

УДК 541.64+577.352.334+597.551.2-131

ВПЛИВ НОВОСИНТЕЗОВАНОГО ПОЛІЕТИЛЕНГЛІКОЛЕВМІСНОГО НОСІЯ НА ЗМІНИ АКТИВНОСТІ Na^+ , K^+ -АТФ-АЗИ ЗАРОДКІВ В'ЮНА УПРОДОВЖ РАНЬОГО ЕМБРИОГЕНЕЗУ

Ю.С. Здвіжков, С.М. Мандзинець, ¹А.О. Рябцева, М.В. Бура, ¹О.С.-Заіченко

Львівський національний університет імені Івана Франка, вул. Грушевського 4, м. Львів,
e-mail: Zdvizhkov_Yura@ukr.net

¹Національний університет «Львівська політехніка», кафедра органічної хімії, вул. С. Бандери, 12, 79013,
м. Львів,

e-mail: zaichenk@polynet.lviv.ua

Надійшла до редакції 17 червня 2013 року

Прийнята 29 листопада 2013 року

Досліджено вплив носія VER-GMA-graft-PEG у концентраціях 10^{-6} – 10^{-18} М на Na^+ , K^+ -АТФ-азну активність зародків в'юна у період раннього ембріогенезу. Провівши апроксимацію змін активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази за впливу VER-GMA-graft-PEG на стадії 10 поділу бластомерів за концентрації 1,5 ($R^2 = 0,75$) та 3 ($R^2 = 0,94$) мМ АТФ, встановлено нелінійну залежність кінетики цього ферменту, що свідчить про змішаний тип інгібування. Згідно проведеного однофакторного дисперсійного аналізу встановлено, що зміни активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази зародків зумовлені наявністю в середовищі досліджуваного полімерного носія. Двофакторний дисперсійний аналіз не виявив суттєвих достовірних змін впливу VER-GMA-graft-PEG на активність мембранозв'язаного ферменту, однак за наявності БАР у концентрації 10^{-8} – 10^{-6} М достовірність результатів складає: $p > 0,95$ та $p > 0,99$.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: поліетиленглікольвмісний носій, активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази, тип інгібування, зародки в'юна, ембріогенез.

ВЛИЯНИЕ НОВОСИНТЕЗИРОВАННОГО ПОЛИЕТИЛЕНГЛИКОЛЬСОДЕРЖАЩЕГО НОСИТЕЛЯ НА ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ Na^+ , K^+ -АТФ-АЗЫ ЗАРОДЫШЕЙ В'ЮНА НА ПРОТЯЖЕНИИ РАННЕГО ЕМБРИОГЕНЕЗА

Ю.С. Здвизжков, С.М. Мандзинец, ¹А.О. Рябцева, М.В. Бура, ¹О.С.-Заіченко

Львовский национальный университет имени Ивана Франко, Львов, ул. Грушевского, 4, 79005,

¹Национальный университет «Львовская политехника», кафедра органической химии, ул. С. Бандеры, 12, 79013, Львов

Произведено исследование влияния носителя VER-GMA-graft-PEG в концентрациях 10^{-6} – 10^{-18} М на Na^+ , K^+ -АТФ-азную активность зародышей в'юна в период раннего эмбриогенеза. Проведя аппроксимацию измененной активности Na^+ , K^+ -АТФ-ази под влиянием VER-GMA-graft-PEG на стадии 10 деления бластомеров за концентрации 1,5 ($R^2 = 0,75$) и 3 ($R^2 = 0,94$) мМ АТФ, установлено нелинейную зависимость кинетики этого фермента, который свидетельствует о смешанном типе ингибирования. Согласно проведенного однофакторного дисперсионного анализа установлено, что изменения активности Na^+ , K^+ -АТФ-ази зародышей предопределены наличием в среде исследуемого полимерного носителя. Двофакторный дисперсионный анализ не обнаружил существенных достоверных изменений влияния VER-GMA-graft-PEG на активность мембраносвязанного фермента, однако при наличии БАР в концентрации 10^{-8} – 10^{-6} М достоверность результатов составляет: $p > 0,95$ и $p > 0,99$.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: полиетиленглицольсодержимый носитель, активность Na^+ , K^+ -АТФ-ази, тип ингибирования, зародыши в'юна, эмбриогенез.

THE INFLUENCE OF NEWLY SYNTHESIZED PEGYLATED CARRIER ON THE CHANGES OF Na^+ , K^+ -ATP-ASE ACTIVITY OF THE LOACH EMBRYOS DURING EARLY EMBRYOGENESIS

Y. Zdvizhkov, S. Mandzynets, ¹A. Riabceva M. Bura., ¹O. Zaichenko

Ivan Franko National University of Lviv, 4 Hrushevsky st., 79005, Lviv, Ukraine

¹Lviv National Polytechnic University 12, S. Bandera St., Lviv 79013, Ukraine

The evaluation of influence of VEP-GMA-graft-PEG carrier in concentrations of 10^{-6} – 10^{-18} M on the Na^+ , K^+ -ATP-ase activity in the early period of development (60 – 330 min) of loach embryos has been performed. Investigation of loach embryos morphology under the influence of BAS during early embryogenesis, revealed no significant differences in their growth compared with controls. After approximation of the change of Na^+ , K^+ -ATPase activity by VEP-GMA-graft-PEG exposure on the stage of 10th division of blastomeres in concentrations of 1,5 ($R^2 = 0,75$) and 3 ($R^2 = 0,94$) mM ATP, nonlinear dependence of enzyme kinetics has been established, indicating a mixed type of inhibition. According to the performed univariate analysis of variance it has been found that changes in the Na, K-ATPase activity of embryos were caused by the presence of polymeric carrier in the medium. Two-factor analysis of variance revealed no significant effect of changes of VEP-GMA-graft-PEG influence on the membrane enzyme activity, however under the presence of BAS in concentrations of 10^{-8} – 10^{-6} M, reliability of the results is the following: $p > 0,95$ and $p > 0,99$.

KEY WORDS: surface-active pegylated polymer, Na^+ , K^+ -ATP-ase activity, loach embryos, type of inhibition, embryogenesis.

