

- Microbiol., 64, 3, 1130-1132, 1998.
11. Soeder C.J. Hydrobiologia, 72, 1, 197-209, 1980.
  12. Tel - OR E. Beussiba S., Richmond A.E. Algae Biomass Elsevier. North-Holland Biomedical Press, 611-618, 1980.
  13. Van Rijn J., Shilo M. Appl. Environ. Microbiol., 52, 2, 340-344. 1986.
  14. Venkataraman L.V. Blue-green Algae Spirulina. CFTRY Press. Mysore, India, 1983.

Поступила 10.11.1999

Биолог. журн. Армении, 2 (52), 1999

УДК 579.253.4:579.842.11

## МЕХАНИЗМ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ОБЛУЧЕННОГО УФ-СВЕТОМ *lon* МУТАНТА NM9 *ESCHERICHIA COLI K-12* ПАНТОИЛЛАКТОНОМ

Г.Г. ОГАНЕСЯН, Л.С. ХАЧАТРЯН, С.С. ОГАНЕСЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г. Абовян

Добавление пантоиллактона (ПЛ) в ростовую среду до или после облучения УФ-светом приводит к резкому (до 500 раз) увеличению выживаемости *lon* мутантов *Escherichia coli K-12*. С повышением концентрации ПЛ увеличивается время генерации, удлиняется лаг-фаза, снижается уровень накопления биомассы, уменьшаются размеры колоний и филаментов. Обнаружена прямая корреляция между скоростью роста культуры и ее чувствительностью к УФ облучению.

ՈւՄ ճառագայթումից առաջ կամ հետո պանտոիլլակտոնի (ՊԼ) ավելացումը ածի միջավայրին բերում է *Escherichia coli K-12*-ի *lon* մուտանտի կենսունակության (մինչև 500 անգամ) կտրուկ բարձրացման: ՊԼ-ի քանակության ավելացումից կախված, մեծանում է կուլտուրայի կրկնապատկման ժամանակը, երկարում է լագ-ֆազը, ընկնում է կենսազանգվածի կուտակման մակարդակը, նվազում են զաղութների և ֆիլամենտների չափերը: Հայտնաբերված է կուլտուրայի ածի արագության և ՈւՄ ճառագայթման հանդեպ նրա զգայունության ուղիղ կախվածությունը:

The addition of pantooyllactone to growth medium before or after UV-irradiation causes the sharp increase (about 500-fold) of survivability in *lon* mutants of *Escherichia coli K-12*. Rise of pantooyllactone concentration brings to elongation of generation time and lag-phase, to decrease of biomass accumulation and to reduction of colonies and filaments sizes. Direct correlation between culture growth rate and sensitivity to UV-irradiation has been revealed.

### *Lon* мутанты *Escherichia coli* - УФ-облучение - пантоиллактон - репарация

Одним из проявлений SOS-ответа на УФ-облучение является индукция *sulA* гена, контролирующего биосинтез ингибитора клеточного деления (ИКД) [6, 7, 9, 10]. У диких штаммов *Escherichia coli* после завершения репарации ДНК ИКД разрушается генопродуктом *lon* гена АТФ-зависимой протеазой (АТФЗП), и деление клеток возобновляется. Но у *lon* мутантов из-за резкого снижения АТФЗП активности ингибирование клеточного деления становится

необратимым, и клетки, как следствие, образуют мультядерные несептированные филаменты [1-8]. Неспособность филаментов образовывать макроколонии на твердых питательных средах является основным фактором высокой чувствительности *lon* мутантов к УФ-облучению.

Показано, что добавление пантоиллактона (ПЛ) в пострадиационную среду роста способствует повышению выживаемости *lon* мутантов и делению филаментов [3-5, 8]. Несмотря на многочисленность работ, проведенных в этом направлении, механизм восстановления клеточного деления ПЛ остается невыясненным. В большинстве работ ПЛ использовался лишь как тест-агент для идентификации мутантов, дефицитных по клеточному делению. Была обнаружена способность ПЛ связываться с клеточной мембраной [5, 9], но каков вклад комплексов ПЛ с клеточной мембраной в инициацию ингибированного облучением септообразования, остается невыясненным.

Предрадиационное влияние ПЛ на выживаемость и деление *lon* мутантов ранее не изучалось.

Настоящая работа предпринята с целью изучения предрадиационного действия ПЛ на жизнеспособность *lon* мутантов и выяснения механизма предотвращения необратимого ингибирования клеточного деления до и после облучения.

**Материал и методика.** В работе использовали неслизистый *lon* мутант NM9 *E. coli* K-12, полученный Оганесяном [2].

Для выращивания бактерий использовали питательный бульон "стандарт II" фирмы Serva, ФРГ; в качестве твердой среды использовали триптоз-агар фирмы Ferak, ФРГ; для разведения культур и облучения - фосфатный буфер (pH-6,8), D,L-пантоиллактон фирмы Sigma, США.

