

УДК 597.551.2-131+57.037

**ВПЛИВ рН СЕРЕДОВИЩА НА АКТИВНІСТЬ  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази В'ЮНА *MISGURNUS FOSSILIS* L. ВПРОДОВЖ РАНЬОГО ЕМБРІОГЕНЕЗУ**

Бура М.В.

Львівський національний університет імені Івана Франко

E-mail: mcelevych@yahoo.com

Надійшла до редакції 06.05.2009

Досліджено залежність активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази зародкових клітин в'юна *Misgurnus fossilis* L. від рН середовища впродовж синхронних поділів бластомерів. Встановлено, що оптимум рН для  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази зародків в'юна знаходиться в межах  $7,0 \div 7,5$  на усіх досліджуваних стадіях, а залежність між активністю АТФази та рН середовища набуває куполоподібного характеру. Вважаємо, що такий характер залежності активності мембранного ферменту зародків залежить від швидкості зв'язування субстрату реакції з активним центром ферменту за різних значень рН, ймовірно, зумовлений появою в молекулах АТФази ділянок із різною спорідненістю до нуклеозидтрифосфату на різних стадіях ембріогенезу. Крім цього максимальну початкову швидкість ( $V_0$ ) АТФ-гідролазної реакції зародків виявлено за присутності 500 мкг білка/мл на досліджуваних стадіях поділу розвитку. Такі зміни активності мембранозв'язаного ферменту зародків пов'язані також з підвищенням інтенсивності експресії молекул ферментів упродовж раннього ембріонального розвитку зародків.

**Ключові слова:**  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза, зародки в'юна, рН, поділ бластомерів.

**ВСТУП**

$\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -активована,  $\text{Mg}^{2+}$ -залежна-АТФаза (АТФ-гідролаза, убаїнчутлива  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -помпа, ЕС 3.6.1.37) – електрогенний  $\text{Ca}^{2+}$ -незалежний,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-залежний транспортувальний білок плазматичної мембрани здійснює енергозалежне і протилежно спрямоване перенесення одновалентних іонів  $\text{Na}^+$  і  $\text{K}^+$  (співвідношення 3:2), внаслідок чого електрохімічні градієнти підтримуються на рівні функціонування клітини у нормі [1].

$\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза належить до АТФаз Р-типу ( $\text{P}_2$ -підтипу АТФаз). Структурною та функціональною основою  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази є  $\alpha$  та  $\beta$ -субодиниці. Каталітичний центр і центри зв'язування  $\text{Na}^+$  та  $\text{K}^+$  локалізовані в  $\alpha$ -субодиниці ферменту, що міститься в цитоплазмі [1-3]. У структурі  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази сперматозоїдів ідентифіковано унікальну  $\alpha 4$ -субодиницю, інгібування експресії якої призводить до пригнічення їхньої рухливості [4]. При цьому, слід відзначити, що  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза сперматозоїдів відіграє ключову роль як у забезпеченні їхньої рухливості [4], так і здатності до запліднення яйцеклітин [5].

Відомо, що  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -помпа не тільки підтримує співвідношення  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  у цитоплазмі [6], а зумовлює збільшення рівня трансмембранного потенціалу (ТМП) [6-7] й відповідає за осмотичність бластоцелю зародків в ранньому розвитку в'юна [8]. Активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази яйцеклітин в'юна [9, 10], *Xenopus laevis* [11], морського їжака [9] низька або відсутня в ооцитах, а після запліднення різко знижується і швидко відновлюється в період ранньої – середньої бластули. Більше того, Гойдою з співавт. [6, 12-13] доведено, що активний транспорт іонів  $\text{Na}^+$  та  $\text{K}^+$  є одним із факторів, що зумовлюють коливний характер ТМП зародків в'юна протягом ембріогенезу.