Полімери на основі поліетиленгліколю (ПЕГ) належать до групи синтетичних водорозчинних полімерів зі структурою $(-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-)_n$. Це речовини, які диспергують, розчинні, або набухають у воді, і, таким чином, змінюють (модифікують) фізичні властивості водних систем шляхом гелеутворення, потовщення або емульгування/стабілізації [26]. Загалом, низький ступінь полідисперсності (НСП) є основною передумовою фармацевтичного застосування полімерів. Значення НСП нижче 1,1 робить полімер більш гомогенним, а це забезпечує надійне перебування в біоб'єкті впродовж певного часу [26].

Відомо [23], що біологічна толерантність, здатність іммобілізувати та звільняти певні лікарські сполуки в органі-мішені [18], утворювати стабільні дисперсні системи для цільової доставки ліків, особливо високого ступеня гідрофобності, можливість долати в організмі природні захисні бар'єри (наприклад, гемоенцефалічний), набути резистентність до ліків, є основними вимогами до полімерних носіїв для лікарських препаратів.

Враховуючи гідрофільні властивості та низьку внутрішню токсичність ПЕГ зручно застосовувати в біологічних системах. Висока гідрофільна природа ПЕГ посилює розчинність гідрофобних лікарських речовин або різного типу носіїв при їх кон'югації. Це посилює фізичну і хімічну стабільність лікарських речовин і запобігає агрегації ліків *in vivo*, а під час зберігання, як результат стеричних перешкод, "маскування" зарядів, що здійснюється шляхом формування конформаційної хмари [21].

Наявність у структурі полімерних носіїв функціональних груп, здатних до іонізації, та/або фрагментів ПЕГ, здатних взаємодіяти з клітинною мембраною та "маскувати" речовину від імунної системи, робить їх цікавими потенційними кандидатами для систем контрольованої доставки ліків. Введення в структуру полімерних носіїв фрагментів ПЕГ переважно досягається або шляхом кополімеризації з ПЕГ-вмісними мономерами малеїнатного, або акрилатого типів або шляхом реакції ПЕГ з реакційно здатними ангідридними, ізоціанатними, епоксидними та іншими групами полімерів [14].

Вважають, що в основі механізму дії поверхнево-активних речовин на живі організми є порушення функціонального стану плазматичних мембран (ПМ), обмінних процесів, водно-сольового балансу клітини, опосередкована взаємодія з мембранними ферментами і рецепторами [4, 5, 13]. Тому з біофізичної точки зору, дослідження дії полімерів на основі ПЕГ на активність мембранних ферментів зародкових клітин, плазматичні мембрани яких є важливим центром морфогенетичних перебудов у ранньому ембріогенезі та найпершою ланкою у сприйнятті різноманітних зовнішніх сигналів [1, 3] є актуальним.

Оскільки зародки в'юна (*Misgurnus fossilis* L.) у період раннього ембріогенезу є

адекватною тест-системою для дослідження впливу різних фармакологічних [16] та хімічних чинників на живі організми, і завдяки короткому періоду ембріогенезу, плазматичні мембрани зародків в'юна є зручним об'єктом для досліджень Na^+ , K^+ -АТФ-ази. **Метою роботи** було дослідити вплив носія VEP-GMA-graft-PEG на Na^+ , K^+ -АТФ-азну активність (тест-система) зародків в'юна у період раннього ембріогенезу.

МАТЕРІАЛИ Й МЕТОДИ

Дослідження проведені на зародках в'юна (*Misgurnus fossilis* L.) у період від запліднення до стадії 10 дроблення бластомерів (2, 16, 64 бластомерів, 8 (256 бластомерів) та 10 поділів бластомерів (1024 бластомери)). Овуляцію стимулювали внутрішньом'язовим введенням самкам хоріогонічного гонадотропіну (500 од.). Ікру одержували через 36 год після стимуляції та запліднювали в чашках Петрі суспензією спермійів за Нейфахом [7, 8]. Сім'яники отримували після декапітації та розтину черевної порожнини самців. Через 5-10 хв після запліднення зиготи відмивали та інкубували у фізіологічному розчині Гольтфретера при температурі 20-22°C. Стадії розвитку контролювали візуально під біокулярним мікроскопом МБС-9.

Мікросомну фракцію мембран зародків в'юна одержували методом диференційного центрифугування у градієнті густини сахарози, за методикою описаною Луциком М.Д. та ін. [6]. Зародки попередньо гомогенізували у буферному розчині наступного складу (ммоль/л): сахароза – 120,0; KCl – 130,0; MgCl_2 – 5,0; тріс-НСl – 10,0 (рН 7,4; 4°C). Рештки зародкового жовтка осаджували центрифугуванням упродовж 10 хв при 1 600 g. Надосадову рідину, збагачену фрагментами плазматичної та ретикулярної мембран, одержану після центрифугування 10 хв при 10 000 g, зберігали при температурі $t = -20^\circ\text{C}$ [6].

Перед початком експерименту аліквоту суспензії мембранного препарату (10 мкл) переносили в стандартне середовище інкубації, яке містило (ммоль/л): NaCl – 125,0; KCl – 30,0; MgCl_2 – 3,0; CaCl_2 – 0,01; АТФ- Na_2 – 3; тріс-НСl – 50,0 (рН 7,4; 21°C). Для визначення Na^+ , K^+ -АТФ-азної активності до середовища інкубації додавали 1 ммоль/л уабаїну. В інкубаційне середовище, в якому визначали активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази, додавали розчини полімеру до кінцевої концентрації 10^{-6} – 10^{-18} М.

Дослідження проводили з новосинтезованим на кафедрі органічної хімії Національного університету „Львівська політехніка” ПЕГ-вмісним олігомерним носієм (VEP-GMA (5:95) – graft-ПЕГ). Це кополімер ненасиченого пероксиду 2-трет-бутилперокси-2-метил-5-гексен-3-ін (ВЕР) і гліцидил метакрилату (ГМА), модифікований монозаміщеним поліетиленгліколем (м-ПЕГ), хімічну структуру якого зображено на рис. 1.

