



УДК 577.152.3+597.551.2-131

**ВПЛИВ КАТІОНІВ ДВОВАЛЕНТНИХ МЕТАЛІВ
НА БАЗАЛЬНУ Mg^{2+} -АТФ-азну АКТИВНІСТЬ ПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАН
ЗАРОДКІВ В'ЮНА (*Misgurnus fossilis* L.)**

М. В. Целевич

Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: mcelevych@yahoo.com

Одержано функціональне підтвердження наявності базальної Ca^{2+} -незалежної, Mg^{2+} -залежної АТФ-ази у зародкових клітинах в'юна *Misgurnus fossilis* L. На ранніх стадіях розвитку зародків виявлено періодичні зміни активності убаїн-резистентної базальної Mg^{2+} -АТФ-ази за нормальних умов розвитку. Досліджено вплив таких катіонів двовалентних металів, як Cd^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} на активність Mg^{2+} -АТФ-ази бластомерів протягом раннього ембріогенезу. Визначення констант напівінгібування I_{50} дало змогу проаналізувати чутливість досліджуваної АТФ-ази зародків до впливу катіонів двовалентних металів протягом синхронних поділів бластомерів. Встановлено, що найбільш виражений інгібувальний вплив на Mg^{2+} -АТФ-азну активність здійснює Cd^{2+} , менш виражений – Zn^{2+} , і найнижча інактивуюча дія характерна для Mn^{2+} .

Ключові слова: базальна Ca^{2+} -незалежна, Mg^{2+} -залежна АТФ-аза, зародки в'юна, плазматична мембрана, Cd^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , поділ бластомерів.

**THE INFLUENCE OF BIVALENT CATIONS ON THE BASAL
PLASMATIC MEMBRANE Mg^{2+} -ATPase ACTIVITY
OF LOACH EMBRYOS (*Misgurnus fossilis* L.)**

M. V. Tselevych

Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskyyi St., Lviv 79005, Ukraine

The functional confirmation of Ca^{2+} -independent, Mg^{2+} -dependent ATPase presence in the loach *Misgurnus fossilis* L. embryo was obtained. It was found out

the periodic changes of ouabain-resistance basal Mg^{2+} -ATPase activity at normal conditions during early stages of development. The influence of some bivalent metal cations as Cd^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} on Mg^{2+} -ATPase activity of loach embryo (*Misgurnus fossilis* L.) during early embryogenesis was investigated. The determination at inhibition constants (I_{50}) permitted to analyse this ATPase sensibility to the influence of metal cations during the synchronous blastomer divisions. The value of I_{50} during the investigated period of development confirmed higher inhibition influence of cations of Cd^{2+} and lower inhibition influence – for Zn^{2+} and Mn^{2+} cations.

Key words: basal Mg^{2+} -dependent ATPase, loach embryos, plasma membrane, Cd^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , blastomers divisions.

ВСТУП

Для плазматичної мембрани (ПМ) багатьох видів клітин властива досить висока активність уабайнрезистентної базальної Ca^{2+} -незалежної Mg^{2+} -залежної АТФ-ази (Mg^{2+} -АТФ-аза, ЕС 3.6.1.3), яку визначають за відсутності в інкубаційному середовищі Ca^{2+} та за присутності Mg^{2+} . Цю транспортну АТФ-азу виявлено, зокрема, в ПМ еритроцитів, клітин мозку, гепатоцитів, міоцитів судин і матки [11, 17, 19, 22]. Зокрема, у матці кролиць вона може становити 80÷100 мкмоль P_i /год на 1 мг білка [2]. У зв'язку з виявленням у фракції ПМ реакції Mg^{2+} -залежного гідролізу АТФ, для якого не потрібні іони Ca^{2+} , можна припустити, що він забезпечується базальною Ca^{2+} -незалежною Mg^{2+} -АТФ-азою, котрій притаманна фізіологічно висока спорідненість до іонів Mg^{2+} ($K_a \approx 107$ мкМ) і яка є маркером цієї фракції, як і Na^+ , K^+ -АТФ-аза.

Фізіологічну роль Ca^{2+} -незалежного Mg^{2+} -залежного ферментативного гідролізу АТФ у фракції ПМ досі не з'ясовано. Ймовірно, що ця функція неоднакова для різних тканин і об'єктів. Так, зокрема, в центральній нервовій системі Mg^{2+} -АТФ-аза може гідролізувати АТФ у пресинаптичній і постсинаптичній мембранах, контролюючи таким чином концентрацію як АТФ, так і самого аденозину в синаптичній щілині [19]. Деякі автори [5, 16] не виключають, що Ca^{2+} -незалежна, Mg^{2+} -залежна АТФ-аза ПМ клітин мозку риб є частиною АТФ-зв'язувальних ділянок на ГАМК-регуляторних Cl^- -каналах. Mg^{2+} -АТФ-аза ПМ еритроцитів контролює їхню форму шляхом АТФ-залежної транслокації фосфатидилсерину та фосфатидил-етаноламіну з поверхневого шару ліпідів ПМ до внутрішнього [11]. На клітинах меланоми та в мембрані гладком'язових клітин трахеї виявлено асоціацію Mg^{2+} -АТФ-ази з протонним насосом [12].

