“ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ТА КЛІНІЧНА ФІЗІОЛОГІЯ І БІОХІМІЯ”
“EXPERIMENTAL AND CLINICAL PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY”
Науково-практичний журнал/Scientific-practical journal

Наукові статті / Research article
ECPB 2018, 2(82): 71–76. <https://doi.org/>

УДК547.422.22–036.7:577.352:576.342+597.551.2–131

Модифікація полімером Na^+ , K^+ -АТФазної активності ембріональних клітин в'юна за зміни рН середовища інкубації

М.Б. ШЕРЕМЕТА¹, С.М. МАНДЗИНЕЦЬ¹, М.В. БУРА¹, О.С. ЗАІЧЕНКО²

¹ Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів, Україна

² Національний університет «Львівська політехніка», Львів, Україна

E-mail: sheremeta.m@gmail.com

Полімерні наноносії – одні з найперспективніших у сучасній нанофармакології, оскільки мають цілу низку специфічних фізико-хімічних і біологічних властивостей, які забезпечують їх біосумісність, можливість додаткової функціоналізації спеціальними біоелементами, необхідними для транспортування фармацевтичних препаратів в організмі [10, 11, 16, 17]. Лікарські форми, у яких активна діюча речовина кон'югована з полімерним носієм, мають нижчу токсичність, поліпшені фармакокінетичні параметри й вищу ефективність терапевтичної дії [9]. Тому одне з головних завдань сучасної біонанотехнології полягає у розробці безпечних нанорозмірних носіїв із заданим розміром, низькою токсичністю, фізичною стабільністю у крові, сумісністю з метаболітами організму, регульованим впливом на пошкодження, можливостями спрямованої доставки ліків до мішені дії [9, 10, 20]. Найчастіше для цього використовують поліетиленгліколь (ПЕГ) [16]. Його приєднання підвищує розчинність гідрофобних лікарських засобів [18], продовжує час циркуляції, мінімізує неспецифічне поглинання, забезпечує конкретне цільове фокусування пухлини і тенденцію до акумулювання ліків у їх тканині [10, 16].

Вважають, що механізм дії полімерів на живі організми ґрунтується на порушенні функціонального стану плазматичних мембран (ПМ), обмінних процесів, водно-сольового балансу клітини, опосередкована взаємодія з мембранними ферментами і рецепторами [15, 16]. Тому, з біофізичної точки зору, дослідження дії полімерів на основі ПЕГ на активність мембранних ферментів зародкових клітин є актуальним і перспективним.

Оскільки зародки в'юна у період раннього ембріогенезу є адекватною тест-системою для дослідження впливу різних фармакологічних [2, 5] та хімічних чинників на живі організми, завдяки короткому періоду ембріогенезу, ПМ зародків в'юна є зручним об'єктом для досліджень Na^+ , K^+ -АТФази.

Мета дослідження – вивчити зміни Na^+ , K^+ -АТФазної активності зародків в'юна (тест-система) у період раннього ембріогенезу за зміни рН середовища інкубації та наявності носія VEP-GMA-graft-PEG (100 нм/л).

Матеріали й методи дослідження. Дослідження провадили з новосинтезованим на кафедрі органічної хімії Національного університету «Львівська політехніка» ПЕГ-вмісним олігомерним носієм (ВЕП-ГМА (5:95) – graft-ПЕГ). Це кополімер ненасиченого пероксиду 2-трет-бутилперокси-2-метил-5-гексен-3-ін (ВЕП) 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 [16].

Об'єктом досліджень були зародки та личинки в'юна (*Misgurnus fossilis* L.). Яйцеклітини одержували і запліднювали за Нейфахом [2]. Овуляцію стимулювали внутрішньом'язовим введенням самкам хоріогонічного гонадотропіну (500 од.). Ікру одержували через 36 год після стимуляції. Сім'яники отримували після декапітації та розтину черевної порожнини самців. Ікру запліднювали в чашках Петрі суспензією спермій. Через 5–10 хв після запліднення зиготи відмивали та інкубували при температурі 20–22° С [2].

