

УДК 591.31:576.32/36

ЧАСОВІ СПІВВІДНОШЕННЯ ДИНАМІКИ МЕТАБОЛІЧНИХ І БІОЕЛЕКТРИЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК РАНЬОГО ЕМБРІОГЕНЕЗУ В'ЮНА ТА ШПОРЦЕВОЇ ЖАБИ

Л. Івашків, Р. Гумецький, Д. Санагурський

*Львівський національний університет імені І.Франка,
вул. Грушевського, 4, м. Львів 79005, Україна,
e-mail: biolog@franko.lviv.ua*

Виявлено аналогії у часових причинно-наслідкових співвідношеннях між динамікою енергетичного метаболізму та процесами клітинного електрогенезу, між регуляцією йонного гомеостазу, процесами, що зумовлюють зміни вмісту K^+ і відношення вмісту K^+/Na^+ у зародках та змінами поляризації зародкових мембран. На кількагодинному часовому інтервалі дослідження визначено також відмінності в часових співвідношеннях між змінами рН цитоплазми та змінами біоелектричних показників цих об'єктів. Проаналізовано періодичність часових змін усіх показників і з'ясовано, що тривалість мітотичного циклу на початкових стадіях дроблення відповідає коливанням трансмембранного потенціалу, концентрації цитозольного Ca^{2+} , швидкості поглинання кисню та рН цитоплазми у в'юна, а також трансмембранного потенціалу та концентрації цитозольного Ca^{2+} у шпорцевої жаби.

Ключові слова: в'юн, шпорцева жаба, дроблення, фізико-хімічні показники, часова динаміка, періодограми, крос-кореляції.

Розкриття складних механізмів регуляції клітинного поділу на різних рівнях біологічної організації – важливий напрям досліджень сучасної ембріології [6, 11, 18-21, 26]. Вважають, що процеси саморегуляції біосистем, їхнє виживання та розвиток в значній мірі зумовлені коливаннями морфологічних параметрів; зокрема, часово-просторова організація морфогенезу завжди ґрунтується на хвильових явищах, що є проявом діяльності внутрішньоклітинних осциляторів [9].

Досі питання про механізми близькогодинних коливань не з'ясоване [3, 16]. Відомо, що клітинний поділ у період синхронних дроблень бластомерів супроводжують коливання біофізичних [5, 8] та метаболічних [17, 19, 22] характеристик розвитку зародків тварин. Періоди більшості з них є стійкими та збігаються з тривалістю мітотичних циклів [5, 17, 26]. Блокування поділу різними факторами не припиняє ритмічних коливань мембранного потенціалу спокою у в'юна [7], цитозольного Ca^{2+} у шпорцевої жаби [23], морського їжака [26], метаболізму тіолів та інших метаболічних процесів [17]. Отже, визначальним фактором регуляції коливної

динаміки цих процесів є не клітинний поділ, а навпаки – вони немов би підпорядковуються ритму так званого біологічного годинника.

Нашим завданням було дослідити взаємозв'язки у часових змінах фізико-хімічних характеристик розвитку зародків амфібій та риб під час дроблення. Коливні зміни окремих показників оцінено з використанням спектрального аналізу. Дослідження часових співвідношень між біоелектричними та метаболічними процесами виконано з використанням крос-кореляційного аналізу з часовими зсувами, який дає змогу не лише виявити зв'язки між параметрами, що характеризують ці процеси, а й порушує питання про можливість існування причинно-наслідкових залежностей. Для вивчення взято значення інтегрально-визначальних функціональних параметрів зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L. та шпорцевої жаби *Xenopus laevis* D.

Вихідний матеріал аналізу – експериментальні дані різних авторів про зміни у часі фізико-хімічних показників розвитку зародків, а саме: трансмембранного потенціалу (ТМП) [5, 22], рН цитоплазми (рН_ц) [5, 22], вмісту йонів K⁺, Na⁺ у зародку [1, 25], співвідношення вмісту K⁺/Na⁺ у зародку [1, 25], швидкості поглинання кисню (ШПК) [5], швидкості виділення вуглекислого газу (ШВВ) [27] та концентрації йонізованого цитозольного кальцію [15, 24].

