БІОФІЗИКА КЛІТИНИ

УДК:612.014.462.4:612.014.23:576.35:591.134

АНАЛІЗ МЕХАНІЗМІВ ПЕРЕНОСУ ОСНОВНИХ ПОТЕНЦІАЛГЕНЕРУЮЧИХ ІОНІВ В РАННЬОМУ РОЗВИТКУ ТВАРИН

З.Я. Іваницька

Кафедра біофізики

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

вул. Пекарська, 69, Львів 79010

e-mail: depbioph@meduniv.lviv.ua

Надійшла до редакції 28 квітня 2005 р.

Проведено літературний огляд біофізичних, біохімічних та фізіологічних параметрів зародка, що розвивається. Зокрема, акцентовано увагу на зв'язок зміни співвідношення K^+/Na^+ з процесами розвитку, можливість прямого впливу трансмембранного потенціалу на активність мембранних білків, в тому числі і системи транспорту іонів та механізми переносу основних потенціалгенеруючих іонів у ранньому розвитку риб та амфібій, на основі яких можна запропонувати послідовність протікання мембранозв'язаних процесів в клітинному циклі зародків тварин під час дроблення бластомерів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: дроблення, мембранозв'язані процеси, трансмембранний потенціал, бластомери риб і амфібій, мітотичний цикл.

Однією з головних функцій плазматичної мембрани є регуляція іонного гомеостазу клітини, регуляція розмноження ембріональних клітин, а також є місцем морфогенетичних проявів раннього розвитку, виразною рисою якого є періодичність подій, пов'язаних з іонними потоками і формуванням іонних градієнтів. Припускається, що електричний контроль є домінуючим у ранньому розвитку тварин, проте не має переконливих експериментальних даних котрі б підтверджували ці гіпотези [1-6].

Клітинні мембрани ооцитів і зародків, як і мембрани дорослих клітин, селективні [7, 8]. Результатом цієї властивості є встановлення на мембранах електричного (трансмембранного) потенціалу (ТМП), величина якого і, відповідно, відносна проникність мембрани для малих іонів змінюється на різних стадіях розвитку [9].

З точки зору фізіології клітини, одна з основних функцій мембран полягає у підтриманні трансмембранної різниці концентрацій іонів K^+ і Na^+, від якої залежить наявність мембранного потенціалу. Основним з факторів, який підтримує іонну асиметрію клітини є аденозинтрифосфатазна (АТФазна) система, активована іонами калію, натрію та магнію [10]. Зокрема, Na^+, K^+-АТФаза цитоплазматичних мембран клітин має важливе значення для процесів клітинної фізіології та ембріогенезу [11-14].

Дослідження механізмів поділу клітин є однією з основних проблем сучасної біології. Особливої уваги заслуговують зародкові клітини – бластомери, початок дроблення яких є строго синхронним, ритмічним процесом, що протікає для кожного виду тварин з відповідною йому швидкістю [4, 15-17].

Клітинний поділ не є рушієм ритму метаболічних процесів, оскільки його інгібування не зупиняє періодичних коливань ряду показників. У дослідах з енуклеацією і пересадкою ядер на зародкових клітинах виявлено, що в період дроблення геном не визначає темпу дроблення бластомерів, а фактори, що регулюють частоту мітозів, знаходяться в цитоплазмі [4, 18]. Крім того, регуляція активності самих генів, що здійснюється специфічними факторами в кожному мітозі, значною мірою залежить від внутріклітинного співвідношення одно- і двовалентних катіонів. У свою чергу зміни вмісту у клітині калію і порушення K^+/Na^+ співвідношення ефективно впливають на темп проліферації [4].

Мембранні і цитоплазматичні процеси тісно пов'язані між собою, і домінуючими, регулюючими процесами у період раннього ембріогенезу є саме цитоплазматичні процеси [19-21]. Вони впливають не тільки на внутрішні концентрації іонів, а й на провідність мембрани.

Існують механізми, які змінюють інтенсивність іонного транспорту як через новоутворену мембрану так і через всю поверхню зародка. Спроби дослідження динаміки зміни іонної провідності зародкової мембрани, не лише для калію, а й для інших іонів проведені у роботах [22, 23], де показано, що проникність плазматичної мембрани ембріонів X. laevis для іонів Na^+ і Cl^- дуже низька у порівнянні з проникністю для іонів K^+. Результати отримані на зародках в'юна та шпорцевої жаби показують, що новоутворена в процесі клітинного поділу мембрана амфібій має значно більшу проникність, ніж

мембрани бластомерів. Тоді як на поверхні старої мембрани локалізовано вхідний іонний струм, зумовлений входом іонів Na^+ і Ca^{2+} і виходом іонів Cl^-.

На ранніх стадіях розвитку зародків багатьох тварин, у тому числі й амфібій, дроблення веде до утворення бластули з великою внутрізародковою порожниною – бластоцелем [9].

В клітинах ранніх зародків амфібій натрій в основному зв'язаний, звідси і відмінність загальної концентрації натрію і активності Na^+. При утворенні бластоцеля активність Na^+ в клітинах на відміну від загальної концентрації не змінюється [23]. Припускають, що в бластоцель переходить натрій, який нагромаджений раніше в клітинах у зв'язаній формі.

