

**ВЛИЯНИЕ РЕАГЕНТОВ, УВЕЛИЧИВАЮЩИХ ВЯЗКОСТЬ СРЕДЫ, НА СИНТЕЗ АТФ В ТИЛАКОИДАХ ХЛОРОПЛАСТА**

© 2015 г. И.М. Каргашов, В.К. Опанасенко, А.Н. Мальян

*Институт фундаментальных проблем биологии РАН,  
142290, Пушкино Московской области, Институтская ул., 2**E-mail: opanasenko45@mail.ru*

Поступила в редакцию 21.10.14 г.

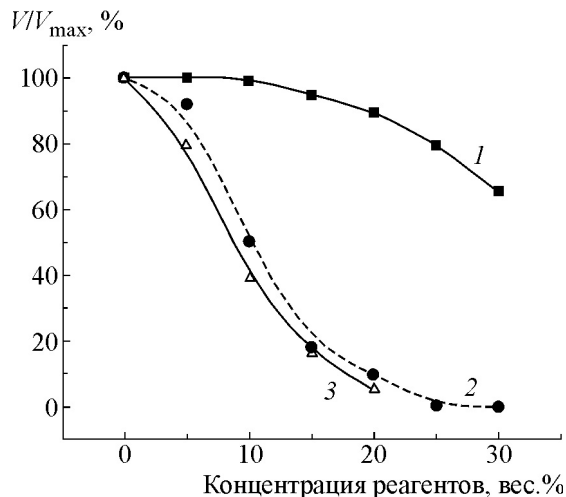
Исследовано влияние увеличения вязкости реакционной среды на циклическое фотофосфорилирование в тилакоидах хлоропластов и на  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимый гидролиз АТФ сопрягающим фактором  $\text{CF}_1$ . Показано, что добавление в реакционную среду агентов разной природы (сахарозы, декстрана 40, полиэтиленгликоля 6000), увеличивающих вязкость среды, приводит к уменьшению скорости синтеза АТФ при концентрации АДФ 0,1–0,2 мМ в условиях, когда эти агенты еще не вызывают ни разобщения, ни ингибирования переноса электронов в отсутствие АДФ. Декстран и полиэтиленгликоль ингибировали синтез АТФ на 50% при концентрациях гораздо меньших (6–10%), чем сахароза (30–40%), тогда как 50%-е ингибирование  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого гидролиза АТФ  $\text{CF}_1$ -АТФазой наблюдалось при более высоких концентрациях декстрана и полиэтиленгликоля (9–13%), но при более низких концентрациях сахарозы (около 20%). Установлено, что эффективная константа Михаэлиса ( $K_M$ ) для АДФ с возрастанием вязкости среды увеличивается в два–три раза, при этом максимальная скорость циклического фотофосфорилирования остается постоянной. Сделан вывод о том, что зависимость  $K_M$  от вязкости среды может служить критерием функционирования процесса фотофосфорилирования в диффузионно-контролируемом режиме. Обсуждаются возможные механизмы диффузии АДФ и АТФ.

*Ключевые слова: хлоропласты, фотофосфорилирование, электронный транспорт, гидролиз АТФ, сопрягающий фактор хлоропластов  $\text{CF}_1$ , вязкость.*

Вязкость – одна из фундаментальных характеристик жидкости как внутри живой клетки, так и в реакционной среде. При исследовании процессов клеточного метаболизма *in vitro* обычно учитывают влияние на скорости реакций температуры, рН, ионной силы и осмотического давления реакционной среды, но не вязкости, хотя известно, что изменение вязкости среды оказывает влияние на все ферментативные реакции, исследованные до настоящего времени [1,2]. Вязкость клеточной цитоплазмы обусловлена в основном сахарами и макромолекулами – белками и полисахаридами, которые в растворе набухают, связывая молекулы воды. При этом отдельные части макромолекул приобретают некоторую подвижность и способность образовывать межмолекулярные водородные связи, что может приводить к образованию гелеобразных структур. Считается, что содержание в цитоплазме эндогенных агентов, повышающих вязкость, находится в пределах 50–400 мг/мл и повышается в условиях стресса так, что их молекулы могут занимать до 40% объема клетки, свободного от органелл [1,3]. Очевидно, что повышение вязкости среды

должно затруднять диффузию субстратов и продуктов ферментативных реакций, что можно зарегистрировать экспериментально как ингибирование скорости работы конкретного фермента реагентами, увеличивающими вязкость реакционной среды. С другой стороны, повышение вязкости может действовать по механизму внутримолекулярного трения, т.е. непосредственно на сам фермент, замедляя конформационные переходы в его активном центре [4].

