислорода не уменьшается (кривая II). Поскольку в перивителлиновом пространстве практически нет диффузионных механизмов перемещения кислорода, то концентрация кислорода в цитоплазме должна быть постоянной в области клеточ-



Какие же из известных фактов, можно привлечь для объяснения ускоренного перемещения кислорода в клетке? В первую очередь это явление циклозиса — непрерывного активного гидродинамического перемещения цитоплазмы [9], которое до сих пор выпадало из поля зрения при рассмотрении вопросов транспорта кислорода в клетке. Циклозис является общепризнанной закономерностью, справедливой для всех клеток, в том числе — животного происхождения [18, 43]. Аксонный транспорт, широко исследуемый в последние годы [34, 35], является одной из разновидностей циклозиса. Установлено, что скорость движения цитоплазмы возрастает при возбужденном состоянии клетки [19, 39] и способствует отдаче кислорода эритроцитами [43]. Перенос растворенных в водной фазе цитоплазмы молекул свободного кислорода как в покое, так и, особенно, при активации функционального состояния клетки, может быть одним из механизмов внутриклеточного транспорта кислорода, обуславливающего высокий коэффициент переноса при относительно низком коэффициенте диффузии.

При активации потребления кислорода в клетке, интенсивность ее дыхания возрастает в 3 раза по сравнению с состоянием относительно покоя ( $Q_{O_2} = 6,6 \cdot 10^{-5}$  мл  $O_2$ /см<sup>3</sup>·с), или  $2,95 \cdot 10^{-9}$  моль/см<sup>3</sup>·с). Если принять, что при этом градиент  $P_{O_2}$  между примембранным слоем и геометрическим центром клетки не превышает 1 гПа (что вытекает из экспериментов), то коэффициент переноса, соответствующий реальным значениям  $P_{O_2}$  в клетке достигает  $78 \cdot 10^{-5}$  см<sup>2</sup>/с. Это в 37 раз больше коэффициента диффузии кислорода в неподвижной водной среде. Разница может быть обусловлена гидродинамическим перемещением цитоплазмы и другими вспомогательными механизмами перемещения свободного кислорода в клетке.

Теоретически отсутствие градиента  $P_{O_2}$  в клетке могло бы возникнуть и без движения цитоплазмы за счет неравномерного распределения органелл — потребителей кислорода. Если основное количество митохондрий сконцентрируется в примембранном слое, а по мере приближения к центру клетки их количество будет экспоненциально убывать — профиль концентрации кислорода в клетке может быть однообразным. Аналогичное распределение  $P_{O_2}$  могло бы возникнуть при разной интенсивности дыхания примембранных и центрально расположенных митохондрий. Если бы пул примембранных митохондрий находился в активном метаболическом состоянии, в то время как более глубоко расположенные митохондрии — в состоянии относительного покоя, — возникла бы аналогичная картина. Вместе с тем гистохимические и электронно-микроскопические исследования гепатоцитов и других специализированных клеток, приближающихся к сферическим, не дают сведений о наличии существенной неравномерности распределения митохондрий, либо значительной разницы их энзиматической активности в зависимости от места расположения в клетке. Поэтому обе последние версии представляются мало вероятными.

Другим источником увеличения переноса кислорода в клетке может быть латеральная диффузия — векторный процесс перемещения молекул свободного кислорода вдоль биологических мембран [14]. Выказана точка зрения о том, что сопротивление мембран потоку кислорода обусловлено не столько их липидным матриксом, сколько примыкающими к нему границами раздела фаз, представляющими определенный энергетический барьер [1, 2, 7]. С этой точки зрения движение потока кислорода вдоль мембран может быть предпочтительным процессом, требующим меньших затрат энергии на единицу пути. Эволюционная целесообразность возникновения внутриклеточных структур детально рассмотрена в работе [17], а соотношение водных и липидных путей на примере эндотелия легкого обслуживается в работе [22].

Современные сведения по анатомии клетки указывают на существование радиально ориентированных мембранных структур эндоплазматического ретикулума (ЭПР), соединяющих плазматическую мембрану клетки с ядерной мембраной, которые пронизывают всю сому. Фикси-

рованные на ЭПР окислители получают кислород за счет диффузии кислорода через мембрану, — растворимость кислорода в липидном матриксе мембран лишены возможности использовать более жестко лимитированный механизм.

