

АКТИВНІСТЬ Na^+ , K^+ -АТФ-АЗИ ПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАН ЗАРОДКІВ В'ЮНА ЗА ВПЛИВУ ЗЕЛЕНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ

О. Семочко, М. Бура, С. Мандзинець, Д. Санагурський

Львівський національний університет імені Івана Франка

вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна

e-mail: olena-yu@ukr.net

У статті вивчали вплив зеленого світла різної тривалості на активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази зародків в'юна (*Misgurnus fossilis* L.) протягом раннього ембріогенезу. Виявлено статистично достовірне зниження ферментативної активності Na^+ , K^+ -помпи на всіх досліджуваних стадіях, окрім 10 поділу бластомерів. Максимальний інгібуючий ефект зеленого світла, спостерігався при збільшенні експозиції до 20 хв. Дія світла за умов опромінення до та після запліднення, відрізняється за своєю здатністю змінювати активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази зародків. Висловлено припущення, що вплив зеленого світла на зародкові клітини здійснюється на мембранному рівні. Na^+ , K^+ -АТФаза може бути мішенню, яка взаємодіє з квантами світла, наслідком цього можуть бути конформаційні зміни у білковій структурі, що викликають пригнічення активності ферменту.

Ключові слова: в'юн, Na^+ , K^+ - АТФаза, мембранний транспорт, активні форми кисню, зелене світло.

Відомо здатність електромагнітного випромінювання (ЕМВ) впливати на клітинний метаболізм, зокрема на вміст АТФ у мітохондріях [5]. З літературних джерел відомий факт взаємозв'язку активного транспорту катіонів з внутрішньоклітинними процесами, зокрема біоенергетичними та перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ) [8].

Припускають, що причиною зміни активності мембранозв'язаних ферментів, у тому числі і зародків, може бути зміна ліпідного мікрооточення внаслідок процесів ліпопероксидації, котрі ще зумовлюють і зміну поверхневого потенціалу мембрани [8]. Виявлено [1], що на зміну електричних властивостей мембран, зміну провідності та мембранного потенціалу впливають саме продукти вільнорадикального окиснення. У свою чергу встановлено, що певні типи світла здатні впливати на зміну транспортних процесів клітин, їх провідність, а також активувати процеси ліпопероксидації [17]. Відомо, що функціонування Na^+ , K^+ -АТФ-ази значно порушується у присутності вільних радикалів [24].

Враховуючи вищеописане та недостатнє вивчення механізмів дії світла на зародкові клітини протягом раннього ембріогенезу, метою роботи було дослідити вплив зеленого випромінювання на функціонування Na^+ , K^+ -АТФ-ази мембран зародків в'юна на різних стадіях раннього розвитку.

Матеріали та методи

Дослідження проводили на зародках в'юна (*Misgurnus fossilis L.*) через 60, 150, 210, 270 та 330 хв після запліднення яйцеклітин під час стадій, які відповідають стадії 2, 16, 64 бластомерів, восьмому та десятому поділу бластомерів.

Яйцеклітини одержували і запліднювали за методом А.А. Нейфаха [15]. Овуляцію стимулювали внутрішньом'язовим введенням самкам хоріогонічного гонадотропіну (500 од.). Ікру одержану через 36 год після стимуляції, запліднювали у чашках Петрі суспензією спермій, отриману з сім'яників після декапітації та розтину черевної порожнини самців. Через 5–10 хв після запліднення зиготи відмивали та інкубували у фізіологічному розчині Гольфрета при температурі 20–22°C.

Отримані зиготи піддавали опроміненню зеленим світлодіодом ASMT MG00 - NGJ00 PBF ($\lambda=530$ нм) потужністю 1 Вт з рефлектором «Fraen» – FC-M2-XR79-OR для фокусування випромінювання у площині. Зародки в'юна в умовах контролю та дослідів інкубували у фізіологічному розчині Гольфрета; опромінювали одноразово одразу після запліднення протягом 1, 5 та 10 хв та 20 хв з відбором клітин на досліджуваних стадіях; та по стадіях. Мікросомну фракцію мембран зародків в'юна одержували методом диференційного центрифугування у градієнті густини сахарози, як описано у роботі Луцика [12]. Стадії розвитку зародків контролювали візуально під бінокулярним мікроскопом МБС-9.