Через 5 – 6 год після запліднення яйцеклітин морського їжака [9] спостерігається різке зниження  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазної активності: у більшості випадків замість активації спостерігалось пригнічення оубаїнчутливої АТФази іонами  $\text{K}^+$ . Після чого спостерігалось таке ж швидке відновлення  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазної активності, яке супроводжувалось більш повільним, поступовим її підвищенням протягом всього ембріонального розвитку. Очевидно, зниження  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазної активності на стадії ранньої бластули має суттєве значення для фізіології зародка на ранній стадії розвитку, хоча ніяких даних з цього питання не має. Регулювання

$\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазної активності перед утворенням бластоцелю і нейрулою формується за рахунок різних складних регуляторних механізмів [14].

У зародків протягом дроблення (на стадіях від зиготи до 64 бластомерів) виявлено періодичні зміни pH, синхронні з циклами поділу та зміною ТМП. Періодичні зміни рівня pH цитоплазми у ході дроблення не пов'язані з активацією  $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}^+$ -обміну [15-16]. Вважають, що залуження лише частково проходить за рахунок активації  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обміну внаслідок зміни внутріклітинної концентрації іонів  $\text{Na}^+$  [6]. У роботах [17-18] показано існування взаємозв'язку між активностями  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обміну і  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази. Як і кожен фермент,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза характеризується кінетичними [19] та каталітичними властивостями, з'ясування останніх, включаючи і залежність активності АТФ-гідролази зародків від pH середовища, є необхідним для розуміння як закономірностей функціонування  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -помп за фізіологічних умов, так і при патологічних станах, протягом ембріогенезу. Це в свою чергу матиме важливе і актуальне значення для подальшого розуміння ролі реакції  $\text{Mg}^{2+}$ -залежного ферментативного гідролізу АТФ у забезпеченні внутрішньоклітинного іонного гомеостазу зародків в ембріогенезі.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дослідження проводили на зародках в'юна (*Misgurnus fossilis* L.) через 60, 150, 210, 270 і 330 хв після запліднення яйцеклітин під час стадій, які відповідають першому дробленню зиготи (2 бластомери), четвертому (16 бластомерів), шостому (64 бластомери), восьмому (256 бластомерів) та десятому (512 бластомерів). Овуляцію стимулювали внутрішньом'язовим введенням самкам хоріогонічного гонадотропіну (500 од.). Ікру одержували через 36 год після стимуляції та запліднювали в чашках Петрі суспензією спермійів з Нейфахом [20]. Стадії розвитку контролювали візуально під бінокулярним мікроскопом МБС-9.

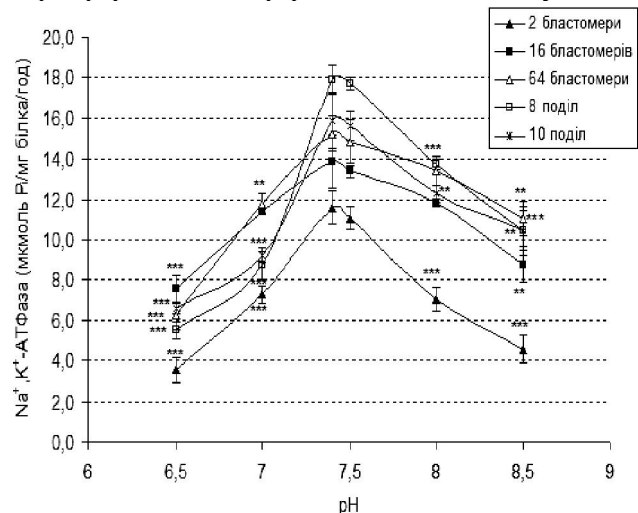
Мікросомальну фракцію мембран зародків одержували методом диференційного центрифугування у градієнті густини сахарози, як було описано у статті [21]. Перед початком експерименту аліквоти суспензії мембранного препарату переносили в стандартне середовище інкубації наступного складу (ммоль/л):  $\text{NaCl}$  – 30,0;  $\text{KCl}$  – 125,0;  $\text{MgCl}_2$  – 3,0; *трис*- $\text{Cl}$  – 50,0 (pH=7,4;  $t=21^\circ\text{C}$ ). АТФ-гідролазну реакцію ініціювали додаванням 3 ммоль/л АТФ та інкубували 15 хв при  $t=21^\circ\text{C}$ , а зупиняли додаванням 10% ТХО. Активність досліджуваного ферменту визначали за різного pH середовища 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазну активність визначали за різницею між вмістом  $\text{P}_i$  (неорганічного фосфату) у стандартному безкальцієвому середовищі при додаванні та за

