

М.В. Целевич, С.М. Мандзинець, Д.І. Санагурський

Na⁺, K⁺-АТФаза активність мембран зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L. при дії антибіотиків

Исследовали влияние антибиотиков класса фторхинолонов – норфлоксацина и борозина – на Na⁺, K⁺-АТФазную активность зародышей в'юна Misgurnus fossilis L. во время синхронных дроблений бластомеров. При действии норфлоксацина и борозина выявлено дозозависимое снижение убаинчувствительной Na⁺, K⁺-АТФазной активности, которое наблюдали на VIII и X делениях бластомеров. При добавлении в инкубационную среду норфлоксацина в концентрации 5–25 мкг/мл, выявлены значительные колебательного характера изменения активности Na⁺, K⁺-АТФазы, а при добавлении борозина в концентрации 5, 15–25 мкг/мл эффект был менее выражен.

ВСТУП

Na⁺, K⁺-активована, Mg²⁺-залежна АТФаза (АТФ-гідролаза, Na⁺, K⁺-АТФаза, Na⁺-K⁺-насос, ЕС 3.6.1.37) – інтегральний білок плазматичних мембран еукаріот [9, 10, 16, 17], який реагує на зміни внутрішньо- і зовнішньоклітинної концентрації Na⁺ та K⁺ [5], і забезпечує підтримку іонних градієнтів цих катіонів, відтак, і трансмембранного потенціалу (ТМП), необхідних для реалізації важливих процесів клітинної фізіології [10], а також для регуляції енергетики та синтезу макромолекул і загального розвитку зародків [4, 8].

Відомо, що функціонування Na⁺, K⁺-АТФази зумовлює збільшення рівня ТМП у ранньому розвитку в'юна [1, 4]. Більше того, Гойдою та співавт. [3, 4, 11] доведено, що активний транспорт Na⁺ та K⁺ є одним із факторів, що зумовлюють коливальний характер ТМП зародків в'юна протягом ембріогенезу.

Встановлено, що під впливом антибіотиків циклогексамідину, пуроміцину, актиноміцину Д [4] і фторхінолонів [2] змінюється динаміка ТМП зародків в'юна, а саме спостерігається збільшення амплітуди та

періоду коливань потенціалу, загальна деполяризація плазматичної мембрани. Подібна деполяризація мембрани спостерігалася при внесенні в інкубаційне середовище специфічного інгібітора Na⁺, K⁺-АТФази – серцевого глікозиду убаїну [3]. Виходячи з цього, можна зробити припущення, що антибіотики впливають на динаміку ТМП за допомогою інгібування Na⁺-K⁺-насоса. Тому метою наших досліджень було вивчення впливу антибіотиків фторхінолонового ряду на активність Na⁺, K⁺-АТФази мембран зародків в'юна протягом їх раннього ембріогенезу.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на зародках в'юна (*Misgurnus fossilis* L.) у період від запліднення до закінчення стадії дроблення бластомерів. Яйцеклітини одержували та запліднювали за Нейфахом [13]. Овуляцію стимулювали внутрішньом'язовим введенням самицям хоріогонічного гонадотропіну (500 од.). Ікру одержували через 36 год після стимуляції. Сім'яники видаляли після декапітації самців та розтину черевної

© М.В. Целевич, С.М. Мандзинець, Д.І. Санагурський

порожнини. Ікру запліднювали в чашках Петрі суспензією спермійв. Через 5–10 хв після запліднення зиготи відмивали та інкубували при 20–22 °С у фізіологічному розчині Гольтфрета. Mg^{2+} -залежну, Na^+ , K^+ -активовану АТФазу активність визначали в гомогенаті зародків в'юна на різних стадіях поділу бластомерів.

Для цього зародки в'юна гомогенізували за допомогою гомогенізатора Поттера–Ельвенгейма у розчині Гольтфрета. Гомогенат центрифугували 15 хв при 1600 g. Для дослідження Na^+ , K^+ -АТФазної активності проводили інкубацію супернатанту (0,1 мл) у 1 мл певного середовища при 25 °С протягом 15 хв. Для визначення сумарної АТФазної активності використовували стандартне середовище інкубації такого складу (ммоль/л): АТФ – 3,0, $MgCl_2$ – 3,0, $NaCl$ – 100,0, KCl – 30,0, буфер тріс- HCl – 30,0 (рН 7,4; 37 °С). Загальну АТФазну активність оцінювали за вмістом P_n у середовищі інкубації ферменту, кількість якого визначали за модифікованим методом Фіске–Суббароу [12]. Na^+ , K^+ -АТФазну активність визначали за різницею між вмістом P_n у середовищі при додаванні та за відсутності уабаїну (1 ммоль/л). Вміст білка в суспензії мембран визначали за методом Лоурі [30].

