

Міністерство освіти і науки України  
Львівський національний університет імені Івана Франка

**Д. І. Санагурський**

# **ОБ'ЄКТИ БІОФІЗИКИ**

Монографія

Львів  
Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка  
2008

УДК 577.35

ББК Е0\*71

С 18

**Рецензенти:**

д-р мед. наук, академік НАН України М.Ф. Шуба

(Київ: Інститут фізіології ім. академіка О.О. Богомольця НАН України);

д-р біол. наук, проф. *М.С. Мірошніченко*

(Київ: Київський національний університет імені Тараса Шевченка);

д-р біол. наук, проф. *Є.О. Гордієнко*

(Харків: Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна)

*Рекомендовано до друку Вченою Радою*

*Львівського національного університету імені Івана Франка*

*Протокол № 1 від 23 січня 2008 р.*

**Санагурський Д.І.**

С 18            Об'єкти біофізики: Монографія – Львів. Видавничий центр  
ЛНУ імені Івана Франка, 2008. – 522 с.

ISBN 978-966-613-641-4

У монографії висвітлено частину проблем, які охоплюють наукові інтереси автора. Зокрема, проблеми, що стосуються питання генерування потенціалів спокою та дії прісноводної гідри, впливу на ці явища йонів важких металів. Досліджено також проблеми генерування потенціалу спокою на зародкових об'єктах (зародках в'юна), роботу деяких мембранних транспортних систем, а також проаналізовано і вплив на них йонів важких металів.

В окремих розділах монографії розглянуто математичні моделі та зроблено структурно-функціональний аналіз на підставі експериментальних даних.

УДК 577.35

ББК Е0\*71

ISBN 978-966-613-641-4

© Санагурський Д. І., 2008

© Львівський національний університет  
імені Івана Франка, 2008

## Перелік умовних позначень

AK – активність казеїнкінази II;

[ ]<sub>в</sub> – внутрішньоклітинна концентрація йонів;

[ ]<sub>з</sub> – зовнішньоклітинна концентрація йонів;

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>в</sub> – концентрація йонів кальцію в цитозолі;

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>з</sub> – зовнішньоклітинна концентрація йонів кальцію;

Δt – інтервал квантування;

5-HT – серотонін (5-гідрокситриптамін);

CNQX – 6-ціано-нітроквіноксалін-2,3-діон;

D1-APV, D-AP<sub>5</sub>, або D-APV – D-2-аміно-5-фосфонопентанат;

EC<sub>50</sub> – середні тератогенні концентрації;

g<sub>K</sub> – калієва потенціалзалежна провідність;

g<sub>Na</sub> – натрієва потенціалзалежна провідність;

GSH – глутатіон;

g<sub>Ca</sub> – кальцієва потенціалзалежна провідність;

g<sub>Cl</sub> – хлорна провідність мембран;

K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> – співвідношення K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>;

LC<sub>50</sub> – середні ембріолетальні концентрації;

MGluR – глутаматні метаботропні рецептори;

N – кількість інтервалів квантування;

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> – співвідношення Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>;

NBQX – 6-нітро-7-сульфамобензоквіноксалін-2,3-діон;

NMDA – N-метил-D-аспартат;

pH<sub>ц</sub> – концентрація йонів водню в цитоплазмі;

$R_{вх}$  – вхідний опір;

$V$  – об'єм зародка;

$\alpha$ -КГДГ –  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназа;

АМРА –  $\alpha$ -аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксалонпропіонат;

АП – активність  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФ-ази;

ГАМК – гама-аміномасляна кислота;

ГАМК<sub>A</sub> – рецептор – іонотропний рецептор, який активується гама-аміномасляною кислотою;

ГАМК<sub>B</sub> – рецептор – метаботропний рецептор;

ГПСП – гальмівний постсинаптичний потенціал;

ЕДТА – етилендіамінтетраацетат;

ЗПСП – збуджувальний постсинаптичний потенціал;

іЗЦДГ – ізоцитратдегідрогеназа;

і-клітина – інтерстиціальна клітина;

КЗ – коефіцієнт електричного зв'язку;

ЛДГ – лактатдегідрогеназа;

МК801 – 5-метил-10,11-дигідро-5Н-добензоциклопентен-5,10-імін малат;

МО – міжнародна одиниця активності ензиму;

МП – мембранний потенціал;

МПС – мембранний потенціал спокою;

МПФ – фактор прогресії мітозу;

ПД – потенціал дії;

ПЕА – пачкова електрична активність;

ПС – потенціал спокою;

РПД – ритмічні потенціали дії;

СДГ – сукцинатдегідрогеназа;

СЗІ – система збору інформації;

СРР – (2-карбоксіпіперазин-4-ил) пропіл-1-фосфонічно кислий;

ТМП,  $E_m$  – трансмембранний потенціал;

ТНІР – 4, 5, 6, 7-тригідроізоксазолпіридин;

ЦНС – центральна нервова система;

ШВВ – швидкість виділення вуглекислого газу;

ШГ – швидкість гліколізу;

ШПК – швидкість поглинання кисню.

*Присвячується  
моїм вчителям  
Автор*

## **В с т у п**

Поглиблення фундаментальних досліджень процесів трансмембранного біоелектрогенезу, впливів, що його модифікують, з використанням системного підходу, статистичних методів, структурно-функціонального аналізу та різних модифікацій математичного моделювання дають змогу широко вивчати послідовність подій, які спричиняють багато фундаментальних загальнобіологічних явищ, наприклад, диференціювання, підтримання гомеостазу та ін. Одержані результати поглиблюють уявлення про механізм передавання збудження між нервовими та епітеліальними клітинами кишковопорожнинних, про механізми збудження та гальмування пачкової електричної активності клітин ектодерми прісноводної гідри, про закономірності часового організування клітинних процесів на стадії дроблення в ранньому ембріогенезі холоднокровних тварин, про вплив катіонів важких металів на електричну активність зародків в'юна, на ультраструктуру бластомерів зародків та на електричну активність клітин ектодерми гідри. Апробовані в роботі статистичні методи можуть бути застосовані для аналізу динаміки фізико-хімічних характеристик клітин та біосистем з метою діагностування та

прогнозування їхнього функціонального стану у разі дії різних факторів.

Математичні моделі можна використати для дослідження впливу зовнішнього середовища на динаміку ТМП (модель динаміки ТМП на ранніх стадіях ембріогенезу тварин), для оцінення балансу регуляторних субстратів у бластомерах протягом досліджуваного інтервалу часу розвитку (модель розвитку ембріона в'юна). Розроблені моделі необхідно далі розвивати і конкретизувати при плануванні та проведенні досліджень, які стосуються регулювання раннього ембріогенезу тварин. Розглянутий у роботі підхід до опису структурно-функціональних тріадних взаємодій між елементами біосистем на різних рівнях організування стає підставою для дослідження відомих у біології феноменів, які частково вивчені експериментально, наприклад, ферментативний каталіз, екологічні системи, а також їх аналітично оцінювати. Модель синтезу рибофлавіну може бути використана для вибору оптимальних режимів у технологічних процесах при виробництві вітаміну В<sub>12</sub>.

# **Розділ I. БІОЕЛЕКТРОГЕНЕЗ ТА МЕТАБОЛІЗМ**

## **1.1. Трансмембранний біоелектрогенез на ранніх стадіях ембріонального розвитку тварин**

У живих системах, окрім нервового, гуморального та генетичного регулювання відома ще одна система керування такими життєво важливими функціями, як ріст, регенерування та підтримання біоритмів, а саме: різниця електричних потенціалів (М.Б. Бекенблит, Е.Г. Глаголева, 1988). Науковці припускають можливість зв'язку між ритмічними коливаннями обміну речовин та осциляціями мембранного потенціалу (Д.І. Санагурський, 1983). Л.В. Білоусов, зокрема, виявив зв'язок між контактною поляризацією зародкових клітин амфібій та інтенсивністю білкового синтезу (Л.В. Белоусов, 2000). Зауважимо, що завдяки клітинному метаболізму підтримується певний розподіл іонів між цитоплазмою та середовищем. Це створює значний заряд потенціальної енергії у вигляді трансмембранних та електрохімічних градієнтів, які можуть бути



досить ефективно використані різноманітними формами клітинної активності (П.Г. Костюк, 1978).

Електрофізіологічні параметри мембран яйцеклітин та зародків тварин є дуже чутливими до впливу факторів зовнішнього середовища, привернувши до себе увагу дослідників близько 40 років тому. У період дроблення для зародків різних тварин зареєстровано закономірну гіперполяризацію мембрани бластомерів з величиною приблизно від  $-5$  –  $-12$  мВ – перед утворенням першої борозни дроблення та до  $-34$  –  $-67$  мВ – на стадії середньої бластули (Д.І. Санагурський, 1983).

Вперше трансмембранний потенціал зареєстровано в яйцеклітин морської зірки, причому діапазон його значень становив від  $-10$  до  $-60$  мВ (J. Tupper et al., 1970). Незабаром після цього на яйцеклітинах інших видів тварин було отримано подібні результати. Це явище простежується і під час раннього розвитку коропа (В.А. Мельник, 1971; В.П. Мельник, В.М. Сабодаш, 1976; 1978), в'юна (В.П. Божкова, 1971; В.П. Божкова и др., 1971; Е.А. Гойда и др., 1974; И.Ш. Квавилашвили, 1971; И.Ш. Квавилашвили и др., 1971; С.И. Кусень и др., 1980), морських риб (E. Vodas et al., 2000), тритона (S. Ito et al., 1974), аксолотля (В.П. Божкова и др., 1974), шпорцевої жаби (De Laat S. et al., 1974; C. Slack, A. Warner, 1973), а також мишей (R. Chen et al., 1994). Вперше на зародках амфібій було виявлено, що ці зміни відбуваються у коливному режимі з періодом, який зрівнювався з періодом тривалості окремого клітинного циклу (D.J. Woodward, 1968; 1965). Пізніше було встановлено для зародків в'юна (Д.І. Санагурський, 1983; И.Ш. Квавилашвили и др., 1971), аксолотля (В.П. Божкова, 1971;

В.П. Божкова и др., 1974), шпорцевої (D.J. Woodward, 1965) та озерної жаб (Ш.Д. Чиквашвили, 1979; С. Slack et al., 1973), що такий період коливання мають всі електрофізіологічні характеристики плазматичних мембран зародків.

Протягом восьми годин розвитку зародків в'юна неперервне реєстрування динаміки ТМП вперше провів Гойда (Д.І. Санагурський, 1983; Е.А. Гойда, 1993), використовуючи автоматизовані методи неперервного біофізичного експерименту. Доведено, що при неперервному реєструванні ТМП під час раннього розвитку зародків в'юна спостерігались періодичні зміни його рівня, синхронні з циклами клітинних поділів. Водночас гіперполяризація мембрани у кожному клітинному циклі в часі збігалася з інтерфазою, а деполяризація – з мітозом. Рівень потенціалу зростав до п'ятого-шостого поділів максимально та до дев'ятого поділу майже не змінювався – коливався у межах  $-59 \div -68$  мВ. Після десинхронізації каріокінезу, що настає за стадією морули, рівень потенціалу дещо знижувався. Найбільш помітне зниження його спостерігали на шостій годині розвитку (Е.А. Гойда, 1993).

Для зародків в'юна, що розвивалися в первітелінових оболонках, зміни ТМП мали колильний характер при поступовому наростанні абсолютних значень: від  $-19 \div -22$  мВ на стадії двох бластомерів до  $-67,1$  мВ – на стадії 128 бластомерів. Протягом перших шести годин розвитку, коли при температурі  $21^{\circ}\text{C}$  реалізується 10 повних поділів бластомерів, ТМП змінюється за фазами. Період кожного коливання становить 30–32 хв, що відповідає

величині  $\tau_0$ , якою позначають тривалість клітинних поділів під час синхронних дроблень бластомерів в'юна при температурі інкубації середовища 21° С. Протягом двох з половиною годин розвитку ( $5 \tau_0$ ), коли борозни дроблень меридіональні і завжди перпендикулярні попереднім, фаза наростання рівня ТМП набагато довша, ніж його зниження, а амплітуда розмаху коливання ТМП залежить саме від цього наростання.

Перші якісні відмінності між бластомерами, що синхронно діляться, спостерігають після п'ятого поділу, коли борозна дроблення проходить паралельно до екватора жовтка, внаслідок чого утворюється “шапочка”, а клітини верхнього шару відділяються від жовтка мембранами, впливаючи на вигляд кривої динаміки ТМП у чергових циклах: фази підйому та спаду вирівнюються, а рівень ТМП коливається в межах  $-59 \div -68$  мВ протягом наступних трьох–чотирьох мітотичних циклів, досягаючи плато максимального рівня ТМП для цієї стадії розвитку зародків в'юна. Після десинхронізації каріокінезу, яка настає після стадії морули (Н.Н. Ротт, В.П. Божкова, 1980), рівень ТМП дещо знижується, а періодичні коливання його затухають, причому період коливань ТМП подовжується. Найбільш помітне зниження рівня ТМП спостерігається на шостій стадії розвитку ( $12 \tau_0$ ), коли у зародків, які розвиваються, падає мітотичний індекс, і різко зростають коефіцієнти асинхронності (Н.Н. Ротт, 1987), електричного зв'язку (В.П. Божкова и др., 1973) і морфогенетична активність ядер (А.А. Нейфах, 1977; А.А. Нейфах, М.Я. Тимофеева, 1978). До цього переломного моменту розвиток зародків

здійснюється за рахунок генетичної інформації, яка була накопичена під час оогенезу в материнському організмі. Ці процеси і, особливо, інтенсивний синтез нових і-РНК, потребують значних енерговитрат (Н.Д. Озернюк, 1985), що приводить до перерозподілу пула макроергів. Цікаво, що саме в цей період падає активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази (Д.Р. Бериташвили и др., 1974), і помітно знижується рівень ТМП плазматичних мембран.

Після шести годин розвитку, на інтерфазі одинадцятого–дванадцятого поділів, зафіксовано істотне зростання тривалості мітотичного циклу за рахунок інтерфази, тоді як тривалість мітозу і його окремих фаз істотно не змінюється (Н.Н. Ротт, Г.А. Шелелева, 1967). На цій стадії розвитку зародків в'юна було відмічено значну варіабельність рівня ТМП, яка протягом наступних 30 хв стабілізувалася до  $-59 \div -67$  мВ, але швидко з'явилися осциляції, які нагадували енцефалограму. Такі осциляції рівня ТМП реєстрували в усіх дослідях, тривалість яких перевищувала сім годин після запліднення яйцеклітин.

У разі неперервного реєстрування ТМП під час раннього розвитку зародків в'юна, позбавлених перивітелінових оболонок, також спостерігають періодичні зміни його рівня, синхронні з циклами клітинних поділів. Однак абсолютні величини ТМП в перших чотирьох клітинних циклах були на 7–9 мВ вищі, а протягом п'ятого–десятого дроблень на 5–12 мВ нижчі, ніж у зародків, які розвиваються в оболонках. Крім того, зародки, позбавлені перивітелінових оболонок, вже після 16 бластомерів досягали рівня “плато” коливань ТМП (в межах  $-47 \div -64$  мВ), яке

утримувалось аж до дев'ятого дроблення. На шостій годині розвитку відбувалося більш різке, ніж в попередніх циклах, зниження ТМП. Починаючи з шостого дроблення у зародків без перивітелінової оболонки простежується збільшення тривалості мітотичних циклів, так що до VIII дроблення ці зародки відстають майже на цілий клітинний цикл від зародків, які розвивалися в оболонках. Однак гіперполяризація мембран зародків в'юна, які розвиваються без перивітелінових оболонок, також припадає на інтерфазу клітинного циклу, а деполяризація – на мітоз. Максимальних значень ТМП досягає під час прометафази, і в цей час у мікроскопі добре видно початок закладання борозни дроблення, що збігається з даними, які були одержані на зародках у перивітелінових оболонках.

Отже, після звільнення зародків в'юна від перивітелінової оболонки не відбувається істотних змін рівня ТМП порівняно з зародками, які розвивалися в оболонках.

Загалом за динамікою ТМП зародків, які розвивались у перивітелінових оболонках та без них, можна визначити тривалість не тільки клітинного циклу, але і його окремих фаз, а також стадій раннього розвитку, а саме: синхронного дроблення бластомерів (перше–сьоме дроблення), закладання екваційних борозен (шосте дроблення), початок асинхронних дроблень ядер (восьме дроблення), утворення морули і повної десинхронізації дроблень (дев'яте і десяте дроблення), завершення формування ранньої бластули і початок морфогенетичної функції ядер (12–13 τ<sub>0</sub>) (десяте–одинадцяте дроблення). Дехто з науковців

одночасно з ростом абсолютних значень ТМП протягом синхронних дроблень бластомерів зародків виявляв закономірні коливання електрофізіологічних характеристик плазматичних мембран з періодом, який дорівнює тривалості окремого клітинного циклу.

Спочатку періодичні коливання ТМП та вхідного опору ( $R_{вх}$ ), синхронні при першому та другому дробленні бластомерів, були виявлені на зародках амфібій (D.J. Woodward, 1965; 1968). Встановлено, що до появи борозни дроблення ТМП поступово зростав від  $-20$  до  $-30$  мВ, а потім знову знижувався, причому це повторювалося в наступних клітинних циклах. Разом з тим  $R_{вх}$  знижувалося від  $500$  до  $300$  кОм, а потім знову зростало майже до вихідного рівня перед появою наступної борозни дроблення. Коливання цих параметрів мембран зародків жаби автор намагався пояснити тим, що нові контактні мембрани відрізняються від виявлених високою проникністю для йонів  $K^+$ . Згідно з розрахунками поверхнева мембрана яйцеклітини має питомий опір  $32$  кОм/см<sup>2</sup> та рівноважний потенціал у розчині Рінгера  $15$  мВ, а новоутворена контактна мембрана бластомерів, які діляться, після запліднення яйцеклітини характеризується зниженим опором ( $0,95$  кОм/см<sup>2</sup>) та підвищеним потенціалом ( $-68$ ). Згодом зниження ТМП та ріст  $R_{вх}$  після дроблення бластомерів він пояснював появою значного послідовного опору між контактними мембранами та зовнішнім середовищем внаслідок звуження міжклітинних щілин. Цікаво, що інші автори (C. Slack et al., 1973) для зародків шпорцевої жаби до стадії

тридцяти двох бластомерів під час утворення кожної борозни дроблення також відзначали найвищу чутливість ТМП до позаклітинної концентрації калію. Хоча після початку дроблень бластомерів ТМП стає залежним від співвідношення концентрацій  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (В.П. Божкова, Л.М. Чайлахян, 1977).

Абсолютні значення ТМП повністю відповідають іонним градієнтам на плазматичних мембранах ооцитів та зигот (L.F. Jaffe, 1977; 1980; 1999; З.Я. Іваницька та ін., 2007). Так, калію в морській воді міститься 10 мМ, а в яйцеклітинах морських їжаків – 210 мМ, тоді як натрію та хлору в середовищі відповідно в дев'ять та сім разів більше, ніж у клітинах. На мембранах яйцеклітин амфібій концентрація йонів калію становить 103 мМ, а натрію – 70 мМ, що відповідає ТМП –63 мВ при інкубуванні об'єкта в розчині Рінгера (G. Morrill et al., 1971; G. Morrill, D. Watson, 1966). Також доведено (В.П. Божкова, Л.М. Чайлахян, 1977), що незрілі ооцити містять багато йонізованого калію та мало натрію, а їхня мембрана більш проникна для калію. В процесі дозрівання в ооциті накопичується натрій, основна частина якого переходить у зв'язаний стан. У зрілих ооцитів різко зменшена загальна йонна проникність мембран. Причому з втратою вибірковості мембран ооцитів щодо  $\text{K}^+$  пов'язаний початковий спад рівня ТМП у зрілих та готових до запліднення яйцеклітин, паралельно зі зростанням проникності мембран для йонів  $\text{K}^+$ , ще до появи першої борозни дроблення відбувається і збільшення ТМП.

Значний вклад у генерування таких змін ТМП вносять іони  $\text{K}^+$ , вміст яких у бластомерах спочатку швидко зростає, а досягнувши максимальних значень, залишається протягом

певного часу на сталому рівні (Д.Р. Бериташвили, 1974; Д.Р. Бериташвили, Н.Н. Ротт, 1973). Це збігається зі зміною мітотичного індексу (Н.Н. Ротт, 1989) та активацією макромолекулярних синтезів в ядрі (К.А. Кафiani, А.А. Костомарова, 1978).

У костистих риб збільшується вміст  $K^+$  за рахунок переходу його з жовтка у бластодиск, приблизно у три рази, до стадії бластули, що доведено у разі використання методу полум'яної фотометрії (Д.Р. Бериташвили и др., 1969; 1970; Д.Р. Бериташвили, Н.Н. Ротт, 1973). У амфібій виявлено, що вміст  $K^+$  у клітинах постійний (Д.Р. Бериташвили и др., 1974). Окрім того, високий рівень натрію на початкових стадіях розвитку зародків у бластомерах, навпаки, спадає. Однак, його кількість в рідині бластоцелю пропорційно зростає (А.В. Kostellow, G.A. Morrill, 1968; G. Morrill, D. Watson, 1966). Разом з тим активність цього катіона в клітинах майже не змінюється (С. Slack et al., 1973). На підставі цих даних було запропоновано гіпотезу, що в бластоцель переходить натрій, який у дозріваючому ооциті накопичувався у зв'язаному вигляді. Формування певної осмотичності рідини бластоцелю є активним процесом і протікає при активній роботі  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФ-ази (С. Slack, А. Warner, 1973; С. Slack et al., 1973).

Отже, ці результати свідчать про те, що співвідношення  $K^+/Na^+$  зростає протягом раннього розвитку костистих риб та амфібій. Початкова величина цього співвідношення може бути різною в різних видів тварин, але до моменту сповільнення темпу поділів воно дорівнює двом. Експериментально доведено



(Д.Р. Бериташвили, 1974; Д.Р. Бериташвили, Н.Н. Ротт, 1973), що рівень ТМП виявляє найбільшу чутливість до змін концентрації  $K^+$  у зовнішньому середовищі й майже не реагує на зміни концентрацій іонів  $Na^+$  та  $Cl^-$ .

Вважають, що залежність вмісту йонів у зародкових клітинах від їхньої концентрації в середовищі під час розвитку істотно змінюється, а на стадії десятого–одинадцятого поділів зародки здатні підтримувати сталий рівень іонів у бластомерах, незалежно від їхнього вмісту в середовищі (звичайно, в допустимих для життєдіяльності концентраціях) (Н.Н. Ротт и др., 1978; Y. Salanki et al., 2000). Ці дані дають змогу пояснити, чому, починаючи з дев'ятого поділу у в'юна (А.И. Зотин и др., 1965) або на стадії морули у тритона (S. Ito et al., 1974) рівень ТМП мало залежить від змін іонного складу середовища. Очевидно, що для зародків необхідний певний час для формування автономної системи клітинного мембранного електрогенезу і регулювання внутрішньоклітинного йонного гомеостазу. Ці процеси досить істотні для початкових стадій диференціації, яка в бластомерах настає лише після накопичення певного граничного градієнта  $K^+$  (Н.Н. Ротт и др., 1978). Можливо, тому на стадії морули основними Salanki Y., потенціалгенеруючими йонами є  $K^+$  та  $Cl^-$ .

Підвищення рівня ТМП у ранньому розвитку в'юна нагадує закономірні зміни  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФ-азної активності гомогенатів зародків в'юна, що виявив Бериташвілі зі співавт. (Д.Р. Бериташвили, 1974; Д.Р. Бериташвили и др., 1974) у період раннього розвитку. Експерименти з додаванням оуабайну в

зародках тритона (К. Ohara, 1988) та в'юна (Е.А. Гойда и др., 1989) дали можливість встановити, що  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-аза здійснює певний внесок у гіперполяризацію мембрани під час дроблення. У фізіологічних умовах рівень потенціалу змінюється від  $-20$  до  $-60$  мВ, а при додаванні оубаїну відбувається деполяризація мембрани, величина якої залежить від стадії розвитку зародків. Вона є досить значною при внесенні інгібітора на стадії чотирьох або 32 бластомерів та не перевищує 5 мВ на стадії ранньої бластули (шоста година) (Е.А. Гойда и др., 1989).  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азна активність низька у незаплідненій яйцеклітині, а після запліднення поступово збільшується та залишається на одному рівні до восьмого поділу. Не випадкове і синхронне зростання цих двох параметрів мембранозв'язаних процесів, як і короточасне зниження рівня ТМП та активності натрієвої помпи після завершення формування морули, тобто в кінці періоду синхронних дроблень бластомерів, для якого характерне активування низки макромолекулярних синтезів, що потребують досить високих енергозатрат (Н.Д. Озернюк, 1985; В.С. Репин, 1980). Іншими дослідниками було встановлено, що активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -помпи змінюється періодично протягом циклу: вона максимальна в інтерфазі, та мінімальна під час мітозу (Е.А. Гойда и др., 1989).

Встановлено, що коефіцієнт електричного зв'язку у різних тварин має подібну тенденцію змін (В.П. Божкова и др., 1973; Е.А. Гойда и др., 1989). Його величина постійна до сьомого поділу в зародків в'юна, а далі зменшується з кожним наступним поділом і на десятому дорівнює  $0,29 \pm 0,09$ . Ці дані свідчать про те, що до

сьомого поділу зародок можна розглядати, з точки зору його електричної структури, як одну клітину, рівну за об'ємом усьому зародку. Те, що початкові синхронні поділи володіють високим коефіцієнтом електричного зв'язку, свідчить про вільний обмін іонами та молекулами з молекулярною масою не більше 1 000 Да (М.Б. Беркинблит и др., 1981). Процес залежить від активного формування щільних контактів, завдяки яким, як зауважує Божкова (В.П. Божкова, Н.В. Розанова, 1998), зародок функціонує як єдиний комунікаційний компартмент.

Японськими дослідниками виявлено (Т. Hirano, К. Takahashi, 1987) гетерогенність зародкової мембрани на стадії дроблення. Калієвий вихідний струм зареєстровано на новоутвореній мембрані (D.J. Woodward, 1965; 1968), а на інших ділянках мембрани досліджено вхідний іонний струм, зумовлений входженням  $\text{Na}^+$  та  $\text{Ca}^{2+}$  та виходом іонів  $\text{Cl}^-$  (Т. Shigemoto, Y. Okada, 1996).

Залежність коливань ТМП від концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі прослідковано у роботах (Е.А. Гойда, И.Р. Медына, 1985; И.Р. Медына и др., 1987). У разі браку іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі зміни рівня потенціалу аналогічні до норми, але його коливання цілком зникають. Найбільш чутливим до впливу  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  є період інтерфази клітинного циклу, коли активуються метаболічні процеси і накопичуються синтезовані речовини для чергового мітотичного поділу клітин.

В ооцитарній плазматичній мембрані наявні популяції різних іонних каналів, які докладно описано в огляді Вебера (W.M. Weber, 1999). Зокрема це: натрій селективні потен-

ціалкеровані, АТФ-чутливі та амilorид-чутливі канали;  $\text{Ca}^{2+}$ -активовані потенціалкеровані  $\text{Cl}^-$ -канали; калій селективні канали, що характеризуються чутливістю до ТЕА (тетраетиламонію) та  $\text{Ba}^{2+}$ , а також  $\text{K}^+$ -канали, що блокуються ТЕА та нечутливі до йонів  $\text{Ba}^{2+}$ . Останні володіють провідністю 20 пСм, середній час їхньої активності становить 300 мс. Вони малочутливі до позаклітинного  $\text{Ca}^{2+}$  та мають схожі характеристики до  $\text{K}^+$ -каналів затриманого випрямлення (Y. Okamura, K. Takahashi, 1993). Виявлено, що густина натрієвих (K. Takahashi, Y. Okamura, 1998) та кальцієвих (M. Kozuka, K. Takahashi, 1982) каналів зменшується протягом стадії дроблення у зародків асцидій, тоді як густина  $\text{K}^+$ -каналів затриманого випрямлення поступово збільшується до стадії бластули (M.L. Block, W.J. Mody, 1987; S. Hagiwara et al., 1981; S. Mitani, 1985; Y. Okamura, K. Takahashi, 1993). Є повідомлення про можливість активування йонних потоків у ооцитах шпорцевої жаби рівнем АМФ (E. Bodas et al., 2000).

Крім того, з перших поділів дроблення на зародках багатьох тварин доведено наявність неселективних катіонних каналів – щілинних контактів (М.Б. Беркинблит и др., 1981; В.П. Божкова, Н.В. Розанова, 1998). Цими каналами можуть транспортуватися великі моновалентні органічні катіони та глюкоза. Встановлено, що вони активуються при гіперполяризації мембрани, мають повільну кінетику активування та дуже залежать від температури (V.P. Vozhkova, 1998; A. Revilla et al., 2000). Вважають, коли їх немає, розвиток зародка шпорцевої жаби

припиняється після восьмиклітинної стадії (В.П. Божкова, Н.В. Розанова, 1998).

Механочутливі малоселективні катіонні канали, що можуть активуватися натягом, виявлено під час дослідження зародків асцидій (W.J. Moody, M.M. Bosma, 1989), амфібій (V. Taglietti, M. Toselli, 1988) та костистих риб (Е.А. Гойда, 1993; И.Р. Медына, Е.А. Гойда, П.Д. Брежестовский, 1988; I. Medina, P. Bregestovski, 1991). Їм властива така вибіркова провідність:



Було запропоновано дві моделі, що пояснюють механочутливість каналів: перша – бішарова, за якою канали активуються натягом, що виникає виключно в ліпідному бішарі, а за другою – канал активується натягом, що розвивається зовнішньоклітинно або цитоскелетними структурами, з'єднаними з каналним білком (С.Е. Morris, 1990). Але остаточно механізм їхнього функціонування ще не з'ясовано. На сьогоднішній день активно досліджують механізм функціонування механочутливих каналів (Z. Gil et al., 2001; С.Х. Gu et al., 2001; О.Р. Hamill, В. Martinac, 2001; R. Maroto, О.Р. Hamill, 2001; Т.У. Nakamura et al., 2001; Y. Zhang et al., 2000; Y. Zhang, О.Р. Hamill, 2000, 2001). Так, Медина та Брежестовський (1991) вважають, що активність механочутливих каналів може регулюватися цАМФ-залежним фосфорилуванням (I. Medina, P. Bregestovski, 1991). Цікавим є повідомлення Вебера (W.M. Weber, 1999) про здатність цих каналів до самовільного відкриття без допомоги зовнішніх факторів. Незважаючи на те, що відкриття каналів було спонтанним, воно залежало також від температури та ТМП.

Медина зі співавт. (I. Medina, P. Bregestovski, 1991) стежачи за зародками в'юна, встановили, що деполяризація мембрани в часі збігається зі збільшенням імовірності знаходження у відкритому стані механочутливих каналів, а гіперполяризація – навпаки. Автори припускають, що ці канали з провідністю 70 пСм можуть здійснювати основний внесок у генерування динаміки трансмембранного потенціалу в зародків в'юна, хоча Хемел зі співавт. (O.P. Hamill, B. Martinac, 2001) встановили, що інгібування механочутливих каналів  $Gd^{3+}$  амілоридом, гептаміцином не мало суттєвого впливу на запліднення та ембріогенез шпорцевої жаби. На підставі цих даних автори прийшли до висновку, що й деякі інші механізми можуть компенсувати активність цих каналів, або канали якимсь чином стають нечутливими до дії блокаторів. Деякі дослідники (А.А. Веренинов, И.И. Марахова, 1986) вважають, що ці канали виконують функцію регулятора осмотичного тиску. Проте встановлено, що мембранний потенціал, іони кальцію та осмотичні зміни не активують механочутливі канали (Y. Zhang, O.P. Hamill, 2001).

Отже, певна участь у механізмі змін ТМП належить взаємозумовленим змінам іонних градієнтів, активного та спряженого йонного транспортування, каналної провідності, яку забезпечує різний набір іонних каналів. Внесок у ці зміни головно додає калієва провідність плазматичної мембрани бластомерів. На основі системного підходу та відомих кількісних співвідношень між біоелектричними параметрами плазматичної мембрани, що описують закономірності зв'язку між показниками клітинного

біоелектрогенезу, запропоновано модель динаміки біоелектричних процесів у ранньому ембріогенезі тварин (Е.А. Гойда, Р.Я. Гумецкий, 1995; О.А. Гойда та ін., 1998).

## **1.2. Зміни метаболічних процесів на ранніх стадіях ембріонального розвитку тварин**

На сьогоднішній день відомо багато гіпотез стосовно механізмів, які забезпечують циклічність явищ на рівні клітини. Найбільш вірогідною для періоду дроблення раніше вважали гіпотезу Кауфмана (S. Kaufman, J.J. Wille, 1975). Згідно з нею процеси клітинного поділу контролюються нелінійним осцилятором із граничним циклом, який на молекулярному рівні може бути реалізований біохімічним циклом зі зворотним зв'язком чи автокаталітичними кооперативними процесами.

Питання про механізм “біологічного годинника” на початкових етапах розвитку зародків довгий час було предметом дослідження різних вчених (Н.Н. Ротт, 1984; S. Busenberg, B. Tang, 1994; L.N. Edmunds, 1981; A. Shinagawa, 1983; G. Sliider, D.A. Begg, 1983). Крім того, як ми вже зазначали раніше, збереження ритмічних процесів при пригніченні поділів наводило дослідників на думку, що провідні засоби цього механізму слід шукати у процесах, які перебігають у цитоплазмі.

Одним з таких процесів контролю може бути гліколіз. Так, Мільман та Юровицький (Л.С. Мильман, Ю.Г. Юровицкий, 1973;

Ю.Г. Юровицкий, 1999) на зародках в'юна довели, що для раннього ембріогенезу характерний інтенсивний глікогеноліз: від другої–третьої години після запліднення яйцеклітини швидкість гліколізу поступово зростає, а до десятої години розвитку збільшується у два рази. Крім того, дослідники встановили, що ензиматичний профіль анаеробного гліколізу у цей час є постійним, але збільшення його швидкості супроводжується координованим зниженням активності ключових ферментів глюконеогенезу, які практично локалізовані лише в цитоплазмі жовтка. Детально досліджуючи механізм регулювання вуглеводного обміну у ранньому ембріогенезі в'юна, вони з'ясували, що гліколіз не контролюється окремою реакцією або окремим контрольним механізмом: в його основу закладені процеси авторегулювання з негативними зворотними зв'язками.

Вчені Сельков (Е.Е. Сельков, 1971; 1978), Гесс (В. Hess, 1979) та Буато (А. Voiteaux, 1982а) досліджуючи коливання інтенсивності енергетичного метаболізму як водія ритму інших коливних процесів у клітині, виявили, що хоча період коливань метаболітів гліколізу досить короткий (1–15 хв), наявність у клітині буферних систем (глікогену та поліглюкози) може збільшувати його до величин, співрозмірних із тривалістю періоду клітинного годинника: ультрадіанного, циркадного чи ж інфрадіанного. Інші автори зауважили (Das, H.G. Busse, 1985), що період гліколітичних коливань може бути збільшений від 20 хв до декількох годин, оскільки він залежить від  $pH_c$ , концентрації фосфатів, ферментів гліколізу та температури.



Використовуючи метод неперервного полярографічного реєстрування протягом усього періоду дроблення зародків в'юна, Гойда зі співр. (Е.А. Гойда, 1993), встановили, що швидкості поглинання кисню властива коливна динаміка на фоні незначного зростання загальних її змін. Рівень показника змінюється в межах від 0,8 до 1,6 нл  $O_2$  на зародок від першого поділу дроблення до початку бластуляції, частота коливань відповідає тривалості поділів при 21 С. Н.Д. Озернюк (Н.Д. Озернюк, 1985), досліджуючи процеси енергетичного обміну в ранньому ембріогенезі риб, зазначив, що початок підсилення швидкості дихання відбувається лише на стадії бластули та посилюється на наступних етапах розвитку зародків. Це саме характерно і для зародків амфібій (L. Rapkine, 1931). Вчений також наводить дані про те, що вперше циклічні зміни швидкості дихання були встановлені у 1955 р. Зейхеном на зародках голкошкірих та амфібій (Н.Д. Озернюк, 1985).

Генератором коливних процесів у ранніх поділах тварин може бути метаболізм тіолів, оскільки він також належить до числа автоколивних процесів (Е.Е. Сельков, 1978). Л. Рапкін став першим, хто виявив циклічні зміни вмісту SH-груп у період дроблення морських їжаків (У. Мапо, 1968). Інші дослідники встановили часовий зв'язок між клітинними циклами та змінами вмісту сульфгідрильних груп, а також залежність поділів від цих циклів (Н. Sakai, K. Dan, 1959). Пізніше японські дослідники на зародках морських їжаків довели зв'язок між тіоловим циклом та швидкістю синтезу білка, періодичні коливання якої вони виявили

вперше: максимум припадає на прометафазу-метафазу, а мінімум – на ана-,телофазу мітозу (У. Мапо, 1968). До речі, Сельков (Е.Е. Сельков, 1978), проаналізувавши кінетику біохімічних систем, що контролюють рівень низькомолекулярних тіолів у цитоплазмі клітин, прийшов до висновку, що за певних умов ця система має декілька альтернативних стаціонарних станів, частині з яких властивий автоколивний характер. Зміна стаціонарних станів може спричиняти значну перебудову фізіологічного режиму життєдіяльності клітини – зміну ритмів клітинного поділу, інтенсивності провідних ланок метаболізму, взаємодій клітини одна з одною.

Відомо, що тіолові групи належать до числа найважливіших функціональних груп білків, багато з яких відносять до ферментативних систем. У багатьох випадках тіолові групи входять безпосередньо до складу активних центрів ферментів, прямо визначаючи їхні каталітичні властивості. Зрозумілим стає те, що регулювання більшості процесів під час дроблення бластомерів зародків здійснюється тіолвмісними білками, які активуються періодично зі збільшенням вмісту в них SH-груп, наприклад, процес збирання мітотичного апарату (У. Okazaki et al., 1973), активування  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-ази, періодичні коливання якої з максимумом у метафазі виявлено Петзельтом у 1972 р. (С. Petzelt, 1972), та інші процеси (Н.Н. Ротт, 1987).

Внутрішньоклітинний показник концентрації  $\text{H}^+$  ( $\text{pH}_c$ ) є регулятором багатьох процесів, наприклад, ферментативної

активності, поділу клітин, мембранного транспортування, синтезу білка, взаємозв'язків клітини з клітиною (W.F. Boron, 1986). Він також бере участь в активуванні запліднення морських їжаків (F. Dube, D. Epel, 1985; J.D. Johnson et al., 1976) і шпорцевої жаби (N. Grandin, M. Charbonneau, 1990). Осциляцію рН<sub>ц</sub> у період дроблення встановлено для зародків шпорцевої жаби (N. Grandin, M. Charbonneau, 1990), морських їжаків (В.П. Божкова, 1991), в'юна (Е.А. Гойда, 1993). Отже, ці зміни також можуть бути інтегральним компонентом осцилятора клітинного циклу. Експериментально доведено, що стабілізування рН<sub>ц</sub> у ембріонах морських їжаків (В.П. Божкова и др., 1987; S.S. Shen, R.A. Steinhart, 1978), шпорцевої жаби (D.W. Towle et al., 1991), хом'яків (M. Lane et al., 1998) може відбуватися за рахунок функціонування Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>- обмінника. Під час дроблення ембріонів людини (2–8 клітин) виявлено можливість регулювання змін рН<sub>ц</sub> двома протидіючими механізмами: HCO<sup>3-</sup>/Cl<sup>-</sup>- антипортером та Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-обмінником (К.Р. Phillips et al., 2000). Проте на зародках в'юна участь Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-обміну в регулюванні змін рН<sub>ц</sub> не підтвердилась (Е.А. Гойда, 1993). Автор припускає залежність змін рН<sub>ц</sub> від стану редокс-систем та активності дегідрогеназ на основі того, що зі збільшенням інтегрального індексу активності дегідрогеназ знижується рН<sub>ц</sub> у кожному клітинному циклі, а при його зниженні навпаки – залужнюється цитозоль.

На сьогодні найбільш відомим універсальним внутрішньоклітинним регулятором клітинних циклів вважають МПФ-систему – фактор прогресії мітозу, – який складається з таких

білкових компонентів, як циклін, циклін-залежні кінази та інші регуляторні фактори, пов'язані з ними (Л.Б. Марголис, 1970; U. Deppe et al., 1978; D.N. Drechsel et al., 1997; M.N. Obeyesekere et al., 1992). Білки-цикліни було названо так через те, що їхня внутрішньоклітинна концентрація періодично змінюється при проходженні через клітинний цикл, зокрема, в ранньому ембріогенезі тварин. Активність циклін-залежної кінази визначають за декількома регуляторними ферментами та рівнем цикліну, який максимальний перед та протягом мітозу, й швидко зменшується при виході з мітозу (D.N. Drechsel et al., 1997, С.А. Swanson et al., 1997). Активна форма МПФ сприяє входженню клітин у метафазу, отже, індукує дальші процеси: руйнування ядерної оболонки, конденсацію хромосом, утворення/розпад мітотичного веретена. Після телофази, коли активність МПФ знижується, відбувається цитокінез. Запропоновано різні моделі регулювання клітинного циклу у період дроблення, в основу яких покладено автокаталітичні процеси реалізації дії МПФ – системи (S. Busenberg, B. Tang, 1994; M.N. Obeyesekere et al., 1992).

У період дроблення зиготи виявлено, що в бластомерах функціонують такі ж біорегулятори, які індукують мітотичний поділ диференційованих клітин (B. Lewin, 1990; J. Maller, 1990). Це різні поліпептидні фактори росту, дослідженню участі яких у регулюванні проліферації і диференціації клітин присвячено багато праць (С.И. Кусень, Р.С. Стойка, 1985). Підтвердженням цьому є дані про наявність в яйцеклітинах і зародках тварин і людини таких поліпептидних факторів росту (С.И. Кусень,

Р.С. Стойка, 1985; Р.С. Стойка, С.И. Кусень, 1988; Р.С. Стойка и др., 1987; А.А. Фильченков и др., 1994): імунореактивного інсуліну в яйцеклітинах риб (И.Е. Сухорская и др., 1983), амфібій (Н.А. Самошкина, 1978) і птахів (De Pablo F. et al., 1982), інсуліноподібного фактора росту I (ІФР I) в жовтку курячих яєць (L. Scavo et al., 1989), ІФР II в ембріонах щурів (S.O. Adams et al., 1983) і людини (E.R. Froesch et al., 1985), епідермального фактора росту (ЕФР) у курячому ембріоні (S. Mesiano et al., 1985), ЕФР-подібної речовини в зародках морських їжаків (O. Yang et al., 1989), трансформуючого фактора росту  $\alpha$  (ТФР  $\alpha$ ) та ТФР  $\beta$  у зародків гризунів і людини (D. Lee et al., 1985; A. Rizzino, 1985; D. Twardzik, 1985), фактора росту фібробластів і ТФР  $\beta$  у зародків в'юна (Я.Я. Феदिшин и др., 1990; И.А. Якимович и др., 1992) та шпорцевої жаби (D. Kimelman, Kirschner., 1987).

Поліпептидні фактори росту регуляторно впливають за рахунок аутокринного чи паракринного механізмів, взаємодіючи зі специфічними рецепторами плазматичної мембрани. Доведено наявність специфічних рецепторів у ембріональних мембранах та яйцеклітинах різних тварин до тих чи інших поліпептидних факторів росту, кількість яких інколи є більшою, ніж у тканинах тварин у постнатальному періоді онтогенезу (С.И. Кусень, Р.С. Стойка, 1985). Зокрема, на зародках в'юна вперше виявили рецептори, що специфічно зв'язують ТФР  $\beta$  (Р.С. Стойка и др., 1993). Посилаючись на відомості про широку розповсюдженість ТФР  $\beta$  та його рецепторів у тканинах ссавців, Стойка зі співавт. (Р.С. Стойка и др., 1993) зазначили універсальну роль цього

фактора в регуляторних системах, які функціонують на всіх етапах онтогенезу тварин. ТФР  $\beta$  (Р.Н. Howe et al., 1991) володіє регуляторним впливом на  $p34^{cdc2}$  (серин/треонінспецифічну протеїнкіназу) (В. Lewin, 1990), яка входить до МПФ-системи та відіграє неабияку роль у процесах регулювання клітинного циклу. Періодичність у змінах її активності протягом клітинного циклу забезпечує білок циклін (А.А. Фильченков и др., 1994).

Отже, дані досліджень засвідчують думку про те, що періодичні зміни біоелектричних процесів у період дроблення зародків тварин тісно спряжені з мембранними процесами та процесами, що відбуваються у цитоплазмі та мають властивості автоколивних систем.

### **1.3. Зміни концентрації вторинних посередників та медіаторів у ранніх ембріональних циклах зародків тварин**

Особливої уваги, як провідні засоби “біологічного годинника”, заслуговують іони  $Ca^{2+}$ , цАМФ та біогенні моноаміни, як регуляторні фактори, що здатні забезпечувати взаємозв’язки між різними періодичними процесами або ж бути елементами автоколивної системи.

Зокрема, головну роль у процесах раннього ембріогенезу більшість дослідників надає йонам  $Ca^{2+}$ , як найбільш універсальному посереднику при переданні сигналів через

інозитольний цикл та інші регуляторні системи (Д. Левицкий, 1990; P. Charp, G. Whitson, 1980; G. Dupont, A. Golbeter, 1993; L. Rebhun, 1976; T. Rink et al., 1980; F. Supritiowicz, D. Muzia, 1985; C. Swanson et al., 1997). Коливання внутрішньоклітинної концентрації йонів  $\text{Ca}^{2+}$  виявлено на початковому етапі ембріогенезу морських їжаків (F.A. Supritiowicz, D. Muzia, 1985), шпорцевої жаби та ін. (P. Charp, G. Whitson, 1980; L. Rebhun, 1976; T. Rink et al., 1980) частота якого відповідала тривалості поділів у цих тварин. Також у зародків в'юна встановлено коливання концентрації йонізованого  $\text{Ca}^{2+}$  у цитозольному гомогенаті, виміри якої проводили протягом усього періоду дроблення (Е.А. Гойда, 1993; И.Р. Медина и др., 1987). При блокуванні поділів колхіцином коливання  $[\text{Ca}^{2+}]_v$  у зародків шпорцевої жаби зберігаються та відбуваються за подібною до норми величиною й частотою (S. Kaufman, J.J. Wille, 1975). Кауфман з співавт. (Kaufman S., Wille J.J., 1975) припускають наявність зв'язку коливань  $[\text{Ca}^{2+}]_v$  з іншими періодичними процесами, зокрема, – у переданні сигналів до  $\text{pH}_c$ , МПФ-системи або до поверхневих хвиль скорочення.

В огляді Божкової (В.П. Божкова, 1986) проаналізовано часову послідовність змін внутрішньоклітинної концентрації йонів  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{pH}_c$  під час запліднення яйцеклітини та при різних типах стимулювання розмноження клітин. Її характеризують початкові короточасні збільшення концентрації йонів  $\text{Ca}^{2+}$  у цитоплазмі та зростання  $\text{pH}_c$  на 0,2–0,3 одиниці. Автор зауважує універсальність цих змін при різних умовах стимулювання проліферації та у процесі запліднення, а також на основі проаналізованих

результатів їхньої динаміки, припускає незалежність змін  $pH_c$  від змін концентрації  $Ca^{2+}$ .

Йони  $Ca^{2+}$  вважають внутрішньоклітинним посередником, який сприяє активуванню різноманітних процесів (А. Болдырев, 1987; В. Зима, О. Дячок, 2000; М. Клевець та ін., 1998; Д. Левицкий, 1990; В. Манько, О. Ларина, М.Ю. Клевець, 2001). Зокрема, відомо, що зміни  $[Ca^{2+}]_v$  беруть участь у запуску процесів під час запліднення (В.П. Божкова, 1986; Д.О. Левицкий, 1990), інгібуванні перекисного окиснення ліпідів при підвищенні  $[Ca^{2+}]_v$  (И.О. Мукалов и др., 1984; А.В. Тарновская, Д.И. Санагурский, 2001; 2002), а зниження його концентрації забезпечує умови збирання мітотичного апарату (L.L. Rebhun, 1976; Т. Sawai, 1979). Так, Савей (Sawai Т., 1979), пересадивши на яйце, що не дробиться, субкортикальний компонент борозни зародка, що дробиться, спостерігав утворення борозни. Він припускає, що це можливо лише за наявності йонів  $Ca^{2+}$  у середовищі. Рух хромосом опосередкований активуванням  $Ca^{2+}$  динеїноподібної АТФ-ази (J. Hisanaga, М. Sakai, 1983; Y. Okazaki et al., 1973).  $Ca^{2+}$  активує НАД-кіназу (D.B. Epel, 1980; Т. Yamuuchi, Н. Fujisuwa, 1981), спричиняючи зрушення тіолів у відновлену сторону і у такий спосіб може змінити весь ланцюг реакцій, у яких вони беруть участь. Припускають, що активність  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -АТФ-ази залежить від окиснювання і відновлення сульфгідрильних груп. Через різноманіття шляхів дії  $Ca^{2+}$  на процеси, пов'язані з клітинним циклом, він може здійснювати прямо протилежний вплив на той



самий процес, що залежить від концентрації, просторової локалізації та ін. (Н.Н. Ротт, 1987; T.J. Keating et al., 1994).

Гіпотеза про важливу роль  $\text{Ca}^{2+}$  у регулюванні клітинних циклів у період дроблення знайшла підтвердження в дослідженнях Сілерса та Форера (P. Sillers, A. Forer, 1985). Вони довели, що додавання інозитулу знімає інгібування мітозу в зародків морського їжака. Згодом дослідженнями на зародках шпорцевої жаби, де експериментально змінювали  $[\text{Ca}^{2+}]_v$ , доведено, що перехідні процеси  $\text{Ca}^{2+}$  стимулюють вступ у мітоз та припинення мітозу (T.J. Keating et al., 1994). Крім того, на цьому ж об'єкті одержано дані, які дають змогу припустити, що є зв'язок між динамікою цикліну та змінами  $[\text{Ca}^{2+}]_v$ : для розщеплення цикліну необхідний кальмодулін-залежний процес (С.А. Swanson et al., 1997). На основі цих даних створено математичні моделі регулювання клітинних циклів за участю  $\text{Ca}^{2+}$  та МПФ-системи. Промодельовано, як кожен з них окремо або у взаємозв'язку можуть запускати клітинні цикли початкового ембріогенезу (С.А. Swanson et al., 1997). Оскільки гіпотеза про зв'язок між змінами вищезгаданих характеристик розвитку не була підтверджена в експериментах на зародках молюсків, у яких збільшення  $[\text{Ca}^{2+}]_v$  ніяк не позначилось на динаміці цикліну (T.J. Keating et al., 1994), остаточно ці результати вважати не слід.

Градієнт концентрації кальцію підтримують мембранні білки-переносники – кальцієві помпи плазматичної мембрани, ендоплазматичного ретикулуму та мітохондрій ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-ази), а також системи антипорту  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ . Виявлено, що хоча

активність  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-ази плазматичної мембрани періодично змінюється протягом дроблення (С. Petzelt, 1972), швидкість виходу (перенесення іонів  $\text{Ca}^{2+}$ ) є у цей час незначною і сильно зростає лише після десяти годин розвитку на стадії бластули в зародків в'юна (Е.А. Гойда, 1993). Фактором збільшення  $[\text{Ca}^{2+}]_v$  можуть бути потенціалкеровані  $\text{Ca}^{2+}$ -канали плазматичної мембрани, які описано для ооцитів шпорцевої жаби (Р.А. Charp, G.L. Whitson, 1980), зародків миші (S. Mitani, 1985) та асцидій (I. Mita, C. Obata, 1984). На зародках асцидій *Halocynthia* встановлено, що, починаючи від запліднення до ранньої гастрული, густина  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів плазматичної мембрани поступово зменшується (М. Kozuka, K. Takahashi, 1982). Цікаво, що на ооцитах шпорцевої жаби були зареєстровані такі кальцієві сигнали, як кальцієвий спайк (В.Л. Зима, О.М. Дячок, 2000; Y. Yao et al., 1995).

Основним фактором збільшення  $[\text{Ca}^{2+}]_v$  протягом клітинних циклів дроблення дехто з дослідників вважає АТФ-залежне вивільнення іонів кальцію з ендоплазматичного ретикулуму через індукцію рецепторів інозитолтрифосфатних та/або ріанодинових кальцієвих каналів. Інозитолтрифосфатні рецептори описано для ооцитів *Xenopus laevis* D. (М. J. Berridge, 1984; 1993). Досліджено коливання інозитолтрифосфату на зародках морських їжаків протягом клітинного циклу (В. Сіара et al., 1994, J. Nan, 1995; M. Whitaker et al., 1984). Крім того, Левицький у своїй монографії (Д.О. Левицький, 1990) наводить дані Клапера про те, що у зародків морського їжака викиди іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у цитоплазму можуть забезпечувати такі кальцій-мобілізуючі агенти: інозитолтрифосфат

та аналоги двох (НАД та НАДН) нікотинамідаденіндинуклеотидів. Аналоги НАД та НАДН спричиняють викиди йонів  $\text{Ca}^{2+}$  при дуже низькій концентрації (нижче 0,1 мкМ). Найцікавішим, на думку автора, є те, що кожна з цих речовин індукує викиди  $\text{Ca}^{2+}$  з незалежних депо. Можливий механізм регулювання змін внутрішньоклітинної концентрації йонів  $\text{Ca}^{2+}$  у кардіоміоцитах, ооцитах, гепатоцитах запропоновано у моделі Дюпона і Голбетера (G. Dupont, A. Golbeter, 1993).

Динаміці вмісту таких вторинних месенджерів, як іони  $\text{Ca}^{2+}$  та цАМФ характерний тісний взаємозв'язок, що виявляється в регулюванні різноманітних процесів у клітині. Тому деякі дослідники припускають, що поділ може регулюватися циклічними нуклеотидами через зміни активності протеїнкінази, а далі через активування  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-ази, яка регулює збирання та розбирання мікротрубочок, знижуючи внутрішньоклітинну концентрацію йонів  $\text{Ca}^{2+}$  (W.L. Geilenkirchen et al., 1977). Інші дослідники (L.L. Rebhun, 1976) відкидають регуляторну роль цАМФ у ранньому ембріогенезі, не виявивши періодичних коливань його вмісту.

Періодичні коливання вмісту цАМФ у ранньому ембріогенезі встановлено для молюска (W.L. Geilenkirchen et al., 1977), морського їжака (K. Ishida et al., 1981; 1985; M. Whitaker, R. Irvint, 1984), шпорцевої жаби (H. Loulrup-Rein et al., 1974), в'юна (Е.А. Гойда, 1993; А.В. Лазарева и др., 1984; В.В. Чабан, 1993). У морських їжаків максимальний вміст цАМФ виявлено у телофазі перед появою борозни поділу, а мінімальний – у профазі, після завершення її утворення (K. Ishida et al., 1981; 1985). Вважають, що

такі періодичні зміни пов'язані зі змінами активності фосфоестерази, тому що вони знімаються дією її активатора кофеїну (K. Ishida et al., 1981), що підтверджено роботами (K. Ishida et al., 1985). У в'юна зазвичай пік вмісту цАМФ спостерігається у профазі-прометафазі, що узгоджується з думкою про роль цАМФ у збиранні мікротрубочок, які формують мітотичний апарат (Е.А. Гойда, 1993; В.В. Чабан, 1993). Крім того, він збігається у часі з максимумом фосфорилування гістону  $H_1$  (гістону стадії дроблення) (Н.Н. Ротт, 1984), що бере участь у спіралізації хромосом.

Наявність закономірних змін рівня біогенних моноамінів (серотоніну, катехоламінів та ін.) у ранньому ембріогенезі різних тварин, що діють як локальні гормони, доведена Бузніковим (Г.А. Бузников, 1987) та підтверджена в інших роботах (А.О. Виллоуз и др., 2000). Так, протягом перших мітотичних циклів відбувається збільшення концентрацій цих фізіологічно активних речовин у десять і більше разів. Максимальні зростання концентрацій у кожному клітинному циклі бластомерів за часом збігаються з фазами мітозу: ана- і телофаза – у випадку ацетилхоліну, пізня телофаза – для серотоніну та двох піків у інтерфазі, профазі-прометафазі – для катехоламінів. На зародках голозябрового молюска *Tritonia diomedea* експериментально встановлено можливість функціонального взаємозв'язку серотоніну та нейропептидів у регуляторних процесах ембріогенезу. Порушення функціональної активності серотоніну, з використанням його антагоністів, зумовило ушкодження цитоскелета у ранньому розвитку тварин (А.О. Виллоуз и др., 2000).

## **1.4. Залежність між змінами біоелектричних і метаболічних процесів у початковому онтогенезі тварин**

Оскільки у динаміці біоелектричних процесів віддзеркалюється перебіг різноманітних процесів, які зумовлюють розвиток зародків, нами проводився пошук взаємозв'язків між ними у ранньому ембріогенезі тварин.

Інгібітори транскрипції та трансляції по-різному діють на динаміку ТМП у період дроблення зародків в'юна. При впливові антибіотика актиноміцидину Д закономірні особливості його динаміки зберігаються, а вплив циклогексиміду або пуроміцину спричиняє значну деполяризацію мембрани з одночасною втратою коливань ТМП (Е.А. Гойда, 1993; С.И. Кусень и др., 1980). На основі цих даних автори припускають, що зміни мембранного потенціалу взаємопов'язані з метаболічною активністю зародкових клітин, зокрема, з трансляційним станом синтезу білка в бластомерах (С.И. Кусень и др., 1980).

Спряження між цими процесами може відбуватися на рівні йонів, що відіграють важливу роль у генеруванні потенціалу та ініціюванні макромолекулярних синтезів у клітині (Р.Г. Ахалкаци и др., 1970; В.П. Божкова, Л.М. Чайлахян, 1977; И.М. Данко и др., 1984; К.А. Кафиани, А.Г. Маленков, 1976; G. Meeker, 1970). Вважають, що зниження концентрації внутрішньоклітинного калію не лише зупиняє дроблення, а й гальмує синтез РНК та білка (J.T. Tupper, 1973).

Деякі автори (Н. Kroeger, М. Lezzi, 1966; R. Macdonald, R. Olsen, 1994; G. Meeker, 1970; С. Orr et al., 1972) припускають, що перерозподіл іонів може значно впливати на інтенсивність макромолекулярних синтезів у клітинах зародків. Враховуючи те, що електрогенні катіони дуже впливають на ріст клітин у культурі, не виключено, що саме зсуви ТМП ведуть до певної координації метаболізму, до зміни швидкості реплікації ДНК та клітинних поділів. Тому досить показово, що при зміні концентрації позаклітинних іонів  $K^+$  до 64 мМ відбувався максимальний ріст клітин у культурі, причому в цей час посилено змінювався ТМП на їхніх мембранах.

Дуже високі концентрації калію в інкубаційному середовищі, які знижують ТМП майже до нуля, гальмують синтез ДНК у клітинних структурах з досить високим індексом клітинних поділів і незабаром припиняють їх (С. Orr et al., 1972). Напевно, зростання внутрішньоклітинного вмісту йонів  $K^+$  є не тільки прямим тригером синтезу ДНК та дроблення (J.T. Tupper et al., 1970), а певним фактором мембраноспряжених процесів, який переводить клітину на новий режим роботи. Так, Кафіані та Маленковим (К.А. Кафиани, А.Г. Маленков, 1976) запропоновано гіпотезу, згідно з якою саме йонний гомеостаз клітини є дуже важливим фактором регулювання різноманітних функцій та процесів. Крім того, йони магнію необхідні для правильного організування рибосом та полісом, кальцій відіграє важливу роль не тільки в багатьох внутрішньоклітинних процесах, але і в структурно-функціональному організуванні мембран, у роботі

мітохондрій і навіть у пускових механізмах процесів запліднення яйцеклітин та дроблення бластомерів, калій та натрій є не тільки головними факторами мембранного електрогенезу, але й істотно впливають на окремі ланки внутрішньоклітинних синтезів та функціонування низки ферментних систем. Рух іонів значною мірою контролюється наявним у живих плазматичних мембранах електричним полем (И.С. Магура, 1981). Основою механізму взаємозв'язку ТМП з метаболізмом клітин багато вчених вважає певну молекулярну перебудову білково-ліпідних конструкцій поверхневих мембран та викликаний цими структурними перебудовами рух іонів через мембрану, що зумовлює швидкі зміни рівня ТМП.

Встановлено зв'язок між динамікою активного транспортування та змінами  $pH_{ц}$  (Е.А. Гойда и др., 1990). З інгібуванням  $Na^+$ ,  $K^+$ -помпи зростає  $pH$  цитоплазми на 0,1–0,15 одиниць. Блокування  $Na^+/H^+$ -обмінника суттєво не впливає на рівень ТМП. Встановлено, що циклічні зміни  $pH_{ц}$  на початкових стадіях дроблення пригнічуються інгібуванням синтезу білка (В.П. Божкова, 1991). Відомі повідомлення про зв'язок між величиною  $pH_{ц}$  та ростом швидкості білкового синтезу (В.П. Божкова и др., 1987), синтезом ДНК у зародків шпорцевої жаби (P. Artigas, D. Gadsby, 2003), а також із швидкістю поділу клітин. Чим вищий рівень  $pH_{ц}$ , тим менший період поділу (В.П. Божкова и др., 1987).

У разі низьких концентрацій електрогенних катіонів мембранні АТР-ази легко агрегують з тубуліном, створюючи мікротрубочки примембранного шару, що сприяє встановленню

міжклітинних контактів бластомерів, які дробляться. Спостерігається чітко виражена часово-просторова залежність експресії генів конексонів (структурна одиниця щілинних контактів), яка зумовлює регуляторний вплив на розвиток зародків тварин (В.П. Божкова, Н.В. Розанова, 1998). Виявлено також залежність швидкості формування міжклітинних контактів від концентрацій електрогенних катіонів. Необхідно, щоб в інкубаційному середовищі було не менше 0,2 мМ іонів  $\text{Ca}^{2+}$  (Т. Ducibella, E. Anderson, 1976) та близько 6 мМ  $\text{K}^+$ , оскільки при зниженні вмісту йонів  $\text{K}^+$  до 0,8 мМ настає часткове, а при 0,4 мМ – повне блокування розвитку зародків мишей (R.D. Powers, J.T. Tupper, 1975).

Співставляючи динаміку трансмембранного потенціалу зі швидкістю поглинання кисню, Гойда зі співроб. (Е.А. Гойда, 1993) зауважили чітку антибатність їхніх змін: ріст рівня потенціалу відбувається в інтерфазі, а максимальні значення його рееструються у про- і метафазі клітинного циклу, коли швидкість поглинання кисню, навпаки, значно знижується. Різностямованість змін цих показників простежено після модифікації раннього ембріогенезу зміною температури (Е.А. Гойда, 1993). Наприклад, зміни тривалості клітинного циклу під дією температури не порушують загальної закономірності динаміки цих показників, а тривалість періоду їхніх коливань змінюється відповідно до тривалості поділів дроблення бластомерів в'юна. Він (Е.А. Гойда, 1993) також повідомив, що сумарна активність дегідрогеназ, яка різко збільшується одразу після запліднення,



протилежна до змін рівня трансмембранного потенціалу й є мінімальною на п'ятій годині розвитку, коли значення потенціалу максимальні. Інгібування гліколітичних процесів у період дроблення призводить до змін поляризації мембрани – вона деполяризується на 8–10 мВ, зберігаючи коливний характер динаміки, характерний для норми. Доведено також взаємозв'язок метаболічних ланок енергозабезпечення активного мембранного транспортування з гліколітичними процесами через цАМФ (В.В. Чабан, 1993). Зокрема, відомою є специфічна властивість піруваткінази зародків в'юна – її активування під впливом цАМФ (Л.С. Мильман, Ю.Г. Юровицкий, 1973).

Регулювання взаємозв'язків між фізико-хімічними процесами в зародкових клітинах може здійснюватися гормональним контролем. Так, Кусень зі співавт. (С.И. Кусень и др., 1975) провели глибоке дослідження регуляторних систем обміну вуглеводів у ранньому ембріогенезі в'юна. Вони виявили здатність до змін активностей ферментів зародкових клітин у відповідь на дію гормонів, а не лише на зміну субстратів та метаболітів цього обміну. Припускають, що гормональні фактори можуть бути пусковим сигналом перебудови обміну вуглеводів в ооциті, що мав глікоген-синтезуючу спрямованість, на глікогеноліз, який спостерігають у початковому ембріональному розвитку.

## **Розділ 2. ВПЛИВ ФІЗИЧНИХ ТА ХІМІЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОЕЛЕКТРОГЕНЕЗ**

### **2.1. Вплив катіонів важких металів на біологічні об'єкти**

Найбільш чутливими до інтоксикації неорганічними елементами є структура та функції нуклеїнових кислот і білків, мембрани клітин та субклітинних органел, системи біосинтезу важливих сполук. Іони металів можуть включатись у всі етапи біосинтезу, побудови макромолекулярних структур клітини (S. Hua et al., 2002; H.M. Levesque et al., 2003; D.M. Medeiros, D. Jennings, 2002; J. Schubert, 1981).

Токсичність неорганічної речовини визначають за її здатністю впливати на динамічну хімічну рівновагу в системах живих організмів (Ю.А. Ершов, 1983). Вплив цей найчастіше зумовлений утворенням міцних або незворотних зв'язків з хімічними компонентами тканин і клітин – головню з біогенними макромолекулами (Ю. Ершов, Т. Плетенева, 1989; D. Medeiros, D. Jennings, 2002). Тому вивчення фізико-хімічних властивостей речовин і їхньої взаємодії з біомакромолекулами дає змогу виявити механізм токсичності.

Токсичний вплив важких металів проявляється в їхній неспецифічній взаємодії з активними групами клітинних полімерів (карбоксильними, амінними, сульфгідрильними, фосфатними), у витісненні незамінних металів з комплексів, які містять біологічно активні молекули, або в модифікації конформацій цих молекул (E.I. Ochiai, 1995).

На біологічну активність і токсичність неорганічних сполук впливає їхня розчинність у воді та ліпідах. Аномальні ефекти токсичних елементів проявляються у випадку розчинних солей, ніж у випадку малорозчинних. Нерозчинні оксиди менш токсичні, ніж більш розчинні хлориди або нітрати того ж елемента (Ю.А. Ершов, Т.В. Плетенева, 1989). Токсичні йони можуть взаємодіяти з мембраною електростатично, особливо з фосфоліпідною частиною. Отже, двовалентні катіони ущільнюють мембрани, тоді як одновалентні спричиняють зміни в структурі, зумовлюючи зміни її проникності (Ю. Ершов, Т. Плетенева, 1989; B. Venugopal, T. Liskey, 1978).

Токсичний ефект катіонів важких металів зі змінною валентністю дещо зумовлений стимулюванням утворення активних форм кисню, що призводить до пошкодження внутрішньоклітинних мембран, білків і ДНК (H.H. Popper et al., 1991). “Окиснювальний стрес” супроводжується підсиленням перекисного окиснення ліпідів, збільшенням активності каталази, супероксиддисмутази і глутатіонтрансферази (R.A. Larson, 1995; N.T. Prakash, K.S. Rao, 1995), пригніченням активності  $Fe^{2+}$ - і  $Cu^{2+}$ -залежних ферментів (A. Ahmed, H.A. Tajmirriahi, 1993).

Токсичність катіонів важких металів може проявлятися у порушенні проникності клітинних мембран (В. Лебедев и др., 1987; S. Astolfi et al., 2003; N. Bal et al., 2003; A. Pillai et al., 2002).

Один з рівнів впливу важких металів на різні види бактерій зумовлений токсичним впливом надлишкової кількості металу, інактивуючи ферменти і дестабілізуючи клітинні структури (О.В. Карначук, 1995; G.M. Gadd, A.J. Griffiths, 1978; T. Liu et al., 2003; В.Р. Rosen, 2002). Мембранні ферментні системи насамперед піддаються агресивному впливу середовища і це позначається на процесах, які відбуваються за їхньою участю (Т.Г. Грузина и др., 1997).

Окремі важкі метали відіграють в організмі людини певну роль. Зокрема, нікель виявляють у РНК. Вважають, що він забезпечує певну структуру нуклеїнової кислоти. Змінюючи хімічні властивості РНК та нуклеопротеїнів при комплексоутворенні, нікель може виявляти канцерогенну дію.

У плазмі крові  $Ni(II)$  приєднується до альбуміну та амінокислот, передусім до L-гістидину.

Внаслідок змінного ступеня окиснення у нікелю солі  $Ni(II)$  є інгібіторами окиснювальних ферментів (Ю.А. Ершов, Т.В. Плетенева, 1989).

$Co^{2+}$  активує низку ферментів *in vitro* і здатний заміщати в них  $Zn^{2+}$  без зниження їхньої активності. Кориноїдні сполуки, в яких є мало  $Co^{2+}$ , є метаболічними інгібіторами вітаміну  $B_{12}$ .

Іони кобальту  $Co^{2+}$  пригнічують споживання кисню в мітохондріях клітин серця, інгібуючи  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназу

та піруватдегідрогеназу. Механізм цього процесу може бути пов'язаний з утворенням суперокси- та пероксикомплексів кобальту (S.N. Baksi, M.J. Hughes, 1983).

Солі кобальту (II) інгібують окиснювальні ферменти (Т. Stoytchev, М. Kadiiska, 1983), поновлюють активність лактадегідрогенази, інактивованої видаленням цинку (F. Morpeth, V. Massey, 1982).

Одним з важливих симптомів отруєння оловом є анемія, яка супроводжується зменшенням числа гематокриту, вмісту гемоглобіну і числа еритроцитів (B. Venugopal, T. Luckey, 1978). Ці ознаки характерні у разі зниження еритропоезу.

