

ДИНАМИКА ИНТЕНСИВНОСТИ СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ УФ-РЕЗИСТЕНТНЫХ И УФ-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ШТАММОВ *SALMONELLA DERBY*

А.З. ПЕПОЯН

Институт молекулярной биологии НАН Армении, 375014, Ереван

Изучены особенности динамики процессов липидной перекисидации штаммов *Salmonella derby*, различных по УФ-чувствительности. Установлен характер интенсивности свободнорадикальных процессов в бактериальных суспензиях и клеточных экстрактах. Показано, что течение этих процессов в клетках *S. derby* зависит как от логарифмических и стационарных фаз роста, так и от характера бактериальных межклеточных взаимодействий.

Ուսումնասիրվել են ՌՄ-զգայունությամբ տարբերվող *Salmonella derby* շտամների լիպիդային պերօքսիդացիոն պրոցեսների դինամիկայի առանձնահատկությունները: Բացահայտվել է ազատ ռադիկալային պրոցեսների ինտենսիվության բնութագիրը բակտերիաների սուսպենզիաներում և բջջային էքստրակտներում: Ցույց է տրվել, որ *S. derby* բջիջներում վերոհիշյալ պրոցեսների ընթացքը խիստ կախված է ինչպես բակտերիաների աճման լոգարիթմական և ստացիոնար փուլերից, այնպես էլ միջբջջային փոխազդեցությունների բնույթից:

The dynamics peculiarities of lipid peroxidation processes of *Salmonella derby* strains differed UV-sensitivity have been studied. The description of intensity free of radical processes in bacterial suspensions and cell extracts has been revealed. It has been shown that indicated processes in *S. derby* cells are deeply depended as on the exponentiation and stationary phases of bacterial growth as character of intercellular interactions.

УФ-резистентность - плаزمида - перексидация липидов - межклеточные взаимодействия

Чрезмерное или длительное неферментативное свободнорадикальное окисление липидов приводит к резкому нарушению физико - химической структуры мембран. Это, в частности, распространяется на проницаемость, устойчивость липид-белковых комплексов, а также на инактивацию липидзависимых мембраносвязанных ферментов. В серии работ нами было показано изменение ряда морфологических, генетических, биохимических свойств УФ-резистентных и УФ-чувствительных клеток *Salmonella derby* [1-3]. Целью настоящей работы явилось изучение динамики интенсивности свободнорадикальных процессов УФ-резистентных и УФ- чувствительных штаммов *S. derby*.

Материал и методика. В работе использовали УФ-чувствительные мутанты *S. derby* К 134, полученные из диких условнопатогенных штаммов *S. derby* К 89 и бесплазмидные УФ-резистентные штаммы *S. derby* К 95, полученные из штаммов *S. derby* К 134 [1].

Об активности перекисного окисления липидов (ПОЛ) судили по интенсивности окрашивания малонового диальдегида (МДА) в реакции с тиобарбитуровой кислотой. Интенсивность окрашивания регистрировали спектрофотометрически (СФ - 4А) при длине волны 535 нм [1]. Количество пероксидов пересчитывали на мг белка данной суспензии. Белок определяли по методу Лоури [7] и Яковлевой [6] как в экстрактах бактерии, так и

в бактериальной суспензии в зависимости от концентрации клеток (расчет концентрации проводили по плотности клеток в 1 мл среды, определяемой по СФ - 4А и продолжительности реакции (время инкубации).

Результаты и обсуждение. В табл. 1, 2 представлены данные о количестве МДА, последнего продукта перекисидации липидов биологических мембран, в зависимости от времени инкубации, фазы роста и концентрации штаммов *S.derby*.

Таблица 1. Количество МДА (мкг/мг белка), образующегося в процессе ПОЛ в клетках *S.derby* в зависимости от времени инкубации (n, ч)