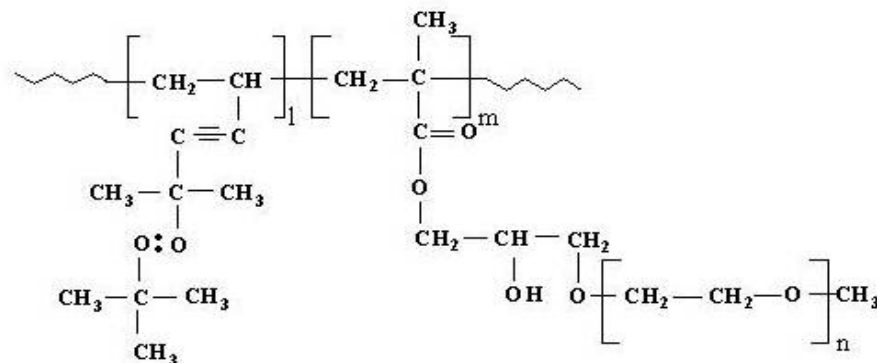


Рис. 1. Хімічна структура полі (VEP-GMA)-graft-mPEG.

Питому активність Na^+ , K^+ -АТФ-азної системи досліджуваних клітин оцінювали за

різницею між кількістю P_i , що утворився в середовищі інкубації за наявності та відсутності фрагментів мембран; поправку на вміст ендogenous P_i визначали при додаванні аліквоти тільки мембранного препарату зародків на відповідній стадії розвитку й виражали активність досліджуваної АТФ-ази зародків у мкмольх P_i у перерахунку за год на 1 мг білка. Кількість продукту реакції P_i визначали за модифікованим методом Фіске-Суббароу [20], а вміст білка в суспензії мембранного препарату – за методом Лоурі [22]. Для встановлення ймовірного типу дії досліджуваного полімеру проводили аналіз Діксона та визначали тип інгібування у класичних координатах ($1/v$, [I]).

У дослідженнях використовували реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації х.ч., а також EGTA, NaN_3 («Merk», Німеччина), убаїн («Fluka», Швейцарія), АТР («Acros», Бельгія), Tris, тапсигаргін («Sigma», США). Вірогідність різниці одержаних показників з контролем визначали за t -критерієм Стюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

Як відомо ПЕГ широко використовують в різних галузях промисловості, а також у практичній та експериментальній медицині як протектор та пролонгатор лікарських препаратів [24, 25], при низькотемпературному консервуванні крові, ембріонів плацентарних тканин та інших біологічних об'єктів.

Встановлені експериментально різноспрямовані зміни рецепторного апарату та системи медіаторної регуляції внутрішньоклітинного метаболізму щурів, що отримували суміш органічних полімерів (у тому числі й ПЕГ) у підгострому експерименті, підтверджують здатність даних сумішей знижувати адаптаційні можливості шляхом суттєвого деструктивного впливу на регуляторний апарат клітинної мембрани [15]. У присутності поліетиленгліколя-1500 (15%) і сахарози (15%) виявлено інгібування транспорту іонів H^+ і SO_4^{2-} в еритроцитах [15].

Вважають, що сильно гідратована полімерна «шуба» утруднює адсорбцію антитіл та інших захисних білків на поверхні ліпосом із сильно гідрофільною поверхнею за рахунок ковалентно зв'язаного синтетичного ПЕГ (у кількості не більше 10%), у результаті чого макрофаги не сприймають їх як чужорідні частинки, що підлягають видаленню [2, 9]. Тому з біофізичної точки зору, актуальним є вивчення структурно-метаболічних порушень при тривалому впливі цієї групи речовин на організм [10-12].

У результаті проведених досліджень встановлено, що дія досліджуваного поліетиленгліколевмісного полімеру (10^{-6} ÷ 10^{-18} М) упродовж раннього ембріогенезу веде до виражених змін активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази зародків у порівнянні з контролем.

Значення Na^+ , K^+ -АТФ-азної активності зародків на стадії 2 бластомерів за впливу носія у діапазоні низьких концентрацій 10^{-15} ÷ 10^{-18} М знаходяться у межах контрольних значень [16]. Тоді як за високих концентрацій полімеру у середовищі інкубації (10^{-8} ÷ 10^{-14} М) виявлено достовірне зростання активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази від 21,85 до 36,68 % у порівнянні з контролем. Максимальне значення досліджуваної АТФ-ази зародків встановлено за дії полімеру в діапазоні концентрацій 10^{-10} ÷ 10^{-13} М, яке становить в середньому $15,87 \pm 0,22$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка ($n=9$). За високих концентрацій полімеру у середовищі інкубації виявлено недостовірне зниження активності оубаїнчутливої АТФ-ази плазматичних мембран зародків (рис. 2).

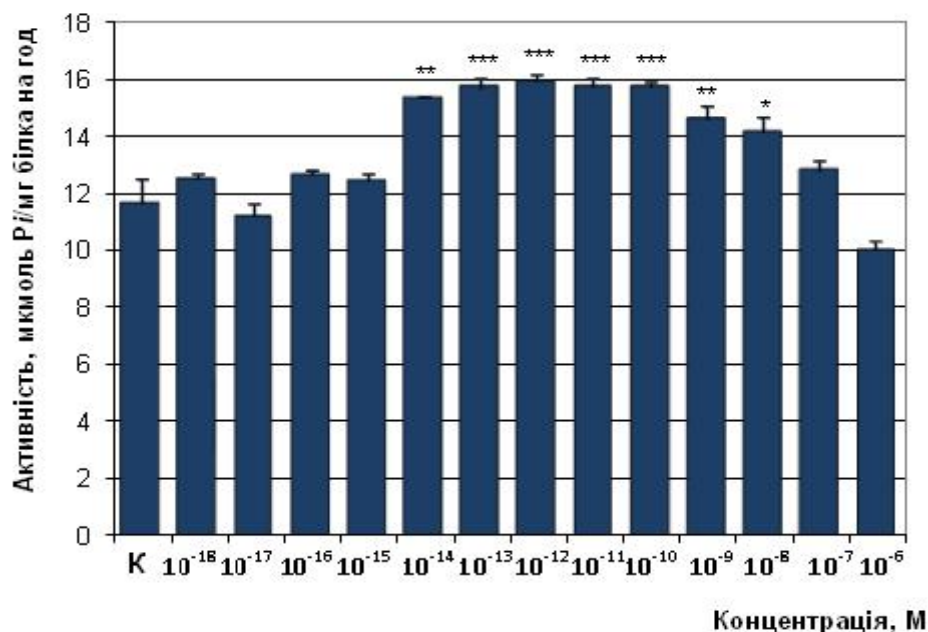


Рис. 2. Зміна активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази зародків *in vitro* за умов впливу VEP-GMA-graft-PEG на стадії розвитку 2 бластомерів у порівнянні з контролем (К) (n=9).