Молекулярні механізми токсичної дії деяких біологічно важливих металів часто пов'язують не лише з унікальними функціями цих металів, а й, що не менш важливо, з їх антагоністичними властивостями в реалізації транспортних процесів клітин. Відомо, що катіони двовалентних металів Ni^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+} [1], Cu^{2+} [23] та Pb^{2+} [24] інактивують таку мембранну систему транспорту, як Na^+ , K^+ -АТФ-азу. Як свідчать дані Пекера та Лотерштайна [20], катіони Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} і Fe^{2+} також здатні замінити Ca^{2+} у процесі Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежного гідролізу АТФ везикулами мікосомної фракції гепатоцитів щурів. Відомості про здатність катіонів Cd^{2+} , Mn^{2+} та Zn^{2+} модифікувати роботу базальної Ca^{2+} -незалежної Mg^{2+} -залежної АТФ-ази є нечисленними, тому доцільним є дослідження впливу цих

катіонів на убаїнрезистентний Mg^{2+} -залежний ферментативний гідроліз АТФ, зокрема, впродовж раннього ембріогенезу зародкових організмів.

Токсичний вплив кадмію пов'язаний з його кумуляцією в організмі, а також зі здатністю ініціювати вільнорадикальне окислення [21], що є причиною пошкодження мембранних та інших ліпопротеїнів, інактивації мембранних ферментів, пригнічення поділу клітин. У дослідженнях впливу на організм коропа лускатого (*Cyprinus carpio* L.) [6] іонів цинку, марганцю та свинцю, а також за умов їх сумісного впливу, спостерігали зміни активності супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази та посилення процесів пероксидації ліпідів, що свідчить про розбалансування системи антиоксидантного захисту. Як відомо, цинк, незважаючи на постійну валентність, істотно впливає на редокс-статус клітини, що надзвичайно важливо для зародкових клітин, через зміну співвідношення вмісту тіолів як у вільному стані, так і в координуваних зв'язках з металом (враховуючи й Me^{2+} -зв'язуючі центри мембранних ферментів) [15].

Метою роботи було визначення питомої Ca^{2+} -незалежної базальної Mg^{2+} -АТФ-азної активності зародків *Misgurnus fossilis* L. та дослідження особливостей впливу катіонів Cd^{2+} , Mn^{2+} та Zn^{2+} на убаїнрезистентний Mg^{2+} -залежний гідроліз АТФ.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження, проведені на зародках в'юна (*Misgurnus fossilis* L.) у період від запліднення до стадії 10 поділу бластомерів (2, 16, 64 бластомерів, 8 та 10 поділи). Ікру одержували через 36 год після стимуляції хоріогонічним гонадотропіном (500 од.) та запліднювали в чашках Петрі суспензією спермій за Нейфахом [7]. Після запліднення (через 5–10 хв) зиготи відмивали й інкубували у розчині Гольфретера ($t=21^{\circ}C$). Стадії розвитку контролювали візуально під бінокулярним мікроскопом МБС-9.

Мікосомну фракцію мембран зародків одержували методом диференційного центрифугування у градієнті густини сахарози, як описано у статті [3]. Рештки зародкового жовтка осаджували центрифугуванням упродовж 10 хв при 1600 g. Надосадову рідину, збагачену фрагментами плазматичної та ретикулярної мембран, центрифугували 10 хв при 10 000 g і зберігали при $t=20^{\circ}C$ [3].

Перед початком експерименту аліквоту суспензії мембранного препарату (10 мкл) переносили у стандартне середовище інкубації, яке містило (ммоль/л): NaCl – 30,0; KCl – 125,0; $MgCl_2$ – 3,0; АТФ- Na_2 – 3; Tris-HCl – 50,0 (pH 7,4; $21^{\circ}C$). Питому активність Ca^{2+} -незалежної, Mg^{2+} -залежної АТФ-ази визначали за відсутності іонів Ca^{2+} , з додаванням 1 мМ ЕГТА та відповідних інгібіторів: 1 мМ убаїну (інгібітор Na^+ , K^+ -АТФ-ази ПМ) та NaN_3 (інгібітор АТФ-ази мітохондрій), 0,1 мкМ тапсигаргіну (інгібітор Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-ази ЕПР). Ферментативну реакцію ініціювали введенням у реакційне середовище аліквоти мембранного препарату, а заповняли додаванням 10% ТХО.

