

ТРАНСПОРТНІ ВЛАСТИВОСТІ МЕМБРАН ЗА ДІЇ ФЛУРЕНІЗИДУ ТА ЙОГО ПОХІДНИХ

Н. О. Боднарчук, М. В. Бура, Д. І. Санагурський

Львівський національний університет імені Івана Франка

*З'ясовано механізми впливу флуоренізиду на іонтранспортні системи зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L. Встановлено, що вплив флуоренізиду на зародки холоднокровних протягом ембріогенезу реалізується на мембранному рівні, а саме через інгібування Na^+ , K^+ -АТФази. Ступінь інгібувального впливу препарату залежить не тільки від концентрації флуоренізиду у середовищі інкубації, а й від стадії розвитку зародків та від структури самого флуоренізиду, що визначає його фізико-хімічні властивості.*

Розраховані значення коефіцієнтів інгібування ($I_{0,5}$) свідчать про те, що зміни Na^+ , K^+ -АТФазної активності пов'язані із різним ступенем чутливості Na^+ , K^+ -АТФази до дії флуоренізиду. Одержані результати розширюють уявлення про механізми впливу флуоренізиду на Na^+ , K^+ -помпу мембран зародкових клітин. Ці дані можуть бути використані для токсикологічної оцінки біологічно активних або фармакологічних речовин, а тому мають значення для медицини та ветеринарії.

Ключові слова: ЗАРОДКИ В'ЮНА, Na^+ , K^+ -АТФаза, ФЛУРЕНІЗИД, ЕМБРІОГЕНЕЗ, ПЕРЕКИСНЕ ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ, ТРАНСМЕМБРАННИЙ ПОТЕНЦІАЛ, ПЛАЗМАТИЧНА МЕМБРАНА, БЛАСТОМЕРИ

Біологічні мембрани відіграють важливу роль у підтриманні іонного гомеостазу клітини, беруть участь у регуляції клітинних поділів, проліферації клітини та розвитку в цілому, а також є центром морфогенетичних процесів раннього розвитку [1]. Зміни біоелектричних параметрів зародкових клітин у значній мірі залежать від стану самої мембрани та від функціонування іонтранспортних систем, таких як Na^+ , K^+ -помпа. Відомо, що Na^+ , K^+ -помпа не тільки підтримує співвідношення Na^+/K^+ у цитоплазмі, а й зумовлює підтримання рівня трансмембранного потенціалу (ТМП), а також відповідає за осмотичність бластоцелю зародків. Багатьма дослідниками встановлено, що ферментативна активність Na^+ , K^+ -помпи істотно змінюється внаслідок впливу різноманітних фізико-хімічних та біологічно активних факторів [2]. Встановлено також інгібування як Na^+ , K^+ -, так і Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаз різних об'єктів внаслідок впливу аміноглікозидних [3], фторхінолонових [1, 3–6] та полієнових антибіотиків [1, 7]. Вплив антибіотиків, зокрема флуоренізиду, не досліджувався з використанням зародкових об'єктів, що може бути критерієм для оцінки можливості подальшого використання препаратів.

Флуоренізд – препарат, синтезований в Україні, один із похідних флуорену. Завдяки наявності гідразних груп має певну структурну схожість з ізоніазидом. За даними Національного інституту фтизіатрії і пульмонології імені Ф. Г. Яновського, м. Київ МОЗ України мінімальна інгібуюча концентрація (МІК) флуоренізиду щодо лабораторних і виділених від хворих штамів мікобактерій туберкульозу (МБТ), чутливих до ізоніазиду, становить 0,04–0,15 мкг/мл на середовищах Проскауера-Бека і кров'яному та 0,08–0,3 мкг/мл на середовищі Левенштейна-Йенсена [2].

У цілому активність флуоренізиду *in vitro* значна, але поступається у два рази ізоніазиду. Штами, стійкі до інших протитуберкульозних препаратів, залишаються чутливими до флуоренізиду.

У хіміотерапії деструктивного туберкульозу легень флуоренізд може застосовуватись, у першу чергу, у хворих з вперше діагностованим туберкульозом, а також при рецидивах і загостреннях процесу, рідше – при раніше неефективно лікованому і хронічному туберкульозі, у всіх випадках при збереженні чутливості МБТ до ізоніазиду [1].

Молекулярна організація та характеристика Na^+ , K^+ -АТФази у плазматичних мембранах холоднокровних протягом ембріогенезу. β -Субодинаця представляє собою сіалоглікопротеїн з молекулярною масою 40–60 кДа [2]. Частина β -субодинаці, яка обернена в позаклітинне середовище, несе на собі ковалентно приєднані вуглеводні фрагменти [8]. Згідно з сучасними уявленнями, вона забезпечує вихід α -поліпептиду з ендоплазматичного ретикулуму (ЕПР),

його вмонтовування і правильну орієнтацію в плазматичних мембранах (ПМ), а також формування функціонально активного ферменту [9], та його антигенні властивості [8]. β -Субодинація також модифікує каталітичні характеристики Na^+ , K^+ -помпи. Експресія екзогенної мРНК β 1-субодинації (курчат, мишей і щурів) в ооцити *X. laevis* приводила до часозалежного збільшення оубаїн-зв'язуючих сайтів, як в ПМ, так і в внутрішньоклітинних мембранах [10].

Для амфібій, риб та морських їжаків характерні α 1 та β 3 ізоформи Na^+ , K^+ -АТФази [11]. Дослідження філогенетичного дерева 21 виду встановило, що α -субодинація амфібій, морських їжаків та хребетних має спільне походження (85 % гомології) [12], а дивергенція ізоферментів відбулася в процесі еволюції тварин.

Існують численні дані, які свідчать про те, що в мембрані Na^+ , K^+ -АТФаза утворює олігомерні комплекси, в склад яких входять 2 і більше протомерів $\alpha\beta$ [6], які отримані після її кристалізації [7]. Використовуючи метод зшиваючих агентів, доказано утворення олігомерних комплексів Na^+ , K^+ -АТФази за рахунок асоціації α -субодинацій [13]. Таким чином, у склад функціонуючої молекули Na^+ , K^+ -АТФази входять дві α -субодинації, а її четвертинну структуру можна представити як $(\alpha\beta)_2$.