Графічні дані переведено у цифрові за допомогою пакета програм GRAPH DIGITIZER. Оскільки значення показників реєстрували у різні проміжки часу протягом дроблення тварин, то попередньо їх проквантовано за однаковими часовими інтервалами. Одержані ряди динаміки, у яких значення показників послідовно впорядковані в часі, досліджували за допомогою пакета програм STATGRAPHICS.

Візуально динаміку ТМП, рН_ц, ШПК та концентрації Ca²⁺ характеризують короткотривалі коливання порівняно довготриваліших змін. Тому насамперед ці ряди розкладено на адитивні компоненти – часовий тренд та коливний процес, які надалі досліджували окремо. Періодичність та інтенсивність (потужність) коливних компонент названих вище показників оцінено на підставі спектрального аналізу, внаслідок якого одержано їхні періодограми.

Виконано аналіз крос-кореляцій між показниками, за яким одержано 18 та 20 корелограм для в'юна та шпорцевої жаби відповідно. Корелограма – це послідовність значень коефіцієнтів кореляції, визначених за різночасових зсувів одного з рядів щодо іншого. Крок зсуву, як і інтервал часу між двома сусідніми вимірюваннями показника, вибрано п'ятихвилинним. Лише для шпорцевої жаби в разі аналізу кореляцій [Ca²⁺] з іншими часовими рядами зсув задано двоххвилинним, оскільки інтервал вимірювання значень цього показника був коротким.

Достовірність одержаних результатів визначено за таблицею граничних значень коефіцієнтів кореляції, які гарантують заданий рівень значимості ($p < 0,05$), залежно від обсягу сукупності [10].

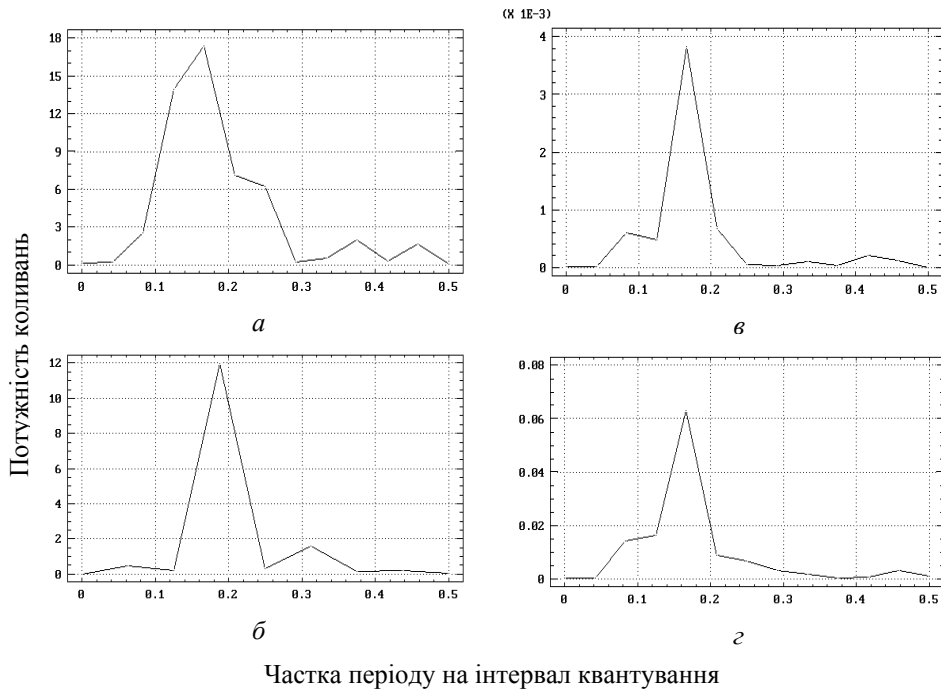


Рис. 1. Періодограми фізико-хімічних показників розвитку зародків в'юна:
 а – трансмембранного потенціалу; б – цитозольної $[Ca^{2+}]$; в – pH_c ;
 г – швидкості поглинання кисню.