Питому активність Mg^{2+} -АТФ-азної системи досліджуваних клітин оцінювали за різницею між кількістю P_i , що утворився в середовищі інкубації різного складу за наявності та відсутності фрагментів мембран, з урахуванням поправки на вміст ендогенного P_i в мембранному препараті й виражали в мкмольх P_i у перерахунку за 1 год на 1 мг білка. Кількість продукту реакції P_i визначали за модифікованим методом Фіске-Суббароу [5], а вміст білка в суспензії мембранного препарату – за методом Лоурі [14]. Ймовірність одержаних показників визначали за t -критерієм Стьюдента.

Для повноти характеристики варіабельності змін базальної активності Mg^{2+} -АТФ-ази зародків за умов дії катіонів двовалентних металів визначено констант напівінгібування (I_{50}), шляхом лінеаризації одержаних кривих доза-ефект у логарифмічних координатах. Числові значення I_{50} для досліджуваних факторів на різних стадіях розвитку визначали у точці перетину одержаних прямих із віссю абсцис. Обчислення лінеаризованих графіків проводили з використанням найменших квадратів (значення r становило 0,90–0,99).

У роботі застосовували такі реактиви: EGTA, NaN_3 („Merk”, Німеччина), убаїн („Fluka”, Швейцарія), АТФ („Acros”, Бельгія), трис-гідроксиметил-амінометан, тапсиграгін („Sigma”, США). Інші реактиви вітчизняного виробництва, кваліфікації х.ч. або ч.д.а.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

З огляду на дані літератури [2] можна припустити, що фракція бластомерів зародків є гетерогенною як за своєю топологією, так і за спектром активності локалізованих у ній АТФ-гідролаз (Na^+ , K^+ ; Ca^{2+} , Mg^{2+} ; Mg^{2+} - та Ca^{2+} -АТФ-ази) і домішок фрагментів мембран інших субклітинних структур (мітохондрій, ЕПР), які здатні гідролізувати АТФ за наявності у середовищі іонів Mg^{2+} .

Присутність 1 мМ EGTA у безкальцієвому, убаїн- і азидвмісному середовищі інкубації практично унеможлиблює ферментативний гідроліз АТФ Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азами ПМ та ЕПР, Na^+ , K^+ -АТФ-азою ПМ та Ca^{2+} АТФ-азою мітохондрій. Отже, за приріст P_i відповідає Mg^{2+} -АТФ-аза, середнє значення активності якої становить $2,4 \pm 0,3$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка (рис. 1). У попередніх дослідах встановлено, що на стадії 2 бластомерів внесок активності Mg^{2+} -АТФ-ази у загальний Mg^{2+} -залежний ферментативний гідроліз АТФ становить приблизно 39,7% (через 60 хв після запліднення) [9].

На стадії поділу 16 бластомерів (150-та хв) Mg^{2+} -АТФ-азна активність зростає на $93,4 \pm 1,2\%$ порівняно з першою стадією розвитку зародків і становить $4,6 \pm 0,6$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка. За умов подальшої інкубації мікросомної фракції мембран зародків, на 210-й хв (рис. 1, стадія 64 бластомерів) за присутності убаїну та азиду натрію (1 мМ), рівень P_i у безкальцієвому Mg^{2+} -вмісному середовищі становив $3,8 \pm 0,5$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка. Отже, відмічено зростання Mg^{2+} -АТФ-азної активності в середньому на $57,1 \pm 7,6\%$ відносно першої стадії розвитку зародків.

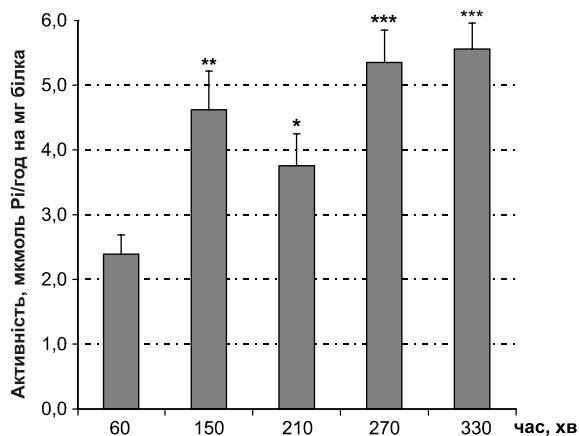


Рис. 1. Активність базальної Mg^{2+} -АТФ-ази зародків в'юна на різних стадіях поділу бластомерів: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ – зміни статистично достовірні порівняно зі стадією 2 бластомерів

Fig. 1. Mg^{2+} -ATPase activity of loach embryo at the different stages of blastomer divisions. Significance level shown inside the figure, determined by Student's t-test: * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$

Максимального значення уабаїнрезистентна базальна Mg^{2+} -АТФ-азна активність плазматичних мембран зародків в'юна досягала на восьмій стадії поділу бластомерів (270-та хв розвитку), становлячи $5,4 \pm 0,5$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка (підвищується більше ніж на $124,2 \pm 10,8\%$ відносно першої стадії розвитку). Як виявлено у ході досліджень, на десятій стадії поділу бластомерів (через 330 хв) не виявлено значних змін базальної Mg^{2+} -АТФ-азної активності, однак на цій стадії спостерігали незначне зростання активності Mg^{2+} -АТФ-ази порівняно із попередньою стадією (рис. 1).