Перші дослідження динаміки іонів K^+ і Na^+ проведені з використанням полуменевої фотометрії, показали, що в зародків X. laevis [3, 7, 24], R. pipiens [25], а також у аксолотля [26] проходить поступове (на 10-20% протягом кожного клітинного циклу) зменшення внутрішньоклітинного натрію і незначне (на 5- 10 %) збільшення концентрації іонів K^+. Для зародків риб [26-28], встановили, що протягом періоду дроблення бластомерів концентрація іонів натрію в цитоплазмі незмінна, тоді як концентрація іонів калію поступово збільшується. Тобто у амфібій і риб в ранньому ембріогенезі проходить поступове збільшення співвідношення K^+/Na^+ в цитоплазмі, хоча механізми цієї реалізації відрізняються [7]. Зміну співвідношення концентрації одновалентних катіонів на користь K^+ можна привести наступною послідовністю: $K^+ : Rb^+ : Cs^+ : Na^+$ (1:0,66:0,16:0,14) [4].

Слек і співавтори зазначили [28], що зміна концентрації іонів натрію протягом клітинного циклу не перевищує 2 – 3 мМ, що не може не відображатись на рівні ТМП.

Використовуючи селективні мікроелектроди, Джіллеспі [8] провів дослідження динаміки внутрішньоклітинної концентрації Na^+, K^+, Cl^- протягом періоду дроблення зародків Xenopus laevis і Ambystoma mexicanum. Виявилось, що концентрація цих іонів достовірно не змінюється. Автор вважає, що ці результати не дають повної картини розподілу іонів в цитоплазмі зародків, оскільки вимірювання проводилось лише в точці контакту мікроелектроду з цитоплазмою, тоді як зародкові клітини мають великі розміри і сильно виражену компартменталізацію.

Інтенсифікація синтезу багатьох метаболітів на стадії інтерфази, необхідних для подальшого росту клітини і забезпечення всіх властивих їй функцій, підготовка до клітинного поділу, характеризується відтворенням в основному ДНК, поліРНК, гістонів, білків мітотичного апарату та ін. веде до збільшення активності АТФазних систем, що зумовлює відповідне зростання внутрішнього заряду клітини [29].

Питанню вивчення концентрації електрогенних іонів протягом клітинного циклу дроблення бластомерів присвячено ряд робіт [9, 30, 31]. Показано, що на початку мітозу першого клітинного циклу концентрація іонів Na^+ зменшується в 6 раз і відновлюється до початку інтерфази наступного циклу. Відповідно у клітинах проходили зміни концентрацій іонів Cl^-, які, як вважають автори, компенсують зміни концентрацій іонів Na^+. Концентрація іонів K^+ протягом циклу залишалась незмінною. Констатують, що наявні градієнти іонів суттєво не змінюються протягом клітинного поділу [32].

Внутрішньоклітинна концентрація Na^+ і K^+ залежить не лише від роботи Na^+,K^+-помпи, але і від трансмембранної різниці електричних потенціалів, від величини потоків цих іонів через інші системи за градієнтом електрохімічного потенціалу [33]. Виявлено, виникнення і ріст негативного мембранного потенціалу, який досягає (як і співвідношення K^+/Na^+) плато на стадії середньої бластули [18].

Вміст іонів K^+ і Na^+ у яйцеклітинах, у досліджених видів риб, залишається у процесі розвитку достатньо постійним, це пов'язано зі слабою проникністю яйцеклітин прісноводних риб для іонів [7, 34]. Абсолютний вміст K^+ і Na^+ варіює у досить широких межах, проте величина K^+/Na^+ співвідношення є подібною для досліджуваних видів [7, 8].

Більш перспективним є аналіз зв'язку зміни співвідношення K^+/Na^+ з процесами розвитку, оскільки у всіх вивчених до цього часу видів амфібій і костистих риб це співвідношення збільшується у процесі розвитку. Припускають, що співвідношення типу поділів при переході до бластуляції запускається деякою пороговою величиною вмісту калію (чи відношення K^+/Na^+) [7], а отже і потенціалом спокою.

В гомогенатах ооцитів в'юна і осетрових риб присутні Mg^{2+} і Ca^{2+} АТФазна активності, причому перша переважає другу [35]. Плазматична мембрана гамет і клітин ранніх ембріонів характеризується наявністю потенціалозалежних кальцієвих каналів Т-типу, які беруть участь у формуванні збудливості ооцитів і відіграють важливу функціональну роль у процесі відновлення і продовження їх мейотичного дозріванняа також запліднення й подальшого розвитку зиготи [36].

Зростання провідності калієвих каналів у ранніх ембріонах миші регулюється в клітинному циклі [37, 38]. Ці канали активні в метафазі II ооцита, залишаються активними й після запліднення протягом фази G1, потім стають інертними оскільки клітинний цикл переходить через фази S і G2, і відновлюють свою активність лише під час мітозу. Зниження провідності каналів вкінці G1 і зростання на початку фази M I клітинного циклу не залежить від синтезу білка і від поділу ядра. Це свідчить про незалежність цієї транспортної системи від функціонування циклінзалежної кінази1 (cdk1-cyclin B).

Досліди з використанням інгібіторів K^+-помпи, Na^+, K^+-АТФази, Na^+/H^+–обміну, а також з видаленням із середовища іонів Na^+ чи підвищенням концентрації іонів K^+, при яких виявлено

гальмування розмноження клітин, вказують на те, що зміна потоків іонів через мембрану є обов'язковим ланцюгом при стимуляції поділу клітин [14, 39].

Активація АТФазної реакції іонами K^+ за наявності іонів Mg^{2+} і Na^+ характерна для Na^+,K^+-АТФази так само як чутливість до пригнічення специфічним інгібітором – оуабаїном або строфантином G [10]. Додавання оуабаїна в присутності $Mg^{2+} + Na^+ + K^+$ пригнічує реакцію в тій же мірі, що і виключення K^+ із реакційної суміші, підтверджуючи цим наявність Na^+,K^+-АТФазної активності в ікрі в'юна.

