

МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО СПЕЦИАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
Р С Ф С Р
ГОРЬКОВСКИЙ ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ им. Н.И.ЛОБАЧЕВСКОГО

УДК:581.19.81:577.4:661.939

№2132-84 Ден

Т.А.Утенкова, Е.М.Волский, В.Г.Сидоркин,
С.Д.Кутис, Н.В.Иванова

Влияние искусственной атмосферы с инертными
газами на активность дегидрогеназ культуры
калусной ткани кукурузы.

Горький - 1983

Проблема изучения роли атмосферного азота в жизнедеятельности живых организмов в настоящее время приобретает большую актуальность. Особое внимание к этой проблеме было проявлено в связи с освоением космического пространства и морских глубин, когда встал вопрос о замене азота воздуха инертными газами в герметически замкнутых системах жизнеобеспечения /1/.

В подавляющем большинстве экспериментальных работ, связанных с изучением влияния замены азота воздуха инертными газами, использовались двухкомпонентные газовые смеси: аргон-кислородная или гелиокислородная. При этом, отмеченные отклонения в тех или иных системах живых организмов, находящихся в атмосфере инертных газов, как правило объясняли различной теплопроводностью искусственных газовых смесей и воздуха /2,3,10/. С целью исключения данного фактора была предложена трехкомпонентная газовая смесь, состоящая из кислорода, аргона и гелия, равная по теплопроводности воздуху /4/.

При использовании растений в замкнутых системах жизнеобеспечения является необходимым выяснение их реакции на измененный состав газовой среды. В качестве объекта исследования нами была выбрана культура ткани растений, которая является удобной моделью для изучения ответных реакций данной биологической системы на воздействие различных факторов внешней среды. В литературе работ аналогичного плана с тканевыми культурами растительного происхождения нами не обнаружено.

Задачей настоящих исследований явилось изучение влияния

замены азота воздуха искусственной газовой смесью теплопроводностноэквивалентной воздуху на активность общих (эндогенных) дегидрогеназ и специфической изоцитратдегидрогеназы, так как изменения в энергетике растительных тканей представляет собой одну из составных частей ответной реакции на эти воздействия.

Методика исследований.

Объектом исследования служила каллусная ткань кукурузы сорта Воронежская 76 корневого происхождения, введенная нами в культуру в 1978 г. /5/. Ткань поддерживали на питательной среде, состоящей из минеральной основы среды /12/, витаминов по Стаба, 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты (5 мг/л), дрожжевого гидролизата (1 г/л), сахарозы (20 г/л), агар-агара (10 г/л).

Кусочки каллусной ткани 10-ти суточного возраста высевали в колбы Эрленмейера на 200 мл с 20 мл агаризованной питательной среды. Для опыта и контроля брали по 15 колб. Через стерильные угольные фильтры колбы последовательно соединяли стерильными вакуумными шлангами.

Система газообеспечения состояла из 4-х баллонов с газами (кислород высокой чистоты с содержанием O_2 - 99,999 об.%, аргон марки "чистый", гелий марки "вч" и воздух), блока приготовления смеси газов (БПГ - 38), блока контроля теплопроводности газовой смеси на базе газового хроматографа "Газохром - 3101" с детектором по теплопроводности и самопишущим потенциометром КСП-4-909. Контрольную ткань продували воздухом, опытную - искусственной газовой смесью, содержащей 21% O_2 , 67% Ar и 12% He , теплопроводностноэквивалентной воздуху. Использовали проточно - замкнутый тип инкубационной системы: в течение 3-х ч в сутки систему продували потоком газов и

в течение 21 ч система была замкнута. Расход газовой смеси и воздуха составлял 10 л/ч.

