

Електрофізіологічні параметри іонтранспортних систем у риб і амфібій за період їх раннього розвитку

Показано, що значення мембранного потенціала, виходячого току і іонної провідності плазматическої мембрани в період дроблення зародків у риб і амфібій залежать від стадії клітинного циклу. Исследовано участие отдельных метаболитов аденилатциклазной системы в регуляции колебаний этих электрофизиологических показателей мембран бластомеров.

Вступ

На сучасному етапі досліджень регуляції іонної провідності за умов поділу, росту та інших функціональних станів клітин особливу увагу привертає вивчення динаміки електрофізіологічних показників мембран на початкових стадіях розвитку зародків тварин. З'ясовано, що протягом дроблення бластомерів зародків відбуваються зміни іонної провідності мембрани у різних представників амфібій, зокрема у *Synaps pyrrogaster* [12], *Rana pipiens* [15], *Xenopus laevis* [14], *Axolotl* [1], *Rana rudibunda* [7], та у прісноводної риби *Misgurnus fossilis* [4].

Досліджуючи чутливість мембранного потенціалу (МП) до різних концентрацій іонів, а також вольт-амперні характеристики, автори зробили висновок про калієву природу змін МП й іонної провідності мембрани [1, 3]. Цікаво, що загальні закономірності змін електрофізіологічних показників мембран зародків амфібій і риб за багатьма аспектами виявилися подібними, незважаючи на відмінності типу дроблення й будови зародків. Однак досі малоз'ясованими лишаються механізми, дія яких призводить до виникнення періодичних змін іонної провідності та МП протягом дроблення зародків тварин.

Виходячи з цього, метою нашої роботи було дослідження шляхів виникнення коливань МП та іонної провідності мембрани під час дроблення бластомерів у амфібій і риб за період раннього ембріогенезу, а також з'ясування функціональної обумовленості цього процесу.

Методика

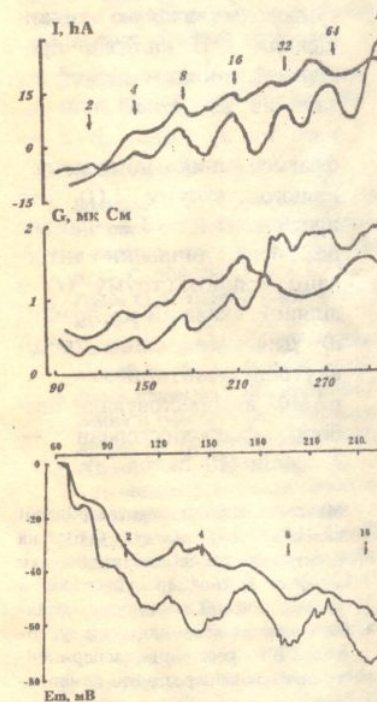
Дослідження проведені на зародках в'юна — *Misgurnus fossilis* L. [6] і шпорцевої жаби — *Xenopus laevis* Daudin [11]. Через декілька хвилин після запліднення зародки в'юна вивільняли від перивітелінової оболонки за допомогою препарувальних голів і поміщали в експериментальну камеру. Зародки шпорцевої жаби, отримані за умов природного запліднення ікри, для проведення експериментів вивільняли ще й від драглистих оболонок. Вимірювання значень електрофізіологічних показників проводили за допомогою мікроелектродної техніки й необхідної виміральної апаратури в режимах фіксації струму й потенціалу [3].

Як інкубаційне середовище використовували модифікований розчин Гольтфретера (ммоль/л): 110 NaCl; 1,4 KCl; 1,8 CaCl₂; 5 трис-HCl; рН 7,4 [1]. В окремих експериментах в середовище додавали толбутамід, теофілін (фірма «Sigma»).