Отже, Mg^{2+} -АТФ-азна активність протягом синхронних поділів бластомерів зародків характеризується певною періодичністю. Однак на десятій стадії поділу бластомерів зміни активності Mg^{2+} -АТФ-ази збільшуються із тривалістю розвитку зародків. Слід зазначити, що подібний характер змін упродовж синхронних поділів виявлено і для Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-ази ПМ зародків в'юна [9]. Крім цього, встановлено, що максимального значення на восьмій стадії поділу також досягає Na^+ , K^+ -АТФ-аза, як і досліджувана уабаїнрезистентна базальна Mg^{2+} -АТФ-аза зародків. Припускають, що такі зміни активності мембранозв'язаних ферментів пов'язані з підвищенням інтенсивності експресії молекул цих ферментів під час раннього ембріонального розвитку зародків. При дослідженні характеру роботи Na^+ , K^+ -АТФ-ази на зародках морських їжаків *Strongylocentrotus purpuratus* і *Littechinus pictus* [13] показано, що активність її для незаплідненої яйцеклітини та при заплідненні майже ідентична, а швидке зростання Na^+ , K^+ -АТФ-азної активності відбувається від стадії бластули до стадії ранньої гастрული, після чого залишається незмінною до стадії вилуплення. Подібні зміни Na^+ , K^+ -АТФ-азної активності до стадії ранньої гастрული описано й для іншого виду морського їжака *Hemicentrotus pulcherrimus* [18]. У кінці періоду синхронних поділів бластомерів активуються макромолекулярні синтези, особливо масивний синтез нових мРНК [8], що потребує значних енерговитрат і приводить до перерозподілу макроергів, із чим, ймовірно, і пов'язана відсутність виражених змін ферментативної активності енергозалежних систем транспорту на цьому етапі розвитку зародків.

При вивченні механізмів дії речовин різної природи значна увага приділяється особливостям їх взаємодії з ПМ, котра є найпершою ланкою у сприйнятті зовнішніх сигналів, їх проведенні та трансформації у клітинну відповідь. Одним із найбільш чутливих показників впливу речовин ендogenousного і екзогенного походження на стан ПМ є зміна активності мембранозв'язаних енергозалежних ферментів (АТФ-аз). Особливо актуальними є дослідження таких впливів на зародкових об'єктах, оскільки характер змін цих параметрів внаслідок впливу хімічних факторів у період раннього ембріогенезу відображають зміни функціонального стану, зокрема, й ступінь життєздатності організму, і можуть бути прогностичними показниками.

АТФ-гідролази, до яких належать Na^+ , K^+ -; Ca^{2+} , Mg^{2+} -; Mg^{2+} , H^+ - та Ca^{2+} -АТФ-ази, мають низку спільних особливостей: є іон-транспортуючими ферментами, мають багато гомологічних послідовностей у молекулі білка, характеризуються подібним кінетичним механізмом [10]. Виходячи з цього та враховуючи високу чутливість АТФ-гідролаз до впливу факторів довкілля, зокрема, катіонів двовалентних металів, доцільно було б дослідити характер зміни активності базальної Mg^{2+} -АТФ-ази зародків за умов впливу катіонів Cd^{2+} , Mn^{2+} та Zn^{2+} , для розуміння ролі реакції уабаїнрезистентного Mg^{2+} -залежного гідролізу АТФ у підтриманні іонного гомеостазу зародків упродовж розвитку.

У ході проведених досліджень встановлено, що на першій годині розвитку (стадія 2 бластомерів) активність базальної Mg^{2+} -АТФ-ази найбільш виражено знижувалася за наявності в середовищі інкубації хлориду кадмію (на $75,1 \pm 3,1\%$, рис. 2, А). Слід зазначити, що за умов впливу катіонів двовалентних металів упродовж досліджуваних стадій розвитку мінімального значення Mg^{2+} -АТФ-азна активність досягала власне на стадії 2 бластомерів ($0,6 \pm 0,3$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка). При дії катіонів Cd^{2+} у низьких концентраціях (10^{-5} – 10^{-6} М) зміни базальної Mg^{2+} -АТФ-азної активності мали менш виражену тенденцію до зниження. Середнє значення питомої Mg^{2+} -АТФ-азної активності зародків за таких умов становить $1,4 \pm 0,3$, тоді як у контролі активність становить $2,4 \pm 0,3$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка, тобто знижується на $41,5 \pm 9,6\%$. Ведення в середовище інкубації катіонів Zn^{2+} та Mn^{2+} (у зазначених концентраціях) спричинює імовірно, в середньому на 45%, зниження Mg^{2+} -АТФ-азної активності порівняно з контролем, значення якої не перевищувало $1,5 \pm 0,2$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка.