Примітка: тут і надалі * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ - достовірні відмінності досліджуваного показника у порівнянні з контролем.

На стадії 16 бластомерів за концентрацій $10^{-18} \div 10^{-15}$ М, відбувається зростання активності досліджуваного мембранного ферменту в середньому на $23 \div 27\%$ відносно контролю.

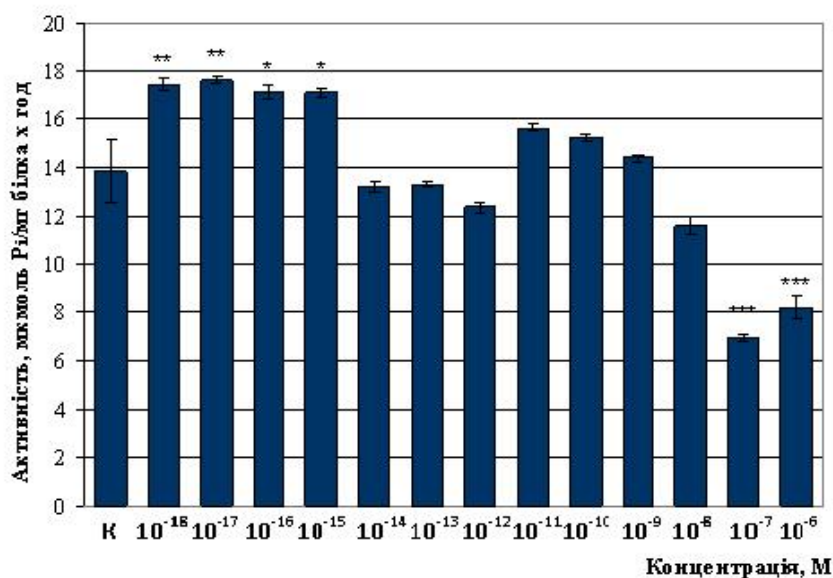


Рис. 3. Зміна активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази зародків *in vitro* за умов впливу VEP-GMA-graft-PEG на стадії розвитку 16 бластомерів.

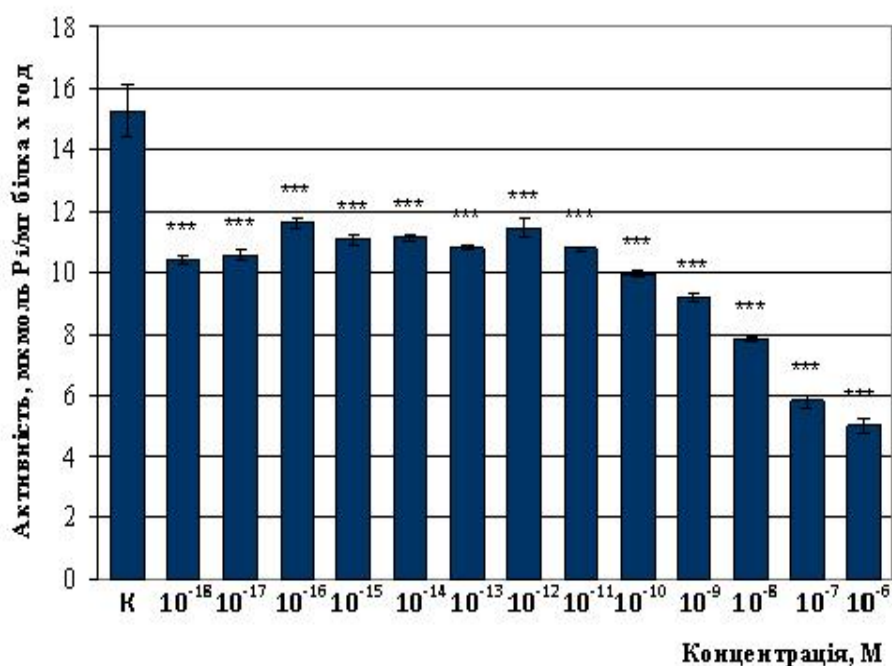


Рис. 4. Зміна активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази зародків *in vitro* за умов впливу VEP-GMA-graft-PEG на стадії розвитку 64 бластомерів.

Зміни активності АТФ-гідролази є достовірними, а максимум значення активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази спостерігаємо за концентрації БАР 10^{-17}M (активність становить відповідно $17,6 \pm 0,13$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка ($n=9$)).

Також було встановлено, що дія досліджуваної речовини у концентраціях $10^{-14} \div 10^{-8}\text{M}$ веде до недостовірних дозозалежних змін активності мембранопозв'язаного ферменту зародків. За додавання високих концентрацій БАР ($10^{-7} \div 10^{-6}\text{M}$) у середовище інкубації виявлено достовірне зниження активності АТФ-ази на $50 \div 59\%$ (рис. 3).