© О.А.ГОЙДА, В.В.ЧАБАН, І.Р.МЕДИНА, 1992

Результати та їх обговорення

На мал. 1, 2 представлені результати інтегрального іонного струму й прічткі ілюструють коливання значення та синхронних за клітинним в сусідній камері, що, завдяки співставляти результати між собою (мал. 2, 1). Максимальні змін з максимальними значеннями МП розни наступного поділу бластомерів максимальне значення МП тозу відбувалася деполяризація мінімальним у момент повного р

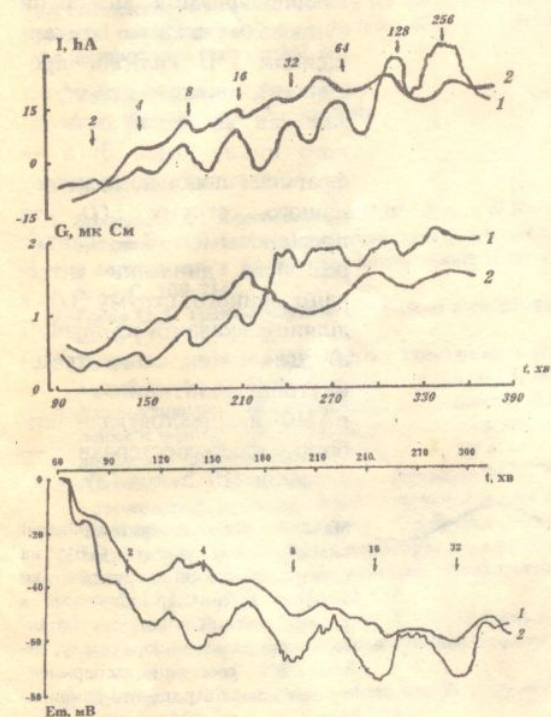


Мал. 1. Динаміка (t) інтеграції іонної провідності (G) мембрани клітин зародків шпорцевої жаби (2) за умов фіксації потенціалу складає -4

Мал. 2. Динаміка (t) мембранного потенціалу клітин в'юна (1) та шпорцевої жаби (2) за умов тривалої реєстрації ходу експерименту

ріонів риб та амфібій є і деякі з яких відрізняються тонка динаміка відбувалася рівномірною гіперполяризацією ритмічних коливань МП, а у МП терні пробіги кривої динаміки. Не дивлячись на багатоконпонентність

На мал. 1, 1 представлені результати першої серії дослідів — реєстрації інтегрального іонного струму й провідності зародкової мембрани в'юна, що чітко ілюструють коливання значень цих показників, співпадаючих за фазою та синхронних за клітинним поділом. Реєстрацію МП вели одночасно в сусідній камері, що, завдяки синхронності поділу бластомерів, дає змогу співставляти результати між собою і підвищує інформативність експерименту (мал. 2, 1). Максимальні значення струму й провідності співпадали з максимальними значеннями МП, які досягаються в момент закладки борозни наступного поділу бластомерів зародків в'юна. На стадії двох бластомерів максимальне значення МП досягало приблизно -20 мВ. Під час мітозу відбувалася деполяризація мембрани на 5 мВ, а значення МП було мінімальним у момент повного розділення бластомерів.



Мал. 1. Динаміка (t) інтеграції іонного струму (I) і провідності (G) мембрани клітин зародків в'юна (1) та шпорцевої жаби (2) за умов фіксації потенціалу (значення фіксованого потенціалу складає -40 мВ).

Мал. 2. Динаміка (t) мембранного потенціалу (E_m) зародкових клітин в'юна (1) та шпорцевої жаби (2) за умов тривалої реєстрації ходу експерименту.