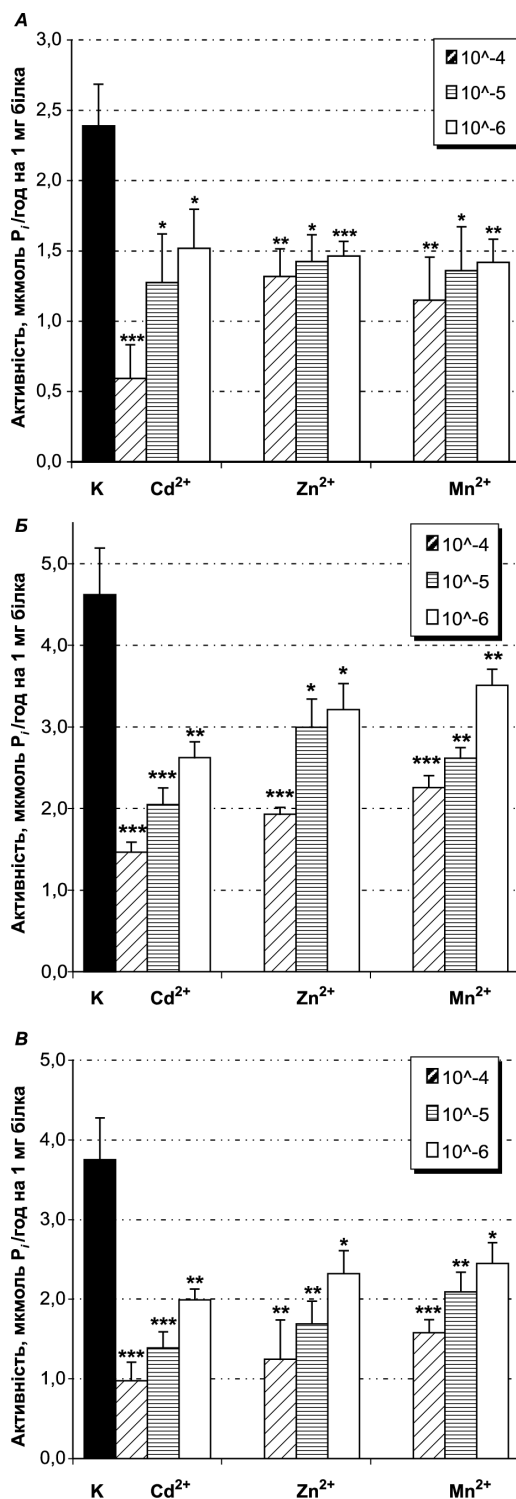
На стадіях 16 і 64 бластомерів, на відміну від першої стадії розвитку, встановлено більш виражену концентраційну залежність змін базальної Mg^{2+} -АТФ-азної активності зародків від

Рис. 2. Mg^{2+} -АТФ-азна активність зародків в'юна за умови впливу катіонів Cd^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} у діапазоні концентрацій 10^{-4} – 10^{-6} М на стадії розвитку 2 (А), 16 (Б) та 64 (В) бластомерів:

Тут і далі імовірні зміни порівняно із контролем * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$

Fig. 2. Mg^{2+} -ATPase activity of loach embryos under the Cd^{2+} , Zn^{2+} and Mn^{2+} influence (10^{-4} – 10^{-6} M) on the stage of 2 (A), 16 (B) and 64 (B) blastomers.

Significance level shown inside the figure, determined by Student's t-test: * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$



вмісту хлоридів досліджуваних металів у середовищі інкубації (рис. 2, Б–В). На цих стадіях активність убаїнрезистентної базальної Mg^{2+} -АТФ-ази також суттєво знижувалася за наявності в середовищі катіонів Cd^{2+} , навіть при концентрації останніх 10^{-6} М – на $43,2 \pm 3,2$ і $46,9 \pm 3,3\%$ відповідно. За таких умов Mg^{2+} -АТФ-азна активність зародкових мембран не перевищувала $1,9 \pm 0,3$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка. Незначні зміни активності мембранозв'язаного ферменту зародків виявлено при впливі хлориду марганцю на обидвох стадіях розвитку. Встановлено, що активність Mg^{2+} -АТФ-ази була максимальною на стадії 16 бластомерів при дії хлориду марганцю у концентрації 10^{-6} М ($3,5 \pm 0,2$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка, рис. 2, Б), а мінімальною ($1,2 \pm 0,2$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка) на стадії 64 бластомерів за дії 10^{-4} М хлориду цинку. Зміни Mg^{2+} -АТФ-азної активності за умов впливу Zn^{2+} на зазначених стадіях розвитку мають подібний характер, як і при дії Mn^{2+} (рис. 2, Б–В).

