

БОТАНИКА

Выпуск XXXVII



Минск
2009

Y.A. SALANENKA, A.G. TAYLOR, N.A. LAMAN
CHEMICAL COMPOSITION OF LIPID LAYER OF THE
PERISPERM-ENDOSPERM ENVELOPE OF CUCUMBER
(*CUCUMIS SATIVUS*) SEEDS

Summary

The transportation and uptake of solutes into cucumber (*Cucumis sativus*) seeds are controlled by a semi-permeable perisperm-endosperm (PE) envelope that surrounds the embryo. The objective of this study was to evaluate the role of the lipid membrane in the semi-permeability of the PE envelope of cucumber seeds by studying its chemical composition. The GC-MS analysis revealed that lipid layer of the cucumber PE envelope contains chloroform-soluble waxes and insoluble cutin polymer, mainly composed of 9(10), 16-dihydroxy-hexadecanoic acid, and 16-hydroxyhexadecanoic acid. The seed cuticle waxes consisted mainly of free fatty acids with minor amounts of sterols, monoacylglycerols, and hydrocarbons. Finding of soluble waxes in lipid layer of the PE envelope suggests that wax extraction could be one of the possible ways in which organic solvents can influence PE permeability.

УДК 581.1

Г.Г. ФИЛИПЦОВА¹, Т.И. ДИТЧЕНКО¹, Е.М. ЛАПКОВСКАЯ¹,
Ф.А. ЛАХВИЧ², А.И. СОКОЛИК¹, В.М. ЮРИН¹
**ИНДУЦИРУЕМЫЕ ГЕТЕРОПРОСТАНОИДОМ ГРУППЫ "В"
ИЗМЕНЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО
СОСТОЯНИЯ РАСТЕНИЙ НА РАЗНЫХ УРОВНЯХ
ОРГАНИЗАЦИИ**

¹Белорусский государственный университет
²Институт биоорганической химии НАН Беларусь

Введение. В семидесятых годах в липидах низших растений (мхи, лишайники, водоросли) были найдены значительные количества полинасыщенных жирных кислот – эйкозотетраеновая (арахидоновая) и эйкозопентаеновая [1,2].

Высшие растения, как правило, не синтезируют арахидоновую кислоту. Для синтеза простагландиноподобных соединений

жасмонатного типа растения используют линоленовую кислоту через липоксигеназно/алленоксид-синглетазный путь, а также С¹⁸-изопростаноиды, называемые фитопростанами, через неферментативный катализируемый свободными радикалами путь. Оба пути неотъемлемо реализуются во многих, если не во всех растениях [3].

Полученные к настоящему моменту фрагментарные данные указывают на возможную функцию фитопростанов в качестве медиаторов защитных реакций у растений в ответ на различные виды стресса [4].

В этой связи представляется целесообразным изучить первичные эффекты экзогенных фитопростанов на мембранных, клеточных уровнях и начальных этапах роста и развития растительного организма.

Объекты и методы исследования. В качестве объектов исследования служили интернодальные клетки пресноводной харовой водоросли *Nitella flexilis* и интактные проростки тритикале (*Triticale*).

Клетки *Nitella flexilis* представляют собой удобную модель для регистрации функционирования транспортных систем плasmатической мембраны и скорости циклоза [5,6].

Использованная в настоящей работе культура водоросли выращивалась в лабораторных условиях в среде следующего состава (моль/л): 10⁻⁴ K₂HPO₄, 4·10⁻³ CaCl₂, 10⁻³ NaHCO₃, 10⁻⁴ Mg(NO₃)₂, pH 7.2. Обеспечивался постоянный цикл освещения – 12 часов свет/12 часов темноты.

Базовым раствором в экспериментах с *Nitella flexilis* служил раствор искусственной прудовой воды (ИПВ) состава (моль/л): 10⁻⁴ KCl, 10⁻³ NaCl, 10⁻⁴ CaCl₂, значения pH которого поддерживались с помощью буферной системы ТРИС-HCl на уровне 7,0±0,1.

Для электрофизиологических экспериментов отбирали вторую или третью интернодальные клетки, которые выдерживались в темноте в течение 1-2 суток для деактивации светостимулируемой электрогенерированной H⁺-ATФазной помпы.