Як первинний токсичний ефект олова розглядають інгібувальний вплив катіонів олова на ферменти шляхів біосинтезу гему, зокрема на  $\delta$ -амінолевулінатдегідратазу (Ю.А. Ершов, Т.В. Плетенева, 1989), яка є другим ключовим ферментом у синтезі гему. У дослідях на кролях доведено, що  $\text{SnCl}_2$  у концентрації 5 мкмоль/л інгібує цей фермент, тоді як  $\text{SnCl}_4$  в тій самій концентрації не володіє інгібувальним впливом.

Пригнічення активності ферментів унаслідок впливу олова може бути спричинене не тільки інактивацією реакційного центру, але й утворенням неактивних комплексів олова з SH-вмісними субстратами, наприклад, з глутатіоном, цистеїном.

Так, Дуайведі зі співавт. (R.S. Dwivedi et al., 1983) довели, що при дії  $\text{Sn}^{2+}$  у концентрації 5 мкмоль/л та вище активність глюкозофосфатгідрогенази знижується в 1,5 раза. Внутрішньочеревне введення катіонів олова в концентрації 20 мг/кг щурам має

інгібувальний вплив *in vivo* та *in vitro* на низку SH-вмісних ферментів печінки: глутатіонредуктазу, глюкозо-6-фосфат-дегідрогеназу, лактатдегідрогеназу і сукцинатдегідрогеназу (R.S. Dwivedi et al., 1983).

Зниження активності SH-вмісних ферментів печінки може бути раннім діагностичним показником отруєння оловом.

Марганець необхідний для росту, збереження репродуктивної функції, утворення кісток, метаболізму глюкози та ліпідів (Ю.А. Ершов, Т.В. Плетенева, 1989), для активування таких ферментів, як піруват карбоксилаза, аргіназа, фосфатаза, біосинтетичні ферменти, ліпіди ті мукополісахариди хрящів.

Велика кількість ферментів має специфічну потребу в  $Mn^{2+}$ . До них, зокрема, відносять галактозил- та N-ацетилгалактозамініл-трансферази, які беруть участь у синтезі мукополісахаридів, а також лактозосинтетаза. Піруваткарбоксилаза містить чотири міцно зв'язані катіони  $Mn^{2+}$ .

Багато білків, які мають потребу в  $Mg^{2+}$ , можуть замість нього використовувати  $Mn^{2+}$ . Марганець може заміщати і  $Zn^{2+}$  в цинкзалежних ферментах, змінюючи їхні каталітичні властивості.

Надмірна кількість Mn (II) в їжі (2 мг/г) перешкоджає абсорбції та метаболізму заліза, зменшуючи утворення гемоглобіну. Отже, марганець може діяти як антагоніст заліза.

Активність аланінамінотрансферази при дії катіонів марганцю (Р.Б. Балабан та ін., 2000) значно зростає у цитоплазматичній фракції печінки коропа (*Syrphus caryo* L.): коропів 2-річного віку утримували протягом 14 діб у воді з

додаванням катіонів Mn (2,4 і 6 мг/л), Zn (2,0 і 5,0 мк/л), Cu (0,2 і 0,5 мг/л), що рівносильно двом та п'яти рибогосподарським гранично допустимим концентраціям (ГДК). У плазмі крові риб було зауважено статистично достовірне зниження активності аспартатамінотрансферази при концентрації марганцю двох ГДК і зростання активності аланінамінотрансферази при вмісті цього металу у воді в кількості п'яти ГДК (Р.Б. Балабан та ін., 2000).

Цинк – один з найбільш розповсюджених необхідних металів в організмі людини. Його вміст в організмі в 10–15 разів вищий за вміст міді та в 100 разів – марганцю (Ю.И. Москалев, 1985).

У разі дії катіонів цинку в цитоплазматичній, і особливо, в мітохондріальній фракції печінки і скелетних м'язах коропа значно зростає активність аспартатамінотрансферази, що свідчить про зміщення реакції в бік утворення глутамінової кислоти, яка відіграє важливу роль у процесах детоксикації аміаку в організмі риб.

Накопичення глутамінової кислоти свідчить про посилення катаболізму білків у тканинах риб унаслідок інтоксикації важкими металами. У плазмі крові коропа при дії катіонів цинку спостерігається дозозалежне зменшення активності аланінамінотрансферази. Активність аспартатамінотрансферази зменшується при двох ГДК і дещо збільшується (порівняно з контролем) при п'яти ГДК (Р.Б. Балабан та ін., 2000).

Кадмій не є необхідним елементом для ссавців. Цей метал має канцерогенні властивості (Ю.А. Ершов, Т.В. Плетенева, 1989).

Отруєння кадмієм зазвичай пов'язують з промисловими забрудненнями, накопиченням кадмійвмісних субстанцій (батареї, сплави, фарби), що забруднюють питну воду та повітря. Промислові фосфатні добрива та органічні добрива також містять домішки кадмію.

Цигарковий дим – ще одне джерело отруєння кадмієм. У двадцяти цигарках міститься 15–18 мкг кадмію. Джерелом кадмієвої інтоксикації може бути споживання продуктів моря, особливо устриць. В Японії захворювання, спричинене отруєнням кадмієм, відоме під назвою “itai-itai” (Ю.А. Ершов, Т.В. Плетенева, 1989).

Кадмій може проникати через плаценту вагітних щурів та хом'яків. Це підтверджується значно більшою його кількістю, порівняно з материнськими особинами (в 2,5 раза) (В. Venugopal, Т. Luckey, 1978).

Кадмій має високу спорідненість до нуклеїнових кислот, зумовлюючи порушення їхнього метаболізму. Він інгібує ДНК-полімеразу, порушує синтез ДНК, а саме: стадію розплетення. Великі пероральні дози кадмію розділяють окисне фосфорильовання в мітохондріях печінки. Патогенез отруєння кадмієм включає також взаємодію кадмію з високомолекулярними білками, особливо тіолвмісними ферментами (P.L. Goering, C.D. Klaassen, 1983).

Кадмій має велику спорідненість до гемоглобіну. Останній конкурує за зв'язування кадмію з усіма біолігандами, окрім металотіонеїнів (S. Onosaka et al., 1987). Кадмій відіграє роль



антиметаболіту щодо цинку, заміщуючи його в металоферментах, наприклад, у лужній фосфатазі. Кадмієва дієта інгібує надходження цинку в різні тканини (E.I. Ochiai, 1995). Наявність кадмію в тканинах ссавців зумовлює симптоми, пов'язані з дефіцитом міді, цинку, заліза.

## **2.2. Катіони важких металів та транспортні властивості мембран**

Багатьма дослідниками було доведено, що йони важких металів впливають на електричні властивості мембран, зокрема, на мембранне транспортування, провідність мембран, генерування мембранного потенціалу. Наприклад, такі йони важких металів, як  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  інгібують транспортування  $\text{Ca}^{2+}$  везикулами мікросомної фракції гепатоцитів щура і спричиняють вихід  $\text{Ca}^{2+}$  з попередньо наповнених везикул, причому вихід  $\text{Ca}^{2+}$  не спряжений з загальним збільшенням проникності мембран мікросом (G.H. Zhang et al., 1990). Базолатеральний  $\text{Cd}^{2+}$ , а можливо, й  $\text{Zn}^{2+}$  і  $\text{Ni}^{2+}$ , імовірно через  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливий рецептор, спричиняє вихід кальцію, що приводить до виходу хлору з клітини А6 (B. Fauriskov, H. Vjerregaard, 2000).

Такі важкі метали, як ртуть, свинець, кадмій і хром у концентраціях 1–1000 мкмоль інгібують активність сульфатного транспортера sat-1 печінки і нирок ссавців.  $\text{Hg}^{2+}$  (10 мкмоль),  $\text{Pb}^{2+}$  (<1 мМ),  $\text{Cd}^{2+}$  (500 мкмоль),  $\text{Cr}^{3+}$  (100 мкмоль) блокують сульфат/бікарбонатний обмінник sat-1, причому йон хрому

можливо зв'язується з обмінником:  $\text{CrO}_2^{-4}$  взаємодіє з обмінником замість  $\text{SO}_2^{-4}$ , оскільки вони мають велику структурну подібність (D. Markovich, K. James, 1999).

Катіони важких металів здатні впливати на роботу  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника плазматичних мембран (А.П. Брагинский, Э.П. Щербань, 1978; В.В. Манько, 1998; В.В. Манько та ін., 1997; Н.В. Федірко, 1998).

Інгібувальний ефект нікелю на вхідний струм  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обміну при дії нікелю на зовнішню поверхню мембрани, ймовірно, зумовлений взаємодією  $\text{Ni}^{2+}$  з  $\text{COO}^-$ -групами центру катіонного зв'язування обмінника, до яких мають високу спорідненість лужні та лужноземельні метали ( $\text{Na}^+$  і  $\text{Ca}^{2+}$ ) (М.Ю. Клевец и др., 1996). Основою конкурентного блокування нікелем  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обміну є взаємодія з цими групами. Останнє підтверджується тим, що при підвищенні зовнішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  до 10 мМ амплітуда струму  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обміну внаслідок дії  $\text{Ni}^{2+}$  не зменшувалася, а зростала (В.В. Манько та ін., 1997).

$\text{Cd}^{2+}$  переважно взаємодіє з внутрішньоклітинним регуляторним центром, який містить тіосульфатну групу (одну або декілька), стимулюючи функціонування  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника мембрани секреторних клітин слинної залози личинки хірономуса (В.В. Манько, 1998).

Катіони ряду лужноземельних і перехідних металів, зокрема,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  і  $\text{Cd}^{2+}$ , суттєво пригнічують  $\text{Na}^+$ -залежне надходження  $\text{Ca}^{2+}$  в секреторні клітини шлункових залоз (Л.О. Дубицький, Л.С. Вовканич, 2001). Так, за наявності в

середовищі інкубації цих залоз катіонів металів у концентрації 50 мкМ швидкість процесу знижується відповідно на 13, 19, 50, 68, 82 %. Залежність ефектів катіонів металів на  $\text{Na}^+$ -залежне транспортування  $\text{Ca}^{2+}$  від їхньої концентрації має експоненційний характер. Встановлено, що за величиною інгібування катіони металів утворюють такий ряд:  $\text{Ba}^{2+} < \text{Sr}^{2+} < \text{Mn}^{2+} < \text{Co}^{2+} < \text{Cd}^{2+}$ . Виявлено переважно конкурентний тип інгібування катіонами зазначених металів  $\text{Na}^+$ -залежного надходження  $\text{Ca}^{2+}$  в секреторні клітини шлункових залоз (Л.О. Дубицький, Л.С. Вовканич, 2000; 2001; 2003).

Багатьма дослідниками (P. Artigas, D. Gadsby, 2003; R. Boominathan, P. Doran, 2003; I. Voskoboinik et al., 2002; D. Ward, J. Cavieres, 2003; G. Yucebilgic et al., 2003; A. Zichittella et al., 2000) доведено, що катіони важких металів, зокрема, кобальт (D.G. Ward, J.D. Cavieres, 2003), свинець (R. Boominathan, P. Doran, 2003; G. Yucebilgic et al., 2003), ртуть (A. Zichittella et al., 2000), мідь (I. Voskoboinik et al., 2002), хром (J. Thaker et al., 1996) інактивують  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азу мембран різних клітин.

Нікель був запропонований як селективний блокатор активованих низькою напругою кальцієвих каналів Т-типу. Дослідження засвідчило, що такі підтипи каналів, як  $\alpha$ -1E блокуються низькими мікромолекулярними концентраціями  $\text{NiCl}_2$ , причому деполяризація може розблоковувати канали (J.H. Lee et al., 1999).

Виявлено, що йони хрому в концентраціях 5, 10 та 15 мг/л інгібують такі системи активного транспортування, як  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -;

$\text{Ca}^{2+}$ ;  $\text{Mg}^{2+}$ ;  $\text{Ca}^{2+}$ ;  $\text{HCO}_3^-$  та  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ -АТФ-ази в клітинах зябер, нирок та кишківника риб *Periophthalmus dips* (J. Thaker et al., 1996).

Іони ртуті, свинцю, кадмію та хрому інгібують натрій-сульфатний обмінник в ооцитах *Xenopus laevis* (D. Markovich, K. James, 1998) і сульфатний транспортер печінки та нирок ссавців (D. Markovich, K. James, 1999). Іони ртуті та свинцю інгібують транспортування амінокислот ооцитів *Xenopus laevis* (S. Waldegger et al., 1995), а йони цинку здатні інгібувати транспортування глутамату (R.J. Vandenberg et al., 1998).

$\text{Cu}^{2+}$  блокує протон-чутливий іонний канал, сформований гомотетрамерним інтегральним мембранним протеїном М2 вірусу грипу А. Цей канал також частково інгібується йонами  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pt}^{2+}$  та  $\text{Zn}^{2+}$  (C.S. Gandhi et al., 1999).

### **2.3. Токсикологічні аспекти дії катіонів важких металів на біологічні об'єкти та модифікуючий їхній вплив на ТМП зародків в'юна**

Тератогенні та ембріотоксичні впливи катіонів важких металів досліджені групою американських вчених під керівництвом Сандермана. Сандерман та співробітники вивчили ембріотоксичний та тератогенний вплив катіонів таких металів, як  $\text{Cd}^{2+}$  (F.W. Jr. Sunderman et al., 1991; 1992),  $\text{Ni}^{2+}$

(O. Hauptman et al., 1993; S. Hopfer et al., 1991),  $\text{Co}^{2+}$  (A.H. Piersma et al., 1993; M.C. Plowman et al., 1991),  $\text{Cu}^{2+}$  та  $\text{Zn}^{2+}$  (S.Q. Luo et al., 1993) з використанням проби FETAX (Frog Embryo Teratogenesis Assay: Xenopus) на африканських жабах *Xenopus laevis*. Вони довели, що у зародків *X. laevis*, яких інкубували у середовищі з додаванням хлориду кадмію в концентрації від 0,75 до 56 мкмоль/л протягом 96 год., починаючи від стадії бластули, спостерігалися порушення розвитку, зокрема, пошкодження очей, кишківника, викривлення хорди, серцеві порушення (F.W. Jr. Sunderman et al., 1992). При концентрації 18 мкмоль/л і більше простежувалося пригнічення росту зародків (F.W. Jr. Sunderman et al., 1991).

Наявність у середовищі катіонів  $\text{Ni}^{+}$  (в концентрації  $1 \cdot 10^{-7}$ – $3 \cdot 10^{-3}$  мкмоль/л) спричиняла порушення розвитку очей, скелета та кишківника зародків, рідше – деформацію серця, голови, шкіри (S.M. Hopfer et al., 1991). Йони  $\text{Ni}^{2+}$  зумовили значні аномалії розвитку очей у зародків *X. laevis*: спостерігали мікрофтальмію, гіпопігментацію, появу пухирців на сітківці, інколи – катаракту.

Вплив катіону кобальту ( $1,8 \cdot 10^{-6}$ – $1,8 \cdot 10^{-2}$  мкмоль/л) став причиною таких пошкоджень, як аномалії очей, деформації серця, пошкодження хвоста, появи пухирців на шкірі зародків (S.M. Hopfer et al., 1991). Ці аномалії виявлено більше, ніж у 99% зародків, які розвивалися за наявності хлориду кобальту, концентрація якого становила приблизно 56 мкмоль/л.

Якщо в інкубаційному середовищі були катіони цинку та міді, у зародків спостерігались аномалії розвитку очей, кишківника, хорди та серця (S.Q. Luo et al., 1993). Вони були виражені більш суттєво при високих концентраціях металів.

Сандерман та співробітники обрахували середні ембріо-летальні концентрації ( $LC_{50}$ ) та середні тератогенні концентрації ( $EC_{50}$ ) металів для зародків *X. laevis*. Для кадмію ці показники становили:  $EC_{50} = 3,7 \pm 1$  мкмоль/л,  $LC_{50} = 32 \pm 4$  мкмоль/л (J.A. Westfall, D.R. Argast, 1982); для  $Ni^{2+}$ :  $LC_{50} = 365 \pm 9$  мкмоль/л,  $EC_{50} = 2,5 \pm 1$  мкмоль/л (S.M. Hopfer et al., 1991); для  $Co^{2+}$ :  $LC_{50} = 10,4 \pm 0,4$  мкмоль/л,  $EC_{50} = 25 \pm 2$  мкмоль/л (S.M. Hopfer et al., 1991); для  $Cu^{2+}$ :  $LC_{50} = 22$  мкмоль/л,  $EC_{50} = 2,5$  мкмоль/л (S.Q. Luo et al., 1993); для  $Zn^{2+}$ :  $LC_{50} = 850$  мкмоль/л,  $EC_{50} = 40$  мкмоль/л (S.Q. Luo et al., 1993).

У зародків, яких утримували у середовищі, в яке було додано хлориди  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  та  $Cd^{2+}$  в концентраціях, які відповідали  $EC_{50}$  для цих металів, протягом 13 тижнів спостерігались такі порушення, як сколіоз, кіфоз, тазо-крижове деформування задніх кінцівок, дисплазія серця, нирок, яєчників та кишківника (M.C. Plowman et al., 1994).

Перез-Колл та співавт. (C.S. Perez-Coll et al., 1985) довели, що вплив катіонів  $Cd^{2+}$  (0,03–4,00 мг/л) на зародки *Bufo arenarum* від стадії двох бластомерів призводив до сповільнення темпу росту, зменшення розмірів тіла, порівняно з контрольною групою, порушення поведінки зародків і низки вад розвитку, таких як мікроцефалія, недорозвинення зябер і патологія плавців.

Цими ж авторами було засвідчено, що важкі метали, зокрема кадмій, можуть передаватися від материнського організму жаби до зародка, ймовірно, зв'язуванням з білками жовтка і металотіонеїном. Самкам *X. laevis* вводили 18 мкмоль кадмію

протягом 11 тижнів, іншій групі – 90 мкмоль протягом чотирьох тижнів. Далі в самок індукували овуляцію, і одержані яйцеклітини запліднювали спермою самців, що не піддавалися впливам металів. У зародків спостерігали різні аномалії розвитку – в 14 % і 7 % (перша та друга групи) (D. Kotyzova, F. Sundeman, 1998).

Вивчали вплив кадмію на розвиток ооцитів *Xenopus laevis*. Дорослим самкам *Xenopus* вводили в дорзальні лімфатичні мішки розчин хлориду кадмію в концентраціях 0,5; 0,75; 1,0; 3,0 та 5,0 мг/кг кожен другий день протягом 21 дня. Відсоткове співвідношення ооцитів на всіх досліджуваних стадіях оогенезу зменшувалося, тоді як кількість пошкоджених ооцитів збільшувалася. Велика кількість ооцитів була крапчастою або плямистою. Дослідження засвідчило, що кадмій має здатність до значного порушення оогенезу і що дослідження розвитку гамет може бути придатним параметром для оцінення впливу забруднювачів навколишнього середовища на здатність до репродукції (L.A. Lienesch et al., 2000).

Катіони важких металів виявляють ембріотоксичну дію також на зародки та личинки риб (C.J. Brauner, C.M. Wood, 2002), ракоподібних (A. Bianchini, C. Wood, 2002) та інших тварин.

Тератогенні властивості важких металів досліджували і на ссавцях (А. Динерман, 1990; M. Calvino et al., 2002; B. Chen, B. Hales, 1994; C. Kapron-Bras, B. Hales, 1992; G. Mizejewski et al., 1990; J. Peters et al., 1995). Низькі рівні солей міді, нікелю та свинцю вводили мишам на ранніх та середніх стадіях вагітності (9–17 днів).

Вплив цих солей зумовлював збільшення рівня альфафетопротеїну в амніотичній рідині (G.J. Mizejewski et al., 1990).

Десятиденні ембріони щура культивували протягом години без кадмію, а далі – протягом 2, 6 або 20 год культивували за наявності або без наявності 2,5 мкмоль хлориду кадмію. Ембріони та жовткові мішки аналізували щодо вмісту кадмію. Розміри ембріонів та жовткових мішків після експозиції протягом 2 та 6 год майже не відрізнялися від контролю, а після 20-годинного впливу розміри зародків були меншими на 10–15%, а жовткові мішки – в два рази менші, порівняно з контролем (B. Chen, V. Hales, 1994).

Доведено (С.М. Kapron-Bras, B.F. Hales, 1992), що у культури зародків мишей лінії SWV попереднє витримування протягом 5 хв при температурі 43 °С значно ліквідувало негативний ефект дальшого впливу кадмію (концентрацією 1,75 мкмоль) на розвиток і ріст ембріонів.

При збільшенні вмісту цинку у сироватці крові матері спостерігається зниження маси плода (А.А. Динерман, 1990).

Ембріони миші культивували за наявності 1,0; 3,0 та 6,0 мкмоль кадмію з додаванням різних антиоксидантів протягом 72 год. Аскорбат, бутилат гідроксианізол, бутилат гідрокситолуен і глутатіон були ефективні в послабленні ембріотоксичності, індукованої 1,0 мкмоль кадмію. В разі дії 3,0 і 6,0 мкмоль кадмію ефективним був лише глутатіон. Чотиригодинна експозиція глутатіону перед впливом кадмію захищає ембріони від шкідливого впливу кадмію (J.M. Peters et al., 1995).



Отже, експериментально доведено, що катіони важких металів можуть впливати на розвиток ооцитів та зародків, а також на репродуктивні функції тварин.

На підставі аналізу описаних результатів можна стверджувати, що катіони важких металів, зокрема, нікелю, кобальту, олова, цинку, марганцю та кадмію впливають на життєдіяльність різних організмів. Встановлено, що йони важких металів впливають на транспортні системи клітинних мембран, спричиняючи зміни провідності та рівня мембранного потенціалу, а також блокуючи йонні канали та мембранні помпи.

На рис. 2.1–2.6 (криві 1 і 2) зображено динаміку ТМП зародків в'юна, що розвивалися за наявності в середовищі інкубації катіонів нікелю. Заміну розчину інкубації на розчин, який містив катіони важких металів, проводили на стадії 8–16 бластомерів. Як видно з рисунків, зміни у динаміці ТМП починалися приблизно через 30 хв, тобто через один повний цикл поділу, протягом якого помітних змін у динаміці ТМП не спостерігалось. Приблизно через 30 хв починали з'являтися зміни періоду та амплітуди коливань ТМП і зміни абсолютних значень потенціалу, порівняно з контролем.

На рис. 2.1 відображено динаміку ТМП зародків в'юна, що були інкубовані в розчині з додаванням хлориду нікелю ( $\text{NiCl}_2$ ) в концентрації  $1 \cdot 10^{-5}$  М (1) і  $1 \cdot 10^{-6}$  М (2).

Очевидно, що наявність катіонів нікелю в середовищі інкубації призводить до деполяризації мембрани зародка: абсолютні значення ТМП зменшуються від 47–50 мВ до 42–43 мВ,

тоді як в контролі на цій стадії спостерігається збільшення абсолютних значень ТМП до 66–68 мВ.

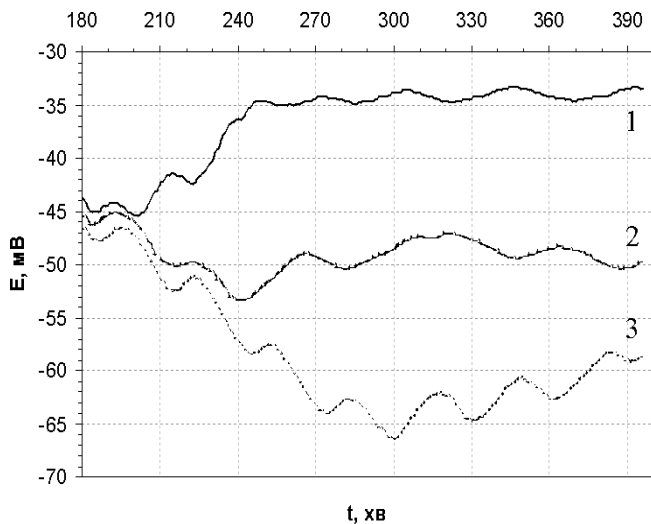


Рис. 2.1. Динаміка ТМП зародків в'юна за умов впливу катіонів нікелю в концентрації  $10^{-5}$  М (1) і  $10^{-6}$  М (2), порівняно з контролем (3)

Крім того, за наявності катіонів нікелю простежувалися значні зміни у динаміці коливань, а саме: амплітуда коливань зменшувалася приблизно в 1,5 раза порівняно з контролем. Період коливань потенціалу також зазнавав значних змін: вплив катіонів нікелю спричиняв збільшення періоду коливань ТМП, а отже, – зменшення частоти коливань, в два рази порівняно з контролем. Оскільки, як вказувалося раніше, коливання ТМП були синхронними з циклами клітинного поділу, зменшення частоти коливань ТМП означає зменшення частоти поділів бластомерів, тобто сповільнюється розвиток зародків, які були піддані впливу катіонів нікелю.

Таке сповільнення розвитку насправді зауважували при візуальному спостереженні за зародками за допомогою бінокулярного мікроскопа МБС-9, тобто, як і в контролі, гіперполяризація мембрани зародків, які розвивалися за наявності катіонів нікелю, припадала на інтерфазу клітинного поділу, деполяризація – на власне мітоз, а максимальні значення ТМП – на прометафазу, причому в цей момент, як і в контролі, під мікроскопом добре видно початок закладання борозни наступного поділу. Отже, вплив катіонів нікелю спричиняє сповільнення не тільки коливань ТМП, але і сповільнення дроблення бластомерів зародків.

При збільшенні концентрації катіонів нікелю в середовищі інкубації до  $10^{-5}$  М, вказані зміни у динаміці ТМП проявляються більш виражено (рис. 2.1, крива 2). Спостерігається досить значна деполяризація мембрани – до  $-35 \div -34$  мВ, тоді як в контролі на цих же стадіях відбувається гіперполяризація до  $-65 \div -67$  мВ.

Період коливань за умов впливу катіонів  $\text{Ni}^{2+}$  в концентрації  $10^{-5}$  М збільшується майже в 2 рази, порівняно з контролем, що збігається зі сповільненням дроблення бластомерів також майже в 2 рази.

Амплітуда коливань при дії катіонів  $\text{Ni}^{2+}$  в концентрації  $10^{-5}$  М, зменшується настільки, що коливання ТМП майже зовсім зникають, тоді як поділ клітин зародка продовжується, хоча і значно повільніше (майже в 2 рази), ніж в контролі.

Отже, вплив катіонів нікелю на зародки в'юна в період дроблення бластомерів призводить до значних змін в динаміці ТМП.

Значно менше такі зміни виражені за умов впливу на зародки в'юна катіонів кобальту. Розчини хлориду кобальту ( $\text{CoCl}_2$ ) використовували в концентраціях  $1 \cdot 10^{-5}$  і  $1 \cdot 10^{-4}$  М, оскільки при дії катіонів кобальту в концентрації  $1 \cdot 10^{-6}$  М зміни в динаміці ТМП були незначними.

Вплив катіонів кобальту в концентрації  $1 \cdot 10^{-4}$  М (рис. 2.2, крива 1) і  $1 \cdot 10^{-5}$  М (рис. 2.2, крива 2) також деполяризує мембрану, але значно слабше, ніж при дії катіонів нікелю в тій самій концентрації: до  $-58 \div -60$  мВ при значеннях потенціалу в контролі  $-65 \div -67$  мВ (максимальні значення).

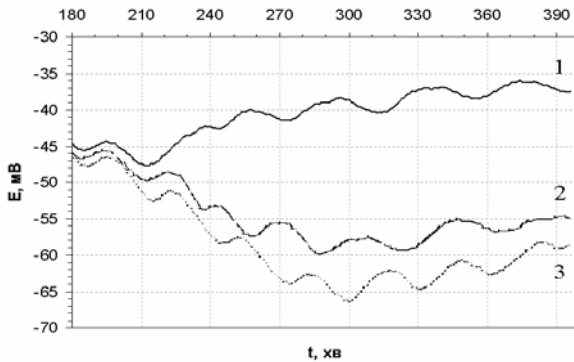


Рис. 2.2. Динаміка ТМП зародків в'юна за умов впливу катіонів кобальту в концентрації  $10^{-5}$  М (1) і  $10^{-6}$  М (2), порівняно з контролем (3)

Зміни періоду та амплітуди коливань за умов впливу концентрації катіонів кобальту  $10^{-5}$  М були незначними.

Наявність у середовищі інкубації катіонів  $\text{Co}^{2+}$  в концентрації  $10^{-4}$  М призводила до значних змін коливань ТМП: зниження абсолютних значень ТМП досягало 38–40 мВ при 65–67 мВ у контролі. Зменшення амплітуди коливань було досить помітним, період коливань ТМП збільшувався, а частота поділу зменшувалася в 1,2–1,3 раза порівняно з контролем.

Вважаємо, що вплив катіонів кобальту спричиняє зміни в динаміці ТМП, подібні до змін, які були зумовлені впливом катіонів нікелю, але виражені значно менше.

Зміни динаміки ТМП за наявності в середовищі інкубації катіонів олова зображено на рис. 2.3.

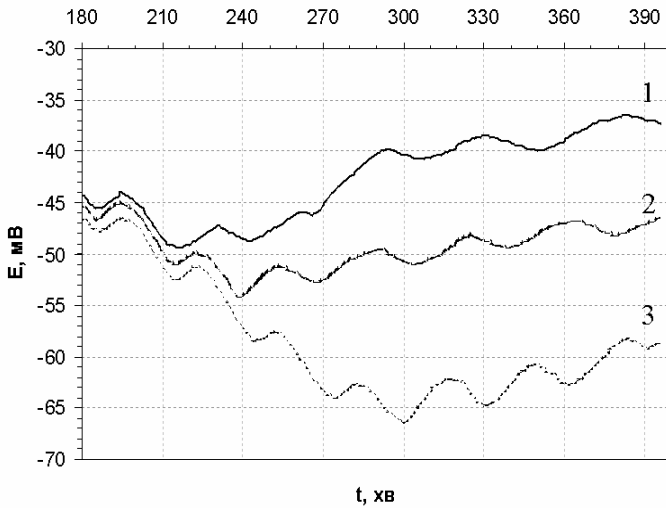


Рис. 2.3. Динаміка ТМП зародків в'юна за умов впливу катіонів олова в концентрації  $10^{-4}$  М (1) і  $10^{-5}$  М (2), порівняно з контролем (3)

При додаванні в фізіологічний розчин хлориду олова ( $\text{SnCl}_2$ ) в концентрації  $1 \cdot 10^{-5}$  М (крива 2) спостерігається деполяризація мембрани до  $-50 \div -52$  мВ при нормі  $-65 \div -67$  мВ (крива 3).

Амплітуда коливань потенціалу значно зменшується – приблизно в 2 рази, а період коливань незначно зростає.

При збільшенні концентрації катіонів  $\text{Sn}^{2+}$  у середовищі інкубації до  $10^{-4}$  М (крива 1), деполяризація мембрани сягає  $-39 \div -40$  мВ. Амплітуда коливань зменшується майже в 2 рази. Період

коливань є приблизно таким самим, як і при дії катіонів  $\text{Sn}^{2+}$  в концентрації  $10^{-5}$  М.

Графіки на рис. 2.4 відображають динаміку ТМП зародків в'юна за умов впливу катіонів цинку в концентраціях  $1 \cdot 10^{-5}$  М та  $1 \cdot 10^{-6}$  М.

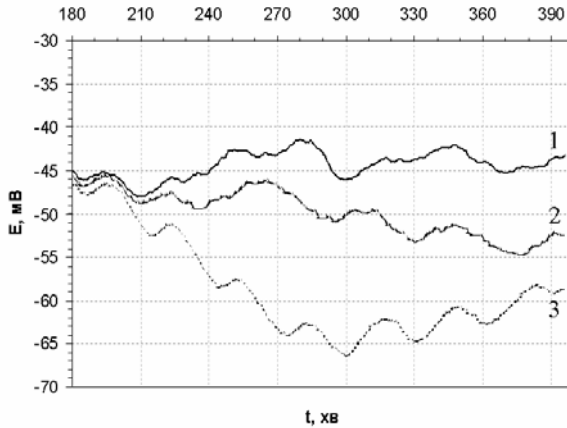


Рис. 2.4. Динаміка ТМП зародків в'юна за умов впливу катіонів цинку в концентрації  $10^{-5}$  М (1) і  $10^{-6}$  М (2), порівняно з контролем (3)

За наявності в середовищі інкубації катіонів цинку в концентрації  $10^{-6}$  М (крива 2), як і за наявності катіонів нікелю, кобальту та олова, спостерігають деполяризацію мембрани зародків, порівняно з контролем. Абсолютні значення потенціалу зменшуються до 45–50 мВ, порівняно з 65–67 мВ в контролі. Амплітуда коливань ТМП за умов впливу катіонів  $\text{Zn}^{2+}$  у цій концентрації майже не змінюється, на відміну від результатів, описаних вище. Період коливань потенціалу, однак, збільшується приблизно в 1,3–1,5 раза.

Вплив катіонів  $\text{Zn}^{2+}$  у концентрації  $10^{-5}$  М (крива 1) веде до більш виражених змін у динаміці ТМП зародків в'юна. Деполяризація мембрани в цьому разі досягає  $-40 \div -45$  мВ.

Період коливань потенціалу при дії цієї концентрації катіонів цинку зростає ще більше – в 1,8–2 рази, порівняно з контролем. Водночас амплітуда коливань дещо зменшується.

Отже, внаслідок впливу катіонів цинку на ТМП зародків в'юна в період дроблення бластомерів не відбувається значного зменшення амплітуди коливань потенціалу, як це було під час впливу катіонів нікелю, кобальту, хрому та олова. Але, як і при дії катіонів цих металів, відбувається зменшення абсолютних значень потенціалу, порівняно з контролем, і зменшення частоти коливань ТМП, а отже, і частоти дроблення бластомерів.

На рис. 2.5 зображено криві динаміки ТМП зародків в'юна за умов наявності в середовищі інкубації хлориду марганцю ( $\text{MnCl}_2$ ) в концентраціях  $1 \cdot 10^{-5}$  М (крива 1) та  $1 \cdot 10^{-6}$  М (крива 2).

І в цьому разі спостерігається деполяризація мембрани: до  $-55 \div -56$  мВ при дії катіонів марганцю в концентрації  $1 \cdot 10^{-6}$  М (крива 2).

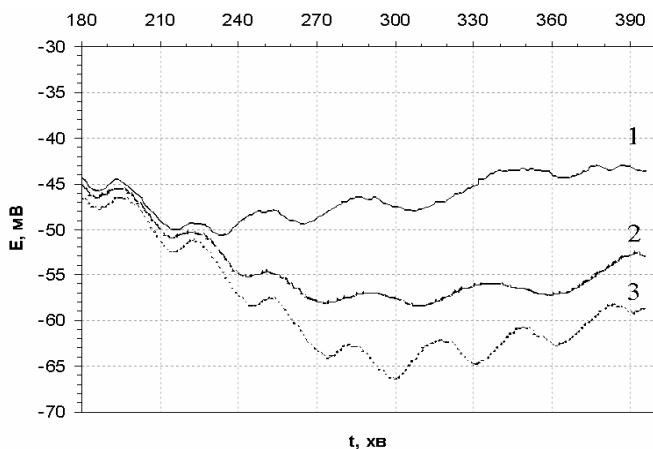


Рис. 2.5. Динаміка ТМП зародків в'юна за умов впливу катіонів марганцю в концентрації  $10^{-5}$  М (1) і  $10^{-6}$  М (2), порівняно з контролем (3)

Амплітуда коливань ТМП при додаванні в середовище інкубації катіонів  $Mn^{2+}$  в цій концентрації зменшується приблизно в 1,5 раза. Період коливань потенціалу при цьому зростає в 1,5–1,7 раза (рис. 2.6; криві 1, 2, 3).

Внаслідок додавання в середовище інкубації більшої концентрації катіонів  $Mn^{2+}$  –  $10^{-5}$  М (крива 1) деполаризація мембрани, порівняно з контролем, є більш вираженою:  $-45 \div -47$  мВ при  $-65 \div -67$  мВ у нормі (крива 3).

Період коливань зростає ще більше – в 1,7–1,8 раза, що підтверджується сповільненням дроблення бластомерів, яке було відмічено при візуальному спостереженні за зародками при дії катіонів марганцю в концентрації  $10^{-5}$  М.

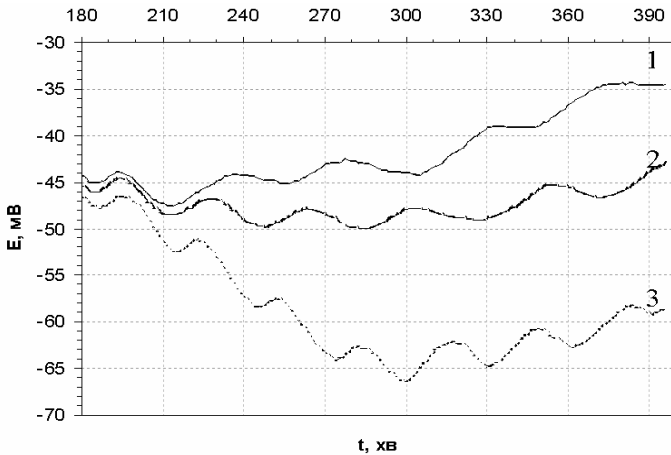


Рис. 2.6. Динаміка ТМП зародків в'юна за умов впливу катіонів кадмію в концентрації  $10^{-5}$  М (1) і  $10^{-6}$  М (2), порівняно з контролем (3)

За умов впливу катіонів кадмію в концентрації  $1 \cdot 10^{-6}$  М (крива 2), як і в попередніх прикладах, спостерігали деполаризацію мембрани, порівняно з контролем: до  $-45 \div -50$  мВ при нормі



-65 ÷ -67 мВ (крива 3). Амплітуда коливань зменшувалася приблизно, в 1,2 раза, тоді як період зростав досить значно: приблизно в 1,8 раза, порівняно з контролем.

При збільшенні концентрації  $Cd^{2+}$  в середовищі інкубації до  $1 \cdot 10^{-5}$  М (крива 1), деполяризація була ще більш значною: до -35 ÷ -40 мВ. Амплітуда коливань ТМП в цьому разі значно зменшувалася – майже в 2 рази, порівняно з контролем. Період коливань потенціалу за умов впливу катіонів кадмію в концентрації  $1 \cdot 10^{-5}$  М збільшувався ще більше – приблизно в 1,8–1,9 раза, порівняно з контролем.

Отже, можна стверджувати, що за умов наявності в середовищі інкубації зародків в'юна в період дроблення бластомерів катіонів важких металів, а саме: нікелю, кобальту, олова, цинку, марганцю та кадмію, спостерігаються певні зміни в динаміці трансмембранного потенціалу цих зародків. Ці зміни мають подібний характер у разі впливу кожного з цих металів і проявляються більш виражено при збільшенні концентрацій вказаних металів в середовищі інкубації зародків (Н.М. Бойко, О.А. Гойда, 1996; Н.М. Бойко та ін., 1997; Н.М. Бойко, Д.І. Санагурський, 2000; 2002; N.M. Boyko, O.A. Goyda, 1996).

Загалом ці зміни можна охарактеризувати як:

- зменшення абсолютних величин ТМП зародків, порівняно з контролем;

- зменшення (в деяких випадках – незначне) амплітуди коливань потенціалу, порівняно з контролем;

- збільшення періоду коливань ТМП, порівняно з контролем, а отже, зменшення частоти поділів, що

супроводжується сповільненням розвитку зародків, які піддавалися впливу катіонів важких металів, порівняно з зародками, які розвивалися в нормальних умовах.

Відомо, що динаміка трансмембранного потенціалу зародків в'юна *Missgurnus fossilis* L. протягом періоду дроблення бластомерів має коливний характер (Е.А. Гойда, 1993, Д.И. Санагурский, 1983), причому гіперполяризація – збільшення абсолютних значень потенціалу – припадає на інтерфазу клітинного циклу, а деполіаризація – зменшення абсолютних значень – власне на мітоз (Е.А. Гойда, 1993). Період коливань ТМП у нормі є приблизно однаковим протягом усього періоду дроблення і становить близько 31 хв (Т.А. Детлаф, А.А. Детлаф, 1960), що збігається з тривалістю клітинного циклу.

Як було доведено дослідженнями, за умов наявності в середовищі інкубації зародків в'юна двовалентних катіонів таких важких металів, як нікель, кобальт, цинк, олово, марганець та кадмій у концентраціях  $10^{-6}$ – $10^{-4}$  М коливний характер динаміки ТМП зародків зберігається, але амплітуда та частота коливань потенціалу зазнають значних змін. Амплітуда коливань ТМП тією чи іншою мірою зменшується при дії всіх досліджуваних металів, тобто зміни рівня ТМП протягом одного клітинного циклу відбуваються у вужчому діапазоні, ніж у нормі.

Частота коливань потенціалу спокою за умов впливу катіонів важких металів зменшується, тобто збільшується період коливань, отже, кожен цикл клітинного поділу, а також вся стадія дроблення бластомерів триває довше, ніж у нормі. Внаслідок цього

стадія морули, тобто початок десинхронізації коливань, який збігається з початком асинхронних поділів ядер, настає пізніше.

Також характерною особливістю динаміки ТМП зародків в'юна за наявності в інкубаційному середовищі катіонів важких металів була загальна деполяризація мембран клітин зародків: зменшення абсолютних значень потенціалу, порівняно з контролем. У нормі зазвичай рівень потенціалу зростає протягом періоду дроблення бластомерів від  $-20$  мВ відразу після запліднення до  $-65 \div -70$  мВ на стадіях 8–10 поділів, рівень ТМП при дії катіонів досліджуваних металів є значно нижчим.

Найбільш вираженою загальною деполяризація мембрани була при дії катіонів нікелю та кадмію, рівень ТМП за цих умов становив на стадіях 8–10 поділів приблизно  $-35 \div -40$  мВ (концентрація  $10^{-5}$  М). Менш вираженою деполяризація простежувалася в умовах впливу олова та цинку. За наявності в інкубаційному середовищі катіонів кобальту та марганцю в концентрації  $10^{-6}$  М деполяризація була виражена мало: значення ТМП досягали приблизно  $-60$  мВ при дії катіонів кобальту та  $-55$  мВ при дії катіонів марганцю.

Однак, хоча і виражена по-різному, деполяризація мембран клітин зародків спостерігалася при впливі всіх досліджуваних металів.

Багатьма дослідниками було доведено, що ТМП різних клітин є достатньо чутливим параметром – він швидко реагує на різні зовнішні впливи, як фізичні, так і хімічні. При внесенні в інкубаційне середовище таких речовин, як гормони (Е.А. Гойда, 1993; С.И. Кусень и др., 1980), антибіотики (Н.М. Бойко,

Д.І. Санагурський, 2000), фактори росту (Е.А. Гойда, 1993; Е.А. Гойда и др., 1981), фактори забруднення навколишнього середовища (Н.М. Бойко та ін., 1997; Н.М. Бойко, Д.І. Санагурський, 2000; 2000) змін передусім зазнають саме амплітуда та період коливань.

За умов впливу цих речовин та деяких фізичних факторів, відмінних від нормальних умов температури та атмосферного тиску, період, а отже, і частота коливань, можуть збільшуватись або зменшуватися і залежати від характеру впливу.

Амплітуда коливань зазвичай, як доведено багатьма дослідженнями (А.С. Гинзбург, 1968) не зазнає суттєвих змін, але в умовах деяких зовнішніх впливів може як збільшуватись (наприклад, при дії певних концентрацій колхіцину (Е.А. Гойда и др., 1981), деяких антибіотиків, зокрема, фторхінолонів (Н.М. Бойко, Д.І. Санагурський, 2000), так і зменшуватися (наприклад, під час дії деяких гормонів (Е.А. Гойда, 1993), серцевих глікозидів (Е.А. Гойда и др., 1989) та ін.

В умовах різних зовнішніх впливів також може спостерігатися загальна деполяризація, або гіперполяризація мембран клітин зародків.

Характерними змінами динаміки ТМП зародків в'юна при дії катіонів важких металів у проведених дослідженнях були: загальна деполяризація мембрани, зменшення амплітуди та збільшення періоду коливань потенціалу.

Схожі зміни динаміки ТМП зародків в'юна описані в літературі (Е.А. Гойда, 1993; Е.А. Гойда и др., 1989): подібне за характером змін зменшення абсолютних значень потенціалу зі

збереженням коливань спостерігалось при дії оуабаїну, тобто при інгібуванні  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази, яка є інтегральним білком  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -помпи. Засвідчено, що внесення оуабаїну в концентрації  $10^{-4}$  М в середовище інкубації зародків в'юна в період дроблення бластомерів зумовлює виникнення деполяризації мембрани, незалежно від стадії розвитку, хоча глибина деполяризації залежала від рівня ТМП на стадії, коли вносили інгібітор. Доведено це і в інших літературних даних (Д.Р. Бериташвили и др., 1974).

Зниження значень потенціалу при дії катіонів таких важких металів, як срібло, золото та цинк, спостерігали дослідники Грузіна, Карамушка та співавтори (Т.Г. Грузина и др., 1997; В.И. Карамушка и др., 1991), досліджуючи бактерії. Вони зауважили, що така деполяризація збігається зі зниженням активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази.

Вважаємо, що доцільно було б дослідити, як впливають катіони важких металів на активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази зародків в'юна.

Дальшими дослідженнями встановлено, що активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази мембран зародків в'юна зменшується дозозалежно внаслідок впливу катіонів досліджуваних металів: найменшою активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази зародків була при дії катіонів металів у концентраціях  $10^{-4}$  М, найбільш наближеною до активності в контролі – при дії катіонів металів у концентрації  $10^{-6}$  М. Найбільш суттєве зниження активності спостерігалось внаслідок впливу катіонів нікелю та кадмію, тобто за тих самих умов, за яких було зареєстровано найбільш виражене зменшення абсолютних значень ТМП.

Якщо порівняти зміни в часі активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази зародків в'юна протягом періоду дроблення бластомерів та загальну тенденцію змін ТМП (тренд) протягом того ж періоду, то стає очевидно, що характер змін цих двох показників за наявності катіонів важких металів є подібним (рис. 2.7–2.12).

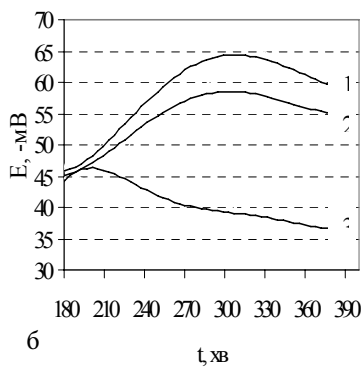
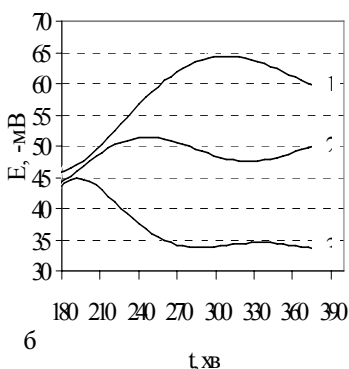
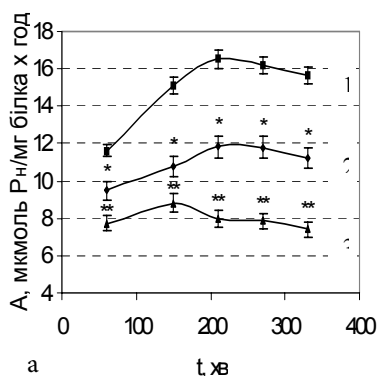
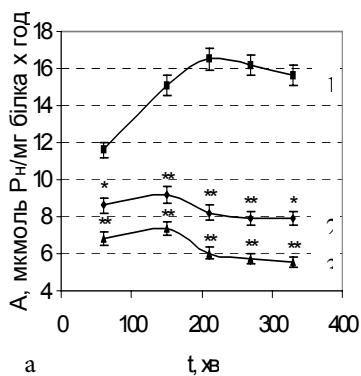


Рис. 2.7. Зміни активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази (а) та рівня ТМП (б) при дії катіонів  $\text{Ni}^{2+}$  в концентраціях  $10^{-6}$  М (криві 2) і  $10^{-5}$  М (криві 3), порівняно з контролем (криві 1).

\* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$

Рис. 2.8. Зміни активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази (а) та рівня ТМП (б) при дії катіонів  $\text{Co}^{2+}$  в концентраціях  $10^{-5}$  М (криві 2) і  $10^{-4}$  М (криві 3), порівняно з контролем (криві 1).

\* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$

На рис. 2.7 зображено зміни активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази (а) та динаміки ТМП зародків в'юна (б) за наявності в інкубаційному середовищі катіонів нікелю, порівняно з контролем. Вплив катіонів нікелю у концентрації  $10^{-6}$  М веде до помітного зменшення як активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази, так і абсолютних значень ТМП, яке стає більш вираженим із збільшенням концентрації катіонів металу до  $10^{-5}$  М. Ймовірно, що в той момент, як в контролі на стадіях VI–X поділу бластомерів активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази та значення потенціалу збільшуються, в разі дії катіонів нікелю на цих стадіях спостерігається зменшення значень обидвох показників.

За умов впливу катіонів кобальту (рис. 2.8) зміни є подібними, але менш вираженими. Значне зменшення активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази (а) та рівня ТМП зародків (б) спричиняв вплив катіонів кобальту в концентрації  $10^{-4}$  М. Вплив катіонів  $\text{Co}^{2+}$  у концентрації  $10^{-5}$  М був менш помітним.

На рис. 2.9 зображено зміни активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази (а) та динаміки ТМП зародків в'юна (б) унаслідок впливу катіонів марганцю в концентрації  $10^{-5}$  М та  $10^{-6}$  М, порівняно з контролем. Очевидно, що вплив катіонів марганцю зумовлює зменшення активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази (а) і зменшення абсолютних значень потенціалу (б). Зміни є більш вираженими при дії катіонів марганцю в концентрації  $10^{-5}$  М.

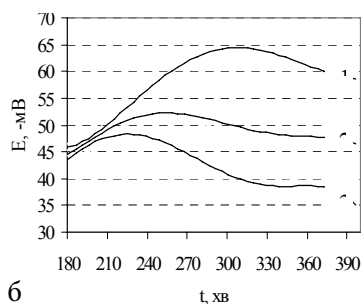
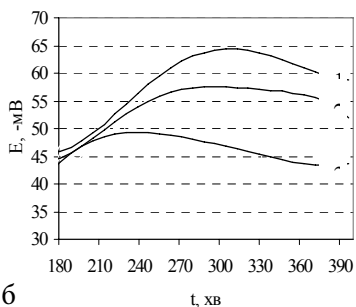
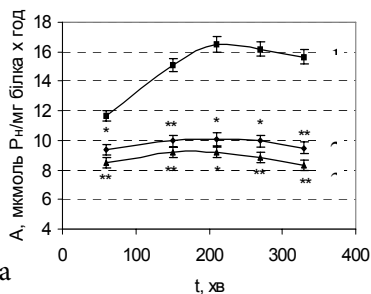
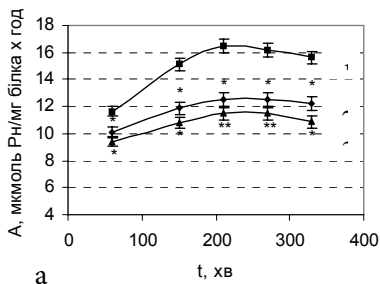


Рис. 2.9. Зміни активності Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФ-ази (а) та рівня ТМП (б) при дії катіонів Mn<sup>2+</sup> в концентраціях 10<sup>-6</sup> М (криві 2) і 10<sup>-5</sup> М (криві 3), порівняно з контролем (криві 1).

\* – p < 0,05, \*\* – p < 0,01.

Рис. 2.10. Зміни активності Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФ-ази (а) та рівня ТМП (б) при дії катіонів Sn<sup>2+</sup> в концентраціях 10<sup>-5</sup> М (криві 2) і 10<sup>-4</sup> М (криві 3), порівняно з контролем (криві 1).

\* – p < 0,05, \*\* – p < 0,01.

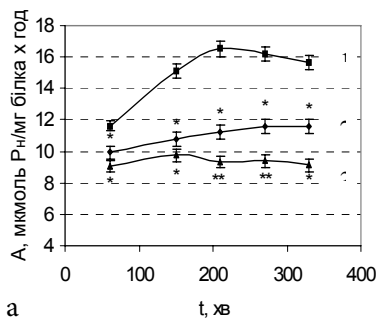
Результати впливу катіонів олова на досліджувані показники показано на рис. 2.10. Ці зміни, як і в попередніх прикладах, є залежними від концентрації: при дії катіонів олова в концентрації 10<sup>-5</sup> М активність Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФ-ази зародків в'юна (а) зменшувалась, як і абсолютні значення ТМП (б). За наявності катіонів олова в концентрації 10<sup>-4</sup> М деполяризація мембрани була більш вираженою, як і зменшення активності АТФ-ази.



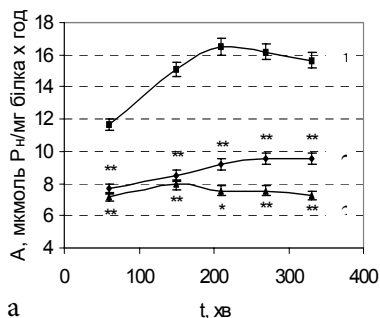
Вплив катіонів цинку (рис. 2.11) зумовлював подібні зміни як активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази (а), так і значень потенціалу зародків в'юна (б). Причому у разі впливу катіонів цинку в концентрації  $10^{-5}$  М ці зміни були більш суттєвими, ніж при концентрації катіонів  $10^{-6}$  М.

На рис. 2.12 зображено зміни АТФ-азної активності (а) та динаміки ТМП зародків в'юна (б) за умов впливу катіонів кадмію. Активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази зародків при дії цих катіонів, як і при дії катіонів нікелю, зменшувалась суттєвіше, ніж унаслідок впливу катіонів інших металів. Як і в інших дослідях, вплив катіонів кадмію в концентрації  $10^{-5}$  М приводив до більш значних змін обох показників, ніж вплив катіонів кадмію в концентрації  $10^{-6}$  М.

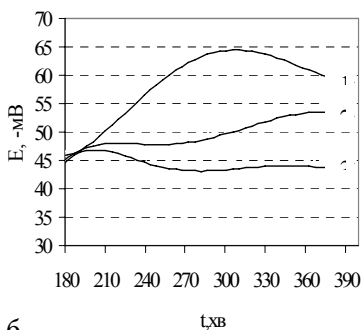
Отже, загалом можна сказати, що дія катіонів важких металів приводила до залежного від концентрації зменшення активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази і до подібного за характером змін зменшення абсолютних значень ТМП зародків в'юна на стадії дроблення бластомерів. Більш виражене зниження активності ферменту помпи простежували в більш суттєвій деполяризації мембрани. Причому, якщо в контролі активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази зростала від запліднення до стадії 64 бластомерів, то за умов впливу катіонів металів активність цього ферменту зменшувалась або зростала незначно протягом періоду дроблення, як і абсолютні значення ТМП зародків у нормі та при дії катіонів важких металів.



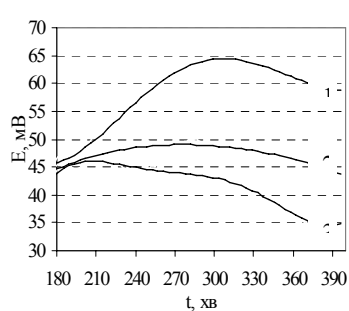
а



а



б



б

Рис. 2.11. Зміни активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази (а) та рівня ТМП (б) при дії катіонів  $\text{Zn}^{2+}$  в концентраціях  $10^{-6}$  М (криві 2) і  $10^{-5}$  М (криві 3), порівняно з контролем (криві 1).

\* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$

Рис. 2.12. Зміни активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази (а) та рівня ТМП (б) при дії катіонів  $\text{Cd}^{2+}$  в концентраціях  $10^{-6}$  М (криві 2) і  $10^{-5}$  М (криві 3), порівняно з контролем (криві 1).

\* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$

Аналізуючи проведене порівняння, можна вважати, що інгібування  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази катіонами досліджуваних важких металів може бути однією з основних причин змін рівня ТМП зародків в'юна внаслідок впливу катіонів важких металів. Інгібування  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази катіонами важких металів може здійснюватись, зокрема, шляхом зв'язування катіонів металів з сірковмісними групами ферменту (Л.С. Вовканич, Л.О. Дубицький, 1998; Л.О. Дубицький, Л.С. Вовканич, 2000; G.H. Zhang et al., 1990).

Доведено (Л.О. Дубицький, Л.С. Вовканич, 2000; 2001; 2003), що інгібувальні ефекти катіонів металів на транспортні системи мембран залежать від їхніх фізико-хімічних властивостей, зокрема, від іонного радіуса, ентальпії гідратації, констант стійкості комплексів металів з біолігандами, SH-лігандами.

Згідно з теорією жорстких і м'яких кислот і основ, розробленою Пірсоном (Ю.А. Ершов, Т.В. Плетенева, 1989), катіони металів з великою електронною оболонкою атомів, що легко поляризуються (м'які кислоти Льюїса), високоспоріднені з м'якими основами, що мають низьку електронегативність, зокрема, з групами –SH і –SR (Ю.М. Торчинский, 1977). Відповідно до припущення цього кадмій належить до м'яких кислот, нікель, цинк, олово, кобальт – до проміжних, марганець – жорстка кислота (Ю.А. Ершов, Т.В. Плетенева, 1989). Стає зрозумілим, чому марганець впливає на активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази найменше, а кадмій – найбільше. Очевидно, такі результати пов'язані саме з утворенням комплексів металів з SH-групами  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази. Вплив на активність ферменту металів, що належать до проміжних кислот, виражений по-різному, що залежить, можливо, від інших фізико-хімічних властивостей цих металів.

Одержані результати щодо інгібування  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази катіонами важких металів значно підтверджуються змінами ультраструктури бластомерів зародків в'юна, які були інкубовані за наявності катіонів застосованих важких металів.

Крім структурних пошкоджень органел бластомерів за умов впливу катіонів важких металів, спостерігався набряк цитоплазми та органел бластомерів. Найбільше такі зміни були виражені на стадії 16 бластомерів та стадії морули. Простежували

зменшення хвилястості плазматичної мембрани, порівняно з контролем, розрідження гіалоплазми, набряк органел. Це, очевидно, пов'язано з надмірним надходженням води у клітину, яке супроводжує вхід у клітину йонів  $\text{Na}^+$  (Е.А. Гойда, 1993). Надлишок води в цитоплазмі може бути пов'язаний зі зменшенням виходу з клітини йонів натрію, що свідчить про порушення активного транспортування, яке виводить надлишок  $\text{Na}^+$  з клітини, а отже, – про зниження активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази внаслідок досліджуваних впливів.

Цікавим результатом, одержаним унаслідок проведених досліджень, є збільшення періоду коливань ТМП зародків в'юна через вплив катіонів досліджуваних металів, порівняно з контролем. Як було встановлено за допомогою спектрального аналізу, збільшення періоду (зменшення частоти) коливань потенціалу спостерігались у всіх дослідах впливу катіонів досліджуваних металів. Найсуттєвіше збільшення періоду відбувалося у разі впливу катіонів нікелю, олова та кадмію, найменш виражене – при дії катіонів кобальту. Оскільки тривалість періоду коливань потенціалу збігається з тривалістю клітинного циклу зародків в'юна, збільшення періоду свідчить про сповільнення розвитку зародків. Це було підтверджено візуальним спостереженням під час розвитку зародків та личинок в'юна за допомогою бінокулярного мікроскопа.

Личинки в'юна у віці 10 діб, які розвивались у нормальних умовах, були рухливими, мали подовгасту форму тіла, розвинені плавці та зябра, виражену пігментацію (рис. 2.13). Жовткового міхура на цій стадії не було.

Личинки того ж віку, що розвивалися за наявності в інкубаційному середовищі катіонів важких металів в концентрації  $10^{-5}$  М, мали певні аномалії розвитку. Добре помітним було відставання розвитку цих личинок, порівняно з контролем: вони мали менші розміри та залишки жовткового міхура (рис. 2.14–2.17).



Рис. 2.13. Личинки в'юна у віці 10 діб, які розвивались у нормальних умовах

У таких личинок спостерігали суттєві вади розвитку, а саме: викривлення та перекручення хребта (рис. 2.14), деформацію кісток черепа та збільшення розмірів голови (рис. 2.15), значний набряк черевної порожнини (рис. 2.16), недорозвинені плавці, зябра, вусики (рис. 2.17). Личинки були малорухливими, серцебиття сповільнене.

Такі аномалії розвитку личинок в'юна виявлено приблизно в 25–30 % зародків, що збігається з даними, що були одержані на зародках *X. laevis* (M.C. Plowman et al., 1991; 1994; F.W.Jr. Sunderman et al., 1991; 1992; 1995; 1996). Решта личинок, в яких не

спостерігали виражені аномалії розвитку, були, однак, малорухливими, їхня шкіра була незначно пігментована, порівняно з контролем.

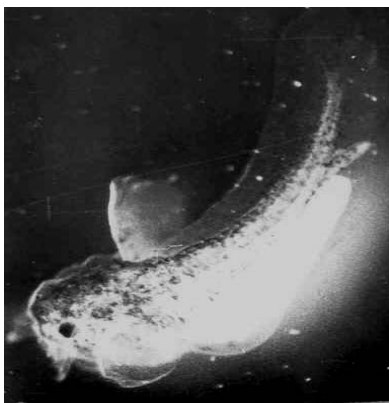


Рис. 2.14. Аномалії розвитку у личинок в'юна, що розвивались за наявності йонів нікелю ( $10^{-5}$  М)

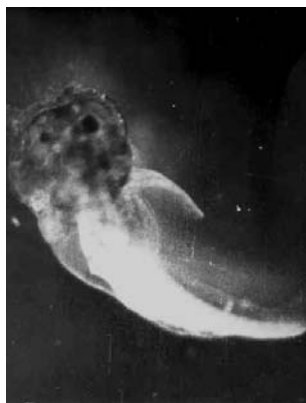


Рис. 2.15. Аномалії розвитку у личинок в'юна, що розвивались за наявності йонів марганцю ( $10^{-5}$  М)



Рис. 2.16. Аномалії розвитку у личинок в'юна, що розвивались за наявності йонів кадмію ( $10^{-5}$  М)



Рис. 2.17. Аномалії розвитку у личинок в'юна, що розвивались за наявності йонів олова ( $10^{-5}$  М)

Оскільки зародки в'юна *Missgurnus fossilis* L. є досить чутливим об'єктом щодо зовнішніх збурень, зокрема, динаміка їхнього трансмембранного потенціалу суттєво змінюється внаслідок впливу різних речовин, зокрема гормонів (Е.А. Гойда, 1993), факторів росту (Е.А. Гойда и др., 1981), антибіотиків (Н.М. Бойко, Д.І. Санагурський, 2000; Е.А. Гойда, 1993), катіонів важких металів (Н.М. Бойко, Д.І. Санагурський, 2000; Н.М. Бойко та ін., 2002), та таких фізичних факторів, як відмінні від нормальних умов температура та атмосферний тиск (Е.А. Гойда, 1993), можна запропонувати цей об'єкт як тест-систему при вивченні впливу різних фармакологічних, хімічних та біологічних субстанцій на живі об'єкти.

## **2.4. Безперервне реєстрування ТМП**

Для отримання безперервної інформації впродовж всього періоду раннього розвитку зародків при мінімальному порушенні їхньої морфологічної і функціональної цілісності, використано методику реєстрування ТМП, добре апробовану на рослинних об'єктах (В.К. Адрианов и др., 1968), з частковою власною модифікацією, відповідно до вимог досліджуваного об'єкта. Загальна блок-схема установки для одноканальних відведень зображена на рис. 2.18. Багатоканальні відведення складаються з аналогічних елементів, які замикаються на досліджуваному об'єкті, в нашому разі – ікра в'юна (рис. 2.18 б, 2.19).

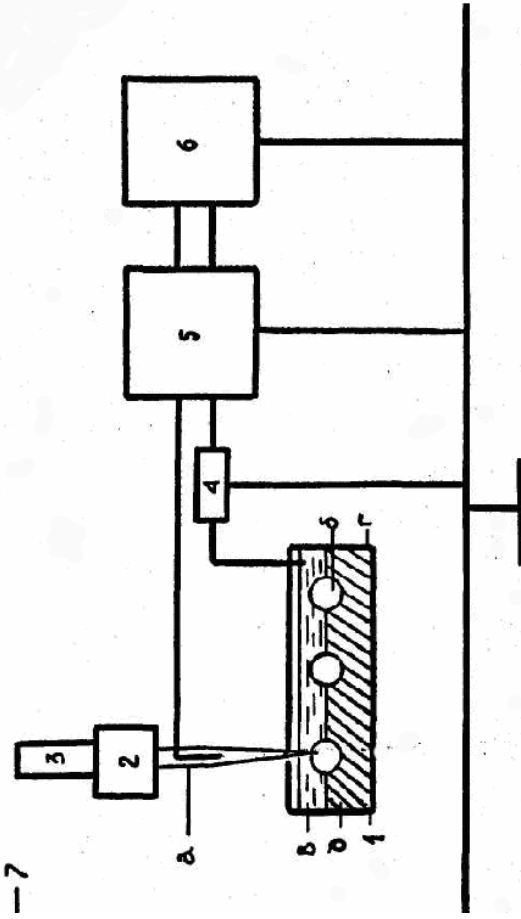


Рис. 2.18. Блок-схема установки для непрерывного реестрування ТМП у зародків в'їона, що розвиваються:  
 1 – камера з кюветою для об'єкта дослідження; 2 – об'єкт дослідження; 3 – екран; 4 – мікроелектрод; 5 – індексний мікроелектрод; 6 – самописний електронний потенціометр; 7 – мікроелектрод; 7 – екран; 2, 3 – блоки маніпулятора; 5 – рН-метр; 6 – самописний електронний потенціометр



Кювета з об'єктом дослідження (рис. 2.18 б), який знаходиться в агаровому блоці (рис. 2.18 д), жорстко кріпиться на платформі, яка механічно переміщається в трьох взаємоперпендикулярних напрямках. Це дає можливість точно підвести об'єкт до мікроелектрода (рис. 2.18 а), який є мікропіпеткою зі скла "Пірекс", заповненою 2,5 М КСІ (П.Г. Костюк, 1960; Р.М. Мещерський, 1960). Витягали мікроелектроди на установці 143-3. Для роботи використовували електроди з кінчиком менше ніж 1мКм і опором 20–50 Мом. Додатковим критерієм хорошої якості мікроелектродів вважають їхні характеристики конусоїдальності і запис "умовного нуля" з мінімальними шумами і дрейфом. Заповнювали мікроелектроди безпосередньо поміщаючи їх у 2,5 н КСІ, оскільки і вони містять внутрішньоелектродні капіляри, що сприяють швидкому заповненню. Відомі й інші способи заповнення мікроелектродів, які потребують довшого часу і підготовчих робіт. Електроди фіксують у спеціальному утримувачі (рис. 2.18 2) мікроманіпулятора ІПМ (рис. 2.18 3). За допомогою нього вводять мікроелектрод у зиготу шляхом імпульсного або плавного його переміщення. Вводили мікроелектроди у полі зору бінокулярного мікроскопа МБІ-1 при збільшенні в 32 рази.

Досліджуваний об'єкт – зиготу в'юна, закріплену в агаровому блоці, – поміщали в камеру, заповнену розчином Гольфрета. У момент проколу плазматичної мембрани зиготи кінчиком мікроелектрода простежується різкий стрибок неявиного потенціалу, який добре видно на шкалі рН-метра (рН=340) (рис.2.185).

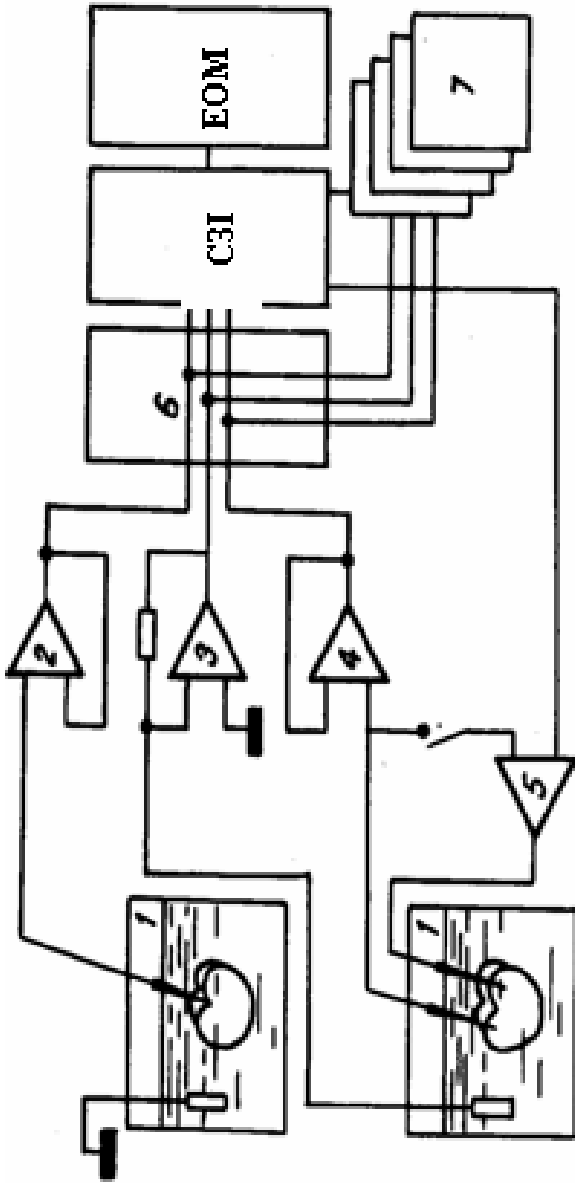


Рис. 2.19. Схема установки для дослідження електрофізіологічних характеристик мембран зародків в юна:  
 1 – експериментальна камера; 2, 4 – мікроелектродні підсилювачі; 3 – підсилювач струму; 5 – підсилювач фіксування потенціалу; 6 – підсилювач-перетворювач; 7 – потенціометри КСП-4

Цю величину ТМП і далші зміни її в часі реєстрували на діаграмній стрічці самописця КСП-2 (рис. 2.18 б). Використані нами у вимірювальній системі рН-метр і самописець КСП-2, відповідають вимогам узгодження вхідних і вихідних опорів, напруг і струмів між елементами в ланці.