У роботі досліджували вплив таких антибіотиків, як бороцин і норфлоксацин (в обох випадках діюча речовина – фторхінолон офлоксацин) у діапазоні концентрацій 5–25 мкг/мл. Розчини антибіотиків відповідної концентрації вносили у інкубаційне середовище безпосередньо під час

реакції для визначення ферментативної активності Na^+ , K^+ -АТФази.

Математичне та статистичне опрацювання результатів здійснювали за допомогою програмного пакету Microsoft Excel, достовірність змін встановлювали за критерієм t Стьюдента [6].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Загальна АТФазна активність зародків в'юна після інкубації супернатанту на стадії двох бластомерів за нормальних умов становила $(29,0 \pm 0,6)$ мкмоль $P_n \cdot mg^{-1}$ білка $\cdot год^{-1}$ ($n=10$). Уабаїнчутлива АТФазна активність зародків в'юна була $(14,5 \pm 0,4)$ мкмоль $P_n \cdot mg^{-1}$ білка $\cdot год^{-1}$ ($n=10$; рис. 1), що складає $50,0 \% \pm 1,2 \%$ від загальної АТФазної активності. Na^+ , K^+ -АТФазна активність зародків в'юна поступово достовірно збільшується протягом двох наступних стадій розвитку зародків. Максимального значення ферментативна активність Na^+ – K^+ -насоса досягала на стадії VIII поділу бластомерів (270 хв) і становила $(17,2 \pm 0,7)$ мкмоль $P_n \cdot mg^{-1}$ білка $\cdot год^{-1}$ ($n=10$). На 6-й годині розвитку (X поділ бластомерів) спостерігається незначне зменшення активності Na^+ , K^+ -АТФази на $3,2 \% \pm 0,4 \%$ відносно активності на першій годині розвитку.

На рис. 2,а представлено значення Na^+ , K^+ -АТФазної активності зародків в'юна при дії норфлоксацину в діапазоні концентрацій 5–25 мкг/мл протягом раннього ембріогенезу. Як видно, додавання в середовище інкубації норфлоксацину у

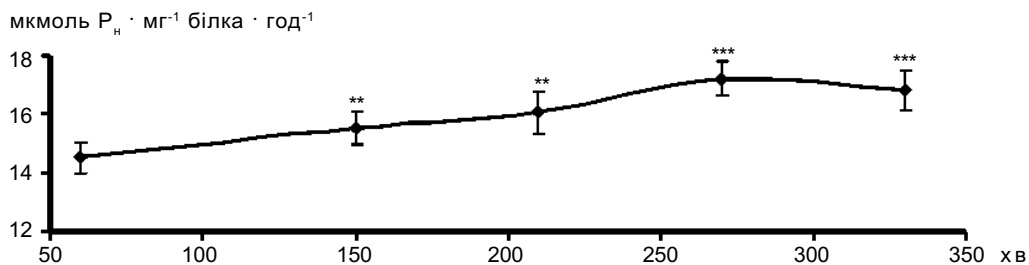


Рис. 1. Na^+ , K^+ -АТФазна активність зародків в'юна за умов норми протягом раннього ембріогенезу. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ – статистично достовірні зміни порівняно зі стадією двох бластомерів

вказаних концентраціях призводило до змін Na⁺, K⁺-АТФазної активності зародків, які набували коливального характеру протягом досліджуваних стадій. За умов впливу

антибіотика в концентрації 5–10 мкг/мл коливальні зміни ферментативної активності Na⁺, K⁺-АТФази були найбільш виражені та характеризувалися певною періо-

