

УДК 536.629

© С. П. Моисеева, Г. В. Котельников, О. И. Грабельных,
Т. П. Побежимова, В. К. Войников

КАЛОРИМЕТРИЧЕСКИЕ ИЗМЕРЕНИЯ ТЕПЛОПРОДУКЦИИ В МИТОХОНДРИЯХ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

На экспериментальном образце нанокалориметра выполнены измерения теплопродукции митохондрий растительных клеток. Введение добавки проводилось без задержки во времени и с задержкой в течение 1.5 часов при температуре 24 °С. Результаты измерений теплопродукции в свежевыделенных митохондриях озимой пшеницы в среде суспендирования показали снижение теплопродукции в 6 раз в случае эксперимента с задержкой, что подтвердило необходимость проведения измерений без задержки во времени для обеспечения прецизионных измерений.

Кл. сл.: нанокалориметр, прецизионные измерения, теплопродукции, растительные митохондрии

ВВЕДЕНИЕ

Впервые калориметрическим методом получены данные о тепловой энергии при дыхании митохондрий печени крыс японским ученым *Nakamura T.* с сотр. в 1978 году [1].

В 2001 г. опубликована работа по экспериментальному исследованию на калориметре ТАМ-III (*TA Instruments*, США) митохондрий риса [2]. В этом приборе образец объемом 1 мл, содержащий 0.3 г митохондрий, размещается в закручивающейся ампуле объемом 4 мл. Чувствительность прибора 0.1 мкВт. В статье представлены кривые термогенеза в митохондриях риса в течение 80 ч. Исследуемый образец, содержащий митохондрии, хранился 15 ч при температуре 0–3 °С. Представленные кривые не содержат информации о переходном процессе выхода на режим измерения с момента установки ампулы с образцом в калориметр и соответственно информации о возможном термогенезе в митохондриях на данном участке.

В публикациях последних лет о калориметрических исследованиях различных митохондрий нет данных об использовании исследовательских образцов митохондрий, хранившихся на льду и помещавшихся в измерительный объем калориметрических камер без задержки во времени. Тем не менее обеспечение указанных условий крайне важно для исследований короткоживущих объектов. Современные аналоги, например описанные в работах [3, 4] *Omega* [5], *VP-ITC*, *iTC200*, *Auto iTC200* (*MicroCal*, USA), не предназначены для измерения тепловой мощности в процессах трансформации и диссипации энергии в митохондриях из-за разобщения дыхания и фосфорилирования митохондрий в процессе длительного, более

10 мин, выравнивания температуры добавки в них до температуры исследуемого образца.

В нанокалориметре данная задача решается на основе зарекомендовавших себя технических решений, реализованных в первом адиабатическом сканирующем микрокалориметре ДАСМ-1, и теоретических исследований, сделанных при разработке капиллярного титрационного калориметра КТД-2156 [6, 7]. Впервые тепловые шунты применены для исключения влияния тепловых помех из внешней среды на измерительный сигнал. Данное решение обеспечило высокую чувствительность микрокалориметра ДАСМ-1.

В работе [8] предложена расчетная формула коэффициента влияния теплового эффекта в зоне шунта на регистрацию теплового эффекта в измерительном объеме калориметрической камеры. Данная зависимость обеспечивает расчет геометрии теплового шунта. Через шунт все паразитные тепловые потоки рассеиваются в термостатирующей оболочке камер, не попадая в измерительный объем калориметра.

В работе [7] представлена расчетная формула для определения максимальной скорости перемещения иглы с титрантом через активный шунт заданной геометрии. При скоростях, равных и меньших данной скорости, температура иглы с титрантом становится равной температуре теплового шунта до выхода из него.

В работе [6] предложено новое решение равномерного распределения вещества добавки по всему объему исследуемого образца. Перечисленные работы являются теоретической основой создаваемого нанокалориметра.