Для проведення експерименту використовують яйцеклітини і зародки в'юна *Misgurnus fossilis* L., одержані за методикою Нейфаха (А.А. Нейфак, 1959). У лабораторних умовах риби утримують при температурі  $+4$ – $-5$  °С. Для отримання ікри самкам доміжово вводять 500 МО хоріогонічного гонадотропіну. Овуляція настає через 36 годин при температурі  $+19$ – $-20$  °С. Зиготи інкубують при температурі  $+20$ – $-22$  °С у розчині Гольфретера. Стадії розвитку контролюють візуально.

Після однієї години інкубації зиготи при температурі  $+21,5$  °С з'являються перші два бластомери зародка, причому борозна першого поділу дроблення проходить меридіально. Згодом вік зародків вимірюють або часом після запліднення, або номером поділів бластомерів, або числом  $\tau_0$  – умовних одиниць “детлаф”, що були названі на честь авторів, які їх запропонували (Т.А. Детлаф, А.А. Детлаф, 1960). Величина  $\tau_0$  – це тривалість одного мітотичного циклу в період синхронних дроблень 2–4 бластомерів, яка для в'юна при температурі  $+21,5$  °С становить 31 хв. Так, через 1,5 год після запліднення, або через 3  $\tau_0$ , відбувається II поділ: кількість бластомерів – чотири. Борозна другого поділу теж меридіальна, але проходить перпендикулярно до борозни першого дроблення. Через 2 год (4  $\tau_0$ , III поділ) зародки мають вісім бластомерів, а через 2,5 год (5  $\tau_0$ , IV поділ) –

шіснадцять, причому і ці борозни проходять меридіонально і перпендикулярно попереднім. Через 3 год (6 τ<sub>0</sub>, V поділ) зародки являють собою 32 бластомери, але борозна п'ятого поділу проходить паралельно екватору жовтка, в результаті чого на анімальному полюсі утворюється “шапочка”, тобто бластодиск, клітини якого ще не відділені від жовтка мембранами. Після 3 год клітини нижнього шару торкаються жовтка безпосередньо своєю базальною частиною, а верхні оточені з усіх боків плазматичними мембранами. Вперше з'являються якісні відмінності між бластомерами (Е.А. Гойда, 1993). На наступній стадії дроблення (7 τ<sub>0</sub>, VI поділ) зародок має 64 бластомери, які розміщені двома-трьома шарами і утворюють “високу шапочку”. Через 4 год після запліднення (8 τ<sub>0</sub>, VII поділ) зародки мають 128 бластомерів, через 5 год (10 τ<sub>0</sub>, IX поділ) – 512 бластомерів, які утворюють морулу. Після цієї стадії поділу відбувається десинхронізація каріокінезу в різних клітинах, а на стадії 12 τ<sub>0</sub> (XI поділ) формується рання бластула – “шапочка” бластомерів здійснюється над жовтком, зовнішні бластомери утворюють епібласт. На цій стадії починається асинхронний поділ ядер, падає мітотичний індекс. Починається інтенсивний синтез РНК і морфогенетична функція ядер.

Саме на цій стадії, через 6 год після запліднення, закінчується реєстрування трансмембранного потенціалу зародків, оскільки в цей час починається десинхронізація коливань ТМП, яка збігається з десинхронізацією поділів ядер, а ТМП має постійний рівень – 60 мВ.

Реєструють рівень мембранного потенціалу безперервно протягом 6–7 год розвитку зародків. Здійснюють реєстрування за допомогою підсилювачів, які мусять мати високоомний вхід – 20–40 МоМ (П. Костюк, О. Крышталь, 1981; И. Магура, 1981; Р. Первис, 1983). Записувати електричні сигнали, отримані на виході підсилювача, можна на різних носіях інформації.

## **2.5. Визначення активності Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> – активованої, Mg<sup>2+</sup> – залежної АТФ– ази в гомогенаті клітин зародків в'юна**

Активність Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-активованої, Mg<sup>2+</sup>-залежної аденозинтрифосфатази, яка разом з гідролізом АТФ біохімічно пов'язана з механізмами генерування різниці потенціалів збудливих мембран, у гомогенаті клітин зародків в'юна визначають за стандартною методикою (М.И. Прохорова, 1982), за різницею активностей без оубаїну та при його додаванні. Внаслідок гідролізу АТФ при дії АТФ-ази нагромаджується неорганічний фосфат (P<sub>n</sub>). Він перетворюється молібденовокислим амонієм у комплексну сполуку, що відновлюється аскорбіновою кислотою до молібденової сині. Інтенсивність забарвлення пропорційна до вмісту P<sub>n</sub>.

У ході визначення використовують такі реактиви:

інкубаційне середовище – розчин Гольфретера (табл. 2.1);

3 мМ розчин АТФ-Na<sub>2</sub> на 50 мМ буфері трис-НСІ (рН 7,4);

- 10 % трихлороцтову кислоту;  
 2 % аскорбінову кислоту;  
 ацетатний буфер (рН 4,5) – 1 М  $\text{CH}_3\text{COONa} + \text{CH}_3\text{COOH}$ ;  
 2 %  $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$  в 0,05 н  $\text{H}_2\text{SO}_4$  і 0,001 н  $\text{CuSO}_4$ ;  
 стандартний розчин  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (20 мкг  $\text{P}_n$  в 1 мл).

Таблиця 2.1

Хімічний склад фізіологічного розчину для холоднокровних  
 – розчину Гольфрретера (В.П. Божкова, 1971)

Складники	Маса солей на 100 мл маточного розчину, мг	Об'єм маточного розчину на літр готового розчину, мл
$\text{CaCl}_2$	11,09	3
$\text{NaCl}$	9,84	60
$\text{KCl}$	7,45	2
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	20,32	0,5
$\text{NaHCO}_3$	8,40	2
$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_8\text{N}_2$ (EDTA)	29,21	5

Зародки в'юна на різних стадіях розвитку гомогенізують і з одержаного гомогенату центрифугуванням відділяють мітохондрії та ядра. Одержані проби розводять водою так, щоб в 0,1 мл проби вміст білка не перевищував 100–250 мкг (кількість білка визначають за методом Лоурі). У пробірки вносять по 0,1 мл одної і тої ж проби, доливають по 1 мл інкубаційного середовища і 0,1 мл АТФ- $\text{Na}_2$ . Потім в одну з контрольних пробірок додають 0,1 мл 0,1 мМ розчину оуабаїну. В досліджувані проби додають розчини солей важких металів в концентраціях від  $10^{-4}$  до  $10^{-5}$  М. Проби інкубують при температурі  $+20^\circ\text{C}$  протягом 20 хв, після чого для припинення гідролізу й осадження білка в них додають 10 %

трихлороцтову кислоту (1:1). Осаджений білок відділяють центрифугуванням при 2 000 об/хв протягом 10 хв. До надосадової рідини, що містить  $P_n$ , який був відщеплений від АТФ під дією АТФ-ази, доливають 1,5 мл ацетатного буфера – для нейтралізації трихлороцтової кислоти до рН 3,9–4,0, 0,2 мл 2 % молібдату амонію і 0,2 мл 2 % свіжо виготовленої аскорбінової кислоти. Проби перемішують і залишають при кімнатній температурі на 20 хв до появи забарвлення. Після закінчення цього терміну визначають величину оптичної густини на спектрофотометрі при довжині хвилі 700 нм. За калібрувальною кривою та величиною екстинції визначають вміст неорганічного фосфору в зразку. АТФ-азну активність (у мкмолях  $P_n$ /мг білка·год) розраховують за формулою:

$$A = 6P_n/aM,$$

де  $P_n$  – вміст фосфору в пробі, знайдений за кривою;  $a$  – вміст білка в пробі;  $M$  – молекулярна маса фосфору.

## **2.6. Електронно–мікроскопічне дослідження клітин зародків в'юна**

Зародки в'юна у стадії двох і шістнадцяти бластомерів та на 6-ій годині розвитку фіксують 1,5 % розчином глутарового альдегіду в 0,2 М какодилатному буфері (рН 7,2) при температурі +4 °С, протягом години. Зразки промивають какодилатним буфером і додатково фіксують 2 % розчином чотирьохокису осмію в тому ж буфері протягом години ( $t^{\circ} = +4$  °С).

Потім препарати відмивають від фіксаторів і обезводнюють у зростаючих концентраціях етилового спирту (50 %, 70 %, 90 % і 100 %). Додатково обезводнюють у двох змінах окису пропілену і поміщають в епоксидну смолу епон-812 (Б. Уикли, 1975).

Зрізи готують на ультрамікротомі УМТП-6 за допомогою алмазного ножа, контрастують 2 % розчином ураніацетату протягом 15 хв і додатково цитратом свинцю за Рейнольдсом (E.S. Reynolds, 1963).

Зрізи переглядають і фотографують за допомогою електронного трансмісійного мікроскопа ПЕМ-100.

## **2.7. Зміни ТМП в процесі раннього розвитку в'юна, пов'язані з тривалістю клітинних циклів**

Дані про періодичні коливання ТМП під час поділів бластомерів у різних тварин (В.П. Божкова и др., 1971, 1974; D.J. Woodward, 1965; И.Ш. Квавилашвили и др., 1971) дзасвідчують чіткий взаємозв'язок змін електричних характеристик мембрани з мітотичною активністю клітин ембріонів. Цей феномен носить універсальний характер, але природу його не можна звести тільки до процесів перерозподілу йонів на мембрані бластомерів (К.А. Кафiani, А.Г. Маленков, 1976), оскільки коливання їхніх концентрацій визначають не тільки за пасивною дифузією, але й за активним транспортуванням через мембрани. На жаль, до сьогоднішнього дня не одержано



результатів про коливання  $[K^+]$  і  $[Na^+]$  протягом мітотичних циклів бластомерів. Немає також переконливих даних щодо частоти коливань ТМП у зародків в'юна й інших тварин при зміні темпу синхронних дроблень бластомерів. Тому нами було проведено визначення безперервної динаміки ТМП при нормальному ранньому розвитку зародків в'юна, його прискоренні або затримці, пов'язаній з температурою, а також при модифікації цитостатиком - колхіцином.

Зміни ТМП зародків в'юна, що розвиваються нормально, носять коливальний характер при поступовому наростанні його абсолютних величин (рис. 2.20). Період кожного коливання становить 30–32 хв і відповідає величині  $\tau$ , що виражає тривалість клітинних ділень або мітозів під час синхронного дроблення бластомерів при температурі  $+21\text{ }^\circ\text{C}$  (Г.М. Игнатъева, А.А. Костомарова, 1966) Завдяки застосованій нами методиці, вдалося одержати безперервну криву динаміки ТМП зародків в'юна протягом сім–вісім годин їхнього розвитку від моменту запліднення. Водночас виявлено, що впродовж перших п'яти годин розвитку ТМП міняється фазно, то збільшуючись, то зменшуючись з періодом в 31,5 хв, і стрибкоподібно наростаючи від величини  $-8 \div 12$  мВ (стадія 2–4 бластомерів) до  $-66 \div -68$  мВ (стадія ранньої бластули). Після п'яти годин від початку запліднення починає виявлятися деяка десинхронізація і подовження періоду ТМП, а після шести годин – зниження абсолютних величин ТМП на 40–50 %. Протягом дальших 30–40 хв ТМП характеризується значною варіабельністю, а потім повертається до величин  $-55 \div -60$  мВ, і утримується на цьому рівні, але без виражених періодичних коливань.

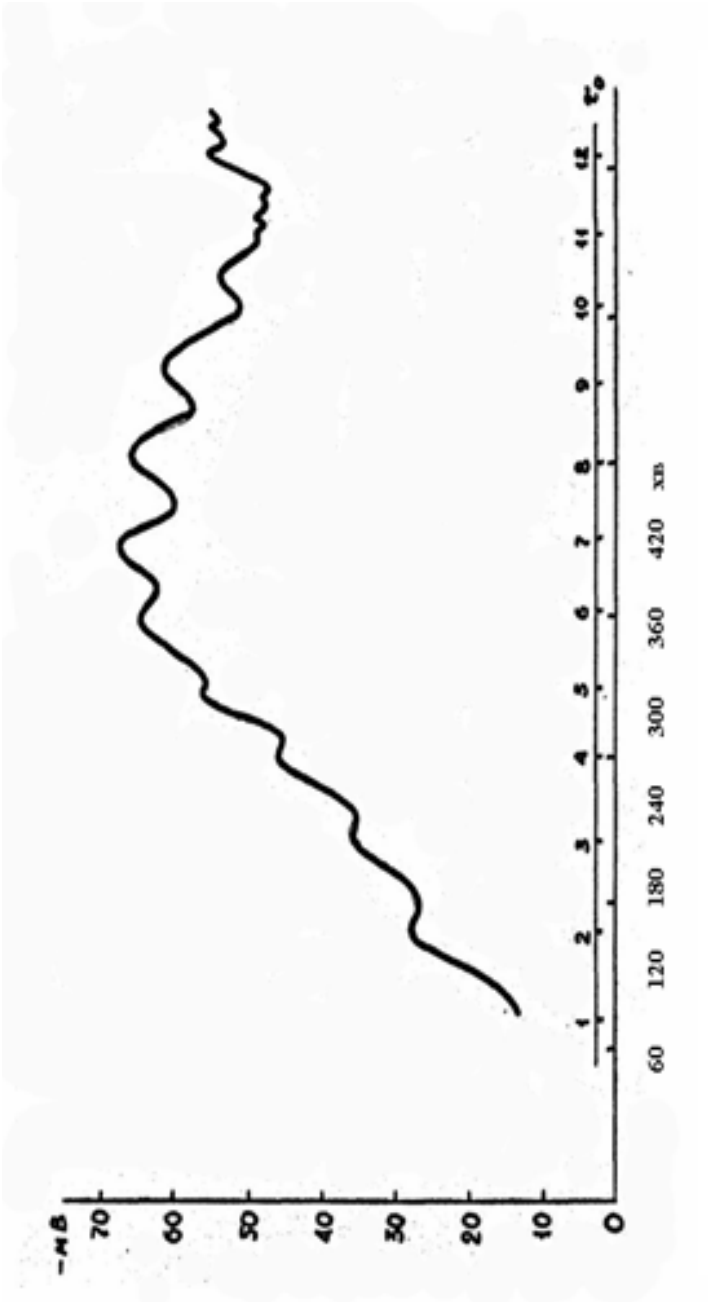


Рис. 2.20. Зміна ТПМ протягом періоду синхронних дроблень бластомерів і формування морули при нормальному розвитку зародків в'юна

Отже, нами виявлений цікавий феномен відображення в динаміці ТМП характерних подій раннього ембріогенезу в'юна, циклічно змінних при мітозах бластомерів залежно від інтенсивності метаболічних процесів, що мають, ймовірно, до генерування ТМП безпосереднє відношення. Щоб переконатися в зв'язку коливань ТМП з темпом дроблення бластомерів, було проведено таку серію дослідів.

## **2.8. Вплив температури інкубаційного середовища на ритміку ТМП у зародків в'юна, що розвиваються**

Як видно з поданих нами результатів (рис. 2.21), температура інкубаційного середовища має істотний вплив на тривалість періодів коливань ТМП. Так, у допустимому діапазоні для нормального розвитку зародків в'юна при температурі  $+17-24\text{ }^{\circ}\text{C}$  знайдено розтягання тривалості мітотичного циклу синхронних дроблень бластомерів приблизно в два рази. При температурі  $+17\text{ }^{\circ}\text{C}$  тривалість  $\tau_0$  становить 44–46 хв (рис. 2.21, крива 1), а при  $+24\text{ }^{\circ}\text{C}$  – 25–26 мВ (рис. 2.21, крива 3). При всіх досліджуваних температурах після  $10\tau_0$  спостерігається характерний спад і підйом величини ТМП. Надалі його зміни носять неперіодичний характер, ритм коливань значно збільшується, проте амплітуда їхня при цьому зменшується.

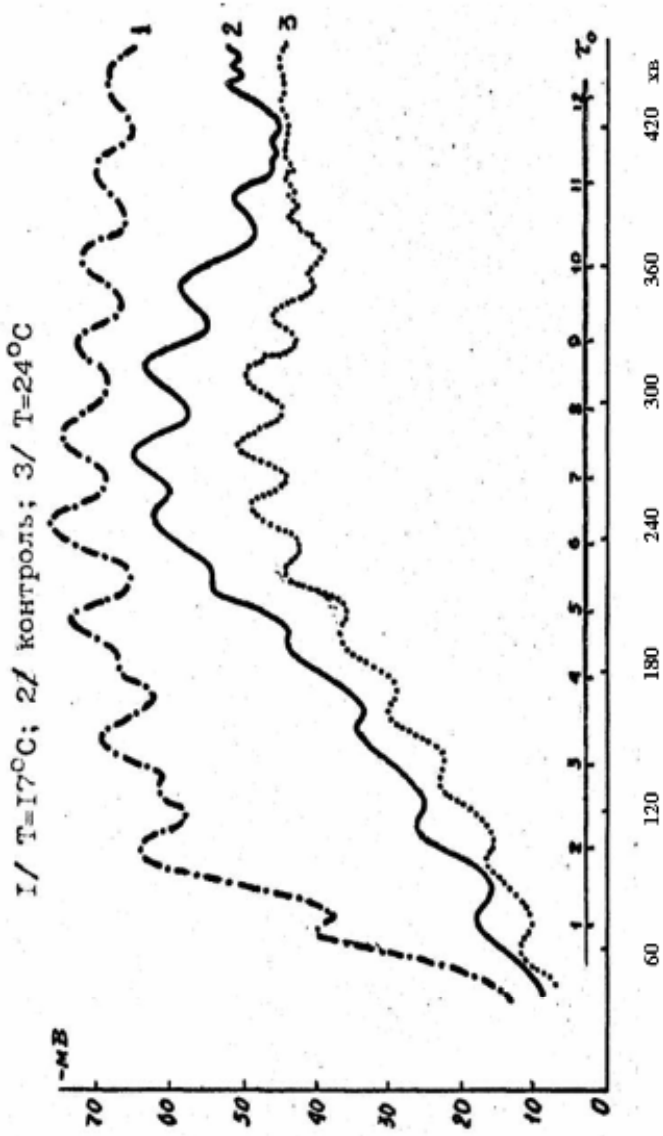


Рис. 2.21. Зміни ТМІ зародків в'юна, що розвиваються під впливом різних температур

Важливим є також факт зміни рівня ТМП від температури. Якщо величини ТМП при температурі  $+21\text{ }^{\circ}\text{C}$  (рис. 2.21, крива 2) прийняти за середній рівень, то пониження температури до  $+17\text{ }^{\circ}\text{C}$  (рис. 2.21, крива 1), починаючи вже з першої години розвитку зародка, спричиняє підвищення його величин у середньому на  $20\div 25\text{ мВ}$ . Отже, в цьому разі чітко простежується ефект гіперполяризації мембрани на початкових етапах розвитку зародка. Крім того, при швидкому пониженні температури інкубаційного середовища до нижньої межі оптимального діапазону перед другим і третім поділами нами виявлено появу додаткових піків у загальній коливальній динаміці ТМП, що може бути пов'язано з перебудовою певних ланок метаболізму, що імітують більш сповільнений темп синхронних дроблень бластомерів. Явище це у зародках в'юна зауважено вперше.

Цікаво відмітити, що температура інкубаційного середовища  $+17\text{ }^{\circ}\text{C}$  є ближчою до температур, при яких зародки в'юна розвиваються в природних умовах. Через чотири години після запліднення різниця в абсолютних величинах ТМП при  $+17\text{ }^{\circ}\text{C}$  і  $21\text{ }^{\circ}\text{C}$  не перевищує  $5\text{--}9\text{ мВ}$ . При підвищенні температури до  $+24\text{ }^{\circ}\text{C}$  (рис. 2.21, крива 3) абсолютні величини ТМП щодо середнього рівня знижуються на  $8\text{--}10\text{ мВ}$ , але загальна динаміка ТМП аналогічна контролю ( $+21\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Важливо підкреслити, що  $\tau_0$  – тривалість протікання мітотичних циклів упродовж періоду синхронних дроблень бластомерів, які визначали при цих же температурах цитологічними методами (Г.М. Игнат'єва, А.А. Костомарова, 1966;

Г.М. Ігнат'єва, 1979; Н.Н. Ротт, 1980 ), збігається з періодами коливань рівня ТМП, одержаними в наших дослідках. Отже, період коливання ТМП своєрідно дублює тривалість мітотичного циклу і може служити інтегральним показником темпу чергування процесів посилення метаболізму у фазі "S" бластомерів, що синхронно діляться.

## **2.9. Вплив біологічно активних речовин на йонні градієнти, транспортні властивості мембран і величину ТМП**

Вплив біологічно активних речовин на проникність плазматичних мембран і активне транспортування через них іонів найдетальніше досліджено на прикладі інсуліну й альдостерону. Вивчення впливу інсуліну на активне транспортування іонів у мембранах тих або інших клітин ускладнюється тим, що на сьогодні залишається не встановленим справжній механізм його дії на клітини.

Якщо виходити з уявлень, що інсулінрецепторний комплекс плазматичної мембрани в результаті ендцитозу може упроваджуватися всередину клітини, тобто інтерналізуватися (С. Kahn, N. Baird, 1978), то можна припускати пряму залежність передислокації в клітині низки катіонів, насамперед калію і натрію, від гормонального впливу. Правда, щодо дії гормонів на клітинний йонний гомеостаз і залежний від нього рівень ТМП, немає єдиної думки. Так, дія, яку має інсулін на клітини м'язів діафрагми щура,

що супроводжується підвищенням потенціалу спокою (Д. Унагар, 1959), дає підстави вважати, що тут відбувається накопичення внутрішньоклітинного калію і викиду натрію назовні (M.D. Resh et al., 1980), або опосередкована його дія через  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  або  $\text{Na}^+/\text{OH}^-$  обмін (R.D. Moore, 1983).

Окрім цього, відомі й інші дані, що засвідчують взаємозв'язок гормональних дій з іонним обміном клітин, генеруванням на їхніх мембранах ТМП, але інтерпретація результатів багатьма авторами дуже неоднозначна. Це стосується зміни коефіцієнта Хілла під впливом інсуліну і гідрокортизону для ферментативних процесів, які мають пряме відношення до властивостей мембран і мембранних ліпідів (E.M. Massa et al., 1975), до різного ступеня включення Р у білки жирових клітин і субклітинних фракцій щурів під впливом інсуліну та адреналіну, як наслідки різного ступеня поляризації мембран (W.B. Benjamin, J. Singer, 1975), до відокремлення ауксином (10 М) катіонселективної здатності мембран рослинних клітин (E. Muller, A. Nells, 1977).

Дія інсуліну на клітину призводить до зміни її фізіологічних властивостей, що стосуються проникності для йонів. Відомо, що інсулін змінює поляризацію клітинної мембрани і транспортування катіонів, зменшуючи активний вхід і пасивний вихід калію з клітини, підвищує швидкість напівобміну натрію і швидкість фракції калію, що обмінюється. За наявності інсуліну, потенціал спокою підвищується на 6 мВ, а вхідний опір до 37 В (О.А. Мартыненко, 1977). Зміщення потенціалу спокою залежить

від кількості інсуліну, що вводиться, що, до речі, відмічено і в наших дослідженнях (С.И. Кусень и др., 1980), а також від віку тварини (В.В. Фролькис и др., 1976; О.А. Мартыненко, 1977).

Окрім вказаних ефектів впливу гормонів на йонне транспортування, є низка робіт з вивчення їхнього впливу на метаболічну активність, зокрема, на макромолекулярні синтети в клітинних системах, які мають непряме відношення до потенціалгенеруючої здатності (О.С. Клименко, 1974; В.В. Фролькис, 1980).

У роботах Фролькіса (1980) описано, що при активуванні біосинтезу білка статевими стероїдами, інсуліном, гідрокортизоном, при регенеруванні і крововтраті, в різних клітинах (печінка, серце, скелетний м'яз) розвивається гіперполяризація клітинної мембрани. Інгібітори біосинтезу білка попереджають розвиток гіперполяризації мембран клітин печінки (В.В. Фролькис, 1980). У цій роботі використані актиноміцин Д і циклогексімід, що діють на різних рівнях макромолекулярних синтезів (Т. Obrig et al., 1971; И.П. Ашмарин, А.А. Ключарев, 1975; С.М. Новашин и др., 1977). На сьогоднішній час достатньо повно вивчений механізм дії деяких інгібіторів макромолекулярних синтезів, зокрема, актиноміцину Д, циклогексіміду і пуроміцину. Цей факт був використаний нами при дослідженні ТМП, оскільки він дає змогу проаналізувати участь основних ланок метаболічних систем клітин у потенціалгенеруючій здатності мембран, що реалізується через концентраційні градієнти електрогенних іонів.



## **2.10. Проблема гормонального регулювання обміну речовин у ранньому ембріогенезі**

Серед механізмів, за допомогою яких реалізується спадкова програма індивідуального розвитку організму, є й гормональне регулювання. Дослідження і виявлення його ролі в багатогранних процесах онтогенезу є одним з актуальних розділів біології розвитку.

Одержані останнім часом дані дають підстави вважати, що гормональне регулювання обміну речовин у тваринних організмах виражене вже на ранніх стадіях ембріонального розвитку. Так, доведено наявність деяких функціонально активних факторів гормональної природи в зародках тварин (H.W. Burden, J.E. Lawrence, 1973; Г.А. Бузников, 1970; С.И. Кусень и др., 1979). Відомо, що в зрілих незапліднених яйцеклітинах морського їжака і в'юна є адреналін і норадреналін, причому кількість їхня істотно варіює (Г.А. Бузников, 1967). У перші 20–40 хв після запліднення концентрація обох катехоламінів наближається до нуля, а згодом зазнає значних коливань. Можна припустити, що біологічно активні речовини виконують важливу регуляторну роль у процесах раннього ембріогенезу, доказом чого може служити здатність речовин-антагоністів цих з'єднань специфічно блокувати цитогенез (Г.А. Бузников, 1971; 1977). Передбачають, що речовини ці беруть участь у процесах клітинного поділу як пускові агенти і як фактори, що мають відношення до синтезу і підтримування ультраструктури апарату ділення, до регулювання білкового

синтезу через забезпечення активного стану цитоплазматичних мембран клітин. Їхні функції, згідно з думкою Г.А. Бузникова (1971) здійснюються не на рівні макромолекулярних синтезів, а на рівні регулювання проникності клітинних мембран для низки речовин, безпосередньо білків, що беруть участь у біосинтезі.

Необхідно зазначити, що відповідно до деяких повідомлень, у ранньому ембріогенезі ссавців є можливість синтезу стероїдних гормонів. Так, виявлені ключові ферменти стероїдогенезу  $\Delta 53\beta$ -гідроксистероїддегідрогенази, встановлено здатність екстрактів бластоцист синтезувати холестерин і прегненолон з оцтовокислого натрію (R.L. Huff, K.B. Vik-Hes, 1966), ідентифіковано в бластоцистах кролика кінцеві продукти стероїдогенезу – естрадіол - $17\beta$  (Z. Dickmann et al., 1975) і деякі інші стероїди.

Що стосується гормонів поліпептидної структури, то наявність їхня в зародках на початкових етапах розвитку і в яйцеклітинах точно невідома. Тим часом, на підставі деяких експериментальних даних передбачають наявність у зародках в'юна інсулінзалажних процесів (С.И. Кусень и др., 1978 ). Відносно раннє виявлення гормонів поліпептидної структури в тканинах внутрішньої секреції, що диференціюються, встановлено на різних об'єктах (W. Clark, J. Rutter, 1972).

Питання про роль пептидних і білкових гормонів на початкових етапах розвитку становить великий інтерес, оскільки згідно з уявленнями, саме таким гормонам і гормоноподобним речовинам належить головна роль у регулюванні диференціювання клітин (J. Zapf et al., 1978). Правда, все, що

відомо з цього питання, то це дані, які стосуються впливу інсуліну й інсуліноподібних речовин на вже диференційовані клітини. Проте важко уявити собі, що на етапах раннього розвитку, коли відбувається дуже бурхливе ділення клітин, не задіяні ці могутні регуляторні фактори. Адже відомо, наприклад, що для проліферації клітин у тканинних культурах їхнє інкубаційне середовище має включати інсулін або сироватку крові, що містить цей гормон і інші поліпептидні компоненти. До речі, виділена група т. зв. факторів росту, дуже близьких за своїм складом і характером дії до інсуліну (J. Zapf et al, 1978).

Окрім питання про наявність у зародках на ранніх етапах їхнього розвитку регуляторних з'єднань і, частково, гормонів, постає питання про наявність в їхніх клітинах рецепторів до гормонів, про компетентність їхню до цих ефекторів. За останній час одержано дані про те, що навіть до одного і того ж гормону може бути кілька класів рецепторів (J. Zapf et al., 1978 ).

Низка гормонів може здійснювати свій регуляторний ефект на обмін речовин у зародках, що розвиваються, за допомогою системи цАМФ. Встановлено, що відразу після запліднення ікринок морського їжака відбувається збільшення концентрації цАМФ у десять разів, порівняно з його кількістю в незапліднених яйцеклітинах. Проте цитокінез, пов'язаний з первинним дробленням, супроводжується різким зменшенням вмісту цього нуклеотиду. Аналогічне зниження рівня цАМФ у зародках спостерігається також при другому і третьому поділах (J. Yasumasu et al., 1973). Можливо, що ці зміни пов'язані з гормональним статусом клітин у процесі початкових етапів

розвитку або мають до неї певне відношення (Б.Н. Лейбуш, В.М. Бондарева, 1981). Важливим є також встановлення ефектів впливу гідрокортизону й інсуліну на активність деяких ферментів не тільки на початкових етапах розвитку, але навіть у незапліднених яйцеклітинах в'юна (С.Й. Кусень, П.С. Олешко, 1974; С.И. Кусень и др., 1974 а, б; 1975).

Отже, можна вважати, що дуже цікаві питання, стосуються гормонального регулювання на початкових етапах ембріогенезу, залишаються маловивченими. На сьогодні можна робити припущення про різний набір фактів, які важко піддаються побудові прийнятних гіпотез. І водночас такі дані вкрай необхідні для встановлення ролі цих сполук у процесах раннього розвитку, а в ширшому плані, для розуміння тих механізмів, які лежать в основі диференціювання клітин.

Відомо, що інсулін стимулює синтез глюкокінази, збільшує активність фосфофруктокінази, піруваткінази, пригнічує синтез ферментів гліоконеогенезу (Л.С. Мильман, Ю.Г. Юровицкий, 1973).

Цікаво, що при сумісній дії на динаміку ТМП таких гормонів, як адреналін у концентрації  $5 \cdot 10^{-3}$  М та інсулін у концентрації 0,5 МО/мл (МО – міжнародних одиниць), спостерігається характер динаміки мембранного потенціалу, аналогічний до норми, чого не відбувається під впливом кожного з гормонів окремо (Е.А. Гойда и др., 1986; Д.И. Санагурский и др., 1982; 1983). Автори (Д.И. Санагурский и др., 1982) припускають, що, ймовірно, ці гормони запускають у дію системи протилежного регуляторного напрямку. Ефект зняття інсуліном

деполяризуючого впливу адреналіну може ґрунтуватися на змінах функціонування йонтранспортних систем. Добре відомо про вплив інсуліну на ці системи у диференційованих клітинах (С.И. Кусень, Р.С. Стойка, 1985; М.Р. Czech, 1977). В огляді Мура (R.D. Moore, 1983) узагальнено дані про різноманітні транспортні системи, які можуть опосередковувати вплив інсуліну на перерозподіл іонів у клітині. Гормон збільшує активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази, та ця дія незалежна від білкового синтезу і відбувається при фізіологічних концентраціях інсуліну. Він також впливає на транспортування іонів кальцію, інгібуючи  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-азу, що веде до збільшення обміну іонів натрію на кальцій (R.D. Moore, 1983; N.E. Owen, M.L. Villereal, 1983).

Виявлено, що при гальмуванні мітозів цитостатиком колхіцином бракує параболічного росту рівня ТМП, характерного для контрольного досліду, але зберігаються його періодичні коливання з видовженим періодом та значно збільшеною амплітудою ніж у нормі (Е.А. Гойда, 1993; Е.А. Гойда и др., 1981). Відомі також повідомлення, що хвилі скорочення кортекса за цих умов відбуваються з тим самим ритмом, що й у нормі, а ізольований кортекс містить кальмодулін (М. Ishikawa, Т. Kohno, 1984)

Наведені факти засвідчують те, що динамічні зміни біоелектричних процесів у період раннього ембріогенезу тварин тісно спряжені з метаболічними процесами, що відбуваються в цитоплазмі, і теж характеризуються періодичністю. Ця спряженість, вочевидь, підтримується різними регуляторними факторами.

## 2.11. Дія колхіцину на величину і характер коливань ТМП зародків в'юна

Як описано попередньо, температурний фактор має великий вплив на темп дроблення бластомерів у в'юна. Було цікаво прослідкувати, як позначиться гальмування утворення нових мембран ембріональних клітин на генеруванні ТМП. Для цієї мети було використано колхіцин, який є хорошим цитостатиком (А.И. Зотин, 1961). Він інгібує процес розбіжності хромосом і утворення борозен і мембран нових клітин, не порушує при цьому перебігу інших основних ланок метаболізму в клітинах (А.И. Зотин, 1961).

У наших дослідях при концентраціях  $0,9 \cdot 10^{-3}$  і  $4,5 \cdot 10^{-3}$  М (рис. 2.22, криві 3, 2) колхіцин спричиняє початкову швидку гіперполяризацію мембрани, що утримується потім упродовж перших двох-двох з половиною год розвитку зародків. Разом з тим періодичні коливання ТМП, які простежувалися, мають більш розтягнутий за тривалістю період і збільшену амплітуду коливань, порівняно з контролем.

Потрібно відзначити і те, що в разі впливу колхіцину у зазначених концентраціях немає характерного для контролю спаду ТМП на шостій годині розвитку зародка. Мабуть, зародки в'юна не встигають виконати весь генетично запрограмований часовий план, який включає, очевидно, і певні метаболічні перетворення, впливають на потенціалгенеруючу систему клітин.

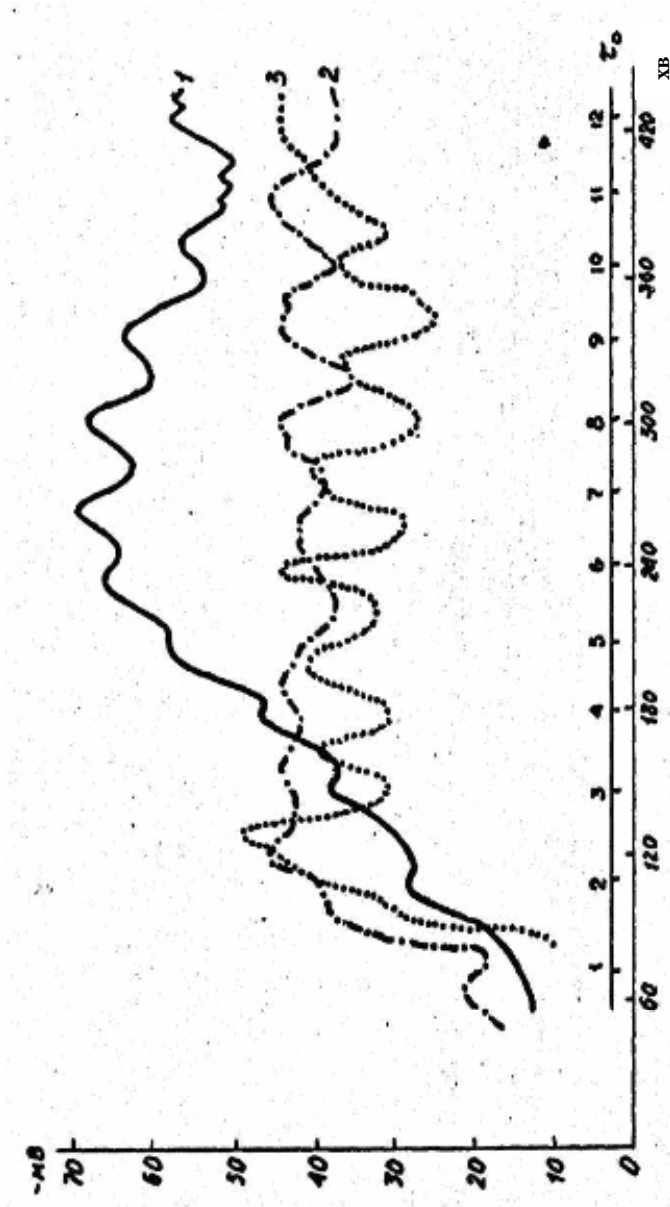


Рис. 2.22. Вплив різних концентрацій коліцину на динаміку ТМП зародків в юна, що розвиваються

Цікавим є те, що колхіцин усуває параболічне наростання величин ТМП, характерне для контролю. Це, швидше за все, пов'язано з постійною площею клітинних мембран, оскільки клітинне ділення гальмується.

Двогорбі ж піки при нижчих концентраціях (рис. 2.22, крива 2) колхіцину є частковим феноменом, якому немає переконливого пояснення. Щоправда, можна припустити, що в останньому прикладі певне значення має час поміщення зародків у середовище, що містить цитостатик.

Отже, колхіцин, не усуваючи періодичних коливань, обмежує ТМП у максимальних величинах тих, що не перевищують  $-35 \div 10$  мВ. Ураховуючи обставину, що основні обмінні реакції ембріональних клітин мало порушуються колхіцином (А.И. Зотин, 1961), можна припустити, що спостережувані при його дії коливання ТМП є своєрідним віддзеркаленням запущених актом запліднення періодичних змін інтенсивності синтетичних процесів у цитоплазмі, які швидко змінюються один за одним відповідно до мітотичних циклів бластомерів зародків в'юна, що дробляться в нормі. Щоб упевнитися в цьому, нами була зроблена спроба визначити динаміку ТМП у зародків в'юна при дії на них деяких біологічно активних речовин з відомими точками впливу, що призводить до пригнічення або активування окремих ланок обміну речовин у клітині.



## **2.12. Характеристика ТМП зародків в'юна за наявності в середовищі інкубації гідрокортизону**

Вплив гідрокортизону в концентрації  $1 \cdot 10^{-10}$  М на величину ТМП і його динаміку у зародків в'юна зображено на рис. 2.23, крива 2. Визначати ТМП почали після трьох годин після запліднення, а до цього зародки знаходилися в розчині, що містив гормон. У цьому варіанті досліді змінюється не тільки основний ритм періодичних коливань ТМП, порівняно з контролем (рис. 2.23, крива 1), але й знижується його абсолютна величина.

Відмічене нами раніше в контролі падіння величини ТМП після п'яти годин ембріогенезу, при дії гідрокортизону, зрушується за часовою шкалою і виражено як після шести годин розвитку. До того ж, максимальне значення ТМП ( $-55$  мВ) у разі дії гідрокортизону досягається через 330 хвилин після запліднення, тобто у момент відносно низького його значення при нормальному розвитку зародків.

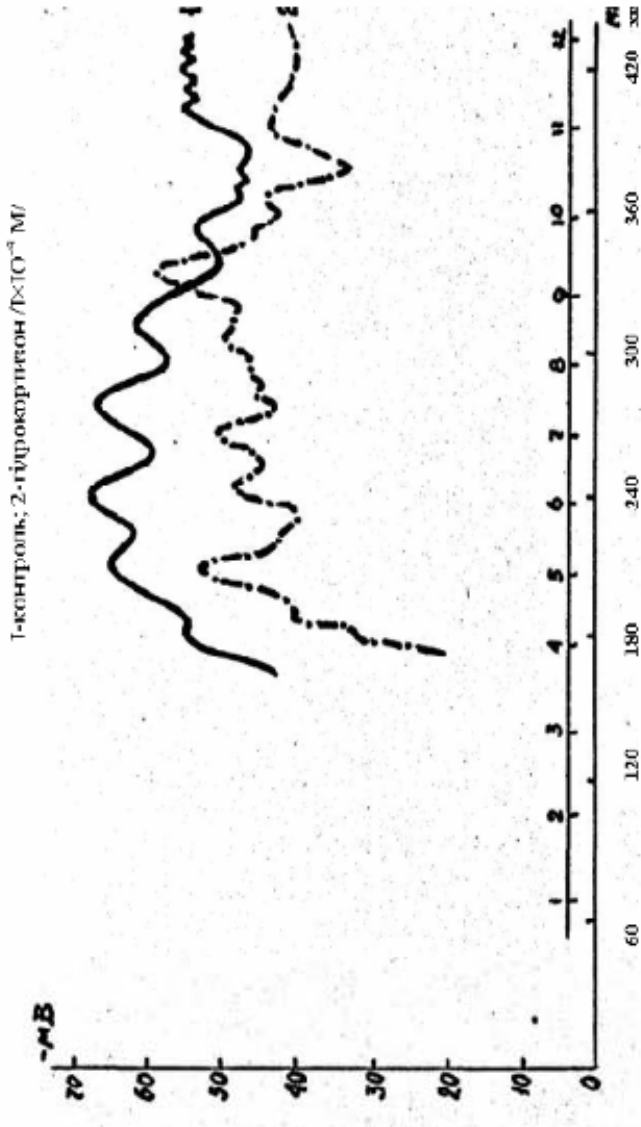


Рис. 2.23. Вплив гідрокортизону на ТМП зародків в'юна, що розвиваються

Таке зрушення коливальних величин ТМП є, мабуть, наслідком модифікації розвитку зародків в'юна гідрокортизоном. Це засвідчують також дані про зменшення під впливом гідрокортизону в зародках в'юна, активності деяких ферментів (С.Й. Кусень і ін., 1974).

Крім того, при дії гідрокортизону спостерігається аперіодична поява зубців на кривій зміни ТМП, що не виявляє особливої закономірності. Створюється враження, що гідрокортизон частково десинхронізує або затримує ділення бластомерів зародків в'юна вже на початкових етапах розвитку, що підтверджується візуальними і біохімічними спостереженнями (С.И. Кусень, П.С. Олешко, 1974).

### **2.13. Вплив різних концентрацій інсуліну на динаміку ТМП у ранньому розвитку в'юна**

Дані, одержані в серіях дослідів з інсуліном (рис. 2.24, криві 2, 3, 4), свідчать про специфічний вплив інсуліну на величину ТМП, що залежить від концентрацій гормону в середовищі. Так, при концентрації 0,1 МО/мл (рис. 2.24, крива 2) інсулін спричиняє значну гіперполяризацію мембрани, чітко виражену до кінця четвертої години розвитку зародків. Водночас зберігається ритміка коливальних ТМП, аналогічна тривалості періоду мітотичного циклу синхронних дроблень бластомерів, проте спостерігається деяке зрушення в настанні мінімумів і максимумів

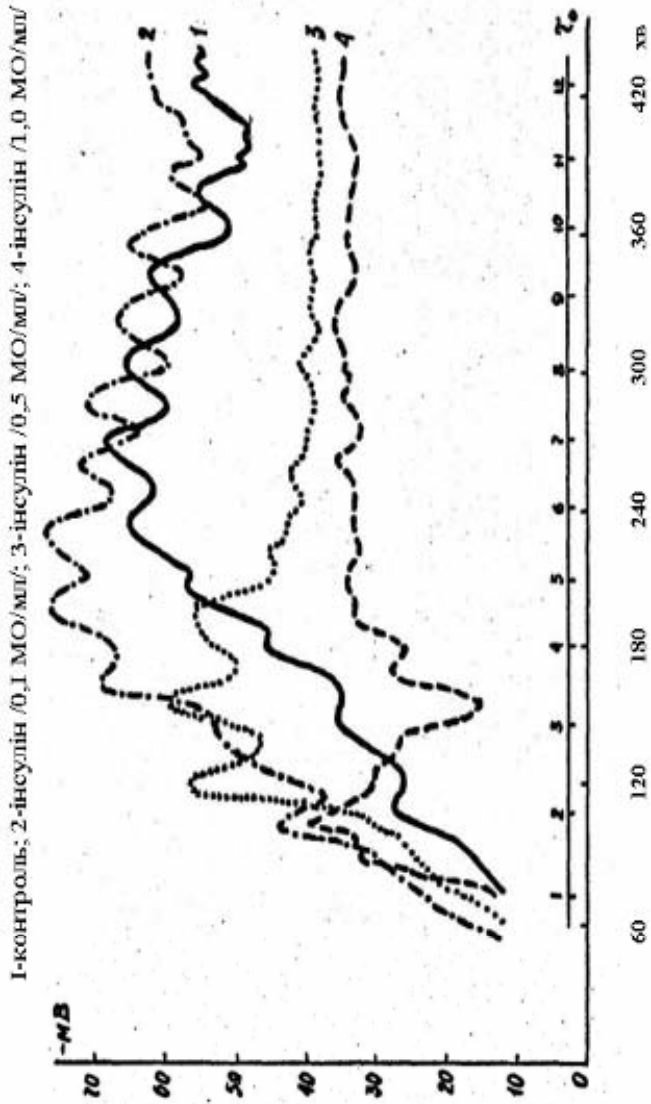


Рис. 2.24. Вплив різних концентрацій інсуліну на динаміку ТМШ у ранньому розвитку в'яона

коливань, хоча періоди й амплітуди наближаються до таких у нормі.

Зі зростанням концентрації гормону в середовищі інкубації зародків в'юна також має місце гіперполяризація мембрани протягом двох–трьох з половиною годин початкового етапу їхнього розвитку. Надалі рівень ТМП знижується, коливання зменшуються за амплітудою, а їхня чітка періодичність порушується. При концентрації гормону 0,5 МО/мл (рис. 2.24, крива 3) наростання ТМП є різкішим, ніж у нормі, але продовжується до двох з половиною годин після запліднення (у нормі до 4 год). Інсулін у концентрації 1,0 МО/мл (рис. 2.24, крива 4) ще різкіше змінює характер динаміки цього показника. Так, гіперполяризація мембрани через 1 годину і 40 хвилин від початку ембріогенезу змінювалася різкою деполяризацією, і в змінах рівня ТМП не виявляється характерної для норми ритміки коливань.

Привертає увагу і той факт, що зі збільшенням концентрації гормону в середовищі, період тривалості гіперполяризації клітинної мембрани скорочується. Ступінь гіперполяризації клітинної мембрани, залежно від кількості гормону в середовищі, при фіксованому часі можна ілюструвати таким чином (рис. 2.25). Сімейство кривих одержано шляхом трансформування результатів, які визначають вплив різних концентрацій інсуліну на динаміку ТМП зародків в'юна (рис. 2.24), що розвиваються.

З рис. 2.24 очевидно також, що зі збільшенням концентрації гормону в середовищі зменшується ступінь періодичності функцій,

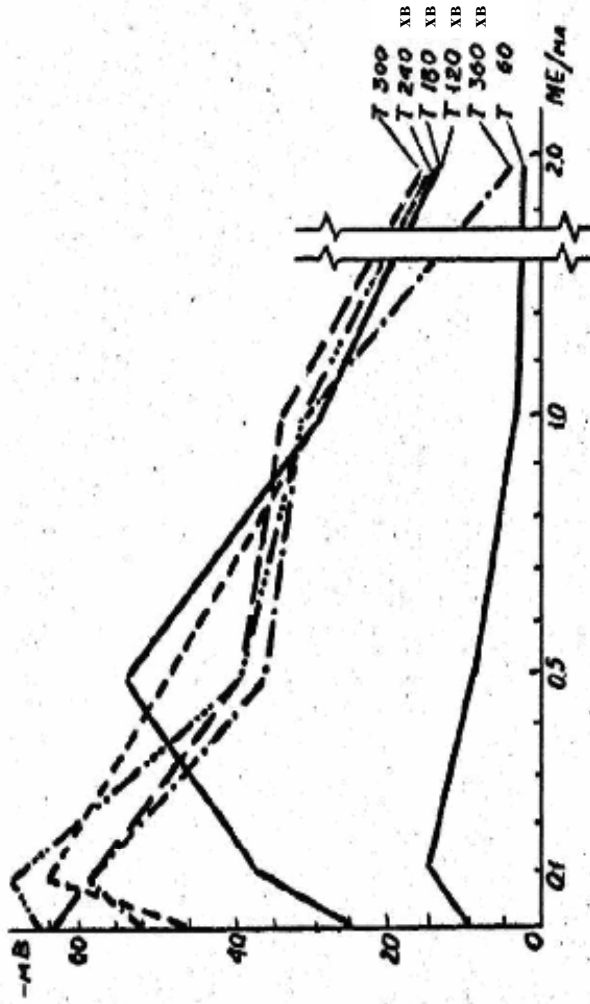


Рис. 2.25. Ступінь гіперполяризації клітинних мембран залежно від концентрації інсуліну в середовищі

які характеризують динаміку ТМП, а також середнє значення його впродовж досліджуваного проміжку часу.

Отже, наявна пряма залежність між концентраціями інсуліну в інкубаційному середовищі і ступенем відхилення динаміки ТМП у зародків в'юна, порівняно з нормою, що свідчить про істотний внесок у динаміку ТМП зародків в'юна тих ланок метаболізму клітин, які причетні до дії цих гормонів.

## **2.14. Зміни ТМП зародків в'юна під впливом адреналіну**

Коли в інкубаційному середовищі наявний адреналін (рис. 2.26, криві 2, 3, 4) в концентраціях відповідно  $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $5 \cdot 10^{-3}$  і  $5 \cdot 10^{-2}$  М, то деяке первинне наростання ТМП відбувається тільки до третього поділу, після чого спостерігається стабілізація його величини в межах  $-35 \pm 10$  мв. Характерно, що і в цьому разі, як і при дії інсуліну, має місце концентраційна зумовленість гормонального ефекту відносно динаміки ТМП не виявляється характерної для норми ритміки коливань. Окрім того, за наявності в середовищі інкубації адреналіну можна відзначити брак періодичності коливань ТМП, характерний для контролю, а також деяку початкову швидку гіперполяризацію мембрани при низькій концентрації адреналіну в середовищі ( $5 \cdot 10^{-5}$  М). Проте ця гіперполяризація є короткочасною і лише трохи перевершує рівень, якого ТМП досягає до цього часу в нормі.

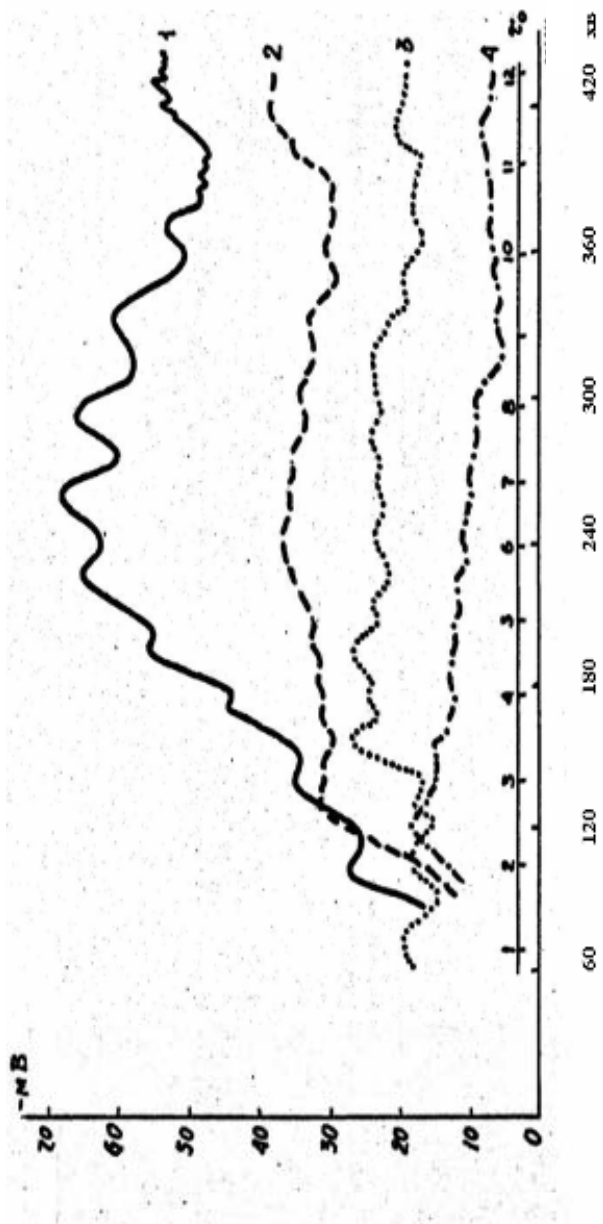


Рис. 2.26. Вплив різних концентрацій адреналіну на динаміку ТМП у данньому розвитку зародків в'юна



Слід зазначити, що при концентрації адреналіну  $5 \cdot 10^{-5}$  М після шести годин розвитку зародків, коли в контролі спостерігається характерний спад ТМП, нами виявлено повторне різке зростання його, але все-таки рівня контролю його величина не досягає.

Вищі концентрації адреналіну ( $5 \cdot 10^{-3}$  і  $5 \cdot 10^{-2}$  М) спричиняють значні порушення динаміки ТМП, що полягає не тільки в пропорційному зниженні абсолютних його значень, але також у згладжуванні періодичних коливань. Насправді, перші коливання ТМП, що окреслилися при цих концентраціях гормону, перебувають у профазі з такими в контролі. Останній приклад свідчить про те, що для прояву впливу адреналіну на досліджуваний параметр потрібен певний час (чим вища концентрація гормону в середовищі, тим швидше проявляється його ефект). Проте не виключено, що глибока деполяризація мембран зародків в'юна (до  $-10$  мВ) за наявності в середовищі адреналіну в концентрації  $5 \cdot 10^{-2}$  М пов'язана зі згубною для зиготи кількістю біологічно активної речовини в інкубаційному середовищі.

Вплив адреналіну на генерування ТМП у мембранах зародків в'юна істотно відрізняється не тільки від контролю, але і від картини, одержаної при дії різних концентрацій інсуліну.

Оскільки ефекти впливу інсуліну й адреналіну на динаміку ТМП якісно відрізняються, важливо було встановити характер їхньої сумісної дії на цей показник у зародків в'юна, що розвиваються.

## **2.15. Динаміка ТМП зародків в'юна, що розвиваються, при сумісній дії інсуліну та адреналіну**

За наявності в середовищі інкубації зародків в'юна суміші гормонів (інсулін 0,1 МО/мл + адреналін  $5 \cdot 10^{-3} \text{M}$ ) (рис. 2.27, крива 2), а також (інсулін 0,5 МО/мл + адреналін  $5 \cdot 10^{-3} \text{M}$ ) (рис. 2.28, крива 2) зміни ТМП багато в чому відрізняються як від норми, так і від індивідуальних ефектів цих гормонів. З одержаних даних стає очевидно, що при сумісній дії спостерігається деяке ослаблення окремих інсулінового й адреналінового ефектів. Так, якщо сам інсулін спочатку гіперполяризує мембрану (рис. 2.27, крива 3), адреналін в узятій концентрації веде до її деполяризації (рис. 2.27, крива 4), то при їхній сумісній дії (рис. 2.27, крива 2) первинна гіперполяризація зберігається лише частково, а деполяризація, спричинена самим адреналіном, не виявляється навіть на пізніших етапах розвитку зародків в'юна. До речі, подібний ефект часткової нормалізації інсуліном зрушень біохімічних параметрів, зумовлених іншими гормонами, спостерігається і в дослідженнях на диференційованих тканинах (Д.А. Сутковой, А.И. Альферов, 1978).

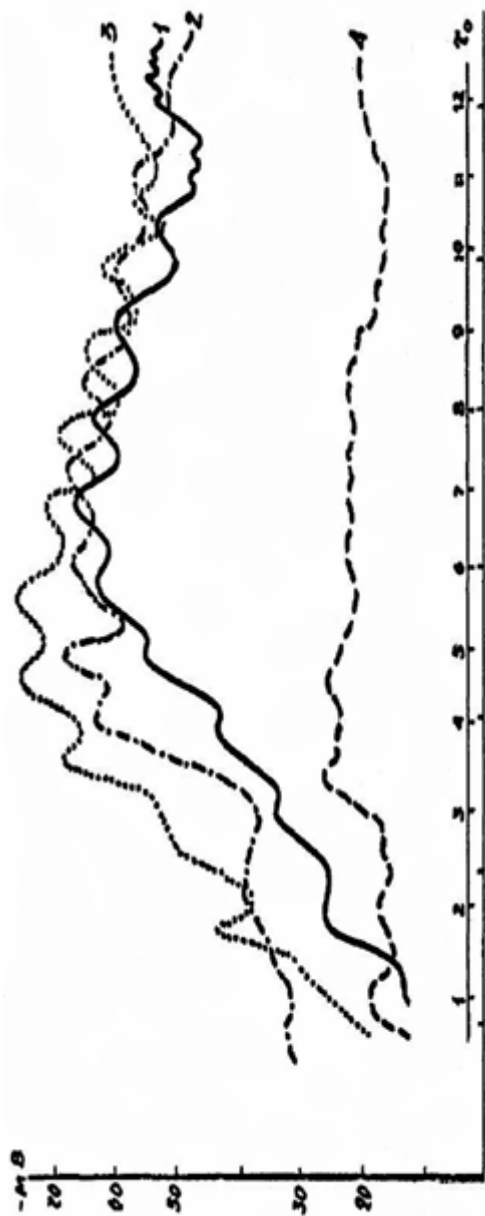


Рис. 2.27. Сумісний і індивідуальний вплив інсуліну й адреналіну на динаміку ТМП у зародків в'юна, що розвиваються:  
 1 – контроль; 2 – інсулін/ $0,1 \text{ МО/мл}$ / $+адреналін/5 \cdot 10^{-3} \text{ М}$ ; 3 – інсулін/ $0,1 \text{ МО/мл}$ ; 4 – адреналін/ $5 \cdot 10^{-3} \text{ М}$

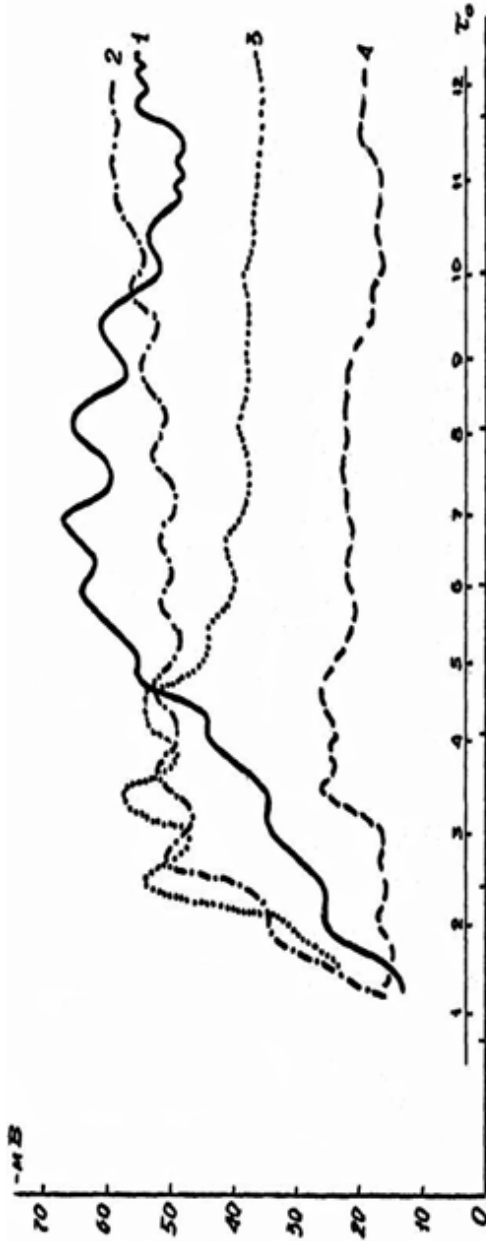


Рис. 2.28. Вплив інсуліну й адреналіну на динаміку ТМП у ранньому розвитку зародків в'юна:  
 1 – контроль; 2 – інсулін /0,5 МО/мл/; 3 – інсулін /0,5 МО/мл/ + адреналін /5·10<sup>-3</sup>М/  
 4 – адреналін /5·10<sup>-3</sup>М/

Привертає увагу той факт, що за наявності інсуліну відновлюється періодичність коливань ТМП, хоча частота їхня й амплітуда відрізняються від норми. За цих умов характерним є брак деполяризації, спричиненої інсуліном в концентрації 0,5 МО/мл після попередньої гіперполяризації (рис. 2.28, крива 2). Адже на початкових етапах розвитку в'юна не тільки немає сумування деполяризуючого ефекту обох використаних гормонів, а навпаки, відбувається наближення і навіть досягнення рівня норми. Все це дає підстави припускати, що двома гормонами запускаються в дію системи протилежного регуляторного характеру, які знаходять свій інтегральний вираз також у пізніші терміни дослідження.

Як і в попередній серії дослідів, у цьому разі також бракує характерного спаду ТМП після десяти поділів бластомерів, тобто на шостій годині розвитку зародків.

Отже, нами отримано результати, що засвідчують суттєві відмінності впливу комплексу гормонів від їхніх індивідуальних ефектів на потенціалгенеруючу здатність мембрани зародкових клітин. Насамкінець, це засвідчує певний антагонізм автономних гормональних феноменів відносно динаміки ТМП, генерування якого опосередковується пов'язаними з мембранами ферментними ланками клітинного метаболізму.

Ефект зняття інсуліном деполяризуючого ефекту адреналіну в наших дослідях, безумовно, ґрунтується і на йонтранспортних системах зародкових клітин, оскільки відомий вплив інсуліну на цю систему (М.Р. Czech, 1977).

## **2.16. Зміни динаміки ТМП зародків в'юна, що розвиваються, інгібуванням трансляції і транскрипції**

З літературних джерел відомо, що макромолекулярні синтези у низці прикладів ініціюються одно- і двовалентними іонами (Р.Г. Ахалкаци и др., 1970; А.С. Сирин, Л.П. Гаврилова, 1971; К.А. Кафиани, А.Г. Маленков, 1976). Оскільки ці іони відіграють провідну роль у генеруванні електричних потенціалів клітин, то дуже цікавим є встановлення загальних закономірностей динаміки ТМП у системах, що розвиваються, при інгібуванні істотних сторін біосинтезу макромолекул, а саме: транскрипції і трансляції антибіотиками специфічної дії.

## **2.17. Вплив актиноміцину Д на ТМП зародків в'юна**

Результати дослідів впливу актиноміцину Д на динаміку ТМП подано на рис. 2.29 (криві 2–4). Зрозуміло, що цей антибіотик у використаних нами концентраціях (10, 15 і 20 мкг/мл) майже не впливає на характер динаміки ТМП зародків. Простежується лише незначне зниження абсолютних величин досліджуваного показника. Це, ймовірно, пов'язано з тим, що актиноміцин Д блокує синтез РНК на стадії транскрипції, а під час перших п'яти годин розвитку зародків в'юна починається

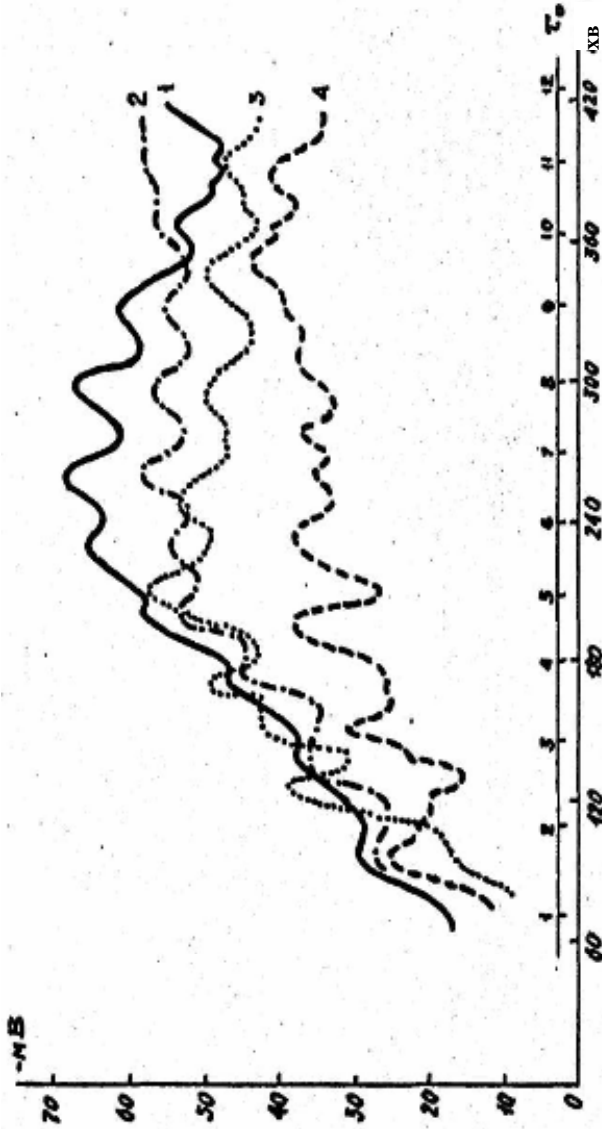


Рис. 2.29. Динаміка ТМП зародків в'юна під впливом різних концентрацій актиноміцину Д:  
 1 - контроль; 2 - актиноміцин Д / 10 мг/мл; 3 - актиноміцин Д / 15 мг/мл; 4 - актиноміцин Д / 20 мг/мл/

період т. зв. “ядерного мовчання” (А.А. Нейфах, 1959), коли ядерна транскрипція ДНК ще не реалізується в системі цитоплазматичних синтезів білків. Тому, мабуть, актиноміцин Д у концентрації 10 мкг/мл (рис. 2.29, крива 2) мало впливає на розвиток зародка загалом і, отже, на процеси, що позначаються на коливальній динаміці ТМП.

У разі збільшення концентрацій актиноміцину Д до 15 і 20 мкг/мл (рис. 2.29, криві 3, 4) в інкубаційному середовищі спостерігається його вплив на абсолютні величини ТМП при збереженні декількох розтягнутих коливань. Можливо, вищі концентрації антибіотика зачіпають частково і систему електрогенезу клітинних мембран зародків, а не тільки інгібують транскрипцію в ядрах. Не виключено, що разом з тим частково блокується в мембранах іонне транспортування, позначаючись на динаміці ТМП.

## **2.18. Зміни ТМП під впливом пуроміцину і циклогексїміду**

Під час дії на зародки циклогексїміду в концентрації 2,5 і 10 мкг/мл (рис. 2.30, криві 2, 3) простежується різке зниження величини ТМП і істотне порушення його півгодинних періодичних коливань. Як видно з рисунка, величина ТМП дуже низька із самого початку і прогресивно падає протягом всього експерименту, особливо за наявності в середовищі 10 мкг/мл циклогексїміду.



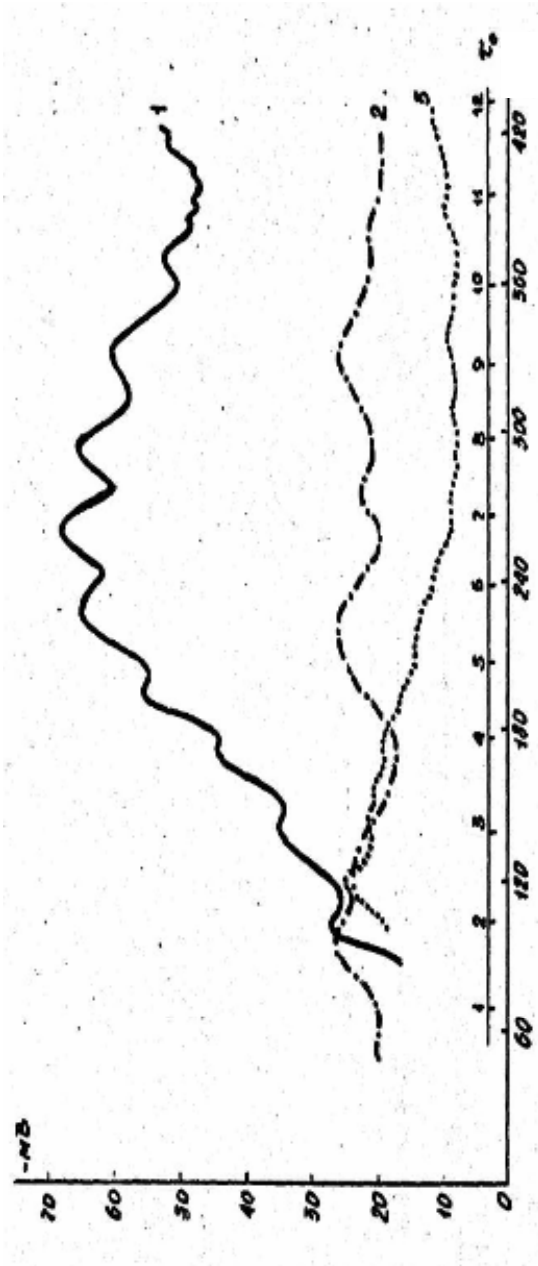


Рис. 2.30. Динаміка ТМП зародків в іона під впливом циклогексїміду:

1 – контроль; 2 – циклогексїмїд /2,5 мг/мл/; 3 – циклогексїмїд /10 мг/мл/

Аналогічні результати отримані і в дослідях з пуроміцином, який міститься в інкубаційному середовищі в концентрації 5,0 і 10 мкг/мл (рис. 2.31, крива 2, 3). Зауважимо, що при візуальному спостереженні за розвитком зародків у серіях з пуроміцином і циклогексїмідом було відмічено неправильне дроблення бластомерів і порушення нормального перебігу розвитку зародків.

