

УДК 576.342: 576.35 + 577.25.5

ВПЛИВ ЙОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА АКТИВНІСТЬ Na^+ , K^+ -АТФ-АЗИ ТА ДИНАМІКУ ТРАНСМЕМБРАННОГО ПОТЕНЦІАЛУ ЗАРОДКІВ В'ЮНА

Н. Бойко, М. Целевич, Д. Санагурський

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

Вплив йонів таких важких металів, як нікель, кобальт, манган, олово, цинк та кадмій у концентраціях 10^{-6} - 10^{-4} М призводить до зниження активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази зародків в'юна на різних стадіях дроблення бластомерів, причому характер цих змін подібний до характеру змін трансмембранного потенціалу протягом періоду дроблення, відповідно до впливів на нього.

Ключові слова: активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази, трансмембранний потенціал, зародки в'юна, йони важких металів.

Вплив катіонів важких металів, як з'ясовано в наших попередніх дослідженнях, призводить до виражених змін у динаміці трансмембранного потенціалу (ТМП) зародків в'юна протягом періоду дроблення бластомерів, зокрема таких: збільшення періоду синхронних коливань потенціалу, зменшення амплітуди коливань, деполяризація мембрани, тобто зменшення абсолютних значень ТМП [1]. Наприклад, таке явище, як деполяризація мембрани простежувалося у всіх випадках впливу йонів досліджуваних металів. Подібний вплив на ТМП зародків в'юна, тобто значна деполяризація мембрани зі збереженням коливань, зафіксована, як виявили Гойда та співробітники [2], у разі внесення в середовище інкубації зародків специфічного інгібітору Na^+ , K^+ -активованої, Mg^{2+} -залежної АТФ-ази – серцевого глікозиду оубаїну. Інші автори [3] з'ясували, що зменшення абсолютних значень ТМП під впливом йонів важких металів у бактерій супроводжується зниженням АТФ-азної активності бактеріальної мембрани. З огляду на це можна припустити, що катіони важких металів впливають на динаміку трансмембранного потенціалу шляхом інгібування Na^+ , K^+ -помпи. Тому нашою метою було дослідження впливу йонів важких металів на активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази, яка є інтегральним білком Na^+ , K^+ -помпи, що виконує sprzęжене з гідролізом АТФ транспортування йонів Na^+ і K^+ через мембрану [5].

Об'єктом досліджень були зародки в'юна (*Misgurnus fossilis* L.) у період від запліднення до закінчення стадії дроблення бластомерів. Яйцеклітини одержували і запліднювали за Нейфахом [7]. Овуляцію стимулювали внутрішньом'язовим уве-

денням самкам хоріогонічного гонадотропіну (500 од.). Ікру одержували через 36 год після стимулювання. Сім'яники отримували після декапітації та розтину черевної порожнини самців. Ікру запліднювали в чашках Петрі суспензією спермій. Через 5-10 хв після запліднення зиготи відмивали та інкубували при температурі 20-22°C у фізіологічному розчині Гольфрета.

Розчини солей важких металів виготовляли на основі розчину Гольфрета.

ТМП реєстрували за допомогою стандартної мікроелектродної техніки [4] на зібраній нами установці за допомогою скляного мікроелектрода, заповненого розчином КСІ (2,5 М). Зародок звільняли від перивітелінової оболонки механічним способом (за допомогою препарувальних голочок) і поміщали в камеру експериментальної установки, заповнену розчином Гольфрета. Коливання записували за допомогою потенціометра КСП-4.

Активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази в гомогенаті клітин зародків в'юна визначали за стандартною методикою [6], за різницею активностей у відсутності оуабаїна та в разі його додавання. В результаті гідролізу АТФ під час дії АТФ-ази накопичується неорганічний фосфат (P_n), що його молібденовокислий амоній переводить у комплексну сполуку, яка відновлюється аскорбіновою кислотою до молібденової сині. Інтенсивність забарвлення пропорційна до вмісту P_n . Вміст неорганічного фосфору в пробі визначали за калібрувальною кривою через величину екстинції, яку вимірювали на спектрофотометрі за довжини хвилі 700 нм. АТФ-азну активність (у мікромолях P_n на 1 мг білка за годину) обчислювали за формулою:

$$A=6P_n/aM,$$

де P_n – вміст фосфору в пробі, знайдений за калібрувальною кривою; a – вміст білка в пробі; M – молекулярна маса фосфору.