Зміни іонного гомеостазу запускають метаболічні процеси в ядрі і цитоплазмі зигот та зародків [8, 14]. Електрофізіологічні дослідження свідчать про схожість ПМ ооцитів і диференційованих клітин, що пояснюється наявністю в них подібних структур і властивостей [15].

Центральне місце в регуляції енергетики або метаболізму клітини, в тому числі і мембранного транспорту, відводять різниці електрохімічних потенціалів диференційованих клітин [7]. Показано, що густина поверхневих зарядів впливає на активність іммобілізованих ферментів [14]. Це свідчить про можливість прямого впливу ТМП на активність мембранних білків, а також і на системи активного транспорту йонів.

При дослідженні характеру роботи Na^+ , K^+ -АТФази в зародків в'юна показано [14], що її активність змінюється протягом клітинного поділу бластомерів: вона є максимальною в інтерфазі клітинного циклу, а під час мітозу – зменшується [12, 15, 16]. Ці результати узгоджуються з даними отриманими на зародках тритона. Іншими дослідниками [1, 4, 5, 8] показано, що Na^+ , K^+ -АТФаза локалізована в новоутвореній не пігментованій ПМ.

Подібні зміни активності Na^+ , K^+ -АТФази встановлено Леонгом [4] протягом раннього розвитку зародків морських їжаків *Strongylocentrotus purpuratus* і *Litichinus pictus*. При дослідженні характеру роботи Na^+ , K^+ -АТФази на зародках морських їжаків [17], показано, що активність цього мембранного ферменту для незаплідненої яйцеклітини та при заплідненні залишається на одному рівні, а швидке збільшення активності Na^+ , K^+ -АТФази відбувається від стадії бластули до стадії ранньої гастрული. Проте активність оубаїнчутливої АТФази залишається незмінною до стадії вилуплення. Подібні зміни Na^+ , K^+ -АТФазної активності до стадії ранньої гастрული описано і для іншого виду морського їжака *Hemicentrotus pulcherrimus* [13].

Протягом раннього ембріогенезу зародків морського їжака *S. purpuratus* експериментально показано [3], що в порівнянні між загальною Na^+ , K^+ -АТФазною активністю і активністю *in vivo* в середньому лише 51 % загальної Na^+ , K^+ -АТФазної активності є фізіологічно активною. Це виявлено при додаванні в середовище монензину [4], який викликає вхід Na^+ в клітину й *in vivo* активує Na^+ , K^+ -АТФазу, внаслідок чого відновлюються іонні градієнти. У зародків морського їжака додавання в середовище інкубації монензину *in vivo* стимулювало Na^+ , K^+ -АТФазу, значення якої досягали максимуму. Різниця між загальною та *in vivo* Na^+ , K^+ -АТФазною активністю представляє фізіологічно активний резерв ферменту в зародках.

Наведені факти підтверджують думку про те, що зміни Na^+ , K^+ -АТФазної активності мембран характеризуються періодичністю і тісно пов'язані з метаболічними процесами, що відбуваються у цитоплазмі зародкових клітин.

Матеріали і методи

Методика визначення Na^+ , K^+ -активованої, Mg^{2+} -залежної АТФазної активності мембран зародків в'юна.

Перед початком експерименту аліквоти суспензії мембранного препарату переносили в стандартне середовище інкубації наступного складу (ммоль/л): NaCl –30,0; KCl –120,0; MgCl_2 –3,0; ATP-Na_2 –3,0; тріс- HCl –50,0 (рН 7,4; 21 °С). Питому активність Na^+ , K^+ -АТФази визначали за умов додавання до вказаного середовища відповідних інгібіторів: 1 мМ NaN_3 та убаїну, 0,1 мМ тапсигаргіну, а також додавали 1 мМ EGTA. Загальну АТФазну активність оцінювали за вмістом P_i у середовищі інкубації, кількість якого визначали за модифікованим методом Фіске-Суббароу [18] і виражали у мкмольх P_i /год на 1 мг білка, а вміст білка визначали за методом *O. Lowry* [7]. Na^+ , K^+ -АТФазну активність визначали за різницею між загальною АТФазною активністю та активністю в

присутності убаїну.

При дослідженні кінетики ферментативної реакції везикули зародкових клітин інкубували в середовищі інкубації протягом різних проміжків часу (0–15 хв). Для дослідження катіонної специфічності реакції Na^+ , K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного ферментативного гідролізу АТФ стосовно катіонів Mg^{2+} ізоконцентраційно замінювали MgCl_2 (3 мМ) на хлориди вищезазначених металів. У досліджувані проби додавали по 0,1 мл розчину відповідної концентрації флуореніду (у діапазоні концентрацій 0,05–15 мМ).

Як контроль на кількість ендogenous неорганічного фосфору у мембранах зародків використовували суспензію мембранного препарату у середовищі Гольфрета. Ферментативну реакцію ініціювали введенням у реакційне середовище аліквоти (10 мкл) суспензії мембранного препарату, а зупиняли додаванням 10 % ТХО.

Питому активність АТФазних систем досліджуваних клітин оцінювали за різницею вмісту неорганічного фосфату (P_i), що утворився в середовищі інкубації різного складу за наявності та відсутності фрагментів мембран з урахуванням поправки на вміст ендogenous P_i в мембранному препараті й виражали в мкмольх P_i у перерахунку на 1 мг білка за год.

Статистична обробка експериментальних даних. Статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням програмного пакета для персональних комп'ютерів *Microsoft Excel*. Визначали такі основні статистичні показники, як середнє арифметичне значення (M), стандартну похибку (m) та середнє квадратичне відхилення (σ). Достовірність змін встановлювали за t-критерієм Стьюдента [14].