Активность общих дегидрогеназ и специфической изоцитратдегидрогеназы (ИЦДГ) определяли тетразолиевым методом /6/ при pH инкубационной среды 7,6. Активность дегидрогеназ выражали в мг восстановленного трифенилтетразолия хлористого на 1г сырой массы ткани. Ферментативную активность ткани определяли на 7, 14, 24, 28-е сутки от момента начала инкубации ткани в искусственной газовой смеси и в воздушной среде. Результаты опытов статистически обрабатывали с применением t - критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение.

Результаты определения эндогенных дегидрогеназ и специфической изоцитратдегидрогеназы в условиях контроля (инкубация в воздушной среде) и опыта (инкубация в атмосфере с инертными газами) представлены в таблице. Как видно из таблицы, энзиматическая активность ткани в условиях контроля существенно изменяется в течение ростового цикла ткани, что, вероятно, обусловлено характерной для каллусной ткани сменой фаз в цикле ее развития: лаг-фазы, фазы экспоненциального роста, стационарной фазы. В условиях данного эксперимента, отчетливое повышение активности эндогенных дегидрогеназ на 17-ые сутки и понижение на 24-ые, и далее на 28-ые сутки, по-видимому, можно объяснить характерным для каллусной ткани возрастанием интенсивности дыхания в фазе экспоненциального роста и его спадом на заключительном этапе развития культуры /7,13,14/.

Динамика активности суммарных дегидрогеназ каллусной

Таблица

Активность эндогенных дегидрогеназ и изоцитратдегидрогеназы культуры каллусной ткани кукурузы в воздушной и гелиоаргонокислородной газовой смеси теплопроводностэквивалентной воздуху

Исследуемые ферменты	Газовая атмосфера	Возраст культуры (сутки)	Возраст культуры (сутки)				
			7	14	17	24	28
			Активность фермента (мг восстановленного трифенилтетразолия/г сырой массы ткани)				
I	2	3	4	5	6	7	8
Эндогенные дегидрогеназы	воздух	7	0,76±0,04	0,56±0,12 $P_1 > 0,05$	1,27±0,09 $P_1 > 0,05$	0,92±0,05 $P_1 > 0,05$	0,56±0,02 $P_1 < 0,01$
		14			$P_1 < 0,01$	$P_1 > 0,05$	$P_1 > 0,05$
		17				$P_1 < 0,05$	$P_1 < 0,01$
		24					$P_1 < 0,01$
Искусственная атмосфера с инертными газами		7	0,95±0,1	0,62±0,19 $P_2 > 0,05$	1,15±0,17 $P_2 > 0,05$	0,86±0,01 $P_2 > 0,05$	0,93±0,04 $P_2 > 0,05$
		14			$P_2 > 0,05$	$P_2 > 0,05$	$P_2 > 0,05$
		17				$P_2 > 0,05$	$P_2 > 0,05$
		24					$P_2 > 0,05$
				$P_3 > 0,05$	$P_3 > 0,05$	$P_3 > 0,05$	$P_3 > 0,05$

I	2	3	4	5	6	7	8
Изоцитрат дегидрогеназа	воздух	7	0,23±0,05 $P_1 > 0,05$	0,14±0,05 $P_1 > 0,05$	0,18±0,07 $P_1 > 0,05$	0,39±0,16 $P_1 > 0,05$	0,32±0,08 $P_1 > 0,05$
		14			$P_1 > 0,05$	$P_1 > 0,05$	$P_1 > 0,05$
		17				$P_1 > 0,05$	$P_1 > 0,05$
		24					$P_1 > 0,05$
Искусственная атмосфера с инертными газами		7	0,05±0,02	0,02±0,01 $P_2 > 0,05$	0,17±0,05 $P_2 > 0,05$	0,49±0,09 $P_2 < 0,05$	0,14±0,05 $P_2 > 0,05$
		14			$P_2 > 0,05$	$P_2 < 0,05$	$P_2 > 0,05$
		17				$P_2 < 0,05$	$P_2 > 0,05$
		24				$P_2 < 0,05$	$P_2 > 0,05$
				$P_3 < 0,05$	$P_3 > 0,05$	$P_3 > 0,05$	$P_3 > 0,05$