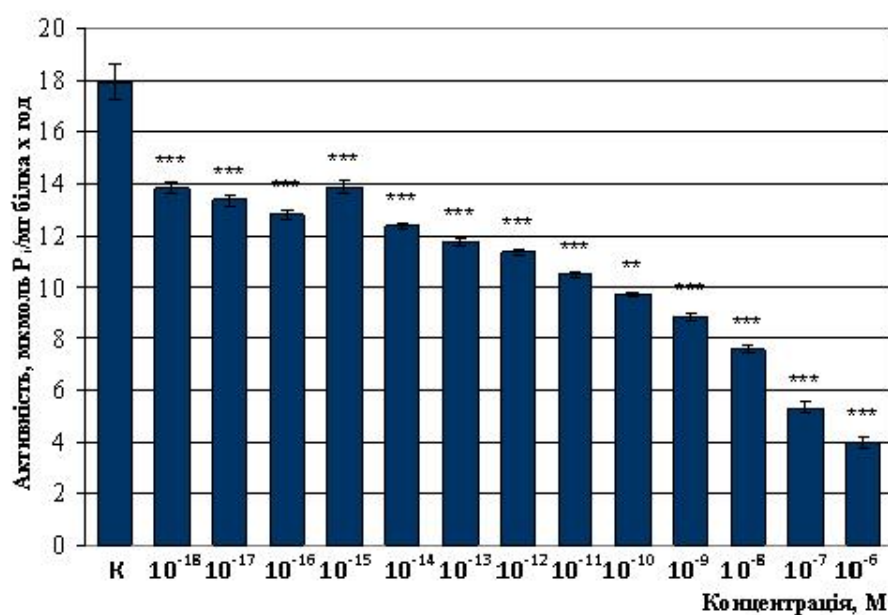


Рис. 5. Зміна активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази зародків *in vitro* за умов впливу VEP-GMA-graft-PEG на стадії 8 поділу бластомерів розвитку зародків.

На стадіях 64 бластомерів, 8 та 10 поділу за дії ПЕГ-вмісного олігомерного носія простежується загальна подібна тенденція до достовірного зниження активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази зародків (рис. 4-6). На стадії 64 бластомерів спостерігаємо достовірний інгібуючий вплив полімеру на активність досліджуваного мембранного ферменту зародків. Інгібуюча дія БАР у діапазоні 10^{-18} ÷ 10^{-10} М є вагомою й значення активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази зародків знаходиться практично на одному рівні, а за високих концентрацій полімеру у середовищі інкубації його інгібуючий вплив посилюється (рис. 4). Так за наявності в середовищі інкубації 10^{-6} ÷ 10^{-7} М носія Na^+ , K^+ -АТФ-азна активність становить лише 35% активності АТФ-ази у контролі, тоді як внесення в інкубаційне середовище полімеру у низьких концентраціях (наприклад, 10^{-18} ÷ 10^{-17} М) відновлює частково активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази до 69% у контролі.

На стадії 8 поділу розвитку зародків холоднокровних інгібуючий вплив VEP-GMA-graft-PEG має подібний ефект (рис. 5). Загалом можна сказати, що зі зростанням концентрації олігомерного носія у середовищі інкубації, посилюється його інгібуючий вплив на функціонування Na^+ , K^+ -АТФ-ази.

Встановлено, що БАР з подібною тенденцією впливає на активність ферменту на стадії 10 поділу: при зменшенні концентрації полімеру знижується ферментативна активність Na^+ , K^+ -помпи та зростає його інгібуючий вплив (рис. 6).

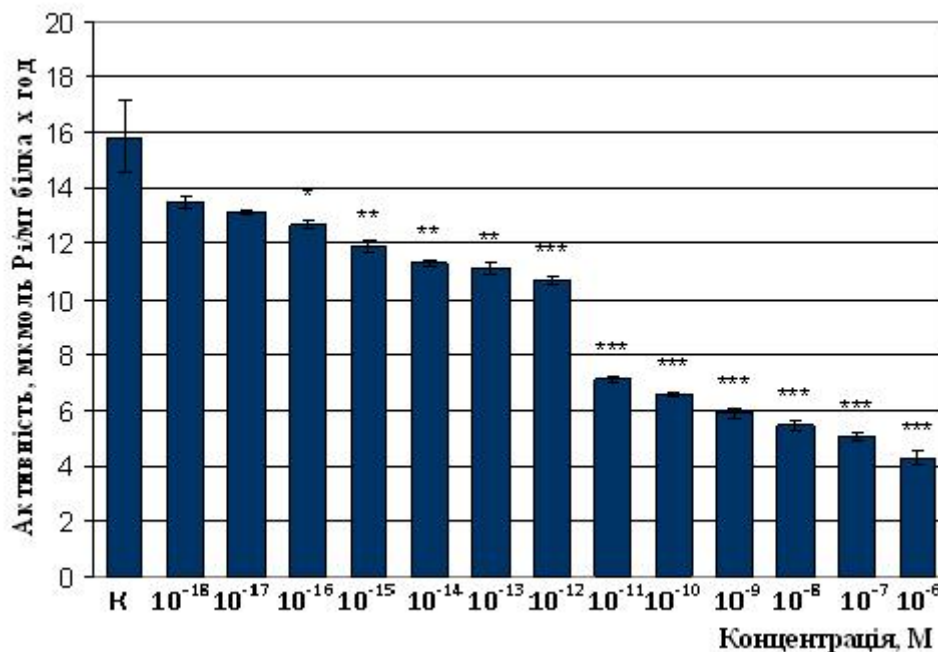


Рис. 6. Зміна активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази зародків *in vitro* за умов впливу VEP-GMA-graft-PEG на стадії 10 поділу бластомерів розвитку зародків.

Із літературних джерел відомо, що полімер ПЕГ використовується багатьма дослідниками для потенціювання взаємодій макромолекул, і, зокрема, для сприяння взаємодій, що кристалізують білки. Були також досліджені механізми, за якими ПЕГ викликає агрегацію білків, в основному для використання його у спонуканні кристалізації для структурних досліджень. ПЕГ-полімер приймає випадкову спіральну конфігурацію у розчині, діючи так, сферу з ефективним радіусом [19].

Структурно-функціональні перебудови біологічних мембран за умов впливу ПЕГ [11], активація вільнорадикальних процесів [10] та перекисного окиснення ліпідів [17], утворення продуктів біотрансформації, які здатні взаємодіяти з білками та нуклеїновими

кислотами, є підставою для припущення можливості впливу ПЕГ на біосинтетичні процеси в організмі. Виходячи з особливостей фізико-хімічних властивостей ПЕГ (наявності гідрофільних і гідрофобних угруповань відносно невеликої молекулярної маси та ін.), можна висунути припущення про мембранотропні ефекти БАР [12].