В настоящей работе впервые экспериментально исследовано влияние увеличения вязкости реакционной среды, создаваемого различными реагентами – полиэтиленгликолем, декстраном и сахарозой – на фотофосфорилирование АДФ АТФ-синтазой тилакоидных мембран и предпринята попытка выявить возможный механизм этого влияния. Для этого мы определяли скорость синтеза АТФ при варьировании концентрации АДФ и агентов, повышающих вязкость (сахарозы, декстрана 40 и полиэтиленгликоля 6000), а для выяснения влияния этих агентов на каталитическую часть АТФ-синтазы (сопрягающий фактор хлоропластов  $\text{CF}_1$ ) исследовали кинетику  $\text{Ca}^{2+}$ -зависи-



**Рис. 1.** Влияние реагентов, повышающих вязкость, на скорость циклического фотофосфорилирования ( $V/V_{max}$ , %), катализируемого феназинметасульфатом при концентрации АДФ 0,2 мМ: 1 – сахароза, 2 – декстран, 3 – полиэтиленгликоль. Скорость реакции в контроле равнялась 250 мкмоль на 1 мг хлорофилла в час. Условия см. в «Материалах и методах».

мого гидролиза АТФ при насыщающей концентрации субстрата реакции.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Тилакоиды хлоропластов выделяли из двухнедельных листьев гороха по методике, описанной ранее [5]. Полученные тилакоиды промывали при температуре 4°C в растворе, содержащем 0,5 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 0,2 М сахарозы, 10 мМ трицин-КОН (рН 7,8), 10 мМ NaCl и 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, затем ресуспендировали и хранили в той же среде при концентрации хлорофилла 2–3 мг/мл. Концентрацию хлорофилла определяли по методу Арнона [6].

В экспериментах использовали реакционные среды без альбумина, термостатированные при 25°C и содержавшие вышеуказанные концентрации солей, 100 мМ сахарозы, хлоропласты (40 мкг Хл/мл), акцептор электронов – 0,05 мМ феназинметасульфата или 0,5 мМ феррицианида и различные концентрации буферов. При измерении транспорта электронов для оценки фотосинтетического контроля мембран использовали среду, содержащую 5 мМ НЕРЕС + 5 мМ трицина (рН 7,8) ± грамицидин Д, а при измерении синтеза АТФ – различные концентрации АДФ, 2 мМ Р<sub>i</sub> и 2 мМ трицина (рН 7,8). Тилакоиды не имели каталазной активности, поэтому в серийных экспериментах мы не использовали ингибиторы каталазы. Для реги-

страции кинетики реакций хлоропласты освещали белым светом (200 Вт/м<sup>2</sup>) в течение 0,5–2,0 мин.

Транспорт электронов и синтез АТФ регистрировали с помощью рН-электрода по защелачиванию реакционной среды. Количество поглощенных протонов определяли титрованием среды известными количествами HCl. Скорость синтеза АТФ рассчитывали по известной методике [7]. Разброс данных для всех измерений на препаратах одного выделения не превышал 5%.

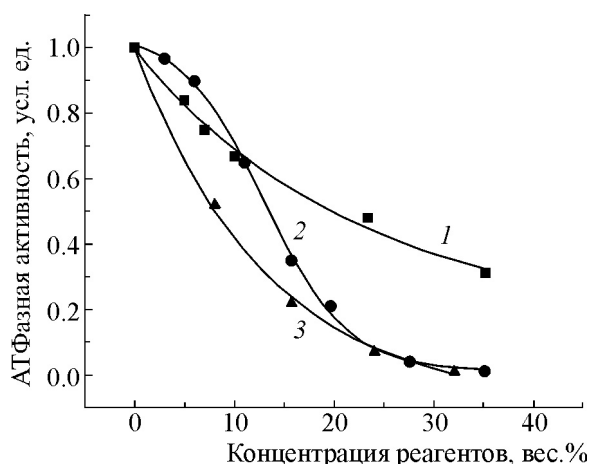
Сопрягающий фактор хлоропластов CF<sub>1</sub> выделяли по методу Биндера с соавт. [8] и хранили в 2 М (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в присутствии 1 мМ АТФ. После обессоливания фермента гель-фильтрацией через колонку с сефадексом G-50 проводили тиол-зависимую активацию CF<sub>1</sub> в среде, содержащей 50 мМ трис-HCl (рН 7,8), 50 мМ KCl, 0,1 мМ ЭДТА и 50 мМ дитиотреитола, в течение двух часов при комнатной температуре. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда [9]. Об активности препарата судили по скорости выделения неорганического фосфата [10] в реакционной среде, содержащей 50 мМ трис-HCl (рН 7,8), 50 мМ KCl, 0,1 мМ ЭДТА, 6 мМ CaCl<sub>2</sub>, 5 мМ АТФ и CF<sub>1</sub>, при температуре 25°C [11].