Зародки та личинки в'юна в умовах контролю інкубували у фізіологічному розчині Гольфрєтера такого складу, ммоль/л: CaCl_2 – 1,8, NaCl – 110, KCl – 1,4, Tris-HCl – 5. Для проведення експериментальних досліджень зародки відбирали на 60-, 210- і 330-й хвилини розвитку після запліднення яйцеклітин під час стадій, які відповідають першому дробленню зиготи (2 бластомери), шостому (64 бластомери) та десятому (1024 бластомери).

Мікросомну фракцію мембран зародків в'юна одержували методом диференційного центрифугування у градієнті густини сахарози [3]. Спочатку зародки гомогенізували в буферному розчині, такого складу, ммоль/л: сахароза – 120,0; KCl – 130,0; MgCl_2 – 5,0; Tris-HCl – 10,0 (pH 7,4; 4° С). Потім рештки зародкового жовтка осаджували центрифугуванням (10 хв, 1600 g). Збагачену фрагментами плазматичної та ретикулярної мембран надосадову рідину, одержану після 10-хвилинного центрифугування при 10 000 g, зберігали при температурі –20° С [3].

Питому активність Na^+ , K^+ -АТФази (КФ 3.6.1.37) (мкмоль P_i /хв на 1 мг білка) досліджуваних клітин оцінювали за різницею між кількістю P_i , що утворився в середовищі інкубації за наявності та відсутності селективного інгібітора Na^+ , K^+ -АТФази оубаїну (1 ммоль). Поправку на вміст ендогенного P_i визначали при додаванні аліквоти тільки мембранного препарату зародків на відповідній стадії розвитку. Експерименти *in vitro* дослідження активності Na^+ , K^+ -АТФази проводили змінюючи pH середовища інкубації від 6,5–8,5 і додаючи в середовище VEP-GMA-graft-PEG (100 нм/л). Кількість продукту реакції P_i тестували модифікованим методом Фіске–Суббароу [7], а вміст білка в мембранному препараті – методом О.Н. Lowry et al. [12].

У дослідженнях використовували реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації х. ч. або зарубіжного виробництва EGTA, NaN_3 (Merk, Німеччина); убаїн (Fluka, Швейцарія); АТФ (Acros, Бельгія); Tris. Вірогідність різниці одержаних показників із контролем визначали за *t*-критерієм Стьюдента.

Результати дослідження та їх обговорення. У попередніх дослідженнях констатовано, що Na^+ , K^+ -АТФаза активність ПМ зародків в'юна за умов VEP-GMA-graft-PEG (1 мкмоль/л÷1 ммоль/л) упродовж 6 год розвитку зародків знижується порівняно з контролем на стадіях 64 бластомерів, 8 та 10 поділів. Зниження субстрату ферментативної реакції вдвічі зумовлювало достовірне зниження активності Na^+ , K^+ -АТФази (від 48 до 77 % контролю) [19].

Ефективність перебігу фаз гідролітичного циклу роботи Na^+ , K^+ -АТФази, зростає залежно від зв'язування АТФ із регуляторним центром, що своєю чергою зв'язане зі зміною рН середовища, зокрема, внутрішньоклітинного [5]. Результати досліджень показали, що залежність активності досліджуваної АТФази ПМ зародкових клітин від досліджуваних чинників є куполоподібною на етапі 2 бластомерів (рис. 2, а). Відомо, що Na^+ , K^+ -АТФаза характеризується високою активністю у межах рН середовища від 7,0 до 8,0, і досить низькою АТФ-гідролазною активністю за рН 6,5 і 8,5 [1].

Значення Na^+ , K^+ -АТФазної активності бластодерм зародкових клітин рН = 7,5 достовірно не відрізняється від значень ферменту при рН середовища 7,4. За останніх умов активність Na^+ , K^+ -АТФази зародків набувала максимальних значень на всіх досліджуваних стадіях розвитку зародків [1]. Отже, рН у оптимумі відповідає оптимальному зв'язуванню АТФ досліджуваним ферментом зародків з найбільшою швидкістю каталізу.

