

На правах рукописи

ПОДЛИПАЕВА
Юлия Игоревна

РГБ ОД

- 3 МАЯ 2000

**АКТИВНОСТЬ
И ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТЬ
НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ
АМОЕВА PROTEUS
ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ТЕМПЕРАТУРЫ
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ АМЕБ**

03.00.25 – клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ
2000

*Работа выполнена в Институте цитологии РАН,
Санкт-Петербург*

- Научный руководитель: доктор биологических наук
А.Л. Юдин
- Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
профессор **Б.Н. Кудрявцев**
Институт цитологии РАН,
Санкт-Петербург.
- доктор биологических наук,
профессор **В.В. Хлебович**
Зоологический институт РАН,
Санкт-Петербург.
- Ведущее учреждение: Биолого-почвенный факультет
Санкт-Петербургского
государственного университета.

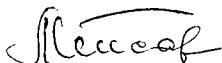
Защита состоится "28" апреля 2000 года в 13 час на
заседании Диссертационного совета Д.002.73.01 Института
цитологии РАН по адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий
пр., д. 4.

Факс (812) 247 03 41.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института
цитологии РАН

Автореферат разослан "24" марта 2000 года.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
д.б.н.



Л.Н. Писарева

E 903, 139, 0

1. Общая характеристика работы

Среди многочисленных абиотических факторов внешней среды, оказывающих влияние на жизнедеятельность организмов, одним из важнейших является температура. Проблема приспособления организмов к изменяющимся температурным условиям среды важна как с практической (например, акклиматизация животных и растений к новым местам обитания), так и с теоретической (например, экология отдельных видов и их адаптивная радиация в процессе эволюции) точек зрения. Адаптация животных и растений к температурным условиям внешней среды осуществляется на разных уровнях организации - популяционном, организменном, тканевом, клеточном и молекулярном.

Термином «адаптация» принято обозначать любые свойства и признаки организма, обеспечивающие его жизнеспособность (Ночачка, 1998). Важнейшим элементом адаптационного процесса является акклимация, которая представляет собой компенсаторное изменение, возникающее в организме в ответ на длительное отклонение какого-либо фактора внешней среды от первоначального уровня, или «...фенотипический сдвиг, происходящий в лабораторных условиях в ответ на экспериментальное варьирование какого-либо одного параметра среды» (Проссер, 1977, стр. 19). Иногда акклимация может выглядеть инадаптивной, что, скорее всего, свидетельствует о незавершенности процесса (Прехт, 1964), который в своем завершенном виде всегда адаптивен (Хлебович, 1981).

При характеристике результатов воздействия той или иной температуры на изучаемый организм большое значение имеет определение диапазона температурной толерантности данного организма (ДТ) и его температурного оптимума (Sopina, 1976; Александров, 1985; Сопина, 1986). Механизмы компенсаторных реакций организмов на воздействия субоптимальной температуры, находящейся в пределах ДТ, и стрессовой температуры (сублетальной или летальной) различны. В случае реакции на стрессовые температурные воздействия значительная роль отводится синтезу белков теплового шока.

В процессе интенсивного изучения повреждающего действия субоптимальной температуры на организмы, клетки и их компоненты было сформировано понятие «теплоустойчивость», ставшее неотъемлемым элементом экспериментальных исследований и теоретических построений (см.: Ушаков, 1989). Под первичной теплоустойчивостью клеток или организмов подразумевается их устойчивость, опре-

деляемая сразу после краткосрочного интенсивного нагрева (Александров, 1975). Уровень теплоустойчивости организмов и их клеток традиционно служил критерием адаптации к температурным условиям. Показано, что при смене температуры окружающей среды теплоустойчивость эктотермных организмов изменяется в широких пределах, а теплоустойчивость отдельных клеток такого организма представляет собой консервативный показатель и может служить цитологическим критерием того или иного вида животных или растений (см.: Александров, 1985).

У эктотермных организмов имеются многообразные биохимические приспособления, направленные на минимизацию повреждений, вызванных изменениями температуры. Среди биологических макромолекул (белков, нуклеиновых кислот, липидов), являющихся «мишенями» повреждающего действия температуры, особое внимание традиционно уделялось белкам, а среди белков – ферментам. Это связано с тем, что именно ферментные системы обеспечивают необходимую интенсивность метаболизма при различных температурах и, кроме того, их активность представляет собой удобный для регистрации маркерный признак. В основе компенсации температурных влияний на обмен лежат количественный и качественный (Marek, 1982; Хочачка, Сомеро, 1988; Ciardiello, 1997; Feller et al., 1997; Pierce, Crawford, 1997) способы регуляции работы ферментов, направленные на коррекцию их активности и каталитической эффективности, в том числе путем конформационных изменений. Кроме того, в качестве показателя протекания адаптивных процессов принято использовать данные об изменении теплоустойчивости белков, в частности, белков-ферментов (см.: Александров, 1975; Константинова, 1983).

Простейшие представляют собой эктотермные одноклеточные организмы, сочетающие в себе свойства клеток и организмов. В отличие от реакции на изменение температуры изолированных клеток многоклеточного организма реакции простейших более лабильны. Их теплоустойчивость при изменении температурного режима изменяется: при повышении температуры культивирования она повышается и, за некоторыми исключениями (Полянский и др., 1967), при пониженной температуре снижается (Полянский, 1957; Осипов, 1966; Сопина, 1968; Суханова, 1968, и др.).

Актуальность проблемы. Количество сведений о биохимических способах температурной компенсации работы ферментных систем у простейших крайне невелико (Сопина, 1987, 1991, 1997). Активность и теплоустойчивость белков простейших так же, как и у многокле-

точных организмов, исследовалась и в сравнительном плане - у представителей разных видов (популяций, клонов), и в процессе акклимации простейших одного вида к разным температурам. Однако, в отличие от данных по многоклеточным организмам, сведения, касающиеся простейших, крайне немногочисленны.

Имеющиеся данные об активности и теплоустойчивости ферментов одноклеточных организмов свидетельствуют о наличии положительной корреляции между теплоустойчивостью ферментов и теплолюбивостью видов (Janovy, 1972) или внутривидовых группировок (Лозина-Лозинский, 1961; Сопина, 1986). Однако каких-либо общих закономерностей в поведении теплоустойчивости ферментов при акклимации животных одного вида к различным температурам культивирования выявить не удавалось (Серавин и др., 1965; Березина, 1970; Сопина, 1991). Не исключено, что поведение ферментов, различных по своей первичной структуре, термоллабильности, конформационным потенциям и другим свойствам, при смене температурного режима не подчиняется общей схеме. В связи с этим для выявления роли изменений свойств ферментов при адаптации простейших к изменившимся температурным условиям актуальным было бы исследование влияния температуры на активность и теплоустойчивость ферментов возможно большего числа видов простейших для накопления фактов в этой области.

