

ТЕМПЕРАТУРНА ЗАЛЕЖНІСТЬ ГІДРОЛІЗУ АТФ Na^+/K^+ -АТФазою ЕМБРІОНАЛЬНИХ КЛІТИН В'ЮНА *MISGURNUS FOSSILIS* L. ЗА ВПЛИВУ He-Ne ЛАЗЕРА

М. С. Романюк, С. М. Мандзинець, М. В. Бура, Д. І. Санагурський
myroslavaromaniuk@gmail.com

Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Грушевського, 4, м. Львів, 79005, Україна

Na^+/K^+ -АТФаза — електрогенний мембранний ензим, який є мішенню для дії різноманітних фізичних та хімічних факторів середовища, механізми впливу яких на ензим недостатньо вивчені, що й обумовлює актуальність його подальшого дослідження та аналізу кінетичних параметрів.

На сьогодні вплив низькоінтенсивного лазерного випромінювання (НІЛВ) на зародкові об'єкти є не до кінця з'ясованим. Найбільш обґрунтованою є гіпотеза про те, що механізм дії НІЛВ може бути опосередкованим структурами цитоплазматичної мембрани за рахунок поглинання квантів фотоакцепторними молекулами, що призводить насамперед до активації біохімічних реакцій в клітині. Під час ферментативних реакцій відбуваються постійні динамічні перебудови комплексу протеїн-ензиму з одного конформаційного стану в інший, які можна виявити експериментально.

В експериментах, виконаних на суспензії плазматичних мембран ембріональних клітин в'юна *Misgurnus fossilis* L., яку було отримано після одноразового опромінення зародків червоним низькоінтенсивним лазером, досліджували вплив температури на активність маркерного ензиму — Na^+/K^+ -АТФази. У статті подані результати оцінювання змін температурної залежності активності ензиму за умов впливу НІЛВ тривалістю експозиції 5 хв та у контролі. Зокрема встановлено, що максимальна активність Na^+/K^+ -АТФази спостерігається за температури середовища інкубації 22–23 °C як за контролю, так і за дії НІЛВ на всіх досліджуваних стадіях розвитку зародків в'юна. Дія НІЛВ супроводжується збільшенням частки впливу фактора температури на активність ензиму і до зниження частки впливу часового фактора розвитку зародків в'юна порівняно з контролем, а також до зміни енергії активації ензиму.

Ключові слова: Na^+/K^+ -АТФаза, ПЛАЗМАТИЧНА МЕМБРАНА, ЕМБРІОНАЛЬНІ КЛІТИНИ, ЛАЗЕРНЕ ВИПРОМІНЮВАННЯ, ТЕМПЕРАТУРА

TEMPERATURE DEPENDENCE OF ATP HYDROLYSIS BY LOACH EMBRYONIC CELLS Na^+/K^+ -ATPase UNDER THE INFLUENCE OF He-Ne LASER

M. S. Romaniuk, S. M. Mandzynets, M. V. Bura, D. I. Sanagursky
myroslavaromaniuk@gmail.com

Ivan Franko National University of Lviv,
4 Hrushevskogo str., Lviv 79005, Ukraine

Na^+/K^+ -ATPase is an electrogenic membrane enzyme that is targeted by different physical and chemical factors. The mechanisms of their action on this enzyme are not fully elucidated. The determination of these mechanisms is important task which needs further research and analysis of kinetic properties.

The influence of low-intensity laser irradiation on embryo objects is currently obscure. The most reasonable hypothesis nowadays is that the mechanism of low-intensity laser irradiation is mediated with cytoplasmic membrane structures by absorbing photons molecules that primarily leads to activation of biochemical reactions in cell. During enzymatic reactions the constant dynamic adjustment of protein-enzyme complex from one conformational state to another is occurring, which can be experimentally detected.