Знак зсуву, якому відповідають достовірні значення коефіцієнта кореляції, свідчить про те, який з рядів є випереджальним, а значення зсуву – про час випередження, що може відображати причинно-наслідковий зв'язок. Важко визначити характер зв'язку, коли є від'ємне та додатне значення коефіцієнтів кореляції в разі різних зсувів. Такий двонаправлений зв'язок можна інтерпретувати двояко: або один з рядів випереджає інший, або обидва ряди незалежні та їм властиві коливання з певним періодом.

На рис. 1 і 2 показано результати спектрального аналізу динаміки фізико-хімічних показників розвитку в'юна та шпорцевої жаби у вигляді періодограм. У в'юна на періодограмах динаміки ТМП, ШПК та pH_c максимальний пік потужності коливань припадає на 0,16, що відповідає періоду приблизно 31 хв, а для змін концентрації Ca^{2+} пік потужності відповідає періоду 27 хв. Аналогічно у шпорцевої жаби (рис. 2) на періодограмах динаміки ТМП та концентрації Ca^{2+} пік потужності припадає на 0,24, що відповідає періоду приблизно 21 хв. Широка основа піка на періодограмах деяких показників засвідчує значну варіабельність тривалості окремих періодів, близьких до визначеного. За спектральними піками на періодограмах показники

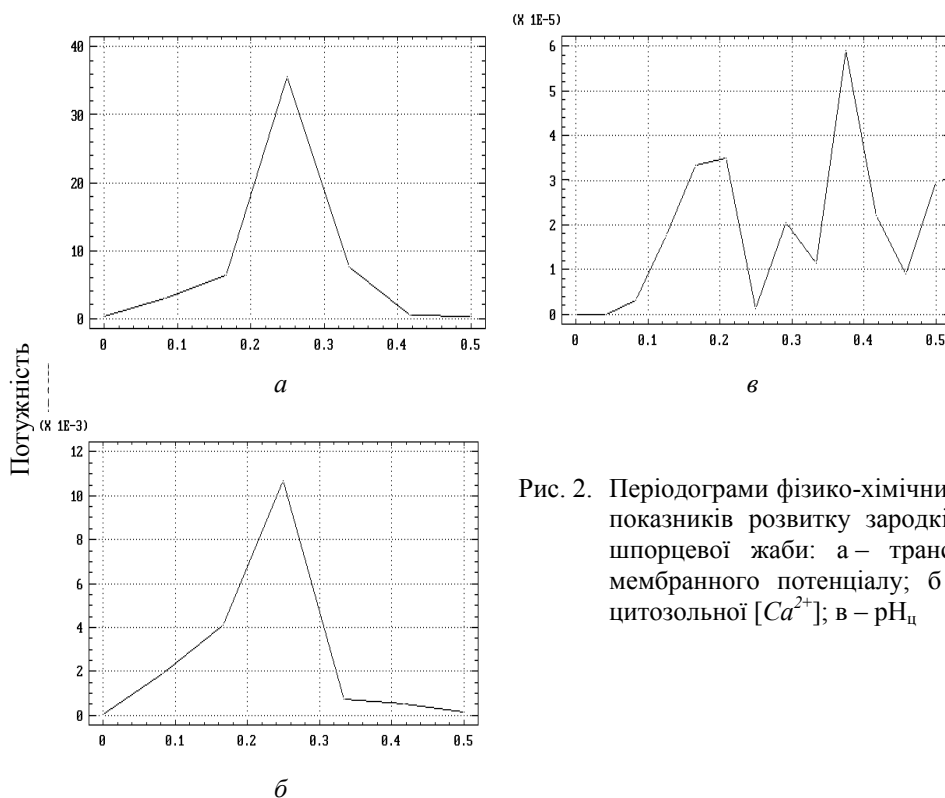


Рис. 2. Періодограми фізико-хімічних показників розвитку зародків шпорцевої жаби: а – трансмембранного потенціалу; б – цитозольної $[Ca^{2+}]$; в – рН_ц

Частка періоду на інтервал квантування

можна впорядкувати за зниженням амплітуди їхніх коливань: ТМП, $[Ca^{2+}]$, ШПК, рН_ц для в'юна та ТМП, $[Ca^{2+}]$ для шпорцевої жаби.