При изучении мембранных действий различных химических соединений важное значение имеет приживленный контроль наблюдаемых эффектов *in vivo*. В настоящей работе это достигается использованием микроЗлектродной техники. Эксперименты проводились в режиме фиксации напряжения на

плазмалемме [5,7]. Фиксацию потенциала осуществляли на уровне -160 мВ, после чего регистрировали токовые кривые при подаче импульсов деполяризующего напряжения с шагом 20 мВ. Интервалы между импульсами составляли 7 минут. На основании токовых значений строились вольт-амперные характеристики каналов и активационные кривые, представляющие собой зависимости проводимости каналов от напряжения на плазмалемме.

Скорость циклоза измеряли визуально под микроскопом в растворе ИПВ с использованием окуляр-микрометра [6].

Семена тритикале замачивали в течение 24 часов в дистиллированной воде (контроль) и в растворах с концентрацией простаноида 10^{-5} , 10^{-6} и 10^{-7} моль/л. Определяли количество набухших и наклонувшихся семян и высаживали их в бумажные рулоны. Проростки тритикале выращивали в течение 7 суток на растворе Кюна при естественном освещении и температуре 20-22 °C [8]. На 3 сутки измеряли длину колеоптилей во всех вариантах опыта, на 7 сутки определяли сырую и сухую массу листьев, их площадь, количество фотосинтетических пигментов, а также проводили электрофоретический анализ белков листьев тритикале.

Экстракцию пигментов из растительного материала проводили с помощью неразбавленного ацетона. Оптическую плотность растворов измеряли на спектрофотометре Varian Cary 50 Bio (Германия) при длинах волн 662, 644 и 440 нм. Концентрацию хлорофиллов *a* и *b* и каротиноидов в вытяжке рассчитывали в соответствии с формулами, приведенными в работе [9]. Электрофоретическое разделение белков в полиакриламидных гелях осуществляли с помощью камеры для вертикального электрофореза «Хеликон» VE-10 (Россия). Анализ результатов электрофореза производили с помощью программного пакета Total Lab.

Изучалась биологическая активность синтетического фитопростаноида, относящегося к простагландинам группы В – *N*-гептил -2-[3-{(2-(гептиламино)-4-оксо-4,5-дигидрофuran-3-ил)метил}фенокси] ацетамида в диапазоне концентраций от 10^{-4} до 10^{-7} моль/л. Препарат синтезирован в Институте биоорганической химии НАН Беларусь.

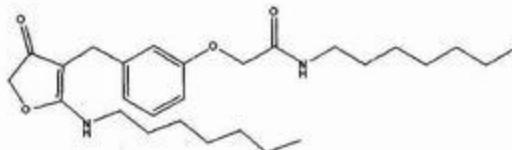


Рис. 1. Химическая структура гетеропростаноида группы В

Исследуемые параметры регистрировались в контрольных растворах и после добавления соответствующей концентрации простаноида.

Результаты и их обсуждение. Изучение биологической активности простаноидов, которая определяется их мембранотропными, физиолого-биохимическими и другими эффектами, диктуется как интересами регуляции роста и развития растений, так и задачами целенаправленного синтеза простаноидов.

Мембранотропные эффекты. Первичной мишенью действия экзогенных веществ является плазматическая мембрана растительной клетки, в которой функционируют транспортные системы, обеспечивающие перенос веществ в клетку и из нее в окружающую среду.

Одним из путей воздействия простагландинов (ПГ) на клеточные процессы является их способность влиять на транспорт ионов Ca^{2+} через мембранны животных клеток [10]. Непосредственный вклад ионов кальция в величины потенциала и проводимости плазматической мембранны растительных клеток в покое невелик [5]. Действительно, в проведенных нами экспериментах не было обнаружено заметного влияния испытуемого простаноида на мембранный потенциал и проводимость плазматической мембранны. С учетом приведенных выше соображений и ролью кальция в качестве вторичного мессенджера в сети передачи информации была предпринята попытка выявить действие простаноида на кальциевые каналы плазматической мембранны клеток *Nitella flexilis*.

На рис. 2 представлены вольт-амперные характеристики и активационные кривые Ca^{2+} -каналов плазмалеммы в контроле и после 30-минутной экспозиции клеток в растворе 10^{-7} и 10^{-6} моль/л исследуемого простаноида.

Согласно полученным данным фитопростаноид индуцировал возрастание амплитуды Ca^{2+} -тока, а также увеличение проводимости кальциевых каналов. Оба эффекта возрастили при увеличении его концентрации в растворе ИПВ. Так, если при воздействии простаноида в концентрации 10^{-7} моль/л отмечалось увеличение амплитуды кальциевого тока в среднем в 1,3 раза, то при десятикратном повышении его концентрации в среде максимальный кальциевый ток возрастал более чем в 3 раза (см. рис. 2а).