відсутності убаїну (1 ммоль/л). Питому активність АТФазної системи зародків оцінювали за різницею вмісту  $\text{P}_i$ , що утворився в середовищі інкубації різного складу за наявності та відсутності фрагментів мембран з урахуванням поправки на вміст ендogenous  $\text{P}_i$  у мембранному препараті й виражали в мкмольях  $\text{P}_i$  у перерахунку за год на 1 мг білка. Кількість  $\text{P}_i$  визначали за методом Фіске-Суббароу [22].

У дослідженнях використовували реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації х.ч., а також EGTA,  $\text{NaN}_3$  («Merk», Німеччина), убаїн («Fluka», Швейцарія), АТФ («Acros», Бельгія), Tris («Sigma», США). Достовірність змін встановлювали за t-критерієм Стьюдента [23]. Обчислення лінеаризованих графіків проводили з використанням найменших квадратів (значення коефіцієнта кореляції  $r$  становило 0,90-0,99).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза каталізує транспортування іонів натрію та калію крізь мембрану за гідролізу однієї молекули АТФ. Це спряжено зі зміною конформаційного стану молекули ферменту  $E_1$  (висока спорідненість до АТФ і внутрішньоклітинних іонів  $\text{Na}^+$ ) на  $E_2$  (висока спорідненість до зовнішньоклітинних іонів  $\text{K}^+$ , відповідно низька спорідненість до іонів  $\text{Na}^+$ ) [1, 3, 24], унаслідок чого нуклеодтрифосфат, як субстрат ферментативної реакції підвищує швидкість конформаційного переходу  $E_2 \rightarrow E_1$ , вивільнення трьох іонів  $\text{Na}^+$  у позаклітинне середовище і введення двох іонів  $\text{K}^+$  у клітину, та дефосфорилування ферментативної молекули.



**Рис. 1.** Зміни активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази зародків в'юна впродовж раннього ембріогенезу в залежності від pH середовища (\* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$  – вірогідні зміни порівняно із значеннями активності АТФази за pH=7,4).

Ефективність перебігу фаз гідролітичного циклу роботи  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази, зростає в залежності

від зв'язування АТФ з регуляторним центром, що в свою чергу пов'язане зі зміною рН середовища, зокрема, внутрішньоклітинного [2]. Оскільки зміна рН середовища призводить до зміни ступеня іонізації кислотних та основних груп не тільки активного центру ферменту, але й самого субстрату.

Відомості стосовно впливу рН на функціонування  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази плазматичних мембран (ПМ) зародкових клітин в'юна протягом раннього ембріогенезу практично відсутні, тому нами були проведені дослідження для з'ясування залежності активності АТФ-гідролази від рН середовища (від 6,5 до 8,5) упродовж синхронних поділів бластомерів: від стадії першого поділу (2 бластомери) до 10 стадії поділу бластомерів (1026 бластомерів) (рис. 1).

У результаті проведених досліджень встановлено, що залежність активності досліджуваної АТФази ПМ зародкових клітин від рН середовища є куполоподібною, практично на усіх досліджуваних стадіях розвитку зародків (рис. 1). Встановлено, що  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза характеризується високою активністю в межах рН середовища від 7,0 до 8,0, і досить низькою АТФ-гідролазною активністю за рН 6,5 та 8,5. При останніх значеннях рН середовища активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази зародків в'юна знижувалася в середньому на  $60,4 \pm 6,3$  та  $40,2 \pm 4,1\%$  відповідно у порівнянні з контролем (рН=7, 4). Значення  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазної активності бластодерм зародкових клітин рН=7,5 достовірно не відрізняється від значень ферменту при рН середовища 7,4, за останніх умов активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази зародків набувала максимальних значень на усіх досліджуваних стадіях розвитку зародків. Отже рН в оптимумі відповідає найкращому зв'язуванню АТФ досліджуваним ферментом зародків і найбільшою швидкістю каталізу. Крім цього встановлено, що максимального значення на восьмій стадії поділу зародків в'юна досягає  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза [25], як і уабайнрезистентна базальна  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФаза зародків [26]. Значення  $V_{max}$  за АТФ дещо відмінні на досліджуваних стадіях розвитку зародків, для них також характерна тенденція до зростання. Слід зазначити, що як і у випадку загальної питомої активності АТФази, максимальне значення  $V_{max}$  характерно на 8 поділі бластомерів [19].