Проводили двофакторний дисперсійний аналіз. Методом дисперсійного аналізу, в якому для одержання значимих результатів достатні малі обсяги вибірки [5], встановлено відносні частки впливів флуореніду у зміни активності Na^+ , K^+ -АТФази зародків в'юна.

Вихідним матеріалом були експериментальні дані впливу флуореніду на активності досліджуваних мембранних ферментів зародків. Аналіз проводили з середніми значеннями вказаного вище показника, які були виміряні одночасно з певними часовими інтервалами, як для контрольних умов, так і для дослідів з експериментальними впливами.

Для кількісної оцінки та підтвердження наявності чи відсутності впливу окремих чинників (концентрації антибіотика (фактор дози) і тривалості розвитку (фактор часу)) експериментальний матеріал обробляли методом двофакторного дисперсійного аналізу [2], який дає можливість провести адекватну експертизу отриманих результатів. Для кожного з досліджуваних катіонів металів визначали як відносні частки їхнього впливу у діапазоні концентрацій 0,05–15 мМ, так і фактора тривалості розвитку зародків (60, 150, 210, 270, 330 хв) на зміни сумарної активності Na^+ , K^+ -АТФази на тлі дії чинників, які не враховували в експерименті. Оцінювали статистичну значущість показників, рівні яких становили 0,05 та 0,01. Дисперсійний аналіз виконували за допомогою програми *Microsoft Excel*, яким оцінювали також вірогідність одержаних результатів дослідження.

Для повноти характеристики варіабельності активності Na^+ , K^+ -АТФази мембран зародків за умов дії флуореніду визначено коефіцієнти інгібування $I_{0,5}$, шляхом лінеаризації одержаних кривих доза-ефект у логарифмічних координатах [8]. Числові значення коефіцієнтів інгібування $I_{0,5}$ для досліджуваних факторів на різних стадіях розвитку визначали у точці перетину одержаних прямих з віссю абсцис.

Результати й обговорення

Зміна Na^+ , K^+ -АТФазної активності мембран зародків в'юна за умов дії флуореніду.

Згідно з даними літератури, для Na^+ , K^+ -помпи характерний складний механізм регуляції її ферментативної активності, який в більшості випадків *in vivo* відбувається на рівні біосинтезу, тобто підвищення інтенсивності експресії молекул ферменту з пропорційним їх вмонтуванням у ПМ клітин. Показано, що Na^+ , K^+ -АТФазна активність базолатеральних клітин нирок щурів [7] та проксимальних каналців людини [8] інгібується аміноглікозидними антибіотиками, полієнові антибіотики інактивують Na^+ , K^+ -; Ca^{2+} , Mg^{2+} -; Mg^{2+} -АТФази ПМ еритроцитів [2, 12] та мікосомальної фракції нирок собак [1], антибіотики фторхінолонового ряду інгібують Na^+ , K^+ -АТФазу зародків в'юна протягом раннього ембріогенезу [2, 3, 7, 14], природні токсини та поліміксин В інгібують Na^+ , K^+ -АТФазу мембран синапсом [14]. Проте вплив антибіотиків майже не досліджувався з використанням зародкових об'єктів, що може бути прогностичним показником подальшого використання препаратів. Враховуючи це, для з'ясування механізмів впливу антибіотиків фторхінолонового ряду на еукаріотичні клітини, доцільно провести дослідження впливу фторхінолонів на функціонування Na^+ , K^+ -помпи зародків в'юна на різних стадіях раннього розвитку.

Результати вимірювання активності Na^+ , K^+ -активованої, Mg^{2+} -залежної АТФази під впливом флуренізиду та в контролі представлені у вигляді діаграм (рис. 1–5), які відображають значення активності Na^+ , K^+ -АТФази (у мкмоль P_i /год на 1 мг білка) на різних стадіях розвитку зародків протягом періоду дроблення бластомерів в'юна.

У результаті проведених досліджень встановлено, що вплив флуренізиду в діапазоні концентрацій 0,05–15 мМ на функціонування Na^+ , K^+ АТФази веде до залежних від концентрації препарату змін активності цього ферменту протягом раннього розвитку зародків.

На стадії першого поділу (2 бластомери, 60 хв, рис. 1) оубаїнчутлива АТФаза активність мембран зародків в'юна при дії флуренізиду у концентрації 0,05 мМ змінювалась незначно – зниження активності мембранного ферменту у порівнянні з контролем становить $1,8 \pm 0,08$ %, $p \geq 0,5$ і становила $11,4 \pm 0,49$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка. При збільшенні концентрації антибіотику у середовищі інкубації в діапазоні концентрацій 0,1–5 мМ спостерігається дозозалежне пригнічення активності Na^+ , K^+ -АТФази до рівня $7,91 \pm 0,38$ (0,1 мМ); $6,24 \pm 0,47$ (1 мМ); $4,94 \pm 0,38$ (5 мМ) мкмоль P_i /год на 1 мг білка, що становить $31,87 \pm 1,53$ %, $46,23 \pm 3,48$ %, $57,41 \pm 4,39$ % у порівнянні з контролем відповідно.

Максимальне пригнічення АТФазної активності зародків спостерігається за дії 15 мМ флуренізиду. У цьому випадку остання становить $2,49 \pm 0,19$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка, що відповідає зниженню активності ферменту на $78,52 \pm 6,02$ % у порівнянні з контролем.