Виявлено закономірну зміну Na^+, K^+-АТФазної активності з розвитком [39]. Активність Na^+, K^+-АТФази яйцеклітин в'юна [14, 39], Xenopus laevis [40], морського їжака [14] низька або відсутня в ооцитах, а після запліднення різко знижується і швидко відновлюється в період ранньої – середньої бластули.

Через 5 – 6 год (10 – 12 τ_0) після запліднення яйцеклітин морського їжака [14] спостерігається різке зниження Na^+, K^+-АТФазної активності: у більшості випадків замість активації спостерігалось пригнічення оуабаїнчутливої АТФази іонами K^+. Після чого спостерігалось таке ж швидке відновлення Na^+, K^+-АТФазної активності, яке супроводжувалось більш повільним, поступовим її підвищенням протягом всього ембріонального розвитку. До 1-го поділу дроблення Na^+, K^+-АТФаза яйцеклітин жаби реактивується разом з появою і ростом мембранного потенціалу. У в'юна після запліднення величина мембранного потенціалу і вміст K^+ в зародках також зростає [18], однак причинний зв'язок цих змін з підвищенням Na^+, K^+-АТФазної активності потребує пояснень [41].

Очевидно, зниження Na^+, 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. Зниження Na^+, K^+-АТФазної активності співпадає у часі (з точністю до 1 – 2 τ_0) з рядом інших змін зародків в'юна під час розвитку. На стадії ранньої – середньої бластули різко падає мітотична активність і змінюється характер мітотичного циклу [42], різко активується синтез РНК в ядрах цілого зародку і зростає їх РНК - полімеразна активність in vitro, розпадається більша частина накопичених в оогенезі передутворених ДНК-подібних РНК яйця і відбувається "репрограмування" рибосом новоутвореними мРНК. На цьому відрізку часу можна відмітити припинення підвищення вмісту іонів K^+ в зародку і величини мембранного потенціалу. Дослідження можливих причинних зв'язків між цими корелюючими показниками може сприяти розумінню механізмів, які керують ембріональним розвитком [43].

Регулювання Na^+, K^+-АТФазної активності перед утворенням бластоцелю і нейрулою формується за рахунок різних регуляторних механізмів [44].

Пік активності Na^+, K^+-АТФази гомогенатів яєць при pH 6,85. Встановлено, що на останній стадії дроблення K^+ стимулює реакцію при всіх значеннях pH, у незапліднені ікри така стимуляція спостерігається лише в інтервалі pH 6,4 – 7,3, тоді як за межами цих значень K^+ дещо пригнічує розщеплення АТФ. Таким чином різниця між активністю в присутності K^+ і його відсутності відповідає Na^+, K^+-АТФазної активності. Na^+, K^+-АТФазна активність ікри на пізніх стадіях розвитку вища і діє у більш широкому діапазоні pH ніж в незапліднені ікрі.

Після запліднення яцеклітин проходить залуження їх цитоплазми до pH 4. 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 Na^+, H^+-обміну [45, 46]. Вважають, що залуження лише частково проходить за рахунок активації Na^+/H^+ – обміну внаслідок зміни внутріклітинної концентрації іонів Na^+ [4]. У роботах [47, 48] показано існування взаємозв'язку між активністю Na^+/H^+ -обміну і Na^+, K^+-АТФази.

Відомо також, що Na^+, K^+-АТФаза підтримує високі значеня мембранного потенціалу зародкових клітин [49, 50]. Припускають, що у зміни мембранного потенціалу зародкових клітин вносять вклад інші процеси, в тому числі пов'язані з енергетичним і окисно-відновним метаболізмом [49].

Зміна транспортних властивостей мембран клітин, які культивуються при стимуляції поділів (фібробластів, клітин печінки, пухлинних клітин), включають активацію Na^+, K^+–помпи, підсилення поглинання із середовища фосфату, глюкози, амінокислот, уридину. Паралельно в клітинах проходить збільшення концентрації [Ca]ц в цитоплазмі, збільшення цГМФ і зменшення цАМФ, підсилення обміну мембранних фосфоліпідів. Крім змін властивостей клітинної мембрани при стимуляції поділів проходить реорганізація кортикального цитоскелетного шару, що проявляється підсиленням поверхневої активності зони міжклітинного контакту. Деякі процеси в мембрані, наприклад, активація Na^+, K^+–помпи є відповіддю на зростання Na^+/H^+-обміну [30].

Багатьох дослідників зацікавив механізм, за участю якого зв'язування пептидних факторів росту з мембранними рецепторами регулює Na^+, K^+–помпу. Показано, що стимуляція потоку Na^+ всередину клітини сироваткою є кальцій – залежним процесом, і постульовано, що сироватка і очищені фактори росту викликають збільшення концентрації внутріклітинного Ca^{2+}, що в свою чергу викликає модифікацію клітинної мембрани, це веде до активації транспортних систем клітини. Окрім Ca^{2+} і кальмодуліну регулятором транспортних властивостей мембрани, очевидно є фосфоліпази, оскільки

інгібітори і активатори фосфоліпаз відповідно блокують і стимулюють чутливий до амілориду потік Na^+ через мембрану [30].

Протягом дроблення бластомерів тварин періодично змінюється жорсткість плазматичної мембрани [51]. Синхронно зі зміною структури клітинної поверхні в ранньому розвитку зародків спостерігаються коливання рівня ТМП та іонної проникності мембрани [18, 28].

Одним з факторів, який визначає характер цих коливань у зародків в'юна є механочутливі іонні канали [52, 53], описані також для інших об'єктів [54-56]. Припускають, що механочутливі канали відслідковують зміну напруження плазматичної мембрани [56]. Про це свідчить те, що коливання провідності механочутливих каналів в мембрані зародків в'юна синхронні з клітинними циклами [57]. Механочутливі калієві канали є прикладом іон транспортної системи, яка відображає стан як метаболічнозалежних систем клітини, так і клітинної поверхні та цитоскелету. Автори вважають, що мікрофіламенти цитоскелету задіяні в процесах регуляції роботи механоканалів, оскільки руйнування мікрофіламентів супроводжується зникненням механочутливості і зниженням активності каналів. Крім того, можливо, існують інші незалежні від наявності мікрофіламентів, шляхи регуляції активності каналів [58].