Так при дослідженні характеру роботи  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази на зародках морських їжаків *Strongylocentrotus purpuratus* і *Litechinus pictus* [9], показано, що активність АТФ-гідролази для незаплідненої яйцеклітини та при заплідненні майже ідентична, а швидке зростання  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазної активності відбувається від стадії бластули до стадії ранньої гастрული, після чого

залишається незмінною до стадії вилуплення. Подібні зміни  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазної активності до стадії ранньої гастрული описано й для іншого виду морського їжака *Hemicentrotus pulcherrimus* [27]. У кінці періоду синхронних поділів бластомерів (6-7 години розвитку) активуються макромолекулярні синтези, особливо масивний синтез нових мРНК [28], що вимагає значних енерговитрат і приводить до перерозподілу клітинних макроергів, з чим імовірно й пов'язана відмінність ферментативної активності енергозалежних систем транспорту на цьому етапі розвитку у порівнянні із першими поділами бластомерів.

На перших трьох стадіях поділу бластомерів (2, 16 та 64 бластомери) активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази плавно зростала при підвищенні рН до норми (рН 7,4), а при подальшому підвищенні рН середовища спостерігали поступове зниження активності ферменту. Тоді як на 8 і 10 поділах бластомерів відмічено стрімке зростання активності АТФази при підвищенні рН до значень 7,4. Припускають, що такі зміни активності мембранозв'язаних ферментів пов'язані з підвищення інтенсивності експресії молекул цих ферментів упродовж раннього ембріонального розвитку зародків (тобто перших годин розвитку).

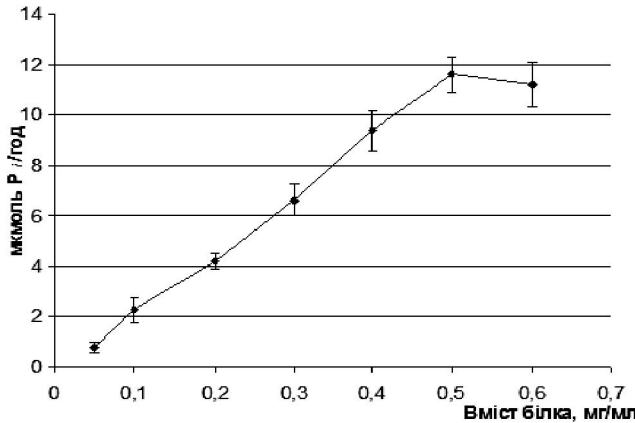
Відповідно при зміні рН середовища змінюється спорідненість субстрату (в даному випадку АТФ) до активного центру фермента, а це насамперед впливає й на каталітичний механізм реакції.

Harris і Bayliss [29] показали, що вибіркова проникність епітелію зябер креветки *Penaeus chinensis* Osbeck для іонів  $\text{Na}^+$  корелює з специфічною активністю  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази епітелію. Зниження осмотичності, а також втрата іонів гемолімфи (в основному іонів  $\text{Na}^+$ ) супроводжується входом молекул води в цих ракоподібних. Крім цього показано, що активний транспорт іонів  $\text{Na}^+$  та  $\text{K}^+$  інгібується при зниженні рН до значень 4,6-5,0, тоді як пасивна проникність для цих іонів у слизових оболонках навпаки зростає [30]. Отже зниження активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази при рН 6,0 та 8,5 переважно зумовлене ініціацією зниження потоку  $\text{Na}^+$  через мембрани зародкових клітин.