Для з'ясування особливостей впливу VEP-GMA-graft-PEG на активний транспорт одновалентних іонів фракцією мембран зародків досліджено зміни активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази за наявності в середовищі інкубації 1,5 мМ АТФ на стадіях 2 бластомерів та 10 поділу.

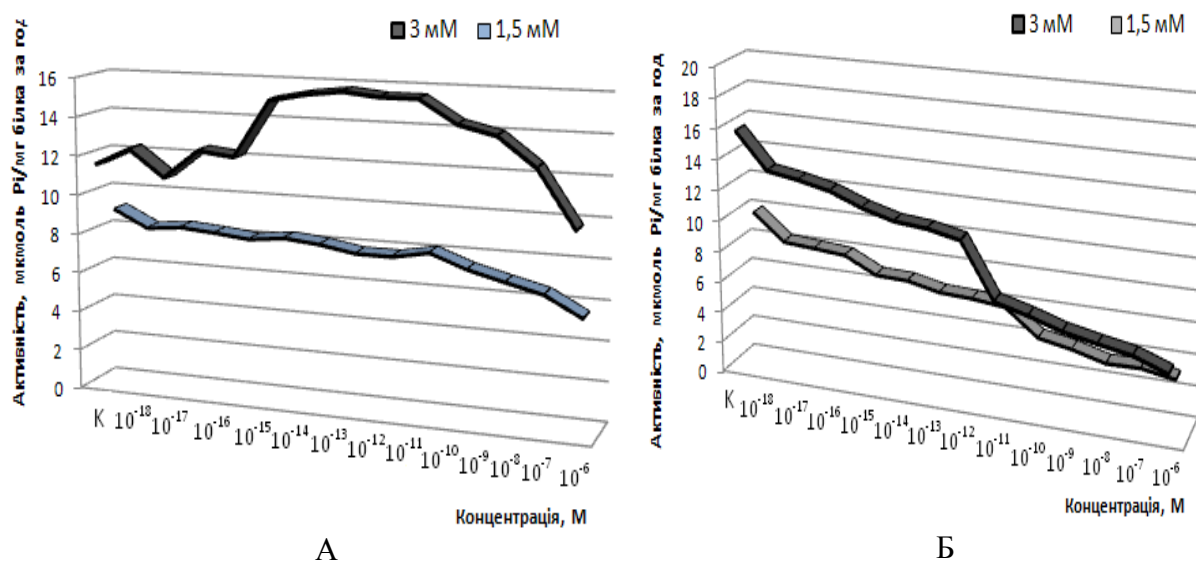


Рис. 7. Зміна активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази зародків *in vitro* за умов впливу VEP-GMA-graft-PEG на стадії 2 бластомерів (А) та 10 поділу бластомерів розвитку зародків (Б) за різної концентрації субстрату ($p < 0,001$).

У результаті проведених досліджень, встановлено, що за концентрації субстрату 3 мМ АТФ на стадії 2 бластомерів (рис. 7, А) встановлено достовірне зростання активності АТФ-ази за наявності полімеру в середовищі інкубації в діапазоні концентрації 10^{-14} - 10^{-7} М у порівнянні з контролем. Зниження концентрації субстрату ферментативної реакції вдвічі зумовлювало достовірне ($p < 0,001$) зниження активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази, яка становила 48÷77% значень контролю (при 3 мМ АТФ). Ймовірно таке зниження пов'язане із повним насиченням активного центру Na^+ , K^+ -АТФ-ази за присутності субстрату у концентрації 3 мМ, тоді як зменшення субстрату в середовищі інкубації вдвічі знижує роботу ферменту на 50%.

На відміну від першої години розвитку, на стадії 10 поділу, виявлено достовірне інгібування активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази за обох концентрацій АТФ (1,5 та 3 мМ, рис. 8). Тому для з'ясування особливостей ферментативної кінетики Na^+ , K^+ -АТФ-ази за впливу VEP-GMA-graft-PEG проведено аналіз Діксона в координатах $1/V$ та $[I]$.

Результати кінетичного аналізу по Діксону представлено на рисунку 8. Провівши апроксимацію змін активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази за впливу VEP-GMA-graft-PEG на стадії 10 поділу бластомерів за концентрації 1,5 ($R^2 = 0,75$) та 3 ($R^2 = 0,94$) мМ АТФ встановлено нелінійну залежність кінетики цього ферменту, що свідчить про конкурентний тип інгібування (рис. 8). Однак для підтвердження цих даних проведено додатковий аналіз інгібування VEP-GMA-graft-PEG роботи Na^+ , K^+ -АТФ-ази зародків у координатах субстрат/ v від $[I]$, які підтвердили змішаний тип інгібування ферменту.

Виходячи із аналізу отриманих залежностей можна зробити висновок про змішаний тип інгібування БАР АТФ-азної активності зародків. Змішане інгібування ферментативної активності є результатом зв'язування молекули інгібітора не з активним центром, а з іншою ділянкою молекули білка-ферменту, що зумовлює конформаційні зміни молекул ферменту зародків.