Свободноживущие пресноводные амёбы, не имеющие в своем жизненном цикле полового процесса, представляют особый интерес для исследования их приспособлений к температурному фактору, так как отсутствие полового процесса позволяет четко отделить модификационные изменения, вызванные сменой температуры, от наследственных вариаций.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы являлся анализ модификационных изменений, происходящих на уровне активности и теплоустойчивости некоторых ферментов при акклимации амёб *Amoeba proteus* к различным температурам, лежащим в пределах диапазона температурной толерантности исследуемого штамма. Кроме того предполагалось оценить генотипические межштаммовые (внутривидовые) различия по указанным свойствам ферментов, сохраняющиеся в ряду многих поколений клеток. Для этого следовало определить активность и теплоустойчивость некоторых ферментов у амёб одного штамма, культивируемых при разных температурах, а также сравнить активность и теплоустойчивость этих ферментов у штаммов амёб, различающихся по температурным оптимумам раз-

множения. В связи с этим были поставлены следующие задачи:

а) найти оптимальный вариант методики спектрофотометрического выявления и определения удельной активности термостабильного (суммарные водорастворимые эстеразы) и термолабильного (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа) ферментов у амёб;

б) выяснить, являются ли активность фермента и его теплоустойчивость (остаточная ферментативная активность после прогрева) штаммоспецифичными признаками и определить, связаны ли эти показатели с температурным оптимумом размножения (теплолюбивостью) штамма амёб; проследить изменения этих признаков в процессе культивирования амёб при различных температурах, входящих в диапазон температурной толерантности данного штамма;

в) проверить, существует ли связь между активностью и теплоустойчивостью одного из ферментов амёб - глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и особенностями электрофоретического спектра этого фермента и теплоустойчивостью его отдельных электроморф при сравнении двух штаммов амёб и при культивировании одного из штаммов при различных температурах;

г) попытаться выявить у амёб белки теплового шока и выяснить, влияет ли повышенная температура, превышающая верхнюю границу диапазона температурной толерантности штамма, на уровень их содержания в клетке.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Теплоустойчивость двух изученных ферментов у *Amoeba proteus*, культивируемых при 25 °С, положительно коррелирует с теплолюбивостью штамма амёб. Активность и теплоустойчивость ферментов могут служить у амёб штаммовой характеристикой.

2. Акклимация амёб к повышенной температуре (28°С), лежащей на границе диапазона температурной толерантности исследованного штамма, не приводит к изменению активности и теплоустойчивости их Г6ФДГ.

3. Акклимация амёб к относительно низкой температуре (10°С) не влияет на теплоустойчивость их суммарных водорастворимых эстераз и приводит к повышению теплоустойчивости и активности их Г6ФДГ. Повышение активности этого фермента позволяет предполагать активизацию пентозофосфатного пути усвоения глюкозы у амёб.

Научная новизна работы. Впервые методом спектрофотометрии выявлена и измерена активность суммарных водорастворимых эстераз у амёб вида *Amoeba proteus*, а также активность одного из фер-

ментов пентозофосфатного (фосфоглюкопатного) пути усвоения глюкозы – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ). Разработана комплексная оценка теплоустойчивости Г6ФДГ, включающая в себя спектрофотометрическое определение остаточной ферментативной активности этого фермента и выявление его электрофоретического спектра после тестирующего прогрева. Используя ее, удалось охарактеризовать особенности терморезистентности Г6ФДГ и ее отдельных электрофоретических фракций у двух штаммов амёб, различающихся по теплолюбивости (температурному оптимуму размножения), и продемонстрировать достоверное повышение удельной активности Г6ФДГ у амёб, акклимированных к пониженной температуре, входящей в диапазон температурной толерантности исследуемого штамма амёб. Методом иммуноблоттинга впервые у амёб *Amoeba proteus* выявлен конститутивно присутствующий белок теплового шока семейства HSP70 и установлены условия, при которых происходит повышение уровня его содержания (индукция) в клетке.

Теоретическое значение работы. Выявленные особенности поведения термостабильного и термолабильного ферментов у амёб *Amoeba proteus*, относящихся к штаммам с различными температурными оптимумами размножения, позволяют продолжить углубленный цитофизиологический анализ биохимических изменений, сопровождающих температурные адаптации у эктотермных организмов. Данные об отсутствии однонаправленных изменений теплоустойчивости ферментов при изменении температуры культивирования амёб следует учитывать при анализе связи теплоустойчивости белков с теплоустойчивостью клеток простейших.

Практическое значение работы. Разработанная методика спектрофотометрического выявления и измерения активности Г6ФДГ в надосадочной жидкости водорастворимых гомогенатов амёб вида *Amoeba proteus* и предложенный на примере Г6ФДГ амёб способ анализа изменений свойств фермента, сочетающий количественную (методом спектрофотометрии) и качественную (методом нативного электрофореза) оценку его теплоустойчивости у амёб разных штаммов и амёб одного штамма, культивируемых при различных температурах, могут быть рекомендованы в лабораторной практике при проведении цитофизиологических экспериментов. Полученные данные могут быть использованы в курсах лекций по биологии клетки, зоологии беспозвоночных, гидробиологии и др. в высших учебных заведениях.

Апробация работы. Результаты работы доложены: в 1987 г. - на

IV съезде ВОПр в г. Ленинграде; в 1988 г. - на Конференции молодых специалистов Института цитологии АН СССР; в 1991 г. - на Всесоюзном совещании «Клеточные механизмы адаптации» в г. Чернигове; в 1992 г. - на V съезде ВОПр в г. Витебске; в 1999 г. - на совместном семинаре лаборатории цитологии одноклеточных организмов и лаборатории морфологии клетки ИНИЦ РАН и заседании Санкт-Петербургского отделения Российского общества протозоологов при РАН. По теме диссертации опубликовано 11 работ.

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 139 страницах машинописного текста и состоит из введения, 4 глав и выводов. Диссертация иллюстрирована 19 рисунками и включает 6 таблиц. Список цитированной литературы насчитывает 185 источников, в том числе 86 - на русском языке.

2. Материалы и методы

2.1. Штаммы амёб и их культивирование

В работе использовали три штамма амёб вида *Amoeba proteus* из коллекции лаборатории цитологии одноклеточных организмов Института цитологии РАН. Штамм **В** получен из Медицинского университета (Будапешт, Венгрия) в 1959 г. Штамм **Petrozavodsk** выделен из небольшого пруда в окрестностях Петрозаводска (Карелия, Россия) в 1968 г. Штамм **Da** поступил в коллекцию из Саутгемптонского университета (Саутгемптон, Великобритания) в 1970 г. Температурный оптимум размножения амёб штамма **В** находится в диапазоне 25 – 28 °С (Сопина, 1976). Для амёб штамма **Da** оптимальной является температура 22 °С (Сопина, 1986); для штамма **Petrozavodsk** температурный оптимум определен не был.

Амёб культивировали по методу Прескотта и Кэриера (Prescott, Cairgier, 1964). Культуральную среду меняли 1 раз в сутки. Перед тем, как использовать клетки амёб для приготовления гомогената, амёб не кормили по крайней мере 72 ч. Амёб штамма **В** культивировали при температурах 10 и 25 °С; амёб штамма **Da** - при 10, 25 и 28 °С; штамма **Petrozavodsk** - при 10 и 25 °С.

2.2. Получение гомогенатов амёб и определение активности ферментов

Перед получением гомогената амёб тщательно отмывали от культуральной среды путем их трехкратного центрифугирования при 1000 - 1500 об./мин. Осажденные клетки гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком. Для определения активности водорастворимых эстераз в гомогенатах амёб полученный гомо-

генаг оставляли на ночь при 4 °С, а затем центрифугировали при 33000 об./мин в течение 1 ч при 4 °С. При определении активности Г6ФДГ гомогенаты амёб сразу после их получения центрифугировали при 12000 об./мин в течение 30 мин при 4 °С и в дальнейшем использовали супернатант. Концентрацию белка в супернатанте определяли по методу Лоури (Lowry et al., 1951)

Активность эстераз в гомогенатах амёб определяли по модифицированному методу Гомори (Gomori, 1952). К 0.2 мл супернатанта добавляли 2 мл субстратной смеси, в состав которой входили: Три-малеатный буфер, рН 7.0 – 7.1, 1 мг прочного синего РР и 0.4 мг β-нафтилацетата, предварительно растворенного в ацетоне для УФ-микроскопии. Ферментативную реакцию проводили при 37 °С в течение 20 мин и останавливали добавлением 1 мл 2%-ного раствора додесилсульфата (лаурилсульфата) натрия. Сразу же после этого окрашенные в вишневый цвет пробы фотометрировали на фотоэлектрическом колориметре с зеленым фильтром при длине волны 530 нм; значения оптической плотности использовали для вычисления активности суммарных водорастворимых эстераз, которую выражали в условных единицах (у.е.) - микрограммах β-нафтола, выделившегося в расчете на 1 мг белка за 20 мин при 37 °С. Мы не могли с уверенностью вычислить удельную эстеразную активность в количестве β-нафтола, выделившегося за 1 мин, так как пробы колориметрировали один раз через 20 мин после окончания их инкубирования при 37 °С и нет доказательств того, что выделение β-нафтола в течение этого периода времени происходило с постоянной скоростью.