Відомо, що активність Na^+, K^+-АТФази залежить від фосфоліпідного складу мембрани і концентрації двовалентних катіонів (Ca^+, Mg^{2+}) [59]. Механізм дії багатьох біостимуляторів включає в себе зміну іонної проникності мембран і/або мобілізацію іонів із депо. Показано, що жирні кислоти є активними модуляторами концентрації вільних іонів [60].

Запліднення яйцеклітин морського їжака викликає вже через декілька хвилин цілий спектр морфологічних і біохімічних змін в цитоплазмі. Цим змінам передує зміна мембранного потенціалу і проникності мембрани для різних іонів: Ca^{2+}, H^+ та інших [61].

Зміна ТМП яйцеклітин морських їжаків являє собою двофазну хвилю. Спочатку відбувається зміна потенціалу від невеликого негативного (в середньому –10мВ) до позитивного (в середньому +10 – +18 мВ). Потім проходить реполяризація від позитивного мембранного потенціалу до рівня, дещо підвищеного мембранного потенціалу ооцитів. Всі ці зміни займають 60 – 120 с і названі потенціалом активації. Через 3 – 4 хв після встановлення рівня ТМП, близького до такого у ооцитів, починається нове збільшення ТМП, що досягають в наслідок 60 – 65 мВ до 20 – 30 хв після запліднення. Після того ріст мембранного потенціалу зупиняється [9, 30]. Таке явище можна порівняти з виникненням потенціалу дії у збудливих клітинах, з більш розтягнутими фазами у часі.

Очевидно, ТМП ооцитів морського їжака створюється іонами Cl^-, так як їх вміст в морській воді великий, а мембрана на цій стадії проникна головним чином для аніонів. Амплітуда потенціалу активації залежить від вмісту в середовищі іонів Na^+. Значення ТМП яйцеклітин морських їжаків після запліднення, залежить від вмісту K^+ в середовищі. Висока проникність мембрани яйцеклітин морських їжаків для K^+ після запліднення і партеногенетичної активації є причиною для обговорення ролі K^+ і високої проникності мембрани для нього в процесі активації синтезів, в тому числі білкового. Оскільки активація синтезу білків проходить одразу за збільшенням проникності мембран для K^+. Однак цей часовий зв'язок, очевидно, співпадіння. Стимуляція білкового синтезу і синтезу ДНК при заплідненні не пов'язана, очевидно, з раннім збільшенням потоку Na^+ всередину яйця. Зв'язок зміни проникності мембран для Na^+ і K^+ зі стимуляцією поділів залишається незрозумілим [9, 30].

Виявлено зміни проникності для PO_4^{3-}, Cl^-, Ca^{2+}, H^+ у яйцеклітин морського їжака, причому зміни проникності для двох останніх без сумніву пов'язані зі стимуляцією поділів. Можливо, що проникнення фосфату в яйце пов'язано з фосфорилюванням мембранних білків. Проникність мембрани для Cl^- збільшується одразу після запліднення. Концентрація Cl^- в цитоплазмі спочатку зменшується, а потім збільшується до 140 мМ. Є дані про вплив Cl^- на білковий синтез in vitro і на транспорт інших іонів через мембрану, в тому числі H^+ [9, 30].

Вважають, що виведення H^+ пов'язано із зміною транспортних властивостей мембрани. Виявилось, що вивільнення в середовище H^+ і відповідне йому збільшення $pH_ц$ є Na^+ – залежними процесами. Характеристики зміни часового підсилення виходу H^+ і входу Na^+ протягом запліднення наступні: воно починається через 20 с після контакту сперматозоїду з яйцеклітиною, триває 5 хв, не вимагає метаболічної енергії і в присутності 1 мМ KCN та 10 мМ Na^+ викликає еквівалентне нормальному збільшення pHц.

Запліднення підсилює і другий тип обміну – Na^+/K^+-обмін через мембрану ооцитів морського їжака, що зумовлює збільшення відношення K^+/Na^+ в ооплазмі від 6 до 12. Оубаїн– і хармалін – чутливий Na^+/K^+ – обмін досягає максимуму на 8-й хв після запліднення, а потім зменшується з виходом на плато на 30-й хв Активність Na^+, K^+-АТФази із кортесів яйцеклітин збільшується у 10 раз при збільшенні $pH_ц$ від 6,7 до 7,7. Очевидно, компоненти Na^+, K^+-помпи передіснують в мембрані яйця і стимулюються заплідненням. Активатором Na^+/K^+-обміну, можливо, є збільшення $pH_ц$. Нормальний ембріогенез можливий лише при визначеному відношенні K^+/Na^+ в цитоплазмі [9, 30].