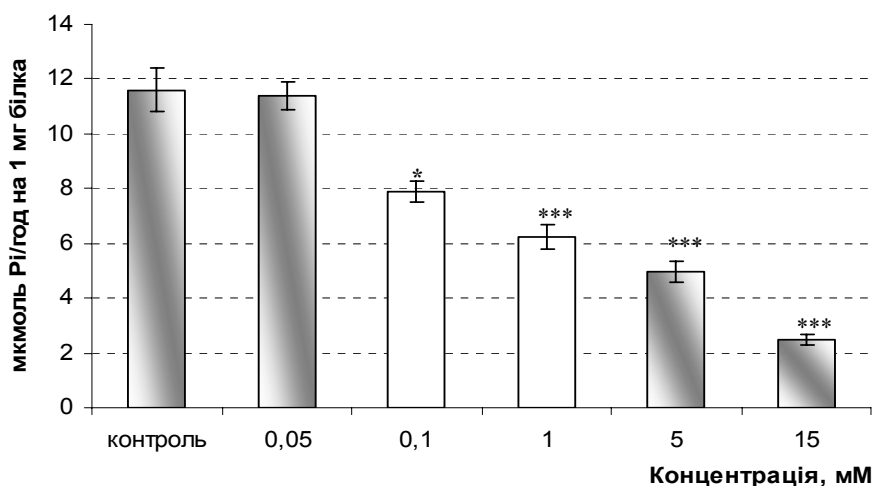


Рис. 1. Активність Na^+ , K^+ -АТФази зародків в'юна на стадії 2 бластомерів у контролі та за умов впливу флуренізиду в концентраціях 0,05–15 мМ: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ порівняно з контролем

На стадії розвитку 16 бластомерів (рис. 2) за умов впливу флуренізиду у мінімальній з досліджуваних концентрацій (0,05 мМ) відмічено недостовірне зниження рівня ферментативної активності Na^+ , K^+ -помпи мембран зародків в'юна до $11,42 \pm 0,39$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка, що відповідає $86,3 \pm 0,39$ % активності у контролі. Збільшення концентрації препарату до 0,1 мМ веде до подальшого незначного зниження активності Na^+ , K^+ -АТФази у порівнянні із попередніми концентраціями на $23,29 \pm 0,73$ % (0,1 мМ), яка становить $10,64 \pm 0,33$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка. За умов впливу 1 і 5 мМ препарату спостерігається також достовірне (рис. 2) значне зниження Na^+ , K^+ -АТФазної активності зародків у середньому на $69,8 \pm 3,41$ % у порівнянні з контролем. У випадку дії флуренізиду в найбільшій з досліджуваних концентрацій (15 мМ) спостерігається максимальне зниження активності досліджуваного мембранного ферменту до $0,92 \pm 0,08$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка, що відповідає $6,65 \pm 7,46$ % активності у контролі.

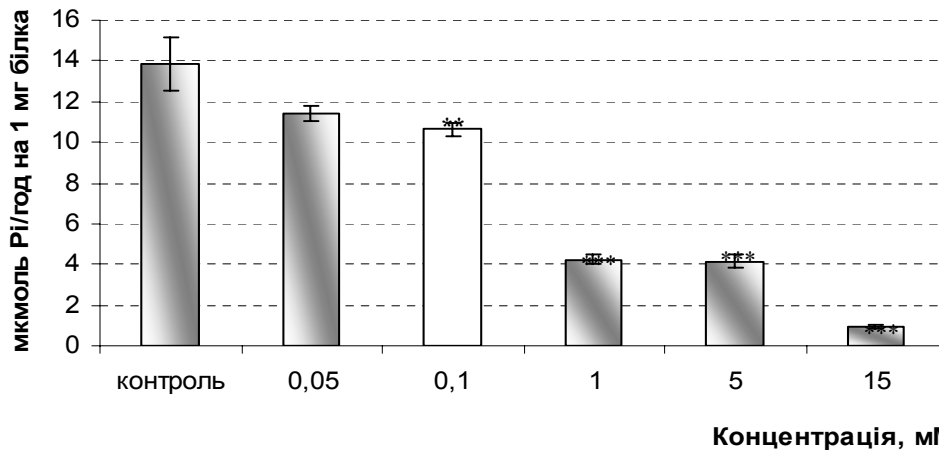


Рис. 2. Активність Na^+ , K^+ -АТФази зародків в'юна на стадії 16 бластомерів у контролі та за умов впливу флуренізиду в концентраціях 0,05÷15 мМ.

На стадії розвитку 64 бластомери (рис. 3) за умов впливу флуренізиду у концентраціях 0,05 та 0,1 мМ не виявлено достовірного зниження рівня АТФазної активності мембран зародків в'юна. При дії 0,1 мМ флуренізиду активність Na^+ , K^+ -АТФази зародків становить $13,5 \pm 0,61$ мкмоль $\text{P}_i/\text{год}$ на 1 мг білка. Подальше збільшення концентрації в середовищі інкубації флуренізиду приводить до більш виражених змін у функціонуванні досліджуваного ферменту.

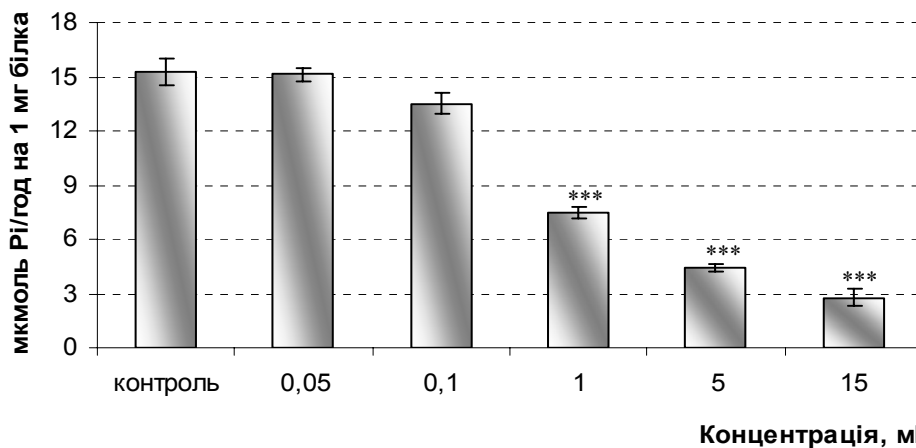


Рис. 3. Активність Na^+ , K^+ -АТФази зародків в'юна на стадії 64 бластомерів у контролі та за умов впливу флуренізиду в концентраціях 0,05÷15 мМ.