З одержаних даних можна зробити висновок про істотний вплив інгібування трансляції на динаміку ТМП, що виражається в зниженні абсолютних величин його і у повній аперіодичності коливань.

## **2.19. Модифікація гормональних ефектів відносно динаміки ТМП зародків в'юна при інгібуванні у них трансляції і транскрипції**

Оскільки інсулін може впливати на транспортування йонів, змінюючи активність низки ферментів, зокрема,  $K^+$ ,  $Na^+$ -АТФази (М.Р. Czech, 1977), доцільно було перевірити опосередкованість цього ефекту через різні етапи синтезу білка. З цією метою вивчали вплив інгібування транскрипції і трансляції на інсуліновий ефект.

У першій серії дослідів вносили в середовище інкубації суміш гормону (1,0 МО/мл) і антибіотика актиноміцину Д (10 мкг/мл) (рис. 2.32, крива 2). Як видно з одержаних даних,

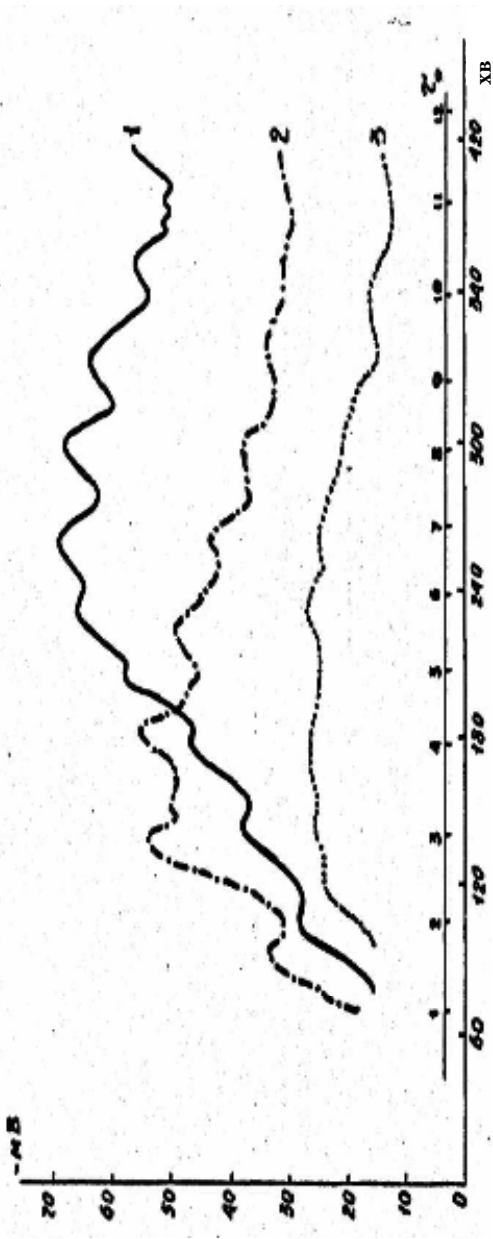


Рис. 2.31. Вплив різних концентрацій пуроміцину на динаміку ТМШ у зародків, що розвиваються:

1 – контроль; 2 – пуроміцин /5 мкг/мл/; 3 – пуроміцин /10 мкг/мл/

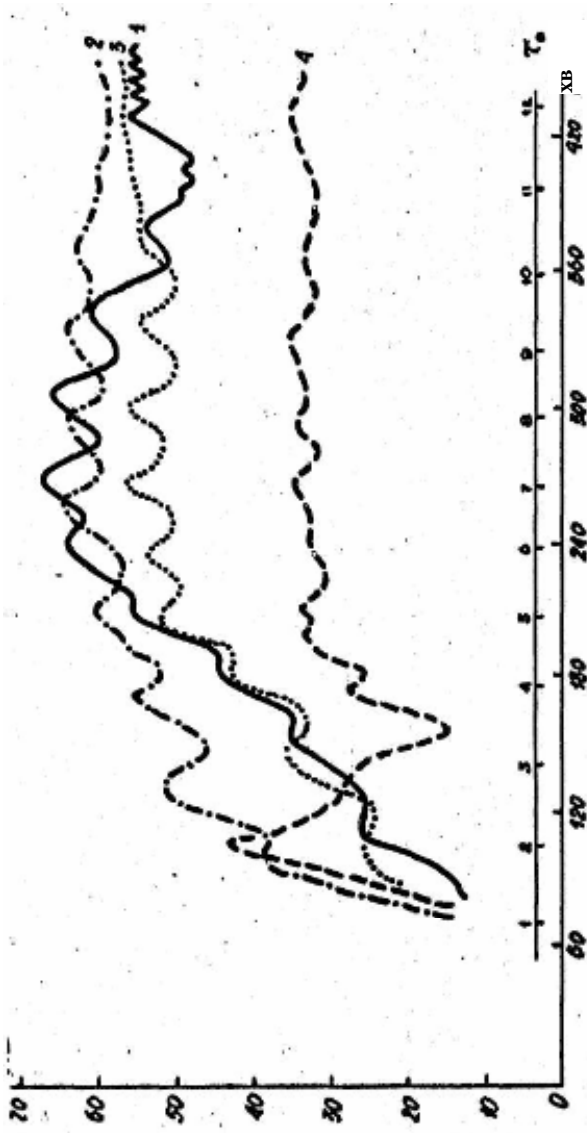


Рис. 2.32. Модифікація інсулінового ефекту на динаміку ТМТ у зародків в'юна, що розвиваються, при інгубуванні транскрипції актиноміцином Д:

1 – контроль; 2 – інсулін /1,0 МО/мл/+актиноміцин Д /10 мкг/мл/; 3 – актиноміцин Д /10 мкг/мл/ 4 – інсулін /1,0 МО/мл/

актиноміцин Д не позбавляє первинного ефекту гіперполяризації мембрани інсуліном, хоча дещо послаблює його концентраційну зумовленість, а надалі динаміка ТМП дуже нагадує картину, одержану нами за наявності в середовищі самого інсуліну в концентрації 0,1 МО/мл.

У іншій серії дослідів, коли в інкубаційному середовищі наявні інсулін у концентрації 0,1 МО/мл і циклогексїмід в концентрації 2,5 мкг/мл (рис. 2.33, крива 2), відновлення нормальної картини динаміки ТМП не спостерігається: коливання ТМП аперіодичні, абсолютні величини низькі. У третій серії цього циклу дослідів за наявності в інкубаційному середовищі адреналіну в концентрації  $1 \cdot 10^{-3}$  М і актиноміцину Д (10 мкг/мл) (рис. 2.34, крива 2), відбуваються зміни рівня ТМП у ранньому розвитку, порівняно з впливами окремо взятих початкових речовин. Якщо протягом перших трьох годин розвитку зародків актиноміцин Д частково знімає деполаризуючий ефект адреналіну, водночас відновлюючи амплітуди коливань ТМП, то надалі простежується чітко виражене підвищення самого рівня ТМП і наближення його до контрольних величин.

Значний прояв ефекту актиноміцину Д до кінця шостої години після запліднення, мабуть, пов'язаний з уже згадуваним попередньо на початкових етапах розвитку зародків періодом “ядерного мовчання”. Проте при “збуреному” стані, спричиненому дією адреналіну, інгібування транскрипції позначається на гормональному ефекті.

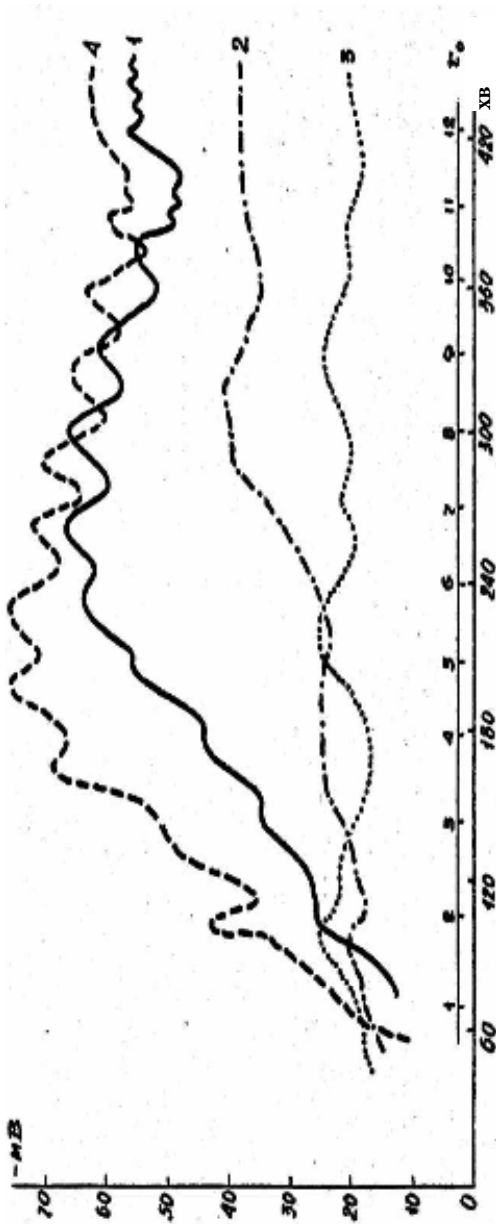


Рис. 2.33. Модифікація інсулінової дії на ТПМ зародків в'юна циклогексїдом:

1 – контроль; 2 – інсулін /0,1 МО/мл/+циклогексїд /2,5 мкг/мл; 3 – інсулін /0,1 МО/мл/ 4 – циклогексїд /2,5 мкг/мл/

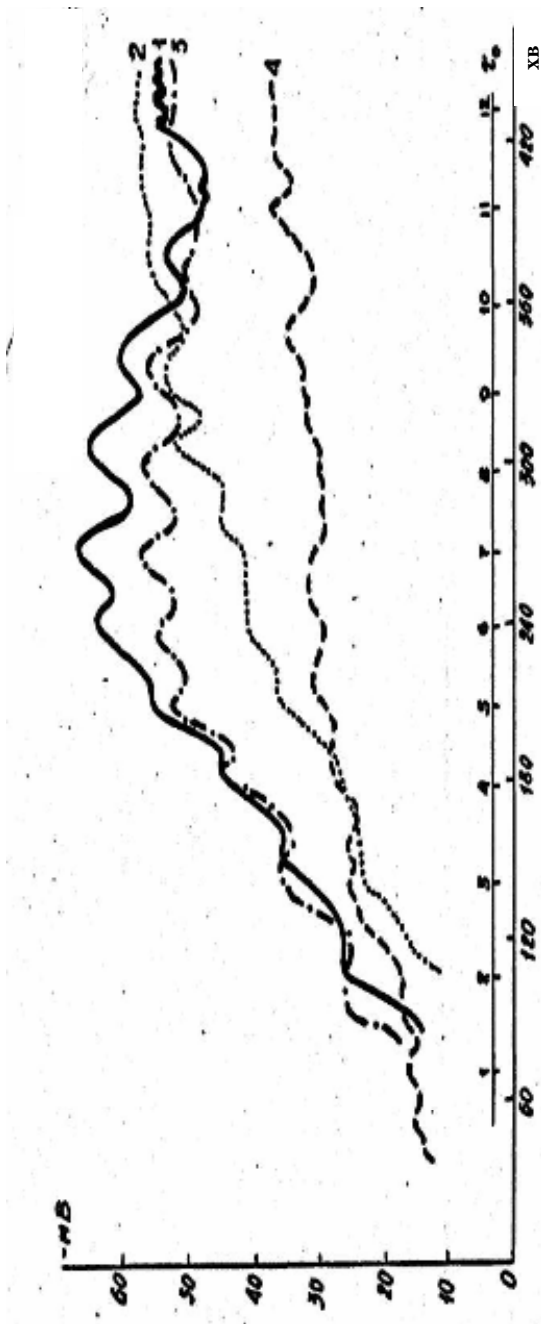


Рис. 2.34. Вплив інгібування транскрипції актиноцином Д на прозв ефекту адреналіну відносно рівня ТМІІ у ранньому розвитку в'юна:

1 - контроль; 2 - адреналін  $/1 \cdot 10^{-3}$  М+актиноцидин Д  $/10$  мкг/мл/;

Отже, можна вважати, що зміни величини ТМП у зародків в'юна, що розвиваються, тісно пов'язані з метаболічною активністю клітин, що стосується синтезу білка в бластомерах, які швидко дробляться. Правдивість такого висновку ми перевіряли на моделі, описаній нижче.



## **РОЗДІЛ 3. АНАЛІТИЧНІ МЕТОДИ АНАЛІЗУ КОЛИВАНЬ ТМП**

### **3.1. Спектральний аналіз періодичних коливань ТМП зародків в'юна у нормі та за умов впливу катіонів важких металів**

Спектральний аналіз коливань трансмембранного потенціалу зародків в'юна на ранніх етапах ембріогенезу дає можливість визначити, наскільки змінюється частота коливань ТМП за умов впливу катіонів важких металів, порівняно з контролем.

Частотні спектри (періодограми) коливань ТМП отримували за допомогою пакета прикладних програм STATGRAPHICS 2.6.

На рис. 3.1 зображено спектр частоти коливань ТМП зародків в'юна, які розвивалися в нормальних умовах (контроль).

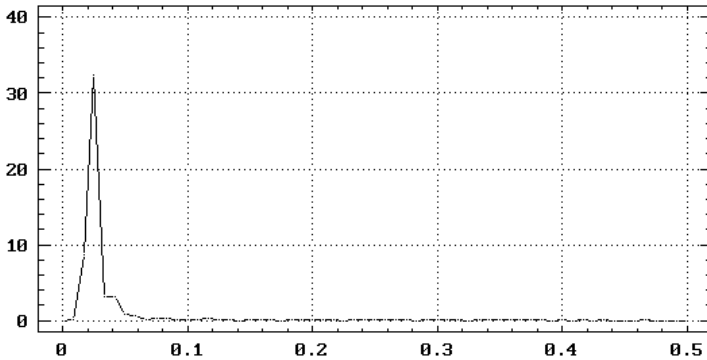
Оскільки на цьому графіку наявний тільки один досить вузький пік, можна зробити висновок, що в динаміці коливань ТМП зародків в'юна в нормі превалюють коливання тільки однієї частоти. Пік припадає на 0,041 періоду інтервалу квантування. Оскільки інтервал квантування в нашому прикладі становив 1,25 хв, можна вирахувати період коливань, які превалюють в контролі. Він становить:  $1,25 \cdot 1/0,04 = 30,5$  хв.



Рис. 3.1. Спектр частоти коливань ТМП зародків в'юна в нормі

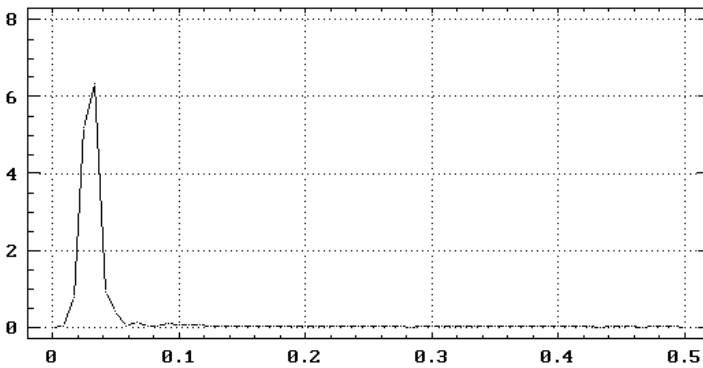
На рис. 3.2–3.3 зображені спектри частоти коливань ТМП зародків в'юна за умов впливу катіонів нікелю в концентрації  $10^{-6}$  та  $10^{-5}$  М. Пік частот при дії катіонів нікелю в концентрації  $10^{-6}$  М припадає на 0,021 періоду на інтервал квантування, а отже, період коливань у цьому разі становить 59,5 хв.

У разі дії катіонів нікелю в концентрації  $10^{-5}$  М пік є досить широким, його верхівка припадає на значення шкали 0,02–0,035 періодів на інтервал квантування. Це означає, що період коливань у цьому разі не є постійним і варіює від 38 до 62,5 хв.



Частка періоду / інтервал квантування

Рис. 3.2. Спектр частоти коливань ТМП зародків в'юна за умов впливу катіонів нікелю в концентрації  $10^{-6}$  М



Частка періоду / інтервал квантування

Рис. 3.3. Спектр частоти коливань ТМП зародків в'юна за умов впливу катіонів нікелю в концентрації  $10^{-5}$  М

Спектральний аналіз цих коливань дає можливість порівняти періоди коливань ТМП зародків в'юна в контролі та внаслідок впливу катіонів важких металів і зробити висновок, що вплив катіонів нікелю спричинює значне збільшення періоду коливань ТМП – приблизно в два рази, порівняно з контролем.

На рис. 3.4–3.5 зображено спектри частот коливань ТМП зародків в'юна за умов впливу катіонів кобальту в концентраціях  $10^{-5}$  М та  $10^{-4}$  М.

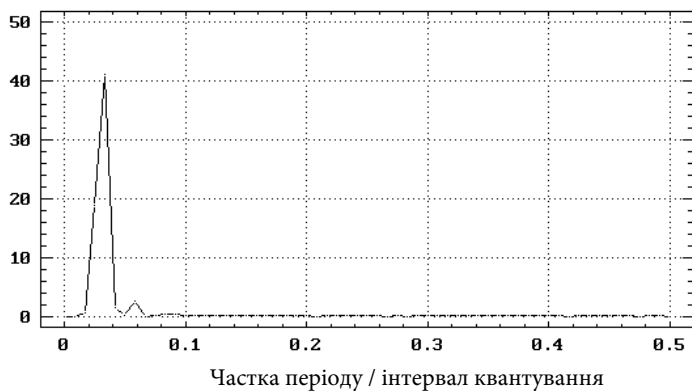


Рис. 3.4. Спектр частоти коливань ТМП зародків в'юна за умов впливу катіонів кобальту в концентрації  $10^{-5}$  М

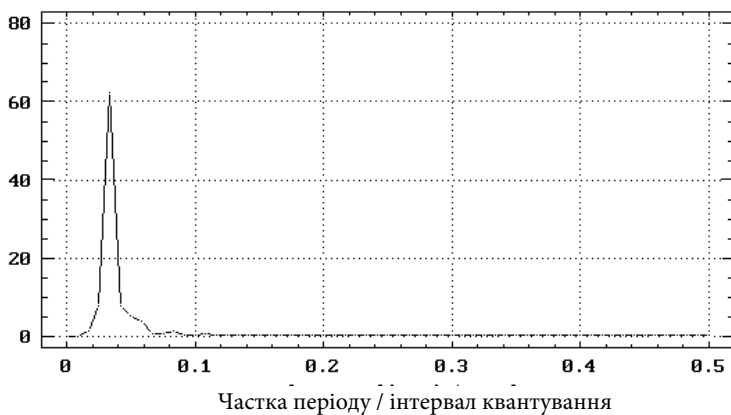


Рис. 3.5. Спектр частоти коливань ТМП зародків в'юна за умов впливу катіонів кобальту в концентрації  $10^{-4}$  М

Піки коливань припадають на 0,032 періоду на інтервал квантування в обох випадках, а отже, період коливань при дії

катіонів кобальту змінюється однаково, як при концентрації  $10^{-5}$  М, так і при концентрації  $10^{-4}$  М, і становить приблизно 39 хв.

На рис. 3.6–3.7 показано спектри частоти коливань ТМП зародків в'юна за умов впливу катіонів олова в концентраціях  $10^{-5}$ – $10^{-4}$  М.

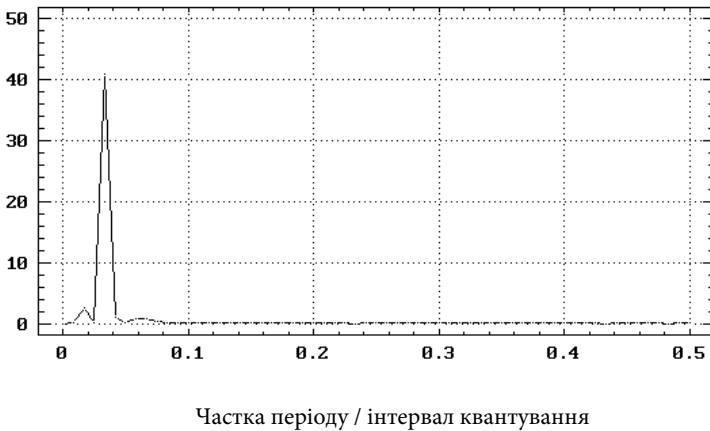


Рис. 3.6. Спектр частоти коливань ТМП зародків в'юна за умов впливу катіонів олова в концентрації  $10^{-5}$  М

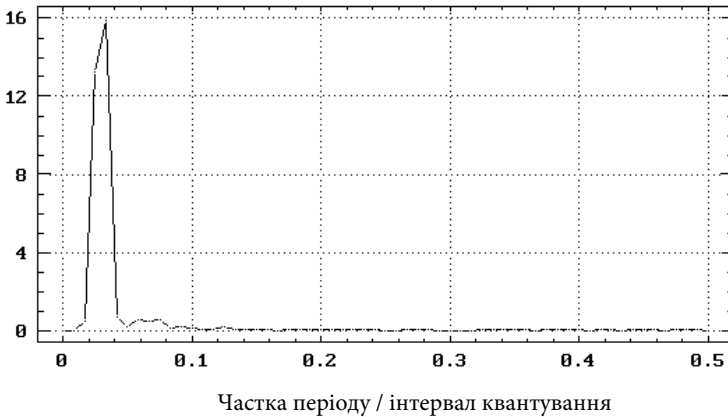


Рис. 3.7. Спектр частоти коливань ТМП зародків в'юна за умов впливу катіонів олова в концентрації  $10^{-4}$  М

При дії концентрації катіонів олова  $10^{-5}$  М, частотний пік припадає на 0,032 періоду на інтервал квантування, а отже, період коливань ТМП у цьому разі збільшується приблизно до 39 хв, як і при дії катіонів кобальту в концентраціях  $10^{-5}$ – $10^{-4}$  М.

За умов впливу катіонів олова в концентрації  $10^{-4}$  М верхівка частотного піка є розтягнутою: від 0,023 до 0,033 періоду на інтервал квантування, отже, період коливань ТМП, як і при дії катіонів нікелю в концентрації  $10^{-5}$  М, не є однаковим протягом дроблення бласомерів, а змінюється від 38 до 54 хв.

Спектри частот коливань ТМП зародків в'юна за умов впливу катіонів цинку в концентраціях  $10^{-6}$  М та  $10^{-5}$  М подано на рис. 3.8–3.9.

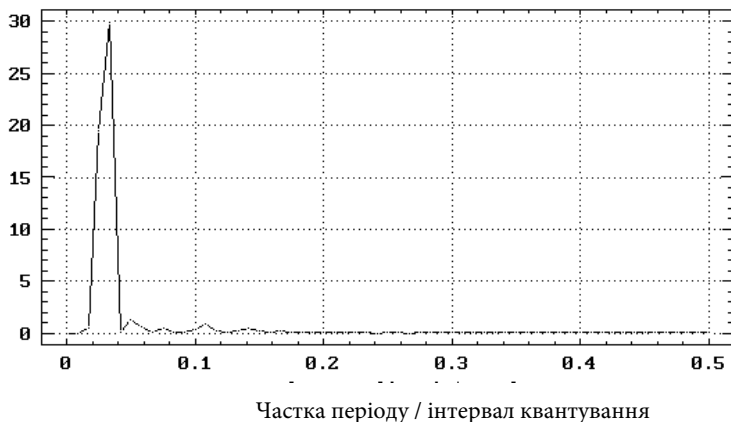


Рис. 3.8. Спектр частоти коливань ТМП зародків в'юна за умов впливу катіонів цинку в концентрації  $10^{-6}$  М

Частотний пік при дії катіонів цинку в концентрації  $10^{-6}$  М припадає на 0,031 періоду на інтервал квантування, що відповідає періоду коливань ТМП близько 40 хв. Отже, період коливань ТМП

у цьому разі збільшується приблизно в 1,3 раза, порівняно з контролем.

У разі впливу катіонів цинку в концентрації  $10^{-5}$  М частотний пік розтягнений від 0,024 до 0,032 періоду на інтервал квантування. Отже, період коливань ТМП змінюється від 39 до 52 хв протягом дроблення бластомерів.

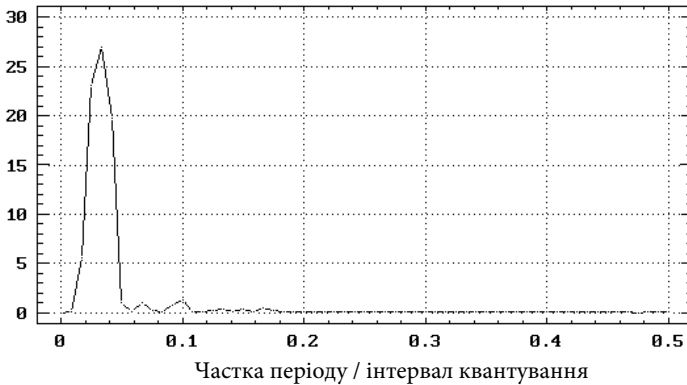


Рис. 3.9. Спектр частоти коливань ТМП зародків в'юна за умов впливу катіонів цинку в концентрації  $10^{-5}$  М

На рисунках 3.10–3.11 зображено спектри частоти коливань ТМП зародків в'юна за умов впливу катіонів марганцю в концентраціях  $10^{-6}$ – $10^{-5}$  М.

Пік частоти при дії катіонів марганцю в концентрації  $10^{-6}$  М припадає на 0,024 періоду на інтервал квантування. Період коливань у цьому разі становить 52 хв, отже, цей вплив спричиняє збільшення періоду коливань ТМП в 1,7 раза, порівняно з контролем.

Під час дії катіонів марганцю в концентрації  $10^{-5}$  М пік частоти припадає на 0,023 періоду на інтервал квантування, отже,

період коливань досягає 54,3 хв, що більше від періоду в контролі в 1,8 раза.



Рис. 3.10. Спектр частоти коливань ТМП зародків в'юна за умов впливу катіонів марганцю в концентрації  $10^{-6}$  М

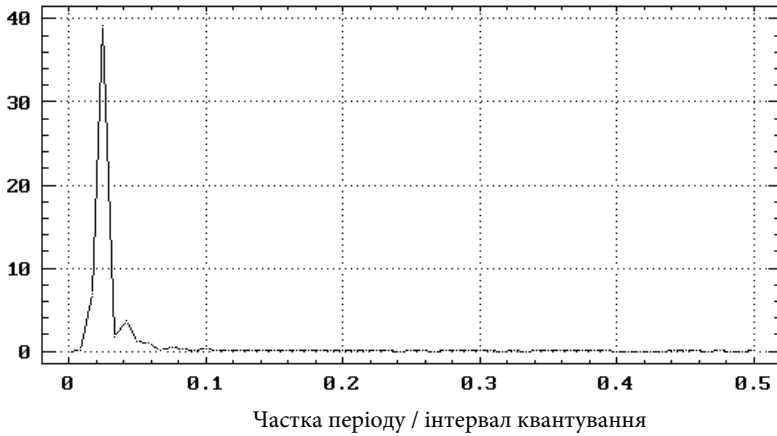


Рис. 3.11. Спектр частоти коливань ТМП зародків в'юна за умов впливу катіонів марганцю в концентрації  $10^{-5}$  М

Спектри частот коливань ТМП зародків в'юна за умов впливу катіонів кадмію в концентраціях  $10^{-6}$  М та  $10^{-5}$  М подано на



рис. 3.12–3.13. Частотні піки за цих умов є досить вузькими, що свідчить про постійність частоти коливань трансмембранного потенціалу протягом дроблення blastomerів.

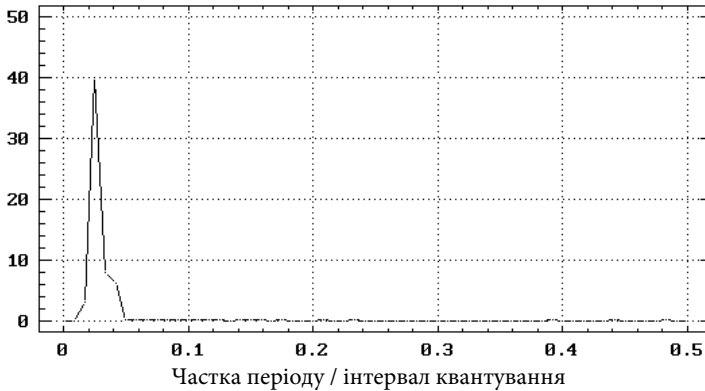


Рис. 3.12. Спектр частоти коливань ТМП зародків в'юна за умов впливу катіонів кадмію в концентрації  $10^{-6}$  М

За умов наявності в інкубаційному середовищі катіонів кадмію, концентрація яких становить  $10^{-6}$  М, пік частоти коливань припадає на 0,023 періоду на інтервал квантування. Отже, період коливань ТМП становить приблизно 54 хв, як і при дії катіонів марганцю в концентрації  $10^{-5}$  М.

Частотний пік при дії катіонів кадмію більшої концентрації –  $10^{-5}$  М – припадає на 0,022 періоду на інтервал квантування. Період коливань є ще більшим, порівняно з контролем і сягає приблизно 57 хв, що більше від контролю в 1,9 раза.

Спектральний аналіз дає можливість виявити частоти коливань трансмембранного потенціалу, які превалюють протягом періоду дроблення blastomerів, і порівняти частоти коливань ТМП у нормі та при дії катіонів важких металів. Він свідчить, що

вплив катіонів досліджуваних металів у концентраціях  $10^{-4}$ – $10^{-6}$  М спричиняє зменшення частоти коливань трансмембранного потенціалу, а отже, збільшує період коливань, порівняно з контролем.

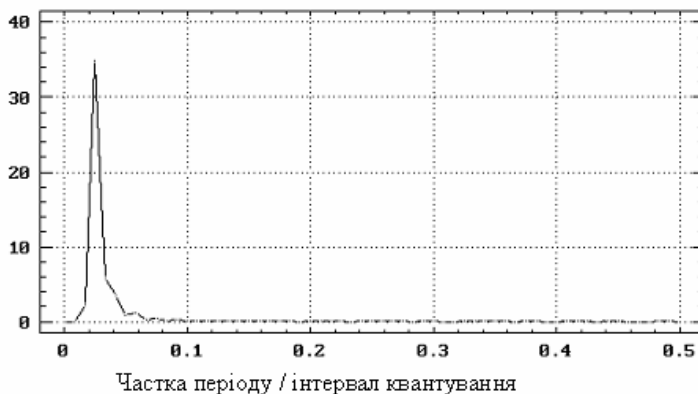


Рис. 3.13. Спектр частоти коливань ТМП зародків в'юна за умов впливу катіонів кадмію в концентрації  $10^{-5}$  М

Найменше на зміну частоти коливань впливають іони кобальту, їхній вплив зумовлює збільшення періоду коливань тільки приблизно в 1,3 раза, порівняно з контролем. Найсуттєвіше впливають катіони нікелю та кадмію – період коливань при дії цих катіонів збільшується до 57–62,5 хв, (в 1,9–2 рази). Іони нікелю в концентрації  $10^{-5}$  М, олова в концентрації  $10^{-4}$  М та цинку в концентрації  $10^{-5}$  М впливають таким чином, що період коливань не є постійним і варіює протягом дроблення blastomerів: від 38 до 62,5 хв при дії катіонів нікелю в концентрації  $10^{-5}$  М, від 38 до 54 хв при дії катіонів олова в концентрації  $10^{-4}$  М та від 39 до 52 хв при дії катіонів цинку в концентрації  $10^{-5}$  М.

### **3.2. Зміна активності $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ – активованої, $\text{Mg}^{2+}$ – залежної АТФ–ази мембран зародків в'юна внаслідок впливу катіонів важких металів**

Результати вимірювання активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -активованої,  $\text{Mg}^{2+}$ -залежної АТФ-ази за умов впливу катіонів важких металів та в нормі подано у вигляді графіків, які були виконані за допомогою графічного редактора Excel із стандартного набору Microsoft Office (рис. 3,14–3,18). Ці графіки відображають числові значення активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази, обраховані за стандартною методикою (М.И. Прохорова, 1982) на різних стадіях розвитку зародків в'юна протягом періоду дроблення бластомерів.

Одержані результати були оброблені методами статистичного аналізу. Активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази в умовах впливу катіонів важких металів достовірно відрізнялася від активності ферменту в контролі.

На рис. 3.14 зображено значення активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази мембран зародків в'юна на стадії розвитку двох бластомерів у нормі та за умов наявності в середовищі інкубації катіонів двовалентних важких металів: нікелю, кобальту, олова, цинку, марганцю та кадмію в концентраціях  $10^{-6}$ – $10^{-4}$  М.

## 2 бластомери

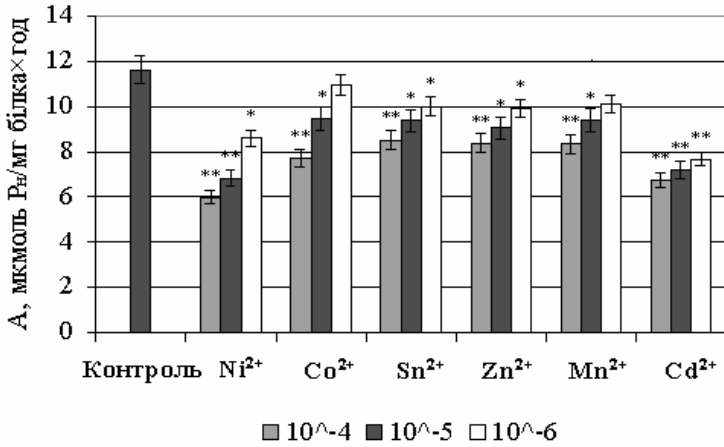


Рис. 3.14. Змїни активностї  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азї зародків в'їона на стадїї двох бластомерів унаслідок впливу катїонів важких металів рїзних концентрацій.

## 16 бластомерів

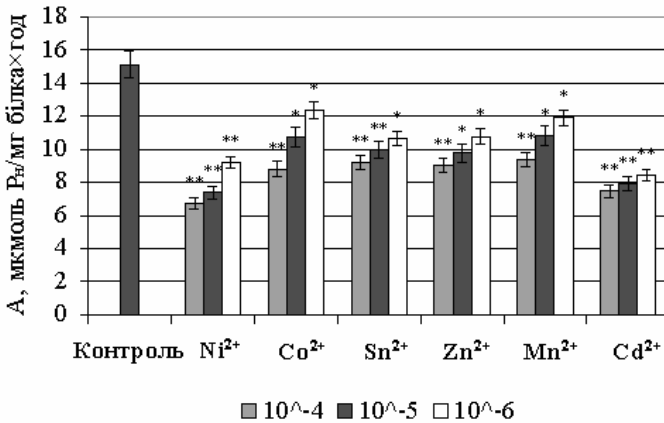


Рис. 3.15 Змїни активностї  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азї унаслідок впливу катїонів важких металів у концентраціях  $10^{-6}$ - $10^{-4}$  М на стадїї розвитку 16 бластомерів  
\* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$

## 64 бластомери

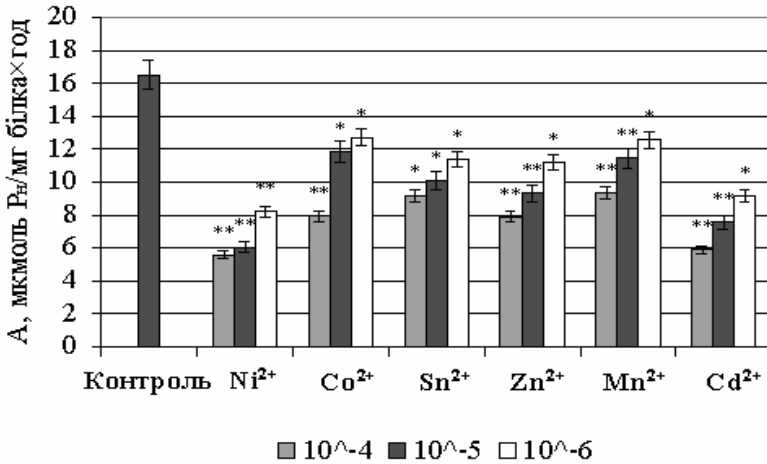


Рис. 3.16. Зміни активності Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФ-ази зародків в'юна на стадії 64 бластомерів унаслідок впливу катіонів важких металів різних концентрацій.  
\* – p < 0,05, \*\* – p < 0,01

Активність Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФ-ази за умов впливу катіонів важких металів зменшується; вона залежить від концентрації катіонів металів: дія катіонів важких металів у концентрації 10<sup>-4</sup> М веде до значного зменшення активності ферменту, вплив катіонів у концентрації 10<sup>-6</sup> М спричиняє менш виражене зменшення активності Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФ-ази.

На стадії двох бластомерів найсуттєвіше впливали на активність Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФ-ази йони нікелю та кадмію, менше – йони цинку, марганцю та олова. Дія катіонів кобальту в концентрації 10<sup>-4</sup> М зумовлювала значне зменшення активності ферменту, а в концентрації 10<sup>-6</sup> М – майже не впливала на його активність.

## VIII поділ

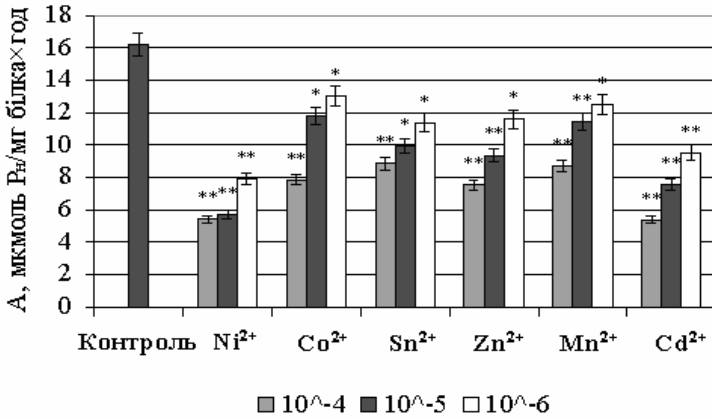


Рис. 3.17. Зміни активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази зародків в'юна на стадії восьмого поділу внаслідок впливу катіонів важких металів різних концентрацій.

\* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$

## X поділ

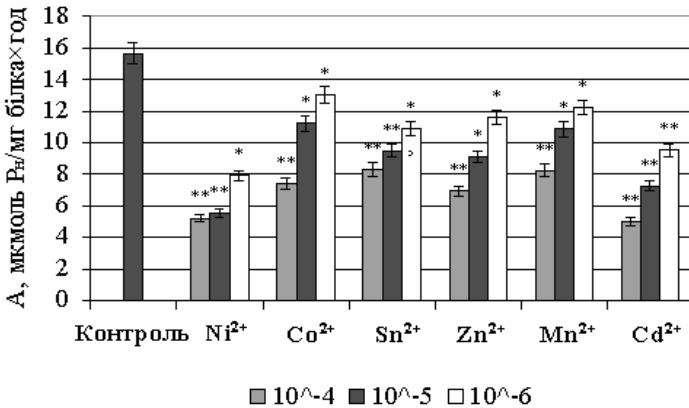


Рис. 3.18. Зміни активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази зародків в'юна на стадії 10 поділу внаслідок впливу катіонів важких металів різних концентрацій

\* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$

Зменшення активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази на цій стадії більш виражено, ніж на стадії двох бластомерів. Найсуттєвіше на активність ферменту впливають іони нікелю та кадмію, менше – йони цинку та олова, катіони кобальту та марганцю впливають найменше.

На рис. 3.16 зображено значення активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази за умов наявності в інкубаційному середовищі катіонів важких металів у тих самих концентраціях на стадії 64 бластомерів. Зменшення активності ферменту в цьому разі є ще більш значним, ніж у попередніх прикладах. Найсуттєвіше на активність ферменту, як і на стадіях двох та 16 бластомерів, впливають катіони нікелю та кадмію.

Зміни активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази зародків в'юна внаслідок впливу катіонів важких металів на стадії восьмого поділу подано на рис. 3.17.

Зменшення активності ферменту, як і на попередніх стадіях, залежить від концентрації катіонів металів, і найбільш виражено при дії катіонів кобальту та нікелю.

Рисунок 3.18 відображає зміни активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази зародків в'юна внаслідок впливу катіонів важких металів у концентраціях  $10^{-6}$ – $10^{-4}$  М на стадії десятого поділу.

На цій стадії йони нікелю та кадмію також впливають найбільше, а йони кобальту та марганцю – найменше.

Отримані результати дають змогу переконатися, що вплив катіонів таких важких металів, як нікель, кобальт, олово, цинк,

марганець та кадмій у концентраціях  $10^{-6}$ – $10^{-4}$  М веде до залежного від концентрації зменшення активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -активованої,  $\text{Mg}^{2+}$ -залежної АТФ-ази. Таке зменшення активності спостерігалось як після першого поділу – на стадії двох бластомерів, так і в кінці періоду дроблення бластомерів – на стадії десятого поділу, причому на більш ранніх стадіях дроблення бластомерів зменшення активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази внаслідок впливу катіонів важких металів було менш виражено. На всіх досліджуваних стадіях активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази змінювалась найбільше внаслідок впливу катіонів нікелю та кадмію (Н.М. Бойко та ін., 2002).

Для більш якісної характеристики змін активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази плазматичної мембрани зародків в'юна за умов впливу катіонів важких металів було розраховано коефіцієнти інгібування  $I_{0,5}$ , які засвідчують, у якій концентрації вплив катіонів важких металів зумовлює зменшення активності ферменту на 50 %.

Визначали коефіцієнти інгібування  $I_{0,5}$  шляхом лінеаризації експоненційних кривих інгібування  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази катіонами досліджуваних важких металів на різних стадіях розвитку у логарифмічних координатах (рис. 3.19–3.23).

Значення коефіцієнтів інгібування  $I_{0,5}$  визначали у точці перетину одержаних прямих з віссю абсцис (Л.О. Дубицький, Л.С. Вовканич, 2003; Т.С. Chou, 1976).

Числові значення коефіцієнтів інгібування  $I_{0,5}$  для досліджуваних металів на різних стадіях розвитку подано у таблиці 3.1.



## 2 бластомери

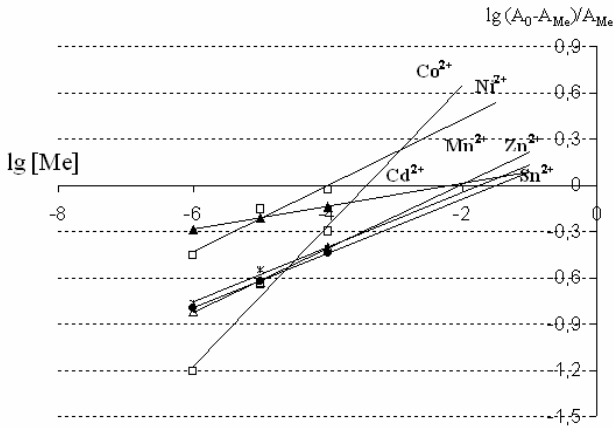


Рис. 3.19. Визначення коефіцієнта інгібування  $I_{0.5} Na^+, K^+ - ATP$ -ази плазматичної мембрани бластомерів в'юна катіонами важких металів на стадії розвитку двох бластомерів

## 16 бластомерів

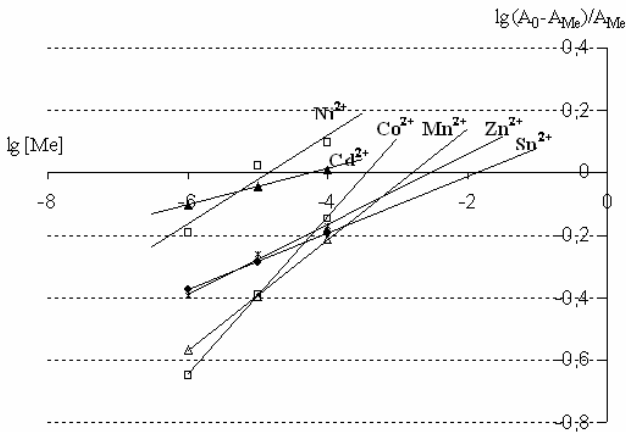


Рис. 3.20. Визначення коефіцієнта інгібування  $I_{0.5} Na^+, K^+ - ATP$ -ази плазматичної мембрани бластомерів в'юна катіонами важких металів на стадії розвитку 16 бластомерів

## 64 бластомери

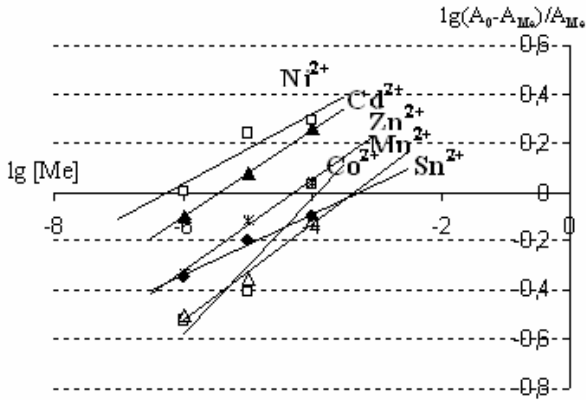


Рис. 3.21. Визначення коефіцієнта інгібування  $I_{0,5}$   $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - АТФ-ази плазматичної мембрани бластомерів в'юна катіонами важких металів на стадії розвитку 64 бластомерів

## VIII поділ

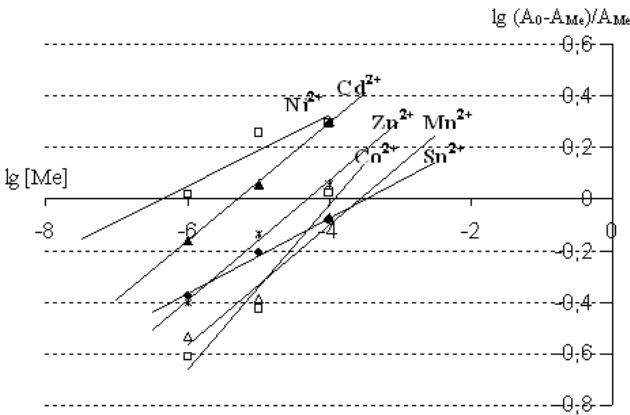


Рис. 3.22. Визначення коефіцієнта інгібування  $I_{0,5}$   $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - АТФ-ази плазматичної мембрани бластомерів в'юна катіонами важких металів на стадії розвитку VIII поділу

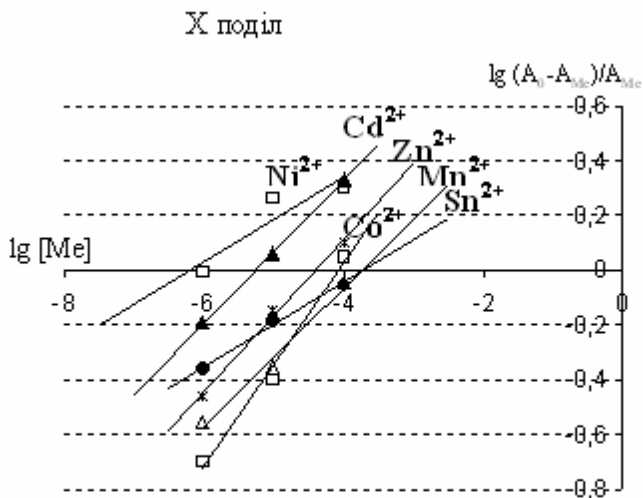


Рис. 3.23. Визначення коефіцієнта інгібування  $I_{0,5}$   $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - АТФ-ази плазматичної мембрани бластомерів в'юна катіонами важких металів на стадії розвитку X поділу

Отримані значення коефіцієнтів інгібування  $I_{0,5}$  засвідчують, що чутливість  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази до впливу катіонів важких металів змінюється від ранніх стадій дроблення бластомерів до більш пізніх. Зокрема, якщо коефіцієнт  $I_{0,5}$  для катіонів нікелю на стадії двох бластомерів становить  $9,54 \cdot 10^{-5}$  М, то на стадії X поділу –  $6,38 \cdot 10^{-7}$  М, тобто на два порядки нижче. Отже, активність цього ферменту на стадії десятого поділу зменшується вдвічі при дії катіонів нікелю у концентрації, що вдвічі менша, ніж на стадії двох бластомерів.

Такі значення збігаються з даними, одержаними Гойдою (Е.А. Гойда, 1993) при інгібуванні  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази оубаїном: рівень ТМП зародків в'юна змінювався по-різному залежно від

стадії розвитку. На більш ранніх стадіях відсоткове співвідношення зниження рівня потенціалу було невеликим, тоді, як на більш пізніх стадіях воно значно зростало, отже, інгібувальний ефект оубаїну був виражений значно сильніше. Це може свідчити про збільшення чутливості  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази до інгібувальних впливів від ранніх стадій дроблення бластомерів до більш пізніх.

Таблиця 3.1

Значення коефіцієнтів інгібування  $I_{0,5}$  (М)  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази мембран зародків в'юна катіонами важких металів на різних стадіях розвитку

Катіони важких металів	Стадії розвитку				
	2 бласт.	16 бласт.	64 бласт.	VIII поділ	X поділ
$\text{Ni}^{2+}$	$9,54 \cdot 10^{-5}$	$1,48 \cdot 10^{-5}$	$5,57 \cdot 10^{-7}$	$4,13 \cdot 10^{-7}$	$6,38 \cdot 10^{-7}$
$\text{Co}^{2+}$	$3,74 \cdot 10^{-4}$	$3,72 \cdot 10^{-4}$	$1,19 \cdot 10^{-4}$	$1,13 \cdot 10^{-4}$	$8,72 \cdot 10^{-5}$
$\text{Mn}^{2+}$	$9,16 \cdot 10^{-3}$	$1,64 \cdot 10^{-3}$	$4,54 \cdot 10^{-4}$	$2,61 \cdot 10^{-4}$	$1,82 \cdot 10^{-4}$
$\text{Sn}^{2+}$	$3,07 \cdot 10^{-2}$	$1,38 \cdot 10^{-2}$	$5,56 \cdot 10^{-4}$	$3,16 \cdot 10^{-4}$	$1,98 \cdot 10^{-4}$
$\text{Zn}^{2+}$	$1,7 \cdot 10^{-2}$	$2,89 \cdot 10^{-3}$	$5,4 \cdot 10^{-5}$	$4,96 \cdot 10^{-5}$	$3,94 \cdot 10^{-5}$
$\text{Cd}^{2+}$	$6,56 \cdot 10^{-3}$	$6,14 \cdot 10^{-5}$	$3,66 \cdot 10^{-6}$	$4,99 \cdot 10^{-6}$	$5,57 \cdot 10^{-6}$

Для різних стадій дроблення характерна також різна чутливість  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази до впливу катіонів різних металів.

Цю чутливість можна передати за допомогою рядів, які відображають ступінь інгібувального ефекту катіонів різних металів на  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азу.

На стадії 2 бластомерів:  $\text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Sn}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ .

На стадії 16 бластомерів:  $\text{Cd}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Sn}^{2+}$ .

На стадії 64 бластомерів:  $\text{Ni}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Sn}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Co}^{2+}$ .

На стадії VIII поділу:  $\text{Ni}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Sn}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Co}^{2+}$ .

На стадії X поділу:  $Ni^{2+} > Cd^{2+} > Zn^{2+} > Co^{2+} > Sn^{2+} > Mn^{2+}$ .

Найнижчі значення коефіцієнтів  $I_{0,5}$ , а отже, найвищий ступінь інгібування, на всіх стадіях дроблення характерні для катіонів нікелю та кадмію, що свідчить про їхній найбільший вплив на активність  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФ-ази мембран зародків в'юна. Слід відмітити, що коефіцієнт інгібування  $I_{0,5}$  для катіонів кобальту є досить високим на стадії двох бластомерів, а на більш пізніх стадіях значно зменшується. Це може свідчити про більш високу чутливість  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФ-ази до впливу цих катіонів на ранніх стадіях розвитку, порівняно з більш пізніми.

Найменший інгібувальний ефект і найнижчі значення коефіцієнтів інгібування  $I_{0,5}$  майже на всіх досліджуваних стадіях розвитку характерні для катіонів марганцю. Катіони олова мали також невисокі значення коефіцієнтів інгібування на всіх стадіях дроблення бластомерів.

Отже, розрахунок коефіцієнта інгібування  $I_{0,5}$  дає змогу проаналізувати чутливість  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФ-ази до різних катіонів металів протягом періоду дроблення бластомерів.

## **Розділ 4. УЛЬТРАСТРУКТУРА ЗАРОДКІВ ТА МОДИФІКУЮЧІ ВПЛИВИ**

### **4.1. Зміни ультраструктури бластомерів зародків в'юна на різних стадіях розвитку в нормі та під впливом катіонів важких металів**

В результаті електронно-мікроскопічного дослідження ультратонких зрізів зародків в'юна на стадії розвитку двох бластомерів у нормі встановлено, що їхня цитоплазма головно складається з дрібнозернистої гіалоплазми середньої електронної щільності, цитоплазматичних органел та включень.

У цитоплазмі розрізняємо канали гранулярного та агранулярного ендоплазматичного ретикулуму, скупчення полісом та окремі рибосоми.

Серед скупчень рибосом і полісом знаходяться округлої, рідше – овальної форми мітохондрії, які мають добре розвинуті зовнішні і внутрішні мітохондріальні мембрани.

Внутрішня мітохондріальна мембрана утворює розгалужену систему крист, між якими є речовина середньої електронної щільності, т. зв. внутрішньомітохондріальний матрикс.

Поряд з мітохондріями виявлено значних розмірів, обмежені мембранами, травні вакуолі. Трапляються мітохондрії, які однією з бокових поверхонь зливаються з травною вакуолею (рис. 4.1, а).

Між травними вакуолями, серед полів рибосом та полісом, містяться поодинокі лізосоми, автофаголізосоми та дрібні ліпопротеїдні краплі.

Також виявлено, що в глибоких шарах цитоплазми бластомерів частіше трапляються кулеподібної форми, різної електронної щільності та неоднакового діаметра гранули жовтка (рис. 4.1, б).

Гранули жовтка оточені по периферії мембраною, яка в багатьох місцях продовжується у трубкоподібних виростах гранулярного ЕПР. Невеликого діаметра гранули жовтка часто прилягають до травних вакуоль і зливаються з ними (рис. 4.1, в).

З наближенням до кортикального шару бластомерів частота виявлення гранул жовтка зменшується, зменшуються і розміри травних вакуоль, а цитоплазма з наближенням до кортикального шару заповнюється розширеними каналами гранулярного ЕПР, цистернами комплексу Гольджі (рис. 4.1, г).

Поверхня бластомерів покрита суцільною чітко контурованою плазматичною мембраною, яка має хвилясту форму з невеликою амплітудою.

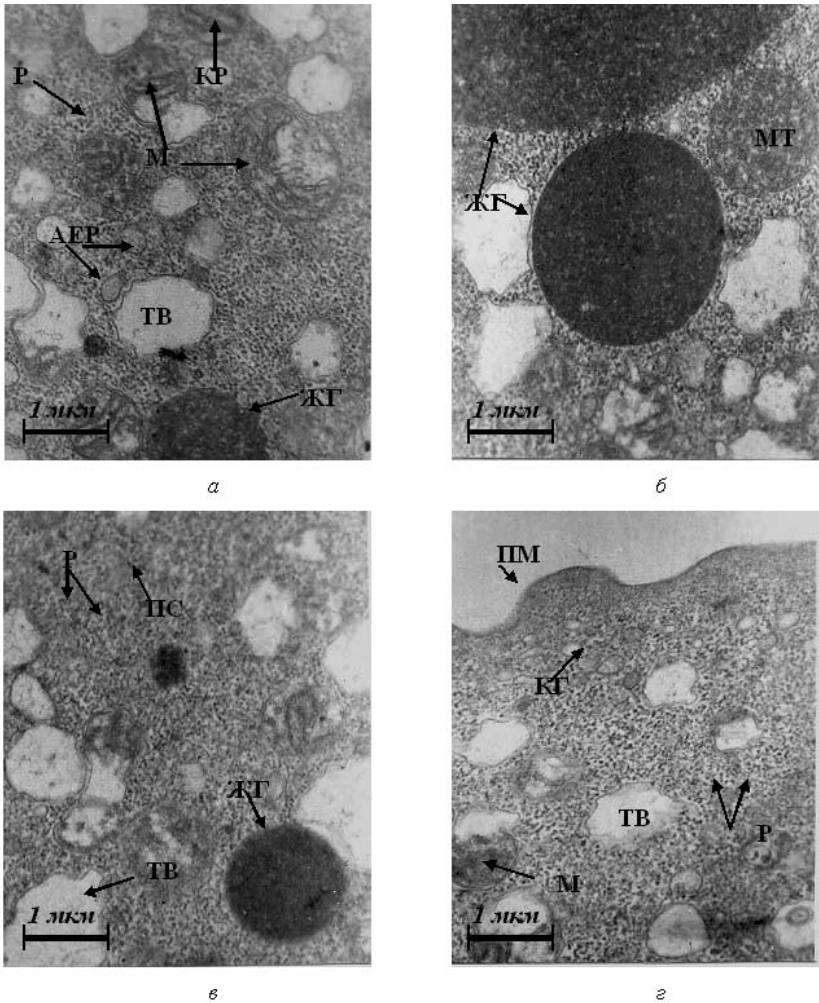


Рис. 4.1. Ультраструктура бластомерів зародків в'юна на стадії розвитку 2 бластомерів за нормальних умов: АЕР – агранулярний ендоплазматичний ретикулум; АФЛ – автофаголізосоми; ГЕР – гранулярний ендоплазматичний ретикулум; ЖГ – жовткові гранули; КГ – комплекс Гольджі; КР – кристи мітохондрій; Л – лізосоми; М – мітохондрії; МТ – мультивезикулярні тільця; ПМ – плазматична мембрана; ПС – полісоми; Р – рибосоми; ТВ – травні вакуолі

Ультраструктурне організування бластомерів зародків в'юна, що були інкубовані протягом години за наявності катіонів



нікелю, в концентрації  $10^{-4}$  М, характеризується низькою електронною щільністю цитоплазми та дезорганізацією органел.

Відмічено, що гранули жовтка мали великі розміри та велику електронну щільність гомогенного вмісту.

Поверхнева мембрана, що оточує гранули жовтка, є розпушеною і має поодинокі вирости, які продовжуються в мікротрубочках ЕПР (рис. 4.2, а). Цитоплазма, що прилягає до гранул жовтка, насичена лізосомами, малою кількістю рибосом та полісом.

Мітохондрії мають великі розміри та перебувають у стані набряку, як і вся цитоплазма. Зовнішні та внутрішні мітохондріальні мембрани і кристи розпушені та в окремих місцях утворюють преципітати та коагуляти (рис. 4.2, а, б).

Виявлено мітохондрії, що зливаються з травними вакуолями (рис. 4.2, в). Травні вакуолі не мають мембран, що їх обмежують, вміст їхній зливається з вмістом гіалоплазми; вони знаходяться переважно в ділянках гіпертрофованого комплексу Гольджі (рис. 4.2, в).

Вважають, що значна кількість мітохондріальних мембран і мембран травних вакуоль утворюють суцільні ліпопротеїдні поля.

Окремі ділянки крист мітохондрій та мітохондріального середовища, що їх оточує, зберігають цілісність, однак і тут спостерігаються локальні ушкодження у вигляді розривів.

Кортикальна цитоплазма бластомерів під час впливу катіонів нікелю на близькій віддалі від плазматичних мембран є електронно щільною, а сама плазматична мембрана, хоча і контурована, однак у ділянках інвагінацій є перервною, в деяких місцях розпушеною (рис 4.2, г).

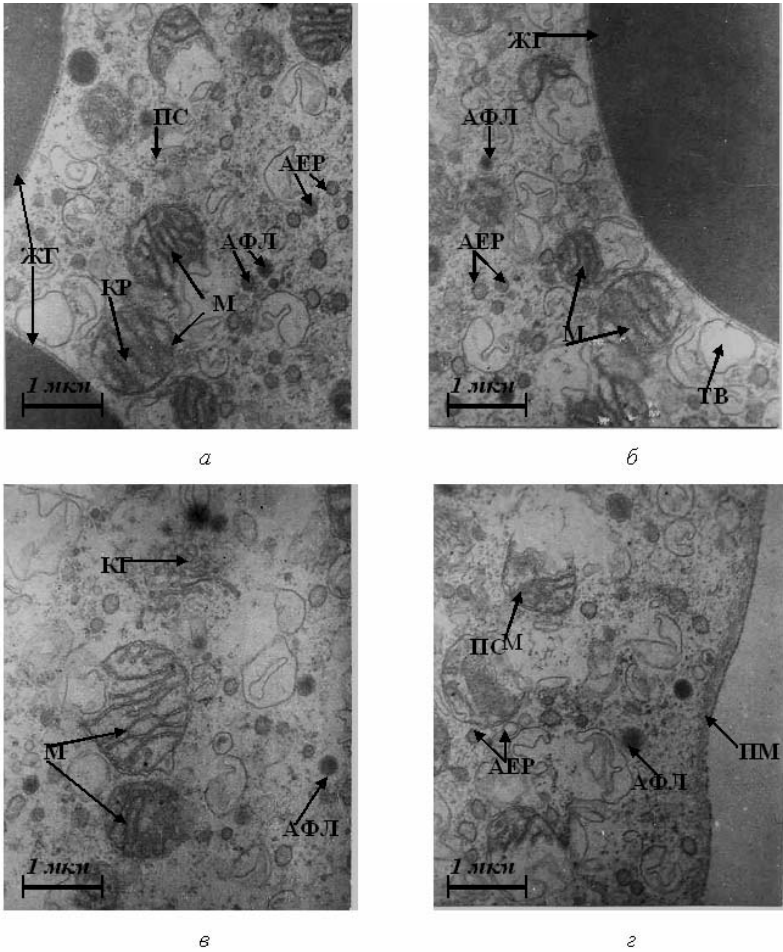


Рис. 4.2. Ультраструктура бластомерів зародків в'юна на стадії розвитку 2 бластомерів за умов впливу катіонів нікелю. Позначення – як на рис. 4.1

Контур плазматичної мембрани зберігає хвилеподібну форму, але амплітуда є дуже малою.

Зародки в'юна інкубували протягом однієї години, додаючи хлорид кобальту, концентрація якого становила  $10^{-4}$  М.

У глибоких шарах цитоплазми бластомерів виявлено середніх розмірів жовткові гранули, що часто не мають

обмежуючої оболонки. Від окремих периферичних ділянок жовткових гранул відходять тяжі електронно-щільного матеріалу.

Цитоплазма, що прилягає до гранул жовтка, вміщує дезорганізований гранулярний та агранулярний ендоплазматичний ретикулум та значну кількість дрібних неправильної форми вакуоль (рис. 4.3, а).

Поряд із середньої величини жовтковими гранулами виявлено невеликі скупчення дуже дрібних гранул жовтка. Вони прилягають до мітохондрій, що перебувають у стані набряку, та окремих, значних за розмірами, вакуоль (рис. 4.3, б).

У мітохондріях відмічено дезорганізацію крист, більшість з яких мають розпушені мембрани, що являють собою ліпопротеїдні електронно-щільні скупчення. В окремих мітохондріях спостерігається наявність крист, які мають електронно-щільні мембрани.

В ділянках цитоплазми, де є скупчення мітохондрій, які розпадаються, наявні скупчення рибосом і полісом. Окремі мітохондрії в своєму матриксі вміщують електронно-щільні компактні гранули. Для таких мітохондрій характерна цілісність зовнішньої і внутрішньої мітохондріальних мембран та гіпертрофованих крист (рис. 4.3, в). У кортикальному шарі бластомерів за умов впливу катіонів  $Co^{2+}$  відмічено наявність великої кількості незначних за розмірами травних вакуоль, які розміщені переважно між великими за розмірами дезорганізованими мітохондріями. Такі мітохондрії мають розпушені зовнішні і внутрішні мембрани та кристи. Переважно

розпушені мембрани крист зливаються між собою й утворюють маси ліпопротеїдів різної електронної щільності.

Поверхня цитоплазми бластомерів є нерівною та формує сходинкоподібні випинання. Плазматична мембрана на загострених випинаннях має чіткі контури та виражену двошаровість, тоді як у ділянках, які віддалені від випинань, вона розпушена або її зовсім немає.

Електронна щільність гіалоплазми, що прилягає до розпушених ділянок мембрани, є підвищеною (рис. 4.3, з).

Під час інкубування зародків в'юна за наявності катіонів цинку, концентрація яких становила  $10^{-4}$  М, цитоплазма бластомерів збіднена на жовткові гранули. Жовткові гранули невеликих розмірів часто необмежені лімітованою оболонкою.

На близьких віддалях від жовткових гранул виявлені поодинокі первинні лізосоми та мультивезикулярні тільця великих розмірів.

Гіалоплазма, що оточує жовткові гранули та мультивезикулярні тільця, перебуває в стані набряку, а поодинокі канали агранулярного ендоплазматичного ретикулуму – в стані лізису.

Переважно до лізованих і гіпертрофованих каналів ендоплазматичного ретикулуму прилягає комплекс Гольджі. Вкорочені канали та мікроміхурці комплексу Гольджі наповнені речовиною значної електронної щільності.

Мітохондрії, що знаходяться між комплексом Гольджі та гіпертрофованими каналами агранулярного ендоплазматичного

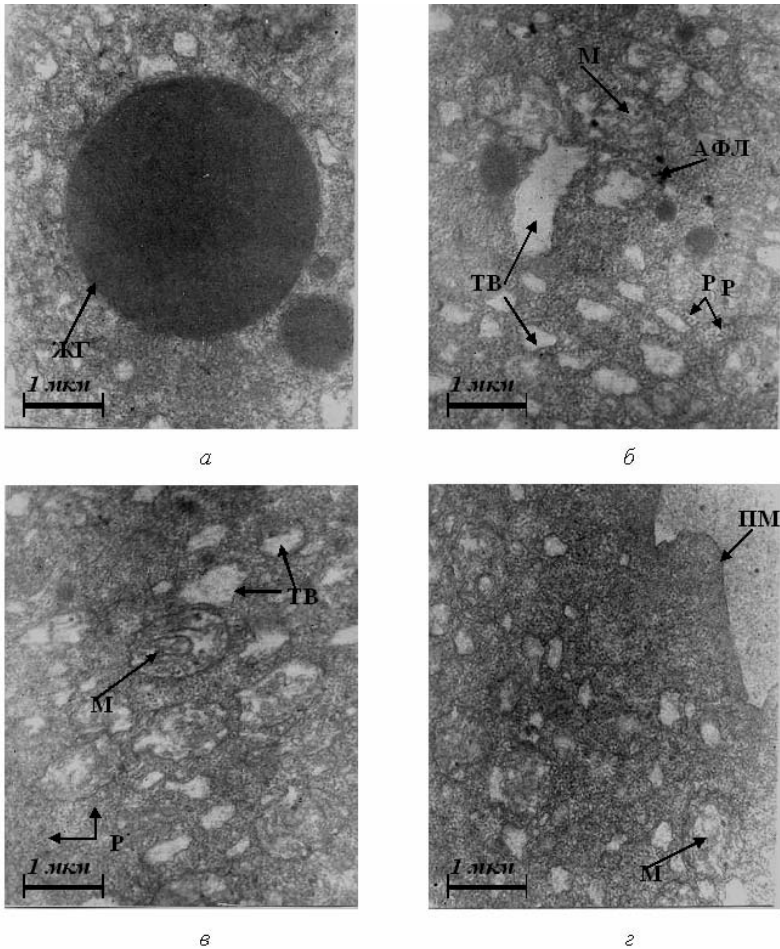


Рис. 4.3. Ультраструктура бластомерів зародків в'юна на стадії розвитку 2 бластомерів за умов впливу катіонів кобальту. Позначення – як на рис. 4.1

ретикулуму, мають оптимально розвинуті зовнішні та внутрішні мембрани та кристи (рис. 4.4, а).

Виявлено також ділянки цитоплазми, що містять дезорганізований комплекс Гольджі, канали і мікроміхурці якого є електронно-світлимими, а мембрани, що їх обмежують, розпушені

(рис. 4.4, б). Мітохондрії, які знаходяться поряд з таким атрофованим комплексом Гольджі є дезорганізованими, перебувають у стані набряку. Зовнішні та внутрішні мітохондріальні мембрани та мембрани крист розпушені (рис. 4.4, в). Мітохондріальний матрикс таких мітохондрій вміщує преципітати та коагуляти. Переважно описані форми мітохондрій знаходяться в кортикальному шарі бластомерів (рис. 4.4, г).

Плазматична мембрана бластомерів частково розпушена, її рельєф наближений до площини і не містить заглиблень всередину цитоплазми.

Одногодинне інкубування зародків в'юна на стадії 2 бластомерів у середовищі, в яке додано катіони марганцю, спричинювало появу ультраструктурних змін органел та включень.

Виявлено, що жовткові гранули мають дещо знижену електронну щільність. Поверхневі частини окремих гранул жовтка оточені мембраною, що утворює пористі структури, окремі з яких мають куполоподібні випинання в цитоплазму і продовжуються в каналах ЕПР, ділянки якого містять рибосоми.

Прилегла до таких жовткових гранул цитоплазма містить значну кількість розпливчастої форми рибосом і полісом, мітохондрій, що мають дезорганізований матрикс та частково розпушені кристи.

Серед полів частково дезорганізованих рибосом виявляються невеликих розмірів травні вакуолі, мультивезикулярні тільця, первинні лізосоми великих розмірів, розширені канали агранулярного ЕПР (рис. 4.5, а). Виявлено також жовткоподібні гранули великих розмірів, в яких між електронно

щільним вмістом та оболонкою, що складається з зовнішньої та внутрішньої мембран, містяться поля гранулярного матеріалу.