Аналіз даних свідчить, що в спектрах коливань різних фізико-хімічних показників розвитку зародків тварин переважає періодична компонента, яка за тривалістю збігається з мітотичним циклом дроблення. Для зародків в'юна він триває приблизно 31 хв при $t=21^{\circ}C$, а для шпорцевої жаби – 23 хв при $t=17-26^{\circ}C$. Одержані результати можна пояснити тим, що, вочевидь, є один чи декілька факторів, які задають ритм біоелектричним та метаболічним процесам у зародку під час дроблення.

Виявлено різницю у динаміці рН цитоплазми в зародків в'юна та шпорцевої жаби (рис. 2), у якої спектр коливань цього показника наче розмитий. Одержані піки мають дуже незначну потужність і відповідають 13-, 17-хвилинним коливанням та коливанням у межах 24–31 хв. У цьому випадку можна інтерпретувати зміни рН_ц на досліджуваному інтервалі часу як випадкові флуктуації, що підтверджують результати оцінки достовірності спектральних піків.

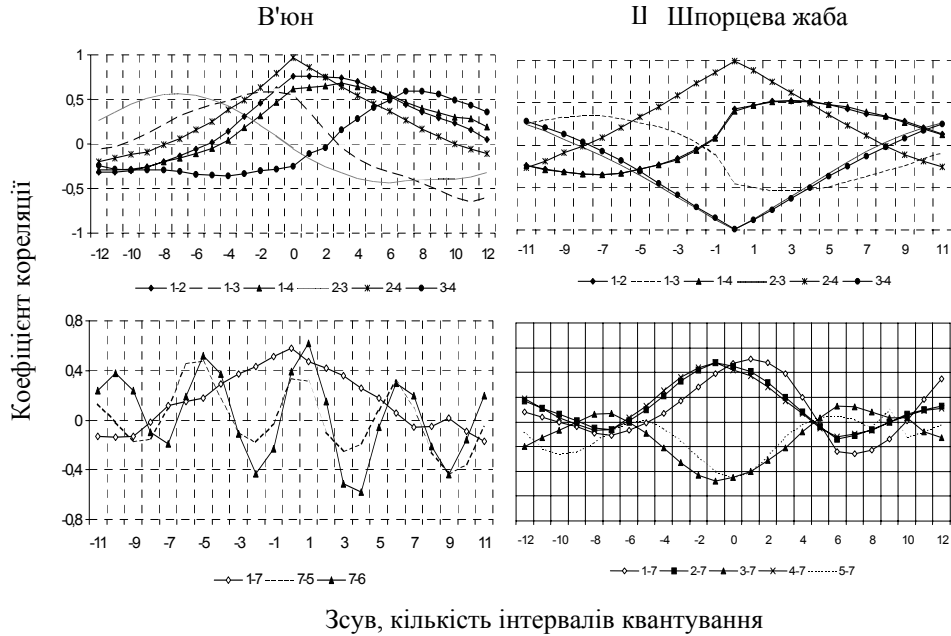


Рис. 3. Корелограми фізико-хімічних показників розвитку зародків тварин: 1 – ТМП; 2 – вміст K^+ у зародку; 3 – вміст Na^+ у зародку; 4 – відношення вмісту K^+/Na^+ у зародку; 5 – $pH_{ц}$; 6 – ШПК; 7 – концентрація цитозольного Ca^{2+} .