Гомогенаты для опытов по определению активности Г6ФДГ так же, как и в случае с суммарными водорастворимыми эстеразами, собирали по крайней мере из трех разных порций клеток массовой культуры амёб; в одном опыте проводили не менее трех измерений активности фермента. Активность Г6ФДГ определяли на спектрофотометрах СФ-16 и Spokol-211 по скорости восстановления никотинамиддинуклеотидфосфата (НАДФ) при длине волны 340 нм. Реакционная смесь содержала 0.075 мМ Три-НСI буфер, рН 9.1, 0.63 мМ MgCl₂, 1.15 мМ глюкозо-6-фосфата натрия (Г6Ф) и 1.19 мМ НАДФ в 1 мл. Все компоненты реакционной смеси, кроме субстрата, вносили в пробирку с пробой непосредственно перед измерением активности. Ферментативная реакция начиналась после добавления в смесь субстрата (Г6Ф). Измерения проводили в течение первых 3 - 5 мин протекания реакции с интервалом 0.5 - 1.0 мин; предварительно было

установлено, что в этом интервале количество восстановленного НАДФ возрастает прямолинейно. Измеренную оптическую плотность использовали для вычисления удельной активности Г6ФДГ и выражали ее в нанномолях НАДФ-Н, выделившегося за 1 мин в расчете на 1 мг белка (ед.).

2.3. Определение теплоустойчивости ферментов

Для определения теплоустойчивости ферментов пробы прогревали при различных температурах, определяли активность фермента в прогретых пробах и выражали ее в процентах от активности фермента в непрогретых пробах (остаточная ферментативная активность). В одном опыте при каждой тестирующей температуре прогревали не менее трех проб. Проводили не менее трех опытов.

При определении теплоустойчивости суммарных водорастворимых эстераз пробы гомогената прогревали в стеклянных пробирках при температурах 45, 50, 55 и 60 °С в течение 30 мин. При определении теплоустойчивости Г6ФДГ пробы прогревали при температурах 39, 42, 45 и 48 °С в течение 10 мин. Пробы объемом 0.015 - 0.020 мл, содержавшие 150 - 200 мкг белка, прогревали в полиэтиленовых пробирках объемом 1.5 мл. Непрогретые контрольные пробы (не менее 3) хранили при 4 °С в холодильнике, куда после прогрева помещали и опытные пробы.

По результатам определения остаточной ферментативной активности строили графики зависимости величины этой активности от температуры, которые служат характеристикой теплоустойчивости фермента.

При оценке теплоустойчивости эстераз использовали также такой показатель, как время их 50%-ной инактивации при данной температуре прогрева. В этом случае пробы прогревали при 50, 55 и 60 °С в течение 10, 20, 30, 40, 50 и 60 мин, определяли остаточную ферментативную активность для каждого срока прогрева и таким образом определяли время, за которое активность снижалась на 50%.

2.4. Статистическая обработка данных

При статистической оценке различий теплоустойчивости ферментов разных штаммов амёб или одного штамма, акклиматизированного к разным температурам, использовали не отношение активности фермента в прогретой и непрогретой пробе, поскольку статистическая оценка достоверности различий отношений переменных связана с определенными трудностями (Зайдель, 1985), а разности величин активности фермента в непрогретой и прогретой пробах. Для таких разностей, полученных в различных опытах, в каждом из которых был

использован гомогенат, полученный из одной порции амёб, рассчитывали среднюю разность и её стандартную ошибку.

При сравнении активности фермента у амёб из разных культур использовали значения его удельной активности; в некоторых случаях сравнивали активность фермента, выраженную в условных единицах - значениях оптической плотности, полученных при спектрофотометрическом определении активности. Как и в случае сравнения величин остаточной активности ферментов, использовали средние значения активности, полученные в разных опытах (не менее 3 измерений в одном опыте).

При определении достоверности различий активности и теплоустойчивости ферментов амёб разных штаммов или амёб одного штамма, культивировавшихся при разных температурах, использовали уровень значимости 0.05. Для статистической обработки данных использовали пакет SYSTAT, для построения графиков – программу EXCEL.

2.5. Проведение нативного электрофореза

Для выявления электрофоретических форм водорастворимой Г6ФДГ проводили нативный электрофорез супернатанта гомогенатов амёб в вертикальной пластине 7%-ного полиакриламидного геля (ПААГ) размером 120 x 90 x 1.5 мм в трис-глициновой системе (Laemmli, 1970). НАДФ в электродный буфер не добавляли. На старт наносили 100 - 140 мкг белка, утяжеленного 60%-ной сахарозой, в объемном соотношении 1.5 : 1. Для оценки теплоустойчивости отдельных электрофоретических форм Г6ФДГ в стартовые «карманы» одного геля вносили непрогретую контрольную пробу и пробы, прогретые при тех же тестирующих температурах, при которых прогревали и пробы, использовавшиеся для спектрофотометрии. Для выявления активности Г6ФДГ гели по окончании электрофореза окрашивали в соответствующей инкубационной смеси (Серов и др., 1977) в течение 30 - 40 мин при 37 °С. Окрашенные гели фиксировали 7.5%-ной уксусной кислотой и сканировали на денситометре MD -100 («Карл Цейсс», Германия). Фракции фермента нумеровали в порядке снижения их электрофоретической подвижности.

2.6. Выявление и очистка белка теплового шока 70кДа у амёб

Амёб штамма Da, культивировавшихся при 22 °С, подвергали тепловому шоку, помещая культуры амёб в термостаты при температурах 28, 32 и 37 °С на 1 ч. Непосредственно после теплового шока (0 час) и через некоторое количество часов после него (разное в разных опытах) порции амёб центрифугировали при 1000 об./мин и одина-

ковое количество осадка из каждой порции гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе. Экстракционный буфер, используемый при гомогенизации амёб, включал в себя 20 мМ Трис HCl, pH 7.5, 20 мМ NaCl, 0.1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA), 0.5 мМ дитиотриетол (DTT) и 0.2 мМ фенолметилсульфонилфлуорида (PMSF). Полученные гомогенаты, а также гомогенат, полученный из амёб, не подвергавшихся тепловому воздействию, помещали в холодильник при температуре -20°C , затем после размораживания все гомогенаты одновременно центрифугировали при 15000 об./мин в течение 45 мин при 4°C и в дальнейшем использовали супернатант.