Так, при дії флуренізиду у концентрації 1 мМ відмічено зниження активності Na^+ , K^+ -АТФази на $51,04 \pm 2,21$ %, яка становить $7,48 \pm 0,32$ мкмоль $\text{P}_i/\text{год}$ на 1 мг білка. При наявності у середовищі інкубації флуренізиду у концентрації 5 мМ зниження активності Na^+ , K^+ АТФази у порівнянні з контролем становить $71,10 \pm 3,04$ % ($4,41 \pm 0,19$ мкмоль $\text{P}_i/\text{год}$ на 1 мг білка). Максимально виражений вплив на функціонування Na^+ , K^+ -АТФази відмічено при дії флуренізиду у концентрації 15 мМ, зниження активності ферменту у порівнянні з контролем складає $81,74 \pm 15,30$ %, яка становить $2,79 \pm 0,52$ мкмоль $\text{P}_i/\text{год}$ на 1 мг білка.

На стадії розвитку 8-го поділу (рис. 4) оубаїнчутлива АТФазна активність мембран зародків в'юна при дії 0,05 мМ флуренізиду також змінювалась незначно – зниження активності Na^+ , K^+ -АТФази у порівнянні з контролем становить було недовірним.

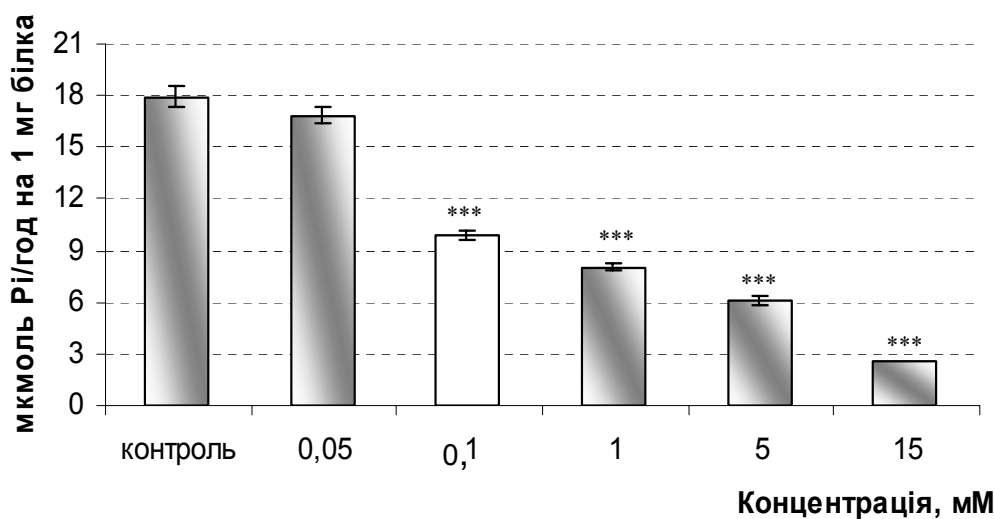


Рис. 4. Активність Na^+ , K^+ -АТФази зародків в'юна на стадії 8 поділу бластомерів у контролі та за умов впливу флуренізиду в концентраціях 0,05÷15 мМ.

При збільшенні концентрації флуренізиду у середовищі інкубації в діапазоні 0,1–5 мМ спостерігається поступове пригнічення активності Na^+ , K^+ - АТФази до рівня $9,91 \pm 0,31$ (0,1 мМ); $8,01 \pm 0,21$ (1 мМ); $6,12 \pm 0,23$ (5 мМ) мкмоль P_i /год на 1 мг білка, що становить 50,0±1,57 %, 40,43±1,54 %, 30,86±2,56 % активності у контролі відповідно. Максимальне інгібування АТФазної активності спостерігається за дії флуренізиду у концентрації 15 мМ. У цьому випадку вона знижується на спостерігається за дії флуренізиду у концентрації 15 мМ. У цьому випадку вона знижується на 87,03±6,5 % і становить $2,57 \pm 0,19$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка у порівнянні з контролем $87,03 \pm 6,5\%$.

На стадії розвитку 10-го поділу (рис. 5) спостерігається подібний характер змін Na^+ , K^+ -АТФазної активності як і на стадії розвитку 8-го поділу. За наявності флуренізиду у середовищі інкубації у найнижчій з досліджуваних концентрацій (0,05 мМ) спостерігаються недостовірні зміни активності Na^+ , K^+ -АТФази – зниження активності ферменту у порівнянні з контролем становить $18,89 \pm 0,87$ %, яка складає $12,84 \pm 0,6$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка.

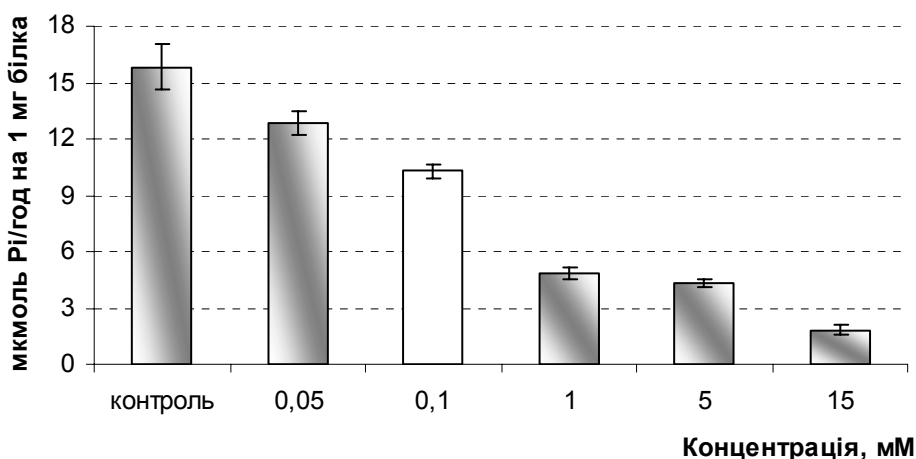


Рис. 5. Активність Na^+ , K^+ -АТФази зародків в'юна на стадії 10 поділу бластомерів у контролі та за умов впливу флуренізиду в концентраціях 0,05÷15 мМ.