Результати крос-кореляційного аналізу показано на рис. 3 і 4. У разі зіставлення рядів вимірювань без часових зміщень в обох об'єктах виявлено сильну кореляцію у парах таких показників: вміст K^+ та співвідношення вмісту K^+/Na^+ у зародку, ТМП та $[Ca^{2+}]$, ШПК, ШВВ та вміст K^+ чи відношення вмісту K^+/Na^+ у зародку. Отже, процеси, які описують зміни цих показників, тісно спряжені у риб та амфібій.

На рис. 3 і 4 видно, що корелограми показників вмісту K^+ чи співвідношення вмісту K^+/Na^+ у зародку з іншими досліджуваними показниками є ідентичними в обох тварин, тобто значення коефіцієнтів кореляції за різночасовими зсувами змінюються аналогічно (близькі за значенням та знаком). За цими даними можна припустити, що механізм змін K^+/Na^+ -співвідношення є однаковим у цих тварин і значно спряжений з процесами, які зумовлюють часові зміни концентрації іонів калію у зародках.

Виявлено деякі різниці (рис. 3) у співвідношеннях змін вмісту Na^+ з співвідношенням вмісту K^+/Na^+ у зародку. Якщо у шпорцевої жаби зміни цих показників мають сильну негативну кореляцію, то для в'юна картина дещо інша: корелограмі властивий коливний ефект, тобто є достовірні значення коефіцієнтів кореляції з 30-

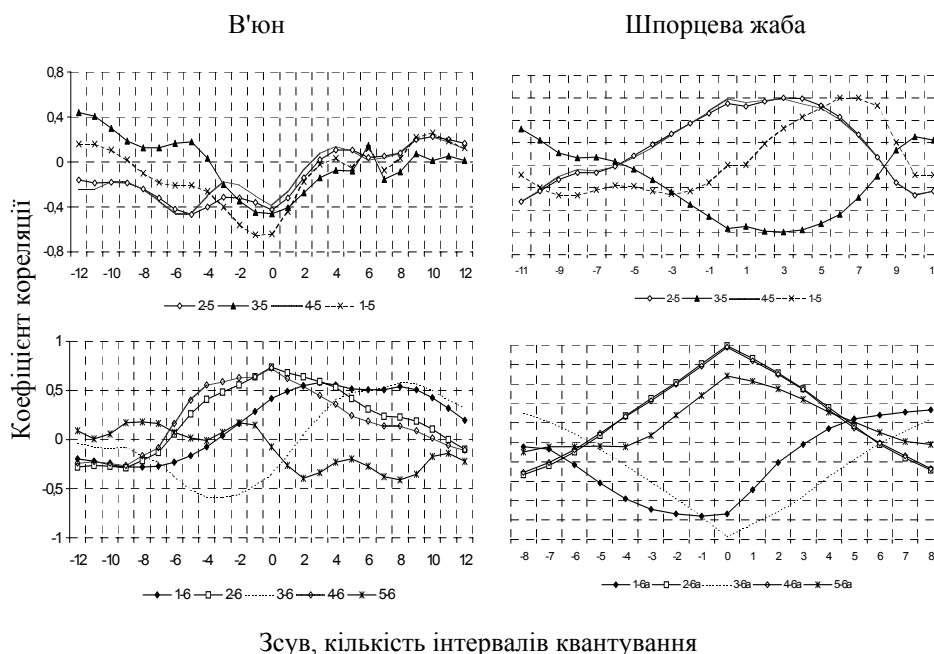


Рис. 4. Корелограми фізико-хімічних показників розвитку зародків тварин: 1 – ТМП; 2 – вміст K^+ у зародку; 3 – вміст Na^+ у зародку; 4 – відношення вмісту K^+/Na^+ у зародку; 5 – $pH_{ц}$; 6 – ШПК; 7 – концентрація цитозольного Ca^{2+} .

хвилинним зсувом, які різнонапрямлені. Ймовірно, що спряженість між часовими змінами цих показників виникає періодично, а різниця у корелограмах може бути зумовлена зміною фазового співвідношення між ними на початку та наприкінці спостереження.