Примечание: P_1 - достоверность различий между показателями активности суммарных (эндогенных) дегидрогеназ (изоцитратдегидрогеназы) в динамике развития культуры ткани в воздушной среде.
 P_2 - достоверность различий показателей активности эндогенных дегидрогеназ (изоцитратдегидрогеназы) в динамике развития культуры ткани в инертных газах.
 P_3 - достоверность различий показателей активности эндогенных дегидрогеназ (изоцитратдегидрогеназы) между контролем и опытом в однозначные сроки развития культуры ткани.

ткани, растущей в атмосфере искусственной газовой смеси, сходна с динамикой их в контрольном варианте. Вместе с тем, при статистическом анализе материала опытного варианта достоверных различий суммарной активности в различные периоды развития ткани не было обнаружено, что, вероятно, связано с возрастанием асинхронности развития ткани под влиянием инертных газов. При сравнении активности суммарных дегидрогеназ в контрольном и опытном варианте статистически достоверное различие выявлено только на 28-ые сутки развития культуры.

Динамика активности изоцитратдегидрогеназы в условиях контроля сходна с динамикой активности эндогенных дегидрогеназ в тех же условиях: активность фермента понижается на 14-ые сутки, возрастает на 24-ые и снижается на 28-ые сутки. Максимум активности изоцитратдегидрогеназы приходится на 24-ые сутки, в то время как суммарных дегидрогеназ - на 17-ые.

В искусственной атмосфере с инертными газами отмечено возрастание активности ИЦДГ на 14-ые и далее на 24-ые, после чего наступает резкое снижение активности фермента, причем, начиная с 17 суток изменения в активности фермента статистически достоверны. Сопоставительный анализ активности изоцитратдегидрогеназы в контрольном и опытном варианте показал достоверные различия в активности фермента только на 7-ые сутки роста культуры: в ткани, инкубированной в искусственной газовой атмосфере с инертными газами, активность ИЦДГ была более, чем в 4 раза ниже по сравнению с контролем.

Таким образом, не во все сроки развития каллусной ткани кукурузы отмечены статистически достоверные отличия активности ферментов по вариантам сравнения: лишь только на

7-е сутки показатели активности изоцитратдегидрогеназы и 28-е сутки - суммарных дегидрогеназ, достоверно различались. Эти различия связаны с повышением активности суммарных дегидрогеназ и понижением активности ИЦДГ в указанные сроки.

Полученные нами результаты в определенной мере можно объяснить с позиций данных, имеющихся на сегодняшний день в литературе. В частности, известно, что замена азота в газовой смеси гелием увеличивает скорость окисления глюкозы, угнетает реакции фосфорилирования, воздействует на цитохромную систему и цикл лимонной кислоты /15/. По данным Левченко с соавт. /8/ пируват, НАДН, малатдегидрогеназа азотобактера выше в атмосфере инертного газа, чем азота, а активность сукцинатдегидрогеназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы не меняется в разных газовых средах. По данным Эберта /16/ гелий конкурирует с кислородом за активные центры клетки. Мейер /цит. по 17/ высказал гипотезу, согласно которой инертные газы, растворяясь в липидном компоненте мембран клеток, изменяют парциальный состав системы липид - вода клеточных мембран, что, в свою очередь, ведет к изменению ионного окружения поверхности мембран. Эта гипотеза была высказана в связи с объяснением возможного механизма наркотического действия инертных газов. В опытах Рича /цит. по 9/ на искусственных бимолекулярных мембранах было обнаружено значительное увеличение электрического сопротивления мембран в условиях гелиокислородной среды по сравнению с воздушной. Автор предполагает, что указанные изменения связаны с возникновением сдвига жидко-кристаллического состояния мембран под влиянием инертных газов.