Результаты теоретических исследований учтены в настоящее время при проведении разработки нанокалориметра, что обеспечивает выполнение

требований к нанокалориметру по введению в измерительный объем калориметрических камер добавки, хранившейся на льду, без задержки во времени и выделению измерительного объема калориметрических камер.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

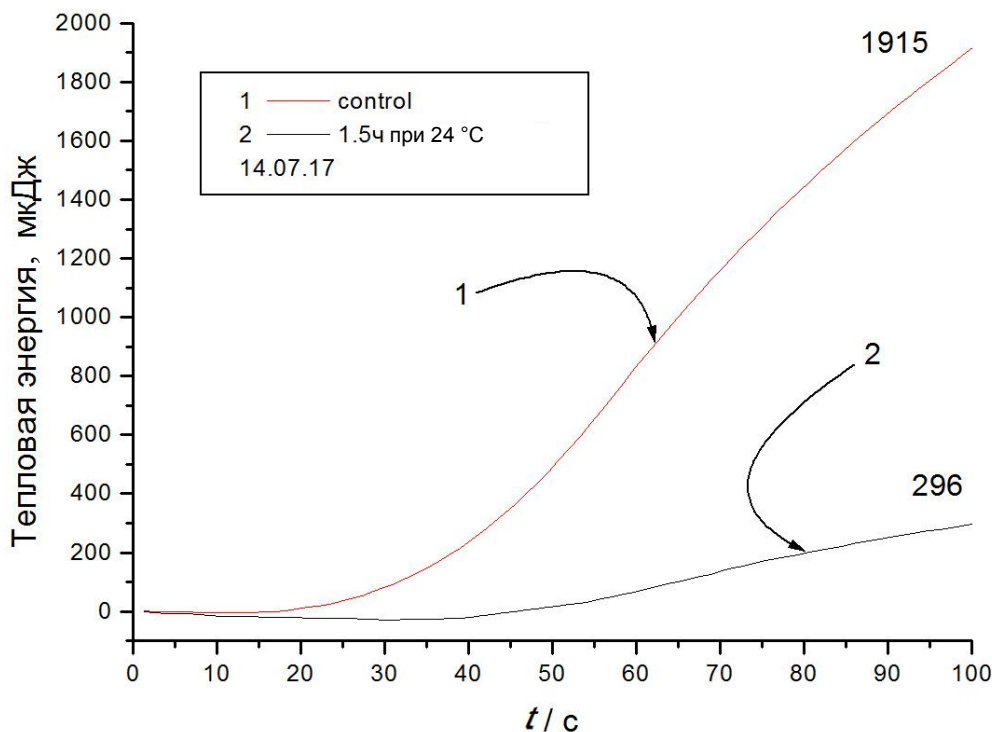
Нанокалориметр обеспечивает точные измерения теплопродукции при исследованиях короткоживущих митохондрий растительных клеток, добавка которых в измерительный объем калориметрических камер вводится практически без задержки во времени, сразу после установки дозирующего узла в прибор.

Для приготовления добавки митохондрии из побегов 3-дневных этиолированных проростков озимой пшеницы, выращенных при температуре 24 °С, выделяли методом дифференциального центрифугирования по стандартной методике [9]. Среда выделения содержала 300 mM сахарозы, 40 mM MOPS-KOH (pH 7.4), 10 mM KCl, 2 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 0.5 % цистеин и 0.1 % БСА (бычий сывороточный альбумин). Рабочая

и эталонная калориметрические камеры с измерительным объемом 156 мкл, а также эталонный дозирующий шприц заполнялись следующим составом: среда инкубации (18 mM KH₂PO₄, 125 mM KCl, 5 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, pH 7.4) и субстрат окисления (10 mM малат; 10 mM глутамат). Для заполнения рабочего дозирующего шприца использовалась суспензия свежely выделенных митохондрий озимой пшеницы в среде ресуспендирования (300 mM сахарозы, 40 mM MOPS-KOH, 10 mM KCl, 5 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, pH 7.4). Эксперимент проводился при температуре калориметрических камер 24 °С.

Добавка объемом 10 мкл со скоростью 1 мм/с вводилась в измерительный объем калориметрических камер при опускании дозирующих игл на 50 мм, т. е. на всю длину измерительного объема.

На рисунке приведены кривые изменения величины теплопродукции митохондрий озимой пшеницы во времени. На кривой 1 показан результат контрольного эксперимента, при котором добавка, хранившаяся на льду, введена в течение 10–20 с в измерительный объем калориметрических камер.



Изменения величины теплопродукции митохондрий озимой пшеницы, хранившихся на льду, введенных в измерительный объем калориметрических камер без паузы и с паузой 1.5 часа.