Для визначення активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази використовували отриману фракцію з кожної з досліджуваних стадій. Ензиматичну активність мембранного ферменту (у мкмоль P_i /мг білка·год) клітин оцінювали за різницею вмісту неорганічного фосфату (P_i), утвореного в середовищі інкубації за наявності та відсутності інгібітора Na^+ , K^+ -АТФ-ази – оубаїну (1 ммоль/л), а також з урахуванням поправки на вміст у мембранному препараті ендогенного P_i та наявність фрагментів мембран. Кількість продукту реакції P_i визначали модифікованим методом Фіске-Суббароу [16], а вміст білка в мембранному препараті – методом Лоурі [23]. Аліквоту суспензії (100 мкл) мембранної фракції переносили у стандартне середовище інкубації, яке містило (ммоль/л): АТФ- Na_2 – 3; MgCl_2 – 3; NaCl – 100; KCl – 30; EGTA – 1,0; Tris- HCl – 50 (рН 7,4; 22°C).

У дослідженнях використовували реактиви вітчизняного виробництва EGTA, («Merk» Німеччина); оубаїн («Fluka», Швейцарія); АТФ («Acros», Бельгія); Tris («Sigma», США). Вірогідність різниці одержаних показників з контролем визначали за t-критерієм Стюдента

[7]. Статистичну обробку та графічне представлення виконували за допомогою програмного пакета Microsoft Excel.

Результати і їхнє обговорення

Безліч досліджень на сучасному етапі, присвячені вивченню мембранозв'язаних процесів у ранньому розвитку тварин, отримано обґрунтовані висновки [11, 18]. Застосовується системний підхід до вивчення даних явищ [13], а також створені моделі динаміки біоелектричних процесів у ранньому ембріогенезі [6]. Проте актуальним залишається розкриття механізмів регуляції клітинного поділу [3, 4] що є домінуючим у процесах диференціації клітин [14]. Припускають, що в основі процесів зміни концентрації іонів у зародках тварин, інтенсивності енергетичного метаболізму, біоелектрогенезу є однаковий часовий механізм регуляції, який не залежить від типу дроблення цих тварин [10]. З'ясовано, що існує тісний взаємозв'язок між електричними мембранопов'язаними коливними процесами та ритмом дроблення бластомерів, в літературі висувалось припущення про електричний контроль раннього розвитку тварин, однак експериментальні дані є недостатньо переконливі [9].

Встановлено, що активність Na^+ , K^+ -активованої, Mg^{2+} -залежної АТФ-ази зародків в'юна за нормальних умов зростає протягом ранніх етапів ембріогенезу, на стадії 8 поділу бластомерів (270 хв розвитку) показник сягає максимального значення, а на стадії 10 поділу (330 хв розвитку) активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази дещо знижується [19]. Схожий характер змін ферментативної активності Na^+ , K^+ - помпи спостерігали на зародках морських їжаків [19].

Встановлено, що випромінювання зеленого діапазону спектру достовірно дозозалежно інгібує активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази бластомерів зародків в'юна протягом раннього ембріогенезу (рис. 1, А, Б). Істотне інгібування відмічено на стадії 2 бластомерів (60 хв розвитку) вже за мінімальних експозицій 1 та 5 хв зеленим монохроматичним світлом, за умов опромінення після запліднення, показник знизився відносно контролю на $36,5 \pm 2,1\%$ та $33,09 \pm 1,96\%$ відповідно (рис. 1, А). За умов опромінення по стадіях, відмічено схожий ефект – зниження активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази на $34,1 \pm 3,5\%$ та $42,5 \pm 1,9\%$ за експозицій 1 та 5 хв відповідно (рис. 1, Б). 20-ти хвилинне опромінення зародків після запліднення спричиняло достовірне зниження активності досліджуваного ферменту на стадії 2 бластомерів на $48,1 \pm 2,9\%$ (рис. 1, А), тоді як дія світла по стадіях веде до зниження активності на $67,3 \pm 5,3\%$ (рис. 1, Б).