З метою вивчення особливостей активності ферментів, в тому числі й мембранозв'язаних, визначали початкову швидкість ( $V_0$ ). Зважаючи на залежність активності ферменту зародків від вмісту білка в мембранному препараті везикул та здатність до її пригнічення за високих його концентрацій, АТФ-гідролазну реакцій ініціювали додаванням до середовища інкубації 50-500 мкг білка/мл (рис. 2).

Було з'ясовано, що поступове підвищення його концентрації спричинює досить стрімке зростання  $V_0$   $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазної реакції, яка досягає максимальної

величини за 500 мкг білка/мл ( $V_0=11,6\pm 0,8$  мкмоль P<sub>i</sub>/год) на стадії 2 бластомерів і надалі вірогідно не змінюється. На наступних досліджуваних стадіях розвитку зародків відмічено подібний характер змін  $V_0$  відносно концентрації білка у середовищі інкубації.



**Рис. 2.** Залежність початкової швидкості  $V_0$  реакції  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -активованого,  $\text{Mg}^{2+}$ -залежного гідролізу АТФ у мікосомній фракції мембран зародків в'юна на стадії 2 бластомерів від вмісту білка ( $n=10$ ).

Слід зазначити, що оптимум pH для  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази зародків в'юна знаходиться в межах  $7,0\div 7,5$  упродовж синхронних поділів бластомерів. Подібну залежність між значеннями pH середовища та активністю  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази, метаболічними процесами і концентрацією фосфору виявлено й для епітелію зябер та м'язів креветки *Penaeus chinensis* Osbeck [30]. Ефект впливу pH на виживання, активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази зябер та метаболічні процеси у м'язах має чітко виражену залежність від низьких (6,0) до високих значень pH (8,0).

Таким чином, одержані експериментальні дані доцільно застосовувати з метою подальшого з'ясування молекулярних та мембранних механізмів підтримання внутрішньоклітинного іонного гомеостазу зародків упродовж ембріогенезу.

## ВИСНОВКИ

Отже, встановлено, що залежність активності досліджуваної  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази ПМ зародкових клітин в'юна від pH середовища є куполоподібною, практично на усіх досліджуваних стадіях розвитку. Оптимум pH для  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази зародків в'юна знаходиться в межах  $7,0\div 7,5$  упродовж синхронних поділів бластомерів. Такий характер залежності активності мембранного ферменту зародків залежить від швидкості зв'язування субстрату реакції з активним центром ферменту за різних значень pH, ймовірно, зумовлений появою в молекулах АТФази ділянок із різною спорідненістю до нуклеозидтрифосфату на різних стадіях ембріогенезу. Крім цього максимальну початкову швидкість АТФ-гідролізу реакцій зародків виявлено за присутності 500 мкг білка/мл на усіх

досліджуваних стадіях поділу бластомерів. Такі зміни активності мембранозв'язаного ферменту зародків пов'язані також з підвищенням інтенсивності експресії молекул цих ферментів упродовж раннього ембріонального розвитку зародків (тобто перших годин розвитку).