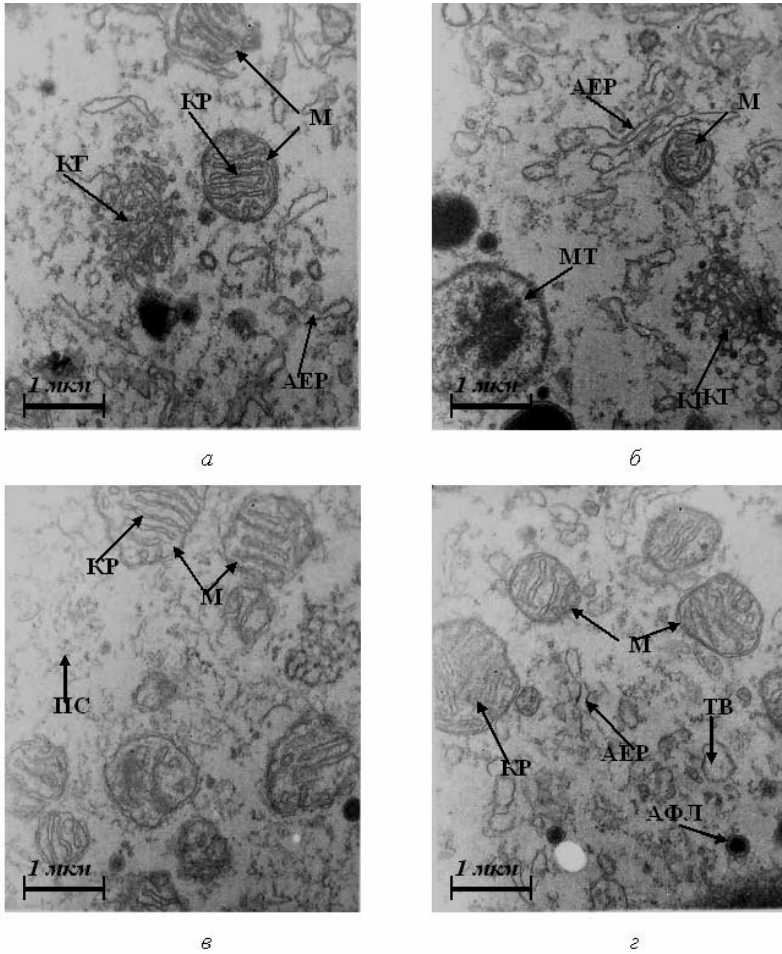


Рис. 4.4. Ультраструктура бластомерів зародків в'юна на стадії розвитку 2 бластомерів за умов впливу катіонів цинку. Позначення як на рис. 4.1

Як правило, цитоплазма, що прилягає до описаних гранул, насичена великою кількістю розширених каналів агранулярного ЕПР, набряклими мітохондріями, мультивезикулярними тільцями,

первинними лізосомами, поодинокими травними вакуолями, обмеженими оболонкою (рис. 4.5, б).

Часто трапляються накопичення великої кількості гроноподібних скупчень полісом, які по периферії обмежені оболонкою, що складається з однієї або двох нечітко контурованих мембран. Ділянки цитоплазми, що містять великі скупчення полісом і первинних лізосом, містять також велику кількість мітохондрій. Мітохондрії знаходяться на різних етапах дезорганізації крист та формування преципітатів, коагулятів, гомогенних ліпопротеїдних комплексів (рис. 4.5, в).

Кортикальні шари цитоплазми бластомерів за умов впливу катіонів марганцю насичені великою кількістю рибосом, які мають нечіткі контури, полісом та об'єднань полісом.

Мітохондрії, хоча їх і є значна кількість, однак є дезорганізовані, мають розпушені кристи, часто їхній матрикс набряклий. Разом із мітохондріями виявлено значну кількість розширених каналів агранулярного ЕПР. У шарі цитоплазми, що безпосередньо прилягає до розпушеної плазматичної мембрани, виявлено підвищену електронну щільність, він є гомогенним.

Поверхня цитоплазми бластомерів зберігає хвилеподібну форму, однак її амплітуда і частота є неоднаковими по всій поверхні. Плазматична мембрана бластомерів розпушена (рис. 4.5, г).

Інкубування зародків в'юна на стадії 2 бластомерів у середовищі з додаванням катіонів кадмію спричиняє до ультраструктурні зміни, яким характерні низька електронна щільність цитоплазми, що перебуває в стані набряку, та дезорганізування



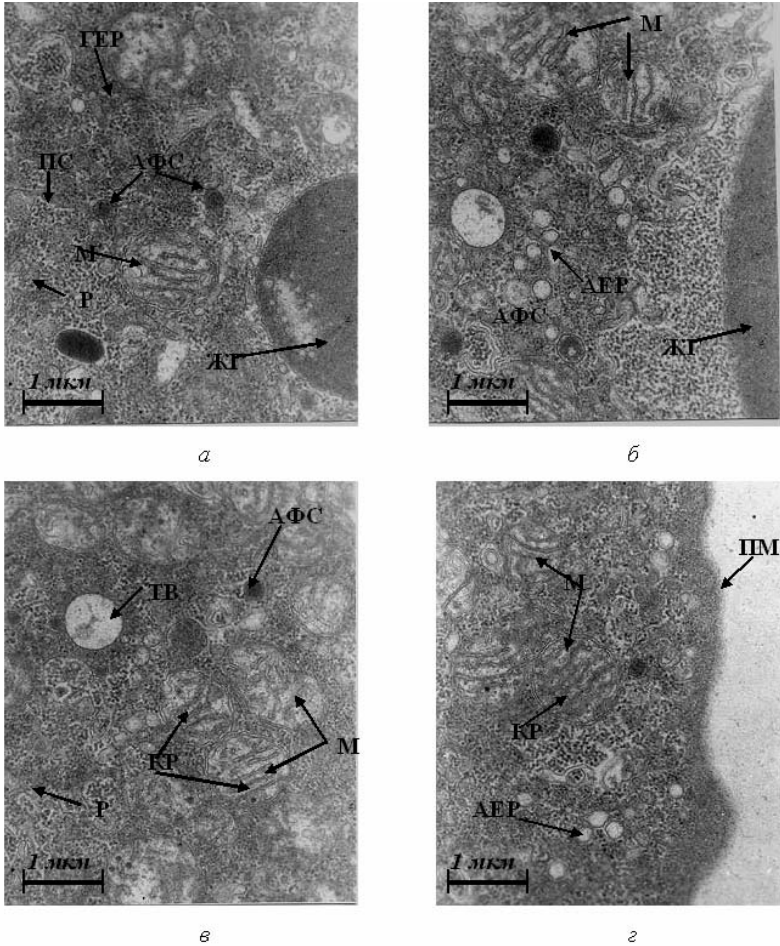


Рис. 4.5. Ультраструктура бластомерів зародків в'юна на стадії розвитку 2 бластомерів за умов впливу катіонів марганцю. Позначення – як на рис. 4.1

жовткових гранул. У жовткових гранул бракує лімітованої оболонки, а поверхня є розпушеною. Шар цитоплазми, що прилягає до гранул жовтка, вміщує зазвичай гіалоплазму, невелику кількість травних вакуоль, мікроміхурці, поодинокі лізосоми, агранулярний ендоплазматичний ретикулум, який розпадається (рис. 4.6, а).

У віддалених від жовткових гранул ділянках цитоплазми знаходяться поодинокі великі мітохондрії. Мітохондрії, хоча і зберігають свої форми, однак їхні мембрани є дещо розпушеними, разом з тим інколи зовнішня мітохондріальна мембрана формує вирости, поєднані травними вакуолями, що заходять глибоко в цитоплазму (рис. 4.6, б). Серед таких мітохондрій та дрібніших за розмірами гранул жовтка виявлено поодинокі кортикальні гранули. Частина великих за розмірами мітохондрій вміщує значну частку крист, які трансформовані в скупчення ліпопротеїдних мас.

Особливістю таких ділянок цитоплазми є також наявність гіпертрофованого комплексу Гольджі, по периферії якого знаходяться невеликі за розміром первинні лізосоми (рис. 4.6, в).

Шар цитоплазми бластомерів, який безпосередньо прилягає до цитоплазми мембрани, як видно з рис. 4.6, г, вміщує поодинокі мітохондрії, які перебувають у стані набряку, дрібні травні вакуолі, що не завжди мають чіткі лімітовані оболонки, і кортикальні гранули, що мають нечіткі контури.

Плазматична мембрана бластомерів за умов впливу катіонів кадмію має легко випуклу форму, особливо в тих частинах, які являють собою суцільний електроннощільний тяж її преципітатів і коагулятів.

Відмічено також ділянки розпушеної плазматичної мембрани. У незначних кількостях виявлено ділянки поверхні еластомерів, де плазматична мембрана не є суцільною (рис. 4.6, г).

Глибокі шари цитоплазми вміщують великих розмірів жовткові гранули різної електронної щільності, обмежені лімітованою оболонкою (рис. 4.7, а). У безпосередній близькості до

жовткових гранул знаходяться групи травних вакуоль середніх розмірів, розширені канали агранулярного ендоплазматичного ретикулуму.

Електронна щільність гіалоплазми в ділянці дислокації жовткових гранул є незначною.

Поблизу жовткових гранул невеликих розмірів виявлено скупчення мітохондрій, які мають розвинені кристи та зовнішні і внутрішні мембрани (рис. 4.7, б). Цитоплазма між такими мітохондріями містить канали агранулярного ендоплазматичного ретикулуму. З наближенням до периферії бластомера кількість жовткових гранул зменшується, а цитоплазма збагачується гіалоплазмою середньої електронної щільності, в якій простежуються рівномірно розміщені травні вакуолі, канали агранулярного ендоплазматичного ретикулуму, значних розмірів мітохондрії (рис. 4.7, в).

Кортикальний шар цитоплазми бластомерів збагачений дрібними каналами агранулярного ЕПР, дрібнозернистою гіалоплазмою. Зауважимо, що у кортикальних шарах бластомерів, цитоплазма яких є електронноосвітлюючою, кількість мітохондрій, порівняно з цитоплазмою електроннощільних шарів, є більшою (рис. 4.7, г), і вони наближені до плазматичної мембрани.

Плазматична мембрана зародків на стадії 16 бластомерів є суцільною, чітко контурованою (рис. 4.7, г). Рельєф поверхні, яку обмежує плазматична мембрана, є хвилеподібним, з дуже малою амплітудою.

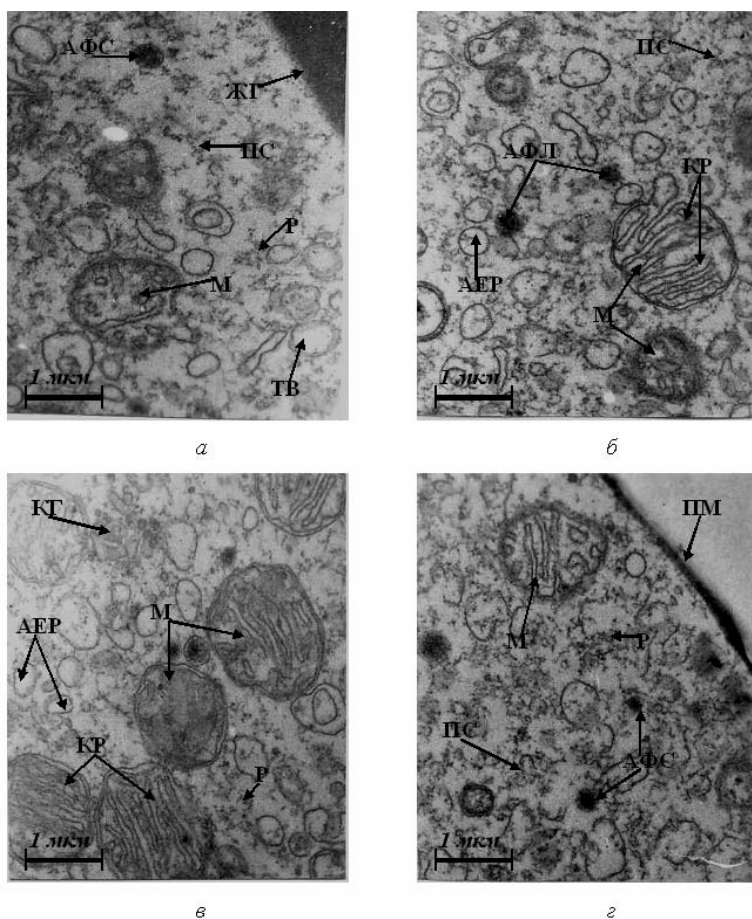


Рис. 4.6. Ультраструктура бластомерів зародків в'юна на стадії розвитку 2 бластомерів за умов впливу катіонів кадмію. Позначення – як на рис. 4.1

Інкубування зародків в'юна від запліднення до стадії 16 бластомерів у середовищі з додаванням катіонів нікелю, концентрація якого становить  $10^{-4}$  М, зумовлює значні зміни ультраструктури цитоплазми. Передусім, це стосується травних вакуоль, які мають досить великі розміри і локалізовані переважно в глибині бластомерів. Значна кількість травних вакуоль прилягає до оболонки жовткових гранул.

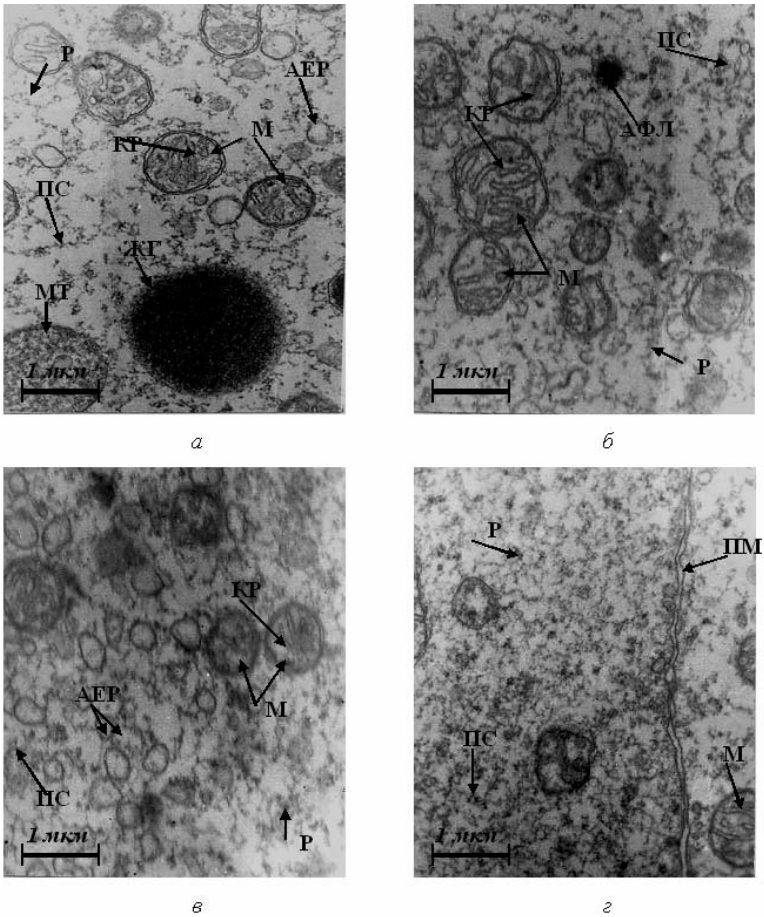


Рис. 4.7. Ультраструктура бластомерів зародків в'юна на стадії розвитку 16 бластомерів у нормальних умовах. Позначення – як на рис. 4.1

У гіалоплазмі, що знаходиться між травними вакуолями, сконцентровані мітохондрії, які перебувають на різних етапах розпаду. Привертають увагу електроннощільні мітохондрії великих розмірів з розвиненою сіткою трубочкоподібних крист і значною кількістю пальцеподібних виростів. У таких мітохондрій зовнішня мітохондріальна мембрана цілісна, тоді як у електронносвітлих мітохондрій кристи і зовнішня мембрана є

розпушеними, а матрикс вакуолізованим. Багато мітохондрій являє собою вакуолеподібні структури, в середині яких знаходяться преципітати і коагуляти, ліпопротеїдні маси (рис. 4.8, а).

Інші ділянки глибоких шарів цитоплазми містять жовткові гранули середніх розмірів, які мають розпушену оболонку, також вони вміщують скупчення мультивезикулярних тілець, автофаголізосоми, мітохондрії невеликих розмірів і середньої електронної щільності (рис. 4.8, б).

У ділянках скупчення мітохондрій спостерігають дезорганізований комплекс Гольджі, канали агранулярного і гранулярного ендоплазматичного ретикулуму, електроннощільні первинні лізосоми, обмежені суцільною мембраною (рис. 4.8, в). Цій ділянці цитоплазми характерна також наявність мітохондрій, які мають розпушені зовнішні і внутрішні мітохондріальні мембрани та кристи, а в матриксі – поодинокі електроннощільні гранули.

Цитоплазма периферійних шарів за умов впливу катіонів нікелю є збідненою на внутрішньоклітинні органели. Гіалоплазма водночас є дезорганізованою і перебуває в стані набряку.

Канали агранулярного ендоплазматичного ретикулуму лізовані, а їхні профілі являють собою преципітати і коагуляти. В кортикальному шарі цитоплазми бластомерів містяться групи мітохондрій, які перебувають на завершальних етапах розпаду. Їхній матрикс вакуолізований, а кристи, зовнішні та внутрішні мембрани, – лізовані, вони набувають вигляду невеликих ліпопротеїдних мас. Плазматична мембрана являє собою електроннощільний суцільний утвір, рельєф якого на більшості

ділянок є плоским і продовжується незначною випуклістю окремих ділянок. До плазматичної мембрани з боку гіалоплазми бластомерів прилягають тонким шаром маси преципітатів і коагулятів (рис. 4.8, з).

Ультраструктура бластомерів зародків в'юна, що інкубувалися за наявності катіонів кобальту є зміненою, порівняно з контролем.

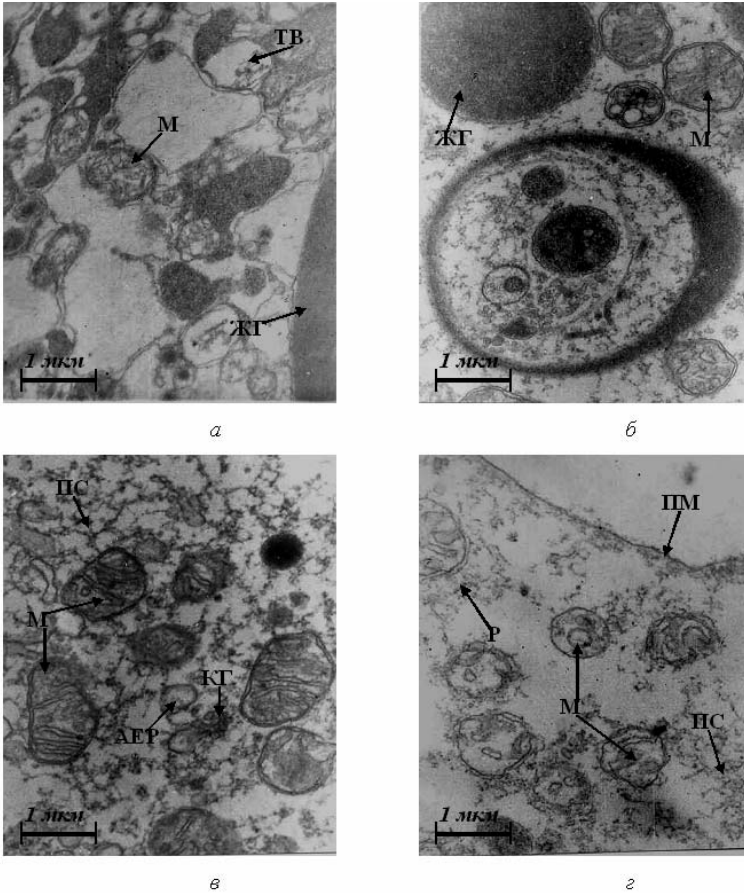


Рис. 4.8. Ультраструктура бластомерів зародків в'юна на стадії розвитку 16 бластомерів за умов впливу катіонів нікелю. Позначення – як на рис. 4.1

Цитоплазма більш розріджена, порівняно з контролем. У ній спостерігаються рибосоми та полісоми нечітких контурів, розширені канали агранулярного ЕПР, поодинокі первинні лізосоми. Також у цитоплазмі міститься велика кількість мітохондрій, зовнішні та внутрішні мембрани кристи, яких у багатьох місцях утворюють преципітати і коагуляти (рис. 4.9, а).

Мітохондрії, що знаходяться в периферійних шарах цитоплазми, є більш пошкодженими, порівняно з мітохондріями глибоких шарів. Мембрани та кристи таких мітохондрій у багатьох місцях утворюють скупчення ліпопротеїдних мас (рис. 4.9, з).

Також у цитоплазмі виявлено поодинокі мультивезикулярні тільця значного розміру (рис. 4.9, б). Жовткові гранули оточені подвійною мембраною, що утворює випинання невеликих розмірів (рис. 4.9, в).

Плазматична мембрана відрізняється слабо вираженою хвилястістю. Це разом з пониженою щільністю цитоплазми свідчить про набряк клітини (рис. 4.9, з). У багатьох місцях плазматична мембрана є розпушеною та перервною.

Інкубування зародків в'юна на стадії 16 бластомерів за наявності катіонів цинку, концентрація якого становить  $10^{-4}$  М, зумовлює незначні зміни ультраструктури цитоплазми у внутрішніх шарах бластомерів. Гіалоплазма набуває низької електронної щільності, канали агранулярного ендоплазматичного ретикулу-му стають дещо розширеними, кількість травних вакуоль зменшена.

До поодиноких, невеликих за розмірами, жовткових гранул прилягають гіпертрофовані комплекс Гольджі і велика кількість дрібних мітохондрій, які мають розпушені мембрани (рис. 4.10, а).



В ділянках скупчення дрібних мітохондрій виявлено також поодинокі автофаголізосоми, канали дезорганізованого агранулярного ендоплазматичного ретикулу (рис. 4.10, б).

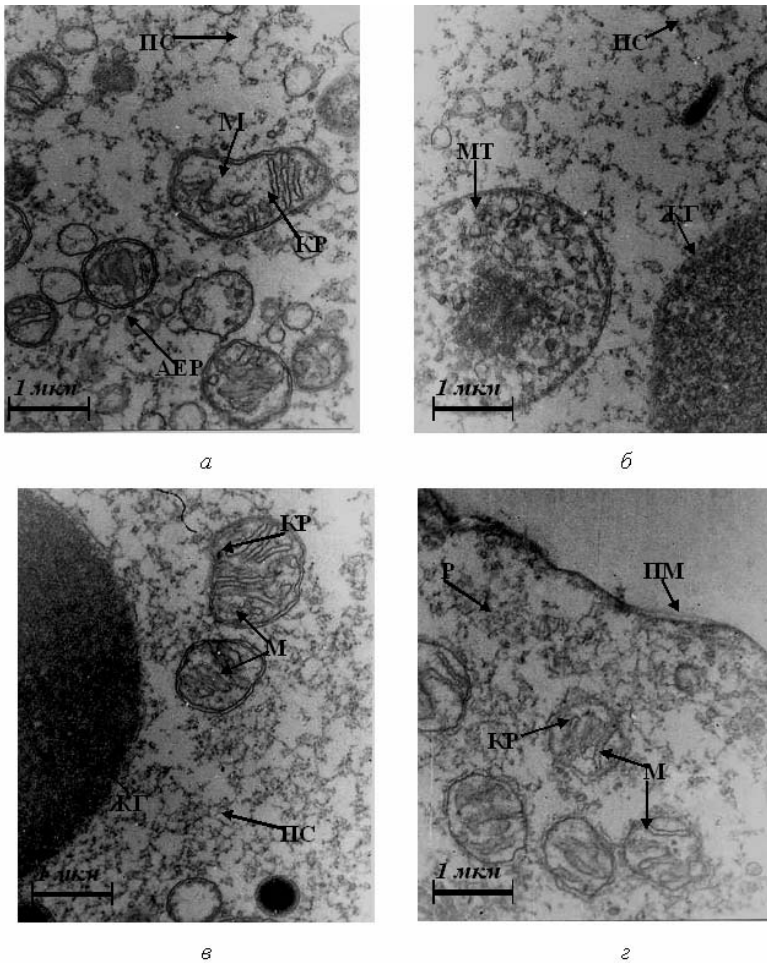


Рис. 4.9. Ультраструктура бластомерів зародків в'юна на стадії розвитку 16 бластомерів за умов впливу катіонів кобальту. Позначення – як на рис. 4.1

У шарах цитоплазми, що знаходяться ближче до поверхні бластомерів зародків, цитоплазма містить значну кількість каналів

гранулярного і агранулярного ендоплазматичного ретикулуму, полісом і рибосом, невелику кількість травних вакуоль малих розмірів, поодинокі мультивезикулярні тільця та скупчення мітохондрій, які мають зменшену електронну щільність і частково розпушені мембрани (рис. 4.10, в). Зауважено, що кортикальний шар цитоплазми у разі впливу катіонів цинку за своїм ультраструктурним організуванням майже не відрізняється від контролю. Розрізняємо в ньому дрібнозернисту гіалоплазму, велику кількість рибосом і полісом. Ця частина цитоплазми вміщує незначно гіпертрофований комплекс Гольджі, по периферії якого знаходиться велика кількість міхурців, заповнених електронно щільним матеріалом, та первинні лізосоми (рис. 4.10, г).

На невеликій віддалі від комплексу Гольджі виявлено каскад мітохондрій значних розмірів з добре розвинутими кристами. Мітохондрії з цього ряду, які є найближче до мікроміхурців комплексу Гольджі, мають дезорганізований матрикс та кристи, що являють собою скупчення ліпопротеїдних мас, тоді як їхні зовнішні і внутрішні мембрани цілісні.

Плазматична мембрана бластомерів є більш тонкою, має хвилеподібну форму, виступи і впадини якої не завжди періодично повторюються.

Інкубування зародків в'юна за наявності катіонів марганцю, концентрація якого становить  $10^{-4}$  М, також змінює ультраструктуру бластомерів зародків, порівняно з контролем.

Цитоплазма має значно знижену електронну щільність, порівняно з контролем, і містить пошкоджені органи та включення (рис. 4.11).

Канали агранулярного ЕПР розширені. Рибосоми та полісоми мають нечіткі контури і трапляється у вигляді скупчень.

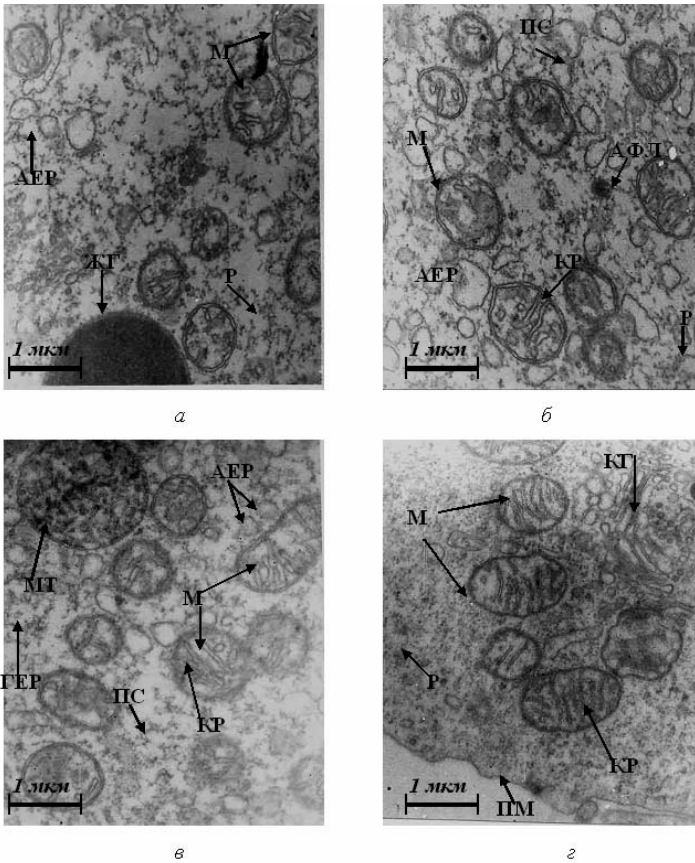


Рис. 4.10. Ультраструктура бластомерів зародків в'юна на стадії розвитку 16 бластомерів за умов впливу катіонів цинку. Позначення – як на рис. 4.1

Більшість мітохондрій має зруйновані зовнішні та внутрішні мітохондріальні мембрани. Кристи мітохондрій – це скупчення преципітатів та коагулятів (рис. 4.11, а). Поряд з такими мітохондріями бувають мітохондрії, які мають непошкоджені мембрани, але їхні кристи зруйновані й утворюють суцільні ліпопротеїдні поля (рис. 4.11, б).

Жовткові гранули мають нечітко виражену оболонку, до якої прилягають скупчення електронно-щільних тяжів (рис. 4.11, в).

У цитоплазмі бластомерів можуть бути поодинокі мультивезикулярні тіลця великих розмірів, частина вмісту яких є лізованою. Також у цитоплазмі спостерігають поодинокі лізосоми (рис. 4.11, з).

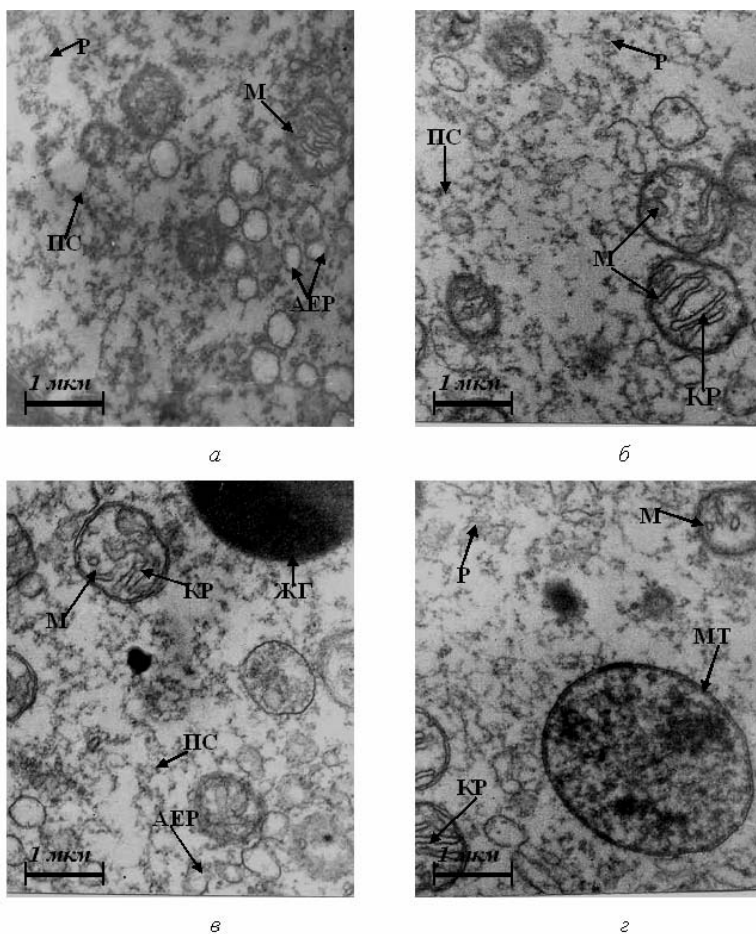


Рис. 4.11. Ультраструктура бластомерів зародків в'юна на стадії розвитку 16 бластомерів за умов впливу катіонів марганцю. Позначення – як на рис. 4.1

Електронна щільність гіалоплазми бластомерів зародків в'юна на шостій годині розвитку за нормальних умов є незначною, а форма бластомерів – кулеподібна. Міжбластомерні простори розширені та заповнені речовиною незначної електронної щільності, дрібнозернистої консистенції (рис. 4.12, а).

Цитоплазма, що прилягає до плазматичної мембрани, має малий вміст цитоплазматичних органел, тоді як з наближенням до центру клітини дрібнозерниста гіалоплазма наповнюється мітохондріями округлої чи овальної форми з чітко контурованими кристами. В безпосередній близькості до мітохондрій виявлено канали агранулярного та гранулярного ЕПР, рибосоми, полісоми (рис. 4.12, б).

У деяких місцях цитоплазми спостерігають ділянки комплексу Гольджі, що являють собою розгалужені системи мікроміхурців, каналів, дрібних первинних лізосом (рис. 4.12, в). На деяких віддаленнях від центральних частин комплексу Гольджі виявлені скупчення розгалуженої системи мікроміхурців та каналців, які, можливо, утворюють видільну систему.

Поверхня бластомерів укрита плазматичною мембраною, рельєф якої нагадує на поперечному перерізі систему випинань та заглиблень приблизно однакової амплітуди. Плазматична мембрана на всьому протязі є чітко контурованою (рис. 4.12, г).

Інкубування зародків в'юна за наявності в інкубаційному середовищі катіонів нікелю, концентрація якого становить  $10^{-4}$  М, протягом п'яти годин зумовлювало зміни ультраструктури бластомерів зародків, порівняно з контролем.

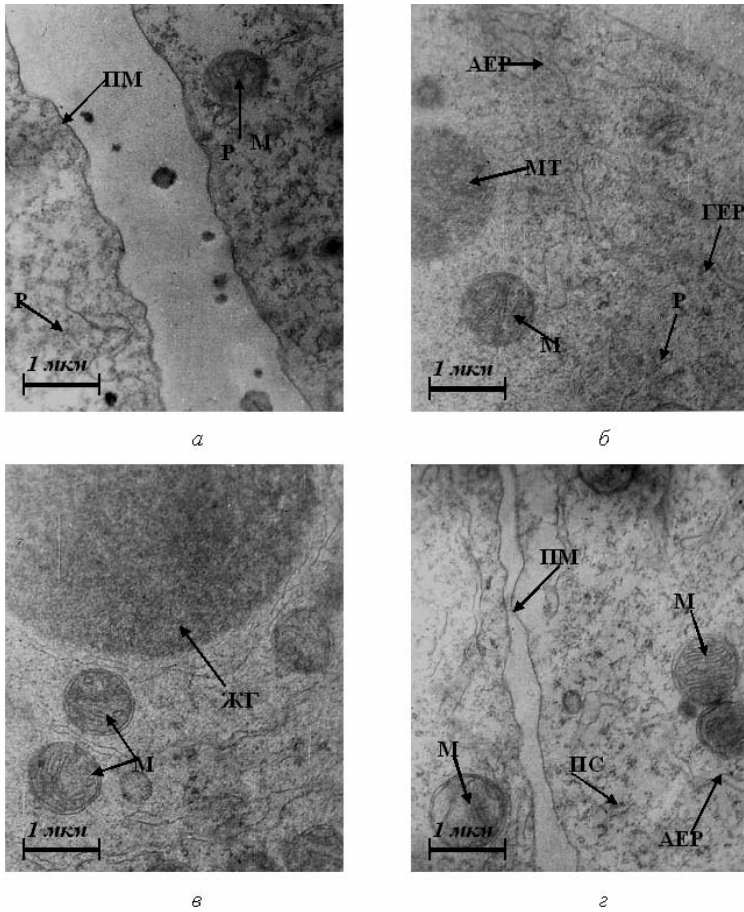


Рис. 4.12. Ультраструктура бластомерів зародків в'юна на шостій годині розвитку в нормальних умовах. Позначення – як на рис. 4.1

Електронна щільність гіалоплазми є зниженою, порівняно з контролем. Бластомери зберігають кулеподібну форму, міжклітинна речовина – дрібнозерниста, але трапляються і великі гранули електроннощільного матеріалу (рис. 4.13, *a*).

Цитоплазма містить мітохондрії, кристи яких в основному зруйновані, мають вигляд преципітатів та коагулятів. Деякі з них – це суцільні ліпопротеїдні поля (рис. 4.13, *б*).

Мітохондрії більш глибоких шарів цитоплазми, що прилягають до жовткових гранул, зберігають цілісність крист, але внутрішні та зовнішні їхні мембрани є частково uszkodженими.

Жовткові гранули мають невисоку електронну щільність, порівняно з попередніми стадіями розвитку (рис. 4.13, в).

Між мітохондріями міститься велика кількість частково дезорганізованих рибосом та полісом, первинні лізосоми, канали гранулярного та агранулярного ЕПР. Також у цитоплазмі наявні скупчення розгалуженої системи мікроміхурців та каналців.

Поверхня бластомерів покрита цитоплазматичною мембраною, яка в деяких місцях є розпушеною та пошкодженою (рис. 4.13, з).

Якщо в середовищі інкубації наявні катіони кобальту, концентрація яких становить  $10^{-4}$  М, ультраструктура бластомерів зародків в'юна на шостій годині розвитку є зміненою, порівняно з контролем.

Гіалоплазмі бластомерів цих зародків характерна низька електронна щільність. Цитоплазма заповнена частково дезорганізованими рибосомами та полісомами, мітохондріями, каналами гранулярного та агранулярного ЕПР, розгалуженою системою міхурців і каналців (рис. 4.14, а).

Жовткові гранули мають нижчу, ніж на більш ранніх стадіях розвитку, електронну щільність.

Мітохондрії мають округлу форму, розміщені невеликими скупченнями, кристи їхні частково розпушені, як і зовнішні та внутрішні мембрани. В деяких місцях кристи мітохондрій майже повністю зруйновані і являють собою скупчення ліпопротеїдного матеріалу (рис. 4.14, б).

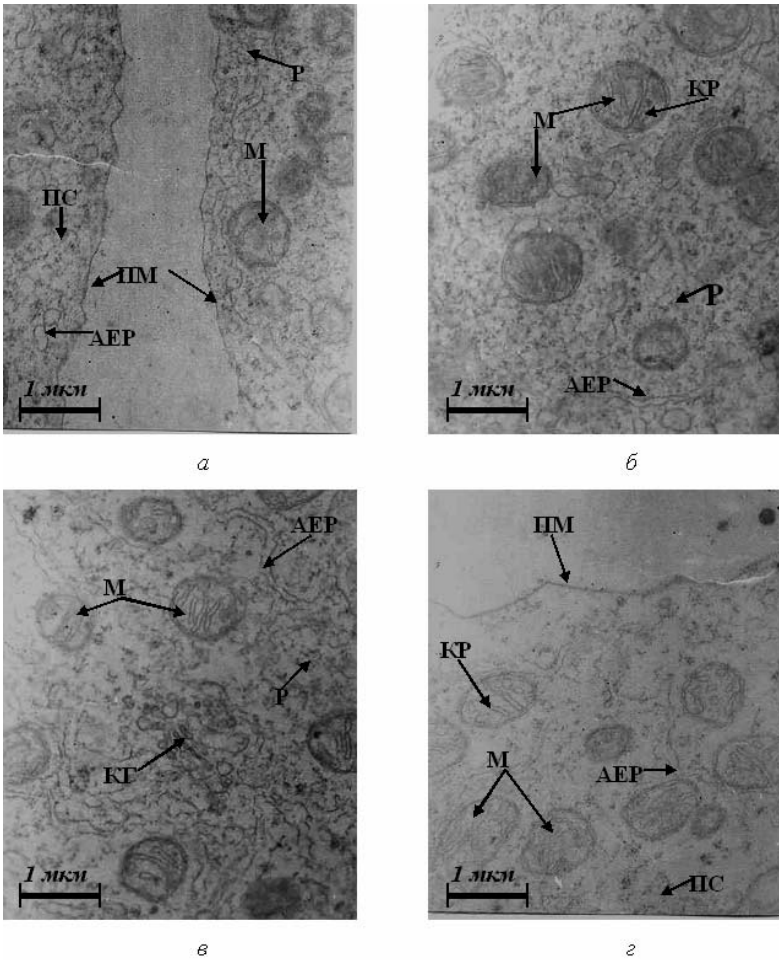


Рис. 4.13. Ультраструктура бластомерів зародків в'юна на шостій годині розвитку за умов впливу катіонів нікелю. Позначення – як на рис. 4.1

Частина мітохондрій, розміщених у безпосередній близькості до частково дезорганізованого комплексу Гольджі, утворює об'єднання з кількох мітохондрій, кристи яких розпушені й утворюють ліпопротеїдні поля. До таких скупчень мітохондрій можуть прилягати травні вакуолі (рис. 4.14, в).



Плазматична мембрана між бластомерами має слабо хвилясту форму, в деяких місцях вона розпушена або пошкоджена. Цитоплазма кортикальних шарів бластомерів має невеликий вміст органел (рис. 4.14, з).

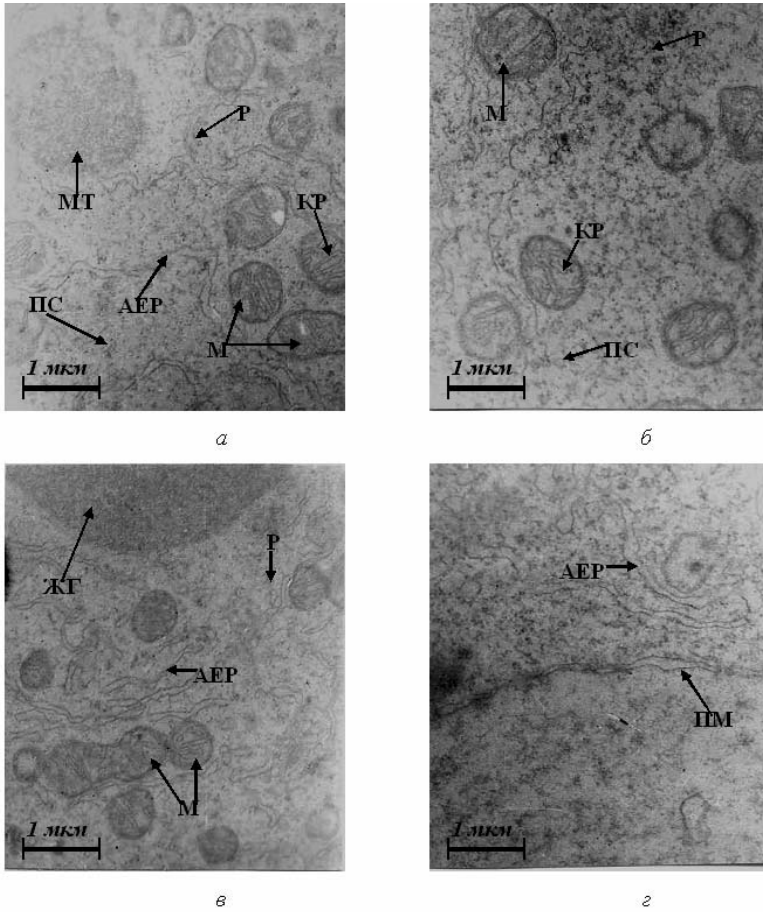


Рис. 4.14. Ультраструктура бластомерів зародків в'юна на шостій годині розвитку за умов впливу катіонів кобальту. Позначення – як на рис. 4.1

Ультраструктура бластомерів зародків в'юна, які піддавалися інкубуванню за наявності в інкубаційному середовищі

катіонів цинку, концентрація якого становить  $10^{-4}$  М, є зміненою, порівняно з контролем.

Електронна щільність гіалоплазми бластомерів незначна. Цитоплазма заповнена рибосомами, полісомами, первинними лізосомами, мітохондріями, кристи яких значно пошкоджені, порівняно з контролем. Органели, як і вся цитоплазма, перебувають у стані набряку (рис. 4.15, а).

Кристи деяких мітохондрій являють собою ліпопротеїдні маси, мембрани розпушені, інколи перервані. До деяких з них прилягають травні вакуолі (рис. 4.15, б).

Жовткові гранули бластомерів цих зародків мають вигляд гранулярного матеріалу невисокої електронної щільності. В безпосередній близькості до таких гранул знаходяться мультивезикулярні тільця (рис. 4.15, б, в).

У цитоплазмі бластомерів спостерігають розгалужені системи мікротрубочок та каналців.

Поверхня бластомерів покрита хвилястої форми мембраною, яка в багатьох місцях є розпушеною або перерваною (рис. 4.15, г).

Інкубування зародків в'юна за наявності в інкубаційному середовищі катіонів марганцю, концентрація якого становить  $10^{-4}$  М, зумовлює зміни ультраструктури бластомерів зародків на шостій годині розвитку, порівняно з контролем. Цитоплазма бластомерів таких зародків містить рибосоми та полісоми, канали гранулярного та агранулярного ЕПР, первинні лізосоми, мітохондрії. Гіалоплазма бластомерів є електроннощільною. Більшість мітохондрій зберігає цілісність крист, зовнішніх і

внутрішніх мембран, але деякі мітохондрії мають розпушені та пошкоджені мембрани та кристи (рис. 4.16, а).

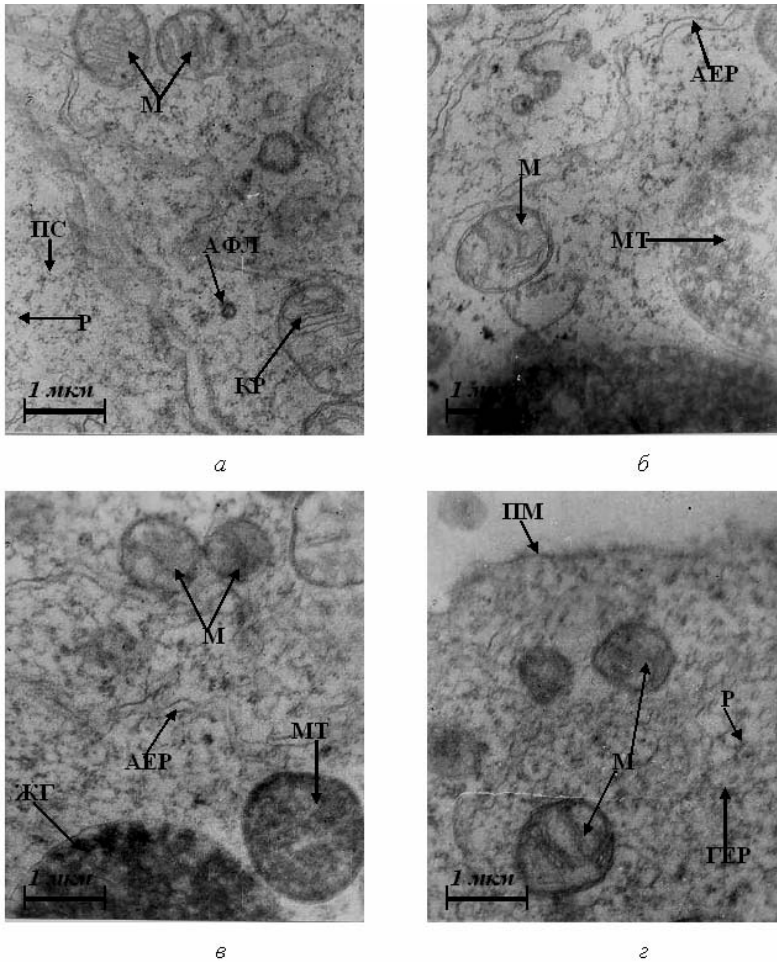


Рис. 4.15. Ультраструктура бластомерів зародків в'юна на шостій годині розвитку за умов впливу катіонів цинку. Позначення – як на рис. 4.1

Жовткові гранули мають високу електронну щільність. У безпосередній близькості від них знаходяться мітохондрії з кристами, що являють собою ліпопротеїдні поля (рис. 4.16, б).

Крім того, поблизу жовткових гранул знаходяться травні вакуолі (рис. 4.16, в).

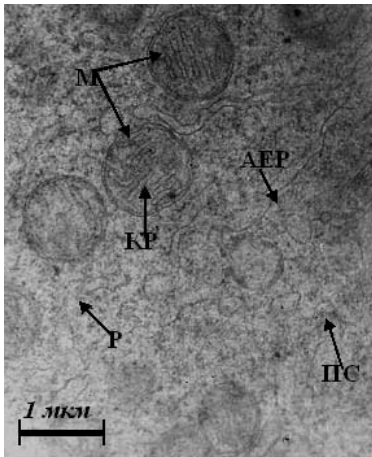
Плазматична мембрана є хвилястою, майже на всьому протязі суцільною. В деяких місцях спостерігають розпушеність та пошкодження окремих ділянок мембран (рис. 4.16, з).

У разі інкубування клітин за наявності катіонів кадмію плазматична мембрана бластомерів є розтягнутою, на поперечному перерізі набирає форми витягнутої нитки, а самі клітини перебувають у стані набряку. Інші бластомери, що знаходяться поряд, на деяких ділянках мають зруйновану плазматичну мембрану, частина кортикального шару цитоплазми відшарована в міжклітинний простір (рис. 4.17, а). Міжклітинний простір заповнений преципітатами та коагулятами.

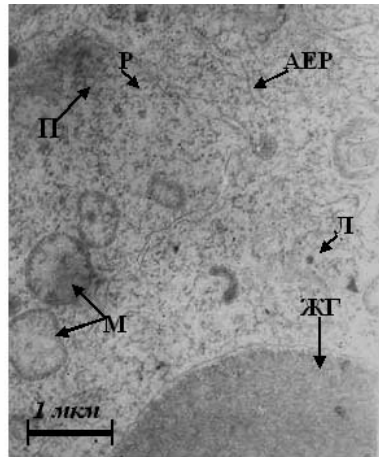
У ділянках зруйнованого шару цитоплазми бластомерів у кортикальних шарах гіалоплазми простежується формування каналів гранулярного ЕПР видовженої форми, що може свідчити про адаптивне пристосування клітини до ефекту пошкодження та заміщення плазматичної мембрани (рис. 4.17, б).

Цитоплазма бластомерів має малий вміст рибосом та полісом, значну кількість мітохондрій округлої форми з розпушеними кристами.

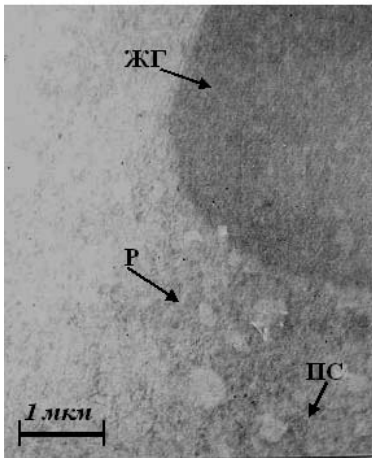
Окремі мітохондрії є вакуолізованими та вміщують преципітати та коагуляти. Між мітохондріями виявлена розгалужена система мікроміхурців, видовжених каналів, мультивезикулярних тілець. В цитоплазмі наявні жовткові гранули невисокої електронної щільності (рис. 4.17, в).



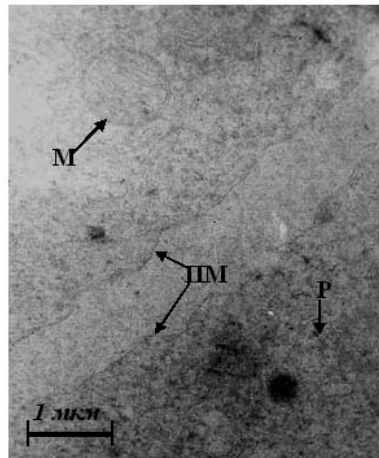
а



б



в



г

Рис. 4.16. Ультраструктура бластомерів зародків в'юна на шостій годині розвитку за умов впливу катіонів марганцю. Позначення – як на рис. 4.1

У ділянках гіпертрофованого комплексу Гольджі виявлено значні скупчення дрібних первинних лізосом, поодинокі первинні лізосоми великого розміру та дезорганізовані мітохондрії (рис. 4.17, г).

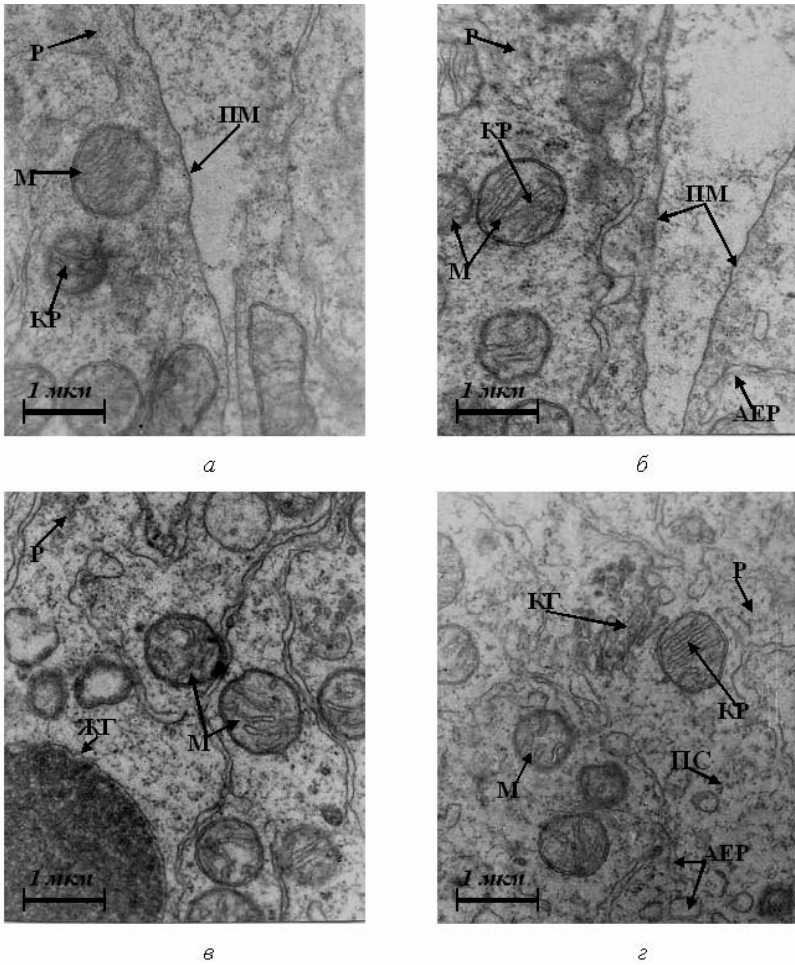


Рис. 4.17. Ультраструктура бластомерів зародків в'юна на шостій годині розвитку за умов впливу катіонів кадмію. Позначення – як на рис. 4.1

Гіпертрофія комплексу Гольджі свідчить про підвищену його діяльність, що направлена на утилізацію пошкоджених ультраструктур та метаболітів.

Підсумовуючи, скажемо, що інкубування зародків в'юна на різних стадіях розвитку за наявності катіонів важких металів

призводить до виникнення значних змін ультраструктури бластомерів зародків, порівняно з контролем. Спостерігаються такі зміни, як пошкодження та дезорганізування органел, гіпертрофія видільної системи (комплексу Гольджі), значний у деяких прикладах набряк цитоплазми та органел, розпушення та пошкодження мітохондріальних і плазматичних мембран (Н.М. Бойко та ін., 2002).

Зауважимо, що, незважаючи на такі значні зміни ультраструктури бластомерів, зародки в'юна, що були інкубовані за наявності катіонів досліджуваних важких металів, зберігали життєздатність, хоча і відставали у розвитку від контрольних. На більш пізніх стадіях (7–10 діб) у 25–30% з них спостерігали наявність певних вад розвитку, малорухливість, сповільнення серцебиття, але відсоток загибелі цих зародків був ненабагато більший, ніж у контролі (Н.М. Бойко, О.А. Гойда, 1996; Н.М. Бойко, Д.І. Санагурський, 2000).

## **Розділ 5. АЛГОРИТМИ ПОБУДОВИ «ЛОГІЧНИХ» СТРУКТУР, СХЕМ, ЯК АНАЛОГ БІОЛОГІЧНИХ ЯВИЩ**

### **5.1 Якісний та порівняльний аналіз динаміки біоелектричних, енергозабезпечувальних і мембранно–транспортних процесів у ранньому ембріогенезі в'юна та шпорцевої жаби**

З метою дослідження особливостей динаміки біоелектричних і метаболічних процесів та з'ясування часового організування між ними на стадії дроблення зародків риб та амфібій нами проведено математичний аналіз аперіодичних та періодичних змін параметрів, якими описують ці процеси.

Відомо, що часове організування полягає у сукупності всіх ритмічних процесів, які відбуваються у біосистемах, що



взаємодіють, узгоджуються в часі між собою та зі змінними умовами середовища (Ю.А. Романов, В.В. Маркіна, 1989). Вважають, що ритмічні зміни відтворюють діяльність регуляторних механізмів у підтриманні гомеостазу, тоді як аперіодичні (зміни загального рівня) – діяльність, спрямовану на зміну рівня функціонування різних процесів (Н.Б. Игошева и др., 2001). Останнє твердження узгоджується з отриманими нами результатами крос-кореляційного аналізу аперіодичних змін біоелектричних і метаболічних характеристик зародків в'юна та шпорцевої жаби.

Для зародків в'юна у першій серії крос-кореляційного аналізу (табл. 5.2) нами виявлено 12 статистично значимих кореляційних залежностей між досліджуваними показниками. Як й інші автори (Л.С. Мильман, Ю.Г. Юровицкий, 1973; Д.І. Санагурський, 1983; Е.А. Гойда, 1993) ми виявили позитивні кореляції між АП–ТМП, ШГ–ШПК, ТМП–ШПК, а, крім цього, між біоелектричними параметрами з ШГ і АК, АК з ШПК та негативні достовірні кореляції між ТМП і АК з КЗ. Ці результати свідчать про те, що гіперполяризація зародкової мембрани супроводжується підсиленням інтенсивності процесів енергетичного метаболізму, а також підтверджують відомі експериментальні дані про те, що джерелом енергії у певний період розвитку зародків тварин є зазвичай глікоген (Л.С. Мильман, Ю.Г. Юровицкий, 1973; Ю.Г. Юровицкий и др., 1996; Ю.Г. Юровицкий, 1999). Цілком зрозумілими є кореляційні зв'язки між АК з іншими показниками (рис. 5.1), оскільки цей фермент відіграє головну роль у регулюванні метаболізму і, зокрема, значною мірою її активністю

регулюється обмін гліколізу, процеси транскрипції і трансляції (Л.В. Рябова, С.Г. Васецкий, 1996, 2000; Е.А. Земсков и др., 1998).

Щодо механізму змін середнього рівня ТМП, то гіперполяризація плазматичної мембрани бластомерів може бути пов'язана зі змінами розміру зародкових клітин, об'єм яких з кожним поділом зменшується. Можливість цього механізму підтверджується у роботі Веренінова зі співавт. (А.А. Веренинов, 1986), де промодельовано зв'язок між змінами ТМП та вмістом у клітині води (клітинним об'ємом).

Разом з тим, у десяти прикладах може бути ймовірність причинно-наслідкових зв'язків (рис. 5.1) між змінами певних показників. Усім виявленим часовим співвідношенням характерні довготривалі зсуви 30–60 хв (оскільки інтервал квантування становив 30 хв). Звідси зрозуміло, що зміни досліджуваних показників відображають події, які відбуваються на рівні макроорганізму, та часові взаємозв'язки між ними. Таке припущення узгоджується з результатами експериментальних досліджень.

Доведено, що починаючи зі стадії 32-х бластомерів, відбувається активне перенесення з жовтка у бластодерму глікоген-фосфорилазного комплексу (Л.С. Мильман, Ю.Г. Юровицкий, 1973; Ю.Г. Юровицкий, 1999), яке супроводжується збільшенням швидкості гліколізу. У цей же час у зародків в'юна між бластодиском та жовтком відбувається формування перибласту, за рахунок якого здійснюється активне засвоєння компонентів жовтка (Е.І. Furshpan, D.D. Potter, 1968). Крім того, зміни інтенсивності дихання у цей час можуть бути опосередковані змінами в ультраструктурі популяції мітохондрій, оскільки

встановлено, що зі стадії 16-ти бластомерів змінюється співвідношення між паличкоподібними та кулястими мітохондріями, зокрема, збільшується кількість перших (М.Ю. Сухомлинова и др., 2000). Ці дані дають змогу пояснити також отримані нами результати сильної достовірної кореляції між змінами ТМП та ШПК, яку спостерігають під час довготривалих зсувів, у період розвитку 16–32 бластомерів, що узгоджується також з даними крос-кореляційного аналізу коливних складових цих показників.

Отже, виявлені часові співвідношення між динамікою тренду біоелектричних і метаболічних показників, імовірно, пов'язані з морфологічними процесами, що супроводжують розвиток зародків в'юна.

Аналогічне пояснення мають деякі отримані результати крос-кореляційного аналізу з п'ятихвилинним інтервалом квантування значень характеристик, якими описують зміни середнього рівня біоелектричних, метаболічних та регуляторних факторів у ранньому ембріогенезі в'юна. У результаті цього аналізу виявлено ймовірність наявності 32-х достовірних причинно-наслідкових зв'язків, які описано у підсумкових таблицях 5.1–5.6, де вказано максимальні достовірні значення коефіцієнтів крос-кореляції ( $R_{xy}$ ) і часові зсуви ( $t$ ), при яких їх спостерігають. Індeksi  $R_{xy}$ :  $x$  – показник першого стовпчика,  $y$  – показник першого рядка; \*\* –  $p < 0.01$ , \* –  $p < 0.05$ .

Як і в попередньому аналізі виявлено достовірні крос-кореляційні зв'язки, що простежуються при довготривалих зсувах між змінами рівнів:  $pH_d$  з усіма іншими показниками (крім зв'язку з серотоніном),  $[Ca^{2+}]_v$  з активністю ЛДГ і ШПК, а також між

активністю ізЦДГ і ШПК. Аналіз зсувів засвідчує, що ці зв'язки, найімовірніше, пов'язані з процесом запліднення (В.П. Божкова, 1986).

Таблиця 5.1

Крос-кореляційні зв'язки між біоелектричними та метаболічними характеристиками зародків в'юна

Показники кореляції, $R_{xy}$	ТМП	$Ca^{2+}$	$pH_{ц}$	Із ЦДГ	$\alpha$ -КГДГ	СДГ	ЛДГ	ШПК	5-НТ
ТМП	–	0,84**	0,76**	–	–	-0,87**	–	0,74**	-0,55**
t, хв	–	5	25	–	–	5	–	80	5
$pH_{ц}$	–	-0,54*	–	–	–	–	-0,53**	0,66**	–
t, хв	–	25	–	–	–	–	40	25	–
Із ЦДГ	-0,80**	-0,86**	-0,72**	–	–	0,71**	–	-0,50**	–
t, хв	5	5	45	–	–	5	–	80	–
$\alpha$ -КГДГ	–	-0,70**	-0,40*	–	–	–	–	–	–
t, хв	–	10–30	55	–	–	–	–	–	–
СДГ	–	-0,86**	-0,60**	–	–	–	–	-0,79**	–
t, хв	–	5	25	–	–	–	–	5	–
ЛДГ	–	-0,50*	–	0,50*	–	0,39**	–	-0,42**	–
t, хв	–	30	–	25	–	10	–	10	–
ШПК	–	-0,58**	–	–	-0,74**	–	–	–	0,80**
t, хв	–	40	–	–	5	–	–	–	20
5-НТ	–	-0,44*	0,52*	0,46*	0,54*	0,50*	0,51*	–	–
t, хв	–	5	5	10	5	5	5	–	–

Відомо, що під час запліднення відбувається зростання  $pH_{ц}$  на 0,2–0,3 од., яке можливо регулює біосинтетичні процеси, транспортування речовин через мембрани (В.П. Божкова, 1986), збільшення мембранної провідності для іонів  $K^+$  (S.S. Shen, R.A. Steinhardt, 1978). Водночас короткочасно збільшується  $[Ca^{2+}]_в$  (за рахунок активування інозитолтрифосфатного шляху), що бере участь у підсиленні поглинання кисню, пов'язаного з окисненням ненасичених жирних кислот (D.V. Epel, 1980).

Отже, ці дані дають змогу пояснити виявлені часові співвідношення між певними показниками, але разом з тим не можна стверджувати про те, що зміни одних показників є безпосередньою причиною змін інших.

На підставі аналізу кореляційних залежностей, причину слід шукати у спільних факторах, які однаково впливають на зміни тих чи інших процесів. Як свідчать факти, які наведено у огляді Божкової (В.П. Божкова, 1986), можлива незалежність змін одних показників від інших. Наприклад, збільшення  $[Ca^{2+}]_v$  та  $pH_c$  є наслідком метаболізму фосфогліцеридів, що відбувається двома різними шляхами: через діацилгліцерид та інозитолтрифосфат (M.J. Berridge, 1984).

Діацилгліцерид функціонує в мембрані, активуючи протеїнкіназу C та  $Na^+/H^+$ -обмін, а інозитолтрифосфат дифундує з мембрани в цитоплазму та сприяє вивільненню  $Ca^{2+}$  з внутрішньоклітинних депо.

Доведено, що активність протеїнкінази C веде до залуження цитоплазми у яйцеклітинах морського їжака не впливаючи на процеси, що відбуваються за рахунок збільшення  $[Ca^{2+}]_v$  (K. Swann, M. Whitaker, 1985).

Оскільки йони  $Ca^{2+}$  є найбільш універсальним вторинним посередником, виявлені крос-кореляційні зв'язки за п'ятихвилинним зсувом між ТМП- $Ca^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ -ізЦДГ, СДГ реалізуються на рівні молекулярних механізмів.

Зокрема, встановлено, що зміни цитозольної концентрації  $Ca^{2+}$  мають вплив на мітохондріальну фізіологію, оскільки регулюють окиснювальний метаболізм впливаючи на окремі

матриці дегідрогеназ (С.V. Ammini, W.W. Haus wirth, 1999), а також на інтенсивність перикисного окиснення ліпідів (И.О. Мукалов и др., 1984), регулювання мембранної провідності та ін. (П.Г. Костюк, 1978; С.Э. Шноль, 1979; П.Г. Богач і ін., 1984; М.Д. Курський, С.М. Кучеренко, 1993; П.Г. Костюк /за ред. і ін., 2001).

Виявлені крос-кореляційні зв'язки між динамікою концентрації серотоніну з іншими досліджуваними показниками, в яких динаміка серотоніну проходить з деяким упередженням на 5–10 хв до змін інших показників (табл. 5.1.). На сьогодні відомо, що донервовий 5-НТ (5-гідрокситриптамін) може брати участь у сегрегації цитоплазми та клітинних поділах. Внутрішньоклітинними ефекторами в реалізації обох функцій служать елементи цитоскелета (Г.А. Бузников, 1987). Одержано також дані про можливість функціонального взаємозв'язку серотоніну та нейропептидів у регуляторних процесах ембріогенезу (А. Виллоуз и др., 2000). Звідси зрозумілою є кореляція між серотоніном і  $Ca^{2+}$ , оскільки йони кальцію беруть участь у полімеризації та скороченні актинових мікрофіламентів, які входять до складу примембранного кортикального шару цитоплазми (В.П. Божкова, 1986). Цей зв'язок може бути опосередкований через аденілатциклазну систему за участю вторинних месенджерів – іонізованого кальцію або фосфатидилінозитидів. Підтвердженням цьому є виявлені у мембранах ооцитів морських їжаків функціонально активні поверхневі рецептори до біогенних моноамінів (Н.Е. Ламаш и др., 1994).

Із досліджень диференційованих клітин відомо, що дія серотоніну реалізується через вплив на аденілатциклазну систему,

змінюючи у клітинах цитозольну концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$ , що забезпечує клітинну відповідь через  $\text{Ca}^{2+}$ -залежні протеїнкінази (З.П. Кометиани, Г.М. Джариашвили, 1975). Через зміни  $[\text{Ca}^{2+}]_v$  можуть також опосередковуватися зв'язки між ТМП і серотоніном. Невідомими є виявлені нами кореляційні зв'язки між змінами цього показника та активністю ферментів циклу Кребса, ЛДГ та ШПК у період дроблення зародків різних тварин. Ці дані свідчать, що збільшення концентрації серотоніну супроводжується збільшенням активності ізЦДГ,  $\alpha$ -КГДГ, СДГ, ЛДГ та ШПК. Можливо, ці зв'язки пов'язані з регулюванням швидкості дихання, як це виявлено для диференційованих клітин (М.Н. Кондрашова, Е.В. Григоренко, 1985). Оскільки при підсиленні швидкості дихання, що пов'язане з викидом адреналіну, активуються процеси його гальмування, одним з факторів яких є продукти окислення серотоніну. Ймовірно, що це має місце й у зародків риб, оскільки виявлено закономірні зміни не лише серотоніну, але катехоламінів та ацетилхоліну під час дроблення зародків різних тварин (Г.А. Бузников, 1987). Усі ці медіатори, ймовірно, виконують важливу роль у складному ланцюгу регуляторних механізмів на ранніх стадіях ембріогенезу. Бузников із співр. (Г.А. Бузников, 1987) у дослідях на морських їжаках, застосовуючи інгібіторний аналіз, довели участь серотоніну в регулюванні білкового синтезу у зародків на стадії дроблення.

Одержані нами результати свідчать про можливість участі серотоніну в регулюванні процесів дихання зародків риб, інтенсивності біосинтетичних процесів та гіперполяризації мембрани.

Відомі достовірні крос-кореляції між змінами вмісту  $K^+$  і  $Na^+$ , співвідношенням  $K^+/Na^+$  у зародку та динамікою ТМП, ТМП і концентрацією цитозольного  $Ca^{2+}$ , а також встановлені кореляції між динамікою процесів, які зумовлюють зміни поляризації зародкових мембран (перерозподіл вмісту  $K^+$ ,  $Na^+$ , співвідношення  $K^+/Na^+$  у зародку) з одного боку, та зміни інтенсивності енергетичного метаболізму – з іншого, у зародків в'юна та в зародків шпорцевої жаби (рис. 5.22 і 5.23). За результатами спектрального аналізу виявлено близькість періодів коливань ТМП і концентрації цитозольного  $Ca^{2+}$  з тривалістю клітинних циклів у обох об'єктів.