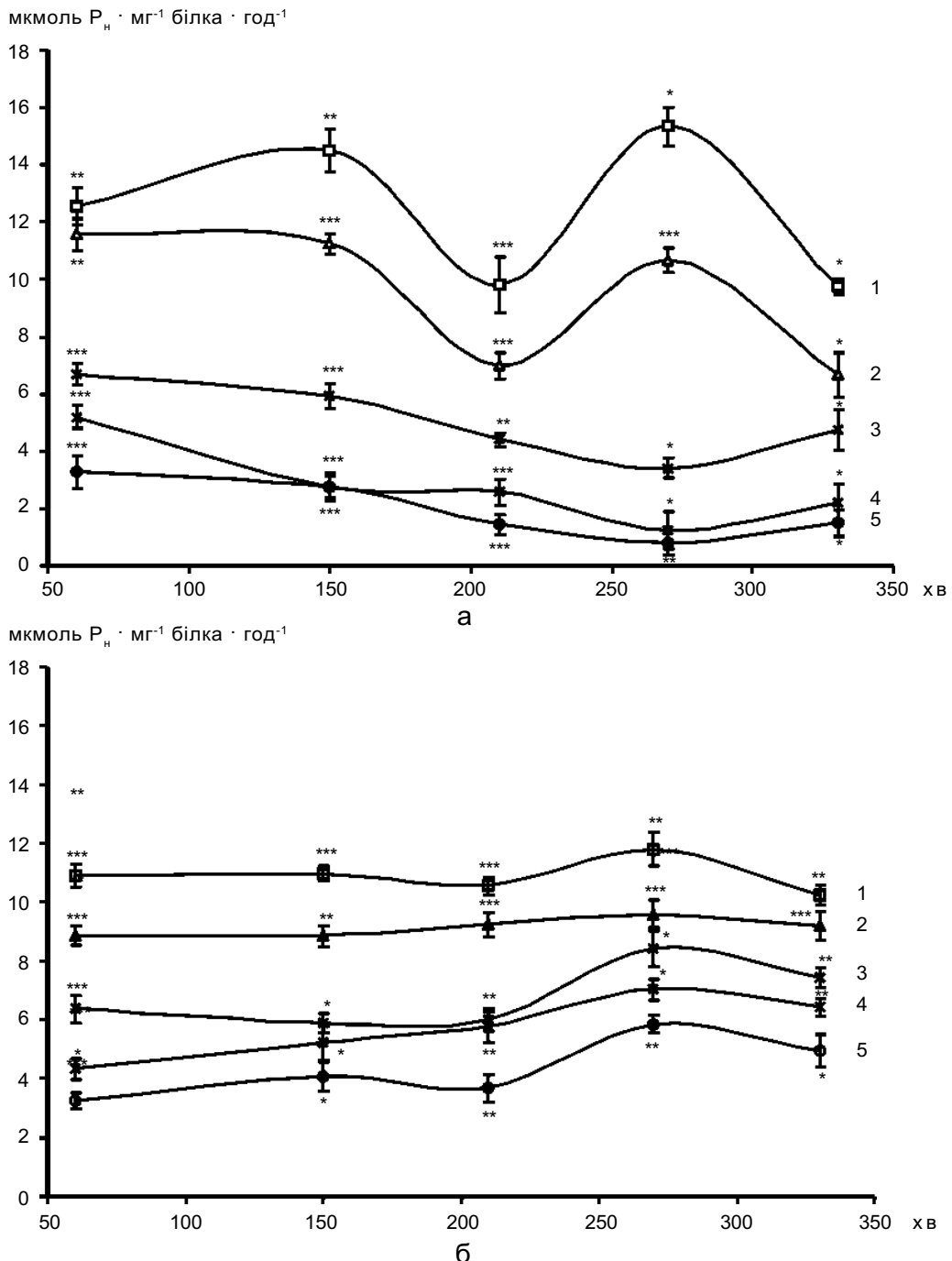


Рис. 2. Na⁺, K⁺-АТФазна активність зародків за умов впливу норфлоксацину (а) та бороцину (б) в концентрації 5 (1), 10 (2), 15 (3), 20 (4), 25 (5) мкг/мл протягом раннього ембріогенезу в'юна.

* P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001 порівняно з контролем

дичністю. Так, на стадії першого поділу (2 бластомерів, 60 хв) убаїнчутлива АТФазна активність за умов впливу норфлораксацину в низьких концентраціях зменшувалась у середньому на $22,7\% \pm 0,3\%$ ($P < 0,01$) порівняно з контролем на цій стадії, і становила $(12,1 \pm 1,1)$ мкмоль $P_n \cdot \text{мг}^{-1}$ білка $\cdot \text{год}^{-1}$ ($n=10$). Істотне зменшення Na^+ , K^+ -АТФазної активності зародків в'юна на $56,4\% \pm 0,7\%$ ($P < 0,01$) спостерігалось при дії норфлораксацину в концентрації 10 мкг/мл на стадії 64 бластомерів (210 хв) та X поділу бластомерів (330 хв). За умов впливу норфлораксацину (5 мкг/мл) Na^+ , K^+ -АТФазна активність зародків на вище вказаних стадіях розвитку була найменшою і становила $(9,7 \pm 0,4)$ мкмоль $P_n \cdot \text{мг}^{-1}$ білка $\cdot \text{год}^{-1}$ ($n=10$).