Оптические исследования окислителей полностью подтверждают зависимость от цитохрома *с* и альбумина в гепатоцитах микросом, основываясь на этом факте авторами клеточной среды и эндотелия, ощущаемого градиента концентрации кислорода в клеточной среде и внеклеточной среде и вступает в высокий градиент концентрации при низких значениях.

Наличие в цитоплазме средств к кислороду, способных отдачу кислорода, может внутриклеточный профиль концентрации кислорода, а также растворимость кислорода в клеточной среде и эндотелия составляет около  $3,5 \cdot 10^{-5}$  моль/см<sup>3</sup>·с). бина достигает величины 5,5 моль/см<sup>3</sup>·с). ность гемоглобина и миоглобина, каротиноидов, влияющих на диффузию кислорода (42)), а облегченная диффузия кислорода, выравнивая внутриклеточный профиль концентрации кислорода. Значит, внутриклеточный каротиноидный профиль обычно рассматривается, что в начальной стадии липидных гранул может быть клетки к гипоксии и создаются условия для образования кислорода, аналогично тому, что у глубоководных моллюсков.

Способность специфически облегчать перемещение свободного кислорода, особенно значимой для возбужденной клетки, точного  $P_{O_2}$ , когда величина градиента, обусловленного этим градиентом, пренебрежительно мала по сравнению с градиентом миоглобина, каротиноидов и других веществ, влияющих на жизнедеятельность клетки.

Представляет интерес вопрос о перемещении кислорода через внешнюю мембрану в состоянии относительного покоя. В состоянии покоя, когда величина градиента, обусловленного этим градиентом, пренебрежительно мала по сравнению с градиентом миоглобина, каротиноидов и других веществ, влияющих на жизнедеятельность клетки.

Как следует из законов диффузии, увеличение градиента концентрации кислорода (или концентрации кислорода) приводит к увеличению градиента концентрации кислорода (или концентрации кислорода) и, следовательно, к увеличению скорости перемещения кислорода. В состоянии покоя, когда величина градиента, обусловленного этим градиентом, пренебрежительно мала по сравнению с градиентом миоглобина, каротиноидов и других веществ, влияющих на жизнедеятельность клетки.

можно привлечь для объяснения в клетке? В первую очередь это активного гидродинамического педосих пор выпадало из поля зрительности, справедливой для происхождения [18, 43]. Аксон последние годы [34, 35], является установлено, что скорость движения в состоянии клетки [19, эритроцитами [43]. Перенос растительных молекул свободного кислорода функционирования состояний внутриклеточного транспорта коэффициент переноса при диффузии.

рода в клетке, интенсивность ее с состоянием относительно или  $2,95 \cdot 10^{-9}$  моль/см<sup>3</sup>·с). Если кду примемembrанным слоем и геодышает 1 ГПа (что вытекает из аса, соответствующий реальным  $10^{-5}$  см<sup>2</sup>/с. Это в 37 раз больше неподвижной водной среде. Различия перемещением цитомеханизмами перемещения сво-

$P_{O_2}$  в клетке могло бы возникнуть неравномерного распределения. Если основное количество мембранном слое, а по мере призо будет экспоненциально убыва в клетке может быть одно-  $P_{O_2}$  могло бы возникнуть при ранных и центрально располо- мембранных митохондрий нато- тоянии, в то время как более состоянии относительного по- а. Вместе с тем гистохимичес- дования гепатоцитов и других дихся к сферическим, не дают мерности распределения мито- энзиматической активности в клетке. Поэтому обе последние

носа кислорода в клетке мо- ный процесс перемещения мо- гических мембран [14]. Вы- ление мембран потоку кисло- т матриком, сколько примы- представляющими определен- той точки зрения движение ть предпочтительным процес- а единицу пути. Эволюцион- клеточных структур деталь- ние водных и липидных пу- нивается в работе [22]. клетки указывают на существ- анных структур эндоплазма- к плазматическую мембрану низывают всю сомю. Фикси-

рованные на ЭПР окислительно-восстановительные ферменты могут получать кислород за счет латерального перемещения, минуя процесс диффузии кислорода через преимущественно водную среду — цитоплазму, — растворимость кислорода в которой значительно ниже, чем в липидном матриксе мембран. Расположенные в цитоплазме митохондрии лишены возможности использовать латеральную диффузию и находятся в более жестко лимитированных условиях доставки кислорода.