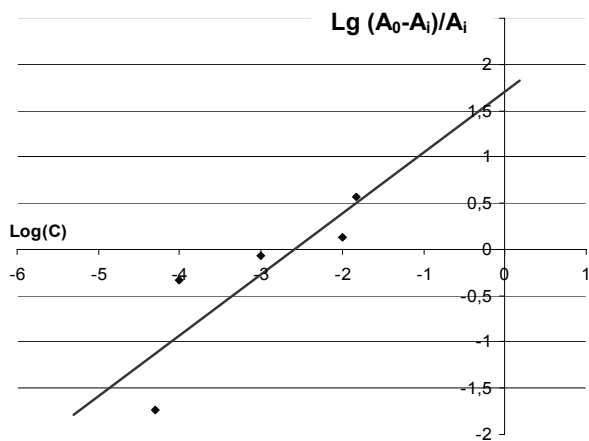
Поступове зростання концентрації флуренізиду в середовищі інкубації веде також до дозозалежного пригнічення активності досліджуваного мембранного ферменту, як і на попередніх досліджуваних стадіях розвитку зародків в'юна. Так, при дії флуренізиду у концентрації 0,1 мМ активність Na^+ , K^+ - АТФази становить $10,30 \pm 0,36$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка (зниження активності у порівнянні з контролем $34,93 \pm 1,21$ %); при дії 1 мМ на— $4,86 \pm 0,29$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка (зниження активності у порівнянні з контролем $69,31 \pm 4,15$ %); при дії 5 мМ – $4,32 \pm 0,17$ мкмоль P_i /год

на 1 мг білка (зниження у порівнянні з контролем на $72,69 \pm 2,93$ %). Однак, на відміну від попередніх стадій розвитку зародків в'юна, при дії флуренізиду у концентрації 15 мМ спостерігається найбільш виражений вплив на функціонування Na^+ , K^+ -АТФази – зниження активності у порівнянні з контролем становить $88,45 \pm 14,58$ % ($1,83 \pm 0,30$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка).

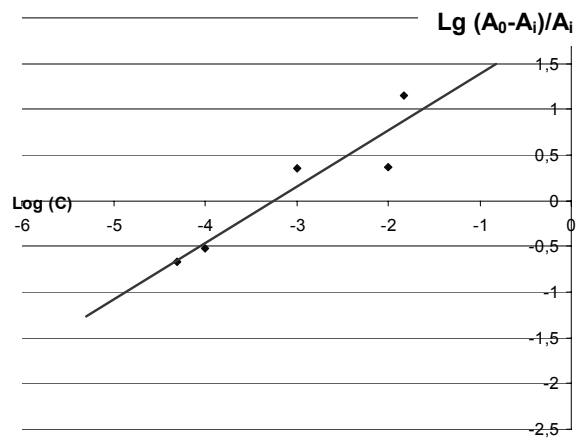
Загалом можна сказати, що антибіотик флуренізид у концентраціях $0,05 \div 15$ мМ дозозалежно пригнічує ферментативну активність Na^+ , K^+ -помпи мембран зародків. Причому, зменшення активності мембранного ферменту було найбільш вираженим на пізніх стадіях ембріогенезу (8 та 10 поділи бластомерів). На всіх досліджуваних стадіях найсуттєвіші зміни активності оубабічутливої АТФази спостерігалися при додаванні в середовище інкубації антибіотику у концентраціях $1 \div 15$ мМ.

Отже, Na^+ , K^+ -АТФази зародків в'юна властива висока чутливість до флуренізиду. Крім того, показано, що дія антибіотиків проходить ймовірно на мембранному рівні, оскільки отримані результати подібні до змін активності Na^+ , K^+ -АТФази зародків за умов впливу фторхінолонів [2, 3, 7, 14].

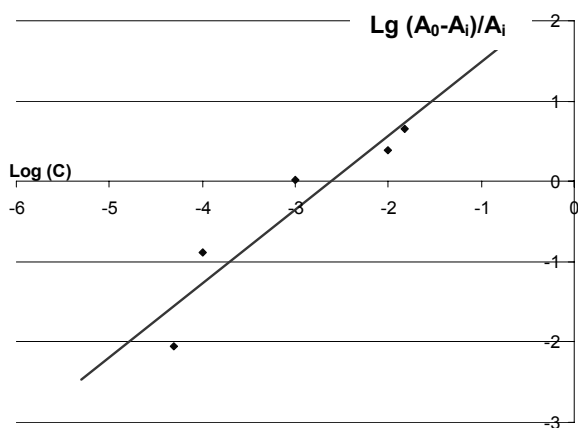
Для більш повної характеристики варіабельності активності Na^+ , K^+ -АТФази мембран зародків в'юна за умов дії флуренізиду визначено коефіцієнти інгібування ($I_{0,5}$), шляхом лінеаризації одержаних кривих доза-ефект у логарифмічних координатах. Числові значення коефіцієнтів інгібування $I_{0,5}$ для досліджуваного фактора на різних стадіях розвитку визначали у точці перетину одержаних прямих з віссю абсцис (рис. 6). Порівняльний аналіз інгібувального впливу флуренізиду на Na^+ , K^+ -АТФазну активність мембран зародків в'юна на різних стадіях раннього ембріогенезу проводили на основі коефіцієнтів інгібування, які визначали описаним вище методом.