Регуляція фізіологічного стану організму тісно пов'язана з циклічністю метаболічних процесів і біоритмами, динамічною основою яких вважають незатухаючі коливання концентрацій макромолекул, які виникають у зв'язку з існуванням негативних зворотних зв'язків у ланцюгах біохімічних перетворень [62, 63]. Серед параметрів, які характеризуються коливною динамікою, можна виділити окремі інтегральні показники реактивності біосистеми, яку вивчають. Так, трансмембранний потенціал являє собою трансформуючий енергетичний фонд і рушійну силу синтезу АТФ, але разом з тим втягнений у синхронування ряду ферментативних і транспортних процесів, сумування різних дій на мембрану, передачу зовнішніх сигналів до ферментів внутрішньої поверхні мембрани і т.д. Значення трансмембранного потенціалу знаходиться у строго визначених співвідношеннях з іншими фізико-хімічними і фізіологічними параметрами клітини [24], а також з рівнем її структурної і функціональної спеціалізації [26]. Автори припускають, що зсуви іонного балансу запускають метаболічні процеси у ядрі і цитоплазмі запліднені яйцеклітини і ранніх зародків [11, 13]. Накопичуються дані про виникнення мікрогрaдієнтів в примембранному шарі цитоплазми ембріональних і диференційованих клітин. Електрофізіологічні дослідження свідчать про значну подібність плазматичної мембрани яйцеклітини і диференційованих клітин [4].

Показано, що калій і натрій-залежні потенціали дії виникають при визначеному критичному ТМП і тому величини ТМП можуть відігравати роль тригерів, які активуютьють відповідні іонні канали. У зв'язку з цим виріс інтерес до механізмів виникнення подібних процесів у яйцеклітинах і зародках.

Малєнковим запропоновано гіпотезу, згідно якою саме ТМП диференційованих клітин відводять центральне місце у регуляції в тому числі трансмембранного транспорту [64]. Доведено, що густина поверхневих зарядів впливає на активність іммобілізованих ферментів [65]. Це свідчить про можливість прямого впливу ТМП на активність мембранних білків, в тому числі і системи транспорту іонів. Поверхнево активні агенти, які модифікують трансмембранний потенціал клітин, викликають спряжену зміну швидкості синтезу макромолекул. Високий темп клітинних поділів у культурі різних клітин часто супроводжується високим значенням ТМП або його зростанням у ході поділів. Експериментальна деполяризація плазматичної мембрани викликає сповільнення синтезу ДНК і білків у інтенсивно проліферуючій культурі [11, 66].

Доведено існування кореляції між величиною ТМП і швидкістю метаболічних процесів в деяких випадках, проте експерименти у цій області тлумачать неоднозначно. Ця залежність добре прослідкована на дозріваючих ооцитах амфібій, голкошкірих, ссавців [67]. Дозрівання ооцитів супроводжується незначною деполяризацією вітелінової мембрани. При дозріванні зменшується активність Na^+,K^+-АТФази і провідність мембрани. Внаслідок цих змін в ооциті різко зростає концентрація іонів Na^+. Активність катіон– і аніон-транспортних систем в плазматичній мембрані зрілого ооциту мінімальна, що узгоджується з низькою біосинтетичною активністю [67].

Найбільш суттєві зміни при дозріванні ооцита, очевидно, пов'язані не з внутрішньоклітинним середовищем, а з блокадою селективної проникності мембрани до іонів і метаболітів. Зсуви ТМП при дозріванні ооциту ссавців з допомогою іонофора в протилежну сторону – викликана гіперполяризація мембрани – гальмує дозрівання гамет, яке оцінюється моментом появи статевих тілець. Встановлено, що коливання мембранного потенціалу не пов'язане з утворенням нових борозон дроблення [7].

Початок досліджень механізмів коливань трансмембранного потенціалу в ранньому ембріогенезі поклала робота Вудворда [68]. Автором виявлено, що синхронно зі зміною трансмембранного потенціалу коливається вхідний опір мембрани (R(вх)) під час дроблення зародків жаби рідкіс. Зменшення R(вх) супроводжується гіперполяризацією мембрани, а збільшення – деполяризацією. Вудворд припустив, що зміни R(вх) проходять за рахунок коливання калієвої проникності мембрани і запропонував гіпотезу, що новоутворена протягом клітинного циклу мембрана має значно більшу калієву проникність ніж наступна мембрана [68].

Коливний характер іонної проникності мембрани також показаний для шпорцевої жаби, аксолотля, озерної жаби, в'юна. За допомогою різних методичних прийомів показано, що у них рівень ТМП найбільш чутливий до зміни зовнішньоклітинної концентрації іонів K^+ і майже не змінюється при варіюванні концентрації іонів Na^+ і Cl^-, що є наслідком калієвої природи ТМП [68].

Калієва проникність мембрани низька одразу після запліднення яйцеклітини і значно збільшується з початком закладання борозни першого поділу дроблення [23, 41, 68, 69]. Уеб і Вудвортелі показали, що до запліднення ТМП ооцита формується, в основному, завдяки хлорній провідності мембрани. При цьому калієва провідність практично не виявлена. Після запліднення протягом 20-30 хв хлорна провідність мембрани зникає, а калієва багатократно збільшується, визначаючи рівень ТМП протягом всього періоду дроблення бластомерів.

Досліджені особливості зміни калієвої проникності мембрани X. laevis у період дроблення показали, що включно до стадії 32 бластомерів вона періодично змінюється протягом клітинного циклу: значно збільшується у період утворення нової непігментованої мембрани і зменшується в момент утворення борозни дроблення. Рівень калієвої проникності мембрани зменшується протягом утворення бластоцелю.

Із досягненням стадії морули калієва проникність зовнішньої мембрани у незруйнованих зародків відсутня і сильно виражена у зародків зі зруйнованим бластоцелем. Таким чином, виникає питання важливості ролі бластоцеля у регуляції іонного транспорту через знов утворену бластодермальну мембрану. Де Лят і співавтори [70] встановили, що протягом першого клітинного циклу ТМП зародків Xenopus laevis, які розвиваються без превітелінової оболонки, коли бластоцель не утворюється, змінюється від -60мВ, тоді як у контрольних зародках рівень ТМП досягає лише -20мВ. Ці результати стали прямим доказом, що новоутворена протягом клітинного поділу мембрана амфібій має значно більшу проникність, ніж попередня. Велика частина новоутвореної мембрани не контактує із зовнішнім середовищем, а заключна в бластоцеліальному просторі, який є своєрідним внутрішнім середовищем організму на стадії ембріонального розвитку [4, 70].