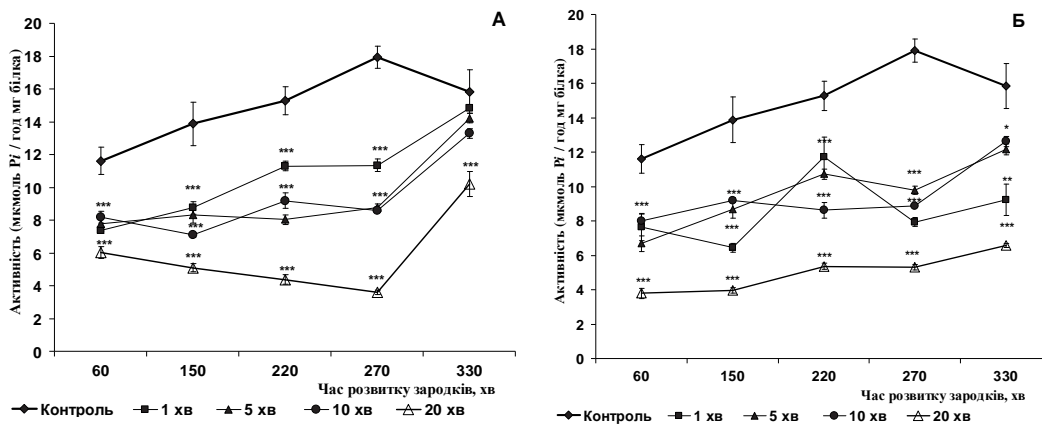


Рис. 1. Динаміка зміни активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази на ранніх етапах розвитку зародків в'юна за умов впливу зеленого світла (А – опромінення після запліднення, Б – опромінення по стадіях).

Зниження ферментативної активності Na^+ , K^+ -помпи спостерігалось на всіх досліджуваних стадіях, окрім 10 поділу бластомерів. Максимальний інгібуючий ефект спостерігався при збільшенні експозиції до 20 хв зеленим випромінюванням, активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази знизилась на $35,6 \pm 2,7\%$ та $58,5 \pm 1,2\%$ за умов опромінення після запліднення та по стадіях відповідно (рис. 1, А). Характер зміни активності ферменту зберігається як за умов опромінення після запліднення, так і за дії світла поетапно. Достовірної різниці у змінах активності досліджуваної АТФ-ази за різних умов досліду не виявлено. Активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази на стадії 10 поділу бластомерів зазнала найменших змін внаслідок дії зеленого світла, що вказує на здатність клітин відновлювати активність ферменту (через деякий час (6 год)) після дії фізичного фактора.