Оптические исследования степени окисленности внутриклеточных оксидаз полностью подтверждают такую точку зрения. Величина  $K_m$  для зависящего от цитохрома  $P_{450}$  окисления гексобарбитала, фенира- мидона и альпренола в изолированных гепатоцитах и выделенных из гепатоцитов микросомах оказывается практически одинаковой [27]. На основании этого факта авторы приходят к заключению, что между вне- клеточной средой и эндоплазматическим ретикулулом гепатоцитов нет ощутимого градиента концентрации кислорода. В то же время между внеклеточной средой и внутренней мембраной митохондрий существу- ет высокий градиент концентрации кислорода, который особенно воз- растает при низких значениях внеклеточного  $P_{O_2}$  [27].

Наличие в цитоплазме гранул миоглобина, обладающего высоким сродством к кислороду, способным осуществлять обратимое связывание и отдачу кислорода, может быть одним из факторов, выравнивающих внутриклеточный профиль концентрации кислорода. По данным Вит- тенберга растворимость кислорода в тканевой жидкости при 20 °C составляет около  $3,5 \cdot 10^{-5}$  моль/л, в то время как концентрация миогло- бина достигает величины  $5 \cdot 10^{-4}$  моль/л, что в 15 раз больше. Способ- ность гемоглобина и миоглобина, растворенных в водной среде уско- рять диффузию кислорода достаточно хорошо изучена (см. обзоры [30, 42]), а облегченная диффузия может рассматриваться как один из ме- ханизмов выравнивания внутриклеточных градиентов концентрации сво- бодного кислорода. Значительно менее исследована в этом плане роль внутриклеточных каротинов и липидных гранул, появление которых в цитозоле обычно рассматривается как признак дегенерации клетки. Не исключено, что в начальных стадиях кислородного голодания появление липидных гранул может быть одним из механизмов приспособления клетки к гипоксии и создания более мощных внутриклеточных депо кислорода, аналогично тому, что по данным В. Н. Карнаухова имеет место у глубоководных моллюсков.

Способность специфических белков типа гемоглобина и миоглобина облегчать перемещение свободного кислорода в клетке становится осо- бенно значимой для возбужденной клетки в условиях низкого внекле- точного  $P_{O_2}$ , когда величина градиента концентрации кислорода и обус- ловленного этим градиентом диффузионного потока кислорода стано- вится пренебрежительно малыми. Именно в таких условиях гранулы миоглобина, каротиноиды и липосомы могут способствовать сохранению жизнедеятельности клетки.

Представляет интерес рассмотреть также особенности перемеще- ния кислорода через внешнюю и внутреннюю оболочки икринок в со- стоянии относительного покоя и после стимуляции дыхания. При увели- чении скорости потребления кислорода поток кислорода через обе обо- лочки возрастает. Поскольку радиус внешней оболочки составляет 0,09 см, а внутренней — 0,6 см и площади их поверхности различаются более чем в 2 раза, поток кислорода (количество вещества, проходящее в единицу времени через единицу площади) через внутреннюю оболочку оказывается в два раза более интенсивным.

Как следует из законов диффузии, возрастание потока вещества че- рез определенный участок среды ( $\Delta x$ ) может происходить либо за счет увеличения градиента концентрации, либо вследствие увеличения коэф- фициента диффузии ( $D_{O_2}$ ) на этом участке. Сравнивая профили  $P_{O_2}$  икринок в состоянии относительного покоя и в состоянии повышенного потребления кислорода, мы обнаружили отчетливые различия перепадов  $P_{O_2}$  на внешней и внутренней оболочке. В состоянии покоя на внутрен-

ней оболочке наблюдается значительный перепад  $P_{O_2}$  (48 гПа), в то время как на внешней оболочке он практически не регистрируется. При максимальной активации дыхания на внешней оболочке возникает статистически значимый перепад  $P_{O_2}$  (11 гПа), свидетельствуя о возрастании потока кислорода. В то же время на внутренней оболочке икринки градиент  $P_{O_2}$  практически не меняется, хотя поток кислорода резко возрастает. Это позволяет заключить, что коэффициент диффузии через внутреннюю мембрану изменяется прямо пропорционально интенсивности дыхания.