Вязкость, создаваемую реагентами, оценивали по литературным данным [12–14].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Измерение скорости синтеза АТФ в тилакоидах в различных условиях показало, что при концентрации АДФ 0,2 мМ, близкой к насыщению этой реакции в отсутствие агентов, повышающих вязкость, все исследованные реагенты ингибируют скорость циклического фотофосфорилирования. Влияние реагентов, увеличивающих вязкость реакционной среды, на скорость циклического фотофосфорилирования ( $V/V_{max}$ , %), катализируемого феназинметасульфатом при концентрации АДФ 0,2 мМ, показано на рис. 1. Сахароза оказалась наименее эффективным ингибитором – для достижения 50%-го ингибирования ее требовалось в три-четыре раза больше, чем полиэтиленгликоля или декстрана.

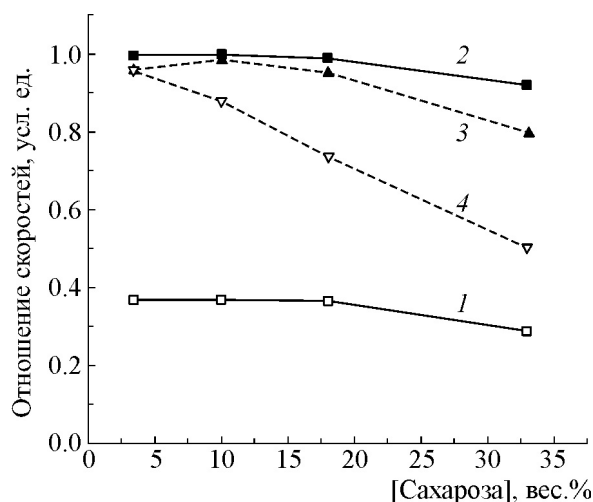
Чтобы выяснить, влияют ли реагенты, повышающие вязкость, на сопрягающий фактор CF<sub>1</sub>, исследовали их действие на гидролиз АТФ изолированным ферментом. Как видно на рис. 2, исследованные реагенты ингибировали гидролиз АТФ, причем 50%-е ингибирование декстраном и полиэтиленгликолем, в отличие от синтеза АТФ (рис. 1), наблюдалось в диа-



**Рис. 2.** Зависимости скорости  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемого гидролиза АТФ  $\text{CF}_1$ -АТФазой от концентрации в реакционной среде агентов, повышающих вязкость: 1 – сахароза, 2 – декстран, 3 – полиэтиленгликоль. Единице активности соответствует АТФазная активность  $\text{CF}_1$ , равная 0,82 мкмоль/мин на мг фермента. Условия см. в «Материалах и методах».

пазоне 9–13 вес.%, что несколько выше, чем диапазон ингибирования синтеза АТФ (7–10%). С другой стороны, та же степень ингибирования гидролиза АТФ сахарозой достигалась при значительно меньшей ее концентрации (около 20%), чем в случае фотофосфорилирования.

Для оценки влияния агентов, повышающих вязкость, на тилакоидные мембраны (возможность диссипации протонного градиента или ингибирования комплексов цепи электронного транспорта) была использована реакция переноса электронов от воды к феррицианиду в отсутствие АДФ. Лимитирующей стадией этой реакции является депротонирование пластогидрохинона на люменальной стороне цитохромного комплекса, так как закисление люмена тормозит перенос электронов между фотосистемами. Агенты, повышающие вязкость, практически не проникают в люмен, и если они не индуцируют трансмембранной утечки  $\text{H}^+$  и не ингибируют комплексы цепи, то не должны влиять и на скорости переноса электронов. Поэтому для оценки их влияния можно использовать фотосинтетический контроль – отношение или разность скоростей базального переноса электронов от воды к феррицианиду в отсутствие и в присутствии 2 мкМ грамицидина Д, который является эффективным разобщителем, обеспечивающим максимальную скорость электронного транспорта [15]. Снижение фотосинтетического контроля свидетельствует о разобщении (если увеличивается скорость базального транспорта) или об ингибировании пере-