Кривая 1 — теплопродукция митохондрий, введенных без паузы; кривая 2 — теплопродукция митохондрий, введенных через 1.5 ч хранения при температуре 24 °С

На кривой 2 показан результат эксперимента, в котором добавка, хранившаяся на льду, перед введением в измерительный объем калориметрических камер находилась 1.5 ч при температуре 24 °С. Тепловая мощность измерялась в течение 100 с с момента введения добавки митохондрий в измерительный объем рабочей калориметрической камеры. Кривые представляют собой временную зависимость тепловой энергии, полученной в результате интегрирования сигналов тепловой мощности [10]. Полученные результаты показывают, что через 1.5 ч величина измеренной теплопродукции для добавки, находившейся в течение 1.5 ч при температуре 24 °С, снизилась, более чем в 6 раз.

Эти эксперименты достаточно наглядно подтверждают, что для получения точных измерений теплопродукции в митохондриях растительных клеток должны обеспечиваться условия введения охлажденной добавки в измерительный объем калориметрических камер без задержки во времени.

Следует отметить, что по результатам испытаний экспериментального образца нанокалориметра планируется при выпуске таких приборов в ИБП РАН расширить функциональные возможности нанокалориметра за счет реализации в нем режима управляемого охлаждения. Это перспективно для решения задачи измерения энергетических изменений в исследуемом образце под воздействием стрессовых температур в режиме линейного охлаждения исследуемого образца на заданном интервале температур в одном эксперименте.

В ИБП РАН накоплен многолетний опыт в создании и выпуске высокочувствительных калориметров типов ДСМ и ДАСМ. Выпуск экспериментальных образцов нанокалориметра станет достойным продолжением создания и выпуска указанных приборов, успешно работающих до настоящего времени в отечественных и зарубежных научных организациях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ИБП РАН проводятся на создаваемом нанокалориметре измерения теплопродукции митохондрий растительных клеток по программе биотехнических испытаний нанокалориметра в условиях, максимально приближенных к существующим современным научным задачам растениеводства, для исследований термогенеза растений при действии экстремальных факторов природной среды и поиску механизмов и соединений, снижающих их неблагоприятное воздействие.

Основные конструктивные и технологические характеристики нанокалориметра обеспечивают

прецизионные измерения теплопродукции при работе с короткоживущими объектами. Новые технические решения внедрены в нанокалориметр и отражены в конструкторской документации ЮФВК.408827.001.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nakamura T., Matsuoka I. Calorimetric studies of heat of respiration of mitochondria // *Journal of Biochemistry*. 1978. Vol. 84, no. 1. P. 39–46.
2. Zhou P.-J., Zhou H.-T., Liu Y., Qu S.-S., Zhu Y.-G., Wu Z.-B. Studies on the energy release of rice mitochondria under different conditions by means of microcalorimetry // *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2001. Vol. 48. P. 1–11.
3. Velázquez-Campoy A., López-Mayorga O., Cabrerizo-Vilchez MA. Development of an isothermal titration microcalorimetric system with digital control and dynamic power Peltier compensation. I. Description and basic performance // *Review of Scientific Instruments*. 2000. Vol. 71, no. 4. P. 1824–1831.
4. Garcia-Fuentes L., Baron C., Mayorga O.L. Influence of dynamic power compensation in an isothermal titration microcalorimeter // *Analytical Chemistry*. 1998. Vol. 70, no. 21. P. 4615–4623.
5. Wiseman T., Williston S., Brandts J.F., Lin L.-N. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter // *Analytical Biochemistry*. 1989. Vol. 179, no. 1. P. 131–137.
6. Kotelnikov G.V., Moiseyeva S.P., Mezhburd E.V., Krayev V.P. New isothermal titration calorimeter for investigation on very small samples. Theoretical and experimental studies // *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2002. Vol. 68, no. 3. P. 803–818.
7. Kotelnikov G.V., Moiseyeva S.P., Mezhburd E.V., Maevsky E.I., Grishina E.V. Studying dispersoid systems method of introducing an injecting needle into calorimetric chamber of capillary titration calorimeter // *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2005. Vol. 81, no. 2. P. 255–259.
8. Kotelnikov G.V., Moiseyeva S.P., Mezhburd E.V., Krayev V.P. Method of separating the sensitive volume of calorimetric cells in a differential titration calorimeter // *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2000. Vol. 62, no. 1. P. 39–50.
9. Побежимова Т.П., Колесниченко А.В., Грабельных О.И. Методы изучения митохондрий растений. Полярография и электрофорез. М.: ООО "НПК Промэкспобезопасность", 2004. 98 с.
10. Котельников Г.В., Моисеева С.П. Нанокалориметр для измерения теплопродукции в митохондриях // *Научное приборостроение*. 2016. Т. 26, № 3. С. 3–9. URL: <http://213.170.69.26/mag/2016/abst3.php#abst1>.