Аналогічні результати отримані і на зародках в'юна, де показано, що рівень ТМП зародків із зруйнованим бластоцелем на 20-30 мВ перевищує рівень ТМП інтактних зародків [4].

Для визначення складових коливань ТМП через мембрану зародків в'юна використовували підхід, який грунтується на аналізі зміни потенціалів реверсії іонного струму. Виявилось, що поряд з коливанням калієвої провідності мембрани, потенціал реверсії якої знаходиться у межах -40÷-80 мВ проходять зміни іонної провідності з переважанням натрієвої компоненти, потенціал реверсії цих змін становить 0÷-20 мВ. Характер зміни іонного струму через мембрану зародків в'юна протягом інтерфази клітинного циклу суттєво відрізняється від такого під час мітозу. У період інтерфази зареєстрована чітко виражена компонента, зумовлена роботою Na^+, K^+-АТФази. Na^+, K^+-АТФаза відіграє важливу роль в періодичній релаксації рівня ТМП бластомерів під час дроблення, а її інгібітор оуабаїн – сприяє підсиленню іонної провідності, зміни селективності плазматичної мембрани, що в кінцевому результаті, при тривалому порушенні іонного гомеостазу веде до аномалій розвитку зародка [50]. Іонний струм, викликаний цією компонентою, інгібується оуабаїном. Під час мітозу оуабаїн залежний струм не був зареєстрований, що говорить про різну активність Na^+, K^+–помпи протягом клітинного циклу дроблення бластомерів.

На зародках тритона показано [71], що Na^+, K^+-АТФаза локалізована у новоутвореній непігментованій мембрані і її вклад в гіперполяризацію мембрани під час інтерфази першого дроблення бластомерів становить 30 мВ. У контрольних умовах рівень ТМП змінюється від –11 до –87 мВ, а після додавання оуабаїну гіперполяризація мембрани становить лише –58 мВ. Встановлено також, що в першому клітинному циклі дроблення зародків тритона активність Na^+, K^+-АТФази незначна, але вже в інтерфазі другого дроблення – збільшується, а гіперполяризація йде не лише за рахунок K^+-провідності. Виявилось, що активність Na^+, K^+-АТФази залежить від зовнішньої концентрації іонів K^+ – вона максимальна, коли $[K^+]_o$ = 10мМ.

Таким чином на основі літературних даних можна запропонувати таку послідовність протікання мембранозвязаних процесів в клітинному циклі зародків тварин під час дроблення бластомерів: деполяризація мембрани певним чином відкриває потенціал залежні Ca^{2+} -канали, що сприяє росту проникності для іонів Na^+, які активують Na^+,K^+–АТФазу і збільшують осмомолярність цитозоля. Це веде до зростання внутрішньоклітинного K^+ і, у зв'язку з надходженням H_2O в клітину, – до механічного натягування мембран, що сприяє спрацюванню механочутливих каналів і гіперполяризації мембрани. Починається інактивація Ca^{2+}–каналів, падіння Na^+ провідності, що веде до виходу з клітин Na^+, H_2O, Cl^-, зменшення натягу мембран, інактивації механочутливих натрієвих каналів і нової деполяризації мембрани. Далі цикл повторюється.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Антонов В.Ф. Мембранный транспорт // Соросовский образовательный журнал, 1997. № 6 С.14 – 20
2. Биологические мембраны и патология клетки // Под ред. А.Ф. Брюгера Рига: Зинатне, 1986, 146 с.
3. Бериташвили Д.Р., Квавивашвили И.Ш., Кафиани К.А. Изменение отношения K^+/Na^+ в зародышах вьюна на ранних стадиях развития. // Цитология. 1969. 9№5. С. 574 – 584
4. Гойда Е.А. Биофизические аспекты раннего онтогенеза животных. К. Наук. думка, 1993. – 224 с.
5. Lane M., Baltz J. M., Bavister B. D. Bicarbonate Chloride Exchange Regulates Intracellular pH of Embryos but Not Oocytes of the Hamster // Biology of Reproduction. 1999. vol. 61, P. 452 – 457
6. Tosti E., Boni R. Electrical events during gamete maturation and fertilization in animals and humans Human Reproduction Update, 2004. vol.10, No.1 P.53 – 65
7. Ротт Н.Н. Клеточные циклы в раннем эмбриональном развитии. М.: Наука, 1987. 207 с.
8. Gillespie JI. The distribution of small ions during the early development of Xenopus laevis and Ambystoma mexicanum embryos // J Physiol. 1983. vol. 344. P. 359 – 77
9. Божкова В.П., Чайлахян Л.М. Внешняя среда и развивающийся организм. М.: Наука, 1977. С. 210 – 256
10. Лисовская Н.П. Аденозинтрифосфатаза клеточных мембран и перенос ионов. // Успехи биол.химии. 1968. т.8, С. 93 – 116
11. Данко И. М., Казьмин С. Д., Колосов Е. В. Роль одновалентных катионов Na^+ и K^+ в регуляции клеточной пролиферации и биосинтеза макромолекул // Успехи совр. биологии. 1984. Т. 97. № 3. С. 366 – 377