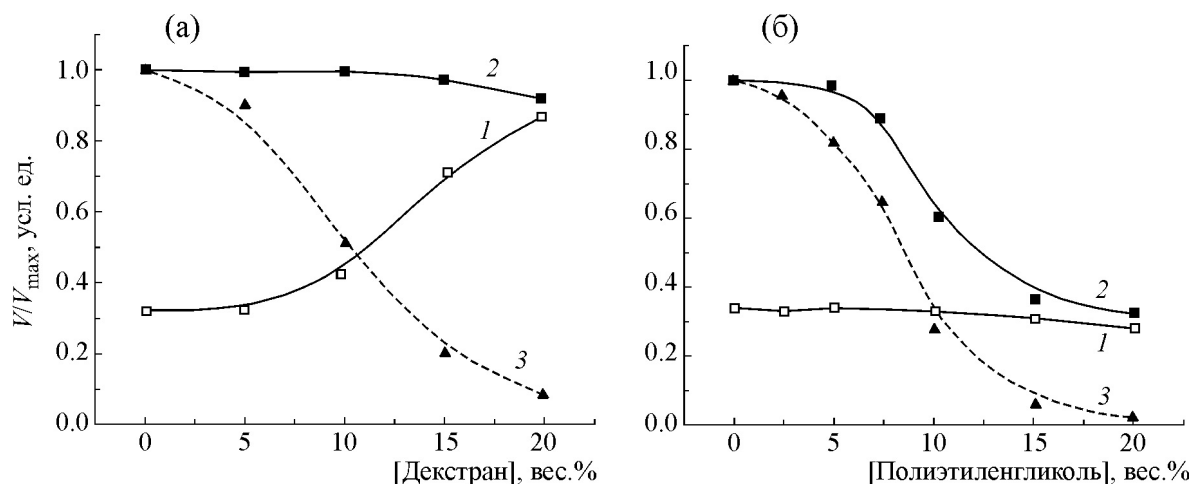


**Рис. 3.** Действие сахарозы на перенос электронов от воды к феррицианиду в отсутствие (1) и в присутствии (2) 2 мкМ грамицидина Д. Данные приведены в виде отношения скорости базального переноса к скорости разобщенного грамицидином Д в отсутствие сахарозы. Пунктиром показано действие сахарозы на скорость синтеза АТФ ( $V/V_{\text{max}}$ ) при концентрациях АДФ 0,2 мМ (3) и 0,1 мМ (4).

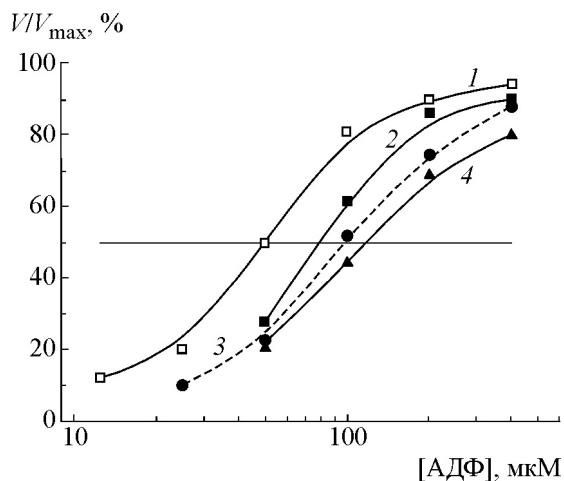
носа (если снижается скорость разобщенного транспорта электронов).

Эксперименты по оценке влияния агентов, повышающих вязкость, на фотосинтетический контроль показали, что 30%-я сахароза не нарушала фотосинтетический контроль, но заметно ингибировала синтез АТФ при концентрациях АДФ ниже 0,2 мМ (рис. 3). Таким образом, эффект сахарозы был обусловлен ее действием на скорость синтеза АТФ, но это действие отличалось от ее влияния на гидролиз АТФ изолированным ферментом.