Белковый состав проб анализировали методом SDS-электрофореза в 7 и 10%-ном ПААГ в трис-глициновой системе Лэммли. После электрофореза гели фиксировали в смеси формальдегида, спирта и уксусной кислоты, окрашивали 0.25%-ным раствором красителя Кумасси бриллиантового синего в течение 1 ч и отмывали в 7%-ной уксусной кислоте. Для выявления белков теплового шока (БТШ) сразу после проведения электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозу с использованием техники электроблоттинга (Towbin et al., 1979). Блоты обрабатывали поликлональными кроличьими антителами, полученными против БТШ HSP70 крупного рогатого скота (КРС) и обладавшими широкой перекрестной реакцией с аналогичными белками из различных видов животных (Margulis et al., 1991), и моноклональными антителами против БТШ HSP70 КРС, узнающими только индуцибельный компонент семейства БТШ 70 кДа. Зоны связывания анти-HSP70 антител с тестируемыми белками окрашивали при помощи антител АТ-II, конъюгированных со щелочной фосфатазой или пероксидазой, путем проведения ферментативной реакции. Для идентификации молекулярных масс выявляемых полипептидов использовали высокомолекулярные маркеры (Sigma).

При очистке БТШ HSP70 получали гомогенат, для чего осадок клеток амёб смешивали с экстракционным буфером в соотношении 1:3 и гомогенизировали на льду в стеклянном гомогенизаторе. Буфер содержал 20 мМ Трис-HCl, pH 7.5, 20 мМ NaCl, 0.1 мМ EDTA, 0.5 мМ DTT, 0.2 мМ PMSF и 0.5% нонидета-40. Гомогенат центрифугировали 30 мин со скоростью 14000 об./мин при 4°C , удаляли супернатант, после чего к осадку прибавляли еще один объем экстракционного буфера и повторяли центрифугирование. Супернатанты, полученные после первого и второго центрифугирований, объединяли. Для очистки белка HSP70 применяли АТФ-агарозную хро-

матографию; после хроматографии белковый состав отдельных фракций анализировали методом SDS-электрофореза в 10- и 12%-ном полиакриламидном геле.

3. Результаты и обсуждение

3.1. Активность и теплоустойчивость суммарных водорастворимых эстераз у двух штаммов амёб, культивируемых при температуре 25 °С.

Изучение активности и теплоустойчивости белков ферментов у двух штаммов амёб *Acanthamoeba proteus* с разными температурными оптимумами размножения было начато с суммарных водорастворимых эстераз. Эстеразы - ферменты с широкой субстратной специфичностью, основная функция которых в метаболизме - расщепление экзогенных субстратов. Решающими факторами при выборе этой группы ферментов для работы были: легкость выявления и спектрофотометрического (колориметрического) определения их активности, высокая удельная активность эстераз у ряда животных (Правдина, 1970) и установленный на нескольких штаммах *A. proteus* внутривидовой полиморфизм электрофоретического спектра этих ферментов (Сопина, 1973).

Имеется довольно много исследований, посвященных активности и теплоустойчивости эстераз у близких видов животных, обитающих в различающихся температурных условиях; несколько меньше данных о свойствах этих ферментов у различных подвидов и популяций одного вида, а внутривидовые различия в теплоустойчивости эстераз у агамных организмов на примере клонов (штаммов) с различными температурными оптимумами размножения практически не изучены. Для штамма **B** *A. proteus*, культивируемого при 25 °С, значение удельной эстеразной активности составляет 87.5 ± 2.7 ($n=16$), а для штамма **Da**, культивируемого при той же температуре, - 78.1 ± 2.0 ($n=12$) у.е. Различия величин удельной активности фермента у двух штаммов амёб статистически достоверны.

Результаты определения теплоустойчивости эстераз у двух штаммов амёб, культивируемых при 25 °С, представлены на рис. 1 (стр.23). Оказалось, что зависимость остаточной ферментативной активности от температуры 30-минутного прогрева носит прямолинейный характер в интервале от 45 до 60 °С для амёб штамма **B** и в интервале от 50 до 60 °С для амёб штамма **Da**. Видно, что у амёб **B** эстеразы более устойчивы к нагреву, чем у амёб **Da**. Среднее время 50%-ной инактивации эстераз, определенное при температурах прогрева 50 и

55 °С, для амёб **Da** оказалось меньше (24 и 13.5 мин соответственно), чем для амёб **B** (46.5 и 24 мин).

Достоверность различий величин удельной активности эстераз у двух штаммов амёб позволяет говорить о том, что данная характеристика является штаммоспецифичной. Наряду со сведениями о различиях в электрофоретических спектрах суммарных эстераз у амёб разных штаммов (Сопина, 1973, 1986, 1995) этот факт дополняет наши представления о внутривидовом полиморфизме биохимических признаков у агамно размножающихся амёб *A. proteus*.

Продемонстрированные межштаммовые различия в теплоустойчивости эстераз амёб двух штаммов свидетельствуют о том, что теплоустойчивость суммарных водорастворимых эстераз может служить штаммовой характеристикой амёб так же, как и удельная активность фермента. Методом микроэлектрофореза в ПААГ было показано, что межштаммовые различия в теплоустойчивости суммарных эстераз амёб штаммов **B** и **Da** обусловлены различиями в спектрах электрофоретических форм эстераз: наличием дополнительных теплоустойчивых фракций у штамма **B** и дополнительной термолабильной фракции у штамма **Da** (Сопина, 1986).

Наши данные о различии теплоустойчивости суммарных эстераз у двух штаммов амёб, различающихся по своим температурным оптимумам размножения и культивируемых при 25 °С, показывают, что теплоустойчивость этих ферментов положительно коррелирует с уровнем теплолюбивости штамма амёб. Таким образом, эти данные находятся в согласии с известной закономерностью, по которой теплоустойчивость белков особой вида или внутривидовых категорий коррелирует с теплолюбивостью этих таксонов (см.: Александров, 1985; Хочачка, Сомеро, 1988; Ушаков, 1989)

3.2. Активность и теплоустойчивость эстераз двух штаммов амёб, акклимированных к 10 °С.

Амёбы штаммов **B** и **Da**, культивируемые при 25 °С, были в течение 14 сут акклимированы к температуре 10 °С. Ниже представлены результаты измерения удельной активности суммарных водорастворимых эстераз (у.е.) у двух штаммов амёб, культивировавшихся при 25 и 10 °С:

B 25 °С	B 10 °С	Da 25 °С	Da 10 °С
87.5±2.7	80.7±2.4	78.1±2.0	110.1±3.9

Средние значения активности эстераз у амёб штамма **Da** достоверно различаются между собой - для амёб, акклимированных к 10°, они выше, чем для амёб, содержавшихся при 25 °С. Различия в активнос-

ти эстераз амёб штамма В, культивировавшихся при 10 и 25 °С, недостоверны.

Результаты определения теплоустойчивости суммарных водорастворимых эстераз у амёб, содержащихся при разных температурах, приведены в табл. 1.

Таблица 1

Теплоустойчивость эстераз двух штаммов амёб, акклиматизированных к разным температурам

Штамм	Температура культивирования, °С	Ферментативная активность (% от контрольной) после прогрева проб при разных температурах			
		45 °С	50 °С	55 °С	60 °С
Да	10	64.1	39.9	30.7	22.9
	25	64.3	40.7	29.6	20.8
В	10	74.7	57.6	45.6	28.6
	25	76.7	60.2	45.9	27.0

Во всех случаях, кроме одного (амёбы штамма Да, прогрев при 60 °С), различия между средними недостоверны. Амёбы, культивируемые при 10 и 25 °С, не различаются между собой и по среднему времени потери 50% эстеразной активности при температурах прогрева 50 и 55 °С. Таким образом, у амёб, содержащихся при разных температурах, не было обнаружено различий в теплоустойчивости их суммарных водорастворимых эстераз.