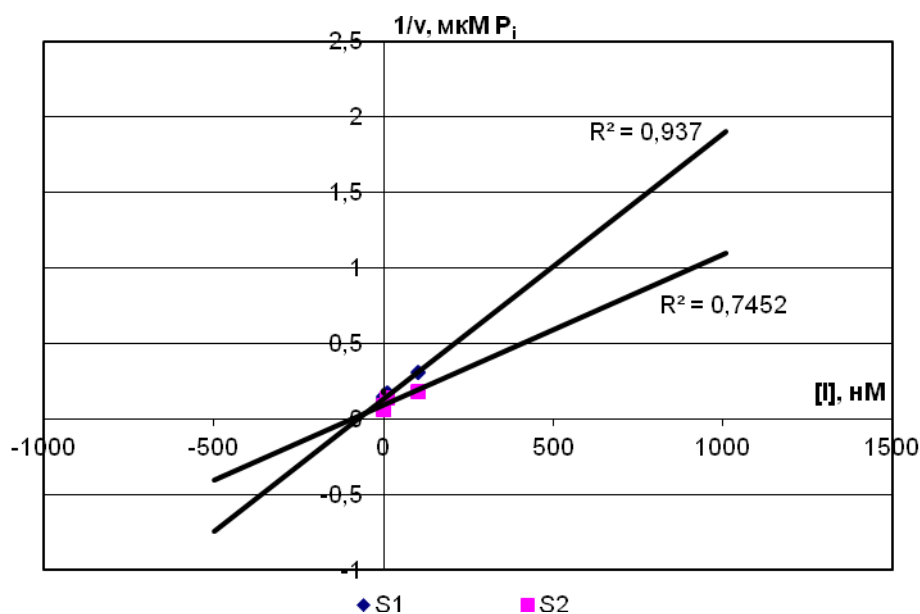


Рис. 8. Кінетичний аналіз інгібування ПЕГ-носієм активності Na^+ , K^+ -АТФази на стадії 10 поділу бластомерів у системі координат Діксона. На осі абсцис наведено величини концентрації VEP-GMA-graft-PEG, на осі ординат обернені величини інгібованої швидкості гідролізу АТФ. S_1 , S_2 – концентрація АТФ 1,5 та 3 ммоль.

Оскільки інгібітор не впливає на зв'язування ферменту з субстратом, у результаті може утворитися потрійний комплекс АТФ-ази, субстрату та БАР, або комплекс БАР з допоміжними продуктами реакції. Механізм інгібування полягає в тому, що після такого зв'язування відбуваються конформаційні зміни в активному центрі, який у подальшому не може нормально функціонувати та перетворювати субстрат.

ВИСНОВКИ

За результатами проведених досліджень Na^+ , K^+ -АТФазної активності плазматичних мембран зародків в'юна протягом періоду синхронного дроблення бластомерів за нормальних умов та при дії поверхнево-активного полімерного носія – VEP-GMA-graft-PEG було встановлено, що вплив полімерного носія VEP-GMA-graft-PEG (у концентраціях 10^{-6} – 10^{-18} М) упродовж 6 годин розвитку зародків призводить до виражених змін активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази зародків у порівнянні з контролем на стадіях 64 бластомерів, 8 та 10 поділів.

Зниження субстрату ферментативної реакції вдвічі зумовлювало достовірне зниження активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази (від 48 до 77% контролю).

Провівши апроксимацію змін активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази за впливу VEP-GMA-graft-PEG на стадії 10 поділу бластомерів за концентрації 1,5 ($R^2 = 0,35$) та 3 ($R^2 = 0,43$) мМ АТФ встановлено нелінійну залежність кінетики цього ферменту, що свідчить про змішаний тип інгібування.

Зміни активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази зародків, згідно проведеного однофакторного дисперсійного аналізу, зумовлені наявністю в середовищі досліджуваного полімерного носія. Двофакторний дисперсійний аналіз не виявив суттєвих достовірних змін впливу VER-GMA-graft-PEG на активність мембранозв'язаного ферменту, однак за наявності БАР у концентрації $10^{-8} \div 10^{-6}$ М достовірність результатів складає $p > 0,95$ та $0,99$.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Антонов В. Ф. Мембранный транспорт / В. Ф. Антонов // Сорос. Обозрев. Журн. Биология. – 1997. – № 4. – С. 2–9. /Antonov V. F. Membrannyj transport / V. F. Antonov // Soros. Obozrev. Zhurn. Biologija. – 1997. – № 4. – S. 2–9./
2. Барсуков Л. И. Как собрать мембрану (Солюбилизация и реконструкция мембран) / Л. И. Барсуков // Сорос. Образов. Журн. – 2004. – № 1. – С. 34–39. /Barsukov L. I. Kak sobrat' membranu (Soljubilizacija i rekonstrukcija membran) / L. I. Barsukov // Soros. Obrazov. Zhurn. – 2004. – № 1. – S. 34–39./
3. Гойда О.А. Биофизические аспекты раннего онтогенеза животных / О. А. Гойда. – К.: Наукова думка. – 1993. – 224 с. /Gojda O.A. Biofizicheskie aspekty rannego ontogeneza zhivotnyh / O. A. Gojda. – K.: Naukova dumka. – 1993. – 224 s./
4. Зайцева О. В. Поверхнево-активні речовини як стимулятори вільнорадикальних процесів / О. В. Зайцева // Довкілля та здоров'я. – 2000. – № 2. – С. 8–11. /Zajceva O. V. Poverhnevo-aktivni rechovini jak stimulyatori vil'noradikal'nih procesiv / O. V. Zajceva // Dovkillja ta zdorov'ja. – 2000. – № 2. – S. 8–11./
5. Гігієнічне нормування додецилбензолсульфокислоти у воді водойм / В. А. Кондратюк, Л. М. Гунько [та ін.] // Довкілля та здоров'я. – 2000. – № 1. – С. 6–9. /Gigienichne normuvannja dodecylbenzolsul'fokisloti u vodi vodojm / V. A. Kondratjuk, L. M. Gun'ko [ta in.] // Dovkillja ta zdorov'ja. – 2000. – № 1. – S. 6–9./
6. Очистка и частичная характеристика плазматических мембран клеток зародышей выюна / М. Д. Луцук, А. В. Лукьяненко [и др.] // Онтогенез. – 1986. – №17. – С. 314–321. /Ochistka i chastichnaja harakteristika plazmatischenkih membran kletok zarodyshej v'juna / M. D. Lucuk, A. V. Luk'janenko [i dr.] // Ontogenez. – 1986. – №17. – S. 314–321./
7. Нейфах А. А. Молекулярная биология процессов развития / А. А. Нейфах. – Москва: Наука. – 1977. – 311 с. /Nejfeh A. A. Molekuljarnaja biologija processov razvitija / A. A. Nejfeh. – Moskva: Nauka. – 1977. – 311 s./
8. Нейфах А. А. Проблемы регуляции в молекулярной биологии развития / А. А. Нейфах, М. Я. Тимофеева. – Москва: Наука. – 1978. – 336 с. /Nejfeh A. A. Problemy reguljacji v molekularnoj biologii razvitija / A. A. Nejfeh, M. Ja. Timofeeva. – Moskva: Nauka. – 1978. – 336 s./
9. Тенденции в развитии исследований в области липосом: обзор патентной литературы / Н. Ю. Несытова, Н. С. Палева [и др.] // Вест. АМН СССР. – 1990. – № 10. – С. 8–29. /Tendencii v razvitii issledovanij v oblasti liposom: obzor patentnoj literatury / N. Ju. Nesytova, N. S. Paleva [i dr.] // Vest. AMN SSSR. – 1990. – № 10. – S. 8–29./
10. Попова Л. Д. Влияние диолов на антиоксидантную систему эритроцитов / Л. Д. Попова // Гигиена населенных мест: Сб. научн. тр. – Киев, 2000. – № 37. – С. 117–120. /Popova L. D. Vlijanie diolov na antioksidantnuju sistemu eritrocitov / L. D. Popova // Gigiena naseleennyh mest: Sb. nauchn. tr. – Kiev, 2000. – № 37. – S. 117–120./
11. Попова Л.Д. Вплив простих полієфірів на фосфоліпідний склад гепатоцитів і еритроцитів білих щурів / Л. Д. Попова // Експерим. і клін. медицина. – 2001. – № 1. – С. 31–33. /Popova L.D. Vpliv prostih poliefiriv na fosfolipidnij sklad gepatocitiv i eritrocitiv bilih shhuriv / L. D. Popova // Eksperim. i klin. medicina. – 2001. – № 1. – S. 31–33./
12. Попова Л. Д. Вплив поліетиленгліколів на біосинтетичні процеси / Л. Д. Попова // Експерим. і клін. медицина. – 2003. – №1. – С. 6–8. /Popova L. D. Vpliv polietilenglikoliv na biosintetichni procesi / L. D. Popova // Eksperim. i klin. medicina. – 2003. – №1. – S. 6–8./
13. Проданчук М. Г. Поверхнево-активні речовини в агропромисловому комплексі: еколого-гігієнічні аспекти / М. Г. Проданчук, І. В. Мудрий. – К.: Наукова думка. – 2000. – 128 с. /Prodanchuk M. G. Poverhnevo-aktivni rechovini v agropromislovomu kompleksi: ekologo-gigienichni aspekti / M. G. Prodanchuk, I. V. Mudrij. – K.: Naukova dumka. – 2000. – 128 s./
14. Поліетиленглікольмісні олігомерні носії та нанорозмірні системи доставки антимікробних речовин на їх основі / А. Рябцева, Ю. Остапчук [та ін.] // Вісник Нац. ун-ту «Львівська політехніка». – 2011. – № 700. – С. 367–373. /Polietilenglikol'vmisni oligomerni nosii ta nanorozmirmi sistemi dostavki antimikrobnih rechovin na ih osnovi / A. Rjabceva, Ju. Ostapchuk [ta in.] // Visnik Nac. un-tu «Lvivs'ka politehnika». – 2011. – № 700. – S. 367–373./