Штаммы <i>S.derby</i>	Время инкубации, ч			
	n=0.5	n=1	n=1.5	n=2
	Суспензия (K=0.4)			
К 89	93.47±1.28	102.58±2.44	118.5±0.28	118.54±0.14
К 82	30.58±1.40	33.13±1.04	35.68±0.94	36.95±0.81
К 134	23.90±1.40	37.44±3.21	47.00±0.70	47.44±3.21
К 95	8.00±1.34	30.62	35.21±0.01	35.4±2.00
	Экстракт (K=0.4)			
К 89	24.94±0.58	25.84±3.14	26.07±0.90	26.30±0.23
К 82	25.64±0.07	27.49±1.40	34.80±0.08	34.80±1.13
К 134	22.4	23.52±0.40	23.71±0.70	23.80±0.87
К 95	7.88±0.89	8.43±0.31	10.70±2.20	10.70±1.20
	Суспензия (K=0.7)			
К 89	30.39±0.60	39.39±0.58	54.02±1.11	54.02±0.70
К 82	19.81±0.20	23.33±1.01	26.01±1.05	26.00±1.23
К 134	15.00±0.43	18.90±0.87	25.90±0.10	26.10±3.01
К 95	21.20±0.47	27.54±0.09	30.29±0.40	30.70±2.70
	Экстракт (K=0.7)			
К 89	44.37±0.19	53.24±0.30	70.99±0.41	71.00±3.06
К 82	19.30±1.03	44.42±0.25	73.34±2.31	77.20±2.10
К 134	22.33±0.07	26.80±0.44	32.20±0.07	32.24±1.04
К 95	9.77±1.01	17.26±2.07	22.95±0.78	24.10±3.00

По интенсивности ПОЛ в бактериальной суспензии выявлено различное содержание МДА в плазмидных (УФ-чувствительных) и бесплазмидных (УФ-резистентных) клетках. Показано, что количество МДА у УФ-резистентного штамма *S.derby* К 95 при любой концентрации клеток приблизительно постоянно, а у УФ-чувствительных клеток *S.derby* наблюдается обратная корреляция между количеством МДА и концентрацией клеток.

Поскольку процесс протекает в диффузионной области, то не исключено, что скорость выделения МДА, образующегося в процессе ПОЛ, из мембраны в межклеточное пространство должна зависеть в первую очередь от площади свободной поверхности клеток. Обозначив наружную поверхность клеток через S_n , поверхность, занятую межклеточным контактом, S_k , можно получить скорость накопления МДА в межклеточном пространстве для

клеточной суспензии:

$$d[\text{МДА}]_c/dt = K_0 N [\text{МДА}]_o (S_o - S_k), \quad (1)$$

где K_0 – константа процесса выделения МДА из мембраны в межклеточное пространство, N – концентрация клеток в системе, $[\text{МДА}]_o$ – концентрация МДА в мембране, $S_o - S_k$ – свободная от контактов поверхность наружной стороны клеточной мембраны.

Для экстракта, состоящего из разрушенных клеток, поверхность межмембранного контакта S_k^2 , с одной стороны, должна быть больше по сравнению с поверхностью целостных клеток; с другой стороны, внутренняя и наружная поверхности клеточных мембран должны одинаково участвовать в процессе переноса МДА из мембраны в межклеточное пространство. Следовательно, для разрушенных клеток будем иметь

$$d[\text{МДА}]_c/dt = 2K_0 N [\text{МДА}]_o (S_o - S_k^2), \quad (2)$$

Разделив (1) на (2), получим

$$d[\text{МДА}]_c/d[\text{МДА}]_o = S_o - S_k / 2(S_o - S_k^2) \quad (3)$$

При постоянной концентрации клеток ($S_k = \text{const}$, $S_k^2 = \text{const}$), интегрируя (3), получим

$$[\text{МДА}]_c = S_o - S_k / 2(S_o - S_k^2) [\text{МДА}]_o \quad (4)$$

Таким образом, очевидность существования зависимости между количеством МДА в системе от S_k и S_k^2 в случае целостных ($[\text{МДА}]_c$) и разрушенных клеток ($[\text{МДА}]_o$) не вызывает сомнений. Следовательно, отношение $[\text{МДА}]_c/[\text{МДА}]_o$, определяемое экспериментально, будет зависеть (при $S_o = \text{const}$) от поверхности межклеточного (S_k) и межмембранного (S_k^2) контактов, в свою очередь зависящих от концентрации клеток. При этом поверхность контактов в случае целостных и разрушенных клеток будет по-разному зависеть от концентрации клеток. В случае разрушенных клеток следует ожидать более быстрого роста S_k^2 , чем в случае целостных клеток. Это объясняется комплементарностью разрушенных клеток в отличие от мембран целостных клеток, имеющих сферическую или эллипсоидную форму.