In experiments, performed on a suspension of plasma membranes of embryo cells of loach *Misgurnus fossilis* L., which were irradiated by low-intensity irradiation red He-Ne laser once after fertilization, the influence of temperature on enzyme activity of Na^+/K^+ -ATPase was studied. The changes in temperature dependence of the activity of this enzyme at 5 min exposure of low-intensity laser irradiation and in control

conditions are evaluated in this paper. In particular, it was found that the maximum activity of Na^+/K^+ -ATPase was observed at 22–23 °C of incubation at both control and low-intensity laser irradiation at all investigated stages of loach embryos development. The action of low-intensity laser irradiation causes increasing the temperature factor in influence on the enzyme activity and reducing the time factor of loach embryos development compared to the control, and also changes activation energy for this enzyme.

Keywords: Na^+/K^+ -ATPase, PLASMA MEMBRANE, EMBRYO CELLS, LASER IRRADIATION, TEMPERATURE

ТЕМПЕРАТУРНАЯ ЗАВИСИМОСТЬ ГИДРОЛИЗА АТФ Na^+/K^+ -АТФазой ЭМБРИОНАЛЬНЫХ КЛЕТОК ВЬЮНА *MISGURNUS FOSSILIS L.* ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ He-Ne ЛАЗЕРА

М. С. Романюк, С. М. Мандзинец, М. В. Бура, Д. И. Санагурский
myroslavaromaniuk@gmail.com

Львовский национальный университет имени Ивана Франко,
ул. Грушевского, 4, г. Львов, 79005, Украина

Na^+/K^+ -АТФаза — электрогенный мембранный фермент, который является фармакологической мишенью. Механизм воздействия на него не до конца выяснен, что и обуславливает актуальность его дальнейшего исследования и анализа кинетических свойств.

На сегодня влияние низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) на зародышевые объекты являются не до конца исследованными. Наиболее обоснованной является гипотеза о том, что механизм действия НИЛИ может быть опосредованным структурами цитоплазматической мембраны за счет поглощения квантов фотоакцепторными молекулами, что прежде всего приводит к активации биохимических реакций в клетке. Во время ферментативных реакций происходят постоянные динамические перестройки комплекса протеин-фермент с одного конформационного состояния в другое, которые можно обнаружить экспериментально.

В экспериментах, выполненных на суспензии плазматических мембран клеток вьюна *Misgurnus fossilis L.*, которая была облучена красным низкоинтенсивным He-Ne лазером, исследовали кинетические характеристики маркерного фермента — Na^+/K^+ -АТФазы. В статье приведены результаты оценки температурной зависимости активности данного фермента в условиях воздействия НИЛИ красного диапазона длительностью экспозиции 5 мин как примера физического фактора. В частности, установлено, что максимальная активность Na^+/K^+ -АТФазы наблюдается при температуре среды инкубации 22–23 °C как в контроле, так и при воздействии НИЛИ на всех стадиях развития зародышей вьюна. Действие НИЛИ приводит к увеличению доли влияния фактора температуры на активность фермента и к снижению доли влияния временного фактора развития зародышей вьюна по сравнению с контролем.

Ключевые слова: Na^+/K^+ -АТФаза, ПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ МЕМБРАНА, ЭМБРИОНАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ, ЛАЗЕРНОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ, TEMPERATURE

Як відомо, маркерні ферменти, які забезпечують унікальність кожного виду біомембран, використовуються для оцінювання чистоти виділених мембранних фракцій і беруть участь у властивих цій мембрані біохімічних процесах.

Na^+/K^+ -АТРаза (натрієва помпа) — електрогенна іон-транспортувальна система плазматичної мембрани, яка здійснює енергозалежне перенесення іонів Na^+ і K^+ у співвідношенні 3:2. Вона забезпечує підтримання трансмембранного градієнта концентрацій цих катіонів,

а також створює рушійну силу для вторинного активного транспорту амінокислот і цукрів [1]. Таким чином, вивчення особливостей активності цього ферменту є актуальним з огляду на необхідність з'ясування молекулярних механізмів функціонування плазматичної мембрани за дії фізико-хімічних факторів.

Вже приблизно 15 років у клініці використовують He-Ne лазери ($\lambda=632,8$ нм) для лікування запальних і дегенеративно-дистрофічних захворювань (трофічні виразки, довго незагоювані рани, артрити тощо) [2].