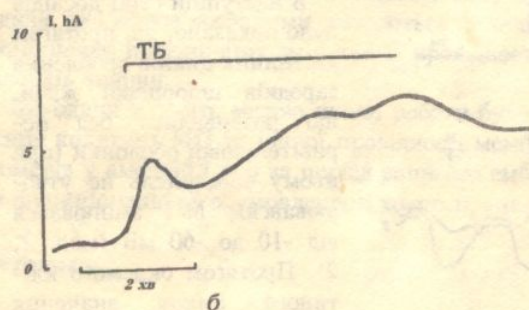
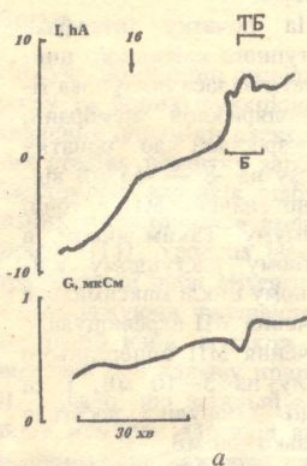
На початку інтерфази наступного клітинного циклу починалася поступова гіперполяризація мембрани, що зростала до початку мітозу на -8 — -15 мВ відносно значень МП в точці мінімуму. Таким чином, в кожному наступному клітинному циклі максимальне значення МП перевищувало значення МП попереднього циклу на 3—10 мВ, і на стадії морули досягало близько -60 мВ.

В наступній серії дослідів було показано, що протягом клітинних циклів дроблення зародків шпорцевої жаби, що розвивалися без перивітелінової оболонки (при цьому бластоцель не утворювався), МП змінювався від -10 до -60 мВ (мал. 2, 2). Протягом окремого клітинного циклу значення іонного струму і провідності змінювалися теж періодично і синхронно (див. мал. 1, 2). Однак, як видно з малюнків, поряд з загальними закономірностями ритмічних коливань значень МП та провідності мембран ембріонів риби та амфібій є і деякі суттєві відмінності. Зокрема, ми зауважили, що відрізняється тонка динаміка тривалих змін МП. У *Xenopus laevis* відбувалася рівномірна гіперполяризація мембрани у максимумах на фоні ритмічних коливань МП, а у *Misgurnus fossilis* чітко відзначені три характерні пробіги кривої динаміки МП в залежності від стадії дроблення [5].

Не дивлячись на багатоконпонентність механізмів виникнення коливань

МП [2, 3], провідна роль в цьому процесі належить змінам іонної провідності.

Враховуючи те, що регуляція іонного транспорту в мембрані ооцитів здійснюється при безпосередній участі цАМФ [13], інозитолтрифосфату [7], іонів кальцію [10], можна передбачити наявність аналогічної або близької за своїм характером регуляції іонного транспорту в мембрані зародкових клітин. Щоб з'ясувати причетність метаболітів аденілатциклазної системи до регуляції коливань МП, була проведена наступна серія дослідів з використанням теофіліну — інгібітора фосфодіестерази й толбутаміду — інгібітора цАМФ-залежної протеїнкінази. При додаванні толбутаміду ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) в середовище інкубації зародка через кілька секунд відбувалася швидка



гіперполяризація мембрани на 15-20 мВ, досягаючи максимального значення через 20-30 с. Відзначена гіперполяризація мембрани супроводжувалася підвищенням і її калієвої провідності, причому цей ефект залежав від стадії клітинного циклу (мал. 3: а — фрагмент повільного запису іонного струму (I) та провідності (G); б — швидка розгортка динаміки інтеграції іонного струму (I) в ділянці, вказаній на позиції а). Для зміни концентрації внутрішньоклітинного цАМФ використовували інгібітор фосфодіестерази — теофілін (10^{-4} моль/л).

Мал. 3. Вплив короткотривалої аплікації торбутаміду (ТБ) на електрофізіологічні характеристики мембран клітин зародків в'юна в режимі фіксації потенціалу (стрілка — стадія клітинного циклу, ділянка Б — реєстрація експерименту при швидкій розгортці самописця).

Як з'ясувалося, підвищення концентрації цАМФ в клітинах, яке викликає зростання протеїнкіназної активності, призводило до деполяризації мембрани, яка, проте, була слабко виражена і не перевищувала 5 мВ. Доданий в середовище інкубації толбутамід не тільки знімав ефект теофіліну, але й призводив до часткової гіперполяризації мембрани.

