

ЗМІНА ФЕРМЕНТАТИВНОЇ АКТИВНОСТІ Na^+ , K^+ -ПОМПИ ЗАРОДКІВ РИБ ЗА УМОВ ВПЛИВУ ІВЕРМЕКТИНУ

Львівський національний університет ім. І. Франка

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

*Досліджено вплив антипаразитарного препарату івермектину, представника родини авермектинів, на Na^+ , K^+ -АТФазну активність зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L. протягом раннього ембріогенезу. Відмічено інгібування активності мембранного ферменту в залежності від дози та стадії розвитку ембріонів. Аналіз коефіцієнтів інгібування $I_{0,5}$ показав найбільшу чутливість цієї іонтранспортної системи до впливу авермектинів на стадії X поділу бластомерів.*

Ключові слова: ІВЕРМЕКТИН, Na^+ , K^+ -АТФАЗНА АКТИВНІСТЬ, ЗАРОДКИ В'ЮНА, КОЕФІЦІЄНТ ІНГІБУВАННЯ.

Авермектини — це родина близькоспоріднених 16-членних макроциклічних лактонів, які є продуктами життєдіяльності *Streptomyces avermitilis* і володіють широким спектром активності проти інфекцій спричинених нематодами та членистоногими. Для препаратів B_{1a} характерна найбільша ефективність у відношенні до паразитів [1], тому саме їх використовують як діючу речовину в різних антипаразитарних комерційних препаратах.

Дослідження авермектинів як антипаразитарних препаратів зосереджувалось виключно на побічних ефектах, зумовлених компонентом B_{1a} та його гідропохідним H_2B_{1a} (івермектин). Показано, що авермектин та івермектин (у концентраціях) є дуже токсичними для безхребетних і водночас не токсичними для ссавців та інших хребетних [2]. Хоч механізм дії авермектинів повністю не досліджений, їх застосовують для лікування онхоцерозу в людини [1], а також застосовується проти деяких ектопаразитів [3]. Івермектин широко застосовується з метою профілактики паразитичних захворювань у рибному господарстві, однак виявлено, що він має певний дозозалежний токсичний вплив на молодняк риб [4]. Івермектин в організмі безхребетних діє на нервово-м'язеву систему шляхом активації гальмівних глутамат-залежних та ГАМК-залежних хлорних каналів [5, 6]. Встановлено, що івермектин, як антипаразитарний агент, є також позитивним алостеричним ефектором нейронного нікотинзалежного ацетилхолінового рецептору [7].

Недавно встановлено, що івермектин інгібує Ca^{2+} -АТФазу саркоплазматичного ретикулу, шляхом блокування транспорту Ca^{2+} , затримуючи фермент на стадії E_1 [8]. Na^+ , K^+ -АТФаза (3.6.1.3) належить до АТФаз Р-типу з характерним E_1 – E_2 конформаційним переходом, як й Ca^{2+} -АТФаза саркоплазматичного ретикулу. Na^+ , K^+ -АТФаза цитоплазматичних мембран є не тільки маркером плазматичної мембрани, а й відіграє ключову роль у виконанні електрофізіологічних функцій мембрани та процесах ембріогенезу [9]. Тому, доцільно дослідити вплив івермектину на Na^+ , K^+ -АТФазу для з'ясування можливих механізмів побічної дії препарату на клітини хребетних. Проведені нами дослідження показали, що івермектин, інгібує Na^+ , K^+ -АТФазну активність зародків в'юна протягом раннього ембріогенезу.

Для більш чіткої характеристики змін Na^+ , K^+ -АТФази плазматичної мембрани зародків за умов впливу івермектину, проведено аналіз дозозалежного інгібувального ефекту цього препарату на різних стадіях розвитку зародків і визначено коефіцієнти інгібування $I_{0,5}$.

Матеріали і методи

В експериментах використовували зародки в'юна на різних стадіях розвитку — від запліднення до стадії останнього синхронного поділу бластомерів (X поділ, шоста година).