В присутствии декстрана или полиэтиленгликоля часто наблюдались нарушения фотосинтетического контроля – тилакоиды разных выделений различались по типу и степени изменения этого показателя в присутствии агентов, повышающих вязкость (рис. 4). На рис. 4а приведены кривые, характерные для декстрана. Видно, что декстран при содержании выше 10% часто вызывает ускорение базального транспорта, что указывает на разобщение тилакоидов, т.е. на диссипацию трансмембранного градиента рН. В отдельных опытах с декстраном и полиэтиленгликолем наблюдалось также ингибирование разобщенного переноса электронов (рис. 4б). Нестабильность мембран могла исказить картину действия агентов, повышающих вязкость, на синтез АТФ из-за наложения мембранных эффектов разобщения или ингибирования транспорта электронов, поэтому мы



**Рис. 4.** Варианты действия декстрана (а) и полиэтиленгликоля (б) на базальный перенос электронов от воды к феррицианиду в отсутствие (1) и в присутствии (2) 2 мкМ грамицидина. Пунктиром показано действие агентов, повышающих вязкость, на синтез АТФ при концентрации АДФ 0,2 мМ (3). Кривые 1–3 на рисунках (а) и (б) получены на образцах одного выделения. Значения скоростей приведены в относительных единицах ( $V/V_{\max}$ ).



**Рис. 5.** Действие агентов, повышающих вязкость, на скорость синтеза АТФ ( $V/V_{\max}$ , %) при разных концентрациях АДФ. 1 – контроль, 2 – сахароза, 30%, 3 – декстран, 10%, 4 – полиэтиленгликоль, 6%. Скорость реакции в контроле – 270 мкмоль на 1 мг хлорофилла в час. Условия см. в «Материалах и методах». Линия, проведенная на уровне 50% ( $V/V_{\max}$ ), пересекает кривые в точках  $K_M$ .

определяли фотосинтетический контроль для каждой серии экспериментов и исследовали действие агентов, повышающих вязкость, на синтез АТФ только в условиях, когда они еще не вызывали нарушения фотосинтетического контроля.

Данные, полученные при измерении скорости синтеза АТФ при разных концентрациях АДФ и представленные на рис. 5 и в таблице, показали, что процесс описывается уравнением

Михаэлиса–Ментен как в отсутствие агентов, повышающих вязкость ( $K_M$  30–50 мкМ), так и в их присутствии ( $K_M$  80–110 мкМ). Необходимо отметить, что все агенты, повышающие вязкость, увеличивали константу Михаэлиса в два-три раза, но не изменяли ни максимальную скорость синтеза АТФ ни величину фотосинтетического контроля в среде без АДФ. Таким образом, несмотря на существенные различия в структуре и размерах реагентов, на синтез АТФ они оказывают (в определенных границах концентраций) одинаковый эффект.

Можно предположить, что усиление влияния агентов, повышающих вязкость, при снижении концентрации субстрата, формально выражающееся в изменении величины  $K_M$ , может служить критерием функционирования процесса фотофосфорилирования в диффузионно-контролируемом режиме.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе впервые проведена оценка влияния увеличения вязкости реакционной среды на циклическое фотофосфорилирование в тилакоидах хлоропластов и на  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимый гидролиз АТФ сопрягающим фактором  $\text{CF}_1$ . Показано, что добавление в реакционную среду агентов разной природы (сахарозы, декстрана 40, полиэтиленгликоля 6000), увеличивающих вязкость среды, приводило к уменьшению скорости синтеза АТФ при концентрации АДФ 0,1–0,2 мМ, причем в условиях, когда они еще не вызывают ни разобщения,

Влияние сахарозы, декстрана и полиэтиленгликоля на величину  $K_M$  АДФ при температуре среды 25°C для реакции циклического фотофосфорилирования с феназинметасульфатом тилакоидами хлоропластов

Реагенты	Контроль	Сахароза, 30%	Декстран, 8–10%	Полиэтиленгликоль, 5–6%
Диапазон $K_M$ , мкМ	30–50	90–100	90–100	100–110

ни ингибирования переноса электронов в отсутствие АДФ.