Випромінювання потужних світлодіодів призводить до вираженого пригнічення активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази мембран зародків в'юна на різних стадіях розвитку. Однак тенденції до інгібування змінюються залежно від умов проведення досліду. Зокрема одноразове опромінення у обох випадках спричинює зниження активності ензиму на перших стадіях розвитку з подальшим відновленням активності ферменту на останній досліджуваній стадії розвитку до значень контролю. Тоді як за умов поетапного опромінення активність АТФ-ази зародків є відмінною залежно від часу експозиції та дози опромінення. Зниження ферментативної активності Na^+ , K^+ -помпи за дії випромінювання може реалізуватись двома способами: Na^+ , K^+ -АТФаза може бути мішенню, яка взаємодіє з квантами світла, наслідком якої є конформаційні зміни у білковій структурі, що викликають пригнічення активності ферменту. З іншого боку не виключений і механізм опосередкованого зниження активності цього ферменту через посилення процесів окиснення ліпідів мембрани за дії ЕМВ.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Антонов В. Ф., Владимиров Ю. А., Россельс А. Н. и др. Влияние продуктов перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот на транспорт ионов через бимолекулярные фосфолипидные мембраны // *Биофизика*. 1973. Т. 18. № 4. С. 668–673.
2. Буйлин В. А., Ларюшин А. И., Никитина М. В. Светолазерная терапия. Руководство для врачей. М.: Триада, 2004. 255 с.
3. Гойда Е. А. Биофизические аспекты раннего онтогенеза животных. К.: Наук. думка, 1993. 223 с.
4. Гойда Е. А., Ощеповский В. В., Санагурский Д. И. Новый подход к оценке взаимосвязи различных параметров, влияющих на динамику трансмембранного потенциала у развивающихся зародышей вьюна // *Биофизика*. 1996. Т. 41. № 2. С. 393–399.
5. Гуляр С. А. Современное состояние ПАЙЛЕР-светотерапии аппаратами Биоптрон. Обзор // *Фотобіологія та фотомедицина*. 2009. № 4. С. 23–35.
6. Гумецький Р., Дика М. Модель динаміки мембранопов'язаних біоелектричних процесів у ранньому ембріогенезі в'юна // *Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол.* 2002. Вип. 28. С. 11–20.
7. Гумецький Р. Я., Паляниця Б. М., Чабан М. Е. Математичні методи в біології: теоретичні відомості, програмований практикум, комп'ютерні тести. Л.: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2004. 111 с.
8. Древаль В. И., Финашин А. В. Влияние перекисного окисления липидов плазматических мембран на активность Ca^{2+} -АТФазы // *Биофизика*. 1991. Т. 36. № 5. С. 799–801.
9. Думальська І., Дика М., Демчук В., Санагурський Д. Особливості електричних властивостей зародкових клітин холоднокровних тварин на ранніх етапах розвитку // *Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол.* 2003. Вип. 32. С. 17–22.
10. Івашків Л. Я., Гумецький Р. Я., Санагурський Д. І. Часові співвідношення динаміки метаболічних і біоелектричних характеристик раннього ембріогенезу в'юна та шпорцевої жаби // *Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол.* 2002. Вип. 29. С. 15–24.
11. Кусень С. И., Санагурский Д. И., Мурацик И. Г. и др. Изменения трансмембранного потенциала у развивающихся зародышей вьюна под влиянием инсулина, ингибирования транскрипции и трансляции // *Биофизика*. 1980. Т. 25. № 4. С. 658–663.
12. Луцик М. Д., Лукьяненко А. В., Кусень С. И. Метод массового механического удаления оболочек из зародышей вьюна // *Онтогенез*. 1983. Т. 14. № 6. С. 386–388.