Лазерне випромінювання для будь-якого живого організму є штучним подразником, що не зустрічається в звичайних умовах. За його дії в живому організмі відбувається низка структурних, функціональних і біохімічних змін [3].

Процеси, що лежать в основі взаємодії лазерного випромінювання з біооб'єктами, маловивчені і залежать від типу лазера та інтенсивності його випромінювання. Це пояснюється як новизною всього напрямку загалом, так і труднощами дослідження великої кількості різних хімічних і біологічних реакцій, які розвиваються при опроміненні біологічних структур. Окрім цього, характер дії лазерного випромінювання на живі тканини і на неживі об'єкти досить відрізняється [4].

Вважаючи плазматичну мембрану клітин першим бар'єром для зовнішніх факторів середовища, а також приймачем та перетворювачем зовнішньоклітинних сигналів, який регулює процеси життєдіяльності, важливо зрозуміти участь плазматичної мембрани та її компонентів у взаємодії з лазерним випромінюванням. Тому метою роботи є вивчення каталітичної активності Na^+/K^+ -АТФази мембран ембріональних клітин в'юна для з'ясування молекулярних механізмів функціонування цього мембранного ензиму за умов дії He-Ne лазера.

Матеріали та методи

Об'єктом досліджень були зародки в'юна (*Misgurnus fossilis* L.). Яйцеклітини одержували і запліднювали за Нейфахом [5]. Овуляцію стимулювали внутрішньом'язовим введенням самкам хоріогонічного гонадотропіну (500 од.). Ікру одержували через 36 год після стимуляції. Сім'яники отримували після декапітації та розтину черевної порожнини самців. Ікру запліднювали в чашках Петрі суспензією спермій. Через 10 хв після запліднення зиготи відмивали та інкубували за температури 20–22 °C [5].

Зародки в'юна інкубували у фізіологічному розчині Гольцфрета. В умовах досліду зародки опромінювали He-Ne лазером з довжиною хвилі 632,8 нм упродовж 5 хв одразу після запліднення і потім від-

бирали на досліджуваних стадіях їх розвитку. Зародки опромінювали за допомогою лазера (діаметр вихідної лінзи — 1,2 мм), розміщеного на відстані 20 см від пробірки, з довжиною хвилі 632,8 нм та густиною потоку $1,5 \times 10^2$ мВт/см² (Рис. 1). Спостереження за зародками здійснювали за допомогою біноклярного мікроскопа МБС-9 з фотографічною приставкою.

Для проведення біохімічних досліджень зародки відбирали через 60, 210 і 330 хв розвитку після запліднення яйцеклітин під час стадій, які відповідають першому дробленню зиготи (2 бластомери), шостому (64 бластомери) та десятому (1024 бластомери).