Для изучения чувствительности к УФ облучению экспоненциально растущие культуры подвергали центрифугированию при 3000об/мин., осадки ресуспендировали в фосфатном буфере до титра  $10^8$  кл/мл. По 2мл клеточной суспензии заливали в чашки Петри диаметром 5 см и облучали при постоянном перемешивании под спаренными бактерицидными лампами БУВ-15 на расстоянии 50см. После облучения культуры высевали на триптоз-агар с ПЛ или без него. С целью изучения предрадиационного влияния ПЛ добавляли к культурам через час после начала освежения, и рост продолжался при интенсивной аэрации еще 1час. Затем клетки отмывали от ПЛ центрифугированием, подвергали УФ облучению и высевали на триптоз-агар.

Рост культур определяли по оптической плотности (фотоэлектроколориметр КФК-2МП,  $\lambda=670$  нм, кюветы - 3 мм). Константу скорости роста культур определяли по формуле  $K=0.6931/t$ , где  $t$  - время удвоения.

Для микроскопического изучения морфологии клеток облученные культуры из соответствующих разведений высевали на поверхность триптоз-агара и инкубировали при 37°. Через определенные промежутки времени делали отпечатки с агаровых блоков на предметные стекла и после добавления одной капли стерильной воды прижимали покровным стеклом и обследовали в световом микроскопе МБИ-11 с использованием фазоконтрастного устройства КФК-4. Относительную длину филаментных клеток изучали на микрофотографиях больших увеличений [8].

**Результаты и обсуждение.** Была определена выживаемость клеток *lon* культуры NM9, выращенной до УФ облучения в присутствии различных концентраций ПЛ (рис.1).

Как видно из рисунка, предрадиационный контакт с ПЛ в зависимости от его концентрации способствовал повышению выживаемости клеток в 3-10 раз. Существовала прямая корреляция между концентрацией ПЛ (дозы ПЛ до

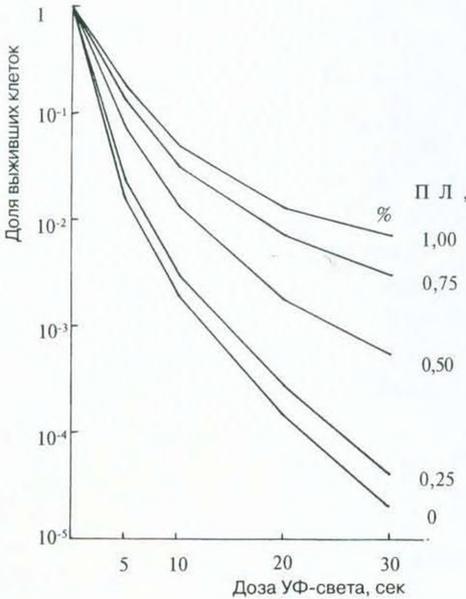


Рис. 1. Предрadiационное действие ПЛ на выживаемость *log* штамма NM9.

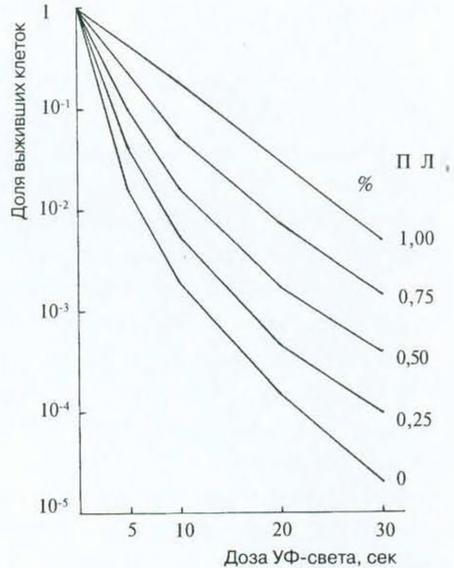


Рис. 2. Пострадиационное действие ПЛ на выживаемость *log* штамма NM9.

0,75%) и выживаемостью клеток. Более высокие концентрации ПЛ ухудшали рост культур и в условиях данного эксперимента не способствовали дальнейшему повышению выживаемости.

Влияние ПЛ на выживаемость культур значительно сильнее проявлялось при его пострадиационном добавлении в питательный агар (рис. 2). С увеличением концентраций ПЛ пропорционально росла выживаемость культуры. На средах, содержащих ПЛ, количество клеток, способных образовывать колонии после УФ облучения, было в 100-500 раз больше, чем на контрольных чашках. Особенно сильно протекторное действие ПЛ проявлялось при высоких дозах УФ.