Данные о вариабельности сопротивления мембран для кислорода в зависимости от степени окисленности липидов, удельного содержания белка, ионных условий и других вне- и внутримембранных условий приведены в литературе [2, 5, 6, 13, 15, 16, 24, 30, 31, 36].

Поскольку экспериментально невозможно измерить перепад  $P_{O_2}$  непосредственно на плазматической мембране, а измерения производятся на каком-то неопределенном расстоянии от нее, расчет коэффициентов диффузии через мембрану целесообразно заменить расчетом коэффициентов проницаемости мембраны ( $p = D_{O_2}/\Delta x$ ). Из формулы (1) и (2) следует, что в состоянии относительного покоя  $p$  для внутренней мембраны икринки составляет около  $3 \cdot 10^{-4}$  см/с, при умеренной активации дыхания —  $5,4 \cdot 10^{-4}$  см/с, а при максимальной активации потребления кислорода —  $10,7 \cdot 10^{-4}$  см/с. Увеличение коэффициента проницаемости внутренней оболочки, включающей цитоплазматическую мембрану, можно рассматривать как свидетельство активной роли этой структуры в перемещении кислорода в цитоплазму клетки.

Активная роль плазматической мембраны в перемещении кислорода не предусматривает обязательного участия активного транспорта кислорода [2, 4]. Активным компонентом, меняющим проницаемость плазмолеммы, является, по-видимому, изменение ее структуры — степени упорядоченности липидных и фосфолипидных молекул матрикса, соотношения липидных и белковых компонентов. Известно, что физико-химическое состояние плазмолеммы весьма динамично и меняется в зависимости от метаболического состояния клетки и факторов окружающей среды. Изменение электролитного состава так же, как и изменение концентрации отдельных структурных элементов мембраны, способно изменять барьерные свойства моно- и бислоевых липидных мембран для кислорода [1, 5, 13, 28].

Различия скорости диффузии кислорода в разных тканях описаны многими авторами. Так, если в ткани почки константа диффузии по Кругу составляет  $0,63 \cdot 10^{-4}$ , то для ткани печени она в 2,6 раза больше —  $1,64 \cdot 10^{-4}$  Круговских единиц [32]. В плазме крови при температуре  $37^\circ\text{C}$  коэффициент диффузии (по Фику) составляет  $2,18 \cdot 10^{-5}$ , в то время как в цельной крови —  $1,62 \cdot 10^{-5}$  см<sup>2</sup>/с [24]. В роговом слое кожи ушной раковины мыши коэффициент диффузии кислорода составляет  $1,1 \cdot 10^{-7}$ , в мягких тканях уха —  $4 \cdot 10^{-6}$  см<sup>2</sup>/с [23]. Эти различия обусловлены неодинаковым биохимическим составом тканей, различной степенью содержания в них воды [37] и рассматриваются исследователями как константы, присущие данной ткани. Мы считаем, что коэффициенты диффузии, или, лучше коэффициенты переноса кислорода в клетках и состоящих из клеток тканях являются динамичными, меняющимися в процессе жизнедеятельности в зависимости от степени активности ткани величинами.

Резюмируя полученные данные и вытекающие из них заключения, можно отметить, что постулат Варбурга о диффузии как единственном процессе, обеспечивающем перемещение молекул свободного кислорода в клетках и тканях явился фундаментом для создания научных представлений первого приближения о биофизических закономерностях транспорта газов в биологических объектах. Дальнейшее развитие этих представлений может исходить из того, что биологические объекты являются многокомпонентными водно-липидно-белковыми системами с динамичными характеристиками структуры и функции мембран, непре-

рывным движением вне- и внутримембранными механизмами, обеспечивающими перемещение кислорода в клетки и ткани от оболочек, для которых выводились.