13. Маслій І., Санагурський Д. Системний підхід до аналізу мембранопов'язаних процесів у період раннього ембріогенезу риб // Вісн. Львів. у-ту. Сер. біол. 2002. Вип. 31. С. 16–21.
14. Медына И. Р., Гойда Е. А. Электрофизиологические характеристики клеточных мембран в период дробления у рыб и амфибий // Онтогенез. 1992. Т. 23. № 2. С. 117–128.
15. Нейфах А. А., Тимофеева М. Я. Проблемы регуляции в молекулярной биологии развития. М.: Наука, 1978. 336 с.
16. Прохорова М. И. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен). Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. 272 с.
17. Пучкова Т. В., Парнев О. М., Путвинский А. В. Электрическая прочность мембран липосом при УФ-индуцированном перекисом окислении липидов // Биофизика. 1983. Т. 28. № 6. С. 1014–1018.
18. Санагурский Д. И., Гойда Е. А., Стельмах Н. С. и др. Влияние адреналина на динамику трансмембранного потенциала развивающихся зародышей вьюна // Биофизика. 1982. Т. 27. № 2. С. 2–257.
19. Целевич М. В., Мандзинець С. М., Санагурський Д. І. Кінетичні характеристики Na^+ , K^+ -АТФ-ази клітин зародків в'юна // Вісн. Харків. ун-ту. 2008. Т. 1. № 20. С. 29–36.
20. Chang Y. S., Hwang J. H., Kwon H. N. et al. *In vitro* and *in vivo* efficacy of new blue light emitting diode phototherapy compared to conventional halogen quartz phototherapy for neonatal jaundice // J. Korean. Med. Sci. 2005. Vol. 20. N 1. P. 61–64.
21. DeLand M. M., Weiss R. A., McDaniel D. H., Geronemus R. G. Treatment of radiation-induced dermatitis with light-emitting diode (LED) photomodulation // Lasers Surg. and Med. 2007. Vol. 39. P. 164–168.
22. DiCesare S., Maloney S., Fernandes B. et al. The effect of blue light exposure in an ocular melanoma animal model // J. Exp. Clin. Cancer Res. 2009. Vol. 28. N 1. P. 48–56.
23. Lowry O. H., Rosebrough N. G., Farr A. L., Randall R. C. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193. N 1. P. 265–275.
24. Mense M., Stark G., Apell H. J. Effects of free radicals on partial reactions of the Na,K-ATPase // J. Membr. Biol. 1997. Vol. 156. N 1. P. 63–71.

Стаття: надійшла до редакції 03.06.14

доопрацьована 02.10.14

прийнята до друку 03.10.14

**ACTIVITY OF Na⁺, K⁺-ATPase IN PLASMA MEMBRANE OF LOACH EMBRYOS FOR
INFLUENCE GREEN LIGHT****O. Semochko, M. Bura, S. Mandzynets, D. Sanagursky**

*Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: olena-yu@ukr.net*

In the paper it was studied the effect of varying lengths of green light on the activity of Na⁺, K⁺-ATPase of loach embryos (*Misgurnus fossilis* L.) during early embryogenesis. The enzyme activity Na⁺, K⁺-pump was decreased in at all studied stages except 10 division blastomeres. The green light in exposure to 20 min produced maximum inhibitory effect. The light irradiation conditions before and after fertilization had different effects on the activity of Na⁺, K⁺-ATPase embryos. We suggested that the effect of green light on the germ cells is realized on the membrane level. Na⁺, K⁺-ATPase may be a target for action of photon, in result may be a conformational change in the pro

Key words: loach, Na⁺, K⁺-ATPase, membrane transport, reactive oxygen species, green light.

**ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ Na⁺, K⁺-АТФ-азы ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ
ЗАРОДЫШЕЙ ВЬЮНА ПРИ ВЛИЯНИИ ЗЕЛЕННОГО ИЗЛУЧЕНИЯ****О. Семочко, М. Бура, С. Мандзинець, Д. Санагурський**

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина
e-mail: olena-yu@ukr.net*

В статье изучали влияние зеленого света различной длины на активность Na⁺, K⁺-АТФ-азы зародышей вьюна (*Misgurnus fossilis* L.) в течение раннего эмбриогенеза. Выявлено статистически достоверное снижение ферментативной активности Na⁺, K⁺-помпы на всех исследуемых стадиях, кроме 10 деления blastomeres. Максимальный ингибирующий эффект зеленого света наблюдался при увеличении экспозиции до 20 мин. Действие света в условиях облучения до и после оплодотворения отличается по своей способности изменять активность Na⁺, K⁺-АТФ-азы зародышей. Высказано предположение, что влияние зеленого света на зародышевые клетки осуществляется на мембранном уровне. Na⁺, K⁺-АТФ-аза может быть мишенью, которая взаимодействует с квантами света, следствием этого могут быть конформационные изменения в белковой структуре, вызывающие угнетение активности фермента.

Ключевые слова: вьюн, Na⁺, K⁺-АТФ-аза, мембранный транспорт, активные формы кислорода, зеленый свет.