Было отмечено, что на агаризованных средах с высоким содержанием ПЛ размеры колоний значительно меньше (табл. 1). В связи с этим

Таблица 1. Влияние ПЛ на морфофизиологические свойства *lon* мутанта NM9 *E.coli*

Концентрация ПЛ, %	Размер колоний, мм	Константа скорости роста $ч^{-1}$	Эффективность посева	Относительная длина* филаментов через 6ч	
				ПЛ до облучения	ПЛ после облучения
0	3,5	1,39	1,00	40-50	40-50
0,25	3,0	1,05	1,15	-"-	30-40
0,50	2,5	0,83	1,06	-"-	20-30
0,75	2,0	0,69	1,00	30-40	10-20
1,0	1,5	0,60	1,02	-"-	5-10

\*Примечание: кратность длины филаментов к длине нормальной клетки

наблюдением было решено проверить влияние ПЛ на динамику накопления биомассы у изучаемых культур (рис. 3).

Как видно из кривых роста, с повышением концентрации ПЛ замедляется рост культуры, удлиняется лаг-фаза, укорачивается экспоненциальная фаза. При концентрации ПЛ 1% на несколько часов раньше наступает стационарная фаза и заметно снижается выход биомассы. Удельная скорость роста находится в обратной зависимости от концентрации ПЛ в питательной среде (табл. 1).

Нами было обнаружено, что ПЛ, начиная с концентрации 0,1%, обладает бактериостатическим действием, замедляя или полностью останавливая рост культуры. В пределах концентраций от нуля до одного процента эффективность посева не меняется (табл. 1). В отличие от обычных антибиотиков бактериостатическое действие ПЛ проявляется при очень высоких концентрациях.

Каков механизм подавления роста культур ПЛ, остается невыясненным. Во всяком случае, будучи предшественником витамина пантотеновой кислоты, он вряд ли действует в качестве ее антиметаболита. Обычно для подавления роста на полноценной среде антиметаболитов требуется в сотни раз больше, чем на минимальной среде. Но бактериостатическое действие ПЛ на минимальной среде незначительно отличалось от такового на полноценной. Более того, показано, что антиметаболит самого ПЛ - омега-метилпантоиллактон - тоже является стимулятором деления филаментов [5].

В действии эндогенного и экзогенного ПЛ, по-видимому, существуют резкие отличия. Причиной замедления роста экзогенным ПЛ может быть его способность связываться с наружной мембраной клетки [4]. При высоких концентрациях он может блокировать транспорт компонентов питательной среды или дыхание через мембрану. Замедление роста, скорее всего, не связано с транспортом органических веществ, так как активность ПЛ на полноценной и минимальной средах примерно одинаковая. Не исключается, что именно затруднение дыхания через мембрану, вызванное связыванием с ней ПЛ, является причиной падения скорости роста клеток.

Необходимо отметить, что сама *lon* мутация не приводит к увеличению скорости роста культуры. Поэтому естественно предположить, что действие ПЛ непосредственно не затрагивает *lon* ген.

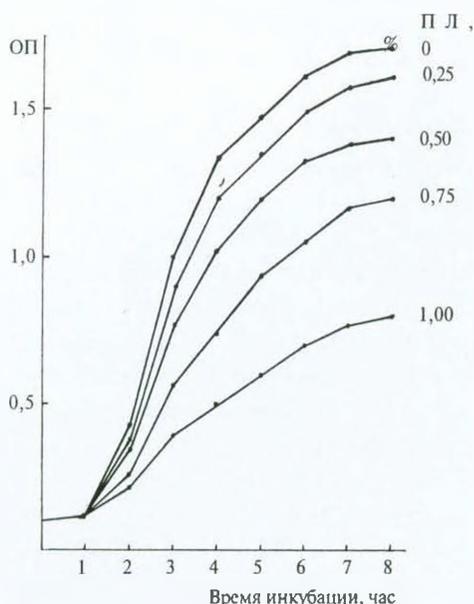


Рис. 3. Влияние ПЛ на скорость роста культуры MM9.

Независимо от места приложения ПЛ, прослеживается четкая корреляция между снижением скорости роста культур и стимуляцией деления клеток, как при предрадиационном, так и пострадиационном добавлении ПЛ. Но по механизму восстановления они, возможно, отличаются друг от друга. При предрадиационном добавлении ПЛ уменьшается доля филаментов в культуре, но не их длина (табл. 1), тогда как предрадиационный рост с ПЛ влияет не на количество филаментов, а на их длину. Существует понятие “критическая длина филаментов”, равная примерно 20-кратной длине нормальной клетки, после достижения которой возобновление клеточного деления становится невозможным [3, 8]. Замедление роста филаментов способствует возобновлению их деления.