Результати досліджень засвідчили, що вплив йонів важких металів призводить до зменшення активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази зародків в'юна на різних стадіях дроблення бластомерів, причому тип цих змін подібний до типу змін ТМП протягом усього періоду дроблення. Для зручності порівняння динаміку ТМП ми зобразили у вигляді тільки однієї математичної складової – тренда, тобто загальної тенденції змін потенціалу протягом періоду дроблення бластомерів. Коливання потенціалу в межах кожного клітинного циклу на рисунках не відображали.

На рис. 1-6 показано результати цих досліджень. Зокрема, відображено зміни активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази на різних стадіях дроблення бластомерів у нормі та під впливом йонів таких металів, як нікель, кобальт, манган, олово, цинк та кадмій у концентраціях 10^{-6} - 10^{-4} М. Крім того, на цих рисунках позначено тренди кривих динаміки ТМП протягом періоду дроблення бластомерів у нормі та під впливом йонів тих самих металів. З рис. 1 видно, що активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази в контролі зростає протягом періоду дроблення (a), як і абсолютні значення ТМП (b). Причому в кінці періоду дроблення, на стадіях VIII та X поділів, активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази, а також абсолютні значення ТМП дещо зменшуються.

З рис. 1 бачимо зміни активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази (a) та динаміки ТМП (b) зародків в'юна під впливом йонів нікелю порівняно з контролем. Вплив йонів нікелю в концентрації 10^{-6} М призводить до помітного зменшення як активності Na^+ ,

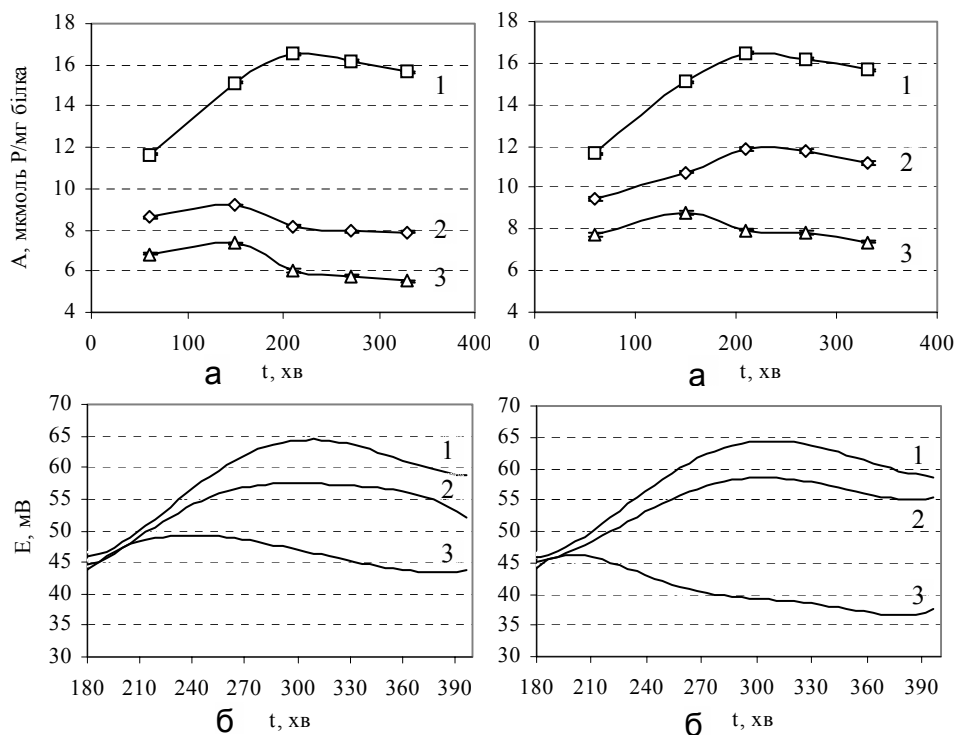


Рис. 1. Зміна активності Na⁺, K⁺-АТФ-ази (а) та ТМП (б) у разі впливу йонів Ni²⁺ у концентраціях 10⁻⁶ (2) і 10⁻⁵ (3) порівняно з контролем (1).