На восьмій стадії поділу бластомерів, як і на попередніх стадіях, за умов впливу катіонів Cd^{2+} в діапазоні концентрацій 10^{-4} – 10^{-6} М відбуваються ймовірні зміни базальної Mg^{2+} -АТФ-азної активності, які набувають лінійної концентраційної залежності (рис. 3, А). Наявність у середовищі інкубації хлоридів марганцю та цинку не викликає виражених змін убаїнрезистентної базальної Mg^{2+} -АТФ-азної активності зародків порівняно з впливом катіонів Cd^{2+} . *In vitro* активність Mg^{2+} -АТФ-ази зародків, за впливу катіонів Zn^{2+} та Mn^{2+} в концентраціях 10^{-5} – 10^{-6} М достовірно не змінюється. На цій стадії розвитку активність мембранозв'язаного ферменту зародків була максимальною за присутності в середовищі інкубації катіонів Mn^{2+} (10^{-6} М) і становила $3,5 \pm 0,5$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка, що відповідає 65% активності в контролі.

На останній стадії синхронних поділів бластомерів (10 поділ, рис. 3, Б) виявлено аналогічні пригнічуючі ефекти впливу катіонів досліджуваних двовалентних металів на активність Mg^{2+} -АТФ-ази

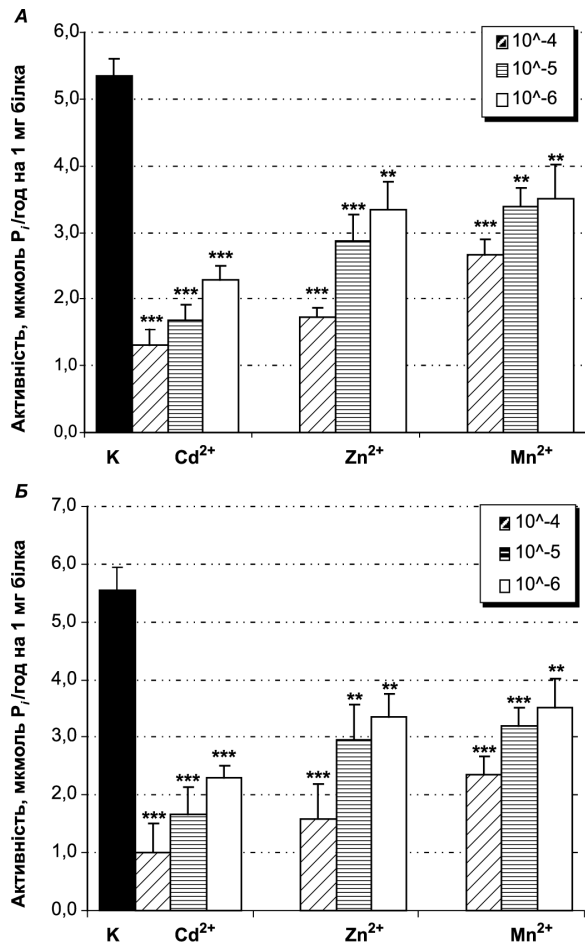


Рис. 3. Mg^{2+} -АТФ-азна активність зародків в'юна за умови впливу катіонів Cd^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} у діапазоні концентрацій 10^{-4} – 10^{-6} М на восьмій (А) та десятій (Б) стадіях поділу бластомерів

Fig. 3. Mg^{2+} -ATPase activity of loach embryos under the Cd^{2+} , Zn^{2+} and Mn^{2+} influence (10^{-4} – 10^{-6} M) on the 8 (A) and 10 (B) stages of blastomers division

зародків. За умов дії 10^{-4} М Cd^{2+} базальна Mg^{2+} -АТФ-азна активність становила $1,0 \pm 0,2$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка, тоді як при дії Mn^{2+} (10^{-6} М) активність досліджуваного ферменту зародків досягала максимального значення на цій стадії розвитку – $3,5 \pm 0,5$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка, яке фактично не відрізнялося від значень Mg^{2+} -АТФ-азної активності на попередній стадії розвитку.

Згідно з отриманими результатами можна зробити висновок, що катіони двовалентних металів Cd^{2+} , Mn^{2+} та Zn^{2+} (10^{-4} – 10^{-6} М) залежно від концентрації інгібують убаїнрезистентну базальну Mg^{2+} -АТФ-азу зародків в'юна *in vitro* на різних стадіях раннього ембріогенезу. Причому зниження активності мембранного ферменту було найбільш вираженим за умов впливу катіонів Cd^{2+} у всіх концентраціях від стадії першого до стадії десятого поділів бластомерів. Наявність в інкубаційному середовищі катіонів Mn^{2+} та Zn^{2+} приводила до менш вираженого, однак у всіх випадках імовірного порівняно з контролем, зниження активності базальної Mg^{2+} -АТФ-ази зародків. Подібні результати отримано і при інгібуванні Na^+ , K^+ -АТФ-ази зародків в'юна катіонами досліджуваних металів [1], а також при дослідженні впливу катіонів цих металів на активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-ази фракції печінки [25].