За умов додавання в середовище інкубації 100 нм/л М VEP-GMA-graft-PEG на всіх досліджуваних стадіях розвитку виявлено достовірне зниження активності Na^+ , K^+ -АТФази за зміни рН інкубації. Зокрема на стадії першого поділу бластомерів активність Na^+ , K^+ -АТФази знижується в середньому на $60,5 \pm 5,3$ % порівняно з контролем, хоча загальна тенденція змін активності досліджуваного ферменту зберігається, а максимальне значення активності Na^+ , K^+ -АТФази зафіксовано за стандартних значень рН = 7,4–7,5.

Рис. 2. Зміни Na^+ , K^+ -АТФазної активності зародків в'юна за різного рН середовища інкубації та наявності носія VEP-GMA-graft-PEG на стадії 2 (а), 64 (б) бластомерів та десятого поділу (в).

*** – $p > 0,999$ – рівень достовірності порівняно з контролем.

Аналогічні зміни відбувалися також на стадії 64 бластомерів (шостий поділ) при інкубації бластодерм зародків за додавання 100 нм/л VEP-GMA-graft-PEG (рис. 2, б). Однак виявлено дещо відмінний характер змін активності Na^+ , K^+ -АТФази (в середньому на $36,5 \pm 3,3$ %) порівняно з контролем. Із огляду на особливості фізико-хімічних властивостей ПЕГ (наявності гідрофільних і гідрофобних угруповань відносно невеликої молекулярної маси тощо), можна припустити мембранотропні ефекти біологічно активного полімеру [13].

На стадії десятого поділу бластомерів спостерігається швидке зниження ($32,9 \pm 5,9$ %) активності досліджуваного ферменту зародків (рис. 2, в). Це узгоджується з отриманими результатами впливу VEP-GMA-graft-PEG на активність Na^+ , K^+ -АТФази впродовж раннього ембріогенезу [19].

Особливості впливу ПЕГ на активність досліджуваного ферменту зародків, імовірно, пов'язані з агрегатними властивостями полімеру та швидкістю утворення зв'язків з активними групами [8] компонентів мембран у разі зміни рН середовища.

Отримані результати можна пояснити гетерогенністю мембран бластомерів на шостій годині розвитку, якісним та кількісним складом ліпідів мембран [6], а також сіалових кислот, які формують глікокалікс та беруть участь у міжклітинній взаємодії, що своєю чергою змінює заряд мембрани та створює інші умови для взаємодії з VEP-GMA-graft-PEG (про що свідчить також зміна рН середовища). Імовірно, ПЕГ здатен інтенсифікувати пероксидне окиснення ліпідів [4], впливати на рухливість ліпідних молекул, і опосередковано, на білок-ліпідні взаємодії [14], які важливі для нормального функціонування Na^+ , K^+ -АТФази, і в результаті – на активність ферменту впродовж раннього розвитку зародків.

Висновки. У результаті проведених досліджень з'ясовано, що за додавання новосинтезованого VEP-GMA-graft-PEG у середовище інкубації Na^+ , K^+ -АТФази зародків в'юна відбувається достовірне рН-залежне зниження активності АТФази упродовж раннього ембріогенезу. Зокрема, на першому етапі розвитку додатковою умовою змін активності досліджуваної АТФази є низький рівень експресії білків, оскільки розвиток бластомерів забезпечується ще материнськими резервами. Отримані дані засвідчують модулюючий і дозозалежний вплив полімеру стосовно біологічних систем, що розвиваються.