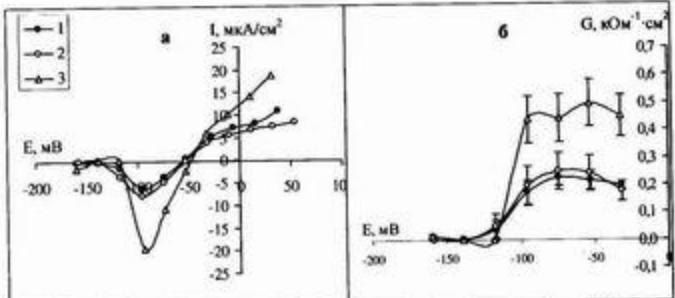


Рис. 2. Вольт-амперные характеристики (а) и активационные кривые (б) Ca^{2+} -каналов плазмалеммы клеток *Nitella flexilis* в контроле (1) и в присутствии простаноида в концентрациях 10^{-7} моль/л (2) и 10^{-6} моль/л (3)

Увеличение проводимости кальциевых каналов в случае воздействия 10^{-7} моль/л испытанного простаноида не являлось статистически достоверным по сравнению с контролем. В концентрации 10^{-6} моль/л он вызывал практически двухкратный рост проводимости Ca^{2+} -каналов плазматической мембранны клеток *Nitella flexilis* (см. рис. 2б).

Воздействие простаноида также приводило к изменению потенциала реверсии кальциевого тока и его смещению в сторону деполяризации. Если при концентрации 10^{-7} моль/л этот сдвиг не превышал 3-4 мВ, то при увеличении концентрации до 10^{-6} моль/л эффект становился более значительным и составлял в среднем 8-11 мВ по сравнению с контролем.

В самой низкой из использованных концентраций простаноид не вызывал изменения порога активации Ca^{2+} -каналов, тогда как

при более высокой отмечалась тенденция к его смещению в сторону положительных значений. В присутствии 10^{-6} моль/л исследуемого простаноида также обнаружено некоторое возрастание крутизны восходящего участка активационной кривой.

В целом проведенные исследования позволяют выявить следующие закономерности воздействия простаноида на работу возбудимых Ca^{2+} -каналов плазматической мембранны клеток *Nitella flexilis*:

- возрастание амплитуды Ca^{2+} -тока и увеличение проводимости каналов;
- отсутствие влияния на положение активационной кривой;
- сдвиг потенциала реверсии кальциевого тока в сторону деполяризации.

Обнаруженное в наших экспериментах активация кальциевых каналов плазмалеммы клеток *Nitella flexilis* в результате воздействия испытанного простаноида может индуцировать резкое повышение концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле, что, в свою очередь, будет приводить к его взаимодействию с Ca^{2+} -связывающими белками и иницииации Ca^{2+} -регулируемых физиологических процессов растений.

Скорость циклоза. Скорость движения цитоплазмы – один из чувствительных показателей жизнеспособности и физиологического состояния клетки. Движение цитоплазмы осуществляется за счет работы сократимых элементов цитоскелета – микротрубочек, которые связаны с плазмалеммой посредством актин-ассоциированных белков. Поэтому цитоскелет является динамическим каркасом клетки, который быстро реагирует как на внутренние, так и на внешние стимулы и влияет на физиологическую активность клетки.

Установлено, что при добавлении в окружающий клетку раствор ИПВ испытуемого простаноида в концентрации 10^{-4} моль/л происходит быстрая (в течение 2-5 минут) остановка циклоза. При перенесении клетки в раствор ИПВ после 5-минутной экспозиции в растворе простаноида в 70 % случаев циклоз не восстанавливался и происходила гибель клетки, в 30 % случаев наблюдалось восстановление скорости циклоза в течение одного часа.

Внесение простаноида в концентрации 10^{-5} моль/л в окружающий раствор приводит к быстрому снижению скорости циклоза клеток *Nitella flexilis*. В течение 10 минутного воздействия

данного препарата этот показатель снижается на 20-25% по сравнению с контролем, после чего наблюдается восстановление скорости циклоза и в течение часа она достигает исходного значения (рис. 3).