При оценке полученного результата следует принимать во внимание то, что электрофоретический спектр суммарных эстераз (водо- и тригонорастворимых) представлен у обоих штаммов большим количеством электроморф - от 16 до 20 при различных способах получения гомогената и использовании различных субстратов при окрашивании гелей (Сопина, 1986, 1995).

Отсутствие изменений теплоустойчивости эстераз после акклиматизации амёб в течение 14 сут к температуре, находящейся в пределах ДТ, при спектрофотометрическом определении активности эстераз может быть отражением того факта, что суммарная теплоустойчивость этого фермента представляет собой результирующую разнонаправленных изменений теплоустойчивости многих электроморф (Сопина, 1997).

3.3. Активность, теплоустойчивость и электрофоретические формы водорастворимой Г6ФДГ у двух штаммов амёб, культивируемых при 25 °С.

Г6ФДГ катализирует первую реакцию фосфоглюконатного (пентозофосфатного) метаболического пути, основное назначение которого состоит в том, чтобы генерировать в цитоплазме НАДФ в восстановленной форме (НАДФ-Н), использующийся главным образом для синтеза жирных кислот и липидов, а также пентозы, необходимые для синтеза нуклеиновых кислот и некоторых коферментов. Спектрофотометрически наличие этого фермента у амёб *A. proteus* ранее не демонстрировалось. Поэтому в первую очередь следовало имеющиеся многочисленные варианты количественного определения активности Г6ФДГ методом спектрофотометрии адаптировать к данному объекту. После экспериментального подбора оптимальных условий для проведения реакции была измерена удельная активность Г6ФДГ, которая составила у амёб штамма **Da** 40.1 ± 0.8 ед. ($n=10$), а у амёб штамма **B** - 33.1 ± 0.9 ед. ($n=10$) ед. Штамм **Da**, для которого характерно более высокое значение удельной активности фермента, характеризуется и большим сродством фермента к субстрату (константа Михаэлиса, K_m - $5.7 \cdot 10^{-6}$ М/мл), чем штамм **B** (K_m - $7.5 \cdot 10^{-6}$ М/мл). Различие средних значений удельной активности Г6ФДГ у двух штаммов амёб статистически достоверно, что позволяет считать этот показатель штаммовой характеристикой.

На рис.2 (стр.23) представлен график зависимости остаточной ферментативной активности Г6ФДГ амёб двух штаммов от температуры прогрева гомогената. Теплоустойчивость Г6ФДГ амёб штамма **B** (оптимум размножения - 25-28 °С) оказалась выше теплоустойчивости этого фермента у амёб штамма **Da** (оптимум - 22 °С). Различия величин потери ферментативной активности, полученные для амёб двух штаммов, статистически достоверны при всех температурах прогрева, кроме 48 °С. Наибольшие различия в теплоустойчивости Г6ФДГ амёб двух исследованных штаммов получены после прогрева проб при 42 °С. Существенным является тот факт, что более устойчивой к нагреву оказалась Г6ФДГ штамма амёб, характеризующегося более низким уровнем ее активности в контроле. Это позволяет предполагать, что более высокая терморезистентность Г6ФДГ амёб штамма **B** - это штаммоспецифичное свойство данного белка, а не следствие высокого исходного уровня активности Г6ФДГ перед тестирующим прогревом. Таким образом, теплоустойчивость водорастворимой Г6ФДГ двух штаммов амёб с различными температурными оптимумами раз-

множения коррелирует с теплолюбивостью этих штаммов.

Электрофоретические спектры водорастворимой Г6ФДГ обоих штаммов не отличаются друг от друга по числу и месту расположения фракций - одной основной, на которую приходится наибольшая доля активности фермента, и трех минорных. Пики на денситограммах, соответствующие минорным фракциям, чаще всего полностью не разделяются, так как в геле эти фракции расположены близко друг к другу. Поэтому количественная оценка каждой отдельной минорной фракции затруднена и для выявления возможных различий в термоинактивации разных фракций Г6ФДГ после экспериментального прогрева гомогенатов амёб можно оценивать лишь соотношения основной и совокупности минорных фракций и возможные его изменения после прогревов при разных температурах.

Главная потеря активности фермента у амёб обоих штаммов после прогрева проб при тестирующих температурах происходит за счет инактивации основной фракции, снижение активности минорных фракций при повышении температуры прогрева гомогенатов визуально не прослеживается.

По-видимому, основная и минорные фракции Г6ФДГ амёб штаммов **В** и **Да** различаются по кинетике их термоинактивации. В контроле доля минорных (предположительно более терморезистентных) фракций в общей активности Г6ФДГ у штамма **В** больше, чем у штамма **Да**. Возможно, именно этим объясняется более высокая теплоустойчивость Г6ФДГ амёб штамма **В** по сравнению с теплоустойчивостью этого фермента у амёб штамма **Да**.

Штаммы **В** и **Да**, послужившие объектом наших исследований, получены в разное время из других лабораторий, а ранее - выделены из природы в разных географических точках. Обнаружение различия в теплоустойчивости Г6ФДГ у штаммов амёб различного происхождения после длительного культивирования обоих штаммов в стандартных лабораторных условиях позволяет считать теплоустойчивость Г6ФДГ, так же как и теплоустойчивость эстераз, штаммовой характеристикой, а более высокую теплоустойчивость белков (ферментов) более теплолюбивого штамма - примером генетической адаптации в ее классическом проявлении (Хочачка, Сомеро, 1988)

3.4. Активность, теплоустойчивость и электрофоретические формы Г6ФДГ амёб, акклиматизированных к 10 °С.

В опытах по влиянию акклиматизации амёб к относительно низким температурам на активность и теплоустойчивость Г6ФДГ по сравнению с подобными опытами по изучению эстераз время акклима-

ции амёб к 10 °С было увеличено с 14 до 30 сут. Поскольку не удалось культивировать при 10 °С амёб штамма **B** в количествах, необходимых для проведения биохимических исследований, в этих опытах использовались штаммы **Da** и **Petrozavodsk**. Удельная активность водорастворимой Г6ФДГ амёб обоих штаммов, содержащихся при 10 °С (**Da** – 55.6.±1.4, n=20 ; **Petrozavodsk** - 41.4±0.9, n=15 ед.) оказалась достоверно выше, чем у амёб, культивировавшихся при 25 °С (**Da** - 45.6±0.8, n=20 ; **Petrozavodsk** - 35.2±1.3, n=15 ед.).

У амёб штамма **Da**, акклимированных в течение 30 сут к 10 °С, теплоустойчивость Г6ФДГ при всех температурах прогрева оказалась достоверно выше, чем у амёб этого штамма, культивируемых при 25 °С (табл. 2).

Таблица 2

Теплоустойчивость Г6ФДГ амёб штамма **Da**, акклимированных к разным температурам

Температура культивирования, °С	Ферментативная активность (% от контрольной) после прогрева проб при разных температурах			
	39 °С	42 °С	45 °С	48 °С
10	90	81	31	9
25	78	63	20	6
10→25	79	66	23	7

Если амёб, акклимированных к 10 °С, перенести обратно в 25 °С, то через 30 сут культивирования теплоустойчивость Г6ФДГ таких амёб перестает отличаться от теплоустойчивости фермента амёб, все время культивировавшихся при 25 °С (табл. 2). Изменения активности и теплоустойчивости Г6ФДГ, произошедшие в процессе акклимации к этой температуре, если и носят приспособительный характер, не являются наследуемыми.