## Література

1. Лопина О. Д. Взаимодействие каталитической субъединицы  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы с клеточными белками и другими эндогенными регуляторами // Биохимия. – 2001. – Т.66, Вып. 10. – С. 1389-1400.
2. Jorgensen P. L., Hakansson K. O., Karlisch S. J. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: Functional sites and their interactions // Annu. Rev. Physiol. – 2003. – Vol. 65. – P. 17-49.
3. Therien A. G., Blostein R. Mechanisms of sodium pump regulation // Am. J. Physiol. Cell Physiol. – 2000. – Vol. 279. – P. 541-566.
4. Woo A. L., James P. F., Lingrel J. B. Sperm motility is dependent on a unique isoform of the Na, K-ATPase // J. Biol. Chem. – 2000. – Vol. 275, No 27. – P. 20693-20699.
5. Blanco G., Sanchez G., Melton R. J. et al. The  $\alpha 4$  isoform of the Na, K-ATPase is expressed in the germ cells of the testes // J. Histochem Cytochem. – 2000. – Vol. 48, No 8. – P. 1023-1032.
6. Гойда О. А. Биофизические аспекты раннего онтогенеза животных. – К.: Наукова думка. – 1993. – 224с.
7. Бериташвили Д. Р., Кутателадзе Т. В., Маршани Д. О., Кафуани К. В. Аденозинтрифосфаты в эмбриональном развитии вьюна // Онтогенез. – 1974. – Т.5, №4. – С.363-371.
8. Slack C., Warner A. E., Warner R. L. The distribution of sodium and potassium in amphibian embryos during early development // J. Physiol. – 1973. – Vol. 232. – P. 297-312.
9. Leong P. K. K., Manahan D. T. Metabolic importance of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity during sea urchin development // J. Exp. Biol. – 1997. – Vol. 200. – P. 2881-2892.
10. Sheldon S. Shen and Lawrence J. Burgart Intracellular Sodium during Fertilization Activity in the Sea Urchin Egg // J. Cell Biol. – 1985. – Vol. 101. – P. 420-426.
11. Han Y., Pralong-Zamofing D., Ackermann U., Geering K. Modulation of Na,K-ATPase expression during early development of *Xenopus laevis* // Dev. Biol. – 1991. – Vol. 145(1). – P.174-81.
12. Гойда Е. А., Медына И. Р., Санагурский Д. И., Стельмах Н. С. Характеристики электрофизиологических параметров мембран эмбриональных клеток вьюна при ингибировании  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы // Онтогенез. – 1989. – Т. 20, №2. – С. 164-170.
13. Медына И. Р., Гойда Е. А., Брежестовский П. Д. Механочувствительные калиевые каналы – один из факторов колебаний потенциала покоя в раннем эмбриогенезе вьюна // Биол. мембраны. – 1988. – Т. 5, № 9. – С. 960-969.
14. Rakowski R. F., Vasilets L. A., LaTona J., Schwarz W. A negative slope in the current-voltage relationship of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pump in *Xenopus* oocytes produced by reduction of external  $[\text{K}^+]$  // J. Membr. Biol. – 1991. – Vol.121(2). – P. 177-187.

15. Божкова В. П., Литинская Л. Л., Сидорова В. Ю. и др. Изменения внутриклеточного рН в клеточном цикле зародышей морских ежей в период делений дробления // Онтогенез. – 1987. – Т.18, №2. – С. 134-140.
16. Божкова В. П., Петряевская В. Б., Литинская Л. Л. и др. Внутриклеточный рН и темп развития у зародышей двух видов морских ежей и их гибридов // Онтогенез. – 1987. – Т.18, №6. – С.651-656.
17. Pavan P., Sirurd S., Ciapa B. Mechanism regulation intracellular pH in sea urchin eggs // Develop. Biol. – 1983. – Vol. 100, No 1. – P. 29-38
18. Poussegur J. The growth factor – activable  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange system: genetic approach// Trends Biochem. Sciences. – 1985. – No 10. – P.453-455.
19. Целевич М. В., Мандзинець С. М., Санагурський Д. І. Кінетичні характеристики  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази клітин зародків в'юна // Вісник Харків. ун-ту ім. В. Н. Каразіна. Серія Біофізичний вісник – 2008. – Вип. 1 (20). – С. 28-36.
20. Нейфах А. А., Тимофеева М. Я. Проблемы регуляции в молекулярной биологии развития. – М.: Наука. –1978. – 336 с.
21. Луцки М. Д., Кусень С. И., Лук'яненко А. В. Очистка и частичная характеристика плазматических мембран клеток зародышей вьюна // Онтогенез. – 1986. – Т. 17, №3. – С. 314-321.
22. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен). Учеб.пособие / Под ред. М.И. Прохоровой. – Л.: Изд-во Ленингр. Ун-та.–1982.–272 с.
23. Деркач М. П., Гумецький Р. Я., Чабан М.Е. Курс 31. варіаційної статистики. –К.: Вища шк. – 1977.– 208 с.
24. Boldyrev A. A.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase: 40 years of investigations // Membr. Cell. Biol. – 2000. – Vol. 13, No 6. – P. 715-719.
25. Целевич М. В., Мандзинець С. М., Санагурський Д. І.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азна активність мембран зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L. при дії антибіотиків // Фізіол. журн. – 2004. – Т. 50, №5. – С. 64-68.
26. Целевич М. В., Фафула Р. В., Галан М. Б., Санагурський Д. І. Ідентифікація  $\text{Ca}^{2+}$ -активованої,  $\text{Mg}^{2+}$ -залежної АТФ-гідролазної ферментативної активності мікосомної фракції мембран зародків в'юна (*Misgurnus fossilis* L.) // Укр. біохім. журн. – 2007. – Т. 79, №1. – С. 53-57.
27. Mitsunaga-Nakatsubo K., Fujiwara A., Yasumasu L. Change in the activity of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase in embryos on the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*, during early development // Dev. Growth Differ. – 1992. Vol. 34. – P. 379-385.
28. Озернюк Н.Д. Энергетический обмен в раннем онтогенезе рыб. – М.: Наука. – 1985. – 175 с.
29. Harris R. R., Bayliss D. Gill ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )-ATPases in decapod crustaceans: distribution and characteristics in relation to  $\text{Na}^+$ -regulation // Comp. Biochem. Physiol. – A90, No 2. – P. 303-308.
30. Wang W.N., Wang A.L., Chen L., Liu Y., Sun R.Y. Effects of pH on survival, phosphorus concentration, adenylate energy charge and  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPase activities of *Penaeus chinensis* Osbeck juveniles // Aquat Toxicol. – 2002. – Vol. 60(1-2). – P. 75-83.