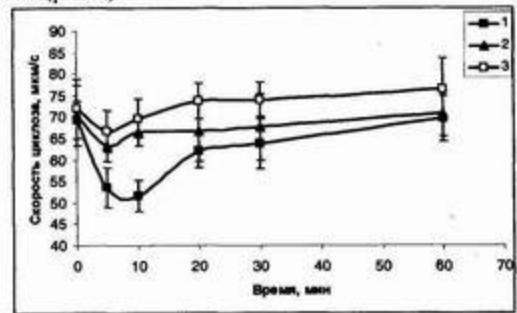


Рис. 3. Влияние различных концентраций простаноида на скорость движения цитоплазмы клеток *Nitella flexilis*: 1 – \$10^{-5}\$ моль/л, 2 – \$10^{-6}\$ моль/л, 3 – \$10^{-7}\$ моль/л

При добавлении \$10^{-6}\$ и \$10^{-7}\$ моль/л простаноида в первые 5 минут отмечается уменьшение скорости циклоза на 7-10 %, а затем быстрое восстановление исследуемого параметра с незначительным (2-7 %) увеличением по сравнению с контролем. В наибольшей степени стимуляция скорости циклоза клеток *Nitella flexilis* наблюдается при их экспозиции в \$10^{-7}\$ М растворе простаноида.

Вызываемый быстрый эффект простаноида может свидетельствовать о том, что мишенью его действия является плазматическая мембрана клетки. ПГ могут непосредственно влиять на текучесть мембранны [11]. Отсутствие зависимости скорости движения цитоплазмы от мембранныго потенциала при действии простаноида говорит о его влиянии на цитоплазматические структуры, ответственные за циклоз [6].

Существует несколько гипотез, объясняющих механизм циклоза. Одна из них связана с регуляторным действием ионов свободного кальция в цитоплазме. Содержание кальция в цитозоле определяет активность многих физиологических процессов, в том числе работу цитоскелета [12].

Элементы цитоскелета способны быстро реагировать на различные внешние сигналы, что может вызвать изменение скорости движения цитоплазмы. Установлено, что при действии экзогенных факторов на растительные организмы в их клетках активируется сборка элементов цитоскелета, что приводит к увеличению вязкости цитоплазмы [13]. В свою очередь увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ингибирует скорость движения цитоплазмы [14,15].

Отмечается двоякое действие ионов Ca^{2+} на циклоз. Во-первых, обратимое ингибирование Ca^{2+} -чувствительного механизма; во-вторых, ингибирование через его действие на миозиновые филаменты [16].

М. Денеш [17] по аналогии с аксолемой считает, что места прикрепления филаментов к плазматической мемbrane клеток являются белковыми молекулами с высоким сродством к ионам Ca^{2+} . В результате повышения концентрации Ca^{2+} и его связывания с активным центром ослабляется связь и происходит открепление актиновых филаментов от мембраны, что и приводит к остановке циклоза; последующее удаление ионов Ca^{2+} из цитоплазмы приводит к прикреплению актиновых филаментов.

Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что снижение скорости циклоза под действием простаноида связано с увеличением концентрации кальция в цитоплазме и ростом ее вязкости.

Увеличение скорости движения цитоплазмы при более длительном воздействии простаноида может быть результатом происходящих в клетке адаптационных реакций.

Ростовые процессы и содержание фотосинтетических пигментов в проростках тритикале. Показано, что предобработка семян простаноидом в концентрациях \$10^{-7}\$ и \$10^{-5}\$ моль/л практически не влияет на всхожесть семян, во всех вариантах опыта она составляла 95-97 % (табл.1). Простаноид в концентрации \$10^{-4}\$ моль/л вызывал сильное подавление всхожести семян, которая составляла всего 35 %.

В вариантах опыта, в которых семена подвергались предобработке простаноидом в концентрации \$10^{-7}\$ и \$10^{-6}\$ моль/л, первый лист появлялся уже на 4 сутки у 12 и 18 % проростков соответственно, в контрольном образце первый лист появлялся на 5 сутки, а при обработке простаноидом в концентрации \$10^{-4}\$ моль/л

лишь на 6 сутки. Следовательно, очевидно стимулирующее действие исследованного простаноида на ростовые процессы проростков в низких концентрациях (10^7 и 10^6 моль/л) и ингибирующее действие в более высоких концентрациях, особенно сильное при 10^4 моль/л (см. табл.1).