Аналогічно дія норфлораксацину у високих концентрації призводила до вірогідного зменшення Na^+ , K^+ -АТФазної активності зародків протягом раннього ембріогенезу в'юна: у концентрації 15 і 25 мкг/мл зміни Na^+ , K^+ -АТФазної активності зародків в'юна були більш вираженими, але набували характеру експоненти. При концентрації антибіотика 20 мкг/мл убаїнчутлива АТФазна активність мембран бластомерів протягом досліджуваних стадій розвитку залишалася на одному рівні і була в межах $(1,2 \pm 3,2)$ мкмоль $P_n \cdot \text{мг}^{-1}$ білка $\cdot \text{год}^{-1}$ ($n=10$). На стадії VIII поділу бластомерів (270 хв) убаїнчутлива АТФазна активність при дії норфлораксацину в концентрації 25 мкг/мл зменшувалась у середньому на $95,3\% \pm 1,6\%$ ($P < 0,01$) порівняно з контролем.

При дії бороцину (див. рис. 2,б) спостерігається подібна тенденція дозозалежного зменшення убаїнчутливої АТФазної активності, проте менш виражена. Як з'ясувалося, протягом раннього ембріогенезу для Na^+ , K^+ -АТФазної активності у разі дії бороцину в концентрації 5, 15–25 мкг/мл також характерні коливальні зміни. При дії бороцину в концентрації 10 мкг/мл Na^+ , K^+ -АТФазна активність зародків залишалася

на одному рівні і не перевищувала значень $(9,6 \pm 0,5)$ мкмоль $P_n \cdot \text{мг}^{-1}$ білка $\cdot \text{год}^{-1}$ ($n=10$). На відміну від дії норфлораксацину, наявність в інкубаційному середовищі бороцину спричинювала найсуттєвіше зменшення убаїнчутливої АТФазної активності на стадії 64 бластомерів. Бороцин у концентрації 25 мкг/мл призводив до зменшення Na^+ , K^+ -АТФазної активності зародків в'юна на $77,2\% \pm 1,9\%$ ($P < 0,001$) порівняно з контролем.

Оскільки до стадії X поділу бластомерів розвиток зародків здійснюється за рахунок генетичної інформації, яка нагромаджена в материнському організмі під час оогенезу [4], а ядро починає функціонувати на пізніших стадіях ембріогенезу, то можна зробити припущення, що вплив фторхінолонів реалізується на мембранному рівні. Відомо, що протягом періоду синхронних поділів бластомерів зародків відбуваються циклічні зміни кількості SH-груп мембранних білків [20]. Оскільки фторхінолони здатні метаболізувати з утворенням сульфометаболітів, ми припускаємо, що інгібування Na^+ , K^+ -АТФази може бути пов'язане з утворенням комплексів антибіотиків з її SH-групами. Крім цього, при дії фторхінолонів активуються вільнорадикальні процеси [14, 15], що в свою чергу призводить до дефіциту Ca^{2+} і Mg^{2+} у клітинах [7, 18, 21]. Відомо, що ці іони беруть участь у складних механізмах регуляції Na^+ , K^+ -АТФази і є ефективними модуляторами її активності [9]. Таким чином, внаслідок їх дефіциту може порушуватися робота Na^+ - K^+ -насоса.

Загалом можна сказати, що антибіотики фторхінолонового ряду норфлораксацин і бороцин у межах концентрації від 5 до 25 мкг/мл дозозалежно пригнічують Na^+ , K^+ -АТФазну активність мембран зародків в'юна. Причому зменшення активності ферменту було найбільш вираженим на пізніх стадіях ембріогенезу (VIII та X поділи бластомерів). На всіх досліджуваних

стадіях найістотніші зміни активності Na⁺, K⁺-АТФази спостерігалися при додаванні в середовище інкубації норфлоксацину в концентрації 5–25 мкг/мл. У всіх випадках ці зміни набували коливального характеру. Протягом раннього ембріогенезу для Na⁺, K⁺-АТФазної активності характерні значні зміни у разі дії бороцину в концентраціях 5, 15–25 мкг/мл, коливальний характер яких був менш виражений. Тоді як за умов впливу бороцину в концентрації 10 мкг/мл цей показник протягом усіх досліджуваних стадій залишався на одному рівні і становив у середньому 5,8 мкмоль P_n · мг⁻¹ білка · год⁻¹.