Реагенты, увеличивающие вязкость среды, были подобраны так, чтобы высокое осмотическое давление на тилакоидную мембрану было возможно только в присутствии сахарозы, благодаря ее низкому молекулярному весу. Чтобы обеспечить 30%-е содержание реагентов, требуется около 900 мМ сахарозы, 50 мкМ полиэтиленгликоля или 7,5 мкМ декстрана. Поскольку осмолярность раствора в данном случае близка к концентрации растворенного вещества, очевидно, что градиент осмотического давления на мембранах, создаваемый сахарозой, в тысячи раз выше, чем при использовании полиэтиленгликоля и декстрана. Таким образом, наблюдаемые эффекты агентов, повышающих вязкость, на синтез АТФ не были обусловлены ни изменением осмотического давления среды, ни разобщением или ингибированием электрон-транспортной цепи.

Тем не менее полученные нами результаты показывают, что при значениях вязкости, близких к вязкости жидкости внутри органелл, наблюдается специфическое торможение скорости циклического фотофосфорилирования. 50%-е ингибирование декстраном и полиэтиленгликолем наблюдалось в области 7–10 вес.%, что, согласно литературным данным, соответствует интервалу вязкости 4–6 сП для декстрана [12,13] и полиэтиленгликоля [14]. Это торможение удается обнаружить, если использовать концентрации АДФ ниже 0,2 мМ. При снижении концентрации АДФ ингибирование синтеза АТФ усиливается, что объяснимо затруднением диффузии субстрата реакции к АТФ-синтазам.

Исследованные агенты, повышающие вязкость, ингибировали не только скорость синтеза АТФ в циклическом фотофосфорилировании, но и гидролиз АТФ изолированным ферментом, при этом 50%-е ингибирование декстраном и полиэтиленгликолем наблюдалось в диапазоне 9–13 вес.%, что несколько выше, чем диапазон ингибирования синтеза АТФ (7–10%). Та же степень ингибирования гидролиза АТФ сахарозой достигалась при значительно меньшей ее концентрации (около 20%), чем в случае фотофосфорилирования. Причиной этих расхождений могут быть различия в механизме ингибирующего действия агентов, повышающих

вязкость, на эти процессы. Действительно, наблюдаемой скорости гидролиза АТФ соответствовала скорость работы фермента 25–27 об/с, тогда как при синтезе АТФ скорость составляла 200–280 об/с и в принципе могла бы достигать 400–600 об/с [16]. Логично предположить, что в случае сравнительно медленного  $Ca^{2+}$ -зависимого гидролиза лимитирующей стадией является торможение конформационных изменений фермента в ходе катализа за счет повышения внутримолекулярного трения [4].

Обнаруженное нами усиление влияния агентов, повышающих вязкость, при снижении концентрации субстрата, формально выражающееся в изменении величины  $K_M$ , может служить критерием функционирования процесса фотофосфорилирования в диффузионно-контролируемом режиме. Режим диффузионно-контролируемого фотофосфорилирования, как и другие данные по влиянию диффузии адениннуклеотидов на процессы генерации и потребления АТФ в хлоропластах, согласуется с основными положениями работ [17,18] о важной роли диффузии метаболитов в биологических системах, выдвинутых на основе анализа физических и химических закономерностей основных этапов биологической эволюции. В этих работах рассмотрены два возможных способа ослабления диффузионных ограничений.

Первый способ включает пространственное сближение ферментов и их правильную ориентацию в надмолекулярных комплексах. Этот способ имеет экспериментальное подтверждение при исследовании кинетики иммобилизованных полиферментных систем, в которых за счет специфического пространственного закрепления соседних ферментов наблюдается более эффективный перенос метаболитов по сравнению с диффузионным механизмом в растворе [18–23].

Согласно второму способу, перенос метаболитов от одного катализатора к другому может осуществляться специфическими маршрутами с участием катализаторов (ферментов). Другими словами, простая диффузия должна быть заменена облегченной для эффективного и регулируемого энергообеспечения физиологических процессов в соответствии с потребностями. В митохондриях в переносе могут принимать участие такие ферменты, как

аденилаткиназа и креатинкиназа [24,25], а в хлоропластах, по нашим данным, аденилаткиназа [26]. В заключение важно отметить, что регуляция диффузии адениннуклеотидов с участием ферментов с изменяемой активностью биологически более выгодна, поскольку позволяет избежать инерционности энергообмена и лучше приспособлять транспорт энергии к действию различных факторов в соответствии с потребностями клетки.