Мікросомну фракцію мембран зародків в'юна одержували методом диференційно-

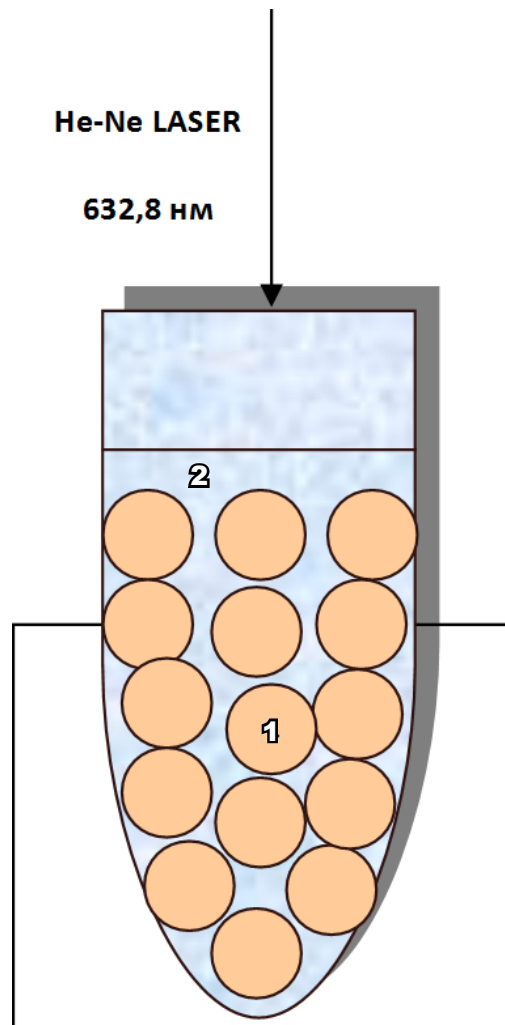


Рис. 1. Схема опромінення зародків в'юна у розчині He-Ne-лазером: 1 — зародки, 2 — пробірка з фізіологічним розчином

Fig. 1. Embryos loach irradiation scheme in solution of He-Ne-laser: 1 — embryos, 2 — tube with saline

го центрифугування у градієнті густини сахарози [6]. Збагачену фрагментами плазматичної та ретикулярної мембран надосадову рідину, одержану після 10-хвилинного центрифугування при 10000 g, зберігали за температури -20°C [6].

Активність Na^+/K^+ -АТРази (КФ 3.6.1.37) (в мкмоль P_i /год на 1 мг білка) мембран клітин на різних стадіях бластуляції оцінювали за різницею вмісту неорганічного фосфору (P_i), утвореного в середовищі інкубації за наявності та відсутності у ньому інгібітора ензиму — уабаїну, а також з урахуванням поправки на вміст у мембранному препараті ендogenous P_i . Кількість продукту реакції P_i визначали модифікованим методом Фіске-Суббароу [7], а вміст білка в мембранному препараті — методом О. Н. Lowry et al [8].

У дослідженнях використовували реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації х. ч. або закордонного виробництва: EGTA, NaN_3 («Merk», Німеччина); уабаїн («Fluka», Швейцарія); АТР («Acros», Бельгія); Tris, тапсигаргін («Sigma», США). Вірогідність різниці одержаних показників з контролем визначали за t -критерієм Стьюдента.

Результати й обговорення

Температура є одним із найбільш значущих фізичних факторів, який обумовлює варіювання функціональної активності більшості ензимів у широких межах [9]. Тому проведено оцінювання температурної залежності активності ензиму за умов впливу НІЛВ тривалістю експозиції 5 хв як прикладу фізичного фактору. При дослідженні накопичення продукту (P_i) Na^+/K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТФ за умов впливу НІЛВ температуру змінювали у діапазоні $19\div 26^{\circ}\text{C}$ (Рис. 2).

На стадії 2 бластомерів (Рис. 2а) спостерігається куполоподібна залежність активності ензиму за інкубації при значеннях температури середовища від 19 до 26°C за нормальних умов. Максимальну активність Na^+/K^+ -АТРази зародків за умов впливу НІЛВ та у контролі виявлено за температури середовища інкубації 23°C , яка становить $11,609\pm 0,867$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка ($n=9$). Для з'ясу-

вання енергії активації використовували різницю температури у 10 градусів — 15 та 25°C .

На стадії 2 бластомерів за температури середовища 15°C зміни активності Na^+/K^+ -АТРази у контролі та за дії НІЛВ є незначними, що можна пояснити тим, що в'юн належить до холонокровних тварин і активність ензимів залежить від температури довколишнього середовища, тому зміни у функціонуванні ензиму, спричинені дією НІЛВ при такій низькій температурі, не є визначальними. Однак розрахунок енергії активації ензиму у контролі та за дії НІЛВ вказує на значну різницю у поведінці ензиму, зокрема вона знижувалась наполовину ($2,612$ кДж/моль) порівняно з контролем ($4,564$ кДж/моль).