Яйцеклітини отримували методом А. А. Нейфаха [10]. Овуляцію стимулювали внутрішньом'язовим введенням самкам хоріогонічного гонадотропіну (500 од.). Запліднення ікри проводили в чашках Петрі, додаючи суспензію спермій. Ікру відмивали від спермій та інкубували в розчині Гольтфретера ($t=21-22\text{ }^{\circ}\text{C}$). Стадії розвитку контролювали візуально, під бінокулярним мікроскопом МБС-9.

Зародки в'юна гомогенізували у буферному розчині такого складу (ммоль/л): сахароза — 120,0; Tris-HCl — 10,0 (рН 7,4; $t=4\text{ }^{\circ}\text{C}$); KCl — 130,0; MgCl_2 — 5,0. Фракцію мембран виділяли із зародків одержували методом диференційного центрифугування у градієнті густини сахарози, як було описано у статті М.Д. Луцика і співавторів [11].

Для визначення сумарної АТФазної активності 0,1 мл супернатанту інкубували 15 хв ($t=20-22\text{ }^{\circ}\text{C}$) у стандартному середовищі інкубації (1 мл) наступного складу (ммоль/л): NaCl — 100,0; KCl — 30,0; АТФ — 3,0; MgCl_2 — 3,0; ЕГТА — 1, 0; буфер *tris*-HCl — 30,0 (рН 7,4; $t=20-22\text{ }^{\circ}\text{C}$). Загальну активність досліджуваних клітин оцінювали за різницею вмісту неорганічного фосфату (P_i), що утворився в середовищі інкубації різного складу за наявності та відсутності фрагментів мембран з урахуванням поправки на вміст ендogenous P_i в мембранному препараті й виражали в мкмоль P_i у перерахунку за годину на 1 мг білка. Кількість продукту реакції P_i визначали за модифікованим методом Фіске-Суббароу [12]. Питому Na^+ , K^+ -АТФазну активність визначали за різницею між вмістом P_i у середовищі при додаванні та за відсутністю 1 мМ оубаїну. Вміст білка в суспензії мембран визначали за методом О. Lowry [13].

Згідно даних щодо токсичності івермектину [4] у роботі досліджували вплив препарату в концентраціях 0,01, 0,1, 1, 10, 100 мг/л. Розчини івермектину відповідної концентрації вносили в інкубаційне середовище безпосередньо в ході реакції.

Коефіцієнти інгібування $I_{0,5}$ визначали методом лінеаризації кривих доза-ефект у логарифмічних координатах. Числові значення $I_{0,5}$ обчислювали в точках перетину прямих із віссю абсцис [14].

Статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням програмного пакета для персональних комп'ютерів *Microsoft Excel*, достовірність змін встановлювали за *t*-критерієм Стьюдента [15].

Результати й обговорення

Встановлено, що активність Na^+ , K^+ -активованої, Mg^{2+} -залежної АТФази зародків в'юна за нормальних умов зростає протягом ранніх етапів ембріогенезу [16]. Подібні результати були отримані Leong P.K. [9] на зародках морських їжаків при вивченні характеру змін Na^+ , K^+ -АТФазної активності протягом перших годин розвитку.

Na^+ , K^+ -АТФазна активність зародків на стадії 2 бластомерів становила $11,61 \pm 0,82$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка ($n=10$). Протягом наступних п'яти годин розвитку, активність оубаїнчутливої АТФази плазматичних мембран зародків поступово зростала і досягала максимального значення на стадії VIII поділу бластомерів — $17,92 \pm 0,67$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка ($n=10$). На стадії X поділу бластомерів спостерігалось незначне зниження Na^+ , K^+ -АТФазної активності бластомерів зародків у порівнянні з попередньою досліджуваною стадією, яка становила $15,84 \pm 1,31$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка.