Рис. 2. Зміна активності Na⁺, K⁺-АТФ-ази (а) та ТМП (б) у разі впливу йонів Co²⁺ у концентраціях 10⁻⁵ (2) і 10⁻⁴ (3) порівняно з контролем (1).

K⁺-АТФ-ази, так і абсолютних значень ТМП, яке стає вираженішим зі збільшенням концентрації йонів металу до 10⁻⁵ М. Водночас у контролі на стадіях VI-X поділу бластомерів активність Na⁺, K⁺-АТФ-ази та значення потенціалу збільшуються, у разі впливу йонів нікелю на цих стадіях простежується значне зменшення значень обох показників.

У випадку впливу йонів кобальту (рис. 2) зміни є подібними, однак менш вираженими. До значного зменшення активності Na⁺, K⁺-АТФ-ази (а) та абсолютних значень ТМП (б) призводив вплив йонів кобальту в концентрації 10⁻⁴ М. Вплив меншої концентрації – 10⁻⁵ М був менш помітним.

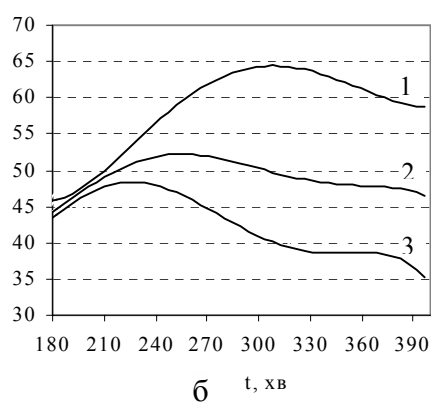
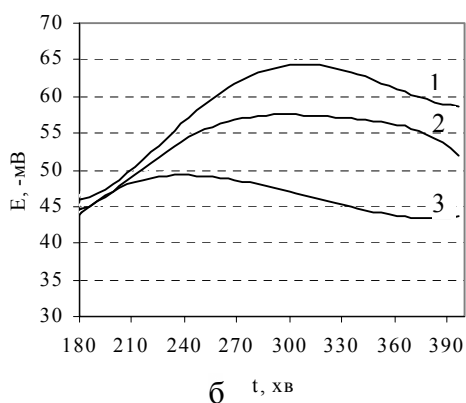
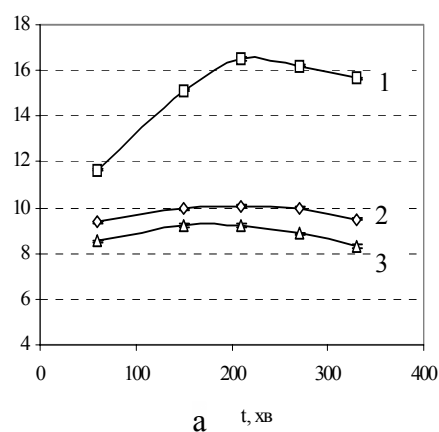
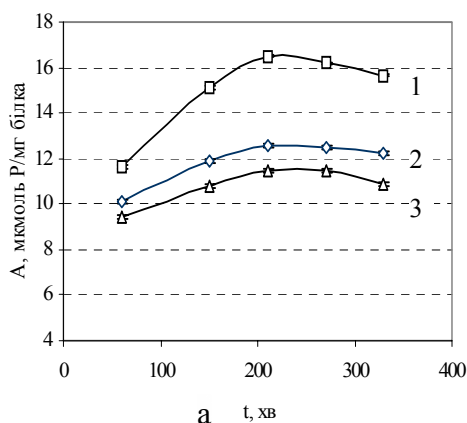


Рис. 3. Зміна активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази (а) та ТМП (б) у разі впливу йонів Mn^{2+} у концентраціях 10^{-6} (2) і 10^{-5} (3) порівняно з контролем (1).