На рис. 3 добре видно, що корелограми показників $[Ca^{2+}]$ – $pH_{ц}$, $[Ca^{2+}]$ –ШПК мають чітко виражений коливний ефект, тобто часові зсуви відповідних рядів у різних напрямках виявляють достовірні крос-кореляційні зв'язки, що виникають періодично з 30-хвилинним ритмом. Це свідчить про стійкість взаємозв'язку цих показників за періодичними складовими. Певну аналогію спостерігаємо, аналізуючи зв'язки $[Ca^{2+}]$ з біоелектричними показниками та зміною $pH_{ц}$. Кореляції виникають під час зсуву у прямому та зворотному напрямі, який триває приблизно 30-40 хв. У цих випадках значення їхні досить низькі, що може бути пов'язане з нелінійним характером змін показників, нестабільністю періоду та наявністю інших періодичних складових, про що свідчать результати спектрального аналізу динаміки цих показників. Таку саму тенденцію спостерігаємо на рис. 3, де показано корелограми показників, що описують зв'язок змін $pH_{ц}$ з динамікою мембранного електрогенезу у

зародків. Ймовірно, що ці процеси у зародків в'юна відбуваються синхронно з 30-хвилинними коливаннями. Цю синхронізацію процесів можуть зумовлювати щільні контакти, які забезпечують тісний зв'язок усіх клітин зародка, формуючи на ранніх стадіях дроблення єдиний комунікаційний компартмент [2].

Оскільки не виявлено чіткої періодичності у змінах $pH_{ц}$, то простежується деяка різниця в часових співвідношеннях цього показника з іншими біоелектричними показниками. Наприклад, достовірні максимальні значення коефіцієнтів кореляції $pH_{ц}$ з цими показниками (рис. 4) припадають на зсув від 5 до 35 хв. У цьому разі кореляція позитивна з ТМП, вмістом K^+ і співвідношенням вмісту K^+/Na^+ у зародку та негативна з вмістом Na^+ у зародку. Виявлення такої причинної залежності може бути зумовлене якимись спільними факторами, що однаково впливають на стабілізацію $pH_{ц}$ та процеси біоелектрогенезу. Ймовірно, що механізми, які генерують зміни цих процесів, різні у шпорцевої жаби та в'юна. Однак це потрібно перевірити на більшій вибірці.

Достовірні часові причинно-наслідкові співвідношення зі зсувом від 5 до 30 хв простежуються між показниками: ТМП і вмістом K^+ та співвідношенням вмісту K^+/Na^+ у зародку, ТМП і вмістом Na^+ у зародку (рис. 3), а також зі зсувом від 5 до 50 хв між ТМП і ШПК (рис. 4). Ці достовірні зв'язки можна пояснити на рівні відомих фізико-хімічних та фізіологічних закономірностей. Збільшення вмісту K^+ у зародку сполучене з гіперполяризацією мембрани та зменшенням вмісту Na^+ . У цьому разі процеси, що зумовлюють зміну концентрації йонів, передують збільшенню абсолютних значень ТМП. Повна аналогія часових співвідношень між цими показниками зафіксована у зародків шпорцевої жаби, лише за дещо меншими зсувами – від 5 до 25 хв, де також простежуються достовірні значення коефіцієнтів кореляції.

Щодо крос-кореляції між ТМП та ШПК, то на цьому часовому інтервалі дослідження достовірні максимальні значення коефіцієнтів кореляції спостерігають за додатним значенням зсуву. Це свідчить про випередження змінами ШПК змін ТМП. Аналогічно за зсувом від 5 до 15 хв виявлено достовірність часових співвідношень між ТМП та ШВВ (рис. 4) у зародків шпорцевої жаби. Однак у цьому випадку кореляція негативна і припадає на від'ємне значення зсуву. Ці відмінності, очевидно, зумовлені тим, що процеси клітинного дихання періодичні, як засвідчив попередньо виконаний спектральний аналіз.