12. Шварц В. Электрофизиология ионных переносчиков //Биологические мембраны. 2002. т.19 №1, С. 66 – 76
13. Jaffe L. F. Electrical control of development // Ann. Bioph. Biog. 1977. № 6. P. 445 – 476.
14. Leong P.K.K., Manahan D.T. Metabolic importance of Na^+, K^+-ATPase activity during sea urchin development //The Journal of Exp. Biol. 1997, vol. 200, P. 2881 – 2892
15. Детлаф Т. Клеточная дифференцировка и индукционные механизмы. – М.:Наука, 1965. – С. 147 – 159
16. Dubois, J.M. and Rouzaire-Dubois, B. Role of potassium channels in mitogenesis // Prog. Bioph. Mol. Biol. 1993. vol. 59, P. 1 – 21
17. Wonderlin W.F. Strobl J.S. Potassium channels, proliferation and G1 progression. // J. Membr. Biol. 1996. vol. 154. P. 91 – 107
18. Квавилашвили И.Ш., Божкова В.П., Кафиани К.А. и Чайлахян Л.М. Изменение мембранного потенциала яиц вьюна в раннем эмбриогенезе. // Онтогенез. 1971.– 2№2. – стр. 213 – 216
19. Маслій І.В., Санагурський Д.І. Особливості формування трансмембранного потенціалу у період раннього ембріогенезу в'юна // Physics of the Alive 2003.vol. 11, № 1, P. 72 – 79
20. Davidson, E. H. How embryos work: a comparative view of diverse modes of cell fate specification. // Development 1990. vol. 108: P. 365-389,
21. Davidson, E. H. Spatial mechanisms of gene regulation in metazoan embryos. // Development. 1991 vol. 113, P. 1-26,
22. Baud C. The Physiological Society Ionic basis of membrane potential in developing ectoderm of the Xenopus blastula // J. Physiology 1987, vol 393, Issue 1 P. 525 – 544.
23. Slack C., Warner A. Intracellular and intercellular potential in the early amphibian embryo// J. Physiol. 1973. vol. 232. P. 313 – 330.
24. Бериташвили Д.Р., Кафиани К.А., Ротт Н.Н., Квавилашвили И.Ш. Измерение содержания калия и натрия в зародышах костистых рыб и амфибий на ранних стадиях развития // Механизмы контроля эмбрионального развития. М.: Наука, 1974. С. 15 – 17
25. Kostellow A., Morrill G. Intracellular sodium ion concentration changes in the early amphibian embryo and influence of nuclear metabolism. // Exp. Cell Res. 1968. vol. 50, P. 639 – 644
26. Ротт Н.Н., Бериташвили Д.Р. Изменение содержания калия и натрия в раннем онтогенезе аскалотля // Онтогенз 1975. Т.6 №1. С. 93 – 95
27. Бериташвили Д.Р. Исследование динамики калия и натрия, аденозинтрифосфатаз и аденилатциклазы в раннем эмбриогенезе вьюна: Автореф.дис….канд.биол.наук.М., 1974. 24.
28. Slack C., Warner A., Warner R. The distribution of sodium and potasium in amphibian an embryos during earky development//J. Physiology (London) 1973. vol. 232. P. 297 – 312
29. Маслій І.В. Автоколивний характер змін трансмембранного потенціалу на ранніх стадіях ембріогенезу вюна // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. Львів, 2001. вип. 27. С. 20 – 23
30. Божкова В.П. Роль клеточной поверхности в стимуляции размножения клеток // Онтогенез. 1986. 17 №5. С. 453 – 469.
31. Cameron I.L., Hunter K.E., Smith N.K.R. Fluctuation in the intracellular concentration of Na^+ and Cl^- but not of Na^+ or Mg^{2+} at mitosis of the first cell cycle in fertilised sea urchin eggs // Cell Biol. Int. Reports. 1988. vol.12 № 11. P. 951 – 958
32. Медына И.Р., Гойда Е.А. Электрофизиологические характеристики клеточных мембран в период дробления у рыб и амфибий // Онтогенез. 1992.т.23 №2. С.117 – 129
33. Веренинов А.А., Марахова И.И. Транспорт ионов у клеток в культуре. Л.: Наука, 1986. 292 с.
34. Morrill G.A., Kostellow A.B, Murphy J.B. Role of Na^+, K^+-ATPase in early embryonic development // An NY. Acad. Sci. 1975. vol. 242. P. 543 – 560
35. Абросимова Н.М., Татарская Р.И. О свойствах аденозинтрифосфатазы в различных фракциях яиц рыб. // Биохимия. 1963. 28 вып. 3. С. 486 – 496
36. Гоцуляк Я.М., Бердинєва Т.К., Ліберт С.В. Вплив блокаторів кальцієвих каналів Т-типу на спонтанне мейотичне дозрівання овариальних ооцитів мишей in vitro// Фізіол.журн., 2002, т.48 № 1 С. 98 – 101
37. Day M.L., Pickering S.J., Johnson M.H., Cook D.I. Cell-cycle control of a large-conductance K^+ channel in mouse early embryos // Nature, 1993. vol. 365, P. 560 – 562
38. Margot L. Day, Martin H. Johnson and David I. Cook A cytoplasmic cell cycle controls the activity of a K^+ channel in pre-implantation mouse embryo. // The EMBO Journal 1998 vol.17., P. 1952 – 1960
39. Sheldon S. Shen and Lawrence J. Burgart Intracellular Sodium during Fertilization Activity in the Sea Urchin Egg // The Journal of Cell Biology. 1985.vol. 101 P. 420 – 426
40. 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.
41. Квавилашвили И.Ш. Исследование эле ктрохимических свойств клеточных мембран в раннем эмбриогенезе вьюна: Автореф. дис....канд.биол.наук. М., 1971. 25 с.
42. Ротт Н.Н., Шевелева Г.А. Изменения характера клеточных делений на ранних стадиях развития диплоидных и гаплоидных зародышей вьюна. // Цитология. 1967. 9 №10. С. 1265 – 1275
43. Бериташвили Д.Р., Кутателадзе Т.В., Маргиани Д.О., Кафиани К.А. Аденозинтрифосфатазы в эмбриональном развитии вьюна. // Онтогез. 1974. 5№4 С. 363 – 371
44. Rakowski R.F., Vasilets L.A., LaTona J., Schwarz W. A negative slope in the current-voltage relationship of the Na^+/K^+ pump in Xenopus oocytes produced by reduction of external $[K^+]$. //J. Membr. Biol. 1991. vol.121(2) P. 177 – 87
45. Божкова В.П., Литинская Л.Л., Сидорова В.Ю. и др. Изменения внутриклеточного pH в клеточном цикле зародишей морских ежей в период делений дробления // Онтогенез. 1987. т.18 № 2 С. 134 – 140.
46. Божкова В.П., Петряевская В.Б. Литинская Л.Л. и др. Внутриклеточный pH и темп развития у зародышей двух видов морских ежей и их гибридов // Онтогенез. 1987. т18. №6 С.651 – 656