M.V. Tselevich, S.M. Madzinets, D.I. Sanagurskiy

Na⁺, K⁺-ATP-ase ACTIVITY OF THE EMBRYOS LOACH MEMBRANE MISQURNUS FOSSILIS L. UNDER THE ANTIBIOTICS INFLUENCE

The influence of some antibiotics of the fluoroquinolone classes on the Na⁺, K⁺-ATP-ase activity of loach embryo (*Misqurnus fossilis* L.) was investigated at different stages of blastomer divisions. It was determined that norfloxacin and borocin induce a dose-dependent decrease in Na⁺, K⁺-ATP-ase activity. Addition of norfloxacin (5-25 mcg/ml) into the incubation media caused pronounced oscillations in Na⁺, K⁺-ATP-ase activity, following borocin addition (5, 15-25 mcg/ml) this effect was less pronounced. A conclusion was drawn about the influence of the fluoroquinolone on the membrane level.

I. Franko Lviv National University

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бериташвили Д.Р., Кутателадзе Т.В., Маршани Д.О., Кафиани К.В. Аденозинтрифосфаты в эмбриональном развитии вьюна // Онтогенез. – 1974. – 5, №4. – С.363–371.
2. Бойко Н.М., Санагурський Д.І. Вплив антибіотиків класу фторхінолонів на динаміку трансмембранного потенціалу зародків в'юна // Біологія тварин. – 2000. – 2, №2. – С.135–137.
3. Гойда Е.А., Медьна И.Р., Санагурский Д.И., Стельмах Н.С. Характеристики электрофизиологических параметров мембран эмбриональных клеток вьюна при ингибировании Na⁺, K⁺-АТФазы // Онтогенез. – 1989. – 20, №2. – С. 164–170.

4. Гойда О.А. Биофизические аспекты раннего онтогенеза животных. – К.: Наук. думка, 1993. – 224 с.
5. Гринюс Л.П. Транспорт макромолекул у бактерий. – М.: Наука, 1986. – 240 с.
6. Деркач М.П., Гумецький Р.Я., Чабан М.Е. Курс варіаційної статистики. – К., 1977. – 206 с.
7. Егоров А.М., Сазыкин Ю.О. Фторхинолоны и проблемы молекулярного механизма их действия // Антибиотики и химиотерапия. – 2000. – 45, №8. – С. 3–5.
8. Конев С.В., Канер Г.В. Трансмембранный электрический потенциал как регулятор функциональной активности биомембран // Биофизика. – 1988. – 32, №6. – С. 1018–1022.
9. Кравцов А.В., Кравцова В.В. Регуляция Na⁺, K⁺-АТФазы: эффекты ионов Mg²⁺ и Ca²⁺ // Укр. біохім. журн. – 2001. – 73, №2. – С. 3–27.
10. Лопина О.Д. Na⁺, K⁺-АТФаза: структура, механизм и регуляция активности // Биол. мембраны. – 1999. – 16, №6. – С. 584–603.
11. Медьна И.Р., Гойда Е.А., Брежестовский П.Д. Механо-чувствительные калиевые каналы – один из факторов колебаний потенциала покоя в раннем эмбриогенезе вьюна // Там же. – 1988. – 5, №9. – С. 960–969.
12. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен). Учеб. пособие / Под ред. М.И. Прохоровой. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. – 272 с.
13. Нейфах А.А. Молекулярная биология процессов развития. – М.: Наука, 1977. – 311 с.
14. Падейская Е.Н. Артротоксичность хинолонов и фторхинолонов в эксперименте: характер поражений и возможный механизм действия // Антибиотики и химиотерапия. – 2000. – 45, №8. – С. 36–41.
15. Падейская Е.Н., Яковлев В.П. Антимикробные препараты группы фторхинолонов в клинической практике. – М.: Наука. – 1998. – 351 с.
16. Brodsky J. L. Insulin activation of brain Na(+)-K(+)-ATPase is mediated by alpha 2-form of enzyme // Amer. J. Physiol. Cell. Physiol. – 1990. – 258, May. – P. 812–817.
17. Cornelius, F. The Sodium Pump. Biomembranes, JAI Press. Lee, A.G, 1996. – P. 133–184.
18. Forster C.S., Shakibaei M., Schilcher H. et al. Expression of beta 1 integrins on epiphyseal chondrocytes is reduced by ofloxacin // Drugs. – 1995. – 49. – P. 279–282.
19. Lowry O.H., Rosebrough N. G., Farr A.L., Randall R.C. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – 193, № 1. – P. 265–275.
20. Rapkine L. Chemical processes during cellular division // Ann. physiol. et phys.-chim. biol. – 1931. – 7. – P. 382–417.
21. Stahlmann R., Lode H. Safety overview. Toxicity, adverse effects, and drug interaction / Ed. Andriole V.T.ed. – London; New York; Tokyo, 1998. – P. 369–415.

Матеріал надійшов до редакції 30.10.2003