На стадії 64 бластомерів також зберігається куполоподібна залежність активності ензиму як в контролі, так і за впливу НІЛВ (Рис. 2б) у діапазоні температур $19\div 26^{\circ}\text{C}$. Максимальна активність Na^+/K^+ -АТРази зародків за нормальних умов виявлено за температури $21\div 23^{\circ}\text{C}$ — $15,91\pm 0,34$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка. За умов впливу НІЛВ встановлено вірогідне зростання активності АТФази до рівня $23,13\pm 0,57$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка ($n=9$) і вона є значно вищою, ніж активність ензиму за нормальних умов. Розрахунки енергії активації на цій стадії, навпаки, вказують на її зростання за дії НІЛВ до $7,917$ кДж/моль, а в контролі вона становить лише $5,116$ кДж/моль.

Подібна залежність активності ензиму від температури зберігається і на стадії десятого поділу (330 хв) у контролі. За дії НІЛВ активність досліджуваного ензиму вірогідно знижується на $36,5\%$ порівняно з контролем. Хоча максимальна активність, як і раніше, спостерігається за температури середовища інкубації 23°C , але становить лише $10,19\pm 0,11$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка, тоді як у контролі вона становить $15,84$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка. На відміну від попередньої досліджуваної стадії, енергія активації у контролі значно знижується і становить лише $1,704$ кДж/моль та зростає до $8,554$ кДж/моль за дії низькоінтенсивного лазерного випромінювання.

Зазвичай на організм впливає багато чинників — як зазначених вище, так і інших, які не враховуються в експериментах, тому для

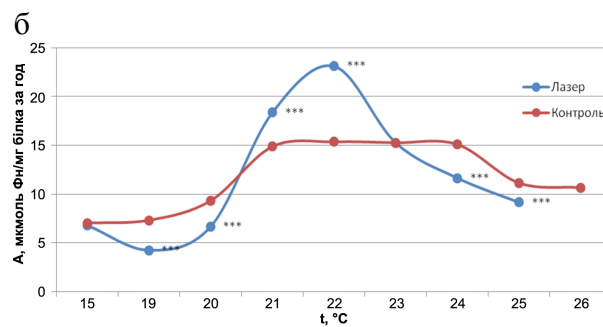
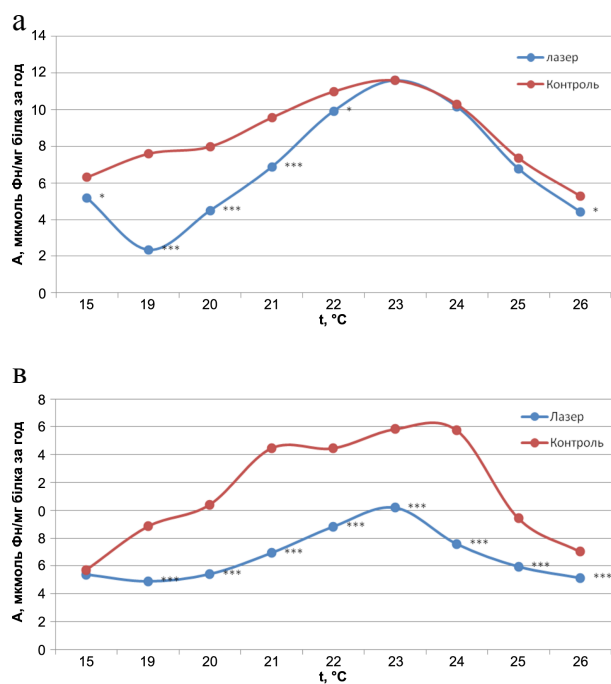


Рис. 2. Температурна залежність гідролізу АТФ Na^+/K^+ -АТФазою зародків в'юна у контролі та після опромінення НІЛВ тривалістю 5 хв на стадії 2 (а), 64 (б) бластомерів та десятого поділу (в)

Fig. 2. The temperature dependence of hydrolysis of Embryos loach Na^+/K^+ -ATPase in control and after low-intensity laser irradiation for 5 minutes in step 2 (a), 64 (b) blastomeres and tenth separation (c)

Примітка: *** — $P < 0,001$ — рівень вірогідності порівняно з контролем
Note: *** — $P < 0,001$ — significance level compared to control

виявлення їх істотного впливу використовують різні статистичні методи. Одним із адекватних способів оцінювання кожного з таких чинників (за відносними частками цієї дії на мінливість значень досліджуваного показника) та їхньої взаємодії, а також підтвердженням такого впливу є багатофакторний дисперсійний аналіз. Для з'ясування факторів, від яких залежать зміни активності Na^+/K^+ -АТФази, вважали за доцільне провести аналіз впливу двох факторів — температури середовища інкубації ензиму та тривалості розвитку зародків.