Авторы выражают искреннюю благодарность С.Э. Шнолю за полезное обсуждение.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Е. О. Пучков, Биологические мембраны **31**, 3 (2014).
2. S. Uribe and J. G. Sampedro, Biol. Proc. Online **5**, 108 (2003).
3. T. Ando and J. Skolnick, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **107** (43) 18457 (2010).
4. A. E. Sitnitsky, Chem. Phys. **396** (1), 37 (2010)
5. V. Opanasenko, A. Agafonov, and R. Demidova, Photosynth. Res. **72**, 243 (2002).
6. D. I. Arnon, Plant Physiol. **24**, 1 (1949).
7. M. Nishimura, T. Ito, and B. Chance, Biochim. Biophys. Acta **59**, 177 (1962)
8. A. Binder, A. N. Jagendorf, and T. Ngo, J. Biol. Chem. **253**, 3094 (1978).
9. M. M. Bradford, Anal. Biochem. **72**, 248 (1976).
10. Г. Н. Никулина, *Обзор методов колориметрического определения фосфата по образованию молибденовой сини* (Наука, М.-Л., 1965).
11. A. N. Malyan, Dokl. Biochem. Biophys. **450**, 123 (2013).
12. *Справочник химика* (Химия, М.-Л., 1965), т. 3.
13. <http://www.dextran.net/dextran-physical-properties.html>.
14. P. Gonzales-Tello, F. Camaco, and G. Brasquez, J. Chem. Eng. Data **39**, 611 (1994).
15. Ю. А. Овчинников, В. Т. Иванов и А. М. Шкроб, *Мембранно-активные комплексы* (Наука, М., 1974).
16. S. Aflalo and N. Shavit, FEBS Lett. **154**, 176 (1983).
17. С. Э. Шноль, Журн. общ. биологии **34**, 331 (1973).
18. С. Э. Шноль, *Физико-химические факторы биологической эволюции* (Наука, М., 1979).
19. R. Goldman and E. Katchalski, J. Theor. Biol. **32**, 243 (1971).
20. И. В. Березин и С. Д. Варфоломеев, *Биокинетика* (Наука, М., 1979).
21. К. Б. Серебровская, А. Л. Камышный и А. С. Ерохин, *Биокатализ* (Наука, М., 1984).
22. V. A. Saks, L. V. Rosenstraukh, V. N. Smirnov, and T. I. Chazov, Can. J. Physiol. Pharmacol. **56**, 691 (1978).
23. П. П. Джея, А. А. Кальвенас, А. И. Толейкис и А. К. Прошкявичус, Биохимия **48**, 147 (1983).
24. W. E. Jacobus, Biochem. Biophys. Res. Commun. **133**, 1035 (1985).
25. T. Wallimann, M. Wyss, D. Brdiczka, et al., Biochem. J. **281**, 21 (1992).
26. И. М. Карташов, Биофизика **54**, 841 (2009).

## Effects of Medium Viscosity Increasing Agents on ATP Synthesis in Chloroplast Thylakoids

I.M. Kartashov, V.K. Opanasenko, and A.N. Malyan

*Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences,  
ul. Institutskaya 2, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

The effect of an increase in the medium viscosity on cyclic photophosphorylation in chloroplast thylakoids and on  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent ATP hydrolysis by the chloroplast coupling factor  $\text{CF}_1$  was studied. With 0.1–0.2 mM ADP used it was found that the rate of ATP synthesis decreases after addition of various agents that increase the medium viscosity (sucrose, dextran 40 or polyethylene glycol 6000 provided that these agents cause neither uncoupling nor electron transport inhibition in the absence of ADP. Dextran and polyethylene glycol inhibited ATP synthesis by 50% when their concentrations were much lower (6–10%) than that of sucrose (30–40%), while 50% inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent ATP hydrolysis by  $\text{CF}_1$ -ATPase was observed at higher concentrations of dextran and polyethylene glycol (9–13 %) and lower concentrations of sucrose (about 20%). For ADP, the effective Michaelis constant ( $K_M$ ) was shown to increase 2–3-fold with the increasing viscosity; meanwhile the maximal rate of cyclic photophosphorylation remained virtually unchanged. The dependence of  $K_M$  on the medium viscosity can serve as a criterion for the process of diffusion-controlled photophosphorylation. Possible mechanisms of ADP and ATP diffusion are discussed.

*Key words:* chloroplast, photophosphorylation, electron transport, ATP hydrolysis, chloroplast coupling factor  $\text{CF}_1$ , viscosity