ИБП РАН, г. Пушкино, Московская область
(Моисеева С.П., Котельников Г.В.)

Контакты: Моисеева Софья Петровна,
spmoiseewa@yandex.ru

**СИФИБРСОРАН, г. Иркутск (Грабельных О.И.,
Побежимова Т.П., Войников В.К.)**

Материал поступил в редакцию 18.06.2018

CALORIMETRIC MEASUREMENTS OF HEAT PRODUCTION IN PLANT CELL MITOCHONDRIA

S. P. Moiseyeva¹, G. V. Kotelnikov¹, O. I. Grabelnykh²,
T. P. Pobezhimova², V. K. Voinikov²

¹*Institute for Biological Instrumentation, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, Russia*

²*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry Siberian Division RAS, Irkutsk, Russia*

Measurements of heat production in the plant cell mitochondria were performed on the experimental sample of the nanocalorimeter. The addition was carried out without delay and with a delay of 1.5 hours at a temperature of 24 °C. The results of measurements of heat production in freshly isolated mitochondria of winter wheat in a suspension medium showed a 6-fold decrease in heat production in the case of a delayed experiment, which confirmed the need for measurements without delay in time to ensure precise measurements.

Keywords: nanocalorimeter, precision measurements, heat production, plant mitochondria

REFERENCES

1. Nakamura T., Matsuoka I. Calorimetric studies of heat of respiration of mitochondria. *Journal of Biochemistry*, 1978, vol. 84, no. 1, pp. 39–46. Doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a132117.
2. Zhou P.-J., Zhou H.-T., Liu Y., Qu S.-S., Zhu Y.-G., Wu Z.-B. Studies on the energy release of rice mitochondria under different conditions by means of microcalorimetry. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2001, vol. 48, pp. 1–11.
3. Velázquez-Campoy A., López-Mayorga O., Cabrerizo-Ví lchez MA. Development of an isothermal titration microcalorimetric system with digital control and dynamic power Peltier compensation. I. Description and basic performance. *Review of Scientific Instruments*, 2000, vol. 71, no. 4, pp. 1824–1831. Doi: 10.1063/1.1150543.
4. Garcia-Fuentes L., Baron C., Mayorga O.L. Influence of dynamic power compensation in an isothermal titration microcalorimeter. *Analytical Chemistry*, 1998, vol. 70, no. 21, pp. 4615–4623. Doi: 10.1021/ac980203u.
5. Wiseman T., Williston S., Brandts J.F., Lin L.-N. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Analytical Biochemistry*, 1989, vol. 179, no. 1, pp. 131–137.
6. Kotelnikov G.V., Moiseyeva S.P., Mezburd E.V., Krayev V.P. New isothermal titration calorimeter for investigation on very small samples. Theoretical and experimental studies. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2002, vol. 68, no. 3, pp. 803–818.
7. Kotelnikov G.V., Moiseyeva S.P., Mezburd E.V., Maevsky E.I., Grishina E.V. Studying dispersoid systems method of introducing an injecting needle into calorimetric chamber of capillary titration calorimeter. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2005, vol. 81, no. 2, pp. 255–259. Doi: 10.1007/s10973-005-0775-6.
8. Kotelnikov G.V., Moiseyeva S.P., Mezburd E.V., Krayev V.P. Method of separating the sensitive volume of calorimetric cells in a differential titration calorimeter. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2000, vol. 62, no. 1, pp. 39–50. Doi: 10.1023/A:1010150409126.
9. Pobezhimova T.P., Kolesnichenko A.V., Grabel'nyh O.I. *Metody izucheniya mitohondrij rastenij. Polyarografiya i ehlektroforez* [Methods of studying of mitochondria of plants. Polyarografiya and electrophoresis]. Moscow, OOO NPK Promehkspobezopasnost Publ., 2004. 98 p. (In Russ.).
10. Kotelnikov G.V., Moiseyeva S.P. [Nanocalorimeter for measuring the heat production in mitochondria]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Scientific Instrumentation], 2016, vol. 26, no. 3, pp. 3–9. Doi: 10.18358/np-26-3-i39. (In Russ.).

Contacts: Moiseeva Sofya Petrovna,
spmoiseewa@yandex.ru

Article received in edition 18.06.2018