Спектры электрофоретических форм водорастворимой Г6ФДГ амёб штамма **Da**, культивируемых при 25 и 10 °С, не различаются и представлены одной основной и тремя минорными фракциями. После прогрева при 42, 45 и 48 °С у основной фракции Г6ФДГ “10-градусных” амёб появляется дополнительная субфракция. Кинетика инактивации основной и минорных фракций фермента после прогрева различна: потеря активности Г6ФДГ амёб, культивируемых при обеих температурах, происходит, главным образом, в результате инактивации основной фракции.

Повышение активности Г6ФДГ при холодовой адаптации нео-

днократно отмечалось в литературе (Fudge et al., 1997; Jagdale, Gordon, 1997). У гольца (Yamauchi et al., 1975) и бельдоги (Campbell, Davies, 1978) оно связывалось авторами с усилением липогенеза при пониженных температурах. Липиды являются антиоксидантами, то есть они обеспечивают нейтрализацию свободных радикалов, образующихся вследствие действия на организм каких-либо повреждающих факторов, одним из которых может быть пониженная температура, и вызывающих цепные реакции окисления биологических субстратов (Соколовский, 1984). Один из ферментов антиоксидантной системы - глутатионредуктаза - для восстановления окисленного глутатиона использует НАДФ·Н, образовавшийся в результате реакции, катализируемой Г6ФДГ. Между уровнями активности Г6ФДГ и глутатионредуктазы существует корреляция (García-Alfonso et al., 1998) и, таким образом, повышение активности Г6ФДГ у амёб, культивируемых при 10 °С, можно квалифицировать как модификационное адаптивное изменение, происходящее при холодовой акклимации амёб. Такое повышение активности Г6ФДГ может указывать на активизацию адаптивной системы антиоксидантной защиты у амёб при пониженной температуре культивирования.

Повышение при этом теплоустойчивости данного фермента, противоречащее представлению об однонаправленности изменений свойств какого-либо белка и температурных условий, не подлежит, на наш взгляд, однозначной трактовке. Оно, возможно, указывает на то, что теплоустойчивость данного фермента у амёб зависит от соотношения температуры культивирования, температурного оптимума штамма и границ диапазона его температурной толерантности и не зависит от того, в каком направлении (в сторону повышения или понижения) происходит изменение температурных условий обитания или культивирования исследуемого организма.

3.5. Теплоустойчивость и электрофоретические формы Г6ФДГ у амёб, акклимированных к 28 °С.

Представляло интерес выяснить, как ведет себя признак «теплоустойчивость Г6ФДГ» у амёб, культивируемых при температуре выше 25 °С, при которой амёбы, тем не менее, сохраняли бы способность к размножению. Такой температурой можно считать 28 °С - она является для амёб штамма **Da** верхней границей ДТ. При этой температуре скорость размножения амёб **Da** сравнима со скоростью их размножения при оптимальной температуре культивирования (22 °С), но эффективность клонирования гораздо ниже - возрастает число погибающих амёб и субклонов (Сопина, 1986). Амёб штамма

Да содержали при температуре 28 °С в течение 30 сут. После этого определяли теплоустойчивость их Г6ФДГ Средние значения остаточной активности Г6ФДГ таких амёб после прогрева проб при всех четырех тестирующих температурах не отличались от соответствующих средних значений для «25-градусных» амёб.

Анализ электрофоретического спектра Г6ФДГ у амёб, культивируемых при 28 °С, показал, что в нем сокращается число быстроподвижных фракций. Основная потеря активности Г6ФДГ после прогрева при 39, 42, 45 и 48 °С происходит за счет инактивации основной фракции, а пик на денситограмме, соответствующий минорной фракции, не только не претерпевает видимого ослабления, но даже слегка повышается после прогрева при всех тестирующих температурах.

Изменение электрофоретического спектра фермента при смене температуры культивирования было отмечено для суммарных тринонорастворимых эстераз амёб штамма В (Сопина, 1997) и тринонорастворимой Г6ФДГ (Sopina, 1989). Кроме того, было показано, что при получении клонов амёб - потомков внутриштаммовых трансплантатов исчезновение быстроподвижных фракций Г6ФДГ может быть индуцировано воздействиями, связанными с операцией по пересадке ядер (Сопина, Юдин, 1993).

Несколько неожиданный результат был получен при определении теплоустойчивости Г6ФДГ амёб, которых в течение 30 сут содержали при 28 °С, а затем стали вновь культивировать при 25°С. Теплоустойчивость Г6ФДГ амёб, возвращенных в 25° после культивирования их при 28 °С, даже через 3 мес культивирования их при 25° С отличалась от таковой как 25-, так и 28-градусных амёб и оказалась достоверно выше, чем у тех и других. Появление нового наследуемого фенотипа может быть проявлением характерного для амёб особого типа изменчивости, сочетающего в себе черты как модификационной, так и наследственной изменчивости и являющейся, предположительно, эпигенетической (Юдин, 1982).

Таким образом, можно предположить, что температура 28 °С, лежащая на границе ДТ штамма Да, изменяет какие-то свойства Г6ФДГ амёб данного штамма. При отсутствии изменений теплоустойчивости Г6ФДГ у амёб, культивируемых при 28 °С, эти свойства обуславливают повышение теплоустойчивости фермента после возвращения культуры амёб в исходные температурные условия.

3.6. Стрессовые температурные воздействия и белки теплового шока у амёб.

Обсуждая в настоящее время проблему температурных адаптаций, недостаточно было бы рассмотреть влияние на организм температур, лежащих в пределах его ДТ, и обойти вниманием стрессовые температурные воздействия. Иными словами, нельзя не коснуться вопроса о белках теплового шока у амёб.

Амебы штамма **Da**, культивировавшиеся при температуре 22 °С, были подвергнуты тепловому шоку при 37 °С в течение 1 ч и через разные сроки после окончания воздействия из амёб были получены гомогенаты. После SDS-электрофореза белки были перенесены на нитроцеллюлозу. В результате обработки полученных блотов поликлональными анти-HSP70 антителами, обладающими перекрестной реакцией с БТШ многих видов животных (Margulis et al., 1991), и окрашивания их вторичными антителами, конъюгированными со щелочной фосфатазой и пероксидазой, на каждом из них была выявлена хорошо окрашиваемая зона, соответствующая полипептиду с молекулярной массой, несколько превышающей 66 кДа (рис.3 а, б; стр.23). Есть основания считать выявляемый таким образом белок одним из белков семейства HSP70. Проведение АТФ-агарозной хроматографии показало, что белок 70 кДа из амёб обладает свойством связываться с АТФ, что также является подтверждением его принадлежности к БТШ (Welch, Feramisco, 1985.) При визуальной оценке интенсивности окрашивания зон локализации белка HSP70 на блотах не удалось выявить зависимость количества этого белка от времени, прошедшего после теплового шока. Не были также обнаружены различия в интенсивности окрашивания зоны локализации HSP70 непрогретых амёб и амёб, подвергнутых тепловому шоку.

Другая серия опытов была направлена на поиск возможно более адекватной температуры для проведения теплового шока. Кроме температуры 37 °С, которая является для амёб данного штамма сублетальной, были испытаны температуры 28 и 32 °С; температура 28 °С является верхней границей ДТ для амёб данного штамма. В одном геле проводили электрофорез гомогенатов непрогретых амёб и гомогенатов, полученных из амёб через 4 ч после того, как они были подвергнуты тепловым воздействиям при температурах 28, 32 и 37 °С в течение 1 ч. На блоте выявлено существенное снижение интенсивности окрашивания зоны, соответствующей HSP70 в гомогенате, полученном через 4 ч после теплового шока, проведенного при 37 °С.