Для кількісного оцінювання та підтвердження наявності чи відсутності впливу досліджуваних чинників (різних значень температури, тривалості розвитку — фактор часу) експериментальний матеріал аналізували методом дисперсійного аналізу, який дає змогу провести адекватну оцінку результатів досліджень (Рис. 3).

З отриманих результатів видно, що після опромінення НІЛВ зародків в'юна вплив температури на активність Na^+/K^+ -АТФази значно збільшується (66,5 %) порівняно з контролем (49 %), тоді як часовий фактор втрачає свій вплив за дії лазера (24,5 %) відносно контролю (29,4 %). Вплив часу розвитку зародків в'юна на активність ензиму знижується за дії He-Ne-лазера, а температури — зростає порівняно з контролем.

Таким чином, дія НІЛВ супроводжується збільшенням частки впливу фактора температури на активність ензиму і зниженням частки впливу часового фактора розвитку зародків в'юна порівняно з контролем.

За результатами дослідження впливу температури на середовище інкубації маркерного ензиму плазматичних мембран можна припустити, що Na^+/K^+ -АТФаза може бути прямою мішенню НІЛВ, про що свідчать отримані результати інгібування досліджуваного ензиму зародків [10]. Однак за умови одноразового опромінення НІЛВ і подальшого розвит-

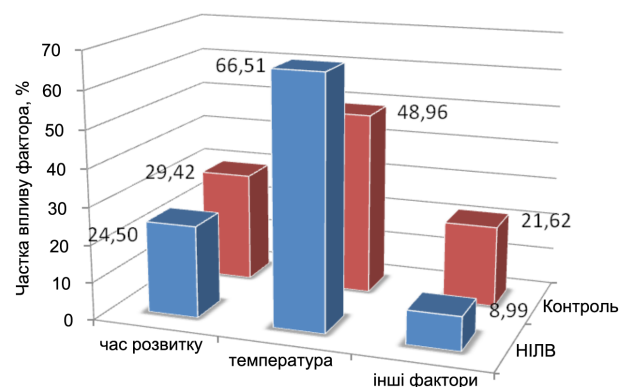


Рис. 3. Дисперсійний аналіз впливу температури та часу розвитку на активність Na^+/K^+ -АТФази зародків в'юна без НІЛВ та за його дії

Fig. 3. Analysis of variance of temperature influence and development time on activity of Na^+/K^+ -ATPase loach embryos without and with low-intensity laser irradiation

ку у зародків активуються захисні механізми, що може нівелювати пряму дію НІЛВ на ензим мембран зародків в'юна, частково стабілізуючи ензиматичну активність Na^+/K^+ -помпи (3-хвилина експозиція) [10]. Не виключено, що дія лазерного випромінювання може мати опосередкований вплив на активність Na^+/K^+ -АТФази. Зокрема відомо, що лазерне випромінювання спричиняє зміни, які за структурними ознаками свідчать про стимуляцію клітинної проліферації у клітин *Torulopsis sphaerica*, опромінених He-Ne-лазером (6 годин інкубації у поживному середовищі) [10, 11]: зменшення клітинних розмірів, кількості мітохондрій, елонгація клітин і мітохондрій, підвищення варіабельності ряду клітинних параметрів. Іншими дослідниками встановлено значне збільшення кількості мітохондрій [12], мембрани яких асоційовані (зближені) з мембранами ендоплазматичного ретикулуму, що, відповідно до сучасних уявлень, може означати активацію синтезу АТФ.