15. Черкашина Я.О. Вплив кріопротекторів і модифікаторів цитоскелет-мембранного комплексу на стан еритроцитів в умовах осмотичного і температурного шоку : Автореф. дис. ... канд. биол. наук:– 2007. – 20 с. /Cherkashina Ja.O. Vpliv krioprotektoriv i modifikatoriv citoskelet-membrannogo kompleksu na stan eritrocitiv v umovah osmotichnogo i temperaturnogo shoku : Avtoref. dis. ... kand. biol. nauk:– 2007. – 20 s./
16. Na^+ , K^+ -АТФ-азна активність мембран зародків в'юна *Misqurnus fossilis* L. при дії антибіотиків / М. В. Целевич, С. М. Мандзинець [та ін.] // Фізіол. Журн. – 2004. – Т. 50. – № 5. – С. 64–68. / Na^+ , K^+ -АТФ-азна активnist' membran zarodkiv v'juna *Misqurnus fossilis* L. pri dii antibiotikov / М. V. Celevich, S. M. Mandzinec' [ta in.] // Fiziol. Zhurn. – 2004. – Т. 50. – № 5. – С. 64–68./
17. Обґрунтування механізму участі кінуренінового шляху обміну триптофану у формуванні судомного стану / А. Я. Циганенко, Л. Д. Попова [та ін.]. –Харків: ХДМУ. – 2002. – 173 с. /Obgruntuvannja mehanizmu uchasti kinureninovogo shljahu obminu triptofanu u formuvanni sudomnogo stanu / A. Ja. Ciganenko, L. D. Popova [ta in.]. –Harkiv: HDMU. – 2002. – 173 s./
18. Polyethylene glycol-coated biocompatible surfaces / N. A. Alcantar, E. S. Avdil [et al.] // Biomed. Mater. Res. – 2000. – Vol. 51, № 3. – P. 343–351.
19. The effect of polyethylene glycol on the mechanics and ATPase activity of active muscle fibers / M. K. Chinn, K. H. Myburgh [et al.] // Biophysical Journal. – Vol. 78, № 2. – 2000. – P. 927–939.
20. Fiske C. H., Subbarow Y. // J. Biol. Chem. – 1925. – 66. – P. 375–400.
21. Polyethylene glycol in drug delivery: Pros and cons as well as potential alternatives / K. Knop, R. Hoogenboom [et al.] // Angew. Chem. Int. Ed. – 2010. – 49. – P. 6288–6308.
22. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. G. Rosebrough [et al.] // J. Biol. Chem. – 1951. – 193, № 1. – P. 265–275.
23. Torchilin V. P. Polymeric micelles as pharmaceutical carriers / V. P. Torchilin // Polymers in drug delivery. – 2006. – P. 111–125.
24. Torchilin V.P. Immunoliposomes and PEGylated immunoliposomes: possible use for targeted delivery of imaging agents / V. P. Torchilin // Immunomethods. – 1994. – 4. – P. 244–258.
25. Poly(ethylene glycol) on the liposome surface: on the mechanism of polimer-coated liposome longevity / V. P. Torchilin, V. G. Omelyanenko [et al.] // Biochem. Biophys. Acta. – 1195, 1. – P. 11–20.
26. Veronese F. M. PEGylation, successful approach to drug delivery / F. M. Veronese, G. Pasut // Drug discov. today. – 2005. – 10. – P. 1451–1458.