Внаслідок проведення досліджень встановлено, що при активуванні протеїнкінази А відбувається зменшення K^+ -провідності плазматичної мембрани, що узгоджується з концепцією про зв'язок фосфатиділінозитольного циклу з регуляцією іонного гомеостазу клітини [8]. При інгібуванні протеїнкінази А калієва провідність мембрани підвищується, що свідчить про причетність фосфорилування білків до регуляції іонної провідності плазматичних мембран зародкових клітин.

Узагальнюючи одержані нами результати та дані, відомі з літератури, можна зробити висновок, що метаболіти аденілатциклазної системи мають

важливе значення для корекції від фаз клітинного циклу як у показник є універсальним на функціонально реалізуватися за тенціалозалежних іонних канал виключено, що вивчення елек мембран зародків допоможе у р вання проліферативних процесі факторів росту.

O.A.Golda, V.V.Chaban, I.R.Medina

ELEKTROPHYSIOLOGICAL PARAMETERS AT EARLY DEVELOPMENTAL STAGE

It is shown that the membrane potential of the cell cycle stage both in *Misgurnus* for the microelectrode technics. Allowing for potential oscillations and ion conductance the inhibitor have been carried out.

A.V.Palladin Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of Ukraine, Lviv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Божкова В.П., Кавиашвили И.П. риодами циклических изменений и карнокинеза в дробящихся яйц 6. — С. 709-716.
2. Гойда О.А. Трансмембранный потен — № 12. — С. 27-38.
3. Гойда Е.А., Медина И.Р. Ионная дышей вьюна // Физиол. журн. .
4. Кавиашвили И.П., Божкова В. ления и мембранного потенциала дробление // Онтогенез. — 1971.
5. Кусень С.И., Санагурский Д.И., потенциал у развивающихся за транскрипции и трансляции //
6. Нейфах А.А., Ротт Н.Н. Синхр *Misgurnus fossilis* путем воздейст 1959. — 125, № 2. — С. 432-434.
7. Тайлахян Л.М., Чиквашидзе Ш. ческие характеристики мембран — 4, № 10. — С. 1047-1058.
8. Berridge M.J. Inositoltriphosphate 1984. — 220, № 1. — P. 345-364.
9. Busa W.B., Williamson J., Nuccite // J. Cell. Biol. — 1985. — 101.
10. Dascel N., Cohen S. Further ch oocytes // Pflugers Arch. — 1987.
11. Gurdon J.V. African clawed frogs Co, 1967. — P. 75-84.
12. Ito S., Hori N. Electrical characte — 49. — P. 1019-1027.
13. Stinnakre J. Endogenous membr laevis // J. Phys. — 1987. — 78.
14. Webb D.J., Nuccitelli R. Direct m at fertilization and cleavage // J.
15. Woodward D. Electrical signals of // J. Gen. Physiol. — 1968. —

Львів, відділення
І-ту біохімії
ім. О.В.Палладіна АН України

важливе значення для корекції значення МП, яке змінюється в залежності від фаз клітинного циклу як у зародків риб, так і у зародків амфібій. Цей показник є універсальним на початкових стадіях ембріогенезу, і може функціонально реалізуватися за умов його впливу на іонну провідність потенціалозалежних іонних каналів, що потребує додаткових досліджень. Не виключено, що вивчення електрофізіологічних характеристик клітинних мембран зародків допоможе у розробці способів стимулювання чи гальмування проліферативних процесів у тварин та оцінці ефективності дії різних факторів росту.