Таблица 1. Изменение ростовых характеристик проростков тритикале при обработке семян различными концентрациями простаноида (моль/л)

Вариант опыта	Контроль	10^7	10^6	10^5	10^4
Всхожесть семян, %	95±2	94±3	96±2	93±3	35±5
Длина колеоптиля, мм	9,0±0,8	11,1±1,2	11,3±1,2	6,4±0,7	1,2±0,3
Площадь листа, мм^2	203±8,8	230±10	242±12	184±9,5	77±5,7
Сухая масса листьев, г	0,222±0,03	0,275±0,04	0,330±0,04	0,236±0,03	0,050±0,02

Поскольку простаноид оказывает влияние уже на стадии прорастания семян можно предположить, что он вызывает запуск ростовых процессов, возможно, активацию синтеза гормонов роста. В 80-х годах XX столетия группа русских ученых исследовала наличие ПГ в различных тканях тополя и лиственницы [18]. Наибольшее количество ПГ обнаружено в камбальной зоне и почках этих растений. Показано, что уровень ПГ сильно изменяется в течение годичного цикла: наиболее высокий в апреле, наиболее низкий в феврале (70,0 и 5,5 мкг/г сухой массы соответственно). Авторы заключают, что ПГ могут являться биорегуляторами reproductiveных процессов в растительном организме.

Нами были проведены исследования, направленные на выявление действия простаноида на ростовые показатели проростков: длину колеоптилей и величину первого листа проростков тритикале.

Установлено, что предобработка семян в концентрации 10^7 и 10^6 моль/л простаноида стимулирует рост растения: длина колеоптилей 3-дневных проростков увеличивается на 12-15 % по сравнению с контролем, а площадь 7-дневного листа на 17-20 %. Концентрация 10^5 моль/л оказывает слабое (10-15 %) ингибирующее действие как на рост колеоптилей, так и на величину листа проростков тритикале. Концентрация 10^4 моль/л

приводит к снижению длины колеоптиля в 7-8 раз, а площадь первого листа уменьшается в 2,5-3 раза по сравнению с контролем.

Исследованный простаноид приводит к изменению не только морфометрических, но и биохимических характеристик листьев проростков тритикале.

Таблица 2. Влияние простаноида (моль/л) на содержание фотосинтетических пигментов в 7-дневных листьях проростков тритикале

Вариант опыта	Контроль	10^7	10^6	10^5	10^4
Содержание хлорофилла <i>a</i> , мкг/г сух.веса	5,49±0,31	5,54±0,33	5,88±0,32	5,94±0,30	5,15±0,29
Содержание хлорофилла <i>b</i> , мкг/г сух.веса	4,33±0,28	3,97±0,30	4,67±0,32	4,20±0,31	3,24±0,28
Содержание каротиноидов, мкг/г сух.веса	1,56±0,11	1,73±0,12	1,76±0,12	1,96±0,15	1,26±0,11
Хл <i>a</i> -Хл <i>b</i> / Каротиноиды	6,29±0,2	5,50±0,2	5,98±0,2	5,17±0,2	6,66±0,2

Было установлено действие различных концентраций простаноида на содержание фотосинтетических пигментов (хлорофиллов *a* и *b* и каротиноидов) и количество ключевого фермента фотосинтеза – рибулозо-бисфосфат-карбоксилазы (табл.2). Показано, что предобработка семян простаноидом в концентрации 10^7 моль/л практически не влияет на содержание хлорофилла *a*, концентрация хлорофилла *b* незначительно снижается.

Уровень каротиноидов во всех опытных образцах (за исключением 10^4 М) увеличивается по сравнению с контролем на 20-30 %. При предобработке семян простаноидом в концентрации 10^6 и 10^5 моль/л происходит увеличение концентрации хлорофиллов *a* и *b* на 10-15 %, уровень каротиноидов возрастает еще в большей степени, в результате чего отношение суммы хлорофиллов к каротиноидам снижается в опытных образцах. Концентрация простаноида 10^4 моль/л вызывает снижение количества всех фотосинтетических пигментов в листьях на 25-30 %.

Следовательно, простаноид в концентрациях 10^6 и 10^5 моль/л может вызывать активацию фотосинтетической активности

растений. Это предположение подтверждается данными электрофоретического анализа белков листьев проростков, согласно которому количество РБФК в опытных образцах возрастает до 1,5 раз по сравнению с контролем. Более высокие концентрации данного препарата приводят к снижению уровня этого фермента.

Активность процессов фотосинтеза в листьях растений напрямую связана с продукционным процессом. Это позволяет предположить, что исследованный простаноид может влиять на синтез органических веществ и вынос биомассы. Действительно, предобработка семян концентрациями простаноида 10^{-7} , 10^{-6} и 10^{-5} моль/л вызывает увеличение сухой биомассы листьев на 15, 50 и 5 % соответственно, концентрация 10^{-4} М приводит к снижению данного показателя в 4 раза (см. табл.2).