Порівняльний аналіз інгібувального впливу катіонів Cd^{2+} , Mn^{2+} та Zn^{2+} на убаїнрезистентну базальну Mg^{2+} -АТФ-азу проводили на основі визначених констант напівінгібування I_{50} (див. таблицю). Найнижчі значення I_{50} , тобто найвищий ступінь інгібування активності мембранного ферменту на всіх досліджуваних стадіях розвитку характерний для катіонів Cd^{2+} . Слід зазначити, що і для Na^+ , K^+ -АТФ-ази зародків спостерігали подібний найбільший пригнічувальний ефект катіонів Cd^{2+} [1].

Константи напівінгібування I_{50} (мкМ) Mg^{2+} -АТФ-ази зародків в'юна катіонами двовалентних металів на різних стадіях розвитку

The half-inhibition constants I_{50} (μM) of the loach embryos Mg^{2+} -ATPase by bivalent metal ions during development stages

Катіони двовалентних металів	Стадії розвитку зародків				
	2 бластомери	16 бластомерів	64 бластомери	8 поділ	10 поділ
Cd^{2+}	6,81 ($r = 0,93$)	3,45 ($r = 0,99$)	1,46 ($r = 0,99$)	0,19 ($r = 0,99$)	0,27 ($r = 0,99$)
Mn^{2+}	6,52 ($r = 0,91$)	58,67 ($r = 0,93$)	23,98 ($r = 0,99$)	163,11 ($r = 0,87$)	25,76 ($r = 0,90$)
Zn^{2+}	69,9 ($r = 0,94$)	43,68 ($r = 0,90$)	5,82 ($r = 0,99$)	9,01 ($r = 0,94$)	6,43 ($r = 0,94$)

Найменший інгібувальний вплив та відповідно найвищі значення констант напівінгібування I_{50} майже на всіх стадіях поділу бластомерів характерні для Mn^{2+} , і у випадку його дії на Na^+ , K^+ -АТФ-ази зародків [1] і Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-ази мікросомної фракції печінки [25]. Стосовно значень I_{50} для катіонів Zn^{2+} це підтверджується досить високим ступенем інгібування ним досліджуваного мембранного ферменту зародків, особливо на останніх стадіях синхронних поділів бластомерів.

Інгібування катіонами двовалентних металів мембранних систем, у першу чергу АТФ-гідролаз, залежить від фізико-хімічних властивостей перших. Найбіль-

ше значення у процесах інгібування мембранного транспорту мають, імовірно, стеричні фактори, зокрема радіус, а також ентальпія гідратації іонів [1]. Рівень спорідненості катіонів двовалентних металів до O_2 -вмісних та SH-груп біолігандів відіграє меншу, однак також вагомую роль у реалізації інгібувальної дії цих катіонів на Mg^{2+} -залежний ферментативний гідроліз АТФ. Крім цього відомо, що інгібування АТФ-гідролаз катіонами двовалентних металів [1, 25] супроводжується змінами ультраструктурної організації клітини: дезорганізацією та набряканням клітинних органел, розрідженням цитоплазми. Це, у свою чергу, свідчить про інгібування активного транспорту іонів за умов впливу катіонів двовалентних металів.

Таким чином, отримані результати мають значення для подальшого розуміння фізіологічної ролі убаїнрезистентного Mg^{2+} -залежного ферментативного гідролізу АТФ упродовж онтогенезу.

ВИСНОВКИ

На основі отриманих результатів можна зробити висновок, що для зародкових клітин в'юна *Misgurnus fossilis* L. характерна базальна Mg^{2+} -залежна АТФ-азна активність, зміни якої на ранніх стадіях розвитку зародків мають періодичний характер. Катіони Cd^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} інгібують убаїнрезистентну базальну Mg^{2+} -АТФ-азну активність протягом синхронних поділів бластомерів. Найбільш виражений інгібувальний вплив на Mg^{2+} -АТФ-азну активність здійснює Cd^{2+} , менш виражений – Zn^{2+} , і, найнижча інактивуюча дія характерна для Mn^{2+} .

Роботу виконано за грантом Президента України для підтримання наукових досліджень молодих учених.