Відомо, що збільшення Na^+ , K^+ -АТФазної активності зародків в'юна зумовлює підвищення рівня трансмембранного потенціалу (ТМП) протягом раннього розвитку [16], які десинхронно нарастають до X поділу бластомерів. Наприкінці синхронних поділів бластомерів спостерігається короткочасне зниження рівня ТМП й ензиматичної активності Na^+ , K^+ -помпи [17]. Цікаво, що саме в цей період у зародків падає мітотичний індекс і зростає морфогенетична активність ядер. До цього часу розвиток зародків здійснюється за рахунок генетичної інформації, яка нагромаджена материнським організмом, а отже всі біосинтетичні процеси вимагають перерозподілу пулів макроергів [17, 18].

За умов інкубації зародків в'юна на перших годинах розвитку за наявності в середовищі інкубації івермектину в концентраціях $100 \div 0,01$ мг/л Na^+ , K^+ -АТФазна активність зазнавала значних змін (рис. 1).

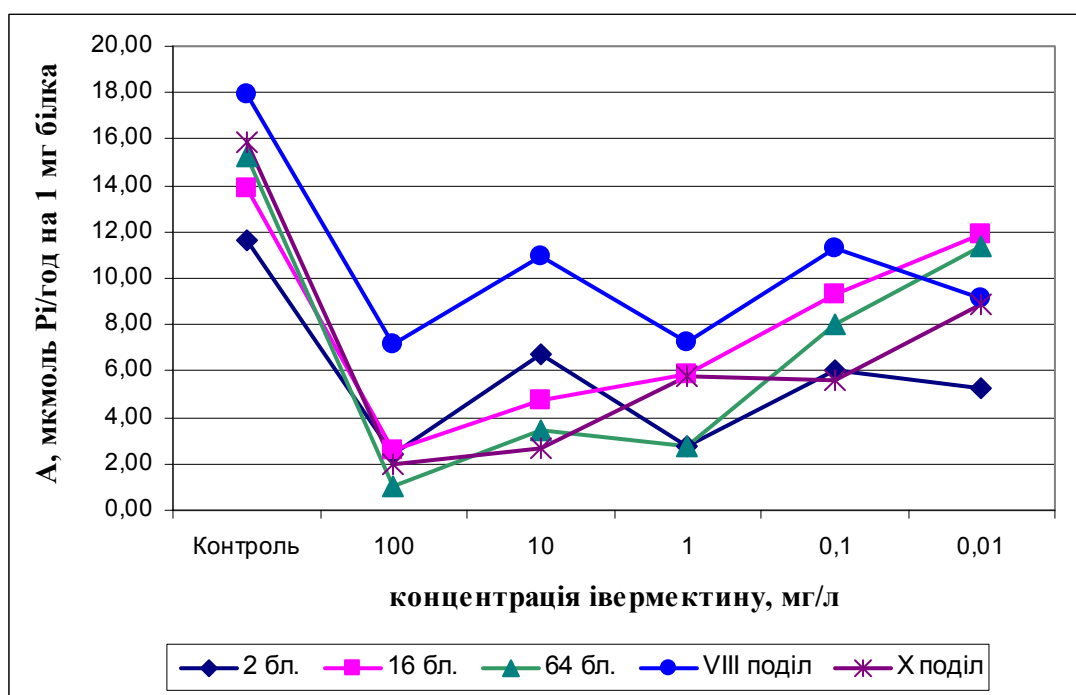


Рис. 1. Активність Na^+ , K^+ -АТФази на різних стадіях розвитку зародків (стадії 2, 16, 64 бластомерів, VIII та X поділу) за наявності івермектину у середовищі концентрації $100 \div 0.01$ мг/л

Найбільшу чутливість до дії івермектину Na^+ , K^+ -АТФаза проявляла на пізніших стадіях поділів бластомерів. При дії $0,01$ мг/л препарату спостерігали зниження активності Na^+ , K^+ -АТФази в середньому на $30 \div 40$ % на всіх досліджуваних стадіях розвитку, тоді як максимальна концентрація івермектину в середовищі інкубації (100 мг/л) зумовлювала зниження ферментативної активності Na^+ , K^+ -помпи на 80 % у порівнянні з контролем. На стадії X поділу бластомерів відмічено виражене зниження активності Na^+ , K^+ -АТФази на $87,48 \pm 10,95$ % при наявності в середовищі препарату в концентрації 100 мг/л і на $44,94 \pm 24,65$ % при $0,01$ мг/л івермектину.