Відомі відмінності у часових співвідношеннях між змінами  $pH_c$  та біоелектричними показниками (рис. 5.23) цих об'єктів. Між цими показниками у шпорцевої жаби спостерігаються достовірні крос-кореляційні залежності з зсувом від 5 до 35 хв. На відміну від цього об'єкту у в'юна виявлено періодичність виникнення крос-кореляційних зв'язків із тридцятихвилинним ритмом. Ці результати підтверджені спектральним аналізом динаміки  $pH_c$ . На відміну від виявленої періодичності динаміки  $pH_c$  у в'юна з періодом 31 хв ( $p < 0.05$ ), у зародків шпорцевої жаби спектральний аналіз засвідчив, що зміни цього показника на досліджуваному інтервалі часу можуть бути випадковими флуктуаціями.

Реалізація цих зв'язків, очевидно, також пов'язана з морфологічними процесами, що супроводжують дроблення зародків, оскільки більшість з них виявлено за довготривалими часовими зсувами в обох об'єктів.



Підтвердженням сказаному можуть бути зміни вмісту йонів  $K^+$  та  $Na^+$  у зародку, що виявлено на ранніх стадіях ембріогенезу різних тварин. У костистих риб збільшується вміст  $K^+$  за рахунок переходу його з жовтка у бластодиск приблизно у три рази, до стадії бластули, що доведено з використанням методу полум'яної фотометрії (Д.Р. Бериташвили и др., 1969, 1970, 1973, 1974). В амфібій встановлено, що вміст  $K^+$  у клітинах постійний, а  $Na^+$  зменшується внаслідок виходу його в бластоцель (Д.Р. Бериташвили и др., 1974). Ці результати свідчать про те, що відношення  $K^+/Na^+$  зростає протягом раннього розвитку костистих риб та амфібій.

Цілісна картина одержаних результатів засвідчує універсальність часового організування динаміки метаболічних і біоелектричних процесів на ранніх стадіях ембріогенезу риб та амфібій. Крім того, це свідчить про те, що динаміка ТМП, перерозподілу вмісту  $K^+$ ,  $Na^+$ , співвідношення  $K^+/Na^+$  та інтенсивності енергетичного метаболізму, яка є властива зародкам, не залежить від типу дроблення та будови зародків тварин: повного нерівномірного з утворенням амфібластули у шпорцевої жаби та часткового рівномірного з утворенням дискобластули у в'юна.

Результати проведеного аналізу коливних складових досліджуваних показників зародків в'юна свідчать, що не всі вони мають тривалість періоду, близьку до тривалості клітинних циклів при  $21^\circ C$ , яка дорівнює 31,5 хв. Зокрема, виявлено, що періоди коливань ТМП,  $Ca^{2+}$ ,  $pH_c$  та активності ізоцитратдегідрогенази є близькими до тривалості поділів.

Активність  $\alpha$ -КГДГ має період приблизно у два рази більший від коливань названих показників. Змінам активності СДГ, ЛДГ та ШПК властивий квазіперіодичний характер, оскільки в їхній динаміці за допомогою спектрального аналізу виявлено наявність декількох періодичних складових, одна з яких є близькою до тривалості клітинних поділів. Відомо, що коливання активності ферментів визначають не тільки за змінами їхнього вмісту в клітині, скільки за змінами стану молекул (В.Я. Бродский, 2000). Коливних змін вмісту серотоніну в зародках не виявлено, хоча графічне зображення засвідчує різке збільшення вмісту серотоніну в зародках в'юна через кожні 60 хв протягом трьох поділів дроблення. Це пов'язано з дуже короткою тривалістю вимірів цього показника.

За результатами автокорелограм, періодограм ТМП, рН<sub>c</sub> та активності ізЦДГ виявлено нестабільність тривалості визначених періодів їхніх коливань. Це очевидно зі змін максимальних значень коефіцієнтів автокореляції відносно часового зсуву на автокорелограмах. Значну варіативність тривалості коливань з періодом близько години описано різними авторами для швидкості білкового синтезу, змін білкової маси клітин (В.Я. Бродский, 1998, 2000), активності ЛДГ (G.M.N. Ferreira, 1994) та інших ферментів (G.M.N. Ferreira, 1994; В.Я. Бродский, 2000; J. Calvert-Evers, 2000). Крім того, відомим є феномен циркадності, що проявляється у нестабільності періоду добових ритмів (Н. Агаджанян., Н. Шабатура, 1989; Ю. Ашофф, 1984). Вважають, що значимість як циркадних (Н.А. Агаджанян, Н.Н. Шабатура, 1989), так і коливань з періодом близько години (В.Я. Бродский,

1998, 2000) може бути пов'язана не лише з гомеостазом, а головню з пристосуванням клітин, пошуком оптимальних умов життєдіяльності.

Результати крос-кореляційного аналізу показників ТМП,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{pH}_{\text{ц}}$ , ізЦДГ узгоджуються з даними їхнього автокореляційного та спектрального аналізів. Так, достовірно сильна кореляція, яка є майже стабільною за величиною, простежується між такими часовими рядами: ТМП–  $\text{pH}_{\text{ц}}$ , ТМП–ізЦДГ,  $\text{Ca}^{2+}$ –  $\text{pH}_{\text{ц}}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ – ізЦДГ,  $\text{pH}_{\text{ц}}$ –ізЦДГ. Ці дані свідчать про стійкий зв'язок між періодичними складовими названих показників з періодом приблизно 30–35 хв. У математичних дослідженнях взаємозв'язку осциляторів із близькими періодами коливань встановлено, що лише два стани між осциляторами можуть бути стійкими, коли коливання відбуваються у фазі або у протифазі (Т. Павлідис, 1984). Тому можна вважати стійкими взаємозв'язки між коливаннями таких показників: ТМП– $\text{pH}_{\text{ц}}$  та  $\text{Ca}^{2+}$ –ізЦДГ відбуваються у фазі, а ТМП–ізЦДГ,  $\text{Ca}^{2+}$ – $\text{pH}_{\text{ц}}$  – у протифазі.

На крос-корелограмах між активністю СДГ, ЛДГ і ШПК із вказаними попередньо показниками виявлено квазіперіодичну появу крос-кореляцій з періодом у межах 30–40 хв, достовірні максимуми яких ( $p < 0,05$ ) спостерігаються на нетривалих інтервалах дослідження при часових зсувах певного ряду в обох напрямках, що може свідчити про тенденцію до синхронності динаміки цих показників, але не на всьому інтервалі дослідження. Оскільки квазіперіодичний характер нами виявлено для функціонально пов'язаних показників енергетичного метаболізму, динаміці яких властиві автоколивання (Е.Е. Сельков, 1970, 1978),

одержані нами результати можна пояснити на основі модельних досліджень автоколивних систем (Ю.М. Романовский и др., 1984), у яких можливе встановлення синхронного режиму. Причому все середовище синхронізується надвисокочастотним елементом, тобто більш високочастотні коливання виживають, а низько-частотні згасають, що пояснює результати крос-кореляційного аналізу цих показників.

Виявлено взаємну невідповідність періодів коливань ТМП та ШПК на початку періоду дроблення та майже подібну періодичність після 150 хв розвитку зародків в'юна, оскільки спостерігався неоднаковий характер появи крос-кореляцій між цими показниками протягом досліджуваного інтервалу часу. Ці результати засвідчують, що ступінь спряженості між коливаннями ТМП та ШПК зростає залежно від біологічного віку зародків. Це може свідчити про те, що механізм формування коливань кожного з цих показників є автономним, але наявні спільні фактори, за рахунок яких зміни обох показників стають більш узгодженими в часі, особливо після стадії 16–32-х бластомерів.

Про це може свідчити також проведений аналіз динаміки цих показників при блокуванні поділів під впливом колхіцину. У цих умовах виявлено десятикратне збільшення інтенсивності коливань, причому параметри коливань ТМП стабілізуються, дещо видовжується їхній період (39 хв), а осциляція ШПК значно сповільнюється та стає аперіодичною. Якщо є факти про те, що колхіцин не порушує коливань метаболічних процесів під час дроблення зародків морських їжаків (И.С. Никольская и др., 1967; Y. Mano, 1968), коливань  $[Ca^{2+}]_v$  (A.M. Hosie, D.B. Sattelle, 1996),

хвиль скорочення кортексу (K. Nara et al., 1980), який містить кальмодулін (M. Ishikawa, T. Kohno, 1984), ми схилиємось до думки, що можлива залежність між коливною динамікою названих процесів, які, ймовірно, відіграють певну роль у формуванні коливань біоелектричних процесів. Механізм цих коливань може також опосередковуватись через механочутливі канали, про що роблять припущення різні дослідники (И.Р. Медына и др., 1988; I. Medina, P. Bregestovski, 1991). Відомі дані й про залежність механочутливої активації цих каналів від білків кортикального цитоскелета (Y. Zhang et al., 2000).

Регуляторні властивості зародків в'юна на стадії дроблення є дуже високими. Про це свідчить той факт, що з видаленням 75 % жовтка вони нормально розвиваються, лише менші за розмірами (Е.Г. Корвин-Павловская и др., 1996).

Аналогічні результати щодо аналізу динаміки досліджуваних процесів було отримано при оцінюванні коливань ТМП та ШПК за розвитку зародків в'юна при температурах 16 та 21 °С. На крос-корелограмах коливних складових цих показників поява максимумів кореляції характеризується квазіперіодичністю з неоднаковою силою зв'язків протягом досліджуваного інтервалу часу. Наявність достовірної сильної кореляції можлива лише на певних інтервалах часу, приблизно рівних 40–120 хв у прямому напрямку та 25–90 хв – у зворотному. Ймовірно, між процесами, які зумовлюють коливну динаміку цих показників, відбувається синхронізація не на всьому досліджуваному періоді часу, а лише на деяких його ділянках, тривалість яких збільшується зі зростанням температури. Цікавою є виявлена залежність між середньою

швидкістю поділів у клітин ранніх зародків ссавців та тривалістю їхнього життя – чим повільніше відбувається проліферація на початкових етапах розвитку, тим довшою є тривалість життя тварин (Л.Ю. Прохоров, 1999).

У результаті наших досліджень з'ясовано, що за нормальних умов розвитку зародків в'юна основною властивістю коливної динаміки метаболічних і біоелектричних характеристик є її значна нерегулярність, що проявляється у варіативності тривалості періодів коливань, неповному збігу їхніх величин між собою, причому для більшості метаболічних характеристик виявлено квазіперіодичний характер динаміки. Аналіз крос-корелограм названих характеристик свідчить про наявність сильної взаємної спряженості їхньої ритміки з періодом у межах 30–35 хв, що спостерігають на коротких інтервалах часу і що може свідчити про майже синхронність змін показників у цей час протягом періоду дроблення.

Цілком іншу закономірність засвідчують результати оцінення динаміки метаболічних і біоелектричних процесів у екстремальних умовах розвитку зародків в'юна. За одержаними результатами оцінення коливань ТМП та ШПК при температурі 24 °С можна відмітити, що появі аномалій розвитку зародків в'юна передують значне спрощення коливного режиму функціонування біоелектричних та метаболічних процесів, яке проявляється у тому, що величина періодів коливань цих показників стає майже ідентичною, а самі коливання – значною мірою синхронними протягом усього періоду дроблення зародків ( $p < 0,01$ ). Це підтверджує їхня крос-корелограма (рис. 5.2, 5), яка має форму,

близьку до гармонічних синусоїдальних коливань з тим самим періодом. Крім того, різко змінюються фазові співвідношення коливної динаміки досліджуваних процесів: вони відбуваються майже синфазно.

Отримані результати аналізу динаміки досліджуваних характеристик за екстремальних умов розвитку узгоджуються з оціненням коливної динаміки циркадної ритміки у разі патології, для визначення якої запропоновано використовувати структуру ритмів (Н.И. Моисеева, 1978). Зазначено, що добрий прогноз при захворюванні дає змогу зробити структура, в якій чітко сформований рисунок кривих, великий розмах коливань значень параметра, добрий збіг положень максимумів і мінімумів на осі часу при дослідженні протягом трьох діб. Водночас дуже сильна синхронізація є небажаною для організму (Н.И. Моисеева, 1978). Аналогічними є дані про те, що збільшення регулярності та періодичності в електрокардіограмах передують нападам стенокардії, інфаркту міокарда, раптовій смерті (A.L. Golgberger, B.J. West, 1987). Численні спостереження ритмічної активності серцево-судинної та нервової систем також свідчать про те, що “резерв частот” і “гнучкість функції” є загальною ознакою стану здоров'я, тоді як стабілізація періоду коливань є ознакою патологічного стану (R. Pool, 1989; T. Elbert, 1993; В. Бродский, 1998; Н. Игошева и др., 2001).

Те, що періодична поява кореляцій стабільна за величиною лише на певних інтервалах часу дослідження, можна пояснити нелінійністю змін показників, нестабільністю періодів їхніх коливань та наявністю різних періодичних складових у динаміці

певних показників, що засвідчили результати спектрального аналізу їхньої динаміки. Це також може означати значну лабільність зв'язків між коливаннями досліджуваних показників. Аналогічна лабільність зв'язків між ритмами спостерігається також й у аналізі експериментальних даних у циркадних системах (М. Мур-Ид, Ф. Салзмен, 1984). Автори це пояснюють пасивною реакцією ритмів на маскувальний вплив факторів як зовнішнього, так і внутрішнього середовища.

Відомо, різні моделі організування циркадної системи множинних осциляторів, які утворюють, або не утворюють, ієрархічну структуру (М. Мур-Ид, Ф. Салзмен, 1984). Оскільки досі не виявлено єдиного пейсмекера коливань з періодом близько години та, враховуючи отримані нами результати, можна припустити, що часове організування біоелектричних і метаболічних процесів у ранньому розвитку зародків тварин складається з багатьох потенційно незалежних осциляторів, у якому ні за одним із осциляторів не закріплена постійна функція провідного пейсмекера (М. Мур-Ид, Ф. Салзмен, 1984). Внутрішню синхронність підтримують різні посередники, здатні контролювати період та фазу різних осциляторів на основі зворотних зв'язків між ними. Вони можуть синхронізувати осцилятори шляхом активного "захоплення" (М. Мур-Ид, Ф. Салзмен, 1984). Такими посередниками, на нашу думку, можуть бути йони кальцію, біогенні аміни, циклічні нуклеотиди і, можливо, серотонін, оскільки відомо, що він може перетворюватись у мелатонін, який є універсальним регулятором добових біоритмів (В.А. Барабой, 2000). Крім того,



доведено наявність на ранніх стадіях ембріогенезу різних поліпептидних факторів росту, через дію яких відбувається запуск посередників та регулювання клітинних поділів під час дроблення (С.И. Кусень и др., 1975; E.R. Froesch et al., 1985; P.C. Стойка и др., 1987, 1988; O. Yang et al., 1989; P.C. Стойка и др., 1993; А.А. Фильченков и др., 1994;). Реалізація цих зв'язків між осциляторами у різних клітинах може опосередковуватись формуванням щільних контактів між бластомерами. На це вказують і виявлені нами у першому аналізі крос-кореляційні зв'язки між КЗ з іншими досліджуваними показниками (табл. 5.2 і рис. 5.1). Появу щільних контактів встановлено на стадії восьми клітин у зародку миші та на стадії шіснадцяти клітин у шпорцевої жаби, як це описано в огляді Божкової з співавт. (В.П. Божкова, Н.В. Розанова, 1998). Вони зазначають про тісний зв'язок процесів раннього розвитку зі станом щільних контактів.

Проведений математичний аналіз динаміки засвідчив, що на різні зміни функціонального стану організму зародків найбільш лабільно реагує часове організування процесів. Це чітко відображається у характеристиках коливань показників, які описують різні процеси, та у часових співвідношеннях між ними. Найбільш чутливими до змін функціонального стану слід вважати такі критерії, як час згасання осциляцій величини коефіцієнта кореляції на автокорелограмах, максимуми спектральної потужності коливань на періодограмах показників та форма крос-корелограм між коливними складовими різних показників.

## **5.2. Аналіз часових співвідношень аперіодичних змін, метаболічних і біоелектричних характеристик зародків в'юна у період дроблення**

У табл. 5.2 подано результати крос-кореляційного аналізу між аперіодичними змінами (часового тренду) біоелектричних, енергозабезпечувальних і мембранно-транспортних показників зародків в'юна у період дроблення. Можна зауважити наявність часових кореляційних зв'язків у дванадцяти прикладах між певними парами досліджуваних показників. Сильну кореляцію виявлено при співставленні значень показників без часових зміщень, тобто при нульовому зсуві, на дев'яти крос-корелограмах між трансмембранним потенціалом (ТМП) – швидкістю гліколізу (ШГ), активністю казеїнкінази (АК), активністю  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -помпи (АП); ШГ–АК, коефіцієнтом електричного зв'язку (КЗ), швидкістю поглинання кисню (ШПК); АК–КЗ, ШПК, АП. Але симетричність появи кореляційних зв'язків, зокрема, з максимальним центровим значенням коефіцієнта кореляції (при  $n=0$ ) та з майже рівностороннім зниженням значень  $R_{xy}$  при однакових зсувах ряду у різних напрямках, має місце лише у корелограмах  $R_{35}$  та  $R_{37}$  (табл. 5.2).

Таблиця 5.2

## Крос-корелограми часових рядів

$R \setminus S$	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5
R <sub>12</sub>	-0,22	-0,33	-0,38	-0,30	-0,10	0,23	0,72*	0,75*	0,65	0,47	0,12
R <sub>13</sub>	-	-0,36	-0,033	-0,10	-0,31	0,80*	0,69	0,54	0,28	-0,10	-
R <sub>14</sub>	-	-	-0,31	-0,024	0,09	0,46	0,57	0,73	0,03	-	-
R <sub>15</sub>	-	0,36	0,25	0,01	0,37	-0,79*	-0,83*	-0,70	-0,42	-0,03	-
R <sub>16</sub>	-0,32	-0,14	-0,11	0,41	0,71*	0,90**	0,43	0,22	0,01	0,15	-0,27
R <sub>17</sub>	-	-0,36	-0,21	0,09	0,46	0,86*	0,74	0,56	0,32	0,03	-
R <sub>23</sub>	-	-0,17	0,16	0,47	0,70	0,92**	0,45	0,06	-0,22	0,35	-
R <sub>24</sub>	-	-	-0,29	0,13	0,57	0,58	0,24	0,14	0,14	-	-
R <sub>25</sub>	-	0,02	-0,14	-0,45	-0,68	-0,56	-0,15	0,20	0,41	0,42	-
R <sub>26</sub>	0,28	0,44	0,48	0,55	0,59	-0,09	-0,11	-0,25	-0,26	-0,24	-0,17
R <sub>27</sub>	-	0,03	0,28	0,49	0,71	0,91**	0,47	0,10	-0,16	-0,30	-
R <sub>34</sub>	-	-	-0,34	-0,13	0,27	0,59	0,51	0,55	-0,51	-	-
R <sub>35</sub>	-	-	0,26	-0,13	-0,55	-0,97**	-0,66	-0,26	0,10	-	-
R <sub>36</sub>	-	-0,08	0,18	0,51	0,78**	0,73	0,22	-0,07	-0,28	-0,36	-
R <sub>37</sub>	-	-0,25	-0,04	0,27	0,63	0,99**	0,61	0,26	-0,02	-0,25	-
R <sub>45</sub>	-	-	0,20	-0,20	-0,46	-0,75	-0,44	-0,12	0,43	-	-
R <sub>46</sub>	-	-	0,05	0,69	0,54	0,41	0,16	-0,18	-0,29	-	-
R <sub>47</sub>	-	-	-0,03	0,57	0,52	0,56	0,24	-0,12	-0,32	-	-
R <sub>56</sub>	-	-0,21	-0,45	-0,56	-0,63	-0,64	-0,22	0,03	0,22	0,28	-
R <sub>57</sub>	-	0,20	-0,10	-0,41	-0,69	-0,94**	-0,56	-0,17	0,20	0,34	-
R <sub>67</sub>	-	-	0,01	0,02	-0,31	-0,18	0,81*	0,54	0,25	0,03	-

$R_{xy}$  – коефіцієнт крос-кореляції, де цифри у індексах позначають досліджувані часові ряди: 1 – трансмембранний потенціал, 2 – швидкість поглинання кисню, 3 – швидкість гліколізу, 4 – рН<sub>i</sub>, 5 – коефіцієнт електричного зв'язку, 6 – активність Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-помпи, 7 – активність казеїнкази II.

\* –  $p < 0,05$  та \*\* –  $< 0,01$ .

Отже, виявлено дуже сильну негативну кореляцію між змінами ШГ та КЗ (-0,97\*\*) та позитивну кореляцію ШГ із АК (0,99\*\*). Ця значна скорельованість одночасових значень вказаних показників на інтервалі дослідження від 150 до 360 хв свідчить про тісну спряженість між процесами, які зумовлюють зміни цих показників.

Щодо кореляцій між іншими зазначеними попередньо парами показників, то їхнім крос-корелограмам властива

несиметрична форма. Простежується збільшення або повільне незначне зменшення послідовних значень коефіцієнтів крос-кореляції односторонньо – при певних часових зсувах або у прямому, або у зворотному напрямку.

Такі результати свідчать про достовірність (табл. 5.2) між певними часовими рядами: АП–ТМП, ШГ, АК та ТМП–ШПК, КЗ таких зв'язків, ознакою яких є відставання або упередження одного показника відносно іншого (фазовий зсув відповідних змін).

При зсувові ряду ТМП щодо ряду АП (табл. 5.2,  $R_{16}$ ) у зворотному напрямі, рівному -1, що відповідає 30 хв, виявлено достовірну позитивну кореляцію. Отже, значення змін АП упереджують значення змін ТМП на 30 хв. Цю причинно-наслідкову залежність між показниками можна добре пояснити відомими фізико-хімічними закономірностями.

Між змінами АП з ШГ (0,78\*\*) та АП з АК (0,81\*) за тридцятихвилинним зсувом простежуються достовірні часові причинно-наслідкові співвідношення. Урахування знаку зсуву, за яким виявлено достовірну кореляцію, засвідчує, що в обох випадках упереджувальними є зміни АП щодо змін інших часових рядів. Ці результати дають змогу зробити припущення про те, що зростання активності помпи супроводжується збільшенням швидкості гліколізу та активності казеїнкінази, які можуть бути причинно пов'язані. Однак слід нагадати, що у кореляційних зв'язках причиною не завжди є зміни іншого показника. Найімовірніше, причину виявлених часових співвідношень слід

шукати в наявності спільних факторів, які однаково впливають на зміни кожного з цих показників протягом ранніх клітинних циклів зародків в'юна.

Як видно за корелограмою  $R_{12}$  (табл. 5.2), прослідковується випередження на 1–2 зсуви змін ТМП відносно динаміки ШПК. Кореляція є більш сильною при зсуві рівному годині (0,75\*). Отже, тісний взаємозв'язок між змінами цих показників спостерігається протягом 30–60 хв. Ступінь спряженості між цими процесами є досить високим – 55 % ( $R_{xy}$ )<sup>2</sup>. Ймовірно, що процеси гіперполяризації мембран зародків потребують більшого енергозабезпечення й певним чином стимулюють процеси, що зумовлюють підсилення ШПК.

Виявлено негативну кореляцію (-0,83\*) при 30-хвилинному зсуві часового ряду ТМП відносно ряду КЗ у прямому напрямку. Такий результат свідчить про випередження змінами ТМП змін КЗ та про їхній різноспрямований характер. Тобто зі збільшенням абсолютних значень мембранного потенціалу бластомерів знижується співвідношення цієї величини на поверхні мембрани однієї клітини до мембранного потенціалу сусідньої клітини. Можливо, це пов'язано зі змінами мембранного транспортування після екваторіального поділу бластомерів, оскільки відомо, що ступінь електричного зв'язку є прямим показником дифузії різних речовин та градієнта йонів між клітинами (В.П. Божкова и др., 1971; 1973).

Часові причинно-наслідкові зв'язки добре видно у корелограмах несиметричної відносно нульового зсуву форми з

максимальними значеннями коефіцієнтів кореляції лише при зсуві у одному напрямі. Разом з тим, проведений нами аналіз виявив аналогічну тенденцію й в певних корелограмах, на яких достовірні значення коефіцієнтів кореляції припадають на нуль, але лише за зсувом у одному напрямі значення близькі до тих, що без зміщень, хоча не достовірні для заданого рівня значимості. Відомо, що є тенденція змін за сусідніми цифрами, які підвищують або знижують поріг достовірності. Тому, згідно з цим твердженням, а також із урахуванням допустимих меж розрахованих коефіцієнтів крос-кореляції, ми вважаємо, що у корелограмах  $R_{13}$ ,  $R_{17}$ ,  $R_{23}$ ,  $R_{27}$  та  $R_{57}$  також можлива ймовірність часових причинно-наслідкових зв'язків між відповідними аналізованими рядами.

Аналогічні часові співвідношення між змінами АП та динамікою ШГ і АК встановлено між динамікою ТМП з цими ж показниками (табл. 2.1,  $R_{13}$ ,  $R_{17}$ ). Результати свідчать про випередження приблизно на 15–30 хв динамічних змін МП змінами ШГ та АК.

При зворотному зсуві (-1) ряду АК відносно рядів ШПК та КЗ ( $R_{27}$ ,  $R_{57}$ ) спостерігали сильну кореляцію, що засвідчує про запізнення на 30 хв змін вказаних показників відносно змін АК. Але на відміну від першого прикладу, в якому напрямок змін обох показників однаковий, у другому – збільшення АК супроводжується зменшенням КЗ.

Достовірний і сильний (0,92\*\*) зв'язок ШПК та ШГ є підставою до припущення про те, що на ранніх стадіях розвитку глікоген є субстратом дихання (А.С. Гинзбург, 1968). Можливо, що

тут бере участь казеїнкіназа – фермент, який регулює різноманітні внутрішньоклітинні процеси: фосфорилування ферментів обміну глікогену, ліпідів, факторів білкового синтезу (Е.А. Гойда и др., 1982; Е.А. Земсков и др., 1998; Л.В. Рябова, С.Г. Васецкий, 1996), і тому зв'язок її активності з ШПК також є сильним (0,91\*\*). Підтвердженням є вже згадана раніше кореляція між активністю казеїнкінази та швидкістю гліколізу.

При крос-кореляційному аналізі пар часових рядів, у яких одним з компонентів є  $pH_{ц}$ , одержано недостовірні значення коефіцієнтів крос-кореляції. Отже, відносно зв'язків динаміки  $pH_{ц}$  із змінами інших досліджуваних характеристик зародків неможливо дати конкретних висновків, оскільки одержані результати слід перевірити за допомогою більшої вибірки.

Як підсумок проведеного комплексного вивчення кількісного оцінення взаємозалежностей між загальними змінами рівня біоелектричних і метаболічних характеристик зародків в'юна розроблено схеми, в яких ураховано всі виявлені достовірні кореляційні зв'язки (рис. 5.1, 1) та причинно-наслідкові (рис. 5.1, 2). Стрілка має напрямок від параметра, що його вважають причиною, до наслідкового параметра.

Аналіз виявлених часових причинно-наслідкових співвідношень засвідчує тісну спряженість змін біоелектричних, енергозабезпечувальних і мембранно-транспортних процесів у ранньому ембріогенезі в'юна, яка може бути реалізована на основі спільних факторів регулювання їхньої динаміки (Л.Я. Івашків та ін., 2001).

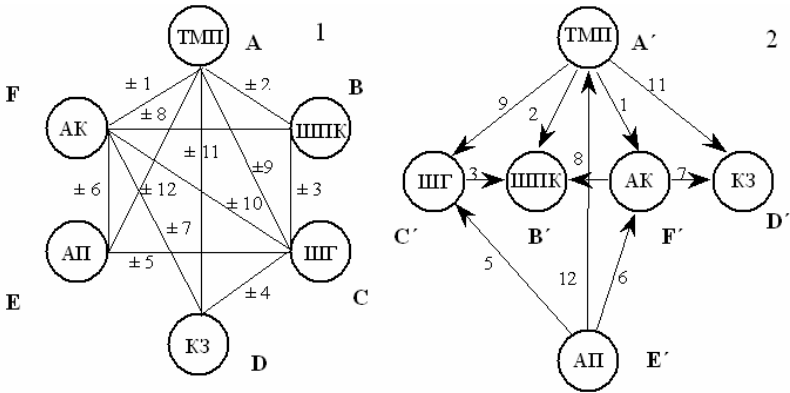


Рис. 5.1. Схеми взаємозалежностей між досліджуваними показниками (1 – усі виявлені взаємозв'язки; 2 – виявлені причинно-наслідкові взаємозв'язки).

$k = \pm i, i = \pm 1, 2, 3, \dots, \pm 12, k = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, (+)$  – пряма дія,  $(-)$  – зворотна, або обернена, дія

Аналітично це можна описати так:

- Для структури №1

$$\frac{dA}{dt} = k_{-2}B - k_2A - k_{-1}A + k_1F - k_{12}F + k_{-12}E - k_{11}A + k_{-11}D - k_5A + k_{-5}C$$

$$\frac{dB}{dt} = k_2A - k_2B - k_8B + k_{-8}F - k_3B + k_{-3}C$$

$$\frac{dC}{dt} = k_3B - k_{-3}B - k_9C + k_{-9}A + k_{-10}F - k_{10}C + k_{-3}F - k_5C + k_{-4}D - k_4C$$

$$\frac{dD}{dt} = k_{-4}C - k_4D + k_{-11}A - k_{11}D + k_{-7}E - k_7D \quad (5.1)$$

$$\frac{dE}{dt} = k_{-5}C - k_5E + k_{-12}A - k_{12}E + k_{-6}F - k_6E$$

$$\frac{dF}{dt} = k_{-6}E - k_6F + k_{-7}D - k_7F + k_{-10}C - k_{10}F + k_{-8}B - k_8F + k_{-1}A - k_1F.$$

- Для структури № 2



$$\begin{aligned} \frac{dA'}{dt} &= k_{12}E' - A'(k_9 + k_2 + k_1 + k_{11}) \\ \frac{dB'}{dt} &= k_3C' + k_2A' + k_8F' \\ \frac{dC'}{dt} &= k_9C' + k_5F' - k_3C' \quad (5.2) \\ \frac{dD'}{dt} &= k_{11}A' + k_7F' \\ \frac{dE'}{dt} &= -E'(k_5 + k_{12} + k_6) \\ \frac{dF'}{dt} &= k_1A' + k_6E' - k_8F' - k_7F'. \end{aligned}$$

Примітка: рівняння подано у первинному вигляді.

У другій серії досліджень аналізували часове організування процесів у ранньому ембріогенезі в'юна на основі змін дев'яти показників, за допомогою яких описують мембранний електрогенез, ланки енергозабезпечення, інтенсивність біосинтетичних процесів та динаміку регуляторних факторів.

У результаті оцінення часових співвідношень між змінами середнього рівня досліджуваних показників одержано 36 крос-корелограм, які зображено у таблицях 5.3–5.6.

Слід відзначити, що лише між парою таких часових рядів, як ТМП та ЛДГ не встановлено достовірних крос-кореляційних зв'язків при комбінаціях значень за різночасовими зсувами у обох напрямках. Для інших 34-х пар показників виявлено достовірні крос-кореляційні зв'язки, більшість з яких можна вважати причинно-наслідковими.

Таблиця 5.3

## Крос-корелограми досліджуваних характеристик зародків в'юна

-18	-0,35	–	0,08	0,15	0,42*	0,23	–
-17	-0,36*	-0,41*	0,06	0,07	0,40*	0,14	–
-16	-0,37*	-0,33	0,05	-0,02	0,37*	0,03	–
-15	-0,37*	-0,23	0,03	-0,10	0,33	-0,07	–
-14	-0,36*	-0,13	0,03	-0,17	0,28	-0,18	-0,03
-13	-0,34	-0,02	0,04	-0,23	0,22	-0,28	-0,11
-12	-0,32	0,10	0,05	-0,28	0,16	-0,37*	-0,18
-11	-0,28	0,21	0,07	-0,31	0,09	-0,44*	-0,25
-10	-0,24	0,32	0,10	-0,33	0,02	-0,50**	-0,30
-9	-0,19	0,42*	0,13	-0,32	-0,05	-0,53**	-0,30
-8	-0,14	0,51**	0,17	-0,30	-0,11	-0,53**	-0,33
-7	-0,08	0,59**	0,20	-0,26	-0,18	-0,51**	-0,35
-6	-0,01	0,64**	0,24	-0,20	-0,23	-0,46**	-0,36*
-5	0,05	0,66**	0,27	-0,13	-0,28	-0,38*	-0,37*
-4	0,12	0,65**	0,28	-0,05	-0,32	-0,27	-0,40*
-3	0,18	0,61**	0,29	0,04	-0,34	-0,14	-0,42*
-2	0,24	0,54**	0,27	0,13	-0,35	0,02	-0,44*
-1	0,29	0,42*	0,24	0,22	-0,34	0,19	-0,44*
0	0,34	0,26	0,17	0,30	-0,31	0,38*	-0,45**
1	0,49**	0,26	-0,02	0,20	-0,42*	0,35	-0,41*
2	0,61**	0,25	-0,19	0,11	-0,50**	0,31	-0,36*
3	0,69**	0,23	-0,34	0,02	-0,56**	0,28	-0,29
4	0,74**	0,21	-0,46**	-0,07	-0,59**	0,24	-0,20
5	0,76**	0,18	-0,56**	-0,15	-0,60**	0,19	-0,10
6	0,76**	0,15	-0,64**	-0,21	-0,59**	0,14	0,01
7	0,73**	0,11	-0,69**	-0,27	-0,56**	0,08	0,14
8	0,69**	0,08	-0,71**	-0,32	-0,52**	0,02	0,17
9	0,62**	0,05	-0,72**	-0,36*	-0,47**	-0,04	0,19
10	0,55**	0,03	-0,70**	-0,39*	-0,41*	-0,10	0,20
11	0,46**	0,00	-0,66**	-0,40*	-0,34	-0,15	0,20
12	0,37*	-0,02	-0,61**	-0,39*	-0,27	-0,19	0,19
13	0,27	-0,04	-0,53**	-0,38*	-0,19	-0,23	0,19
14	0,17	-0,06	-0,44*	-0,34	-0,12	-0,25	0,18
15	0,07	-0,07	-0,35	-0,30	-0,04	-0,26	–
16	-0,02	-0,08	-0,24	-0,24	0,03	-0,26	–
17	-0,11	-0,10	-0,13	-0,18	0,10	-0,25	–
18	-0,19	–	-0,02	-0,11	0,16	-0,22	–
n	R <sub>13</sub>	R <sub>83</sub>	R <sub>43</sub>	R <sub>53</sub>	R <sub>63</sub>	R <sub>73</sub>	R <sub>29</sub>

R<sub>xy</sub> – коефіцієнт крос-кореляції, де цифри в індексах позначають досліджувані часові ряди: 1 – трансмембранний потенціал, 2 – [Ca<sup>2+</sup>]<sub>в</sub>, 3 – рН<sub>в</sub>, 4 – активність ізоцитратдегідрогенази, 5 – активність α-кетоглутаратдегідрогенази, 6 – активність сукцинатдегідрогенази, 7 – активність лактатдегідрогенази, 8 – швидкість поглинання кисню, 9 – вміст серотоніну в зародках в'юна;

n – кількість п'ятихвилинних зсувів; \*\* – p < 0,01, \* – p < 0,05

Достовірна позитивна кореляція ( $p < 0,01$ ) без часових зміщень має місце між змінами активності  $\alpha$ -КГДГ з такими часовими рядами: активності із ЦДГ (0,76\*\*), СДГ (0,79\*\*) та ЛДГ (0,79\*\*) (табл. 5.4). Це свідчить про те, що процеси, якими зумовлені загальні зміни рівня зазначених показників на досліджуваному інтервалі часу – від 120 до 320 хв – тісно спряжені, та відбуваються на рівні біохімічних циклів енергетичного метаболізму. Аналогічну кореляцію спостерігали між змінами ТМП із активністю  $\alpha$ -КГДГ (0,60\*\*), що підтверджує думку про тісну спряженість біоелектричних і метаболічних процесів у ранньому розвитку тварин.

Для ТМП виявлено п'яти часові причинно-наслідкові залежності у таких парах часових рядів: ТМП– $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{pH}_i$ , СДГ, ШПК, серотонін (табл. 5.3–5.6). Водночас кореляції спостерігають за різним додатним значенням зсуву, що свідчить про випередження змінами ТМП змін названих показників, крім корелограми ТМП– $\text{Ca}^{2+}$  ( $R_{12}$ ), де важко з'ясувати, зміни якого з показників є випереджувальними.

За п'ятихвилинним зсувом виявлено сильну достовірну кореляцію між рядами ТМП– $\text{Ca}^{2+}$  (0,84\*\*), ТМП–СДГ (-0,87\*\*) та ТМП–серотонін (-0,55\*\*) (табл. 5.3–5.4).

Виявлені кореляційні зв'язки засвідчують те, що зі збільшенням гіперполяризації мембран зародків збільшується концентрація йонізованого кальцію в цитозолі та зниження активності СДГ і вмісту серотоніну у зародках, що реалізується, очевидно, на рівні фізико-хімічних взаємодій.

Таблиця 5.4

## Крос-корелограми досліджуваних характеристик зародків в'юна

n	R <sub>14</sub>	R <sub>15</sub>	R <sub>16</sub>	R <sub>17</sub>	R <sub>84</sub>	R <sub>85</sub>	R <sub>86</sub>	R <sub>87</sub>	R <sub>54</sub>	R <sub>64</sub>	R <sub>74</sub>	R <sub>65</sub>	R <sub>57</sub>	R <sub>67</sub>
-20	-	-	-	-	-0,41**	-0,15	0,01	-0,09	0,46**	0,11	0,31	-0,02	0,07	0,06
-19	0,12	0,14	0,32	-0,02	-0,46**	-0,14	-0,04	-0,05	0,44**	0,15	0,36*	-0,02	0,09	0,03
-18	0,08	0,12	0,30	-0,02	-0,49**	-0,13	-0,10	0,00	0,40**	0,19	0,39**	-0,02	0,10	0,00
-17	0,03	0,11	0,27	-0,02	-0,50**	-0,11	-0,16	0,05	0,34**	0,22	0,38*	-0,02	0,11	-0,02
-16	-0,01	0,09	0,23	-0,02	-0,50**	-0,08	-0,22	0,09	0,27	0,24	0,35*	-0,03	0,12	-0,05
-15	-0,06	0,08	0,19	-0,02	-0,49**	-0,06	-0,27	0,12	0,19	0,26	0,30	-0,03	0,12	-0,06
-14	-0,11	0,06	0,14	-0,02	-0,47**	-0,03	-0,32*	0,15	0,11	0,27	0,23	-0,04	0,12	-0,07
-13	-0,16	0,04	0,09	-0,03	-0,44**	-0,01	-0,36**	0,15	0,03	0,29	0,13	-0,04	0,12	-0,07
-12	-0,21	0,01	0,03	-0,03	-0,41**	0,00	-0,41**	0,15	-0,04	0,30	0,03	-0,03	0,12	-0,06
-11	-0,26	-0,02	-0,03	-0,04	-0,38*	0,00	-0,45**	0,12	-0,09	0,32	-0,08	-0,01	0,13	-0,04
-10	-0,31	-0,05	-0,10	-0,06	-0,34*	0,00	-0,48**	0,08	-0,12	0,34	-0,18	0,02	0,15	-0,01
-9	-0,37**	-0,09	-0,17	-0,08	-0,32*	-0,03	-0,51**	0,03	-0,13	0,36	-0,28	0,05	0,17	0,04
-8	-0,43**	-0,13	-0,25	-0,10	-0,29	-0,07	-0,54**	-0,04	-0,10	0,39	-0,35*	0,10	0,21	0,09
-7	-0,49**	-0,18	-0,33*	-0,13	-0,28	-0,12	-0,57**	-0,12	-0,05	0,42	-0,41**	0,17	0,25	0,15
-6	-0,55**	-0,23	-0,41**	-0,16	-0,27	-0,19	-0,60**	-0,20	0,03	0,46	-0,42**	0,24	0,31	0,22
-5	-0,61**	-0,29	-0,50**	-0,19	-0,28	-0,28	-0,63**	-0,28	0,14	0,51	-0,40**	0,33*	0,37*	0,28
-4	-0,66**	-0,36*	-0,59**	-0,22	-0,29	-0,38*	-0,66**	-0,35*	0,27	0,56	-0,34*	0,42**	0,45**	0,34*
-3	-0,72**	-0,42**	-0,67**	-0,25	-0,32*	-0,49**	-0,69**	-0,40**	0,40**	0,62	-0,22	0,52**	0,53**	0,38**
-2	-0,76**	-0,49**	-0,76**	-0,26	-0,34*	-0,60**	-0,74**	-0,42**	0,54**	0,67	-0,06	0,62**	0,62**	0,39**
-1	-0,80**	-0,55**	-0,84**	-0,25	-0,38*	-0,71**	-0,79**	-0,38*	0,67**	0,71	0,17	0,71**	0,71**	0,37*
0	-0,82**	-0,60**	-0,92**	-0,23	-0,40**	-0,80**	-0,86**	-0,28	0,76**	0,74	0,44**	0,79**	0,79**	0,29
1	-0,73**	-0,53**	-0,87**	-0,10	-0,36*	-0,73**	-0,75**	-0,19	0,71**	0,66	0,51**	0,71**	0,71**	0,16
2	-0,62**	-0,46**	-0,82**	0,00	-0,30	-0,66**	-0,65**	-0,12	0,62**	0,56	0,53**	0,62**	0,62**	0,05
3	-0,50**	-0,39**	-0,78**	0,07	-0,24	-0,58**	-0,55**	-0,05	0,52**	0,45	0,51**	0,53**	0,52**	-0,03
4	-0,38**	-0,33*	-0,73**	0,11	-0,17	-0,50**	-0,46**	0,00	0,39**	0,34	0,46**	0,45**	0,42**	-0,09
5	-0,26	-0,29	-0,69**	0,13	-0,11	-0,42**	-0,37*	0,05	0,27	0,23	0,38**	0,37**	0,33*	-0,13
6	-0,16	-0,25	-0,64**	0,12	-0,04	-0,34*	-0,28	0,09	0,14	0,12	0,30	0,31	0,24	-0,14
7	-0,06	-0,23	-0,60**	0,10	0,02	-0,26	-0,20	0,12	0,03	0,03	0,21	0,25	0,17	-0,15
8	0,02	-0,22	-0,55**	0,07	0,07	-0,18	-0,13	0,14	-0,07	-0,05	0,12	0,21	0,10	-0,13
9	0,08	-0,22	-0,50**	0,03	0,12	-0,12	-0,06	0,15	-0,15	-0,12	0,04	0,17	0,05	-0,11
10	0,13	-0,23	-0,45**	-0,01	0,16	-0,05	0,00	0,16	-0,21	-0,17	-0,03	0,15	0,02	-0,08
11	0,17	-0,24	-0,40**	-0,05	0,20	0,00	0,06	0,15	-0,25	-0,21	-0,09	0,13	-0,01	-0,05
12	0,19	-0,26	-0,34*	-0,09	0,22	0,05	0,11	0,15	-0,28	-0,23	-0,14	0,12	-0,03	-0,01
13	0,19	-0,28	-0,28	-0,13	0,24	0,09	0,15	0,13	-0,28	-0,24	-0,17	0,12	-0,04	0,02
14	0,19	-0,29	-0,22	-0,15	0,25	0,12	0,19	0,12	-0,27	-0,24	-0,19	0,12	-0,04	0,05
15	0,19	-0,30	-0,16	-0,17	0,25	0,14	0,22	0,10	-0,25	-0,24	-0,18	0,12	-0,03	0,07
16	0,17	-0,30	-0,10	-0,17	0,24	0,16	0,25	0,07	-0,21	-0,23	-0,17	0,12	-0,03	0,09
17	0,16	-0,29	-0,04	-0,16	0,23	0,17	0,26	0,05	-0,17	-0,21	-0,14	0,11	-0,02	0,10
18	0,15	-0,28	0,02	-0,14	0,22	0,18	0,28	0,03	-0,13	-0,19	-0,11	0,10	-0,02	0,10
19	0,14	-0,25	0,08	-0,11	0,20	0,17	0,28	0,01	-0,09	-0,18	-0,07	0,09	-0,02	0,09
20	-	-	-	-	0,18	0,17	0,29	-0,01	-0,06	-0,16	-0,03	0,07	-0,02	0,07

Примітка. Позначення як у табл. 5.3

Крім того, на корелограмах цих показників, починаючи з п'ятихвилинного зсуву для ТМП– $r_{H_c}$  та двадцятихвилинного для ТМП–ШПК, простежується поступове збільшення значень достовірних коефіцієнтів крос-кореляції, що може свідчити про аналогічне збільшення степеня спряженості між змінами цих показників залежно від часу розвитку.

Таблиця 5.5

Крос-корелограми досліджуваних характеристик зародків в'юна

n	R <sub>12</sub>	R <sub>19</sub>	R <sub>82</sub>	R <sub>89</sub>	R <sub>42</sub>	R <sub>49</sub>	R <sub>52</sub>	R <sub>59</sub>	R <sub>62</sub>	R <sub>69</sub>	R <sub>72</sub>	R <sub>79</sub>	R <sub>23</sub>	R <sub>93</sub>
-14	-0,33	0,11	0,18	-0,21	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
-13	-0,30	0,04	0,21	-0,23	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
-12	-0,26	-0,03	0,23	-0,25	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
-11	-0,21	-0,09	0,26	-0,26	0,37	-0,03	0,35	-0,18	0,27	0,07	0,18	-0,28	-0,20	0,05
-10	-0,15	-0,16	0,28	-0,26	0,34	0,04	0,37	-0,14	0,22	0,11	0,25	-0,30	-0,30	0,02
-9	-0,08	-0,18	0,30	-0,25	0,28	0,09	0,37	-0,08	0,16	0,10	0,32	-0,27	-0,38	-0,01
-8	0,00	-0,23	0,30	-0,23	0,20	0,16	0,34	-0,01	0,08	0,13	0,38	-0,23	-0,45	-0,03
-7	0,09	-0,27	0,30	-0,21	0,09	0,23	0,30	0,07	0,00	0,15	0,42	-0,18	-0,50*	-0,04
-6	0,19	-0,30	0,29	-0,18	-0,03	0,29	0,22	0,16	-0,10	0,18	0,44	-0,10	-0,53*	-0,05
-5	0,30	-0,34	0,26	-0,14	-0,17	0,35	0,12	0,25	-0,21	0,22	0,43	-0,01	-0,54*	-0,06
-4	0,42*	-0,39	0,22	-0,09	-0,32	0,40	0,00	0,33	-0,33	0,28	0,39	0,10	-0,54*	-0,06
-3	0,54**	-0,43*	0,15	-0,02	-0,48*	0,44	-0,15	0,41	-0,47*	0,35	0,31	0,22	-0,51**	-0,02
-2	0,67**	-0,47*	0,07	0,05	-0,64**	0,46	-0,32	0,49*	-0,62**	0,42	0,19	0,36	-0,47*	0,06
-1	0,81**	-0,50**	-0,04	0,14	-0,78**	0,44	-0,50*	0,54*	-0,79**	0,50*	0,02	0,51*	-0,41	0,17
0	0,94**	-0,53**	-0,17	0,25	-0,91**	0,39	-0,68**	0,57*	-0,97**	0,58*	-0,19	0,68**	-0,33	0,69**
1	0,90**	-0,55**	-0,26	0,47*	-0,86**	0,07	-0,69**	0,12	-0,86**	0,13	-0,26	0,17	-0,11	0,52*
2	0,84**	-0,55**	-0,34	0,68*	-0,80**	-0,02	-0,70**	0,01	-0,75**	0,02	-0,33	0,06	0,06	0,38
3	0,77**	-0,49**	-0,41*	0,78**	-0,72**	-0,07	-0,69**	-0,06	-0,64**	-0,06	-0,39	-0,02	0,20	0,25
4	0,70**	-0,40	-0,47*	0,80**	-0,63**	-0,09	-0,66**	-0,09	-0,53*	-0,10	-0,44	-0,06	0,30	0,15
5	0,62**	-0,27	-0,52**	0,72**	-0,53*	-0,08	-0,61**	-0,08	-0,43	-0,10	-0,48*	-0,06	0,36	0,06
6	0,53**	-0,11	-0,55**	0,50**	-0,42	-0,07	-0,55**	-0,07	-0,32	-0,10	-0,50*	-0,05	0,39	-0,02
7	0,44*	0,09	-0,58**	0,12	-0,30	-0,06	-0,46	-0,05	-0,22	-0,10	-0,50*	-0,04	0,40	-0,09
8	0,35	0,15	-0,58**	0,03	-0,17	-0,05	-0,37	-0,04	-0,12	-0,09	-0,47*	-0,02	0,38	-0,15
9	0,25	0,18	-0,57**	-0,04	-0,04	-0,04	-0,25	-0,02	-0,02	-0,08	-0,43	0,00	0,35	-0,20
10	0,16	0,20	-0,55**	-0,08	0,08	-0,04	-0,13	0,00	0,08	-0,06	-0,36	0,03	0,30	-0,25
11	0,07	0,21	-0,51**	-0,08	0,20	-0,04	-0,01	0,01	0,16	-0,04	-0,28	0,07	0,25	-0,26
12	-0,02	0,20	-0,46*	-0,09	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
13	-0,11	0,20	-0,39	-0,09	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
14	-0,19	0,19	-0,31	-0,09	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Примітка. Позначення як у табл. 5.3

Таблиця 5.6

Крос-корелограма між мембранним потенціалом та швидкістю поглинання кисню зародків в'юна

n	R <sub>18</sub>	n	R <sub>18</sub>	n	R <sub>18</sub>	n	R <sub>18</sub>
-33	-0,12	-16	-0,42**	1	0,04	18	0,73**
-32	-0,14	-15	-0,42**	2	0,14	19	0,71**
-31	-0,17	-14	-0,42**	3	0,23	20	0,69**
-30	-0,19	-13	-0,42**	4	0,31**	21	0,67**
-29	-0,21	-12	-0,41**	5	0,39**	22	0,65**
-28	-0,23	-11	-0,40**	6	0,45**	23	0,62**
-27	-0,26*	-10	-0,38**	7	0,51**	24	0,59**
-26	-0,28*	-9	-0,37**	8	0,56**	25	0,55**
-25	-0,30*	-8	-0,35**	9	0,61**	26	0,52**
-24	-0,32**	-7	-0,32**	10	0,65**	27	0,47**
-23	-0,34**	-6	-0,30*	11	0,68**	28	0,43**
-22	-0,36**	-5	-0,27*	12	0,70**	29	0,39**
-21	-0,37**	-4	-0,23	13	0,72**	30	0,34**
-20	-0,39**	-3	-0,20	14	0,73**	31	0,37**
-19	-0,40**	-2	-0,16	15	0,74**	32	0,31*
-18	-0,41**	-1	-0,11	16	0,74**	33	0,25
-17	-0,41**	0	-0,07	17	0,74**	34	0,19

Примітка. Позначення як на табл. 5.3

Ці крос-кореляції, виявлені за довготривалими зсувами, можливо, відображають події, які пов'язані зі змінами морфологічного плану. Часовий причинно-наслідковий зв'язок між змінами середнього рівня ТМП і ШПК такого ж характеру нами описано раніше при крос-кореляційному аналізі з тридцятихвилинним зсувом (Л.Я. Івашків та ін., 2001).

Встановлено наявність восьми причинно-наслідкових зв'язків між змінами показників, серед яких одним є Ca<sup>2+</sup> (табл. 5.5), а саме: між Ca<sup>2+</sup> та рН<sub>ц</sub>, активністю ізЦДГ, α-КГДГ, СДГ, ЛДГ та ШПК, серотоніном та ТМП. Зв'язки ці можуть бути реалізовані

на рівні молекулярних механізмів, у яких іони кальцію виконують функцію вторинного посередника. Оскільки не в усіх прикладах достовірні крос-кореляційні зв'язки виявлено при різночасових зсувах ряду  $\text{Ca}^{2+}$  у зворотному напрямку відносно інших рядів – це свідчить, що зміни концентрації йонізованого  $\text{Ca}^{2+}$  у цитозолі проходять із запізненням до змін таких рядів, як  $\alpha$ -КГДГ і серотонін.

Сильну негативну кореляцію між рядами  $\text{Ca}^{2+}$  та ізЦДГ (-0,86\*\*), СДГ (-0,86\*\*), серотоніном (-0,44\*) виявлено за п'ятихвилинним зсувом, а між  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\alpha$ -КГДГ (-0,70\*\*) при десятихвилинному. Оскільки ці кореляції є негативними, це свідчить, що зі зменшенням концентрації йонізованого  $\text{Ca}^{2+}$  у цитозолі збільшується активність названих дегідрогеназ та зростає вміст серотоніну у зародку або ж навпаки.

За довготривалим зсувом, рівним 40 хв, виявлено достовірний крос-кореляційний зв'язок (-0,58\*\*), що виникає між показниками ШПК і  $\text{Ca}^{2+}$ . Тобто зменшення концентрації йонізованого  $\text{Ca}^{2+}$  у цитозолі супроводжується збільшенням ШПК, що ймовірно, реалізується на рівні молекулярних механізмів, як і зазначені попередньо залежності.

Щодо зв'язків  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{pH}_c$  та  $\text{Ca}^{2+}$ -ЛДГ, то їх спостерігають за двадцятип'яти–тридцятихвилинними зсувами часового ряду  $\text{Ca}^{2+}$  в обох напрямках відносно інших рядів, тому важко встановити, який з рядів є випереджувальним. Тобто, що є причиною, а що – наслідком. Але, оскільки більші за величиною значення коефіцієнтів крос-кореляції у обох випадках спостерігали при від'ємних зсувах ряду  $\text{Ca}^{2+}$ , можна припустити, що зміни  $\text{pH}_c$  та

активності ЛДГ є випереджувальними щодо змін концентрації йонізованого  $\text{Ca}^{2+}$  у цитозолі. Водночас кореляція між цими показниками є негативною, що свідчить про різноспрямованість їхньої динаміки.

Аналогічний характер крос-кореляційних зв'язків має місце між рядами  $\text{pH}_{\text{ц}}\text{-ЛДГ}$  та  $\text{pH}_{\text{ц}}\text{-}\alpha\text{-КГДГ}$  (табл. 5.3). У зв'язку з тим, що максимальні достовірні значення коефіцієнтів крос-кореляції простежуються при зсуві ряду  $\text{pH}_{\text{ц}}$  рівному +8 у прямому напрямку для першої пари показників (-0,53\*\*) і при зсуві -11 у зворотному напрямку для другої (-0,40\*), ці результати означають, що зміни  $\text{pH}_{\text{ц}}$  є випереджувальними на 40 хв щодо змін активності ЛДГ та запізнювальними на 55 хв до змін активності  $\alpha\text{-КГДГ}$ . Оскільки кореляція негативна, то зі зменшенням  $\text{pH}_{\text{ц}}$  буде збільшуватись активність ЛДГ та  $\alpha\text{-КГДГ}$ . Одержані результати засвідчують гіпотезу Гойди про можливу участь дегідрогеназ у регулюванні  $\text{pH}_{\text{ц}}$  (Г.А. Бузников, Т.М. Турпаев, 1988). Про це свідчать також виявлені крос-кореляційні зв'язки  $\text{pH}_{\text{ц}}$  й активністю ізЦДГ (-0,72\*\*) та  $\text{pH}_{\text{ц}}$  й активністю СДГ (-0,60\*\*), які виникають при сорокап'ятихвилинних та двадцятип'ятихвилинних зсувах ряду  $\text{pH}_{\text{ц}}$  у зворотному напрямку до названих рядів (табл. 5.3). Отже, зміни  $\text{pH}_{\text{ц}}$  є запізнювальними щодо змін активності ізЦДГ, СДГ та  $\alpha\text{-КГДГ}$  та випереджуючими до змін активності ЛДГ.

Спостерігається також тенденція до випередження змін  $\text{pH}_{\text{ц}}$  на 25 хв змін ШПК (0,66\*\*), оскільки достовірні крос-кореляційні зв'язки виявлено при зсуві ряду  $\text{pH}_{\text{ц}}$  у прямому напрямку відносно ряду ШПК.



Аналіз взаємозв'язків у часі між змінами активності дегідрогеназ свідчить, що за від'ємним часовим зсувом ряду СДГ відносно рядів ізЦДГ та ЛДГ рівним п'яти та десяти хвилинним простежуються достовірні додатні значення коефіцієнтів крос-кореляції рівні 0,71\*\* та 0,39\*\* для цих пар показників відповідно (табл. 5.5), що дає змогу зробити припущення: збільшення активності ізЦДГ та ЛДГ дещо випереджає збільшення активності СДГ. Відома також тенденція щодо випередження рядом ізЦДГ на 5 хв ряду ТМП (табл. 5.4): кореляція негативна та дуже сильна - 0,80\*\*. Отже, зі збільшенням активності ізЦДГ ферменту, що є певним показником інтенсивності біосинтетичних процесів, відбувається деполяризація мембран зародків. Ці дані підтверджують думку про тісну спряженість процесів мембранного електрогенезу з біосинтетичними процесами у ранньому ембріогенезі зародків риб.

Оскільки максимальні значення коефіцієнтів крос-кореляції між рядами ЛДГ та ізЦДГ (табл. 5.4) з'являються з періодом, який становить приблизно 100 хв, при послідовних зсувах одного з рядів у обох напрямках на певну кількість часових інтервалів, тому складно інтерпретувати, що є причиною, а що наслідком у виявлених крос-кореляційних зв'язках. Отже, можна зробити припущення про коливний характер змін активності названих ензимів.

З табл. 5.4 видно, що сильно обернена залежність наявна між змінами активності СДГ та ЛДГ із ШПК. У першому випадку за зсувом -1 спостерігається достовірний крос-кореляційний зв'язок -0,79\*\*. Очевидно також, що кореляції повільно згасають зі

збільшенням величини від'ємного зсуву: за зсувом -14 ще виявлено достовірне значення коефіцієнта крос-кореляції. Це свідчить про те, що зміни рівня активності СДГ випереджують зміни рівня ШПК, а ступінь спряженості між ними, залежно від часового зсуву, збільшується. У другому випадку між активністю ЛДГ та ШПК виявлено максимальне достовірне значення коефіцієнта крос-кореляції  $-0,42^{**}$  за десятихвилинним зсувом.

Одержані результати засвідчують, що зміни ШПК у період дроблення дуже залежать від змін активності обох дегідрогеназ, тобто як від гліколітичного, так і від мітохондріального шляхів енергозабезпечення. Причому під час розвитку зародка в'юна змінюються часові співвідношення інтенсивності шляхів енергозабезпечення.

Крім цього, як видно з табл. 2.3, виявлено за п'ятихвилинним зсувом значну кореляцію між ШПК і активністю  $\alpha$ -КГДГ ( $-0,74^{**}$ ). На відміну від зв'язків з іншими дегідрогеназами тут випереджувальними є зміни ШПК щодо змін активності  $\alpha$ -КГДГ. Між показниками ШПК і серотоніном виявлено сильну позитивну кореляцію за зсувом рівним 20 хв. Отже, збільшення ШПК супроводжується через деякий час зростанням вмісту серотоніну у зародків. Мабуть, цей зв'язок відтворює певні регуляторні механізми, що пов'язані з динамікою процесів, які зумовлюють зміни середнього рівня ШПК.

На відміну від виявлених часових співвідношень між ТМП–серотоніном та ШПК–серотоніном, де випереджувальними є зміни ТМП та ШПК щодо змін вмісту серотоніну у зародках, аналіз

усіх виявлених достовірних крос-кореляційних зв'язків між цим показником з іншими часовими рядами засвідчив, навпаки, випередження змінами вмісту серотоніну у зародках змін досліджуваних показників (табл. 5.3 і 5.5). За п'ятихвилинним зсувом виявлено достовірну кореляцію ( $p < 0,05$ ) між такими часовими рядами: серотонін- $pH_{ц}$  (0,52\*), серотонін- $\alpha$ -КГДГ (0,54\*), серотонін-СДГ (0,50\*), серотонін-ЛДГ (0,51\*) та за десятихвилинним зсувом між парою серотонін-ізЦДГ (0,46\*) (див. табл. 5.5). Отже, збільшення вмісту серотоніну в зародках тісно спряжено зі збільшенням активності названих дегідрогеназ та  $pH_{ц}$  у зародків в'юна на досліджуваному інтервалі часу, що також, ймовірно, пов'язано з регулюванням ШПК, оскільки це функціонально залежні характеристики.

На підставі одержаних результатів можна зробити наступні висновки: більшість виявлених причинно-наслідкових залежностей, можливо, регулюється змінами функціонального стану зародків. Це, зокрема, кореляції між змінами  $pH_{ц}$  із різними показниками, ТМП і ШПК із активністю досліджуваних дегідрогеназ. Підтверджено також взаємозв'язки між змінами концентрації  $Ca^{2+}$  у цитозолі з динамікою процесів енергетичного метаболізму та біоелектричними процесами. Виявлено невідомі раніше кореляції між динамікою концентрації серотоніну з активністю СДГ, ЛДГ, ізЦДГ,  $\alpha$ -КГДГ та змінами швидкості поглинання кисню, а також із змінами біоелектричних процесів. Одержані результати свідчать про можливість участі серотоніну в регулюванні названих процесів.

### 5.3. Дослідження коливних змін клітинних характеристик у ранньому ембріогенезі зародків в'юна

Передусім оцінювали спектральні характеристики та автокорелограми коливної динаміки біоелектричних, енергозабезпечувальних і мембранно-транспортних параметрів. Для аналізу часових співвідношень між коливаннями показників їх згруповано за близькістю визначених періодів коливань, а саме: аналізували часові залежності між рядами ТМП,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{pH}_c$  і іЗЦДГ. Крім того, сюди ж включено часовий ряд  $\alpha$ -КГДГ, період коливань активності якої є майже вдвічі більший до тривалості періоду названих показників. Проаналізовано також показники, зміни яких мають квазіперіодичний характер. Це – СДГ, ЛДГ та ШПК. Оцінено й крос-корелограми між змінами вмісту серотоніну у зародків з усіма іншими досліджуваними параметрами зародків в'юна.

На рис. 5.2 і 5.3 зображено періодограми та автокорелограми досліджуваних показників, з яких видалено тренд. Достовірність одержаних спектральних піків оцінено за розрахунками інтегральних періодограм досліджуваних показників, які наведено в додатку А. На періодограмах це позначено символами (\* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ) аналогічно з позначеннями у таблицях.

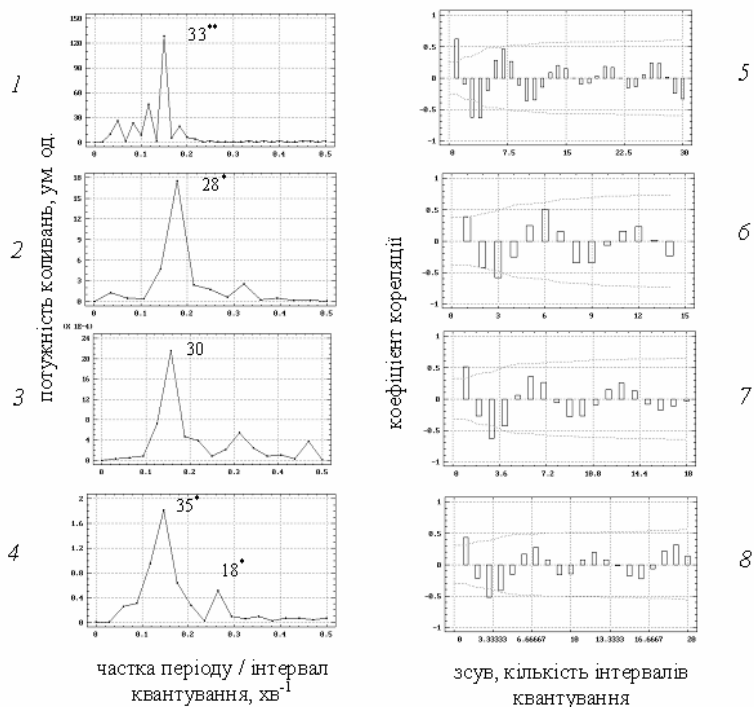


Рис. 5.2. Характеристики коливної динаміки досліджуваних показників зародків в'юна: спектри потужності мембранного потенціалу (1), концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у цитозолі (2),  $\text{pH}_c$  (3), активності ізоцитратдегідрогенази (4) та автокорелограми мембранного потенціалу (5), концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у цитозолі (6),  $\text{pH}_c$  (7), активності ізоцитратдегідрогенази (8). На спектрах цифри над піками – період у хв.,  $\Delta t = 5$  хв.; \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$

Як видно з рис. 5.2, динаміці ТМП (1),  $\text{Ca}^{2+}$  (2),  $\text{pH}_c$  (3) і активності ізЦДГ (4) властиві коливання з близькими періодами, оскільки виявлено достовірні піки на спектрах потужності цих показників, які припадають на частоти 0,15, 0,18, 0,17 та 0,145 і 0,27  $\text{хв}^{-1}$ , що збігається з періодами приблизно рівними 33, 28, 30 та 35 і 18 хв відповідно. На періодограмі динаміки ТМП виявлено за інтервалом на шкалі частот від 0 до 0,14  $\text{хв}^{-1}$  наявність спектральних піків, які є недостовірними та мають незначну

потужність. Цей результат може бути зумовлений ефектами “витоку”, які виникають при дослідженні даних скінченої тривалості (Г.М. Игнат'єва, 1972; Н.А. Хованова, И.А. Хованов, 2001) або наявністю випадкових компонентів (шумів), що завжди має місце у реальних процесах.

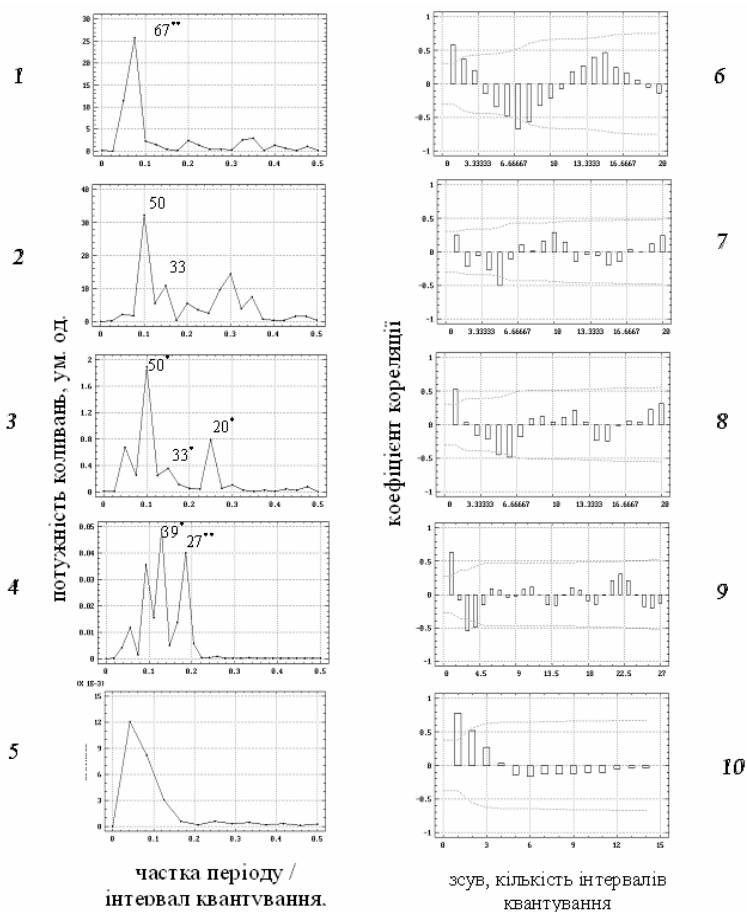


Рис. 5.3. Характеристики коливної динаміки досліджуваних показників зародків в'юна: спектр потужності активності  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогенази (1), сукцинатдегідрогенази (2), лактатдегідрогенази (3) та швидкості поглинання кисню (4), вмісту серотоніну в зародках (5) та автокорелограми цих показників (відповідно 6, 7, 8, 9, 10). На спектрах цифри над піками – період у хв.,  $\Delta t = 5$  хв

Періодограми  $pH_{\text{ц}}$  (3) та активності ізЦДГ (4) на рис. 5.2 відображають гармонічні спектри, оскільки частоти виявлених спектральних піків на них знаходяться у приблизно кратних співвідношеннях. Це свідчить про те, що в основі коливань цих показників лежать генератори гармонічного типу. Спектральний максимум на періодограмі  $pH_{\text{ц}}$  має дуже незначну потужність (приблизно 0,0022 ум. од.). Тому, ймовірно, достовірність коливань цього показника становить  $P < 0,95$ , автокорелограма чітко засвідчує періодичність його змін.

Максимуми коефіцієнтів автокореляції при зсувах ряду ТМП відносно себе (рис. 5.3; 5) простежуються за неоднаковою кількістю часових інтервалів, що свідчить про варіативність тривалості періоду цього показника. Аналогічний характер виявлених коефіцієнтів автокореляції має місце на автокорелограмах  $pH_{\text{ц}}$  та активності ізЦДГ.

Отже, розрахований за автокорелограмами період коливань цих показників рівний приблизно 30–35 хв для ТМП та  $pH_{\text{ц}}$  і 25–35 хв для активності ізЦДГ. Коливання вмісту  $Ca^{2+}$  в гомогенатах зародків в'юна найбільш стабільні за періодом, ніж коливання інших досліджуваних показників, тому що максимуми коефіцієнтів автокореляції пвідбуваються за однаковою кількістю часових інтервалів з 30-хвилинним періодом.

На відміну від автокорелограм  $Ca^{2+}$  та  $pH_{\text{ц}}$ , у ТМП та активності ізЦДГ коливання величини коефіцієнтів автокореляції згасають зі збільшенням часового зсуву, але пізніше їхня величина знову зростає. Це також може свідчити про нестабільність періодів, або ж зумовлено нелінійністю змін цих показників, відхилення яких не завжди добре збігаються на осі часу.