Рис. 4. Зміна активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази (а) та ТМП (б) у разі впливу йонів Sn^{2+} у концентраціях 10^{-5} (2) і 10^{-4} (3) порівняно з контролем (1).

На рис. 3 показані зміни активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази (а) та динаміки ТМП (б) зародків в'юна під впливом йонів мангану в концентрації 10^{-5} М та 10^{-6} М порівняно з контролем. Як бачимо, вплив йонів мангану також приводить до зменшення активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази (а), а також до зменшення абсолютних значень потенціалу (б). Зміни вираженіші у разі впливу йонів мангану в концентрації 10^{-5} М.

Вплив катіонів олова на досліджувані показники відображений на рис. 4. Ці зміни, як і в попередніх випадках, залежать від концентрації: у разі впливу йонів олова в концентрації 10^{-5} М активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази (а) зменшувалась, як і аб-

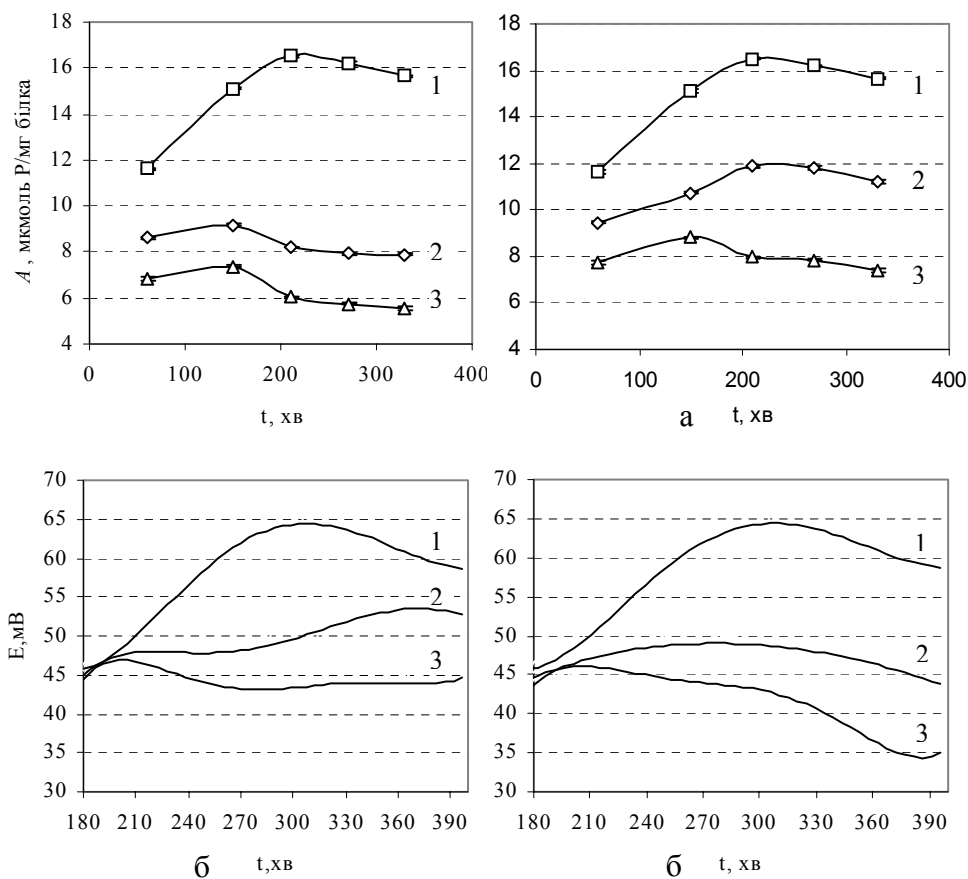


Рис. 5. Зміна активності Na⁺, K⁺-АТФ-ази (а) та ТМП (б) у разі впливу йонів Zn²⁺ у концентраціях 10⁻⁶ (2) і 10⁻⁵ (3) порівняно з контролем (1).

Рис. 6. Зміна активності Na⁺, K⁺-АТФ-ази (а) та ТМП (б) у разі впливу йонів Cd²⁺ у концентраціях 10⁻⁶ (2) і 10⁻⁵ (3) порівняно з контролем (1).