На підставі цілісної картини часових залежностей між процесами, які зумовлюють зміни концентрації йонів у зародках тварин та інтенсивності енергетичного метаболізму, і процесами біоелектрогенезу можна припустити, що в їхній основі є однаковий часовий механізм регуляції, який не залежить від типу дроблення цих тварин (меробластичного рівномірного з утворенням дискобластули у в'юна [5] чи голобластичного нерівномірного з утворенням амфібластули у шпорцевої жаби [13]).

Виконаний аналіз сумісної динаміки метаболічних та біоелектричних процесів дає змогу глибше зрозуміти їхню часову організацію на ранніх етапах розвитку зародків тварин. Виявлені аналогії у часових причинно-наслідкових співвідношеннях між динамікою енергетичного метаболізму та процесами біоелектрогенезу, зокрема,

між регуляцією йонного гомеостазу, процесами, що зумовлюють зміни вмісту K^+ , співвідношення вмісту K^+/Na^+ у зародках та змінами поляризації зародкових мембран підтверджують універсальність цієї організації. Ймовірно, що ці процеси зумовлені й однаковими механізмами регуляції у зародків риб та амфібій.

1. *Бериташвили Д.Р.* Исследование динамики калия и натрия, аденозинтрифосфатаз и аденилатциклазы в раннем эмбриогенезе вьюна: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1974. 24 с.
2. *Божкова В.П., Розанова Н.В.* Современное состояние проблемы щелевых контактов и представление об их роли в развитии // *Онтогенез*. 1998. Т. 29. №1. С. 5-20.
3. *Бродский В.Я.* Околочасовые (ультрадианные) клеточные ритмы: начало исследований. Некоторые итоги // *Онтогенез*. 2000. Т. 31. №6. С. 316-329.
4. *Владимирова И.Г., Злочевская М.Б., Озернюк Н.Д.* Динамика интенсивности дыхания в раннем онтогенезе амфибий // *Онтогенез*. 2000. Т. 31. №5. С. 350-354.
5. *Гойда Е.А.* Биофизические аспекты раннего онтогенеза животных. К.: Наук. думка, 1993. 224 с.
6. *Гойда Е.А., Гумецкий Р.Я.* Математическая модель динамики мембраносвязанных процессов в раннем эмбриогенезе животных // *Критерии самоорганизации в физ.-хим. и биол. системах: Тр. Междунар. симпоз.* М., 1995. С. 52-57.
7. *Гойда Е.А., Ротт Н.Н., Санагурский Д.И.* Изменение трансмембранного потенциала вьюна при действии колхицина // *Онтогенез*. 1981. Т. 12. №6. С. 643-647.
8. *Гойда О.А., Чабан В.В., Медина І.Р.* Електрофізіологічні параметри йонтранспортних систем у риб і амфібій за період їх раннього розвитку // *Фізіол. журн.* 1992. Т. 38. №6. С. 102-105.
9. *Гудвин Б.Г.* Временная организация клетки. М.: Мир, 1966. 251 с.
10. *Деркач М.П., Гумецький Р.Я., Чабан М.Е.* Курс варіаційної статистики. К.: Вища шк., 1977. 208 с.
11. *Евсиков А.В.* Механизмы регуляции раннего эмбриогенеза мыши // *Онтогенез*. 2000. Т. 31. №3. С. 178-191.
12. *Ермаков А.С., Белоусов Л.В.* Морфогенетические и дифференцировочные последствия релаксации механических натяжений в бластуле шпорцевой лягушки // *Онтогенез*. 1998б. Т. 29. С. 450-458.
13. *Игнатьева Г.М.* Ранний эмбриогенез рыб и амфибий. М.: Наука, 1979. С. 176.
14. *Кендэл М.Дж., Стьюарт А.* Многомерный статистический анализ и временные ряды. М.: Наука, 1976. 736 с.
15. *Медына І.Р., Стельмах Н.С., Санагурский Д.И., Гойда Е.А.* Влияние внеклеточного кальция на уровень и динамику трансмембранного потенциала в раннем развитии вьюна // *Онтогенез*. 1987. Т. 18. С. 91-95.