За автокореляційним та спектральним аналізом динаміки активності  $\alpha$ -КГДГ виявлено періодичність коливань цього показника з періодом, який майже вдвічі кратний до коливань зазначених вище показників. На періодограмі активності  $\alpha$ -КГДГ (рис. 5.3 (1)) добре видно спектральний пік, який відповідає періоду 67 хв. Як видно з рис. 5.4, повторення максимальних значень коефіцієнтів автокореляції на автокорелограмі активності  $\alpha$ -КГДГ із зсувом 75 хв, а також значна ширина визначеного спектрального піка засвідчують нестабільність цього періоду.

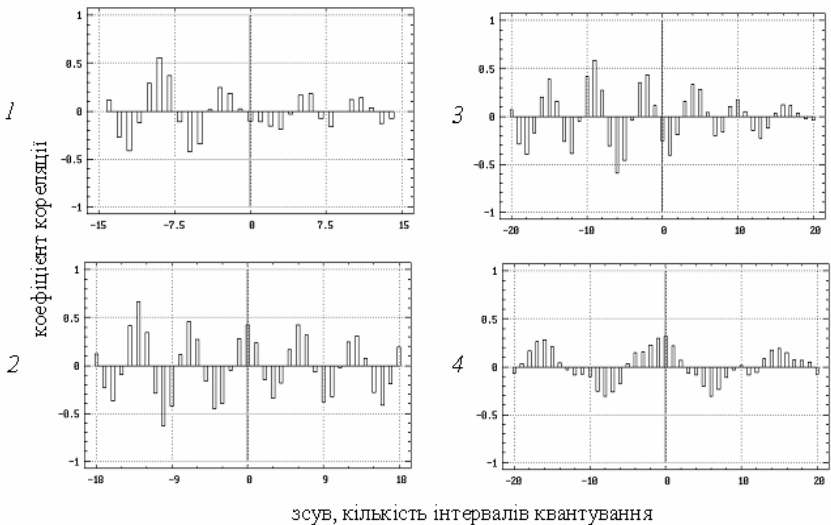


Рис. 5.4. Крос-корелограми коливної динаміки досліджуваних показників зародків в'юна: мембранного потенціалу з цитозольною концентрацією  $\text{Ca}^{2+}$  (1),  $\text{pH}_i$  (2), активністю ізоцитратдегідрогенази (3) та  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогенази (4)

Для динаміки активності СДГ, ЛДГ та ШПК одержано дискретні спектри, в яких середня енергія розподілена між декількома коливними складовими з неспіввимірними частотами.



Максимуми на періодограмі активності СДГ припадають на частоти 0,1; 0,15; 0,2; 0,3; 0,35 хв<sup>-1</sup>, перші дві з яких відповідають періодам 50 та 33 хв, а інші частоти є їм кратними. Достовірність цих спектральних піків становить  $P < 0,95$ . Разом з тим потужність коливань 35-хвилинного періоду майже у три рази менша за потужність 50-хвилинних коливань. Одержані результати видно на автокорелограмі цього показника (рис. 5.3 (7)), форма якої має слабо виражений коливний характер, але на ній можна простежити появу максимальних значень коефіцієнтів автокореляції за однакою зсувом, рівним 50 хв.

На періодограмі активності ЛДГ (рис. 5.3 (3)) виявлено достовірні спектральні піки на частотах, що відповідають періодам 50, 33 та 20 хв. Якщо оцінити співвідношення потужності коливань виявлених максимумів на спектрах, то вона відповідно для 50-хвилинної компоненти є більшою майже у два рази від 20-хвилинної та приблизно у п'ять разів від 33-хвилинної спектральної компоненти. Це може свідчити про те, що домінуючими у динаміці активності ЛДГ є коливання з періодами 50 та 20 хв. Неперіодичний характер динаміки цього показника також засвідчує форма розрахованої автокорелограми активності ЛДГ (рис. 5.3 (8)). Як видно з рис. 5.3, спектр потужності ШПК (4), складається з чотирьох спектральних піків, два з яких є достовірними та відповідають періодам, які становлять 39 і 27 хв, і майже рівноцінні за потужністю.

Аналіз спектра потужності та автокорелограми серотоніну не виявив періодичного характеру змін цього показника. Про це свідчить значна ширина піка на його періодограмі та швидке

згасання значень коефіцієнтів кореляції на автокорелограмі –  $t_k = 20$  хв (рис. 5.3 (5, 10)). Ці результати можна пояснити тим, що аналіз проведено за рядом короткої тривалості ( $n=28$ ), протягом якого лише двічі відбувається збільшення вмісту серотоніну з інтервалом часу рівним 60 хв. Відомо, що для виявлення достовірної періодичності необхідно мати ряди, що містять більшу кількість циклів одного періоду. Цим пояснюється недостовірність результатів спектрального аналізу цього показника, а також активності СДГ.

На рис. 5.4 зображено результати крос-кореляційного аналізу між коливними змінами ТМП з іншими досліджуваними показниками. На крос- корелограмах 2 і 3 простежується майже однакова форма прямої та зворотної крос-кореляційної функції. Більш детальний аналіз цих корелограм засвідчує, що послідовні зсуви ряду ТМП на певну кількість часових інтервалів відносно рядів рН<sub>ц</sub> та ізЦДГ виявляють максимальні значення коефіцієнтів крос-кореляції, які з'являються майже періодично з періодом, рівним 30–35 хв. Водночас для першої пари показників (2) значення максимумів коефіцієнтів крос-кореляції достовірні та майже сталі за величиною протягом усього досліджуваного періоду, що не властиво для другої пари (3). Поступове згасання коливань коефіцієнтів крос-кореляції на корелограмі у прямому напрямку означає неповний збіг експериментальних даних досліджуваних показників.

Це може бути зумовлене нелінійністю змін показників та нестабільністю їхніх періодів, як засвідчили автокореляційний та спектральний аналізи. Ці дані свідчать про стійкий взаємозв'язок

між періодичними складовими показників з періодом 30–35 хв, який є досить стабільним між ТМП та  $pH_d$  на усьому досліджуваному проміжку часу, та помірним між ТМП та активністю ізЦДГ.

Хоча при спектральному аналізі виявлено близькість періодів ТМП та  $Ca^{2+}$ , на їхній крос-корелограмі (1) спостерігається слабкий зв'язок за періодичними складовими, а достовірні кореляції виникають лише при від'ємних значеннях зсуву. Тобто у динаміці цих показників виявлено достовірний зв'язок з приблизно 30-хвилинним періодом, який простежується не на всьому інтервалі дослідження.

Те, що за додатним зсувом виявлено слабку недостовірну кореляцію, свідчить про неповний збіг максимумів та мінімумів значень показників на осі часу, що зумовлено нелінійністю їхньої динаміки.

Без часових зміщень виявлено достовірне значення коефіцієнта крос-кореляції  $0,32^*$  між ТМП та активністю  $\alpha$ -КГДГ. Їхня крос-корелограма (4) характеризується нерівномірним квазіперіодичним характером з низькими максимумами коефіцієнтів крос-кореляції, що свідчить про слабкий нестабільний зв'язок між ними з періодом у межах 70–80 хв. Результати підтверджені даними аналізу їхніх автокорелограм та періодограм.

Аналогічний характер взаємозв'язків між періодичними складовими спостерігається на рис. 5.5 у корелограмах 1, 2, 4. Оскільки без часових зсувів виявлено негативну достовірну кореляцію між  $pH_d$ - $Ca^{2+}$  та  $pH_d$ -ізЦДГ, це свідчить про те, що коливання цих показників відбуваються у протифазі та дещо

зміщені за фазою. На корелограмі 4 видно, що максимум припадає на зсув -1, що не так помітно на корелограмі 1. На цій корелограмі не простежується подібність за величиною сусідніх значень коефіцієнтів крос-кореляції близько максимуму на нульовому зсуві. Те ж саме простежується на крос-корелограмі 2, засвідчуючи те, що динаміка коливань із ЦДГ– $\text{Ca}^{2+}$  відбувається у фазі з деяким зміщенням, менше 5 хв.

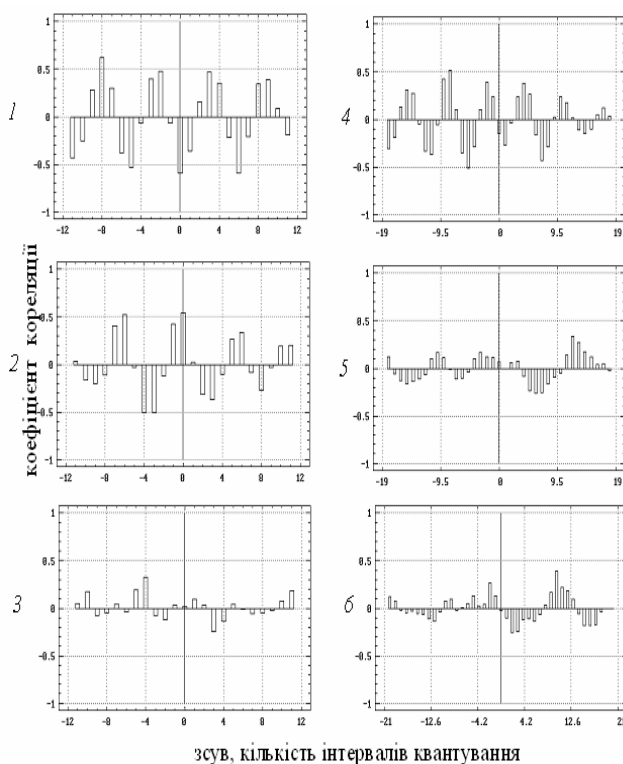


Рис. 5.5. Крос-корелограми коливної динаміки досліджуваних показників зародків в'юна: рН<sub>ц</sub> (1), активності ізоцитратдегідрогенази (2) та  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогенази з цитозольною концентрацією  $\text{Ca}^{2+}$  (3); рН<sub>ц</sub> із активністю ізоцитратдегідрогенази (4) та  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогенази (5) та активності ізоцитратдегідрогенази з активністю  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогенази (6)

Отже, між названими парами часових рядів виявлено зв'язок за періодичними складовими з середнім 30-хвилинним періодом, який є найбільш стійким та стабільним між змінами  $pH_{\text{ц}}$  та  $Ca^{2+}$ .

Цього не можна сказати про взаємозв'язки між коливаннями таких пар часових рядів, як  $\alpha$ -КГДГ– $Ca^{2+}$ ,  $pH_{\text{ц}}$ – $\alpha$ -КГДГ та ізЦДГ– $\alpha$ -КГДГ, оскільки на їхніх крос-корелограмах за різночасовими зсувами в обох напрямках виявлено недостовірні значення коефіцієнтів кореляції (рис. 5.5). Дуже слабо виражений коливний ефект спостерігається на корелограмі 5 між  $pH_{\text{ц}}$  і активністю  $\alpha$ -КГДГ. Одержані результати аналізу між динамікою активності  $\alpha$ -КГДГ з іншими показниками зумовлені нестабільністю періоду коливань досліджуваного параметра, який є приблизно вдвічі більший від періоду коливань цих значень, як це встановлено з використанням спектрального та автокореляційного аналізів.

На корелограмі 1 рис. 5.6 видно квазіперіодичність появи максимальних достовірних коефіцієнтів крос-кореляції, які майже рівні за величиною при зсувах у обох напрямках на інтервалі від 0 до 60 хв. Це свідчить про слабкий, але рівномірний зв'язок квазіперіодичного характеру між коливаннями активності ЛДГ і СДГ з періодом приблизно у межах 45–55 хв. Аналогічний характер взаємозв'язків виявлено між коливаннями ШПК із активністю СДГ (2) та ЛДГ (3). Хоча на цих корелограмах не спостерігається стабільності величини коефіцієнтів кореляції, виявлених за різночасовими зсувами: вони знижуються, майже пропадають, знову з'являються.

Отже, між динамікою досліджуваних показників виявлено слабкий квазіперіодичний зв'язок з періодом у межах від 40 до 60 хв, який можна пояснити квазіперіодичним режимом їхніх коливань з декількома незалежними частотами, як це встановлено раніше, при спектральному аналізі динаміки цих показників.

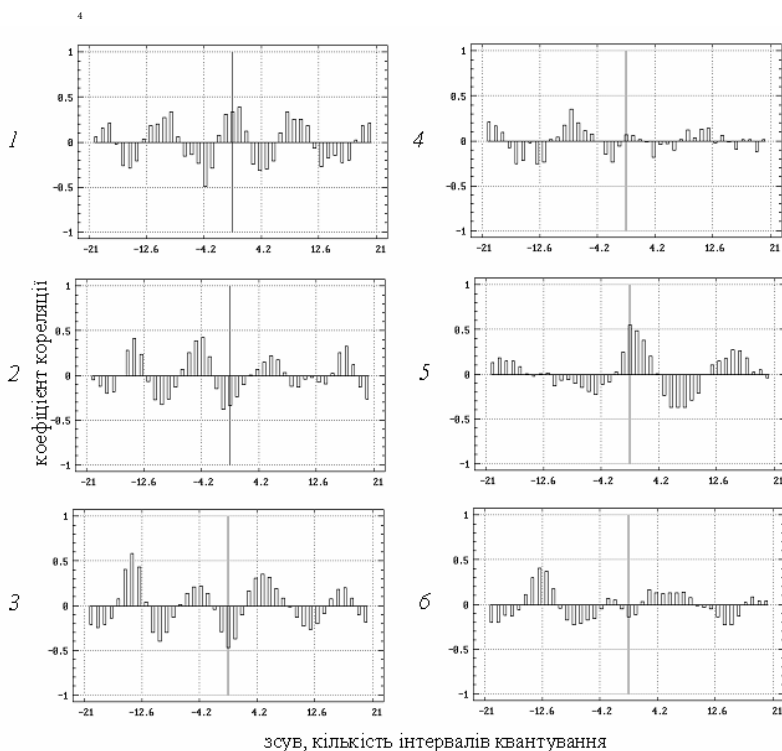


Рис. 5.6. Крос-корелограми коливної динаміки досліджуваних показників зародків в'юна: активності лактатдегідрогенази з активністю сукцинатдегідрогенази (1),  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогенази (5); швидкості поглинання кисню з активністю сукцинатдегідрогенази (2), лактатдегідрогенази (3),  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогенази (6) та активності сукцинатдегідрогенази з активністю  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогенази (4)

Як видно з крос-корелограм 4 та 6 (рис. 5.6), між коливною динамікою рядів СДГ- $\alpha$ -КГДГ та ШПК- $\alpha$ -КГДГ кореляції не

встановлено: значення коефіцієнтів кореляції є низькими та недостовірними. Лише між ЛДГ- $\alpha$ -КГДГ виявлено сильну кореляцію періодичного характеру з приблизно 70-хвилинним періодом при зсувах від 0 до 50 хв ряду ЛДГ відносно ряду  $\alpha$ -КГДГ у прямому напрямку. Ймовірно, між коливними змінами цих показників зв'язок не на всьому досліджуваному інтервалі часу. Але цей зв'язок можливий, оскільки спектральний аналіз засвідчив наявність у динаміці активності ЛДГ складової з періодом 33 хв, а в динаміці активності  $\alpha$ -КГДГ – з періодом 67 хв, що є у два рази кратний першому.

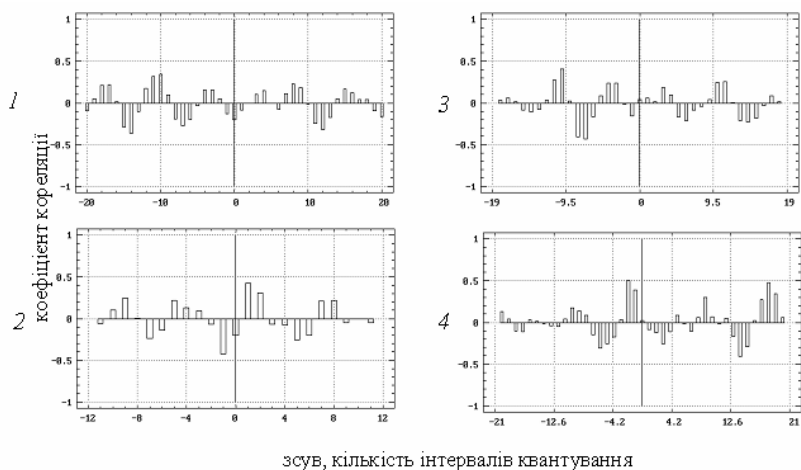


Рис. 5.7. Крос-корелограми коливної динаміки досліджуваних показників зародків в'юна: мембранного потенціалу (1),  $pH_{cy}$  (3) та активності ізоцитратдегідрогенази (4) з активністю сукцинатдегідрогенази; активності сукцинатдегідрогенази з концентрацією  $Ca^{2+}$  у цитозолі (2)

Квазіперіодичний характер динаміки активності СДГ зумовлює дуже слабкий зв'язок з періодом у межах 30–40 хв із коливаннями ТМП,  $pH_{cy}$ ,  $Ca^{2+}$  та активністю ізЦДГ, як це видно на рис. 5.5 та 5.7 з розрахованих крос-корелограм між названими

показниками та активністю СДГ. Очевидно, ці результати зумовлені наявністю у динаміці цього показника ще іншої, 50-хвилинної коливної складової та незначною потужністю коливань 33 хв, як видно з розрахованої періодограми активності СДГ на рис. 5.1 (2).

Подібний характер мають виявлені крос-кореляційні зв'язки за крос-корелограмами 1–4 на рис. 5.8.

Результати узгоджуються з даними автокореляційного та спектрального аналізів цих показників і свідчать про дуже слабкий зв'язок майже періодичного характеру між динамікою активності ЛДГ із ТМП,  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{pH}_c$  протягом усього досліджуваного інтервалу часу з періодом у межах 30–35 хв. А оскільки на крос-корелограмі рядів ЛДГ–ізДДГ виявлено періодичну появу достовірних значень коефіцієнтів кореляції лише при додатних зсувах від 35 до 100 хв, можна зробити припущення про стійкий зв'язок між динамікою цих показників з періодом 35–40 хв лише у певні моменти часу.

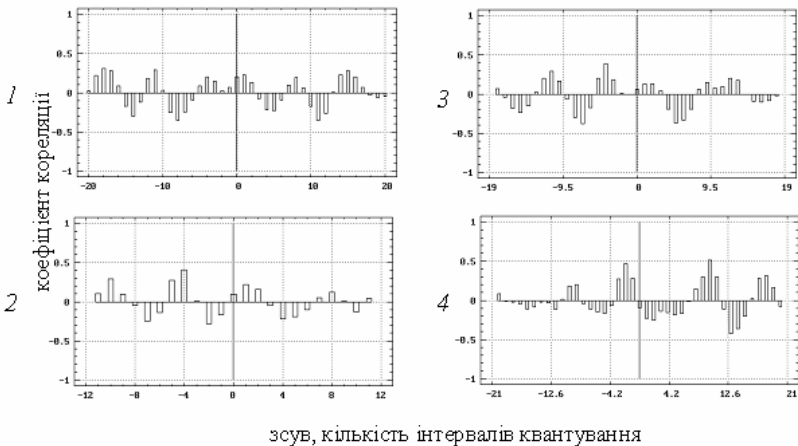
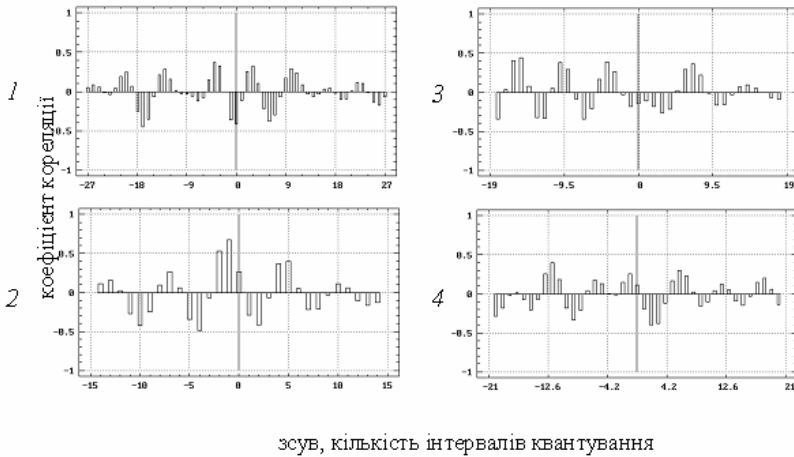


Рис. 5.8. Крос-корелограми коливної динаміки досліджуваних показників зародків в'юна: мембранного потенціалу (1),  $\text{pH}_c$  (3) та активності ізоцитратдегідрогенази (4) із активністю лактатдегідрогенази та активності лактатдегідрогенази з концентрацією  $\text{Ca}^{2+}$  у цитозолі (2)



Деякий збіг положень максимумів та мінімумів між ТМП та ШПК (рис. 5.9 (1)) спостерігається не на всьому 135-хвилинному інтервалі часу, як це показують виявлені кореляції за різночасовими зсувами. Значення коефіцієнтів крос-кореляції непропорційне за величиною при однакових зсувах у різних напрямках. Це свідчить про нестабільний зв'язок між коливаннями показників, який є стійким лише на певних ділянках досліджуваного інтервалу з періодом у діапазоні 30–40 хв.



зсув, кількість інтервалів квантування

Рис. 5.9. Крос-корелограми коливної динаміки досліджуваних показників зародків в'юна: мембранного потенціалу з швидкістю поглинання кисню (1) та швидкості поглинання кисню з концентрацією  $\text{Ca}^{2+}$  у цитозолі (2),  $\text{pH}_c$  (3), активністю ізоцитратдегідрогенази (4)

Така сама тенденція простежується на крос-корелограмі 4, хоча зв'язки між ШПК та активністю ізоцитратдегідрогенази є дещо слабшими. Для рядів ШПК та  $\text{Ca}^{2+}$  виявлено достовірну сильну кореляцію з стійким 30-хвилинним періодом лише на певних інтервалах часу, а періодичні зв'язки між ШПК та  $\text{pH}_c$ , більш стабільні за величиною, простежуються на зворотній крос-кореляційній функції 3. Ці

результати можуть бути зумовлені наявністю інших періодичних складових у динаміці ШПК, зміною фазових відношень між коливаннями показників на початку та в кінці спостереження. Вони узгоджуються з результатами попередньо проведеного аналізу періодограм та автокорелограм показників.

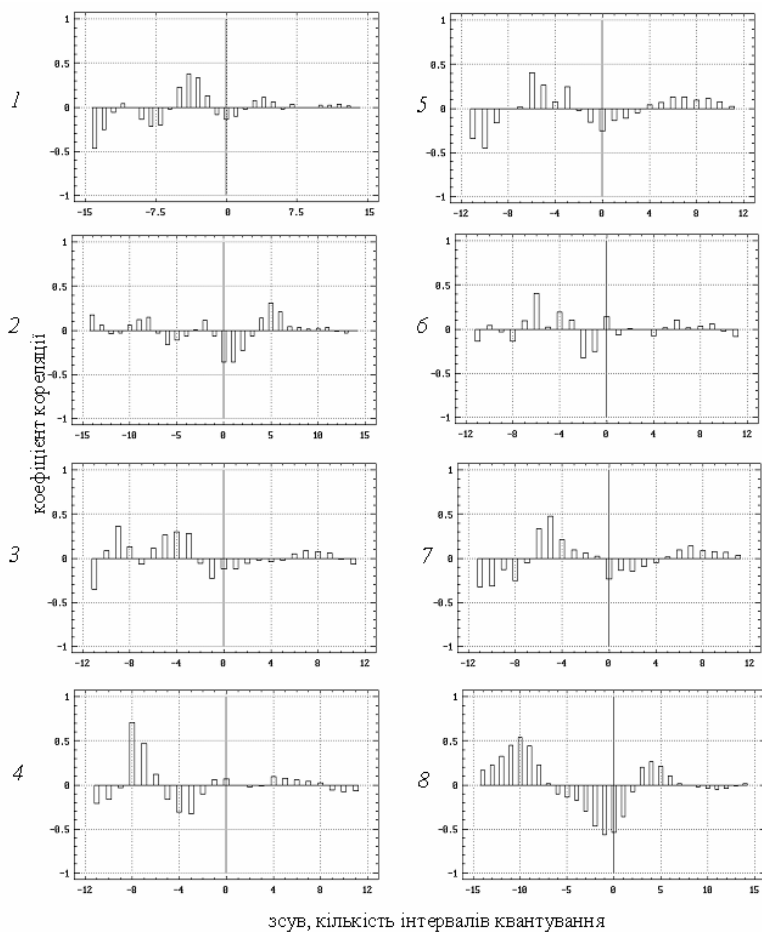


Рис. 5.10. Крос-корелограми коливної динаміки досліджуваних показників зародків в'юна: мембранного потенціалу (1), цитозольної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  (2),  $\text{pH}_c$  (3), ізоцитратдегідрогенази (4),  $\alpha$ -кегоглутаратдегідрогенази (5) сукцинатдегідрогенази (6), лактатдегідрогенази (7) та швидкості поглинання кисню (8) з концентрацією серотоніну

Результати крос-кореляційного аналізу всіх досліджуваних показників із динамікою вмісту серотоніну в зародках в'юна зображено на рис. 5.10. Оскільки не встановлено періодичності змін цього показника, то і за різночасовими зсувами в обох напрямках не виявлено достовірних значень коефіцієнтів крос-кореляції між коливною динамікою таких пар показників: ТМП–серотонін (1), рН<sub>ц</sub>–серотонін (3), α-КГДГ–серотонін (5), СДГ–серотонін (6).

Достовірну негативну кореляцію без часових зміщень спостерігаємо на крос-корелограмі 2, між рядами Ca<sup>2+</sup> і серотоніном (-0,36\*).

Зменшення концентрації серотоніну супроводжується зростанням концентрації йонізованого Ca<sup>2+</sup> у цитозолі. Аналогічну кореляцію виявлено нами у попередньому аналізі між перехідними змінами показників. Тоді ж було встановлено причинно-наслідкові зв'язки між активністю із-ЦДГ, ЛДГ та вмістом серотоніну в зародках, як це виявлено й у цьому аналізі.

За від'ємним 40-хвилинним значенням зсуву спостерігають сильну позитивну кореляцію (0,71\*\*) між рядами із-ЦДГ–серотонін та за 25-хвилинним зсувом – між ЛДГ–серотонін (0,48\*), що видно на крос-корелограмах цих показників 4 та 7. Те, що в цьому разі зміни активності дегідрогеназ випереджають зміни вмісту серотоніну в зародках, але спрямованість зв'язків не змінюється, може свідчити про циклічний характер часової залежності.

Таку періодичну залежність також спостерігають на крос-корелограмі 8 між ШПК і серотоніном. У цьому випадку

достовірну негативну кореляцію виявлено без часових зміщень (0,54\*) та при 50-хвилинному зсуві ряду ШПК у зворотному напрямку відносно ряду серотоніну. Одержані результати ще раз засвідчують можливість наявності часових причинно-наслідкових залежностей між змінами серотоніну з динамікою ШПК, активності із-ЦДГ та ЛДГ, причину яких слід шукати у спільних механізмах, що найімовірніше відбуваються на молекулярному рівні.

Додатково нами проведено співставлення часових співвідношень між динамікою біоелектричних (за коливаннями ТМП) та метаболічних (за коливаннями ШПК) процесів на різних інтервалах дослідження, яке дало змогу проаналізувати зміни характеру взаємозв'язків у часі між ними за нормальних умов розвитку в період дроблення.

На крос-корелограмах динаміки ТМП із ШПК, як видно з рис. 5.11, за інтервалами часу 60–385 хв (1) та 90–385 хв (2) очевидним є квазіперіодичний характер появи крос-кореляцій, який більш виражений у першому прикладі. Це свідчить про нестабільний зв'язок між показниками, зумовлений квазіперіодичним характером динаміки ШПК, оскільки в ній виявлено за допомогою спектрального аналізу дві достовірні періодичні складові 27 та 39 хв.

Аналіз крос-кореляцій між цими показниками на інтервалі від 120 до 385 хв засвідчив, що при зсуві значень ряду ТМП відносно ряду ШПК у обох напрямках простежуються кореляційні зв'язки з періодом у межах 30–40 хв. Але достовірний періодичний зв'язок виявлено не на всьому інтервалі дослідження, що може

свідчити про деяку синхронність між коливаннями цих показників.

Така сама тенденція відбувається у крос-корелограмах показників, динаміку яких співставляли на інтервалі від 150 до 385 хв.

Однак у цьому разі є ліпший збіг максимальних та мінімальних значень показників за часом, про що свідчить величина виявлених достовірних максимумів коефіцієнтів крос-кореляції та регулярність їхнього виявлення за часом на довших ніж у попередньому аналізі проміжках часу.

Без часових зміщень на всіх крос-корелограмах встановлено негативну достовірну кореляцію. Це означає, що коливання показників відбуваються у протифазі, засвідчуючи певну стійкість фазових відношень між ними за нормальних умов розвитку. Хоча, ймовірно, можливий деякий зсув фаз між ними, оскільки на всіх крос-корелограмах простежується неоднакове зниження значень коефіцієнтів кореляції при першому зсуві в обох напрямках.

Отже, оцінення часових співвідношень у динаміці ТМП та ШПК у період дроблення засвідчило, що у процесі розвитку зародків в'юна змінюється характер подібності їхньої коливної динаміки, зокрема, від квазіперіодичного, що спостерігається на початкових поділах дроблення від 60 до 120 хв і після 120 хв – до більш стабільного, майже синхронного, з приблизно 35–40 хв періодом, який можливий не на всьому досліджуваному інтервалі часу.

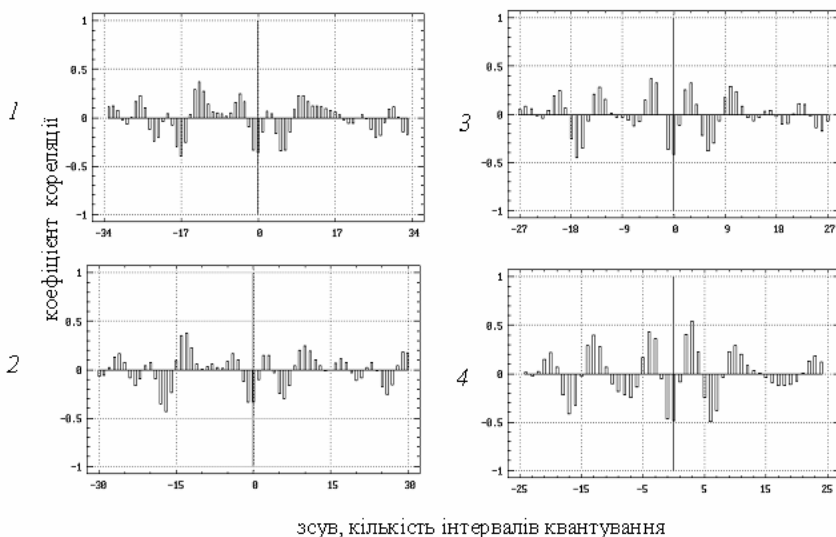


Рис. 5.11. Крос-корелограми коливної динаміки мембранного потенціалу та швидкості поглинання кисню на різних інтервалах дослідження при розвитку зародків в'юна: 1 – 60–385 хв; 2 – 90–385 хв; 3 – 120–385 хв; 4 – 150–385 хв

Аналіз параметрів коливної динаміки клітинних процесів у ранньому ембріогенезі в'юна дав змогу встановити періодичну подібність відхилень у динаміці ТМП,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{pH}_c$  та активності ізЦДГ протягом періоду дроблення. Разом з тим крос-корелограми досліджуваних показників засвідчують взаємну спряженість їхньої ритміки, що характеризується зв'язком різного ступеня. Між змінами активності ЛДГ, СДГ і ШПК із динамікою ТМП,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{pH}_c$  та активністю ізЦДГ виявлено дуже лабільні та нестійкі зв'язки за періодичними складовими, що зумовлено квазіперіодичним характером змін досліджуваних метаболічних показників (Л.Я. Івашків та ін., 2001).

#### **5.4. Зміни метаболічних і біоелектричних показників за нормальних та екстремальних умов розвитку зародків в'юна**

Визначені характеристики динаміки біоелектричних та метаболічних процесів у зародків в'юна при температурах 16 °С та 21 °С (норм. ум.) подано на рис. 5.12 і 5.13. Достовірність одержаних результатів спектрального аналізу оцінено за розрахунками інтегральних періодограм досліджуваних показників, які наведено у додатку Б. На періодограмах це позначено символами \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ .

На різних часових інтервалах досліджуваного періоду (у діапазонах 60–180 хв та 180–360 хв) у коливній динаміці ТМП виявлено перевагу різних періодичних складових. Достовірні максимальні піки спектральної потужності коливань цього показника припадають на частоти, що відповідають періодам 59 та 37 хв при температурі 16 °С і 36 та 33 хв при 21 °С (рис. 5.12 (4, 5)).

Близькі значення визначених періодів коливань ТМП при температурі 21 °С та аналіз ширини піків свідчать про те, що коливанням цього показника характерна варіативність періоду протягом усього часу дослідження. При 16 °С коливання більш стабільні лише протягом другого інтервалу дослідження та суттєво змінюються на початку (до 180 хв). Ці результати засвідчує автокореляційний аналіз (рис. 5.12 (1, 2) та 5.13 (1, 2)).

Аналогічний характер має динаміка ШПК за тих самих умов. На спектрах потужності цього показника достовірні максимуми відповідають періодам 46 та 35 хв відповідно до зазначених температур (рис. 5.12 (б) та 5.13 (б)).

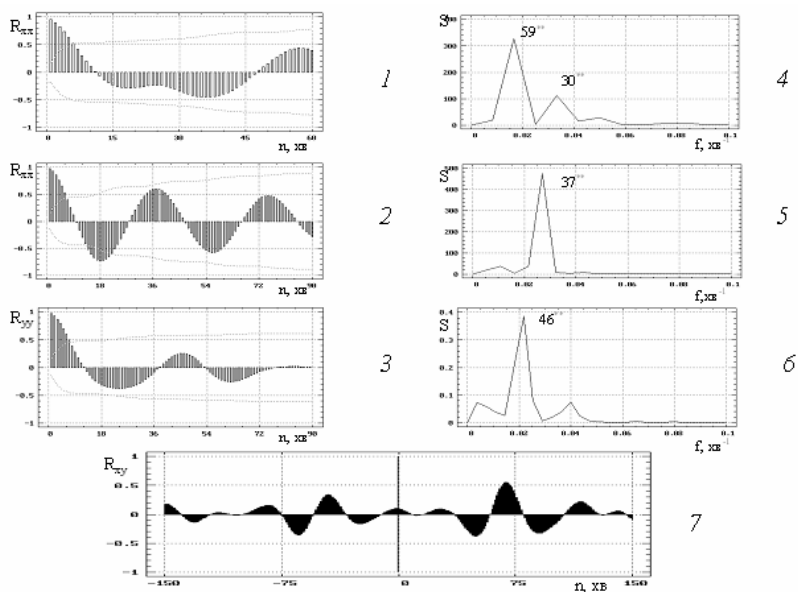


Рис. 5.12. Автокорелограми мембранного потенціалу  $E_m$  (1, 2) та швидкості поглинання кисню (ШПК) (3), періодограми  $E_m$  (4, 5) та ШПК (6), крос-корелограма цих показників (7) для зародків в'юна протягом дроблення при 16°C

Примітка. На корелограмах  $R_{xx}$ ,  $R_{yy}$ ,  $R_{xy}$  – значення коефіцієнта авто- та крос-кореляції,  $n$  – часовий зсув (кількість хвилинних інтервалів квантування); на періодограмах  $S$  – величина спектральної потужності коливань, в ум. од.,  $f$  – частота (частка періоду на інтервал квантування, хв<sup>-1</sup>), цифри над піками – період, у хв

Коліванням ШПК також характерна значна нестабільність їхніх визначених періодів. Про це свідчать широка основа піків коливань на розрахованих спектрах та швидке згасання осциляцій величини коефіцієнта кореляції на автокорелограмах (рис. 5.12 (3))



та 5.13 (3)). Час кореляції  $t_k=70$  хв для динаміки показників при температурі  $16^\circ\text{C}$  і  $t_k=56$  хв при  $21^\circ\text{C}$ .

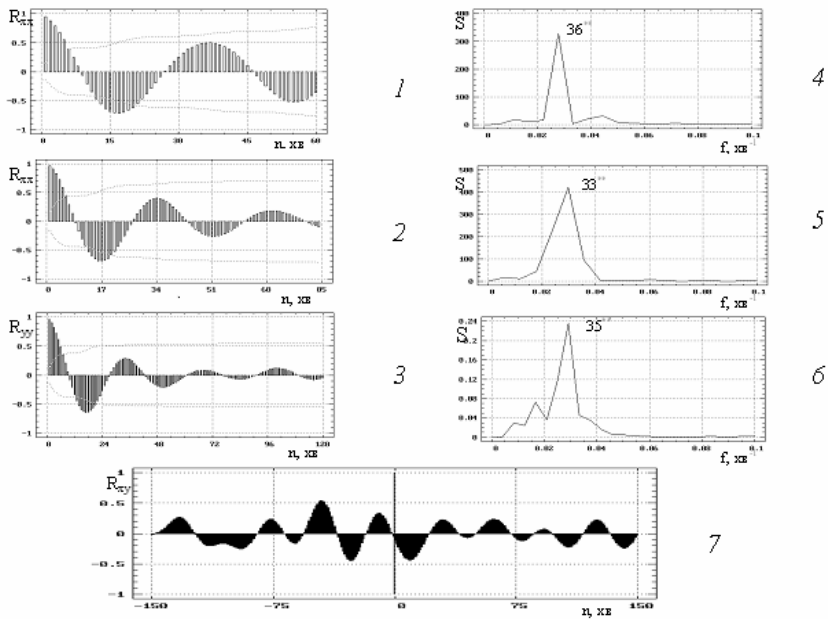


Рис. 5.13. Ті ж характеристики динаміки досліджуваних показників при  $21^\circ\text{C}$ .

Примітка. Позначення – як на рис. 5.12.

Нестабільність періодів коливань досліджуваних показників при цих температурах позначається на характері виявлених їхніх крос-кореляційних зв'язків за різночасовими зсувами (рис. 5.12 (7) та 5.13 (7)). Поява максимумів кореляції пов'язана з квазіперіодичністю та неоднаковою силою зв'язків протягом досліджуваного інтервалу часу, що, ймовірно, зумовлений як нелінійним характером змін цих показників, так і наявністю різних періодичних складових, про що свідчать певні результати спектрального аналізу динаміки.

Аналіз змін показників ТМП і ШПК за різних температур дав змогу виявити певну різницю в часі появи крос-кореляцій між коливними складовими. Якщо при температурі 21 °С (рис. 5.13 (7)) достовірні кореляційні зв'язки з'являються майже періодично при різних часових зсувах рядів у обох напрямках, то при температурі 16 °С (рис. 5.12 (7)) наявна достовірно сильна кореляція лише на певних інтервалах часу приблизно рівних 40–120 хв у прямому напрямку та 25–90 хв у зворотному. Можливо, між процесами, що зумовлюють коливну динаміку цих показників, відбувається синхронізація не на всьому досліджуваному інтервалі часу, а лише на деяких його ділянках, тривалість яких збільшується зі зростанням температури.

При співставленні значень без часових зміщень (рис. 5.12, 7 та 5.13, 7) не виявлено достовірних кореляційних зв'язків у динаміці ТМП та ШПК при температурах 16 та 21 °С, що може свідчити про коливання цих показників із зміщенням за фазою. Крос-кореляційний аналіз часових рядів на різних інтервалах (до і після 180 хв) засвідчує різну картину динаміки: або коливання між показниками відбуваються майже синфазно, або у протифазі, хоча зазвичай зміщені за фазою. Отримані результати можна пояснити тим, що зв'язок між коливаннями досліджуваних показників досить пластичний, що також може бути зумовлено нестабільністю періодів коливань.

Дроблення бластомерів в'юна при постійній температурі (24 °С), яка не є фізіологічно прийнятною для в'юна, як наслідок має появу аномалій та загибель зародків на дальших стадіях ембріогенезу (Е.А. Гойда, 1993). Значно відрізняються від резуль-

татів попереднього аналізу розраховані характеристики динаміки ТМП та ШПК за цих умов (рис. 5.14).

Для обох показників максимуми спектральної потужності, з порівняно вузькими спектральними піками, відповідають коливанням з періодом 30 хв (рис. 5.14, 3 і 4). Ці результати свідчать про стабільність періоду коливань, що засвідчує автокореляційний аналіз (рис. 5.14 (1–2)).

На автокорелограмах помітно зменшується швидкість згасання осциляцій величини коефіцієнта кореляції для обох показників, тому час кореляції неможливо визначити. Слід відмітити високу чутливість цього критерію до впливу екстремальних умов. Крос-корелограма показників (рис. 5.14 (5)) має форму, наближену до гармонічних синусоїдальних коливань з тим самим періодом. Співставлення значень показників без часових зміщень дає можливість виявити наявність достовірної позитивної кореляції, зумовленої синфазністю їхніх коливань. За цих умов також змінюються фазові співвідношення коливної динаміки досліджуваних процесів.

Отже, встановлено, що при температурі 24 °С спрощується колильний режим функціональних змін біоелектричних та метаболічних процесів під час дроблення зародків. Виявлено повний збіг за тривалістю періодів коливань ТМП та ШПК, їхню стійкість. Регулярність періодичної появи крос-кореляції між коливаннями показників, її стабільність за величиною при різночасових зсувах у обох напрямках, свідчать про синхронність спостережуваних змін за періодом, а також за фазою протягом усього часу дослідження.

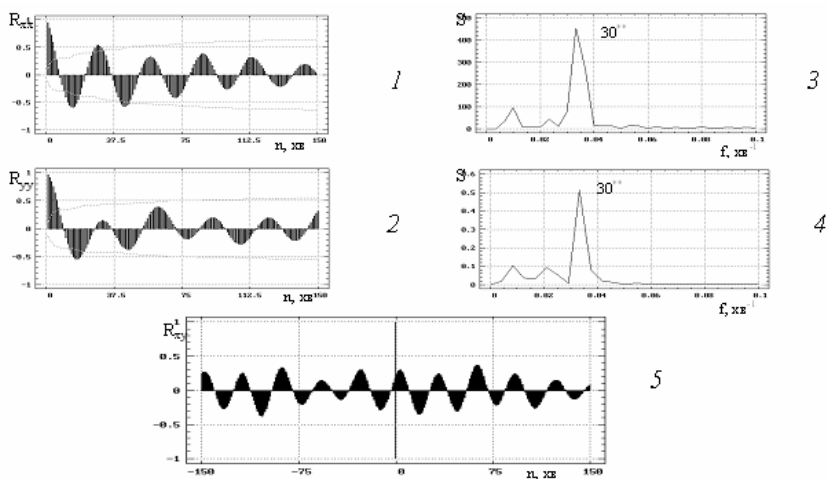


Рис. 5.14. Характеристики динаміки мембранного потенціалу та швидкості поглинання кисню для зародків в'юна протягом дроблення при 24 °С: автокорелограми (1 і 2), періодограми (3 і 4) відповідно та крос-корелограма цих показників (5).

Примітка. Позначення – як на рис. 5.12

Отримані результати засвідчують наявність спільних механізмів, які контролюють взаємовідношення між динамікою цих процесів.

Блокування поділів дроблення зародків в'юна колхіцином при температурі 21 °С чітко відображено в одержаних характеристиках коливної динаміки ТМП та ШПК (рис. 5.15).

Якщо для ТМП автокореляційний та спектральний аналізи (рис. 5.15 (1, 3)) засвідчують наявність стійкої періодичності з приблизно 39–40-хвилинним періодом коливань, що аналогічно результатам попереднього дослідження, то для ШПК (рис. 5.15 (2, 4)) ці ж методи дали змогу виявити відносну періодичність коливань цього показника з 72-хвилинним періодом, який характеризується сильною нестабільністю. Час кореляції  $t_k=88$  хв.

Суттєву різницю у параметрах динаміки обох показників, порівняно з нормою (рис. 5.15 (4–6)), виявлено у зростанні на порядок потужності виявлених коливань, як це видно з величини наявних піків на спектрах (рис. 5.15 (3–4)). У цьому разі параметр є досить чутливим до впливу колхіцину.

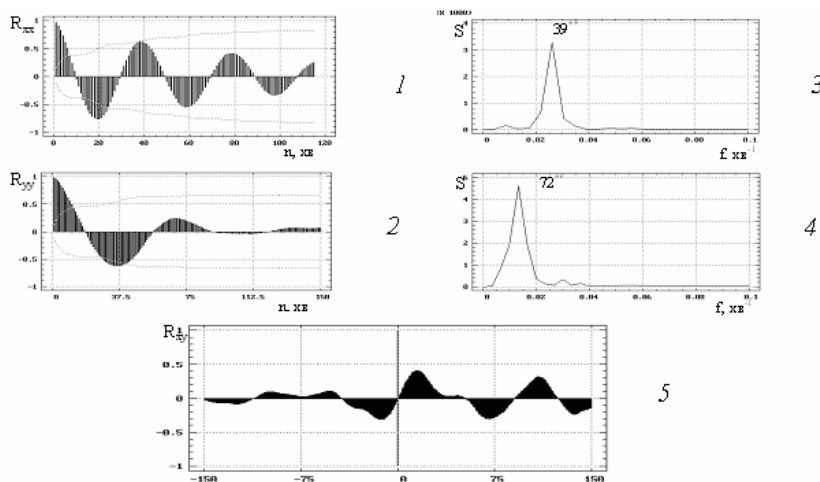


Рис. 5.15. Характеристики динаміки мембранного потенціалу та швидкості поглинання кисню у ранньому розвитку в'юна за наявності в середовищі інкубації  $4,5 \cdot 10^{-3}$  М колхіцину: автокорелограми (1 і 2), періодограми (3 і 4) відповідно та крос-корелограма цих показників (5).

Примітка. Позначення – як на рис. 5.12

Оскільки відома значна різниця в тривалості періоду коливань обох показників при дії колхіцину, а коливання ТМП є більш регулярними та стійкими, ми припускаємо, що механізми формування коливань у процесах біоелектрогенезу та інтенсивності енергетичного обміну є самостійними, на відміну від механізмів, які узгоджують взаємовідношення їхньої коливної динаміки. Підтвердженням цьому може бути одержана крос-кор-

логограма досліджуваних показників, за якою виявлено наявність достовірної і сильної кореляції, що з'являється майже періодично при зміщенні значень ряду ТМП у прямому напрямку з середнім періодом, рівним  $81 \pm 6.3$  хв (рис. 5.15 (5)).

Проведений математичний аналіз динаміки засвідчив, що у характеристиках коливань показників, які описують різні процеси, та у часових співвідношеннях між ними чітко відображені зміни функціонального стану зародків тварин. Найбільш чутливими до змін функціонального стану вважаємо такі критерії: час кореляції на автокорелограмах, ширину й потужність піків на спектрах коливань та форму крос-корелограм між коливними складовими різних показників (Л.Я. Івашків, 2002; Л.Я. Івашків та ін., 2001; L.Y. Ivashkiv et al., 2002).

### **5.5. Оцінення часових залежностей між змінами біоелектричних, енергозабезпечувальних і мембраннотранспортних характеристик зародків шпорцевої жаби на стадії дроблення**

У результаті кількісного оцінення взаємозалежностей змін восьми біоелектричних і метаболічних показників зародків шпорцевої жаби виявлено наявність сильної

кореляції у 23 прикладах (рис. 5.16–5.19), із яких аналіз 15 крос-корелограм засвідчив ймовірність зв'язків причинно-наслідкового характеру. Одержані крос-корелограми, в яких максимальне та достовірне значення коефіцієнта кореляції припадає на нульовий зсув, а для всіх інших зсувів значення коефіцієнтів недостовірні або рівні нулю, дають змогу переконатися в тому, що в цих парах часових рядів скорельовані лише одночасові (синхронні) значення.

Це простежується у восьми прикладах між такими показниками: V – ТМП (0,58\*), V – рН<sub>ц</sub> (0,65\*), V – ШВВ (0,98\*\*); ШВВ – рН<sub>ц</sub> (0,67\*); Ca<sup>2+</sup> – K<sup>+</sup> (0,99\*\*); Na<sup>+</sup> – рН<sub>ц</sub> (0,80\*\*), Na<sup>+</sup> – K<sup>+</sup> (0,94\*\*), Na<sup>+</sup> – Ca<sup>2+</sup> (0,95\*\*) (рис. 3.75–3.78). Отже, відображені цими показниками процеси в досліджуваній період здійснюються одночасно.



Рис. 5.16. Крос-корелограми динаміки показників зародків шпорцевої жаби: трансмембранного потенціалу з співвідношенням Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> (1), об'ємом зародка (2), внутрішньоклітинними концентраціями Na<sup>+</sup> (3), K<sup>+</sup> (4), Ca<sup>2+</sup> (5) та рН<sub>ц</sub> з трансмембранним потенціалом (6)

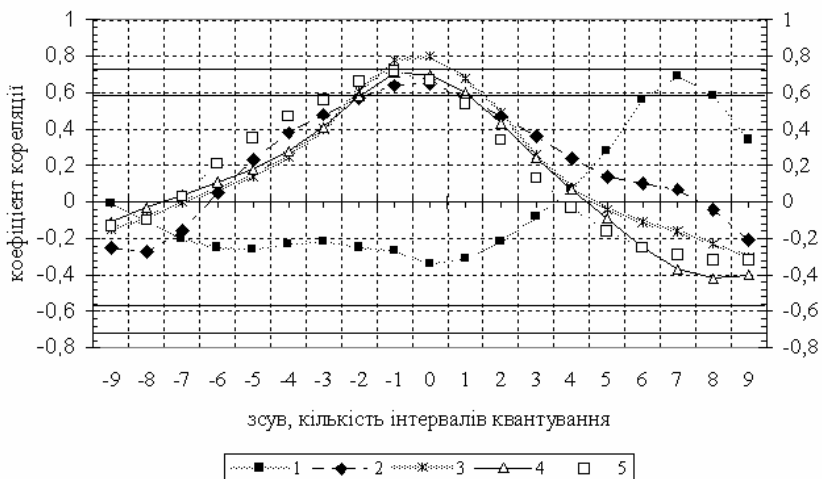


Рис. 5.17. Крос-корелограми динаміки показників зародків шпорцевої жабі: рН<sub>ц</sub> із співвідношенням Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> (1), об'ємом зародка (2), внутрішньоклітинними концентраціями Na<sup>+</sup> (3), K<sup>+</sup> (4) та Ca<sup>2+</sup> (5)

На рис. 5.16 показано одержані крос-корелограми аналізу змін рівня мембранного потенціалу з іншими показниками. Виявлено ймовірність п'яти зв'язків причинно-наслідкового характеру, в яких максимальні та достовірні значення коефіцієнтів кореляції припадають на ненульовий зсув, між такими показниками: ТМП → Na<sup>+</sup> (0,56\*, n=4), ТМП → Ca<sup>2+</sup> (0,52\*, n=3), ТМП → K<sup>+</sup> (0,58\*, n=4), ТМП → рН<sub>ц</sub> (0,65\*\*, n=4) та ТМП → Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> (-0,49 при n=4, 0,49 при n=9), (стрілка прямує від показника, що вважається причинним до наслідкового показника). За корелограмою рядів ТМП – Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> видно, що кореляції змінюють знак. Коли ряд ТМП випереджує ряд Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> на 20 хв з'являється негативна кореляція, а якщо на 45 хв – кореляція позитивна.



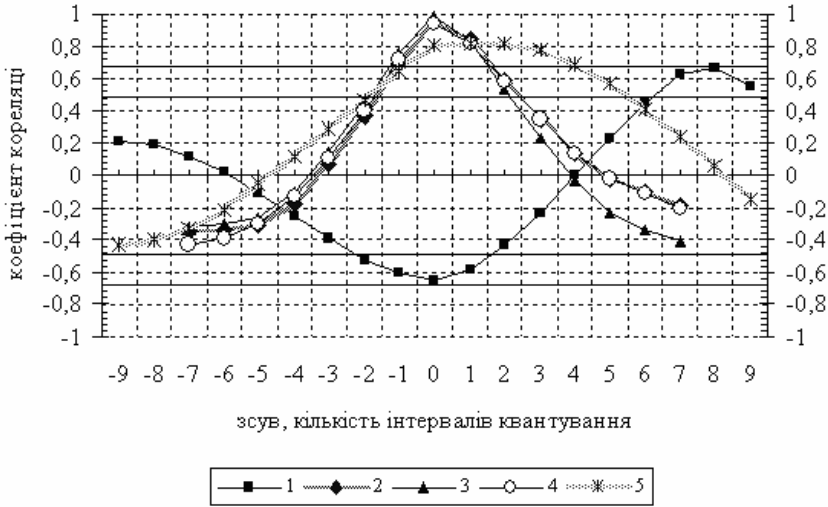


Рис. 5.18. Крос-корелограми динаміки показників зародків шпорцевої жабки: внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  із співвідношенням  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (1), внутрішньоклітинними концентраціями  $\text{Na}^+$  (2),  $\text{K}^+$  (3), об'ємом зародка (5) та внутрішньоклітинними концентраціями  $\text{K}^+$  із  $\text{Na}^+$  (4)

Аналіз результатів, зображених на рис. 5.17, дав змогу виявити ймовірність двох причинно-наслідкових зв'язків між такими рядами:  $V \rightarrow \text{Ca}^{2+}$  ( $0,82^{**}$ ,  $n=2$ ),  $\text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{Na}^+/\text{K}^+$  ( $0,67^{**}$ ,  $n=8$ ). Цікаво, що зв'язок причинного характеру змін об'єму зародка виявлено лише під час змін концентрації вільного кальцію, тоді як з іншими показниками сильна кореляція за браком зсуву, тобто при  $n=0$  (рис. 5.16–5.18).

Характер корелограми засвідчує періодичність виникнення зв'язків між змінними та періодичність напрямку змін цих показників. Вочевидь зрозумілою є сильна кореляція між змінами рівня мембранного потенціалу та змінами внутрішньоклітинних концентрацій іонів калію та натрію, які беруть участь у його генеруванні. Водночас зв'язок  $\text{pH}_c - \text{ТМП}$  виникає при такому ж зсуві, як і зв'язки  $\text{Na}^+, \text{K}^+ - \text{ТМП}$ .

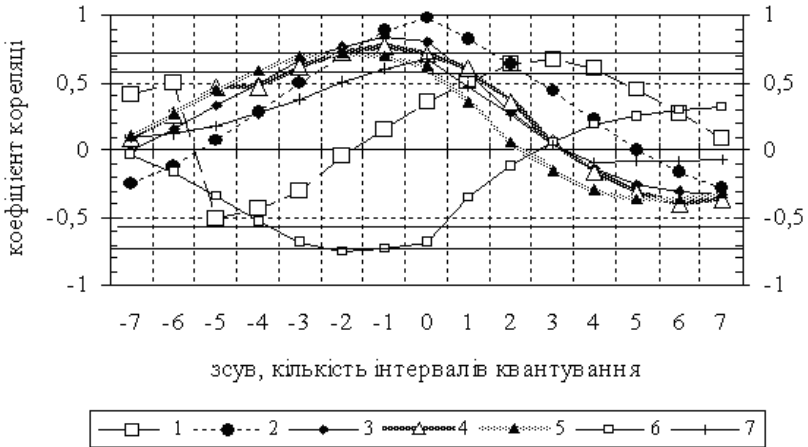


Рис. 5.19. Крос-корелограми динаміки показників зародків шпорцевої жаби: швидкості виділення CO<sub>2</sub> із співвідношенням Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> (1) об'ємом зародка (2), внутрішньоклітинними концентраціями Na<sup>+</sup> (3), K<sup>+</sup> (4), Ca<sup>2+</sup> (5), рН<sub>ц</sub> (7) та трансмембранного потенціалу зі швидкістю виділення вуглекислого газу (6)

Ймовірність чотирьох взаємозв'язків причинно-наслідкового характеру виявлено між рядами, в яких одним з показників є ряд рН<sub>ц</sub> (рис. 5.17): рН<sub>ц</sub> → Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> (0,69\*\*, n=7), рН<sub>ц</sub> → Ca<sup>2+</sup> (0,72\*\*, n=1), рН<sub>ц</sub> → K<sup>+</sup> (0,71\*\*, n=1), рН<sub>ц</sub> → Na<sup>+</sup> (0,71\*\*, n=1).

Кореляційний аналіз між рядом ШВВ та іншими рядами (рис. 5.18) засвідчив наявність достовірної та сильної кореляції у п'яти прикладах за різночасовими зсувами, що свідчить про ймовірність причинно-наслідкових залежностей між такими показниками: ШВВ → Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> (0,67\*, n=3), ШВВ → ТМП (-0,72\*\*, n=-2), Na<sup>+</sup> → ШВВ (0,83\*\*, n=-1), Ca<sup>2+</sup> → ШВВ (0,72\*\*, n=-2), K → ШВВ (0,76\*\*, n=-1).

Негативна кореляція між змінами ТМП та ШВВ – це свідчення того, що зі збільшенням абсолютних значень трансмембранного потенціалу знижується швидкість змін циклу Кребса. Ймовірно, тут має місце корекція між ланками енергозабезпечення

та змінами поляризації зародкових мембран, як це припускав Гойда (Е.А. Гойда, 1993) для зародків в'юна.

Причинні залежності між досліджуваними показниками не можна інтерпретувати прямо – тут прослідковуються складні фізіологічні процеси, що лежать в основі змін цих показників. Можливо, в основі процесів, які генерують зміни причинно-пов'язаних показників, закладений спільний регулюючий механізм (Л.Я. Івашків та ін., 2002).

Одержані результати підтверджують тісну спряженість у протіканні біоелектричних, енергозабезпечувальних та мембранно-транспортних процесів у зародків шпорцевої жаби протягом періоду дроблення.

## **5.6. Співставлення часових взаємозв'язків між динамікою досліджуваних процесів у ранньому ембріогенезі в'юна та шпорцевої жаби**

На рис. 5.20 і 5.21 зображено результати спектрального аналізу динаміки біоелектричних і метаболічних характеристик зародків в'юна та шпорцевої жаби у вигляді періодограм. Достовірність одержаних результатів спектрального аналізу оцінено за розрахунками інтегральних періодограм досліджуваних показників, які наведено в додатку Б. На періодограмах це позначено символами (\* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ).

У в'юна на періодограмах динаміки ШПК та  $pH_c$  максимальний пік потужності коливань припадає на величину 0,16, яка відповідає періоду, рівному приблизно 31 хв, а для змін

концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у цитозолі та ТМП піки потужності відповідають періодам, рівним 27 і 33 хв відповідно. Аналогічно у шпорцевої жаби (рис. 5.21) на періодограмах динаміки ТМП та концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  пік потужності припадає на величину 0,24, що відповідає періоду, рівному приблизно 21 хв. Широка основа піка на періодограмах деяких показників свідчить про значну варіабельність тривалості окремих періодів, близьких до визначеного.

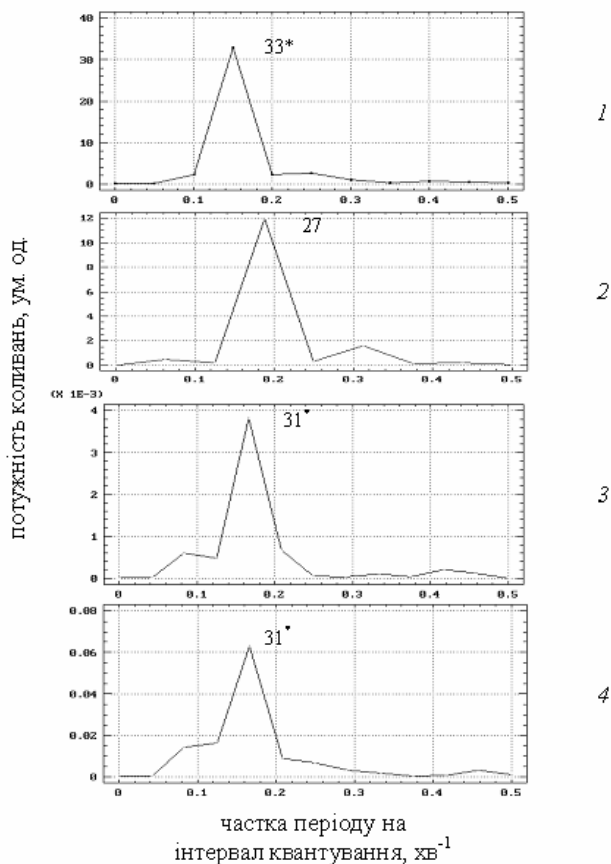


Рис. 5.20. Періодограми досліджуваних показників зародків в'юна: трансмембранного потенціалу (1), концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у цитозолі (2),  $\text{pH}_c$  (3), швидкості поглинання кисню (4).

Примітка. Цифри над піками – період у хв,  $\Delta t = 5$  хв; \* –  $p < 0,05$

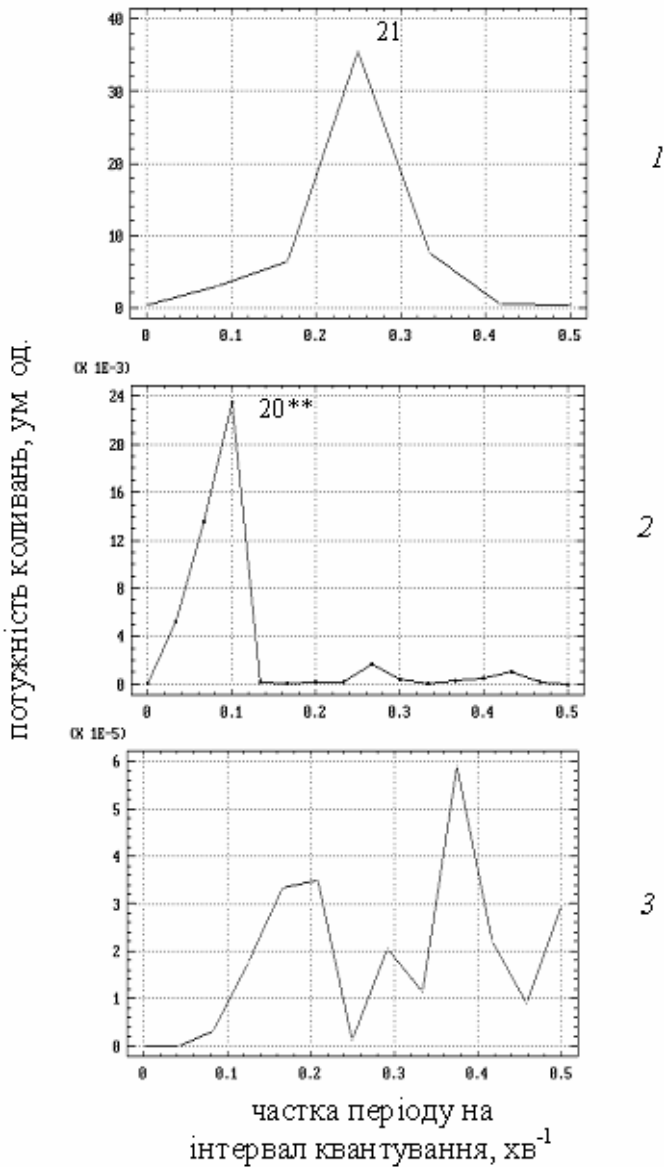


Рис. 5.21. Періодограми досліджуваних показників зародків шпорцевої жаби: трансмембранного потенціалу (1), концентрації  $Ca^{2+}$  у цитозолі (2),  $pH_c$  (3).

Примітка. Цифри над піками - період у  $xh$ , \*\* -  $p < 0,01$ . Для 1, 3  $\Delta t = 5$   $xh$ ; для 2

$\Delta t = 2$   $xh$

За величиною спектральних піків на періодограмах показники можна впорядкувати за зниженням інтенсивності їхніх коливань: ТМП,  $[Ca^{2+}]_v$ , ШПК,  $pH_c$  – для в'юна та ТМП,  $[Ca^{2+}]_v$  – для шпорцевої жаби.

Під час аналізу отриманих періодограм доведено, що в спектрах коливань досліджуваних показників зародків цих тварин перевагу має періодична компонента, яка за тривалістю збігається з тривалістю мітотичного циклу дроблення.

Для зародків в'юна він триває приблизно 31 хв при  $t = 21^\circ C$ , а для шпорцевої жаби – 23 хв при  $t = 17-26^\circ C$ . Результати можна пояснити тим, що є певні фактори, які задають ритм біоелектричним і метаболічним процесам під час дроблення в ранньому ембріогенезі зародків.

Виявлено різницю в динаміці  $pH_c$  цитоплазми зародків в'юна та шпорцевої жаби (рис. 5.20–5.21), у якої спектр коливань цього показника наче “розмитий”. Одержані піки мають дуже незначну потужність ( $\times 10^{-5}$ ) і відповідають 13-, 17-хвилинним коливанням та коливанням у межах 24–31 хв. Тут можна інтерпретувати зміни  $pH_c$  на досліджуваному інтервалі часу як випадкові флуктуації, що підтверджують результати оцінення достовірності спектральних піків (дод. В).

Результати крос-кореляційного аналізу зображено на рис. 5.22 і 5.23.

При співставленні рядів вимірів без часових зміщень в обох об'єктів виявлено сильну кореляцію у парах таких показників: вміст  $K^+$  у зародку та співвідношення вмісту  $K^+/Na^+$  у

зародку, ТМП та  $[Ca^{2+}]_v$ , ШПК, ШВВ та вміст  $K^+$  у зародку чи співвідношення вмісту  $K^+/Na^+$  у зародку. Отже, процеси, за якими описують зміни цих показників, тісно спряжені у риб та амфібій.

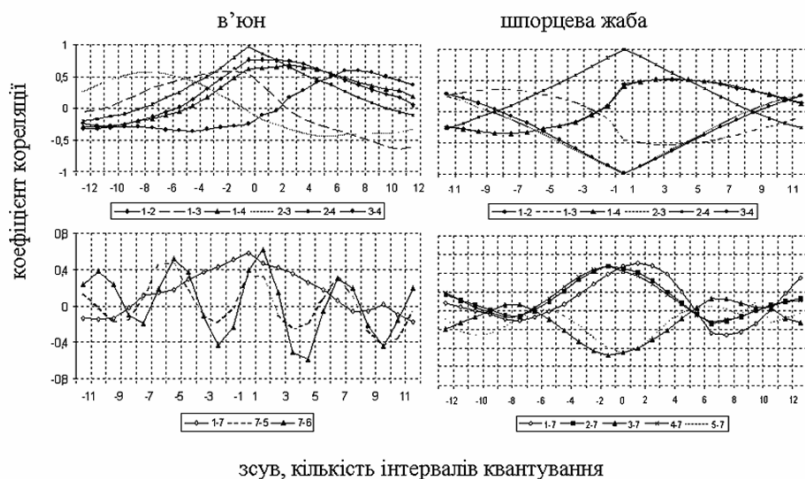


Рис. 5.22. Корелограми досліджуваних показників розвитку зародків тварин, де цифри у підписах графіків позначають: 1 – ТМП; 2 – вміст  $K^+$  у зародку; 3 – вміст  $Na^+$  у зародку; 4 – співвідношення вмісту  $K^+/Na^+$  у зародку; 5 –  $pH_c$ ; 6 – ШПК; 7 – концентрація  $Ca^{2+}$  у цитозолі;  $\Delta t=5$  хв

На рис. 5.22 і 5.23 видно, що характер корелограм показників вмісту  $K^+$  у зародку чи співвідношення вмісту  $K^+/Na^+$  у зародку з іншими досліджуваними показниками є ідентичним у обох тварин, тобто значення коефіцієнтів кореляції за різночасовими зсувами змінюються аналогічно – за величиною та знаком. За цими даними можна припустити, що механізм змін співвідношення вмісту  $K^+/Na^+$  у зародку є однаковим у цих тварин і значною мірою спряжений з процесами, які зумовлюють часові зміни концентрації йонів калію у зародках.

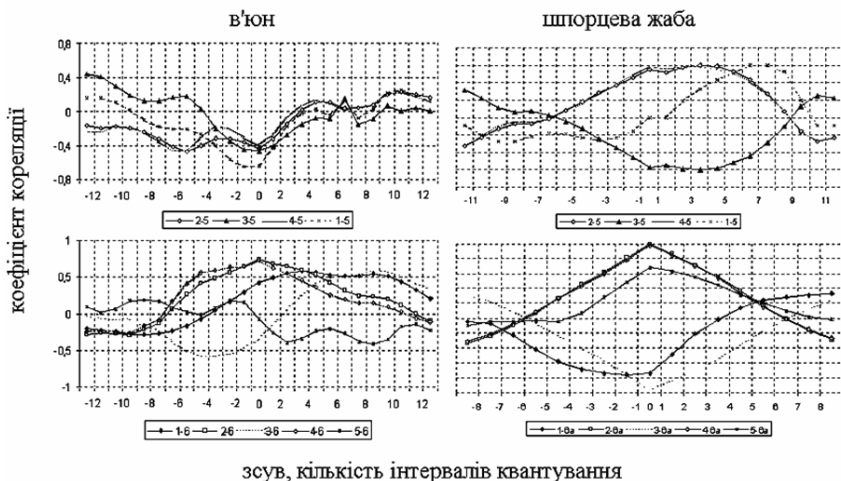


Рис. 5.23. Корелограми досліджуваних показників розвитку зародків тварин, де цифри у підписах графіків позначають: 1 – ТМП; 2 – вміст  $K^+$  у зародку; 3 – вміст  $Na^+$  у зародку; 4 – співвідношення вмісту  $K^+/Na^+$  у зародку; 5 –  $pH_{cy}$ ; 6 – ШПК; 6a – ШВВ; 7 – концентрація  $Ca^{2+}$  у цитозолі

Виявлено деяку різницю (рис. 5.22) у співвідношеннях змін вмісту  $Na^+$  у зародку з співвідношенням концентрацій  $K^+/Na^+$ . Якщо у шпорцевої жаби зміни цих показників мають сильну негативну кореляцію, то для в'юна дещо інша картина: корелограма характеризується коливним ефектом, тобто є достовірні значення коефіцієнтів кореляції з 30-хвилинним зсувом. Ймовірно, що спряженість між часовими змінами цих показників виникає періодично, а різниця у корелограмах може бути зумовлена зміною фазового відношення між ними на початку та в кінці спостереження.