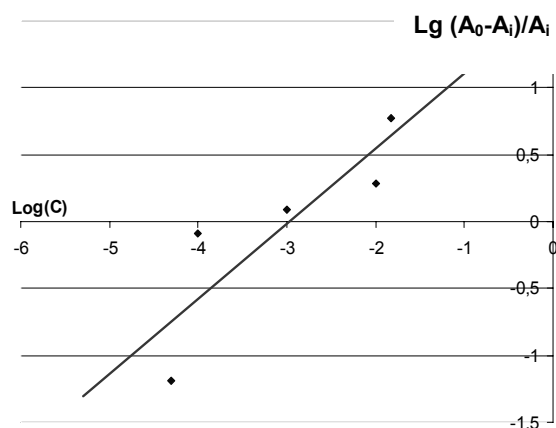
a



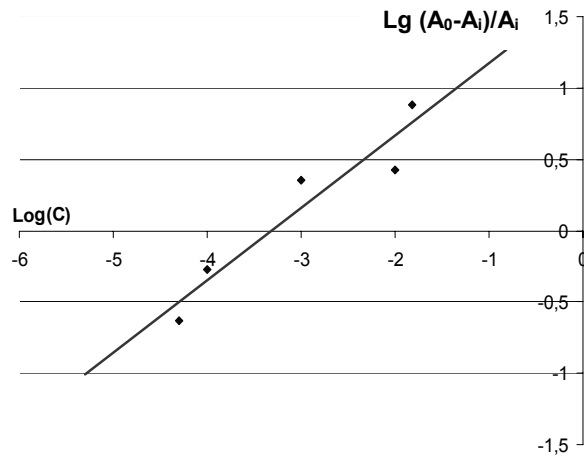
б



в



з



д

Рис. 6. Лінеаризовані криві інгібування флуренізидом Na^+ , K^+ -АТФази зародків в'юна на стадіях 2 (а), 16 (б), 64 (в) та 8 (г) та 10 поділів бластомерів (д) у системі Хілла.

Отже, флуренізид зумовлював значні зміни ферментативної активності Na^+ , K^+ -помпи зародків в'юна, а його інгібувальний ефект посилювався на більш пізніх стадіях розвитку. Про високу чутливість Na^+ , K^+ -АТФази до дії антибіотика флуренізиду протягом синхронних поділів бластомерів свідчать також значення $I_{0,5}$.

Найнижчі значення коефіцієнтів інгібування $I_{0,5}$, тобто найвищий ступінь інгібування активності досліджуваного ферменту флуренізидом характерні на стадіях розвитку 16 бластомерів та 10-го поділу бластомерів – $5,64 \times 10^{-4}$ М $4,74 \times 10^{-4}$ М відповідно.

На стадії 8-го поділу бластомерів антибіотик характеризується найнижчим ступенем інгібувального впливу. Коефіцієнт інгібування $I_{0,5}$ для флуренізиду становить $10,53 \times 10^{-3}$ М. Найменш виражений інактивуєчий вплив флуренізиду на функціонування Na^+ , K^+ -АТФази встановлено на стадіях 2 і 64 бластомерів. На стадії 2 бластомерів коефіцієнт інгібування $I_{0,5}$ досліджуваного ферменту флуренізидом становить $2,58 \times 10^{-3}$ М. Тоді як на стадії 64 бластомерів відмічено нижчу спорідненість Na^+ , K^+ -АТФази до флуренізиду – $I_{0,5}$ становить $2,41 \times 10^{-3}$ М.

Згідно з отриманими результатами, можна зробити висновок, що на різних етапах розвитку зародків в'юна спорідненість Na^+ , K^+ -АТФази до дії флуренізиду варіює. Значення $I_{0,5}$ показують, що чутливість оубаїнчутливої Na^+ , K^+ -АТФази мембран зародків в'юна до дії флуренізиду змінюється від ранніх стадій дроблення бластомерів до пізніх. Найнижча чутливість ферменту до дії флуренізиду на 8 поділу бластомерів, дещо нижча на стадії 2 бластомерів та на стадії 64 бластомерів, і на порядок вища на стадіях розвитку 16 бластомерів та 10 поділу бластомерів.

Отже, ступінь інгібувального впливу флуренізиду залежить не лише від концентрації препарату в середовищі інкубації, а й від стадії розвитку зародка та від структури самого флуренізиду, що визначає його фізико-хімічні властивості. Значення коефіцієнтів інгібування $I_{0,5}$ свідчать про те, що зміни Na^+ , K^+ -АТФазної активності пов'язані із різним ступенем чутливості даної АТФази до дії флуренізиду.

Висновки

1. Кінетика Na^+ , K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТФ, каналізованого везикулами мікосомальної фракції мембран зародків на досліджуваних стадіях розвитку зародків (крім стадії 10-го поділу бластомерів) узгоджується із закономірностями реакції першого порядку.
2. Флуренізид у діапазоні концентрацій 0,05–15 мМ дозозалежно інгібує оубаїнчутливу АТФазу зародкових мембран на різних стадіях розвитку зародків у порівнянні з контролем. Ступінь його інгібувального впливу залежить від стадії розвитку зародка та структури самого флуренізиду, що визначає його фізико-хімічні властивості.
3. Значення коефіцієнтів інгібування $I_{0,5}$ свідчать про те, що зміни Na^+ , K^+ -АТФазної активності пов'язані з різним ступенем чутливості даної АТФази до дії флуренізиду.
4. Зародки в'юна *Misgurnus fossilis* L. на стадіях синхронних поділів бластомерів є зручною та адекватною тест-системою для дослідження впливу фармакологічних та хімічних чинників на живі організми.

Перспективи подальших досліджень. Продовжити дослідження флуренизиду, зокрема провести дисперсійний аналіз впливу препарату на зміни активності Na^+ , K^+ -АТФази зародків в'юна за дії різної концентрації та на різних стадіях розвитку.

N. O. Bodnarchuk, M. V. Bura, D. I. Sanagursky

TRANSPORT PROPERTIES OF MEMBRANES FOR FLURENISID AND IT'S DERIVATIVES

S u m m a r y

The mechanisms of Flurenisid influence on ion transport systems of loach *Misgurnus fossilis* L. embryos were discovered. It was revealed that flurenisid influence on embryos of cold blood animals during embryogenesis is accomplished at membrane level, namely through inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase. The degree of inhibiting effect of the drug depends not only on flurenisid concentration in the incubation medium, but also on the stage of embryo development and the flurenisid structure, which determines its physical and chemical properties.