1. Бойко Н.М., Целевич М.В., Санагурський Д.І. Активність Na^+ , K^+ -АТФази мембран зародків в'юна (*Misgurnus fossilis* L) за дії катіонів важких металів. **Укр. біохім. журнал**, 2004; 76(2): 59–63.
2. Костерин С.А. **Транспорт кальція в гладких м'язках**. Київ: Наукова думка, 1990. 216 с.
3. Луцик М.Д., Лукьяненко А.В., Кусень С.И. Метод массового механического удаления оболочек из зародышей вьюна. **Онтогенез**, 1983; 14(6): 386–388.
4. Мензиков С.А., Ружинская Н.Н., Мензикова О.В. Mg^{2+} -АТФ-аза в мозге рыб и ее ультраструктурная локализация. **Журнал эволюц. биохимии и физиологии**, 2000; 36(4): 263–267.
5. **Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен)**. Учеб. пособие / Под ред. М.И. Прохоровой. Ленинград: Изд-во Ленинград. ун-та, 1982. 272 с.
6. Мудра А.Є. Вміст заліза і магнію у печінці коропа за забруднення середовища солями важких металів. **Медична хімія**, 2004; 6(3): 44–47.
7. Нейфах А.А., Тимофеева М.Я. **Проблемы регуляции в молекулярной биологии развития**. Москва: Наука, 1978. 336 с.
8. Озернюк Н.Д. **Энергетический обмен в раннем онтогенезе рыб**. Москва: Наука, 1985. 175 с.
9. Целевич М.В., Фафула Р.В., Галан М.Б., Санагурський Д.І. Ідентифікація Ca^{2+} -активованої, Mg^{2+} -залежної АТФ-гідролазної ферментативної активності мікросомної фракції мембран зародків в'юна (*Misgurnus fossilis* L.). **Укр. біохім. журнал**, 2007; 79(1): 53–57.

10. Apell H.J. Structure-function relationship in P-type ATPases—a biophysical approach. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol**, 2003; 150: 1–35.
11. Beleznyay Z., Zachowski A., Devaux P. F., Ott P. Characterization of the correlation between ATP-dependent aminophospholipid translocation and Mg^{2+} -ATPase activity in red blood cell membranes. **Eur. J. Biochem**, 1997; 243: 58–65.
12. Bhatnagar V., Ramalah A. Characterization of Mg^{2+} -ATPase activity in isolated B16 murine melanoma melanosomes. **Mol. Cell. Biochem**, 1998; 189: 99–106.
13. Leong P.K., Manahan D. Metabolic importance of Na^+/K^+ -ATPase activity during sea urchin development. **J. Exp. Biol**, 1997; 200: 2881–2892.
14. Lowry O.H., Rosebrough N. G., Farr A.L., Randall R.C. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem**, 1951; 193(1): 265–275.
15. Maret W., Vallee B.L. Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters. **PNAS USA**, 1998, 31; 95(7): 3478–3482.
16. Menzikov S.A., Menzikova O.V. Effect of GABAergic compounds on the anion-sensitive Mg^{2+} -ATPase from bream (*Abramis brama* L.) brain. **Biochemistry** (Moscow), 2000, 65: 622–626.
17. Missiaen L., Wuytack F., Casteels R. Characterization of the Mg^{2+} -activated ATPase activity in smooth-muscle membranes. NADH oxidase and adenylate kinase interfere with the NADH-coupled enzyme assay. **Biochem. J**, 1988; 250: 579–588.
18. Mitsunaga-Nakatsubo K., Fujiwara A., Yasumasu L. Change in the activity of Na^+ , K^+ -ATPase in embryos on the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*, during early development. **Dev. Growth Differ**, 1992; 34: 379–385.
19. Nedeljkovic N., Nikezic G., Horvat A. et al. Properties of Mg^{2+} -ATPase rat brain synaptic plasma membranes. **Gen. Physiol. Biophys**, 1998; 17: 3–13.
20. Pecker F., Lotersztajn S. Fe^{2+} and other divalent metal ions uncouple Ca^{2+} transport from Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase in rat liver plasma membranes. **J. Biol. Chem**, 1985; 260(2): 731–735.
21. Stacey N.H., Cantilena L.R.Jr., Klaassen C.D. Cadmium toxicity and lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes. **Toxicol. Appl. Pharmacol**, 1980; 53(3): 470–480.
22. Van de Put F.H., Visser G.J., Donkers E.A. et al. Basal Mg^{2+} -dependent ATPase activity of rat liver microsomes is not influenced by ambient free Ca^{2+} . **Eur. J. Biochem**, 1993; 218: 959–962.
23. Voskoboinik I., Camakaris J., Mercer J.F. Understanding the mechanism and function of copper P-type ATPases. **Adv. Protein Chem**, 2002; 60: 123–150.
24. Yucebilgic G., Bilgin R., Tamer L., Tukul S. Effects of lead on Na^+ , K^+ -ATPase and Ca^{2+} -ATPase activities and lipid peroxidation in blood of workers. **Int. J. Toxicol**, 2003; 22(2): 95–97.
25. Zhang G.H., Yamaguchi M., Kimura S. Effect of heavy metal on rat liver microsomal Ca^{2+} -ATPase and Ca^{2+} sequestering. Relation to SH groups. **J. Biol. Chem**, 1990; 265: 2184–2189.

Одержано: 15.03.2008