Были также проведены опыты по выявлению БТШ амёб с помощью моноклональных антител, узнающих только индуцибельный компонент семейства HSP70. После того, как амёбы были в течение 1 ч прогреты при температурах 32 и 37 °С, и гомогенаты прогретых и контрольных амёб подвергнуты SDS-электрофорезу с последующим электроблоттингом, блоты были обработаны моноклональными анти-HSP70 антителами. Удалось выявить индукцию белка HSP70 в гомогенатах, полученных из амёб через 4 ч после их прогрева при 32 °С, и заметное снижение интенсивности окрашивания соответствующей зоны в гомогенатах, полученных из амёб через 4 ч после их прогрева при 37 °С (рис. 3 в). Высокий уровень конститутивно содержащейся у амёб индуцибельной формы БТШ семейства HSP70, описанный, в частности, для некоторых тканей человека (Demidov et al., 1999), вызывает несомненный интерес и предполагает продолжение исследований в этой области.

В единственной известной нам работе, посвященной БТШ у амёб вида *Amoeba proteus* (Kalinina et al., 1988), показано, что при повышении температуры от 22 до 32 °С у амёб происходит синтез белков семейства HSP70. К сожалению, различия в использованных методах и несопоставимые схемы проведения экспериментов не позволяют напрямую сравнивать полученные нами результаты с этими данными.

4. Выводы

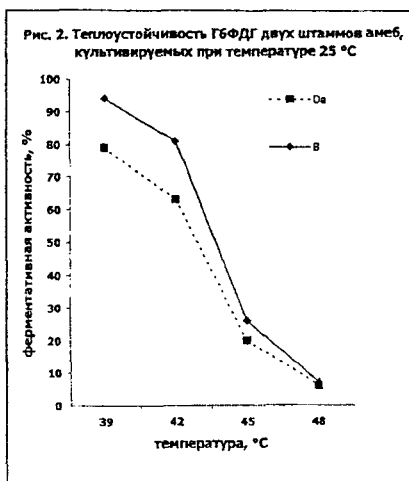
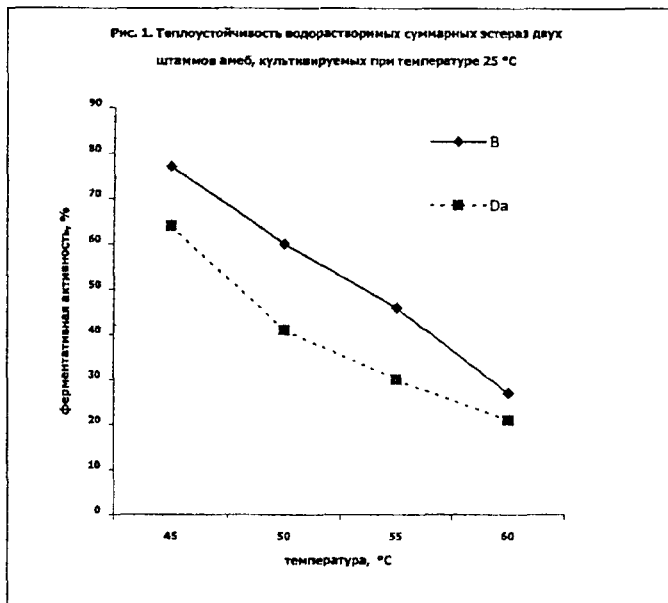
1. В гомогенатах амёб *Amoeba proteus*, культивируемых при 25 °С, методами колориметрии и спектрофотометрии выявляется высокая эстеразная активность и активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ). Активность фермента является у амёб штаммоспецифичным признаком.

2. Электрофоретические спектры Г6ФДГ двух штаммов амёб, различающихся по теплолюбивости, не отличаются друг от друга и состоят из 4 фракций, которые различаются по кинетике своей термоинактивации.

3. Теплоустойчивость как термостабильных эстераз, так и термолабильной Г6ФДГ положительно коррелирует с теплолюбивостью штамма амёб.

4. Активность и теплоустойчивость Г6ФДГ повышаются при акклимации амёб к относительно низкой температуре 10 °С и не изменяются при акклимации к 28 °С - температуре, являющейся верхней границей диапазона температурной толерантности исследованного штамма.

5. В клетках амёб конститутивно содержится белок теплового шока семейства HSP-70. После экспозиции культуры амёб при температуре, превышающей верхнюю границу диапазона температурной толерантности исследуемого штамма, происходит повышение уровня содержания (индукция) этого белка.



5. Список работ, опубликованных по теме диссертации.

Сопина В. А., Подлипаева Ю. И. 1984. Теплоустойчивость эстеразной активности гомогенатов амёб, культивируемых при различных температурах. Цитология 26(2): 143-149.

Подлипаева Ю. И. 1987. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в гомогенатах амёб. В сб.: Современные проблемы протозологии. Л.: Наука: 45.

Сошина В. А., Подлипаева Ю. И. 1989. Ферменты фосфоглюкокатного пути у амёб. Цитология 31(1): 85-96.

Подлипаева Ю. И. 1991. Активность и теплоустойчивость глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФД) в гомогенатах амёб. Цитология 33(5): 125.

Podlipaeva J. I. 1992. The activity and thermoresistance of glucose-6-phosphatedehydrogenase (G6PD) in *Amoeba proteus*. Proc. 1 Europ. Congress of Protozoology, Reading, England: 30.

Подлипаева Ю. И. 1992. Активность и теплоустойчивость глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы у двух штаммов амёб *Amoeba proteus*. Цитология 34(3): 89-96.

Подлипаева Ю. И. 1992. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы у амёб, культивируемых при различных температурах Цитология 34(4): 120.

Подлипаева Ю. И. 1994. Активность, теплоустойчивость и электрофоретические формы глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы у амёб, культивируемых при разных температурах. Цитология 36(4): 378-383.

Podlipaeva Yu. I., Kinev A. V. 1996. The major inducible heat shock protein of 70 kDa in *Amoeba proteus*. *Molecular Biology of the Cell* 7:1038.

Podlipaeva Yu. I. 1997. Hereditary and environmentally determined changes in some characteristics of glucose-6-phosphatedehydrogenase in *Amoeba proteus* (Pallas, 1766), Leidy, 1878. Доповіді Національної Академії Наук України. : 184-188.

Podlipaeva Yu. Gromov D. 1998. 70 kDa heat shock protein content in *Amoeba proteus* cells. *Molecular Biology of the Cell*. 9: 129a.

б. Список литературы.