Рекомендовано до друку комісією з біоетики

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бюра МВ. Вплив рН середовища на активність Na/K -АТФази в'юна *Misgurnus fossilis* L. впродовж раннього ембріогенезу. Фізика живого. 2009;17(2):44–8 (Bura MV. Effects of pH on the Na/K-ATPase activities of *Misgurnus fossilis* L. during early embryogenesis. Cell Biophysics. 2009;17(2):44-8).
2. Гойда ОА. Биофизические аспекты раннего онтогенеза животных. К.: Наук. думка;1993. 224 (Goida OA. Biophysical Aspects of Early Ontogenesis of Animals. Kyiv: Nauk. Dumka;1993. 224).
3. Луцук МД, Кусень СИ, Лук'яненко АВ. Очистка и частичная характеристика плазматических мембран клеток зародышей в'юна. Онтогенез. 1986;17(3):314–21 (Lucyk MD, Kusen SI, Lukyanenko AB. Purification and partial characterization of plasma membranes of loach embryos. Ontogenez. 1986;17(3):314-21).
4. Мазур В, Здвижков Ю, Мандзынець С, Бюра М, Заіченко О. Процеси перекисного окиснення ліпідів у зародках в'юна за дії похідного поліетиленгліколю. Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2017;76:15–22 (Mazur V, Zdvizhkov Y, Mandzynets S, Bura M, Zaichenko O. Lipid peroxidation processes in the loach embryos under the influence of polyethylene glycol derivatives. Visnyk of Lviv University. 2017;76:15-22).
5. Целевич МВ, Мандзынець СМ, Санагурський ДІ. Кінетичні характеристики Na^+ , K^+ -АТФази клітин зародків в'юна // Вісник Харківського університету ім. В.Н. Каразіна. Серія Біофізичний вісник. 2008;1 (20):28–36 (Tselevych MV, Mandzynets SM, Sanagursky DI. The kinetic characteristics of Na^+ , K^+ -ATPase from cells of loach embryo. Biophysical Bulletin. 2008;1(20):28-36).
6. Bezkorovaynyj AO, Zyn AR, Harasym NM, Sanagursky DI. Lipid profile of the egg of the loach *Misgurnus fossilis* L. Experim. Clinical Biochem. 2015;16(3):70-2.
7. Fiske CH, Subbarow Y. The Colorimetric Determination of Phosphorus. J Biol Chem. 1925;66:375-400.
8. Gorbunova OV, Baklanova ON,

Gulyaeva TI, Trenikhin MV, Drozdov VA. Poly(ethylene glycol) as structure directing agent in sol-gel synthesis of amorphous silica. Microporous Mesoporous Materials. 2014;190:146-51. 9. Igarashi E. Factors affecting toxicity and efficacy of polymeric nanomedicines. Toxicol Appl Pharmacol. 2008;229:121-34. 10. Lamprekht A. Nanolekarstva. Koncepcii dostavki lekarstv v nanonauke / gl. red. A. Lamprekht. M.: Nauchnyj Mir; 2010. 232. 11. Li Y, Ogris M, W&gner E, Pelisek J, Rüffer M. Nanoparticles bearing polyethyleneglycol-coupled transferring as gene carriers: preparation and in vitro evaluation. Int J Pharm. 2003;259:93-101. 12. Lowry OH, Rosebrough NG, Farr AL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951;193:265-75. 13. Popova LD, Sherban NG, Vasil'eva IM. Features Of Toxic Action Mechanisms Of Polyethyleneglycols With Different Molecular Mass. Bulletin Biol Med 2012;1(91):165-68. 14. Popova LD. Influence of polyethyleneglycols on the biosynthetic processes. Exp Clinical Medicine. 2003;1:6-8. 15. Prodanchuk MG, Mudrij IV, Kalashnikov AA. Poverhnevo-aktivni rehovini: toksikologo-gigienichni ta mikrobiologichni aspekti [Surfactants, toxicological and hygienic and microbiological aspects]. Kijv: Medicina Ukraini; 2006. 223. 16. Riabtseva A, Mitina N, Boiko N, Garasevich S, Yanchuk I, Stoika R et al. Structural and Colloidal-Chemical Characteristics of Nanosized Drug Delivery Systems Based on Pegylated Comb-like Carriers. Chem & Chem Technol. 2012;6(3):291-95. 17. Senkiv Yu, Riabtseva A, Heffeter P, Boiko N, Kowol RC, Jungwith U et al. Enhanced Anticancer Activity and Circumvention of Resistance Mechanisms by Novel Polymeric/Phospholipidic Nanocarriers of Doxorubicin. J Biomed Nanotechnol. 2014;10(7):1-13. 18. Zaytseva O. Surface-active substances as stimulants of free-radical processes. Environment & Health. 2000;2:8-11. 19. Zdvizhkov Y, Mandzynets S, Riabceva A, Bura M, Zaichenko O. The influence of newly synthesized pegylated carrier on the changes of Na⁺, K⁺-ATP-ase activity of the loach embryos during early embryogenesis. Biophysical Bulletin. 2013;30:42-52. 20. Zhang J, Li S, Li X. Polymeric nano-assemblies as emerging delivery carriers for therapeutic applications: a review of recent patents. J Zhang Recent Pat Nanotechnol. 2009;3(3):225-31.