солютні значення ТМП (б). За умов впливу йонів олова в концентрації 10⁻⁴ М деполаризація мембрани була більш вираженою, як і зменшення активності АТФ-ази.

До подібних змін як активності Na⁺, K⁺-АТФ-ази (а), так і значень потенціалу (б) приводив вплив йонів цинку (рис. 5). Причому у випадку впливу йонів цинку в концентрації 10⁻⁵ М ці зміни були сильнішими, ніж за концентрації йонів 10⁻⁶ М.

На рис. 6 показані зміни АТФ-азної активності (а) та динаміки ТМП (б) під впливом йонів кадмію. Активність Na⁺, K⁺-АТФ-ази у цьому випадку, як і під

впливом йонів нікелю, зменшувалась сильніше, ніж під впливом йонів інших металів; крім того, вплив йонів кадмію в концентрації 10^{-5} М приводив до значніших змін обох показників, ніж вплив йонів кадмію в концентрації 10^{-6} М.

Отже, загалом можна сказати, що вплив катіонів важких металів призводив до залежного від концентрації зменшення активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази і до подібного за характером змін зменшення абсолютних значень ТМП зародків в'юна. Більш вираженому зниженню активності ферменту помпи відповідала суттєвіша деполяризація мембрани. Причому якщо в контролі активність АТФ-ази збільшувалась від запліднення до стадії 64 бластомерів, то під впливом йонів металів активність зменшувалась або зростала незначно протягом періоду дроблення.

Деполяризація мембрани під впливом йонів важких металів простежувалася внаслідок інгібування цими йонами Na^+ , K^+ -помпи, яка генерує йонний струм через мембрану. Отже, одним з механізмів впливу йонів важких металів на динаміку ТМП зародків в'юна протягом періоду дроблення бластомерів можна вважати інгібування ферменту Na^+ , K^+ -помпи – Na^+ , K^+ -активованої, Mg^{2+} -залежної АТФ-ази.

1. *Бойко Н.М., Санагурський Д.І.* Динаміка трансмембранного потенціалу зародків в'юна в умовах впливу йонів важких металів // Вісн. Львів. ун-ту, Сер. біол., 2000. Вип. 25. С. 3-7.
2. *Гойда О.А.* Биофизические аспекты раннего онтогенеза животных. К.: Наукова думка, 1993. 224 с.
3. *Грузина Т.Г., Балакина М.Н., Карамушка В.И.* та ін. Трансмембранный потенциал и АТФ-азная активность плазматической мембраны бактерий при воздействии тяжелых металлов // Укр. биохим. журн. 1997. Т. 69. №1. С. 54-59.
4. *Костюк П.Г.* Микроэлектродная техника. К.: Наукова думка, 1960. 127 с.
5. *Лопина О.Д.* Na^+ , K^+ -АТФ-аза: структура, механизмы и регуляция активности // Биол. мембраны. 1999. Т. 16. №6. С. 584-603.
6. *Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен).* Учеб. пособие / Под ред. М.И. Прохоровой. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. С. 272.
7. *Нейфах А.А.* Молекулярная биология процессов развития. М.: Наука, 1977. 311 с.

**THE HEAVY METAL ION INFLUENCE ON THE Na^+ , K^+ -
ATPASE ACTIVITY AND THE DYNAMIC OF
TRANSMEMBRANE POTENTIAL OF LOACH EMBRYOS**

N. Boiko, M. Celevycz, D. Sanagurski

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

Is shown, that the influence of such ions of heavy metals, as a nickel, cobalt, manganese, tin, zinc and the cadmium in the concentration 10^{-6} - 10^{-4} M results in lowering of Na^+ , K^+ -ATPase activity of loach embryo at different stages of blastomer divisions, thus the character of these changes coincides character of changes of transmembrane potential during period of blastomer divisions under the heavy metal influence.

Key words: transmembrane potential, loach embryo, blastomer division, heavy metal ions.

Стаття надійшла до редколегії 15.02.2002
Прийнята до друку 06.03.2002