**Выводы.** Экспериментальным методом микроэлектрода профиль концентрации кислорода соответствует расчетному, что перемещение кислорода осуществляется за счет диффузии.

Коэффициент переноса кислорода в зависимости от активации интенсивно меняется, что свидетельствует о динамичности коэффициента диффузии.

Внутренняя оболочка икринки способна менять коэффициент диффузии, изменяя ее прямо пропорционально интенсивности дыхания.

Поскольку клетки биологических сред с движущимися мембранами отличаются от гомогенных неподвижных сред, при расчетах коэффициентов диффузии и коэффициентов переноса следует учитывать зависимость от состояния оболочки.

Коэффициенты переноса кислорода в зависимости от состояния биомембран, внеклеточных жидкостей, скорости перемещения молекул кислорода, являются функциональными изм.

V. A.

OXYGEN CONCENTRATION AND CERTAIN DIFFUSION COEFFICIENTS IN THE TRANSITION

Platinum microelectrode method for the study of the external shell of a frog egg. The external shell of the egg is distinct from other sites of the egg. It does not rise when respiration in the plasma membrane pertains. The  $P_{O_2}$  in the cell cytoplasm is the coefficient of oxygen transport. The coefficient of oxygen transport is of its diffusion in stagnant water, and calculated profiles of  $O_2$  transport in biological systems.

A. A. Bogomoletz Institute of Zoology, Academy of Sciences, Ukrainian

1. Алферов Ю. М. Способ исследования мембраны потоку кислорода. Киев: Наук. думка, 1978.
2. Алферов Ю. М., Березовский В. А. Кислород через границу плазмолеммы. — В кн. "Биофизика", с. 78—85.
3. Березовский В. А. Электрохимическое определение концентрации кислорода. — В кн. "Биофизика", с. 98—122.
4. Березовский В. А. Транспорт кислорода. — В кн. "Биофизика", с. 123—130.

и перепад  $P_{O_2}$  (48 гПа), в то-  
тически не регистрируется. При  
нешней оболочке возникает ста-  
Па), свидетельствуя о возраста-  
а внутренней оболочке икринки  
хотя поток кислорода резко  
то коэффициент диффузии че-  
прямо пропорционально интен-

нения мембран для кислорода в  
липидов, удельного содержа-  
и внутримембранных условий  
16, 24, 30, 31, 36].

можно измерить перепад  $P_{O_2}$  не-  
ане, а измерения производятся  
от нее, расчет коэффициентов  
заменить расчетом коэффици-  
( $\Delta x$ ). Из формулы (1) и (2)  
покою  $r$  для внутренней мем-  
м/с, при умеренной активации  
льной активации потребления  
фициента проницаемости внут-  
матическую мембрану, можно  
ой роли этой структуры в пе-  
ри.

раны в перемещении кислоро-  
астия активного транспорта  
и, меняющим проницаемость  
енение ее структуры — степе-  
нидных молекул матрикса,  
ментов. Известно, что физико-  
на динамично и меняется в  
клетки и факторов окружаю-  
тава так же, как и изменение  
ементов мембраны, способно  
ойных липидных мембран для

да в разных тканях описаны  
чки константа диффузии по-  
дечени она в 2,6 раза боль-  
в плазме крови при темпера-  
ку) составляет  $2,18 \cdot 10^{-5}$ , в то  
с [24]. В роговом слое кожи  
узии кислорода составляет  
/с [23]. Эти различия обус-  
тавом тканей, различной сте-  
триваются исследователями  
и считаем, что коэффициенты  
носа кислорода в клетках и  
намичными, меняющимися в  
от степени активности тка-

кающие из них заключения,  
диффузии как единственном  
лекул свободного кислорода  
для создания научных пред-  
еских закономерностей тран-  
Дальнейшее развитие этих  
биологические объекты явля-  
белковыми системами с ди-  
функции мембран, непре-

Физиол. журн., 1984, т. 30, № 3

рывным движением вне- и внутриклеточных жидкостей и другими вспо-  
могательными механизмами переноса кислорода, что существенно отли-  
чает клетки и ткани от однородных неперемешиваемых водных сред,  
для которых выводились диффузионные закономерности.