Заключение. Проведенные исследования позволили выявить следующие закономерности первичного действия N-гептил-2-[3-[(2-(гептиламино)-4-оксо-4,5-дигидрофuran-3-ил)метил]фенокси]ацетамида на разных уровнях организации растения. Мембранотропные эффекты простаноида в концентрациях 10^{-7} – 10^{-6} моль/л, связанные с работой Ca^{2+} -каналов плазматической мембрany клеток *Nitella flexilis*, показали возрастание амплитуды Ca^{2+} -тока, увеличение проводимости каналов и отсутствие влияния на положение активационной кривой. Обработка клетки простанонидом в концентрации 10^{-6} моль/л вызывала сдвиг потенциала реверсии кальциевого тока в сторону деполяризации.

Временная зависимость скорости циклоза описывалась переходной кривой: отмечалось первоначальное снижение скорости с последующим восстановлением к контрольному уровню, причем величина первичной ответной реакции увеличивалась с ростом концентрации простаноида.

Предобработка семян растений в концентрации 10^{-6} моль/л вызывала увеличение активности ростовых и фотосинтетических процессов, а в концентрации 10^{-4} моль/л наблюдается их ингибирование.

Литература

- 1.Groenewald E.G. // Botanical Review. 1997. V.63. P.199-220.
- 2.Thoma I., Krischke M., Loeffler C., Mueller M. J. // Chemistry Physics Lipids. 2004. V.128. P.135-148.
- 3.Afzal M., Ali M., Hassan R.A., Sweedan N., Dhami M. S. // Planta Med. 1991.V57. P.38-40.
- 4.Imbusch R., Mueller M.J. // Plant Physiol. 2000. V.124. P.1293–1304.
- 5.Юрин В.М., Гончарик М.Н., Галактионов С.Г. Перенос ионов через мембрany растительных клеток. Мин. 1977.
- 6.Ониани Д. Регуляция циклозиса клеток водорослей. Тбилиси. 1997.
- 7.Юрин В.М., Соколик А.И., Кудряшов А.П. Регуляция ионного транспорта через мембрany растительных клеток. Мин. 1991.
- 8.Зайцев В.Н., Корсакова О.Н., Жукова Н.В. // Селекция и семеноводство. 1983, № 11. С. 39-40.
- 9.Гавриленко В.Ф., Жигалова Т.В. Большой практикум по фотосинтезу. М., 2003.
- 10.Федоров Н.А. Биологическое и клиническое значение циклических нуклеотидов. М.: Мир. 1979.
- 11.Christov A.M., Vaklinova S.G. // Plant Physiol. 1987. V.83. P.500-504.
- 12.Альбертис Б., Брэй Д., Льюис Дж. Молекулярная биология клетки. В 3-х т. М.: Мир, 1994.
- 13.Чиркова Т.В. Физиологические основы устойчивости растений. Учеб. пособие. СПб: С.-Петербургский ун-т. 2002.
- 14.Williamson R.E. // J. Cell. Sci. 1975. V.17. P.665-668.
- 15.Williamson R.E., Ashley C.C. // Nature. 1982. V.296. P.647-651.
- 16.Tominaga Y., Tazawa M. // Protoplasma. 1981. V.109. P.103-111.
- 17.Денеш М. // Биофизика. 1986. Т.31. С.634-637.
- 18.Левин Э.Д., Черепанова В.Э. Синтез и исследование простагландинов: Тез. докл. научн. конф. Рига. 1982. С. 27.

G.G. FILIPTSOVA, T.I DITCHENKO, E.M. LAPKOVSKAYA, F.A. LAKHVICHE, A.I. SOKOLIK, V.M. YURIN INDUCED BY HETEROPIROSTANOID GROUP B FUNCTIONAL SHIFTS OF PLANT PHYSIOLOGICAL PARAMETERS AT DIFFERENT LEVELS OF ORGANIZATION

Summary

The researches to reveal following laws of primary action N-heptyl-2-[3-[(2-(heptylaminio)-4-oxo-4,5-dihydrofuran-3-yl)methyl]phenoxy]acetamide at different levels of plant organization were carried out. Membranotropical effects of tested prostanoid at concentration 10^{-7} - 10^{-6} mol/l, connected with work Ca^{2+} -channels *Nitella flexilis* cells plasmamembrane, have shown increase of amplitude Ca^{2+} -current and increase conductivity of channels. Time dependence cyclosis speed was described transitive curve: it was marked initial decrease in speed with the subsequent restoration to a test objective level. The size