- Александров В. Я. 1975. Клетки, макромолекулы и температура. Л.: Наука. - Александров В. Я. 1985. Реактивность клеток и белки. Л.: Наука. - Берзина И. Г. 1970. Цитохимическое исследование клеточного метаболизма некоторых свободноживущих простейших, культивируемых при разных температурах. Автореф. канд. дис. Л. - Зайдель А. Н. 1985. Погрешности измерений физических величин. Л.: Наука. - Константинова М. Ф. 1983. Влияние температуры выращивания на активность и теплоустойчивость карбоксиэстеразы озимой пшеницы Мироновская 808. Физиол. биохим. культ. растений 15(1): 28-32. - Лозина-Лозинский Л. К. 1961. Устойчивость к различным внешним агентам парameций, адаптированных к жизни в горячем радиоактивном источнике. Цитология 3(2): 154-166. - Осипов Д. В. 1966. Теплоустойчивость клонов *Paramecium caudatum*, выделенных из разных природных популяций. Вестн. ЛГУ 3(1): 107-115. - Полянский Ю. И. 1957. Температурные адаптации у инфузорий. I Зависимость теплоустойчивости *Paramecium caudatum* от температурных условий существования. Зоол. ж. 36(11): 1630-1646. - Полянский Ю. И., Суханова К. М., Соппа В. А., Юдин А. Л. 1967. Устойчивость *Amoeba proteus* к действию летальной температуры и этилового спирта. В сб.: Изменчивость теплоустойчивости клеток животных в онто- и филогенезе. М., Л., Наука: 43-62. - Правдина К. И. 1970. Теплоустойчивость водорастворимых эстераз пойкилотермных животных. Цитология 12(12): 1541-1549. - Прехт Г. (Precht H.) 1964. Обзор экспериментальных данных по адаптивным изменениям устойчивости. В кн.: Клетка и температура среды. М., Л., Наука : 206-213. - Проссер К. Л. (Prosser K. L.) 1977. Сравнительная физиология животных. М., Мир, т. 1. - Сервини Л. Н., Скобло И. И., Осипов Д. В. 1965. Влияние температурной адаптации на теплоустойчивость ферментов инфузорий *Paramecium caudatum*. В сб.: Теплоустойчивость клеток животных. М., Л., Наука: 161-170. - Серов О. Л., Корочкин Л. И., Манченко Г. П. 1977. Генетика изоферментов. М.: Наука. - Соколовский В. В. 1984. Окислительно-восстановительные процессы в биохимическом механизме неспецифической реакции организма на действие экстремальных факторов внешней среды. В кн.: Антиоксиданты и адаптация Л.: 5-19. - Соппа В. А. 1968. Межклоповые различия по теплоустойчивости у амeb. Цитология 10(2): 207-217. - Соппа В. А. 1973. Эстеразы трех штаммов амeb. Цитология 15(10): 1308-1312. - Соппа В. А. 1986. Теплоустойчивость клеток, суммарных эстераз и отдельных электрофоретических фракций эстераз у двух штаммов *Amoeba proteus*. Цитология 28(11): 1211-1221. - Соппа В. А. 1987. Спектр и теплоустойчивость отдельных электрофоретических форм тригонорастворимых эстераз у амeb, культивируемых при различных температурах. Цитология 29(3): 321-330. - Соппа В. А. 1991. Спектр электрофоретических форм глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, 6-фосфоглюконатдегидрогеназы и глюкозо-дегидрогеназы у амeb, культивируемых при различных температурах. Цитология 33(7): 104-109. - Соппа В. А. 1995. Эстеразы у *Amoeba proteus*. Цитология 37(4): 345-355. - Соппа В. А. 1997. Эстеразы у амeb *Amoeba proteus*, культивируемых при различных температурах. Цитология 39(9): 763-774. - Соппа В. А., Юдин А. Л. 1993. Индуцируемые наследуемые изменения в спектрах электрофоретических форм глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы у амeb. Генетика 29(3): 435-443. - Суханова К. М. 1968. Температурные адаптации у простейших. Л., Наука. - Ушаков Б. П., 1989. Физиология клетки и проблема вида у пойкилотермных животных. Л.: Наука. - Хлебович В. В. 1981. Акклимация животных организмов. Л.: Наука.

- **Хочачка П., Сомеро Дж.** 1988. Биохимическая адаптация. М.: Мир. - **Юдин А. Л.** 1982. Ядерно-цитоплазматические взаимоотношения и клеточная наследственность у амёб. Л.: Наука. - **Campbell C. M., Davies P. S.** 1978. Temperature acclimation in the teleost *Blennius folis*: changes in enzyme activity and cell structure. *Comp. Biochem. Physiol.* 61B: 165-167. - **Ciardiello M. A., Camardella L., Carratore V., Diprisco G.** 1997. Enzymes in antarctic fish - glucose-6-phosphate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase. *Comp. Biochem. Physiol.* 118A(4): 1031-1036. - **Demidov O. N., Tyrenko V. V., Svistov A. S., Komarova Ye. Yu., Karpishenko A. I., Margulis B. A., Shevchenko Yu. L.** 1999. Heat shock proteins in cardiosurgery patients. *Europ. J. Cardio-thor. Surg.* 16: 444-449. - **Feller G., Arpigny J. L., Gerday C.** 1997. Molecular adaptations of enzymes from psychrophilic organisms. *Comp. Biochem. Physiol.* 118A(3): 495-499. - **Fudge D. S., Stevens E. D., Ballantyne J. S.** 1997. Enzyme adaptation along a heterothermic tissue - the visceral retina mirabilia of the blufin tuna. *Amer. Journ. Physiol.* 41(6): R1834-R1840. - **Garcia-Alfonso C., Repetto G., Sanz P., Repetto M., Lopez-Barea J.** 1998. Direct determination of glutathione S-transferase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities in cells cultured in microtitre plates as biomarkers for oxidative stress. *ATLA* 26(3): 321-330. - **Gomori G.** 1953. Human esterases. *J. Lab. Clin. Med.*, 42: 335-453. - **Hochachka P. W.** 1998. Mechanism and evolution of hypoxia-tolerance in humans. *J. Exp. Biol.* 201(8): 1243-1254. - **Jagdale G. B., Gordon R.** 1997. Effect of temperature on the activities of glucose-6-dehydrogenase and hexokinase in entomopathogenic nematodes (Nematoda, Steinernematidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 118A(4): 1151-1156. - **Janovy J.** 1972. Temperature and metabolism in *Leishmania*. III. Some dehydrogenases of *L. donovani*, *L. mexicana* and *L. tarentolae*. *Exp. Parasitol.* 32: 196-205. - **Kalinina L. V., Khrebtukova I. A., Podgornaya O. L., Wasik A., Sikora J.** 1988. Heat shock proteins in *Amoeba*. I. Effect of high temperature on *Amoeba proteus* and *Amoeba borokensis*. *Europ. J. Protistol.* 24: 64-68. - **Laemmli U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685. - **Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. F.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275. - **Margulis B. A., Nacharov P. V., Tsvetkova O. L., Welsh M., Kinev A. V.** 1991. The characterization and use of different antibodies against the HSP70 major heat shock protein family for the development of an immunoassay. *Electrophoresis* 12(9): 670-673. - **Marek M.** 1982. Influence of cooling on the profile of proteins and esterases in tissues of some endopterygote insects. *Comp. Biochem. Physiol.* 73B: 951-956. - **Pierce V. A., Crawford D. L.** 1997. Phylogenetic analysis of thermal acclimation of the glycolytic enzymes in the genus *Fundulus*. *Physiol. Zoology* 70(6): 597-609. - **Prescott D. M., Carrier R.F.** 1964. Experimental procedures and cultural methods for *Euplotes eurystomus* and *Amoeba proteus*. In: *Methods in cell physiology*. New York; London: Acad. Press 1: 85-95. - **Sopina V. A.** 1976. The multiplication rate of amoebae related to the cultivation temperature. *J. Thermal Biology* 1: 199-204. - **Sopina V. A.** 1989. Polymorphism of glucose-6-phosphate dehydrogenase in free-living Amoebidae. *Arch. Protistenkd.* 137: 131-141. - **Towbin H., Staehelin T., Gordon J.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 76: 4350-4354. - **Welch W. J., Feramisco J. R.** 1985. Rapid purification of mammalian 70,000-dalton stress proteins: affinity of the proteins for nucleotids. *Mol. Cell Biol.* 5: 1226-1229. - **Yamauchi T., Stegeman J. J., Goldberg L.** 1975. The effects of starvation and temperature acclimation on pentose phosphate pathway dehydrogenases in brook trout liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 167: 13-22.