Опираясь на представление об отличии межмембранных контактов целостных и разрушенных клеток попытаемся выяснить механизм изменения $[\text{МДА}]_c$ и $[\text{МДА}]_o$. Как видно из табл. 1, кинетика плазмидных штаммов при малых концентрациях клеток ($K=0.4$) на протяжении всего процесса демонстрирует превышение $[\text{МДА}]_c$ над $[\text{МДА}]_o$, и наоборот, $[\text{МДА}]_o$ над $[\text{МДА}]_c$ при относительно высокой концентрации клеток ($N=0.7$). Из сопоставления данных табл. 1 с формулой (4) видно, что при малой концентрации клеток выполняется условие

$$S_o - S_k / 2(S_o - S_k^2) > 1, \quad (5)$$

а при большой концентрации

$$S_o - S_k / 2(S_o - S_k^2) < 1, \quad (6)$$

т. е.

$$S_0 - S_k > 2(S_0 - S_k^3), \quad (7a)$$

$$S_0 - S_k < 2(S_0 - S_k^3). \quad (7б)$$

Из (7а) и (7б) видно, что при малых концентрациях клеток свободная от контактов наружная поверхность целостной клетки $S_0 - S_k$ оказывается больше удвоенной поверхности клеток $2(S_0 - S_k^3)$. Увеличение же концентрации клеток по стерическим причинам должно приводить к незначительному росту S_k^3 вследствие быстрого достижения стационарного значения и к более быстрому росту S_k , ибо мембраны разрушенных клеток благодаря плоской форме и комплементарности, уже при малых концентрациях должны максимально контактировать друг с другом, в то время как для целостных клеток увеличение S_k с концентрацией является монотонным процессом, не имеющим предела насыщения. Следовательно, с повышением концентрации клеток условие (7а) должно перейти в (7б), что, согласно (4), равносильно отмеченному при малых концентрациях превосходству $[МДА]_c$ над $[МДА]$, и, наоборот, для высоких концентраций клеток, что и имеет место в экспериментах, проводимых с УФ-резистентными плазмидными штаммами. Наблюдаемые же (см. табл. 1) во времени увеличение $[МДА]$ в случае суспензии $[МДА]_c$ и незначительное уменьшение в случае экстракта $[МДА]_c$, вероятно, обусловлено наличием двух противоположных процессов: а) повышения концентрации клеток (N) и б) и в) уменьшения свободной от контактов поверхности клеток и мембран ($S_0 - S_k$), ($S_0 - S_k^3$). Увеличение N и уменьшение $S_0 - S_k^3$ компенсируют друг друга, что приводит к незначительному падению $[МДА]_c$ во времени.

В случае целостных клеток рост их концентрации (N), вероятно, превалирует над падением ($S_0 - S_k$), что и приводит к росту $[МДА]_c$ во времени. Согласно изложенной альтернативе о роли поверхностных контактов в ПОЛ у плазмидосодержащих клеток *S. derby*, можно данные по ПОЛ у бесплазмидного штамма (табл. 2), определяемые в бактериальной суспензии и указывающие на отсутствие влияния концентрации клеток на количество МДА, объяснить также наличием большого числа контактов между этими клетками, выявляемых уже при малых концентрациях клеток в суспензии, плотность которой $K=0.2$ (по значениям ФЭК). Это согласуется с выявленным ранее изменением морфологии и ультраструктуры бесплазмидных клеток *S. derby*, для которых показано, что клетки имеют извилистую поверхность клеточной стенки с фимбриями лектинной природы [4], увеличивающими вероятность образования межклеточных контактов.

С другой стороны, весьма интересны результаты изучения ПОЛ в клетках *S. derby* в процессе их роста и размножения, т.е. в логарифмической фазе роста. При равных концентрациях клеток ($K=0.2$) выявляется зависимость ПОЛ от их физиологического состояния, что особенно ярко выражено у *S. derby* К 89 (табл. 2). Показано также, что бесплазмидные клетки (*S. derby* К 95 и К 82) отстают в росте в 2-3 раза по сравнению с плазмидными и при равной концентрации их количество жизнеспособных клеток в 10 раз меньше, чем в случае плазмидосодержащих.

Вышеизложенное не исключает существования неисследованных регуляторных механизмов, обеспечивающих различный уровень образования пероксидов в бактериальной суспензии УФ-резистентных и УФ-чувствительных клеток *S. derby*.