The calculated values of inhibition ($I_{0,5}$) suggest that change of Na^+ , K^+ -ATPase activity is associated with different degrees of sensitivity of Na^+ , K^+ -ATPase to flurenisid action. The obtained results extend understanding of the mechanisms of flurenisid action on Na^+ , K^+ -pump membranes of embryonic cells. These data can be used for toxicological evaluation of bioactive or pharmacological substances, and therefore have value for human and veterinary medicine.

Н. А. Боднарчук, М. В. Бурая, Д. И. Санагурський

ТРАНСПОРТНЫЕ СВОЙСТВА МЕМБРАН ПОД ДЕЙСТВИЕМ ФЛУРЕНИЗИДА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ

А н н о т а ц и я

Выяснены механизмы влияния Флуренизида на ионтранспортные системы зародышей вьюна *Misgurnus fossilis* L. Установлено, что влияние Флуренизида на зародыши холоднокровных в течении эмбриогенеза реализуется на мембранном уровне, а именно через ингибирование Na^+ , K^+ -АТФазы. Степень ингибиторного влияния препарата зависит не только от концентрации Флуренизида в среде инкубации, но и от стадии развития зародышей и от структуры самого Флуренизида, что определяет его физико-химические свойства.

Рассчитанные значения коэффициентов ингибирования ($I_{0,5}$) свидетельствуют о том, что изменения Na^+ , K^+ -АТФазной активности связаны с разной степенью чувствительности Na^+ , K^+ -АТФазы к действию Флуренизида. Полученные результаты расширяют представления о механизмах влияния Флуренизид на Na^+ , K^+ -насос мембран клеток зародышей. Эти данные могут быть использованы для токсикологической оценки биологически активных или фармакологических веществ, а потому имеют значение для медицины и ветеринарии.

1. Луцик М. Д. Очистка и частичная характеристика плазматических мембран клеток зародышей в'юна / М. Д. Луцик, С. И. Кусень, А. В. Лук'яненко // Онтогенез. – 1986. – Т. 17, № 3. – С. 314–321.
2. Целевич М. В. Na^+ , K^+ -АТФ-азна активність мембран зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L. при дії антибіотиків / М. В. Целевич, С. М. Мандзинець, Д. І. Санагурський // Фізіологічний журнал. – 2004. – Т. 50, № 5. – С. 64–68.
3. Озернюк Н. Д. Энергетический обмен в раннем онтогенезе рыб / Н. Д. Озернюк. – М. : Наука, 1985. – 175 с.
4. Медына И. Р. Механочувствительные калиевые каналы – один из факторов колебаний потенциала покоя в раннем эмбриогенезе вьюна / И. Р. Медына, Е. А. Гойда, П. Д. Брежестовский // Биол. мембраны. – 1988. – Т. 5, № 9. – С. 960–969.
5. Мукалов И. О. Перекисное окисление липидов на раннем эмбриогенезе вьюна / И. О. Мукалов, Е. А. Гойда, С. И. Кусень и др. // Биофизика. – 1984. – Т. 29, №1. – С. 60–64.
6. Нейфах А. А. Молекулярная биология процессов развития / А. А. Нейфах. – М. : Наука, 1977. – 311 с.
7. Ротт Н. Н. Клеточные циклы в раннем эмбриональном развитии / Н. Н. Ротт. – М. : Наука, 1987. – 207 с.

8. *Лопина О. Д.* Na, K-АТФаза: структура, механизм и регуляция активности / О. Д. Лопина // Биологические мембраны. – 1999. – Т. 16, № 6. – С. 584–603.
9. *Гойда Е. А.* Характеристики электрофизиологических параметров мембран эмбриональных клеток вьюна при ингибировании Na⁺, K⁺-АТФ-азы / Е. А. Гойда, И. Р. Медына, Д. И. Санагурский и др. // Онтогенез. – 1989. – Т. 20, № 2. – С. 164–170.
10. *Антонов В. Ф.* Мембранный транспорт / В. Ф. Антонов // Совр. обр. жур. Биология. – 1997. – № 4. – С. 2–9.
11. *Божкова В. П.* Исследование электрической связи между клетками зародышей вьюна на ранних стадиях развития / В. П. Божкова, С. А. Ковалев, Л. М. Чайлахян, Э. Н. Шилинская // Онтогенез. – 1971. – Т. 3, № 5. – С. 512–516.
12. Комитет по медицинской и микробиологической промышленности Украины. Фармакопейный комитет. Временная Фармакопейная Статья. 30.12.1999 г.
13. *Гойда О. А.* Биофизические аспекты раннего онтогенеза животных / О. А. Гойда. – К. : Наук. думка, 1993. – 224 с.
14. *Целевич М. В.* Інгібувальний вплив фторхінолонів на Na⁺, K⁺-АТФазну активність зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L. / М. В. Целевич, Н. М. Бойко та ін. // Вісник ЛУ. – 2004. – 35. – С. 40–46. – (Сер. Біол.).
15. *Курський М. О.* Біомембранологія / М. О. Курський, Т. П. Кучеренко. – К., 1993. – С. 56–72.
16. *Кравцов А. В.* Регуляция Na, K-АТФазы: эффекты ионов Mg и Ca / А. В. Кравцов, В. В. Кравцова // Укр. біохім. журнал. – 2001. – Т. 73, № 2. – С. 5–27.
17. *Бойко Н. М.* Активність Na⁺, K⁺-АТФази мембран зародків в'юна (*Misgurnus fossilis*) за дій катіонів важких металів / Н. М. Бойко, М. В. Целевич, Д. І. Санагурський // Укр. біохім. журн. – 2004. – Т. 76, №2. – С. 59–63.
18. *Костомарова А. А.* Вьюн *Misgurnus fossilis* / А. А. Костомарова // Объекты биологии развития. – М. : Наука, 1975. – С. 308–323. 8

Рецензент: доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент НАН України Інституту біології клітини НАН України Р. С. Стойка.