Известно, что время полужизни ИКД, синтез которого индуцируется после УФ облучения, в *lon*<sup>+</sup> клетке составляет 2 минуты, а в *lon* мутанте - до 19 минут [7]. Синтез SOS белков, в том числе SulA, очень короткий промежуток времени происходит с большой скоростью, затем прекращается с затуханием SOS-сигнала. Сила последнего зависит от количества репликативных вилок (РВ) в ДНК [10, 12]. У быстрорастущих клеток число РВ достигает максимума. С замедлением скорости роста и уменьшением количества РВ ослабляется сигнал, индуцирующий SOS-ответ [9]. При слабом сигнале белки SOS-ответа индуцируются не в полном составе и элиминируются быстрее.

При предрадиационном добавлении ПЛ у медленно растущих клеток в момент УФ-облучения количество РВ меньше, и при слабом сигнале SOS-ответ индуцируется не в полном составе. И несмотря на дальнейший рост без ПЛ, во многих клетках SOS-ответ реализуется без индукции синтеза SulA-белка и образования филаментов. Интересно отметить, что полное и частичное отсутствие SulA-белка не отражается на жизнеспособности облученных или интактных клеток [7].

При изучении пострадиационного влияния ПЛ культуры в момент облучения находятся в экспоненциальной фазе роста, поэтому индукция SOS-ответа полная. Но реализация SOS-ответа происходит при заторможенном росте клеток, вызванном наличием ПЛ в среде. При медленном росте скорость синтеза белка уменьшается, но скорость репликации и репарации ДНК остается неизменной [11]. В этих условиях ИКД синтезируется меньше и из-за удлинения времени генерации успевает разрушиться до достижения филаментной клеткой критической длины. Поэтому добавление ПЛ после облучения влияет не на количество, а на длину филаментов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Барсесян А.А., Оганесян Г.Г., Оганесян М.Г. Биолог. журн. Армении, 36, 6, 479-484, 1983.
2. Оганесян Г.Г. Биолог. журн. Армении, 48, 2, 55-58, 1995.
3. Adler H.I., Hardigree A.A. Radiation Res., 25, 92-102, 1965.
4. Adler H.I., Hardigree A.A. J Bacteriol. 90, 1, 223-226 1965.

5. Grula E.A., Grula M.M. J. Bacteriol. 83, 3, 981-988, 1962.
6. Huisman O., d'Ari R. Nature(London), 290, 3, 797-799, 1981.
7. Huisman O., d'Ari R., Gottesman S. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 4490-4494, 1984.
8. Kantor G.J., Deering R.A. J. Bacteriol., 95, 2, 520-530, 1968.
9. Kato Y., Shiraki S., Hamada Y., Iyehara-Ogawa H., Nakayama H. Can. J. Microbiol., 26, 12, 1518-1522, 1980.
10. Walker G.C. Microbiol. Rev., 48, 1, 60-93, 1984.
11. Witkin E. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 57, 1275-1279, 1967.
12. Zittle J.W., Mount D.W. Cell, 29, 1, 11-12, 1982.

Поступила 9.XI.1998

Биолог. журн. Армении, 2 (52), 1999

УДК 619:615(679)

## ПАТОЛОГОАНАТОМИЧЕСКИЕ И ПАТОЛОГОГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ОРГАНОВ ПАВШЕГО ОТ ТРИПАНОСОМОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

С.Р. ПОСТОЯН

*НИИ ветеринарной медицины МСХ Армении, 375005, Ереван*

Проводились патологоанатомические и патологогистологические исследования органов павшего от трипаносомоза крупного рогатого скота. Показано, что наиболее часто деструктивные изменения возникают в печени, почках, селезенке и лимфатических узлах. Активизируется деятельность мононуклеарной фагоцитарной системы.

Կատարվել են տրիպանոսոմոզից ընկած խոշոր եղջերավոր անասունների օրգանների պաթոանատոմիական և պաթոհիստոլոգիական ուսումնասիրություններ: Ցույց է տրված, որ առավել հաճախ կառուցվածքային փոփոխություններ առաջանում են լյարդում, երիկամներում, փայծաղում և ավշային հանգույցներում: Ակտիվանում է մոնոնուկլեար ֆագոցիտային սիստեմի գործունեությունը:

The pathoanatomical and pathohistologic researches of organs in cattel perished from trypanosomosis have been done. The destructive changes more frequently appear in liver, kidneys, spleen and lymph nodes. The mononuclear phagocytic system is activated.

*Трипаносомоз крупного рогатого скота - патологические изменения органов*

Литературные сведения, касающиеся изменений органов павшего от трипаносомоза крупного рогатого скота, скудны и чаще освещают патологоанатомические, нежели патологогистологические изменения [1, 3, 4, 5].

**Материал и методика.** В неблагоприятных по трипаносомозу крупного рогатого скота хозяйствах района Мансанильо провинции Орьенте Республики Куба патологоанатомическим исследованиям подверглись трупы восьми естественно больных и четырех искусственно зараженных трипаносомозом зебу и их помесей в возрасте 6-8 месяцев.