**Выводы.** Экспериментально измеренный при помощи платинового  
микроэлектрода профиль концентрации кислорода в икринке быона не  
соответствует расчетному профилю, полученному исходя из предпосыл-  
ки, что перемещение кислорода в клетке осуществляется только за счет  
диффузии.

Коэффициент переноса кислорода в цитоплазме икринки быона пос-  
ле активации интенсивности ее дыхания более чем на порядок превы-  
шает коэффициент диффузии кислорода в неподвижной водной среде.

Внутренняя оболочка икринки быона, включающая плазматическую  
мембрану, способна менять свою проницаемость для кислорода, увели-  
чивая ее прямо пропорционально интенсивности дыхания.

Поскольку клетки биологических объектов представляют гетеро-  
генные среды с движущейся цитоплазмой, что существенно отличает  
их от однородных неподвижных сред, для которых выводились законы  
диффузии, при расчетах кислородного снабжения клеток целесообразно  
пользоваться не коэффициентом диффузии как константной величиной,  
а коэффициентом переноса кислорода, как динамичной величиной,  
зависящей от состояния объекта.

Коэффициенты переноса кислорода в живых тканях могут менять-  
ся в зависимости от реальных биохимических сдвигов в составе и со-  
стоянии биомембран, вне- и внутриклеточной концентрации электроли-  
тов, скорости перемещения цитоплазмы, растворимости кислорода и дру-  
гих функциональных изменений, отражающих состояние объекта в ре-  
альный отрезок времени.

V. A. Berezovsky, B. S. Sushko

#### OXYGEN CONCENTRATION PROFILE IN A CELL AND CERTAIN DISPUTABLE PROBLEMS OF FREE OXYGEN TRANSPORT IN BIOLOGICAL OBJECTS

Platinum microelectrode probing of various sites of single animal cell soma showed  
that the external shell of a loach egg at rest makes no resistance to free oxygen trans-  
port to the cell. The inner shell membrane which includes the plasma membrane, as dis-  
tinct from other sites of the cell is characterized by a considerable  $P_{O_2}$  gradient which  
does not rise when respiration is stimulated. This gives evidence for a possible increase  
in the plasma membrane permeability for  $O_2$  under intensified respiration. It is shown  
that  $P_{O_2}$  in the cell cytoplasm does not depend on the distance to the oxygen source and  
the coefficient of oxygen transport in an excited cell is 37 times as high as the coefficient  
of its diffusion in stagnant water. These data confirm physiological significance of cyc-  
losis and hydrodynamic  $O_2$  transport in a cell. Comparison of experimentally obtained  
and calculated profiles of  $O_2$  concentration permits supposing that diffusion regularities  
valid for homogeneous immiscible media do not exhaust all mechanisms of oxygen trans-  
port in biological systems.

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

#### Список литературы

1. Алферов Ю. М. Способ изменения диффузионного сопротивления бислоистой липид-  
ной мембраны потоку кислорода. — В кн.: Сурфактанты легкого в норме и патоло-  
гии. Киев: Наук. думка, 1983, с. 171—174.
2. Алферов Ю. М., Березовский В. А. Влияние нонного состава среды на массоперенос  
кислорода через границу раздела электролит-фосфолипидная пленка. — Там же, 1983,  
с. 78—85.
3. Березовский В. А. Электрохимические и биологические особенности хроноамперомет-  
рического определения кислорода в биологических объектах. — В кн.: Полярногра-  
фическое определение кислорода в биологических объектах. Киев: Наук. думка,  
1968, с. 98—122.
4. Березовский В. А. Транспорт кислорода через мембраны. Физическая диффузия или  
активный перенос. — В кн.: IV Междунар. биофиз. конгр. М.: 1972, т. 3, с. 114—115.