Таким образом, поскольку метаболические процессы,

обеспечивающие энергетические потребности клетки, связаны с функционированием мембран, влияние инертных газов на живые системы следует рассматривать в большей степени в связи с опосредованным действием их через изменение физико-химических свойств мембран. Именно эти изменения, по видимому, являются стартовой реакцией в проявлении действия инертных газов на организм в целом. Более подробно механизм действия инертных газов рассматривался нами в ранее опубликованной работе /10/.

2/32-84

1. ...
2. ...
3. ...
4. ...
5. ...
6. ...
7. ...
8. ...
9. ...
10. ...

Л и т е р а т у р а

1. Авдуевский В. . Космонавтика - народному хозяйству. Коммунист, 10, 1980.
2. Борискин В.В., Облапенко П.В., Рольник В.В., Савин Б.М., О возможности развития организма животного в условиях замены азота воздуха гелием. ДАН СССР, 2, 143, 1962.
3. Дианов А.Г., Исаенко В.В., Свиридова Г.П. Физиологический эффект замены азота воздуха инертными газами в условиях высоких и низких температур. Космическая биология и авиакосмическая медицина, 7, 1, 1973.
4. Волский Е.М. Способ приготовления газовых смесей под давлением. В кн.: Усвоение атмосферного азота животными и высшими растениями, 1970.
5. Утенкова Т.А. Получение культуры каллусной ткани кукурузы сорта Воронежская 76. Горьк. гос. ун-т, Горький, 1981, 16с. Рукопись деп. в ВИНТИ 1.2.1982, №23-82 ДП.
6. Гавриленко В.Ф., Ладыгина М.Е., Хандобина Л.М. Большой практикум по физиологии растений, 1975.
7. Сарнацкая В.В. Метаболизм растительной ткани в процессе опухолевой трансформации. В кн.: Регуляция метаболизма растительной клетки, "Наукова думка", 1973.
8. Левченко Л.А., Ивлиева И.Н., Яковлева В.А. Субклеточная локализация оксидоредуктаз *Ascaris balabacensis* и их роль в фиксации азота. "Наука", 1971.
9. Зальцман Г.Л., Кучук Г.А., Гургенидзе А.Г. Основы гипербарической физиологии, 1979.
10. Кутис Т.Л., Волский Е.М., Кутис С.Д., Сидоркин В.Г. Исследование некоторых физиологических и биохимических па -

раметров проростков тыквы, выращенных в воздухе и безазотных искусственных газовых средах с инертными газами. Горьк. гос. ун-т. Горький, 1983. Рукопись депонирована в ВИНИТИ 29.08.1983, № 4727 - деп.

- II. Leon H.A., Cooc S.F. A mechanism by which helium increases metabolism in small mammals. *Amer. J. Physiol.*, 199, no. p 243-245, 1960.
12. Murashige F., Scog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. plant*, 15, 473, 1962.
13. Lioret C. Recherches sur le métabolisme des cultures de tissus végétaux cultivés in vitro. *Thèse. Paris*, 1958, 128 p.
14. Physiologie comparée des tissus végétaux et tumoraux. *Soc. France. physiol. végét.* 1964, 10, 2, p 100.
15. South F.E. Jr., Cooc S.F. Argon, Xenon, Hydrogen and oxygen consumption and glycolysis of Mouse Fibroblast Slices. *J. Gen. Physiol.*, 37, 335, 1953.
16. Ebert M., Hornsey S., Howard A. Effect on Radiosensitivity of Inert gases. *Nature*, 181, 613, 1958.
17. Rindret A.P., Deebler J.F. Physiological and Biochemical Effects and Applications. In: *Agron, Helium and Rare Gases*, 1, 2, 1961, p. 727.

- 12 -

Печатается в соответствии с решением Редакционно - издательского
Совета Горьковского государственного университета от
19 декабря 1983г.

В печать от 21.3.84

Тир. 1

Цена туб. 20 коп.

Зак. 32792

Производственно-издательский комбинат ВИНТИ
Дзержинск, Октябрьский пр., 403