## ВЛИЯНИЕ pH СРЕДЫ НА АКТИВНОСТЬ $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТФазы ВЬЮНА *MISGURNUS FOSSILIS* L. НА ПРОТЯЖЕНИИ РАННЕГО ЭМБРИОГЕНЕЗА

Бура М.В.

Исследовано изменения активности  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы зародышей вьюна *Misgurnus fossilis* L. в зависимости от pH среды на протяжении синхронных делений бластомеров. Установлено, что оптимум pH для  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы зародышей вьюна составляет в пределах 7,0÷7,5 на протяжении исследуемых стадий развития, а зависимость между активностью АТФазы и pH среды имеет колоколообразную форму. Считаем, что такой характер зависимости между активностью фермента зародышей и pH среды зависит от скорости связывания субстрата реакции с активным центром самого фермента, возможно обусловленный содержанием в молекулах фермента АТФазы центров с различным сродством к нуклеозидтрифосфату на разных стадиях эмбриогенеза. Кроме того, максимальное первичное ускорение ( $V_0$ ) АТФ-гидролазной реакции зародышей идентифицировано за содержания в среде инкубации 500 мкг белка/мл на исследуемых стадиях деления. Такие изменения активности мембранного фермента зародышей тоже зависят от повышения интенсивности экспрессии самых ферментов на протяжении раннего эмбрионального развития.

**Ключевые слова:**  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза, зародыши вьюна, pH, деление бластомеров.

## EFFECTS OF pH ON THE $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase ACTIVITIES OF *MISGURNUS FOSSILIS* L. DURING EARLY EMBRYOGENESIS

Bura M.V.

The effects of pH on the activity of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase of the loach embryos *Misgurnus fossilis* L. during early embryogenesis (from stage 2 blastomers to 10th blastomers divisions) were observed. The results showed that optimum pH for maximum values of embryos  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase was 7,0÷7,5 during investigated stages; and the this dependence has campaniform character. The maximum  $V_0$  of ATP hydrolysis in embryos was observed protein content in the medium 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  during early embryogenesis. This data expedient to use in investigations for clarification molecular and membrane mechanisms of maintenance ionic homeostasis in embryos during embryogenesis

**Key words:** :  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, embryo loach, pH, blastomers division.