Физиол. журн., 1984, т. 30, № 3

7 — 4-138

353

5. Березовский В. Я., Алферов Ю. М., Горчаков В. Ю. та ін. Біологічні бар'єри як регулятори дихання.—В кн.: XI з'їзд Укр. фізіол. т-ва: Тези доп. (Дніпропетровськ, вересень 1982 р.) Київ: Наук. думка, 1982, с. 31—32.
6. Березовський В. А., Гойда Е. А., Мукалов І. О., Сушко Б. С. Экспериментальное исследование распределения кислорода в икринках выюна.—Физиол. журн., 1979, 25, № 4, с. 279—289.
7. Березовський В. А., Горчаков В. Ю. К вопросу о роли поверхностноактивных веществ легких в массопереносе кислорода.—В кн.: Суфактанты легкого в норме и патологии. Киев: Наук. думка, 1983, с. 72—77.
8. Иваница К. П., Кисляков Ю. Я. О напряжении кислорода в нервной клетке и окружающей ткани.—Физиол. журн. СССР, 1974, 60, № 6, с. 900—905.
9. Іваниця Н. Дж. Введення протоплазми. М.: Изд-во інстр. д-та, 1962.—306 с.
10. Кисляков Ю. Я., Самойлов М. О., Іванов К. П. и др. Динамика транспорта кислорода из капилляров к нервным клеткам коры мозга.—Физиол. журн. СССР, 1983, 69, № 1, с. 63—69.
11. Круг А. Анатомия и физиология капилляров.—М.: 1927.—267 с.
12. Лубах Г. Г. Моделирование транспиллярного обмена кислорода в скелетной мышце.—Физиол. журн. СССР, 1974, 60, с. 212—217.
13. Минько А. А., Петушич Ю. И., Сушко Б. С. К вопросу о проницаемости биологических мембран для кислорода.—В кн.: Суфактанты легкого в норме и патологии. Киев: Наук. думка, 1983, с. 85—90.
14. Скадуча В. П. Транспорт энергии, метаболитов, кислорода и электролитов вдоль биологических мембран.—Успехи совр. биологии, 1979, 86, вып. 2/5, с. 163—180.
15. Сушко Б. С. К методике изготовления открытых платиновых микроэлектродов для хронометрического определения кислорода в клетках и тканях.—В кн.: Полярнографическое определение кислорода в биологических объектах. Киев: Наук. думка, 1972, с. 108—109.
16. Сушко Б. С. Особенности транспорта кислорода через оболочку ооцита: Автореф. дис... канд. биол. наук.—Киев, 1976.—24 с.
17. Шноль С. Э., Ермакова Е. А., Франк Г. М. Диффузионные ограничения и эволюционный смысл образования внутриклеточных структур.—В кн.: Методологические и теоретические проблемы биофизики. М.: Наука, 1979, с. 90—99.
18. Allen D. R. Some new insights concerning cytoplasmic transport.—In: Transport at the cellular level. Cambridge: Cambr. Univ. press, 1974, 28, p. 15—20.
19. Berlinrod M., Mc Gee-Russel S. M., Allen R. D. Patterns of particle movement in nerve fibers in vitro — an analysis by photokymography and microscopy.—J. Cell. Sci., 1972, 11, N 6, p. 875—886.
20. Cater D. B. The measurement of  $pO_2$  in tissues.—In: Oxygen in animal organism.—London: Perg. press, 1964, p. 235—248.
21. Cater D. B. Oxygen measurements in blood and tissues.—London, 1966, p. 152—161.
22. Chinard F. P., Perl W., Pitter A. B. Interaction of aqueous and lipid pathways in the pulmonary endothelium.—Microcirculation, 2, N 1, p. 71—74.
23. Evans N. T. S., Naylor P. F., D. Rowlinson G. Oxygen diffusion transients in the mouse ear.—Resp. Physiol., 1982, 48, N 3, p. 387—394.
24. Goldstik T. K., Ciurgu V. T., Zuckerman L. Diffusion of oxygen in plasma and blood.—In: Oxygen Transport Tissue-2, Proc. 2nd Int. Symp., Mainz, 1975, New York; London: Plenum press, 1976, p. 183—190.
25. Grote F., Thews G. Die bedingungen für die sauerstoffversorgung des herzmuskels.—Pflügers Arch., 1962, 276, N 1, p. 142—165.
26. Grunewald W. Theoretical analysis of the oxygen supply in tissue.—In: Oxygen transport in blood and tissue. Stuttgart, 1968, p. 100—114.
27. Jones D. P., Mason N. S. Gradients of  $O_2$  concentration in hepatocytes.—J. Biochem., 1978, 253, N 14, p. 4874—4880.
28. Kazunory K., Nobuji M., Misuzu S., Takeshi S., Takeo S. A method for studying oxygen diffusion barrier in erythrocytes: effect of hemoglobin content and membrane cholesterol.—J. Physiol., 1980, 109, N 7, p. 569—590.
29. Kety S. S. Determinants of tissue oxygen tension.—Fed. Proc., 1957, 16, N 3, p. 666—670.
30. Kreuzer F. Facilitated diffusion of oxygen and its possible significance.—Respir. Physiol., 1970, 9, N 1, p. 1—30.
31. Lebovitz A. Permeability of polymers to gases, vapours and liquids.—Mod. Plast., 1966, 43, N 1, p. 139—151.
32. Longmuir I. S., Bourke A. The measurement of diffusion of oxygen through respiring tissue.—Biochem. J., 1960, 76, N 2, p. 225—229.
33. Lubbers D. W. Oxygen transport in heart and brain.—In: Brain and Heart Infarction. Berlin, 1977, p. 5—16.
34. O'Loughlin M. A., Willans D. N., Hunt J. W. A fluorescence approach to testing the diffusion of oxygen into mammalian cells.—Radiat. Res., 1980, 84, N 3, p. 477—495.
35. Mesulam M. M. Principles of horseradish peroxidase neurohistochemistry and their application for tracing neural pathways—axonal transport, enzyme histochemistry and light microscopic analysis.—In: Tracing neural connections with horseradish peroxidase.—Chichester; New York, 1982, p. 1—151.
36. Rashevsky N. Mathematical biophysics. Physicomathematical foundations of biology.—Chicago: The Univ. of Chicago press, 1938.—340 p.
37. Vanel P. Effects of percental water content in tissues and liquids on the diffusion coefficients of  $O_2$ ,  $CO_2$  and  $N_2$ .—Pflügers Arch., 1976, 361, N 2B, p. 201—204.