Коефіцієнт інгібування $I_{0,5}$ (табл. 1) на стадії X поділу та 2 бластомерів мав найнижчі значення, тобто як на проміжних стадіях коефіцієнти мало відрізнялись за порядком. Це свідчить про те, що на першій та шостій годині розвитку чутливість Na^+ , K^+ -АТФази до дії цього авермектину зростає.

Таблиця 1

Значення коефіцієнтів інгібування $I_{0,5}$ (мг/мл) Na^+ , K^+ -АТФази івермектином протягом синхронних поділів бластомерів зародків в'юна

Препарат	Стадії розвитку зародків в'юна				
	2 бластомери	16 бластомерів	64 бластомери	VIII поділ	X поділ
Івермектин	$6,18 \times 10^{-7}$	$6,08 \times 10^{-4}$	$4,25 \times 10^{-5}$	$5,51 \times 10^{-4}$	$5,80 \times 10^{-6}$

Встановлено, що івермектин інгібує Ca^{2+} -АТФазу саркоплазматичного ретикулу, затримуючи конфірмаційний перехід ферменту з стадії $E_1 - E_2$. [8]. Відомо, що даний препарат здатний інгібувати також інші ферменти, які володіють АТФазною активністю [19, 20]. Ймовірно, що вплив івермектину реалізується на мембранному рівні, одним з механізмів якого можна вважати інгібування АТФаз Р-типу.

Висновки

Проведений аналіз показав, що ступінь інгібувального впливу івермектину залежить від концентрації препарату в середовищі інкубації та від стадії розвитку зародків. Чутливість

Na⁺, K⁺-АТФази до впливу препарату змінюється по-різному від першої до останньої стадій синхронних поділів бластомерів, про що свідчать отримані значення коефіцієнтів I_{0,5}. Проте у всіх випадках інгібуювальний вплив івермектину посилювався на першій та шостій годині поділу бластомерів, саме коли інтенсивність біосинтетичних процесів у зародків, які вимагають значних енерговитрат, є максимальною.

S.M. Mandzynets, M.V. Tselevych, D. V. Yanovich, D.I. Sanahurski.

THE INFLUENCE OF IVERMECTIN ON THE CHANGE OF THE ENZYMATIC ACTIVITY Na⁺, K⁺-PUMP OF LOACH EMBRYOS

Summary

The effect of ivermectin on the activity of Na⁺, K⁺-ATPase of the loach embryos (*Misgurnus fossilis* L.) during early development was been researched. It was shown that inhibit of enzyme activity is dependent of dosage the drug and the stage of embryogenesis. The inhibitory effect was evaluated in inhibition coefficient (I_{0,5}). The value of the inhibition coefficient and analysis of the responsivity ion transport system to act of avermectin were shown higher inhibition influence of ivermectin on last stage of embryos development.

Ivan Franko National University of Lviv

1. *Campbell W. C.* Ivermectin as an antiparasitic agent for use in humans // *Annu Rev. Microbiol.* — 1991. — Vol. 45. — P. 445–474.

2. Identification of a *Drosophila melanogaster* glutamate-gated chloride channel sensitive to the antiparasitic agent avermectin / Cully D. F., Paress P. S., Liu K. K., Schaeffer J. M., Arena J. P. // *J. Biol. Chem.* — 1996. — Vol. 271. — P. 20187–20191.