Стаття надійшла до редколегії 30.04.2018

RESEARCH ARTICLE

Modification of *Misgurnus Fossilis* L. Embryonic Cells Na⁺, K⁺-ATP-Ase Activity Under the Effect of Polymer During the pH Changes of the Incubation Environment

M.B. SHEREMETA¹, S.M. MANDZYNETS¹, M.V. BURA¹, O.S. ZAICHENKO²

¹Lviv National Polytechnic University, Lviv, Ukraine

²Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, Ukraine

E-mail: sheremeta.m@gmail.com

The most important aspect of up-to-date nanomedicine is the use of specific nanocarriers that can deliver drugs to the pathological tissues and certain organs to ensure more effective therapy. The nanocarriers are thought to be extremely promising in the modern nanopharmacology, whereas they possess a range of specific physical, chemical and biological properties that ensure their biocompatibility, possibility of additional functionalization of special bioelements needed to deliver pharmaceutical preparations into the body. It has been found that the dosage forms in which the active ingredient is conjugated to a polymeric carrier have lower toxicity, improve the pharmacokinetic parameters and have higher therapeutic efficacy. Therefore, one of the main tasks of modern bionanotechnology is the development of the safe nano-sized carriers of a certain size, low toxicity, physical stability in the blood, compatibility with metabolites of the body, regulated influence on the damages, abilities to deliver the drugs directly to the target. Mostly, polyethylene glycol (PEG) is used for this purpose. It increases the solubility of hydrophobic drugs, prolongs the circulation time, minimizes the nonspecific absorption, specifically targeting at the tumor and having the tendency to accumulate drugs in the tissue.

It is believed that a mechanism of influence of polymers on the living organisms means violation to a functional state of the plasma membranes, metabolic processes, water-salt balance of the cell, mediated interaction with membrane enzymes and receptors.

It has been shown that the activity of Na⁺/K⁺-ATPase, which plays a key role in the maintenance of intracellular ion homeostasis, osmotic cell balance, transmembrane cell potential, apoptosis regulation, cell proliferation and differentiation is changing under the influence of hormones, growth factors and stress. Therefore, from a biophysical approach, the research of the influence of polymers on the basis of PEG on the activity of membrane enzymes of embryo cells is relevant and promising.

The data of the enzymatic activity of Na^+ , K^+ -pump of cold-blooded embryo modification under the influence of the newly synthesized nanoparticles of polyethylene glycol nature have been obtained.

Na^+/K^+ -ATPase activity has been calculated as a difference between the amount of inorganic phosphate released in the conditions of presence and absence of membrane fragments in the incubation medium, including the loss of endogenous phosphorus Pi in the membrane preparation, expressed in $\mu\text{moles Pi per minutes per milligram of protein}$. The amount of endogenous phosphorus has been identified by the modified Fiske-Subbarow method, the quantitation of protein in the membrane preparation has been determined by the Lowry method.

The results have shown that the presence of a polymer produces the decrease of the enzyme activity, nevertheless it maintains the dome-shaped trend of pH depending on the activity under the normal conditions and not taking into account a stage of development. A level of the enzymatic hydrolysis of ATP Na^+ , K^+ -ATPase in the presence of a polymer has been 61, 37 and 32 % instages, that respectively has meant 6th and 10th blastomeres division. Heterogeneity of the cell membrane during the early embryogenesis and different affinity of a polymer and membrane lipids in the consequence of the pH changes can determine a stage of alternating of the enzymatic hydrolysis of ATP by the investigated enzyme, which varies during its developing.

Key words: Na^+ , K^+ -ATP-ase, pH, polyethyleneglycol, loach embryos.