354

Физиол. журн., 1984, т. 30, № 3

38. Warburg O. Oxydationen in  
Physiol. Chem., 1910, **66**, N. 1.
39. Weiss P., Hiscoe H. B. Exper  
1948, **107**, N 3, p. 315—395.
40. Whalen W. J., Nair P. Intra  
the guinea-pig.—Circulat. R.
41. Whalen W. J., Riley J., Nair  
J. Appl. Physiol., 1967, **23**, N.
42. Wyman S. Facilitated diffus  
mechanism.—J. Biol. Chem.,
43. Zander R., Schmid-Schönbein  
release by human erythrocyte

Ин-т физиологии им. А. А. Богданова  
АН УССР, Киев

УДК 612.27:612.12:612.22:612.26:612.66

## НЕКОТО ПРО

Изучение вопросов, св  
ма, было начато в Киеве е  
бюхиими АН УССР, где и  
состав головного мозга, м  
экспериментальной биолог  
состав крови при гипоксии  
логии Киевского медицин  
острой циркуляторной тип  
После переезда в Киев  
да известного учено-пато  
стематические исследовани  
организма в широком плат  
торных животных, в совме  
ниях различных форм ви  
гипоксического состояния  
высокогорные районы назе

Многолетние исследования Института клинической горных экспедиций (начиная с 1930-х годов) показали, что физиологические особенности человека в разреженной атмосфере. В зависимости от закономерностей реакции с кислородом, возникающих в ответ на гипоксию, главствующую роль в адаптации к кислороду во вдыхаемом воздухе играют различные факторы.

Это дало возможности  
лезни у прибывших в горы,  
пий горной болезни. Первые  
ны в монографии Н. Н. С  
соты» в 1939 г. [46] и про  
51] и работах его учеников

Ближайшими сотрудниками продолжены и развиты разносторонний. Сравнительно-физиологический экспериментальный курсовая и сотрудников было о реакциях организма на действие кислорода зависит от уровня Работами Н. В. Лавуэр и А.

Физиол. журн., 1984, т. 30, № 3