3. Topical application of ivermectin for human ectoparasites / Youssef M. Y., Sadaka H. A., Eissa M. M., El-Ariny A. F. // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* — 1995. — Vol. 53. — P. 652–653.

4. *Mladineo I., Marsic-Lucic J., Buzancic M.* Toxicity and gross pathology of ivermectin bath treatment in sea bream *Sparus aurata*, L. // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* — 2006. — Vol. 63(3). — P 438–42.

5. Bloomquist J. R. Toxicology, mode of action and target site-mediated resistance to insecticides acting on chloride channels // *Comp. Biochem. Physiol.* — 1993. — Vol. 106. — P. 301–314.

6. Effects of Ivermectin on gamma-aminobutyric acid- and glutamate-gated chloride conductance in arthropod skeletal muscle. / Duce I. R., Bhandal N. S., Scott R. H. & Norris T. M. // *J. American Chemical Society, Washington, DC. In Molecular Action of Insecticides on Ion Channels*, ed. Marshall Clark. — 1995. — P. 251–263.

7. Ivermectin: A Positive Allosteric Effector of the α7 Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor / Krause R. M., Buisson B., Bertrand S. et all // *Mol. Pharm.* — 1998. — Vol. 53. — P.283–294.

8. *Bilmen J. G., Wootton L. L., Michelangeli¹ F.* The inhibition of the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase by macrocyclic lactones and cyclosporin A // *Biochem. J.* — 2002. — Vol. 366. — P. 255–263.

9. *Leong P. K., Manahan D.* Metabolic importance of Na⁺/K⁺-ATPase activity during sea urchin development // *J. Exp. Biol.* — 1997. — Vol. 200. — P. 2881 – 2892.21.

10. *Нейфах А. А., Пomm Н. Н.* // Доклад НН СССР. — 1959. — Т. 125, №2. — С. 423–434.

11. *Луцик М. Д., Лук'яненко А. В., Кусень С. И.* Метод массового механического удаления оболочек из зародышей вьюна // *Онтогенез.* — 1983. — Т. 14, №6. — С. 386–388.

12. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен). Учеб. пособие / Под ред. М. И. Прохоровой. — Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. — 272 с.

13. Protein measurement with the Folin phenol reagent / Lowry O. H., Rosebrough N. G., Farr A. L., Randall R. C. // *J. Biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193, № 1. — P. 265–275.

14. *Chou T. C.* Derivation and properties of Michaelis-Menten type and Hill type equations for reference ligands // *J. Theor. Biol.* — 1976. — Vol. 59 (2). — P. 253–276.

15. Деркач М. П., Гумецький Р. Я., Чабан М. Е. Courses of Michaelis-Menten type and Hill type equations for reference ligands // *J. Theor. Biol.* — 1976. — Vol. 59 (2). — P. 253–276.
варіаційної статистики. — К., 1977. — 206с.
16. Аденозинтрифосфаты в эмбриональном развитии вьюна / Бериташвили Д. Р., Кутателадзе Т. В., Маршани Д. О., Кафиани К. В. // *Онтогенез.* — 1974. — Т. 5, № 4. — С. 363–371.
17. Гойда О. А. Биофизические аспекты раннего онтогенеза животных. К.: Наук. думка, 1993. — 224 с.
18. Нейфах А. А., Тимофеева М. Я. Проблемы регуляции в молекулярной биологии развития. — М.: Наука, 1978. — 336 с.
19. Karwatsky J., Lincoln M. C., Georges E. A. Mechanism for P-Glycoprotein-Mediated Apoptosis As Revealed by Verapamil Hypersensitivity // *J. Biochem.* — 2003. — Vol. 42. — P. 12163–12173.
20. Interaction of ivermectin with multidrug resistance proteins (MRP1, 2 and 3) / Lespine A., Dupuy J., Orłowski S. et al // *Chem Biol Interact.* — 2006. — Vol. 159(3). — P. 169–79.