Таблица 2. Количество МДА (мкг/мг белка), образующегося в процессе ПОЛ в клетках в зависимости от фазы роста и концентрации штаммов *S. derby*

Штаммы <i>S. derby</i>	K=0.1	K=0.2	K=0.2	K=0.4	K=0.7
	Клеточная суспензия				
	Логарифмическая фаза		Стационарная фаза		
K 89	140.10±2.0	54.32±1.00	36.22±3.40	118.54±1.4	54.02±0.1
K 82	32.01±2.10	32.79±9.1	34.66±1.10	36.95±0.81	26.01±1.23
K 134	17.50±0.90	23.01±0.70	23.90±1.10	47.44±3.21	26.10±3.01
K 95	13.00±2.10	14.90±0.40	15.20±1.40	35.40±2.00	30.70±2.70
	Клеточный экстракт				
	Логарифмическая фаза		Стационарная фаза		
K 89	20.05±0.41	30.90±2.00	9.90±1.21	26.30±0.23	71.00±3.06
K 82	27.00±0.40	27.00±0.24	13.10±2.01	34.80±1.13	77.20±2.11
K 134	5.50±0.70	5.80±0.40	2.50±0.15	23.80±0.87	32.24±1.04
K 95	4.10±1.20	6.00±1.10	5.80±0.80	10.70±1.20	24.10±3.00

На основе вышеприведенных данных реальное количество образовавшегося МДА определяли при концентрации клеток *S. derby* K=0.4, при которой для всех клеток *S. derby* межклеточные взаимодействия существенно не влияют на выделение МДА в межклеточное пространство. Поскольку окислению в основном подвергаются липиды, а основную часть мембранных липидов у бактерии составляют амфифильные фосфолипиды, количество МДА пересчитано на 1 мкг фосфора данной суспензии. Количество фосфора определяли при изучении ФЛ состава клеток *S. derby* [2, 5].

Результаты по определению интенсивности течения реакции ПОЛ в плазмидных и бесплазмидных клетках *S. derby* показали, что количество МДА в мембранах *S. derby* в аскорбат- и НАДФН-зависимых системах переокисления одинаково (табл. 3).

Таблица 3. Количество МДА (мкг/мг ФЛ) в клетках *Salmonella derby* при аскорбат-зависимой и НАДФН-зависимой системах переокисления

МДА	Штаммы			
	<i>S. derby</i> K89 (дикий плазмидный)	<i>S. derby</i> K134 (плазмидный, УФ-чувствительный мутант)	<i>S. derby</i> K82 (бесплазмидный УФ-резистентный)	<i>S. derby</i> K95 (бесплазмидный УФ-резистентный)
Бактериальная суспензия	33.23±1.20	12.78±1.40	416.43±18.30	407.00±56.10
Культуральная жидкость	9.10±1.07	10.50±1.80	278.40±14.00	381.00±17.44

Однако, как явствует из табл. 3, в бесплазмидных клетках (клеточные суспензии) интенсивность ПОЛ почти в 12.5 раза выше, чем в диких клетках *S.derby* К 89, и более 32 раз выше, чем в УФ-чувствительных штаммах *S.derby* К 134. Выявлено почти одинаковое количество МДА в клеточных суспензиях и культуральных жидкостях штаммов *S.derby* К 134 (табл. 3), в то время как в остальных изученных клетках (дикие клетки *S.derby* К 89, УФ-резистентные бесплазмидные клетки *S.derby* К 82 и *S.derby* К 95) уровень пероксидации липидов в клеточных суспензиях значительно выше, чем в культуральных жидкостях.

Таким образом, отсутствие R-плазмиды в диких клетках *S.derby* К 134 влияет на динамику интенсивности пероксидации липидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балаян М.А. Автореф. канд. дисс., Ереван, 1998.
2. Балаян М.А., Вардеванян П.О., Пепоян А.З. и др. Биол. мемб., 14, 506–509, 1997.
3. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., Наука, 1972.
4. Кцоян Ж.А., Таусова А.С., Саркисян Н.Н. и др. Антибиотики и химиотерапия. 10, с. 760, 1988.
5. Пепоян А.З., Балаян М.А., Карагезян К.Г. Докл. АН РА. 97, 79-83, 1997.
6. Яковлева В.И., Малофеева И.В., Зуева И.Н. Приклад. биохимия и микробиология. 15, 328, 1979.
7. Lowry O.M., Rosebrough N.J., Farr A.L. J. Biol. Chem. 93, 265, 1951.

Поступила 10.VII.2001