Отже, дія НІЛВ на активність Na^+/K^+ -АТФази призводить до зміни температурного оптимуму ензиму — він звужується до діапазону температур 21–23 °С, тоді як у контролі становить 21–24 °С. Також відмічено значні зміни енергії активації ензиму. Ймовірно, досліджуваний ензим є прямою мішенню дії НІЛВ, а також може змінювати свою активність через дію НІЛВ на інші клітинні процеси, які визначають активність Na^+/K^+ -АТФази у клітині.

Висновки

1. Встановлено температурний оптимум роботи Na^+/K^+ -АТФази зародків в'юна впродовж раннього ембріогенезу та його зміни за дії низькоінтенсивного випромінювання гелій-неонового лазера. Виявлено, що дія НІЛВ на активність Na^+/K^+ -АТФази призводить до зміни температурного оптимуму ензиму: він звужується до діапазону температур 21–23 °С, тоді як у контролі становить 21–24 °С, що підтверджується результатами двофакторного дисперсійного аналізу.

2. Виявлено зміни енергії активації ензиму. Ймовірно, цей ензим може як бути прямою

мішенню дії НІЛВ, так і змінювати свою активність через дію досліджуваного випромінювання на інші клітинні процеси, які мають регуляційний та визначальний вплив на активність Na^+/K^+ -АТФази у мембранах ембріональних клітин.

1. Suhail M. Na^+/K^+ -ATPase: Ubiquitous Multifunctional Transmembrane Protein and its Relevance to Various Pathophysiological Conditions. *Clin. Med. Res.*, 2010, V. 2 (1), pp. 1–17.

2. Schindl A., Merwald H. Schindl L.. Direct stimulatory effect of low-intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation. *Br. J. Dermatol.* 2003, V. 148, pp. 334–336.

3. Romaniuk M., Neofita O., Holovchak N., Dyka M., Sanahursky D. Low-level irradiation effect on membrane-related processes in loach embryo cells. *VIII Parnas conference, August 27–31, 2011, Abstracts, Acta Biochimica Polonica*, 2011, Vol. 58, Sup. 1/2011, p. 45.

4. Karu T. In Low-power laser therapy. *CRC Press*, N.Y., 2003, pp. 4825–4841.

5. Bura M., Mandzinets S., Temnik M., Sanagursky D. Development of embryos and larvae of loach *Misgurnus fossilis* L. under exposure to low-intensity helium-neon light. *Visn. Lviv. Univ., Ser. Biol.* 2010, Vol. 54, pp. 59–68. (in Ukrainian)

6. Goida O. A. Biophysical aspects of early ontogenesis of animals. Kyiv, Nauk. Dumka, 1993. (in Ukrainian)

7. Fiske C. H., Subbarow Y. The Colorimetric Determination of Phosphorus. *J. Biol. Chem.* 1925, V. 66, pp. 375–400.

8. Lowry O. H., Rosebrough N. G., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, V. 193, pp. 265–275.

9. Tsybalyuk O. V., Kosterin S. O. Thermo-mechanokinetics of viscoelastic deformation of smooth muscles in rat gastrointestinal tract III. The work of the viscoelastic stretch of antral stomach smooth muscles. *Studia Biologica*, 2013, 7 (1), pp. 21–30. (in Ukrainian)

10. Romanyuk M. S., Mandzinets S. M., Bura M. V., Sanagursky D. I. Effect of low-intensity laser radiation of varying exposure on the activity of Na^+ , K^+ -ATPase of loach embryos. *Fotobiol. Fotomed.* 2011, N. 1, pp. 76–83. (in Ukrainian)

11. Manteifel V. M., Dyachkova L. N., Karu T. I. Morphometric study of yeast cells of *Torulopsis sphaerica* after He-Ne laser irradiation. *Cytology*, 2002, N. 12, pp. 1205–1211.

12. Romaniuk M. C., Bura M. V., Mandzynets S. M., Kulachkovsky O. R., Sanagursky D. I. The Influence of low-intensity laser irradiation on the loach embryo cells. *Cytology and Genetics*, 2014, Vol. 48, N. 3, pp. 171–174.