16. Романов Ю.А. Временная организация и информация в биологических системах // Авиакосм. экол. медицина 1995. Т. 29. №4. С. 4-9.
17. Ротт Н.Н. Ритмические процессы в раннем эмбриогенезе приуроченные к клеточным делениям // Онтогенез. 1984. Т. 15. №1. С. 5-20.
18. Ammini C.V., Hauswirth W.W. Mitochondrial gene expression is regulated at the level of transcription during early embryogenesis of *Xenopus laevis* // J. Biol. Chem. 1999. Vol. 274. N 10. P. 6265-6271.
19. Busenberg S., Tang B. Mathematical models of the early embryonic cell cycle: the role of MPF activation and cyclin degradation // J. Math. Biol. 1994. Vol. 32. N 6. P. 573-596.
20. Ed. Stein G.S., Baserga R., Giordano A., Denhardt D.T. The molecular basis of cell cycle and growth control. N.Y.: Wiley-Liss, 1999. 389 p.
21. Goida Ye.A., Oshchapovskii V.V., Sanagurskii D.I. A new approach to the evaluation of the relationship of different parameters influencing the dynamics of the transmembrane potential in developing loach embryos // Biophysics. 1996. Vol. 41. N 2. P. 386-389.
22. Grandin N., Charbonneau M. Cycling of intracellular pH during cell division of *Xenopus embryos* is a cytoplasmic activity depending on protein synthesis and phosphorylation // J. Cell Biol. 1990. Vol. 111. P. 523-532.
23. Keating T.J., Cork R.J., Robinson K.R. Intracellular free calcium oscillations in normal and cleavage-blocked embryos and artificially activated eggs of *Xenopus laevis* // J. Cell Science. 1994. Vol. 107. P. 2229-2237.
24. Muto A., Kumo S., Inoue T., Okano A., Mikoshiba K. Calcium waves along the cleavage furrows in cleavage-stage *Xenopus embryos* and its inhibition by heparin // J. Cell Biol. 1996. Vol. 135. P. 186-190.
25. Slack C., Warner A.E., Warren R.L. The distribution of sodium and potassium in amphibian embryos during early development // J. Physiol. 1973. Vol. 232. P. 313-330.
26. Swanson C.A., Arkin A.P., Ross J. An endogenous calcium oscillator may control early embryonic division // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. Vol. 94. P. 1194-1199.
27. Thoman M., Gerhart J.C. Absence of dorsal-ventral differences in energy metabolism in early embryos of *Xenopus laevis* // Dev. Biol. 1979. Vol. 68. P. 191-202.

TEMPORARY CORRELATIONS FOR DYNAMICS OF METABOLIC AND BIOELECTRIC CHARACTERISTICS DURING EARLY EMBRIOGENESIS OF LOACH AND XENOPUS

L. Ivashkiv, R. Humetskyi, D. Sanagurskyi

*Ivan Franko National University of L'viv,
Hrushevskoho st. 4, L'viv 79005, Ukraine,
e-mail: biolog@franko.lviv.ua*

Analogies in temporary causal correlations between intensity of energetic metabolism and cell electrogenesis processes, between ions homeostasis regulation, processes causing

changes of intracellular K^+ concentration, K^+/Na^+ ratio and changes of embryo membrane polarization are detected. A difference in temporary correlations between changes cytoplasmatic pH and changes of bioelectric parameters on little-hour interval is detected also for these objects. The analysis of periodicity in temporary changes of all parameters is carried out. Conformity of mitotic cycle duration at early stages of cleavage to the oscillation periods of membrane voltage, endogenous calcium concentration, speed of oxygen absorption and cytoplasmatic pH – for loach, and to the membrane voltage and endogenous calcium concentration – for xenopus.

Key words: loach, xenopus, cleavage-stage, physical and chemical parameters, temporary dynamics, periodograms, cross-correlations.

Стаття надійшла до редколегії 18.02.2002

Прийнята до друку 03.03.2002