47. Payan P. Sirurd S. Ciapa B. Mechanism regulation intracellular pH in sea urich eggs // Develop. Biol. 1983. vol. 100 № 1. P. 29 – 38
48. Poussegur J. The grouth factor – activable Na^+/H^+ exchange system: genetic approach// Trends in Biochemical Scienses. 1985. № 10. P.453 – 455
49. ГойдаЕ.А., Медина И.Р., Ротт Н.Н. Периодические изменения внутриклеточного pH у дробящихся зародишей вьюна не связаны с активностью Na^+/H^+ - обмена. // Онтогенез.1989. т. 20 №4 С.443 – 446
50. Гойда Е.А., Медына И.Р., Санагурский Д.И., Стельмах Н.С. Характеристики электрофизиологических параметров мембран эмбриональных клеток вьюна при ингибировании Na^+, K^+-АТФазы. // Онтогенез. 1989. т.20 №2. С.164 – 170
51. Bozkova V.P., Palmbakh L.R., Khariton V. Yu., Chailakhyan L.M. Organization of the surface and adhesive properties of cleavage furrows in the loach (Misgurnus fossilis) eggs // Exp. Cell Res. 1983. vol. 149. №1. P. 129 – 139
52. Медына И.Р., Гойда Е.А., Брежестовский Д.И. Механочувствительные калиевые каналы – один из факторов колебаний потенциала покоя в раннем эмбриогенезе вьюна // Биол.Мембраны. 1988. Т.5.№9. С.960 – 969.
53. Erdogan S., Logoglu G., Ozgunen The ionic basis of membrane potential changes from before fertilisation through the first cleavage in the egg of the frog Rana cameranoi // Gen. Physiol. Biophys. 1996. vol. 15. P. 371 – 387.
54. Gusting M.C. A mechanosensitive ion channel in the yest plasma membrane //Science. 1988. vol. 242. № 4879. P. 85 – 100
55. Martinac B., Buechner M., Delcour A.H., Adler J., Kung C. Pressure-sensitive ion channel in Escherichia coli // Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA. 1987. vol.84. P. 2297 – 2301
56. Morris C.E. Mechanosensitive ion channels //J.Membr. biol. 1990. vol. 113. P. 93 – 107
57. Брежестовский П.Д., Медына И.Р. Механоактивируемые калиевые каналы в плазматической мембране дробящихся зародышей вьюна // Докл. АН СССР. 1988. Т. 302. №4. С. 969 – 972
58. Брежестовский П.Д., Гойда Е.Р., Медына И.Р., Чабан В.В. Роль цитоскелета в регуляции циклических изменений электрических параметров мембран зародишей вьюна // Онтогенез. 1993 т. 24 № 3. С. 81 – 91
59. Механизмы регуляции транспортных систем мембран мышц. Алма-Ата: Наука, 1982. – 151 с.
60. Когтева Г.С., Безуглов В.В. Ненасищеные жирные кислоты как эндогенные биорегуляторы //Биохимия, 1998, т 63. вып.1, С. 6 – 15.
61. Божкова В.П. Динамика изменений мембранных характеристик в процессе дробления зародышей вьюна и асколотля: Автореф.дис….канд.биол.наук.М., 1974. 28 с.
62. Аршавский А.И. Физиологические механизмы и закономерности индивидуального развития. М.: Наука, 1982. – 186 с.
63. Шноль С.Э. Физико – химические факторы биологической эволюции. М.: Наука, 1979. – 263 с.
64. Маленков А.Г. Ионный гомеостаз и автономное поведение опухоли. М.: Наука, 1976. – 215 с.
65. Скулачев В.П. Биоенергетика: Мембранные преобразователи энергии М.: Высш.шк. 1989. 271 с.
66. Гринюк Л.Л. Транспорт макромолекул у бактерий. М.: Наука, 1986. – 240 с.
67. Репин В.С. Критические факторы химической регуляции развития. М.: Медицина, 1980. – 244 с.
68. Woodward P.J. Electrical signals of new membrane production during cleavage of Rana pipitns eggs//J.Cen.Physiol. 1968. vol. 52. №3 P. 509 – 531
69. Kline D., Robinson K. R., Nucitelli R. Ion current and membrane domains in the cleaving Xenopus egg // J. Cell Biol., 1983, vol. 97, P. 1753 – 1761
70. De Laat S.W., Bluemnik J.G. New membrane formation during cytokinesis in normal and cytochalasin B-treaded eggs of Xenopus leavis // J. Cell Biol. 1974. vol. 60. P. 529 – 540
71. Ohara A, Doida Y., Murayana K. et al. Na^+/K^+ pump activity in the net membrane formed at first cleavage in Cynops pyrrhogaster eggs // Dev.Biol. 1988. vol. 126, №2. P. 331 – 336