O.A.Golda, V.V.Chaban, I.R.Medina

ELEKTROPHYSIOLOGICAL PARAMETERS OF ION TRANSPORT SYSTEMS AT EARLY DEVELOPMENTAL STAGES OF FISH AND AMPHYBIANS

It is shown that the membrane potential level, ionic current and membrane conductance depend on the cell cycle stage both in *Misgurnus fossilis* L. embryos and in *Xenopus laevis* Daudin embryos by the microelectrode technics. Allowing for the role of the adenylate cyclase system in the membrane potential oscillations and ion conductance of membranes, some series of experiments for analysis of the inhibitor have been carried out.

A.V.Palladin Institute of Biochemistry,
Academy of Sciences of Ukraine, Lviv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Божкова В.П., Квавилашвили И.Ш., Ротт Н.Н., Чайлахян Л.М. Соотношение между периодами циклических изменений электрических характеристик мембран и фазами цитоплазматического кариокинеза в дробящихся яйцах быка и аксолотля // Цитология. — 1974. — 16, № 6. — С. 709-716.
2. Гойда О.А. Трансмембранный потенциал в эмбриогенезе тварин // Вісн. АН УРСР. — 1983. — № 12. — С. 27-38.
3. Гойда Е.А., Медына И.Р. Ионная проводимость клеточных мембран развивающихся зародышей быка // Физиол. журн. — 1988. — 34, № 6. — С. 38-45.
4. Квавилашвили И.Ш., Божкова В.П., Чайлахян Л.М. Периодические изменения сопротивления и мембранного потенциала яиц быка *Misgurnus fossilis*, сопровождающие деление и дробление // Онтогенез. — 1971. — 2, № 4. — С. 425-430.
5. Кусень С.И., Санагурский Д.И., Мурачик М.Г., Гойда Е.А. Изменение трансмембранного потенциала у развивающихся зародышей быка под влиянием инсулина, ингибирования транскрипции и трансляции // Биофизика. — 1980. — 25, № 4. — С. 658-663.
6. Нейфах А.А., Ротт Н.Н. Синхронизация клеточных делений у ранних зародышей быка *Misgurnus fossilis* путем воздействия пониженной температуры // Докл. АН СССР. — 1959. — 125, № 2. — С. 432-434.
7. Чайлахян Л.М., Чиквашидзе Ш.Д., Квавилашвили И.Ш., Ониани Н.Т. Электрофизиологические характеристики мембраны дробящегося яйца лягушки // Биол. мембраны. — 1987. — 4, № 10. — С. 1047-1058.
8. Berridge M.J. Inositoltriphosphate and diacylglycerol as second messengers // Biochem. J. — 1984. — 220, № 1. — P. 345-360.
9. Busa W.B., Williamson J., Nuccitelli K. Activation of frog (*X.laevis*) eggs by inositoltriphosphate // J. Cell. Biol. — 1985. — 101, № 2. — P. 667-682.
10. Dascal N., Cohen S. Further characterization of the slow muscarinic responses in *Xenopus* oocytes // Pflugers Arch. — 1987. — 409. — P. 512-520.
11. Gurdon J.V. African clawed frogs // Methods in developmental biology. — New York: Crowell Co, 1967. — P. 75-84.
12. Ito S., Hori N. Electrical characteristics of *Triturus* during cleavage // J. Gen. Phys. — 1966. — 49. — P. 1019-1027.
13. Stinnakre J. Endogenous membrane ionic channels and neurotransmitter receptor in *Xenopus laevis* // J. Phys. — 1987. — 78, № 1. — P. 15-22.
14. Webb D.J., Nuccitelli R. Direct measurement of intracellular pH changes in *Xenopus laevis* eggs at fertilization and cleavage // J. Cell. Biol. — 1981. — 91, № 2, pt 1. — P. 562-567.
15. Woodward D. Electrical signals of new membrane production during cleavage of *Rana pipiens* eggs // J. Gen. Physiol. — 1968. — 52, № 3. — P. 509-531.

Львів, відділення
І-ту біохімії
ім. О.В.Палладіна АН України

Матеріал надійшов
до редакції 17.03.92