На рис. 5.22 добре простежується, що корелограми показників  $[Ca^{2+}]_v$ - $pH_{cy}$ ,  $[Ca^{2+}]_v$ -ШПК характеризуються чітко вираженим коливним ефектом, тобто часові зсуви відповідних



рядів у різних напрямках виявляють достовірні крос-кореляційні зв'язки, що виникають періодично з 30-хвилинним ритмом. Це свідчить про стійкість взаємозв'язку цих показників за періодичними складовими. Спостерігаємо певну аналогію, аналізуючи зв'язки  $[Ca^{2+}]_v$  з біоелектричними показниками та зміною  $pH_c$ . Кореляції виникають при зсуві у прямому та зворотному напрямках, рівних приблизно 30–40 хв. Величини їхні досить низькі, що може бути пов'язано з нелінійним характером змін показників, нестабільністю періоду та наявністю інших періодичних складових, про що свідчать результати спектрального аналізу динаміки цих показників. Таку саму тенденцію можна побачити на рис. 5.22, де показано корелограми показників, що описують зв'язок змін  $pH_c$  з динамікою мембранного електрогенезу у зародків.

Оскільки не виявлено періодичності у змінах  $pH_c$ , спостерігається певна різниця в часових співвідношеннях цього показника з іншими біоелектричними показниками. Так, достовірні максимальні значення коефіцієнтів кореляції  $pH_c$  з цими показниками (рис. 5.23) припадають на зсув від 5 до 35 хв. Водночас кореляція позитивна з ТМП, вмістом  $K^+$  у зародку та співвідношенням вмісту  $K^+/Na^+$  у зародку та негативна з вмістом  $Na^+$  у зародку.

Виявлення такої причинної залежності може бути зумовлено певними спільними факторами, що однаково впливають на стабілізацію  $pH_c$  та процеси біоелектрогенезу. Припускають, що механізми, які генерують зміни цих процесів, різні у шпорцевої жаби та в'юна. Достовірні часові причинно-

наслідкові співвідношення зі зсувом від 5 до 30 хв спостерігають між показниками: ТМП і вмістом  $K^+$  у зародку та співвідношення вмісту  $K^+/Na^+$  у зародку, ТМП і вмістом  $Na^+$  у зародку (рис. 5.22), а також зі зсувом від 5 до 50 хв між показниками ТМП і ШПК (рис. 5.23). Ці достовірні зв'язки можна пояснити на рівні відомих фізико-хімічних закономірностей.

Збільшення вмісту  $K^+$  у зародку спряжено з гіперполяризацією мембрани та зменшенням вмісту  $Na^+$ . Разом з тим процеси, що зумовлюють зміну концентрації йонів передують зростанню абсолютних значень ТМП. Повну аналогію часових співвідношень між цими показниками спостерігають у зародків шпорцевої жаби, лише за дещо меншими зсувами – від 5 до 25 хв, де також виявлено достовірні значення коефіцієнтів кореляції.

Щодо крос-кореляції між ТМП та ШПК, то на досліджуваному часовому інтервалі виявлено достовірні максимальні значення коефіцієнтів кореляції за додатним значенням зсуву. Аналогічно за зсувом від 5 до 15 хв встановлено достовірність часових співвідношень між ТМП та ШВВ (рис. 5.23) у зародків шпорцевої жаби. Але у цьому разі кореляція негативна і припадає на від'ємне значення зсуву. Ці відмінності, очевидно, зумовлені тим, що процеси клітинного дихання характеризуються періодичністю, як засвідчив попередньо проведений спектральний аналіз.

Аналізуючи цілісну картину часових залежностей між процесами, які спричиняють зміни вмісту йонів у зародках тварин та інтенсивність енергетичного метаболізму, і процесами біоелектрогенезу можна припустити, що в їхній основі лежить

однаковий часовий механізм регулювання, який не залежить від типу дроблення цих тварин (Л.Я. Івашків та ін., 2002). Проведений аналіз сумісної динаміки клітинних процесів на ранніх етапах розвитку зародків в'юна та шпорцевої жаби засвідчив універсальність часового організування між інтенсивністю енергетичного метаболізму та процесами біоелектрогенезу, між процесами, що зумовлюють перерозподіл вмісту йонів  $K^+$ ,  $Na^+$ , співвідношення вмісту  $K^+/Na^+$  у зародку та змінами поляризації зародкових мембран (Л.Я. Івашків и др., 2002; Л.Я. Івашків, Р.Я. Гумецький, 2002).

## **Розділ 6. СХЕМИ І МОДЕЛІ МЕМБРАННОЗВ'ЯЗАНИХ ПРОЦЕСІВ В ЕМБРІОНАЛЬНИХ СИСТЕМАХ**

### **6.1. Структурно– функціональний аналіз між процесами на різних рівнях організування у біологічних системах**

Вивчення біологічних систем з позицій їхнього організування є одним із способів пояснення більшості явищ, які відбуваються в живих організмах на різних рівнях їхнього існування.

У попередніх роботах (Д.И. Санагурский, Е.А. Гойда, 1980; 1989; Д.І. Санагурський, 1998; Д.І. Санагурський та ін. 1998) наведено один із підходів до опису біологічних структур, коли відоме число елементів та їхні характеристики. Як спосіб ідентифікації були застосовані кореляційні функції: з певного

набору елементів отримували ряд структур, у побудові яких відображені попарні взаємодії між різними елементами, включеними в систему. Було розглянуто ідеальний приклад, коли всі кореляційні профілі ідентичні, тобто всі комбінації попарних взаємодій є рівноцінними. У цьому разі маємо тільки одну структуру, що є частковим випадком наявності та функціонування закритої системи, а також умовою стабільного (довготривалого) існування структури в часі. Було проаналізовано “поведінку” чотирьох і п’ятиелементних структур у часі.

У нашій роботі об’єктом дослідження вибрано систему, що розвивається, в розумінні сприйняття, трансформування і генерування постійно діючих збурень. Схематично взаємодію на рівні однієї тріади показано на рис. 6.1.

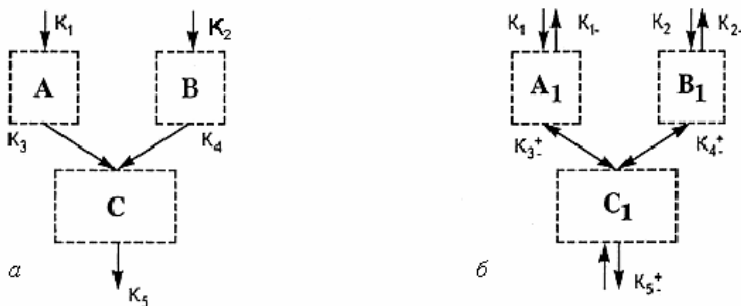


Рис. 6.1. Тріадна взаємодія між елементами A, B і C (a) і  $A_1$ ,  $B_1$  та  $C_1$  (б), як аналог взаємодії на молекулярному рівні

Абстрактно описано структурно-функціональну подібність логічній системі, побудовану на теоретичних уявленнях про її організацію. Головною позицією служить поняття про тріадні взаємодії між елементами, що належать до системи, яку розглядають на певному рівні організування, оскільки більшість

складних явищ можна привести до випадку тріадних взаємодій і до їхнього результату.

У випадку а – система є однонаправленою, а у випадку б вона може набувати різних станів: однонаправленого, рівноважного, або зворотного. Це все залежить від значень  $K_i$  і  $K_{i-}$ . Не розглядаємо виключно “активні” або виключно “пасивні” елементи, що включають генерування або поглинання функції елементами на певному рівні організування (рис.6.2).



Рис. 6.2. Взаємодії між елементами на певному рівні організування

Взаємодії між елементами А, В і С (а) та  $A_1$ ,  $B_1$  і  $C_1$  (б) (рис. 6.1) можна зобразити диференціальними рівняннями виду:

Для структури а                      для структури б

$$\begin{aligned}
 \frac{dA}{dt} &= K_1 A - K_3 A & \frac{dA_1}{dt} &= A_1 (K_1 - K_{1-} - K_3) + K_{3-} C_1 \\
 \frac{dB}{dt} &= K_2 B - K_4 B & \frac{dB_1}{dt} &= B_1 (K_2 - K_{2-} - K_4) + K_{4-} C_1 \\
 \frac{dC}{dt} &= K_3 A + K_4 B - K_5 C & \frac{dC_1}{dt} &= K_3 A_1 + K_4 B_1 + C_1 (K_{5-} - K_{3-} - K_{4-} + K_{5-}).
 \end{aligned} \tag{6.1}$$

Нестационарна поведінка тріадної системи (рис. 6.1 (а), (б)) здійснюється за рахунок властивостей її елементів і за рахунок

констант взаємодій між ними. Елементи  $A_1$ ,  $B_1$  і  $C_1$  є матеріальними чи ідеальними носіями функціонування тріадної системи.

У системі рівнянь (6.1) константи  $K_i$  відповідають таким, які можна назвати константами взаємодії між елементами  $A_i$ ,  $B_i$ , і  $C_i$ . У разі наявності певних початкових умов для розв'язання системи рівнянь (6.1) можна використати процедуру численного інтегрування, що було реалізовано в роботах (А.Е. Цимбрик, Д.І. Санагурський, 2000; 2001; 2000; D.I. Sanagursky, A.E. Tsybryk, 2000). Для того, щоб тріадна структура (рис. 6.1 а, б) була позитивною ланкою у складній багаторівневій системі (рис. 6.3) та щоб ця структура “працювала” у всіх напрямках і досягала певної мети, необхідне виконання принаймні таких умов:

$$K_i > 0, \quad K_i - K_{i-1} > 0, \quad \Sigma F_i \neq \Sigma Q_i.$$

На рис. 6.4 показано схему, що дає змогу розглянути реалізацію взаємодій на молекулярному рівні та їхню інтеграцію в структуру вищої організації, яка може бути характерною для біологічних систем. Елемент 1 на рис. 6.4 – це одна тріада, аналог якої зображено на рис. 6.1 (а), (б).

Невідповідність між  $F$  і  $Q$  якраз і є головною умовою функціонування системи, в розумінні досягнення мети. Загалом структуру, що показана на рис. 6.3, можна також описати і дослідити аналогічно системі диференціальних рівнянь (6.1), використовуючи ланцюг розв'язків для кожної тріади, розглянутої на попередніх рівнях. Таку систему можна описати і для вищих рівнів організування (рис. 6.4). Тут тріада I і II на рис. 6.4 являє собою узагальнення взаємодій, зображених на рис. 6.3.

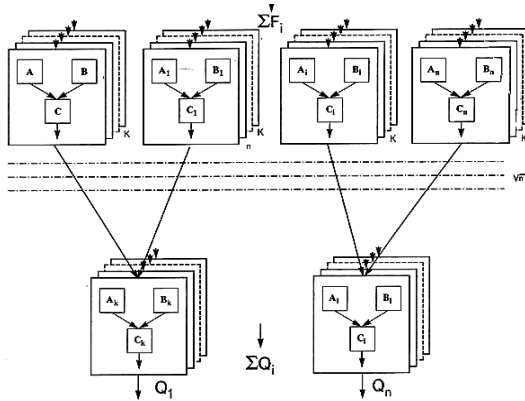


Рис. 6.3. Структура функціональних взаємодій між елементами на молекулярному і вищих рівнях організування біологічних систем

Треба відмітити, що живі системи мають велику множину елементів, а взаємодіють вони між собою у визначені часові інтервали, у певній послідовності та кількісних співвідношеннях.

Питання попарного “розпізнавання” елементів між собою, а також, їхнього часового організування є не вивченим. Йде пошук коливних аналогів, які є “зручними” часовими маркерами при реалізації певної процедури чи процедур одночасно на різних рівнях організування живої системи.

На рис. 6.5 подано графічний аналог біологічної системи з маркерними зонами.

На цьому рисунку (рис. 6.5) зображено динамічні характеристики  $X_{n+2}$  біологічної системи, яка включає  $E_{n+2}$  на проміжку часу  $t_{n+2}$ . Точки  $A_1$  та  $A_2$ ,  $B_1$  та  $B_2$  є маркерними зонами для елементів  $E_2$  та  $E_5$  і відповідно  $E_1$  та  $E_3$ . Ці зони є сигналом для взаємного розпізнавання  $(A_1 \wedge A_2)$ ,  $(B_1 \wedge B_2)$  і дальшої попарної взаємодії з утворенням нових елементів  $E_t$  та  $E_{t+n}$ , які володіють новими властивостями.



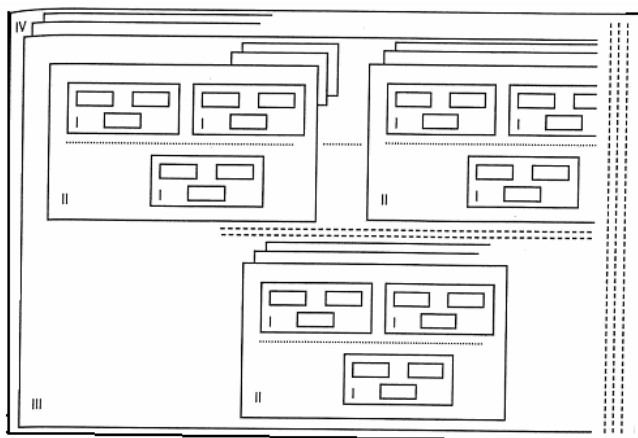


Рис. 6.4. Інтеграція рівнів організації в живій системі на основі тріадних взаємодій, де I – молекулярний рівень; II – рівень надмолекулярних структур (органел); III – клітинний рівень

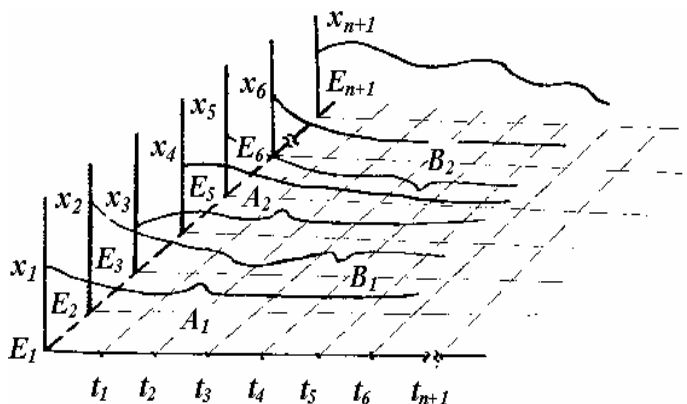


Рис. 6.5. Динамічні характеристики елементів біологічної системи з маркерними зонами ( $A_1$  та  $A_2$ ) і ( $B_1$  та  $B_2$ )

Отже, можна вважати, що такі попарні взаємодії відбуваються з певним набором елементів у різні проміжки часу, утворюючи нові компоненти з новими властивостями, які далі шукають своїх “партнерів” на основі маркерного принципу і т. д. Схематично це показано на рис. 6.6.

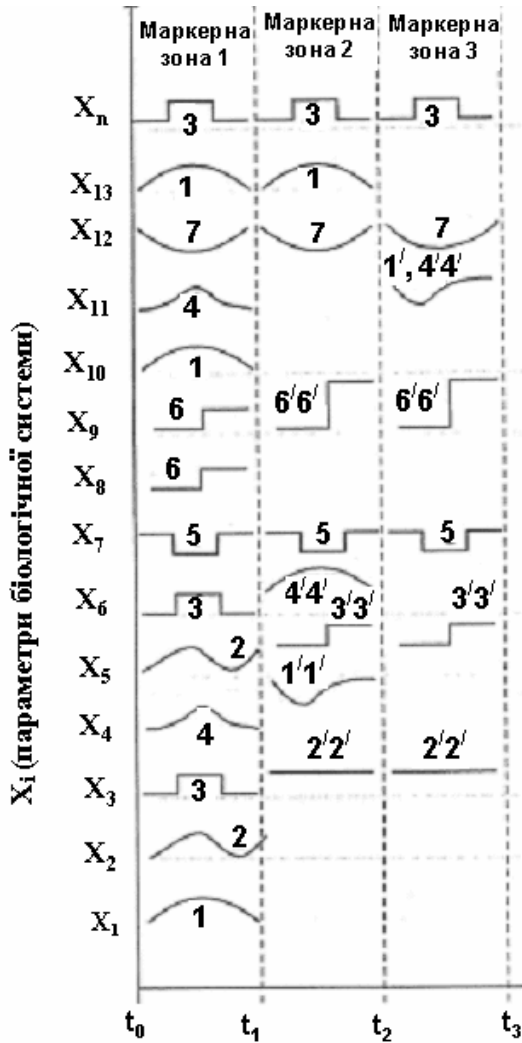


Рис. 6.6. Схематичне зображення взаємодії у певних часових інтервалах (маркерних зонах) компонентів складної системи (процесів з однаковими коливними профілями)

Треба зазначити, що маркерами можуть бути або певні часові інтервали, або певні частотні характеристики коливного процесу, або резонансні взаємодії між компонентами, або певна

сукупність факторів, які зумовлюють попарну взаємодію вибраних компонентів у певний час.

Розглянутий у роботі підхід дає можливість дослідити відомі у біології феномени, які частково вивчені експериментально, наприклад, ферментативний каталіз чи екологічні системи, й аналітично їх оцінювати (Д.І. Санагурський, 2001; Д.І. Санагурський, 1997).

## **6.2. Математичний підхід до інтерпретації структури і регуляторної взаємодії динамічних параметрів, які описують стан об'єкта в певному інтервалі часу**

Один з плідних методів дослідження біологічних систем полягає у вивченні реакції системи на обурюючі дії (Т.Н. Benzieger, 1961). Проте слід підкреслити, що згідно з літературними даними, управління і регулювання в різних системах переважно описують за допомогою лінійних диференціальних рівнянь або вони стають подібними до нелінійних систем у випадку лінійних (Е.Е. Сельков, 1971). Водночас багато закономірностей зовнішнього і внутрішнього врівноваження складних систем можна досліджувати на моделі Ешбі (W. Ashby, 1960). Блоки цієї системи пов'язані між собою таким чином, що обурення, яке змінює стан одного з них,

спричиняє зрушення в параметрах інших, які компенсують обурення, і знову переводять систему в стабільний стан.

Домінуючим методологічним принципом моделювання в біології на сьогоднішній день є така ланка: експеримент–модель–теорія (Ю.Т. Антомонов, 1977). Експериментальні факти дають змогу назбирати певну сукупність закономірних змін, які й стають об'єктом дослідження. Узагальнення знаходить свій вираз у деякій системі гіпотез, де найвищою точкою абстрагування є модель. Для опису складних систем можна використовувати комбінаційні моделі, які являють собою сукупність застосування математичних методів, різних за властивостями і природою, тобто використовувати різний математичний апарат на кожному з етапів дослідження, враховуючи тільки необхідність узгодження між входом і виходом з'єднаних елементів у разі побудови узагальненої моделі.

Потрібно відзначити, що в описі складних систем можлива наявність ієрархії моделей, де, очевидно, найнижчим рівнем є опис стану елементів (Л. Берталанфи, 1969).

Перший етап моделювання полягає в отриманні інформації про стан елементів (безперервної і дискретної) і дослідження її за допомогою методів певного класу.

У разі низького степеня дискретизації інформаційного вектора, що описує поведінку елементу, використовують інтерполяційні методи (Б.А. Демидович, 1970) для отримання задовільної кількості проміжних крапок. Методи інтерполяції функцій можна використовувати при вивченні кінетики

ферментативних процесів, коли необхідно дослідити швидкість реакції у вузькому проміжку часу з дальшим обчисленням коефіцієнтів та інших характеристик у системах, які описують ферментативну систему як при використанні методу стаціонарних, так і нестаціонарних концентрацій (Ч. Уолтер, 1969).

Завершальний етап побудови узагальненої математичної моделі – це застосування методів ідентифікації функцій, теорії подібності та інших підходів, що дають можливість з'ясувати послідовність взаємодій між елементами, які включені в систему.

У системах, утворених із певного набору елементів, є взаємодія між ними, а також спрямованість у “розвитку”, тобто зміна структури і функції в часі (М. Аптер, 1970). Під час розвитку може відбуватися перемикання елементів системи в ареали інших підсистем.

Відомо, що будь-яку систему можна розглядати як “чорний ящик”, в якому наявні вхідні і вихідні величини (В.А. Кулик, 1966). Завданням стає визначення оператора "0", який перетворює вхідні і вихідні параметри. Очевидно, система, яку описує оператор, буде моделлю реального об'єкта, ізоморфної йому за поведінкою.

Завдання визначення “0” зводяться до побудови алгоритму А, за яким необхідно провести трансформації вхідних параметрів у вихідні.

Класичний шлях визначення оператора, або трансформатора,  $Y=0(\bar{X})$ , що охоплює надзвичайно широке коло завдань у біології, техніці, соціології, економіці і т. ін., пропонує Ланге

(O. Lange, 1962). Спочатку елементам системи задають такі властивості:

- середовище взаємодіє з елементом E, зумовлюючи в ньому стан чітко певного роду. Окремі види таких станів будуть входами елемента E ;

- елемент E впливає на середовище, приймаючи також стани певного роду, наприклад, певну температуру, тиск; окремі види таких станів будуть виходами елемента E ;

- елемент має хоча б один вхід і один вихід;

- стани входів однозначним чином визначають стани виходів.

У огляд не включені “виключно активні” і “виключно пасивні” елементи, оскільки біологічні системи належать до типу відкритих (П. Гленсдорф, И. Пригожин, 1973).

Уся процедура аналізу за методом Ланге веде до отримання ряду функцій:

$$\begin{cases} y_1 = f_1(x_1, x_2, \dots, x_m) \\ \dots \dots \dots \\ y_m = f_m(x_1, x_2, \dots, x_m) \end{cases} \quad (6.2)$$

таких, що  $O_{ij} = \frac{\partial f}{\partial x_i}; i = 1 \overline{m}; j = 1 \overline{m}$

і які утворюють інтегральний вид перетворення вектора  $\vec{X}$  в  $\vec{Y}$ .

Для опису взаємодії між елементами системи можна ввести поняття структури системи. Але такий прийом слід використовувати тоді, коли відомі всі входи і виходи системи, а

також частково її структура. Такий підхід, де за відомою структурою системи можна її формалізувати для чисто теоретичного дослідження, називають феноменологічним.

Досліджуючи біологічні системи за приналежністю елементів до певного класу, можна включити в опис будь-яку кількість елементів направленої дії на реалізацію близьких за змістом феноменів. Так, за поняттям інтеграції метаболічних систем (К.А. Кафиани, А.Г. Маленков, 1976; В.П. Скулачев, 1972) опис у термінах математики на рівні клітини можна проводити із залученням усієї відомої інформації про стан клітини, включаючи біохімічні, біофізичні та інші параметри. Власне, наближено описувати можна за такою схемою: нехай метаболічна система  $B$ , яка складається з  $m$  елементів ( $i = 1, 2, \dots, m$ ), володіє функцією відгуку  $X(t)$ . Відомо, що більшість внутрішньоклітинних процесів проходить у коливальному режимі і якимось чином взаємодіє між собою (J.W.S. Pringle, 1951; П. Гленсдорф, И. Пригожин, 1973). Можна описати такі випадки взаємодії між коливальними елементами (Д.І. Санагурський та ін., 1978 ),

$$X(t) = \sum_{x_i}^m x_i(t), \quad X(t) = \prod_{x_i}^m x_i(t), \quad (6.3)$$

де  $X_i(t)$  функції відгуку елементів  $E_m$ .

При змішаних операторах взаємодії між осциляторами маємо

$$X(t) = \prod_{x_i}^m x_i(t) + \sum_{x_i}^m x_i(t); i = 1, 2, \dots, m-1, m. \quad (6.4)$$

Далі будуємо певну систему ідентифікації, у нашому прикладі використовуючи поняття взаємкореляційних функцій (В.И. Грубов, А.Г. Ивахненко, 1966) зі всіма можливими їхніми комбінаціями. На підставі цього можна побудувати шукану структуру системи, що являє собою “грубу модель” (Д.И. Санатурський, Е.А. Гойда, 1980).

Такий шлях приводить до структур, які можуть багато що підказати у разі вивчення механізмів регулювання в клітинах, а також у вивченні процесів генерування певної функції живими системами.

Разом з цим підходом є низка й інших, які можуть бути застосовані в описі біологічних систем (В.М. Глушков и др., 1978; Т.А. Колотенко, 1978). Проте це моделі глобального характеру, які дають змогу розглядати біологічну систему із загальніших позицій. Іноді враховують і динамічні характеристики, що описують стан окремих елементів, хоча в цьому разі беруть до уваги переважно структуру вже відомого феномену, а дослідження проводять у плані визначення його поведінкових властивостей (В. Несс, 1972; Е. Сельков, С. Дынник, 1976). У цьому аспекті є також багато робіт, в яких досліджено характеристики ферментативних систем (М.И. Губанов, А.А. Утенбергенев, 1978) щодо їхньої стійкості, можливої поведінки на певному проміжку часу.

Використовуючи ці методи, можна описувати вже відомі структури з частково певними взаємодіями між їхніми елементами, що зазвичай приводить до систем диференціальних рівнянь, дуже часто нелінійних. Найважливішим етапом роботи в



плані формалізації завдань є отримання структурної моделі за наявною моделлю і за одержаною в дослідях інформацією про її складові елементи.

Отже, обмін речовин в ембріональному розвитку тварин, його зв'язок з іонним гомеостазом і диференціюванням клітин є однією з актуальних проблем сучасної біології. Проте низка питань все ж залишається недостатньо вивченою. Це, зокрема, стосується з'ясування ролі гормонів і деяких фізико-хімічних факторів у регулюванні раннього ембріогенезу і диференціації клітин, дослідженні взаємозв'язку внутрішньоклітинних процесів метаболізму і супутніх ранньому ембріогенезу тварин зовнішніх дій, з потенціалгенеруючою системою. Окрім того, немає досить твердих переконань щодо причетності до процесів внутрішньоклітинного метаболізму йонного гомеостазу клітини. Однак на підставі літературних даних можна вважати, що гормональне регулювання в клітині здійснюється вже на початкових етапах розвитку тварин і має відношення до різних процесів життєдіяльності клітини, зокрема, до її йонного гомеостазу, а через нього – до генерування ТМП. За допомогою гормональних впливів на живу систему інколи вдається “розпізнати” окремі ланцюги регуляторних систем, оскільки часто гормони різної природи володіють протилежно направленими ефектами, що виявляються на однотипних ланках у живій системі. У разі дослідження комплексу складних взаємозв'язків виникає потреба використовувати математичний апарат, який дає змогу побудувати їхню загальну схему.

### 6.3. Засоби і методи аналізу результатів, отриманих під час експерименту

Основною властивістю досліджуваного біологічного об'єкта, є його розвиток, а, отже, параметри, за якими описують його стан, мають нестационарний характер.

Згідно з даними літератури (В.П. Божкова й ін., 1974) і наших досліджень (С.И. Кусень и др., 1980; Д.И. Санагурський, 1983), змінам ТМП властивий коливний характер, тому статистичне оброблення результатів потребує спеціального підходу (Е.А. Гойда и др., 1974).

Нехай відомо декілька паралельних однотипних реалізацій (в нашому прикладі – зміни ТМП) у часі. Опишемо це як:

$$\left\{ \begin{array}{l} X_1(T) = x_{01}(t), x_{02}(t), x_{03}(t), \dots, x_{0n}(t) \\ X_2(T) = x_{11}(t), x_{12}(t), x_{13}(t), \dots, x_{1n}(t) \\ X_n(T) = x_{n1}(t), x_{n2}(t), x_{n3}(t), \dots, x_{nn}(t) \end{array} \right. \quad (6.5)$$

Для отримання кожної точки кривої використано підхід, описаний у нашій роботі (Е.А. Гойда и др., 1974).

Так, щоб отримати першу точку  $[x_{01}(t)]$ , на підставі серії спостережень, описаних формою (6.5), необхідно:

$$\bar{x}_0(t) = \sum x_{i1} / n . \quad (6.6)$$

Границі змін досліджуваного показника  $x_0(t)$  в певний момент часу будуть:

$$\begin{cases} \Delta x_{0max}(t) = [x_{i1max}(t) - x_0(t)] \\ \Delta x_{0min}(t) = [x_{j1min}(t) - x_0(t)] \end{cases}. \quad (6.7)$$

Аналогічні операції роблять із рештою послідовністю точок, коли обов'язковою умовою є облік фіксації часу при отриманні кожної точки.

Подібні ж операції здійснюють для масивів, одержаних при дії гормонів, антибіотиків і цитостатиків.

Для знаходження достовірних або недостовірних відмінностей у експериментах можна використати стандартні програми, які дають змогу підраховувати не тільки відмінності між контролем і дією, але і між однотипними впливами різної сили.

Оскільки в роботі використовували результати дослідження ТМП у середовищах, що містять компоненти, які можуть впливати на окремі ланки метаболізму, то було цікаво з'ясувати в першому наближенні взаємовідношення між деякими процесами метаболізму клітин, а також між вивченими в цих умовах біофізичними параметрами.

Наприклад, використовували підхід (Д.І. Санагурський, О.А. Гойда, 1980), коли за елементарними системними позиціями було узагальнено поняття про властивості систем, а також розглянуто завдання відтворення структури системи, що генерує певну властивість за набором характеристик елементів. Отже, передбачено набір елементів  $E_1, E_2, E_3, \dots, E_n$ . Потрібно відтворити

структуру системи, використовуючи характеристики елементів. За співвідношенням для обчислення взаємокореляційної функції

$$R_{x_i y_i}(\tau) = \frac{1}{T - \tau} \int_0^{T-\tau} x(t)y(t + \tau) dt \quad (6.8)$$

та з урахуванням повної парної комбінації характеристик елементів, отримуємо:

$$C_n^z R_{x_i y_i}(\tau) = \int_{C_n^2} grad R_{x_i y_i}(\tau), \quad (6.9)$$

де  $R_{x_i y_j}(t)$  – значення взаємокореляційної функції;  $x(t)$  і  $y(t + \tau)$  – тимчасові характеристики елементів  $E_i$ , що входять у систему.

За співвідношенням (6.9), можна побудувати кореляційний профіль, одержаний при розрахунку  $R_{x_i y_j}(\tau)$  всіх можливих комбінацій характеристик  $E_i$ , що входять у систему (рис. 6.7).

Приклад з повним збігом усіх максимумів – ідеальний для розрахунку кореляційного профілю, й, отже,  $\tau = \text{const}$  (рис. 6.8). Використовуючи значення  $R_{x_i y_j}(\tau)$  при  $\tau_1, \tau_2$  і т.д. (рис. 6.7), отримуємо низку структур, зображених на рис. 6.9. Тут розглянуто комбінацію з чотирьох елементів. Як видно з рис. 6.9, для кожного фіксованого  $\tau$  є певна структура, тобто можна говорити про “розвиток” системи в часі. Структуру, зображену на рис. 6.9, вважають фіксованою, оскільки всі максимуми  $R_{x_i y_j}(\tau)$  належать до одного  $\tau$ .

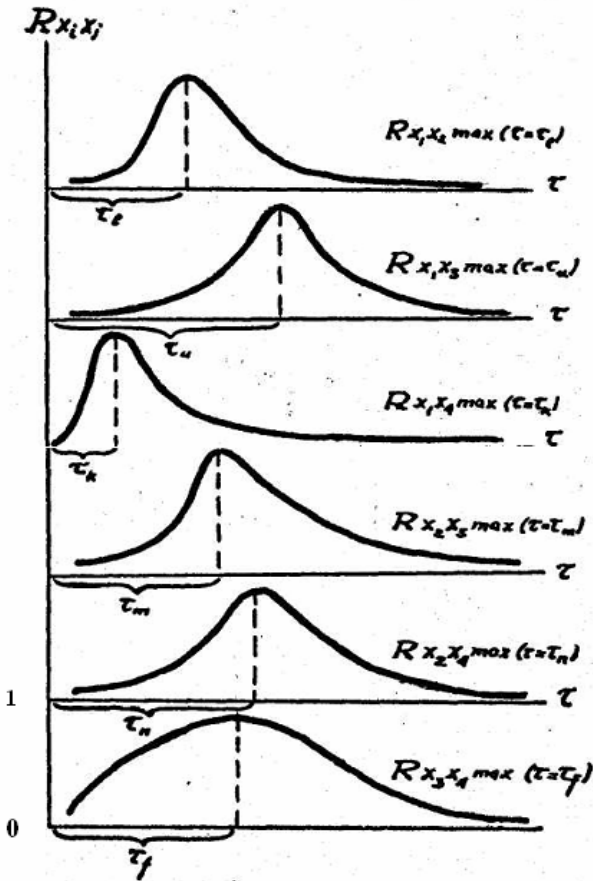


Рис. 6.7. Кореляційний профіль, одержаний при розрахунку всіх можливих комбінацій для чотирьохелементної системи

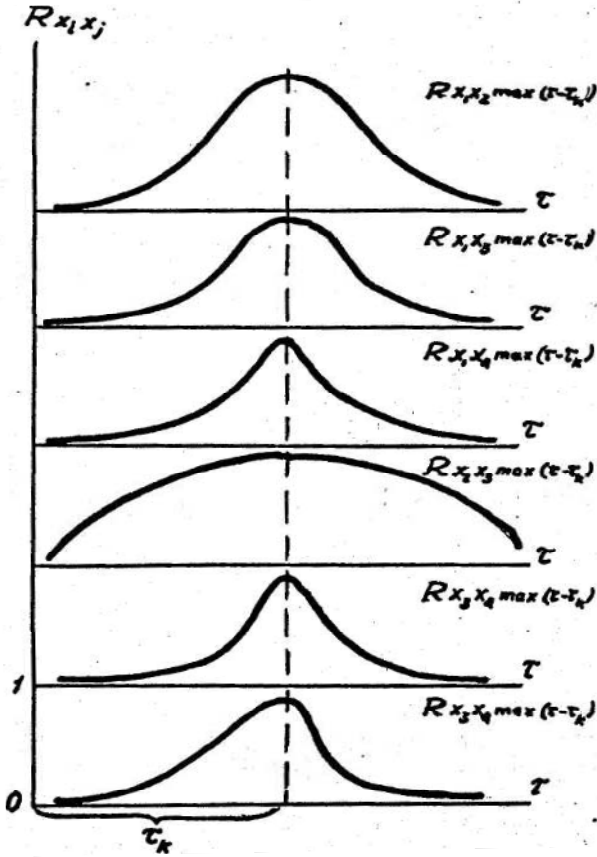


Рис. 6.8. Ідеальний приклад розрахунку кореляційного профілю для чотирихелементної системи

Аналітично такі структури можна описати матрицями стану складної системи (6.10),

$$\text{де } R_{x_i y_j}(\tau_1)_{\max 1} \rangle R_{x_i y_j}(\tau_2)_{\max 2} \rangle \dots \rangle R_{x_i y_j}(\tau_K)_{\max K}.$$

Компонентами матриці служать значення  $R_{x_i y_j}(\tau_k)_{\max K}$  у порядку зростання  $\tau$  ( перший рядок ). Кожен стовпець містить

значення кореляційних функцій за градієнтом зменшення їхніх абсолютних значень у відповідний момент часу  $\tau$  для першого стовпчика –  $\tau_1$ , для другого –  $\tau_2$ , і для  $k$  –  $\tau_k$ .

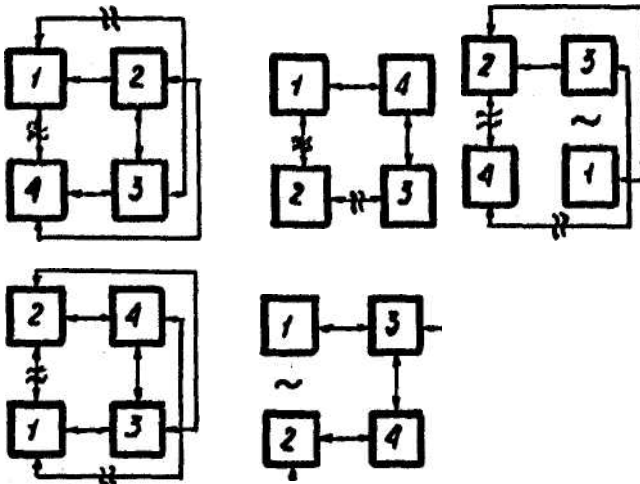


Рис. 6.9. Структури, які відповідають кореляційним профілям, що зображені на рис. 6.7

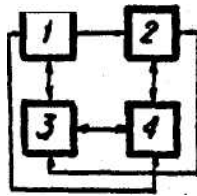


Рис. 6.10. Структура кореляційного профілю, зображеного на рис. 6.8

За значеннями  $R_{x_i y_j}(\tau_1)_{\max} \dots R_{x_i y_j}(\tau_1)_{\max}$  першого стовпця будемо структуру системи для моменту  $\tau_1$ , елементи якої описуються безперервними функціями, що дають змогу розрахувати всі комбінації взаємокореляційних функцій.

Аналогічно чинимо і з іншими стовпцями. При рівності значень  $R_{x_i y_j}(\tau_k)_{\max_K}$  і  $R_{x_i y_j}(\tau_k)_{\max_{K+1}}$  характерне розгалуження структури або наявність зворотних зв'язків у такій системі. У разі  $\tau_{1 \max} = \tau_{2 \max}$  (всі максимуми кореляційних функцій відповідають одному фіксованому значенню  $\tau$ ) можна говорити про наявність єдиної композиції елементів, які генерують певну функцію на всіх проміжках її вивчення.

$$\left\| \begin{array}{cccc} R_{x_i y_j}(\tau_1)_{\max_1}, & R_{x_i y_j}(\tau_2)_{\max_2}, & \dots, & R_{x_i y_j}(\tau_n)_{\max_n}, \\ R_{x_i y_j}(\tau_1)_{\max_1}, & R_{x_i y_j}(\tau_2)_{\max_2}, & \dots, & R_{x_i y_j}(\tau_n)_{\max_n}, \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ R_{x_i y_j}(\tau_1)_{\max_1}, & R_{x_i y_j}(\tau_2)_{\max_2}, & \dots, & R_{x_i y_j}(\tau_n)_{\max_n} \end{array} \right\| \quad (6.10)$$

Матриця стану структури має вигляд:

$$\left| \begin{array}{c} R_{x_i y_j}(\tau_1)_{\max_1}, \\ R_{x_i y_j}(\tau_2)_{\max_2}, \\ \dots \\ R_{x_i y_j}(\tau_k)_{\max_k} \end{array} \right| \quad (6.11)$$

і являє собою вектор-стовпець.

Властивість (6.11) використовують для перевірки точності однотипної паралельної реалізації. Якщо всі максимуми  $R_{x_i y_j}(\tau)$  відповідають одному фіксованому  $\tau$ , то можна оцінити точність використовуваного методу, ступінь стаціонарності досліджуваного явища.



Такі структури є якісним етапом для оцінення взаємодіючих елементів і джерелом для складання математичних моделей з кількісним їхнім дослідженням. Усі розрахунки за запропонованою схемою проводили на електронно обчислювальних засобах різної потужності.

#### **6.4. Дослідження динаміки процесів: кореляційний і спектральний аналізи часових рядів**

Більшість методів аналізу динаміки процесів засновано на припущенні, що зміни у часі різних показників можна розглядати як стаціонарний випадковий процес, який володіє ергодичними властивостями (Н.Б. Игошева і др., 2001; Н.А. Хованова, И.А. Хованов, 2001). Під випадковим процесом розуміють процес зміни стану деякої системи в часі, що підкоряється ймовірнісним (статистичним) законам. Перехід системи з одного стану в інший є випадковою подією, що загалом залежить від усього попереднього перебігу процесу.

Завданням нашого дослідження стало вивчення багатомірного випадкового процесу, який описується багатьма параметрами. Розпочинаючи це дослідження, необхідно було передбачити насамперед відбір експериментальних даних як вихідний матеріал для розрахунків часових характеристик досліджуваних процесів. Об'єктами аналізу були послідовні

значення різних фізико-хімічних та метаболічних показників зародків в'юна та шпорцевої жаби, виміряні у дискретні моменти часу – часові ряди. Якщо одночасно реєструють декілька характеристик процесу, то йдеться про багатомірні часові ряди. Множину значень кожного ряду  $X(t_1), \dots, X(t_n)$  розглядали як сукупність спостережень над деяким багатомірним комплексом. Для кожного завдання ряди динаміки групували за спільною часовою основою та підбирали однаковий інтервал часу  $\Delta t$  між сусідніми вимірами, які позначали символами  $X_0, X_1, X_2, \dots, X_n$  тощо (М. Кендэл, А. Стьюарт, 1976).

Метою аналізу часових рядів є визначення характеристик процесу, якому належить часовий ряд. Це означає, що та чи інша характеристика має віддзеркалювати властивості не окремо взятої реалізації, а всього статистичного ансамблю реалізацій випадкового процесу. Визначення будь-якої характеристики має включати операцію обчислення середніх за ансамблем значень. Але дуже важливий клас процесів, які можна охарактеризувати, не володіючи статистичним ансамблем. Це т. зв. ергодичні процеси. Властивість ергодичності є принциповою у методах аналізу часових рядів і означає, що всі статистичні характеристики процесу можна отримати на основі вивчення однієї реалізації випадкового процесу, якщо процедуру обчислення середніх за ансамблем значень замінити усередненням за часом. Отже, для математичного аналізу динаміки показників важливе значення мав об'єм вибірки або довжина ряду, тобто число значень кожного показника  $N$ .

Послідовність часових значень різних показників, наприклад, динаміка трансмембранного потенціалу чи швидкості поглинання кисню, включає у себе стаціонарні та перехідні процеси, чи нестаціонарні зміни, які можна описати як:

$$X(t) = M(t) + U(t),$$

де  $X(t)$  – експериментально отримана реалізація нестаціонарного випадкового процесу;

$M(t)$  – деяка детермінована функція, що визначає нестаціонарну частину аналізованих даних (тренд);

$U(t)$  – реалізація стаціонарного випадкового процесу.

Після виділення і видалення тренду з часового ряду нестаціонарних даних  $X(t)$  аналіз зводиться до аналізу стаціонарної складової  $U(t)$  класичними статистичними методами. Тренд – це плавні загальні зміни неколивного типу протягом тривалого відрізка часу. Якщо виключити тренд – залишається коливний ряд, який може в одному разі відображати випадкові флуктуації, а у другому – ритмічний коливний рух. Цей коливний ряд прийнято називати осциляцією. Коли зміни загального рівня досить повільні, порівняно до динаміки, яку оцінюють, використовують стандартний підхід до дослідження систем з повільно-мінливими параметрами. У цьому разі припускають, що на невеликих проміжках часу процес приблизно можна вважати стаціонарним і застосовувати класичний апарат аналізу динаміки процесів (Н.А. Хованова, И.А. Хованов, 2001).

У процесі дослідження динаміки показників ми застосовували статистичні методи:

1. Розрахунок авто- та крос-кореляційних функцій, які дають змогу оцінити статистичні особливості випадкових процесів у часовій області.

2. Метод спектрального аналізу, за яким можна охарактеризувати особливості процесів у області частот: розрахунок спектра потужності.

Для виявлення та кількісного оцінення ступеня взаємозв'язку між значеннями даних, які розділяє певний часовий інтервал, часто користуються нормованою кореляційною функцією, що відображає залежність коефіцієнта кореляції від величини часового зсуву.

Якщо ці значення даних належать до одного часового ряду, тоді зазначену функцію вважають авто кореляційною, а коли вибірка динаміки показника  $X(t)$  відповідає моментам часу  $0, \Delta t, 2\Delta t, \dots, N\Delta t$  і їхні значення рівні  $X_0, X_1, X_2, \dots, X_n$ , її розраховують за такою формулою:

$$R_{xx}(n\Delta t) = \frac{1}{N-n+1} \times \frac{\sum_{k=0}^{N-n} (X_k - \bar{M}_x)(X_{k+n} - \bar{M}_x)}{\sum_{k=0}^{N-n} (X_k - \bar{M}_x)^2}, \quad 6.12$$

де кількість часових зсувів  $n = 0, 1, 2, \dots, M; M \ll N$ ;

$N$  – кількість значень показника;

$\bar{M}_x$  – вибіркове середнє ряду.

Якщо ж ці значення даних належать до різних часових рядів  $X(t)$  та  $Y(t)$ , тоді нормовану кореляційну функцію вважають

$$R_{xy}(n\Delta t) = \frac{1}{N - n + 1} \times \frac{\sum_{k=0}^{N-n} (X_k - \bar{M}_x)(Y_{k+n} - \bar{M}_y)}{\left[ \sum_{k=0}^{N-n} (X_k - \bar{M}_x)^2 \sum_{k=0}^{N-n} (Y_{k+n} - \bar{M}_y)^2 \right]^{1/2}} \quad 6.13$$

крос-кореляційною, або функцією взаємної кореляції, розраховану за формулою:

Функції кореляції, або залежність коефіцієнта кореляції від величини зсуву, графічно описують авто- та крос-корелограмами. Форма корелограм несе важливу інформацію про характер динаміки процесів та є самостійним параметром оцінення динаміки показників. Аналіз  $R_{xx}(n\Delta t)$  у широкому діапазоні змінної  $n\Delta t$  дає змогу більш детально дослідити характер динаміки показників та визначити період їхніх коливань.

Положення максимумів функції автокореляції відповідають такому часовому зсуву, при якому відбувається збіг періодів коливань цього показника. Криву автокореляційної функції можна проаналізувати таким чином: якщо при зсуві на певну кількість часових інтервалів спостерігається максимум, то йому відповідає повторення змін показника з певним періодом  $T$  (рівний величині зсуву). Ще один максимум, який спостерігається при зсуві на іншу кількість часових інтервалів (не кратну першому зсуву), означатиме, що є ще ритмічні зміни цього показника з іншим періодом  $T$ .

Нагадаємо, що коефіцієнт кореляції може набувати значення від  $-1$  до  $1$  і не залежить від одиниць вимірювання

показника  $X(t)$ . Причому, максимальне значення коефіцієнт автокореляції набуває на нулі (за браком зсуву). Залежно від внутрішньої структури експериментальних даних швидкість зменшення  $R_{xx}(n\Delta t)$  на автокорелограмах може істотно змінюватись у різних діапазонах за змінною  $n\Delta t$ .

За формою крос-корелограм між коливними складовими різних показників можна виконати такий аналіз. По-перше, виявити взаємозв'язок між їхніми змінами та оцінити, з яким періодом він відбувається. По-друге, за часом появи та величиною першого максимуму  $R_{xy}$  можна розрахувати фазові співвідношення між процесами (упередження чи відставання одного від другого), а також оцінити стабільність виявлених взаємозв'язків у часі.

На відміну від раніше розглянутих імовірнісних методів, які дають змогу описати статистичні особливості динаміки процесів у часовій області, за допомогою спектрального аналізу можна охарактеризувати частотний склад досліджуваного процесу (часового ряду). Його суть полягає в розкладанні складного процесу на прості періодичні складові (гармонічні коливання типу синусоїди). Аналіз теоретично оснований на перетворенні Фур'є.

Пряме перетворення Фур'є дає нам спектр функції, що описується рівнянням:

$$F(f) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{+\infty} X(t) e^{-i\omega \cdot t} dt, \quad (6.14)$$

де  $X(t)$  – часова функція (досліджуваний процес);

$\omega$  – кругова частота,  $\omega = 2\pi f$ ;

$i$  – уявна одиниця  $((-1)^{-2})$ ;

$f=1/T$ , де  $T$  – період коливних складових.

Зворотнє перетворення Фур'є для опису функції спектром має вигляд:

$$X(t) = 2 \int_0^{\infty} [a(\omega) \cos \omega \cdot t + ib(\omega) \sin \omega \cdot t] dt . \quad (6.15)$$

Слід відзначити, що для реалізації стаціонарних випадкових процесів перетворення Фур'є немає, оскільки не виконується умова абсолютного інтегрування. Для аналізу особливостей випадкового процесу  $X(t)$  у частотній області користуються іншою характеристикою – спектром потужності  $S(f)$ . Відмінність  $F(f)$  і  $S(f)$  у тому, що  $F(f)$  визначає амплітудний спектр, а  $S(f)$  - енергетичний спектр (Н.А. Хованова, И.А. Хованов, 2001).

Практичні формули опису функції у вигляді спектра:

$$X_1(t) = \frac{a_0}{2} + a_1 \cos \omega_1 t + a_2 \cos \omega_2 t + \dots + a_x \cos \omega_k t \quad (6.16)$$

$$X_2(t) = b_1 \sin \omega_1 t + b_2 \sin \omega_2 t + \dots + b_k \sin \omega_k t , \quad (6.17)$$

де  $\omega_k = \omega_1 \times k$  – кратні частоти (гармоніки основної частоти).

Тобто функцію описують за сумою синусів і косинусів.

Розкладання в ряд Фур'є фактично є комплексною величиною: має два ряди коефіцієнтів  $a$  і  $b$ , що у векторній сумі дають модуль  $c$ . Якщо виразити функцію через коефіцієнт  $c$ , тоді

$$X(t) = \frac{a_0}{2} + c_1 \cos(\omega_1 t + \varphi_1) + c_2 \cos(\omega_2 t + \varphi_2) + \dots + c_k \cos(\omega_k + \varphi_k) . \quad (6.18)$$

Тобто в загальному вигляді часову функцію можна зобразити так:

$$X(t) = M(t) + \sum_{k=1}^{n/2} c_k \cos(\omega_k t + \varphi_k) + \varepsilon, \quad (6.19)$$

де  $M(t)$  – біжуче середнє значення процесу (тренд);

$\varepsilon \sim N(0; \sigma)$  – залишкові відхилення (похибка) опису дискретної функції  $X(t)$  обмеженим числом частот.

Ряд коефіцієнтів  $c_k$  характеризує амплітуди періодичних складових, квадрати величини яких є енергетичним спектром, або періодограмою цього процесу:

$$|c_k| = \sqrt{a_k^2 + b_k^2}, \quad (6.20)$$

де  $k = 1 \dots n/2$  – загальна кількість спектральних складових;

$$\varphi_k = \operatorname{arctg} \frac{b_k}{a_k} \quad (6.21)$$

– фази, з якими вони входять у сумарний опис процесу.

Енергетичний спектр, описаний рядом коефіцієнтів  $c_k^2$ , тобто періодограма, засвідчує вклад кожної частоти в загальну динаміку процесу, оскільки за таким параметром спектральні складові є адитивними (Н.А. Хованова, И.А. Хованов, 2001).

За аналогією з амплітудним спектром, спектр потужності періодичного сигналу з періодом  $T$  є періодичним та містить базову частоту  $f=1/T$  і гармоніки, тобто частоти складових, кратні основній частоті  $k \cdot f$ ,  $k = 2, 3, 4, \dots$ .



## **6.5. Схема та етапи дослідження динаміки метаболічних і біоелектричних процесів**

Після відбору експериментального матеріалу оцінювали та аналізували динаміку фізико-хімічних показників за такою схемою:

1. Підготування даних до аналізу.
2. Розрахунок основних часових характеристик динаміки окремих досліджуваних показників.
3. Аналіз загальної картини динаміки у ранньому ембріогенезі метаболічних і біоелектричних процесів як цілісної системи.
4. Оцінення достовірності одержаних результатів аналізу.
5. Інтерпретація результатів часового аналізу та їхнє узагальнення.

Під час математичного аналізу динаміки використали пакет прикладних програм STATGRAPHICS, зокрема, програм з розділу TIME SERIES PROCEDURES.

Попереднє оброблення відібраних даних про зміни реєстрованих показників полягало у переведенні їх з графічної у цифрову форму. Цю процедуру виконано за допомогою програми GRAPH DIGITIZER, що забезпечує певний самоконтроль відбору даних. Одержані часові ряди проквантовано з однаковим часовим інтервалом між значеннями показників. Візуальний аналіз динаміки показників проводили за допомогою графічних методів

опису даних з використанням підпрограми HORIZONTAL TIME SEQUENCE PLOT з підрозділу TIME SERIES ANALYSIS. За допомогою графічного опису часових рядів контролювали можливість появи помилок, які можуть виникати під час відбору даних. Такий аналіз давав змогу зробити попередні висновки про характер процесу, які надалі перевіряли та уточнювали за допомогою розрахунків конкретних характеристик ряду. Оскільки візуально динаміка більшості досліджуваних показників характеризується короткотривалими коливаннями відносно більш довготривалих змін, тому насамперед ці ряди розкладено на адитивні компоненти – часовий тренд та коливний процес. Для виділення тренду з динаміки деяких показників було використано підпрограму POLINOMIAL SMOOTHING з підрозділу SMOOTHING. Видалення повільних неперіодичних змін із динаміки показників з одержанням у результаті коливних складових проводили за допомогою поліноміальної моделі, використовуючи підпрограму MEAN OR TREND REMOVAL з підрозділу TIME SERIES ANALYSIS. Числові значення аперіодичних та періодичних складових досліджуваних показників надалі використовували як вихідні дані та аналізували окремо.

На наступному етапі оцінювали основні часові характеристики динаміки окремих досліджуваних параметрів зародкових клітин. Він включав автокореляційний та спектральний аналізи динаміки кожного з досліджуваних показників для виявлення періодичності (або майже періодичності) в характері динаміки процесу, який описує певний показник. Таку подвійну перевірку проводили з метою уникнення

помилки в інтерпретації результатів аналізу на періодичність. Для цього розраховували й автокореляційну функцію, й спектр потужності коливних складових усіх показників за допомогою підпрограм AUTOCORRELATION FUNCTION та PERIODOGRAM з підрозділу TIME SERIES ANALYSIS, а результати подавали у вигляді графіків їхніх автокорелограм та періодограм.

За автокорелограмою оцінювали період коливань кожного показника та його стабільність. Додатково візуально проаналізовано форму розрахованих автокорелограм, яка якісно відрізняється для періодичного та неперіодичного процесів: автокореляційна функція випадкового процесу, що наближається до хаотичного, прагне до нуля зі збільшенням часового зсуву  $n\Delta t$ , а для періодичного процесу ця функція засвідчує осциляції. Крім того, наближення автокореляційної функції до нуля не завжди відбувається монотонно й часто воно носить характер згасаючих осциляцій. Критерієм зростання хаотичності у поведінці процесів запропоновано вважати час кореляції  $t_k$ , який обчислювали за автокорелограмами показників. Це час зсуву, протягом якого величина коефіцієнта кореляції між значеннями ряду зменшується у 10 разів (Н.Б. Игошева и др., 2001). Чим меншим є час кореляції, тим більш хаотичною є поведінка досліджуваного процесу. Швидке згасання осциляцій на графіку автокореляційної функції свідчить про нестабільність визначеного періоду коливань певного показника.

У графіках періодограм ординатами є значення спектральної потужності (в ум. од.), які відповідають частоті коливань (частці періоду на інтервал квантування,  $xv^{-1}$ ) на осі абсцис. За розрахунками спектра потужності виявляли частотний

склад досліджуваного часового ряду, тобто його періодичні складові, та визначали енергетичні співвідношення між періодичними та неперіодичними складовими. Наявність та інтенсивність періодичних компонент для кожного часового ряду визначали за виявленими достовірними піками на спектрах потужності, що давало уявлення про природу та властивості відповідного процесу. Слід зазначити, що площа під кривою піка збільшується пропорційно до тривалості ряду. Чим коротший ряд, тим нижче і ширше пік на періодограмі за шкалою частот. За останнім параметром також оцінювали стабільність визначеного періоду коливань.

Оскільки ми аналізували експериментальні дані обмеженої тривалості, це позначалось на результатах розрахунку спектра – виникали ефекти, зумовлені скінченою довжиною часового ряду (ефекти витоку) (Н.Б. Игошева и др., 2001; Н.А. Хованова, И.А. Хованов, 2001). Суть їхня полягає у тому, що енергія з одних спектральних компонент може частково “перетікати” в інші компоненти, якщо часовий ряд не містить цілих циклів періодичних компонент, що його утворюють, тобто крок квантування не пов’язаний з періодом цих компонент співвідношенням:

$$f = \frac{m}{N \cdot \Delta t}, \quad (6.22)$$

де  $m$  – ціле число періодів;

$N$  – довжина ряду (кількість значень показника);

$\Delta t$  – інтервал квантування.

Ефект витоку може бути послаблений збільшенням кількості або частоти відліків, оскільки у цьому разі зростає

спектральна роздільна здатність, тобто число спектральних ліній, які припадають на одиницю частотного інтервалу. Докладний опис цих ефектів і засобів боротьби з ними наведено у працях: Н.Б. Игошева и др., 2001; Н.А. Хованова, И.А. Хованов, 2001. Уникнення ефектів витоку неможливе для квазіперіодичних та неперіодичних часових рядів).

За результатами спектрального аналізу встановлюють і наближення динаміки показника до хаотичного режиму. Неперіодичний процес має суцільний спектр. У разі квазіперіодичного характеру динаміки отримували дискретний спектр потужності з довільно розміщеними на шкалі частот спектральними піками. Слід також зауважити, якщо періодична складова не гармонічного характеру, у спектрі їй може відповідати декілька піків.

Автокорелограми та періодограми кожного ряду динаміки, одержані в результаті аналізу, узгоджувались між собою.

Далі досліджували взаємозв'язки у часі комплексу метаболічних і біоелектричних характеристик зародків тварин протягом дроблення. Дослідження проводили з використанням методу крос-кореляції за допомогою підпрограми CROSS-CORRELATION FUNCTION з підрозділу TIME SERIES ANALYSIS. У результаті цього аналізу одержано крос-корелограми, що являють собою послідовність значень коефіцієнтів кореляції, визначені при послідовних часових зсувах одного ряду відносно іншого. Взаємна кореляція, як вже зазначали раніше, не лише характеризує ступінь статистичної залежності процесів, але й виявляє їхню

періодичність, а також фазовий зсув між коливаннями цих процесів. Знак зсуву, якому відповідають достовірні значення коефіцієнта кореляції, свідчить про те, який з рядів є випереджувачим, а величина зсуву – час випередження, що може означати причинно-наслідковий зв'язок.

За одержаними значеннями коефіцієнтів кореляції та крос-кореляції між парами часових рядів наступний етап аналізу здійснювали таким чином:

а) за величиною та знаком значень коефіцієнтів кореляції, визначених без часових зміщень, оцінено тісноту та напрямок виявлених кореляційних зв'язків;

б) з урахуванням величини та знака часового зсуву  $n\Delta t$  оцінено ймовірність часових причинно-наслідкових залежностей між досліджуваними показниками, а отже, часові співвідношення між процесами, які ними описуються;

в) для коливних складових з близькими періодами встановлено, чи комбінації процесів відбуваються у фазі, протифазі чи у запізненні;

г) проведено якісний аналіз форми авто- та крос-корелограм коливних складових різних показників для розуміння часової структури динаміки процесів;

д) системний аналіз встановлених кореляційних зв'язків кожного показника з множиною інших дав змогу оцінити динаміку показників як цілісну систему та з'ясувати принципи часового організування біоелектричних і метаболічних процесів у ранньому ембріогенезі тварин.

## 6.6. Оцінення достовірності результатів часового ряду та їхня інтерпретація

Критерій оцінення достовірності результатів проведеного часового аналізу залежить від: а) довжини ряду (об'єму вибірки), б) величини коефіцієнта кореляції.

Довжину ряду, а також часовий інтервал між значеннями (30 хв, 5 хв, 2 хв, 1 хв) підбирали відповідно до мети конкретно поставленого завдання, зважаючи також на час спостереження експериментально виміряних показників. Водночас урахували те, щоб кількість значень чітко відтворювала внутрішню структуру кожного ряду. Вибірki у 300 значень забезпечували отримання більш стабільних результатів. Часовий інтервал між сусідніми вимірами  $\Delta t$  (інтервал квантування) також давав можливість точного обрахунку періоду коливань досліджуваної динаміки. Слід відзначити, що збільшення довжини ряду за рахунок більш щільного запису значень показника, не дає змоги підняти точність оцінення періоду. Від  $\Delta t$  цілком залежить можливість оцінення форми та профілю кожного ряду динаміки показників.

Перевірку на достовірність результатів кореляційного аналізу проведено за таблицею граничних значень коефіцієнтів кореляції, які гарантують заданий рівень значимості ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ), залежно від обсягу сукупності (М.П. Деркач і ін., 1977).

Достовірність спектральних піків оцінено за розрахунками інтегральних періодограм динаміки аналізованих показників з використанням підпрограми INTEGRATED PERIODOGRAM з підрозділу TIME SERIES ANALYSIS.

Часові характеристики кожного ряду, яких оцінено особливості динаміки досліджуваних показників, інтерпретували при узгодженні результатів автокореляційного та спектрального аналізів. У тому разі, коли величини тривалості визначених періодів коливань різних показників збігалися, ми вважали, що процеси, за якими описано динаміку цих показників, синхронні за періодом.

Інтерпретація результатів крос-кореляційного аналізу була ускладнена через те, що ми мали справу з коливним характером динаміки досліджуваних показників. Її проводили на основі узгодження результатів трьох методів аналізу: автокореляційного, спектрального та крос-кореляційного, а також із урахуванням біологічного (функціонального) аналізу їхньої динаміки. Зазвичай крос-корелограмі показників характерний коливний ефект, у якому наявні перші максимуми та мінімуми значень коефіцієнтів кореляції при різних часових зсувах рядів у прямому та зворотному напрямках. Такий двонапрямковий зв'язок можна інтерпретувати двояко. Динаміка обох рядів може бути незалежною й вони матимуть ритм з певним періодом визначеним за їхнього корелограмою, або ж процес, описаний відповідним показником, є випереджуючим щодо іншого, тобто можлива ймовірність причинно-наслідкової залежності між ними.

Інтерпретуючи одержані результати кореляційного аналізу, враховували, що неоднакова величина виявлених  $R_{xy}$  на графіках крос-корелограм може бути зумовлена:

а) нелінійністю змін показників, нелінійним зв'язком між ними та (або) розкидом даних через похибки вимірювання;



- б) нестабільністю періодів коливань показників;
- в) наявністю різних періодичних складових у динаміці показників;
- г) зміною фазових відношень між ними на початку та в кінці інтервалу спостереження.

Виявлені часові причинно-наслідкові зв'язки між досліджуваними показниками не можна інтерпретувати безпосередньо, тобто що зміни одного показника є причиною змін іншого. Тут необхідно враховувати складний характер тих фізіологічних процесів, які лежать в основі спряжених змін цих показників. Отже, можуть бути спільні фактори, що впливають на зміни кожного з показників неоднаково (наприклад, безпосередній і віддалений за часом ефект впливу).

## **6.7. Оцінення динаміки трансмембранного потенціалу в ранньому розвитку в'юна за допомогою кореляційних функцій (реальна ситуація)**

Одержані нами результату і наявна в літературі інформація про дію використаних в даній роботі чинників на метаболізм у зародків, що розвиваються, враховувалися при інтегральній оцінці зв'язку інтенсивності синтетичних процесів клітин, що діляться, з потенціалгенеруючою функцією плазматичних мембран. Для цього застосовувалася

формалізація, представлена в розділі 6.3. На підставі приведеного там алгоритму зроблена спроба оцінки ТМП в динаміці розвитку зародків в'юна шляхом аналізу сили зв'язків, які в часовому аспекті є нестационарними явищами і корелюють із швидкістю споживання кисню (О. Гойда й ін., 1979), змінами обміну речовин під впливом інсуліну (розд. 2.13) і антибіотиків – актиноміцину Д (розд. 2.17) і циклогексимида (розд. 2.18).

У роботі використано такі параметри:

- а) ТМП (контроль);
- б) швидкість споживання кисню (Ж);
- в) ТМП при дії інсуліну;
- г) ТМП при дії актиноміцину Д;
- д) ТМП при дії циклогексимида.

Параметри “а” і “б” одержано при розвитку зародків у нормі, а інші при дії на зародки гормонів і антибіотиків, що розвиваються.

З літературних джерел відомо (Т.Н. Протасова, 1975; А.П. Дыбан и др., 1977), що актиноміцин Д є інгібітором транскрипції, а інсулін може мати дуже широкий вплив на обмін речовин, зокрема – впливати на розподіл електрогенних іонів, активувати ферменти гліколітичного ланцюга. Тим самим ми маємо можливість розглядати об'єкт з урахуванням динаміки параметрів, тих, що відображають адекватно його стан у різних умовах.

Якщо ввести такі позначення й операції:

$X(t)$  – зміна ТМП за нормальних умов;

$X_1(t)$  – зміна СПК за нормальних умов;

$X_2(t)$  – функція, що описує вплив інсуліну на динаміку ТМП зародка в'юна, що розвивається;

$X_3(t), X_4(t)$  – функції, що описують вплив інгібування транскрипції і трансляції на ТМП зародків, які розвиваються, то інформацію про стан перерахованих вище параметрів можна безпосередньо використовувати для реалізації обчислень за запропонованим алгоритмом у розділі 7.1.

Оскільки всі ці параметри відносять до однієї системи (зародок, що розвивається) і вони відображають стан відповідних її елементів у часі, то вони можуть бути використані для побудови структурно-функціональної схеми, за якою описують їхню взаємодію. Для побудови “грубої схеми” такої взаємодії використано такі функції:

1.  $X(t)$  – динаміка ТМП за нормальних умов розвитку зародка;
2.  $X_b(t)$  – динаміка СПК за нормальних умов розвитку зародка;
3.  $X(t) - X_2(t) = F(t)$  – “чиста” складова, що відображає дію інсуліну на генерування ТМП зародка, що розвивається;
4.  $F(t) = X(t) - X_3(t)$  – “чиста” складова, що відображає вплив інгібування транскрипції на ТМП зародка;
5.  $F_2(t) = X(t) - X_4(t)$  – “чиста” складова, що відображає вплив інгібування трансляції на ТМП зародків.

У результаті розрахунку всіх комбінацій взаємодіяючих функцій між вищезгаданими параметрами одержано матрицю абсолютних значень взаємних кореляцій у відповідні періоди розвитку.

90 хв										
0,922	0,940	0,929	1,000	0,938	0,981	1,000	0,964	1,000	1,000	
180 хв										
0,996	0,991	0,981	0,856	0,960	0,897	0,739	0,921	0,779	0,723	
210 хв										
0,954	0,947	0,902	0,736	0,898	0,787	0,586	0,815	0,664	0,576	(6.23)
240 хв										
0,875	0,854	0,797	0,583	0,800	0,652	0,416	0,702	0,462	0,395	
270 хв										
0,767	0,735	0,651	0,543	0,669	0,491	0,355	0,551	0,454	0,297	
300 хв										
0,643	0,612	0,521	0,520	0,528	0,358	0,310	0,393	0,751	0,051	

Матриця сили зв'язків, описана в роботі Санагурського і Гойди (1980), набуде вигляду:

90 хв	X	VII	IX	IV	VIII	VI	I	V	III	II	
180 хв	II	I	III	V	VI	VIII	IV	VII	IX	X	
210 хв	II	I	III	V	VI	VIII	IV	VII	IX	X	
240 хв	II	I	V	III	VI	VIII	IV	VII	IX	X	(24)
270 хв	II	I	V	III	VI	IV	VIII	VII	IX	X	
300 хв	II	VII	I	V	III	IV	VI	II	VIII	X	

Примітка: номери функцій відповідають номерам зв'язків (рис. 6.9):

I – синтез РНК; 2 – синтез білка; 3 – інсулінзалежні процеси; 4 – споживання кисню; 5 – ТМП

Використовуючи підхід, описаний вище (розд. 6.3), одержимо структури (рис. 6.9).

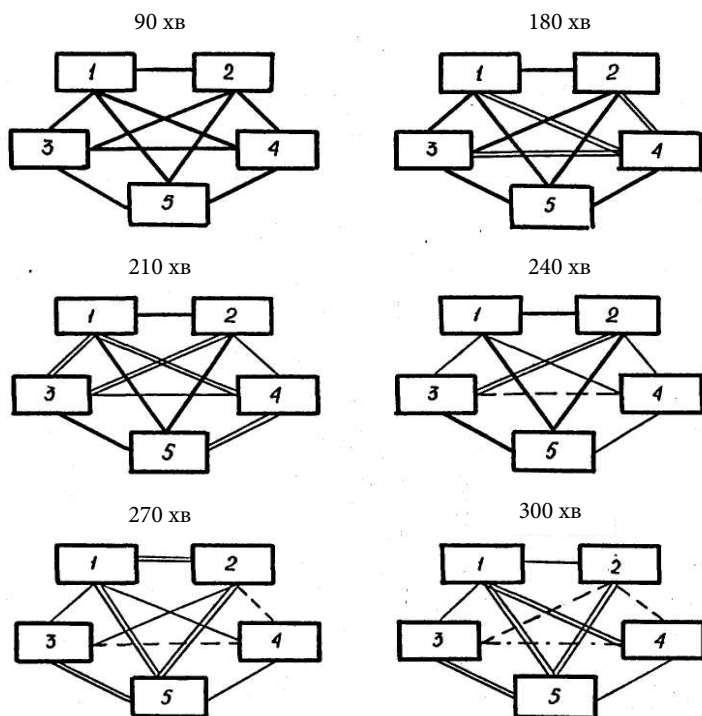
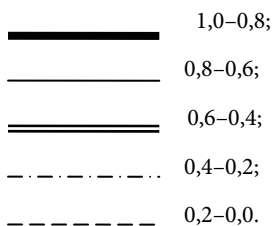


Рис. 6.9. Структури взаємного впливу різних параметрів в процесі розвитку зародків в'юна:



Номери зв'язків: 1-2=V; 2-3=VI; 2-4=VII; 2-5=I; 1-3=VIII;

1-4=IX; 1-5=II; 3-4=X; 3-5=III; 4-5=IV

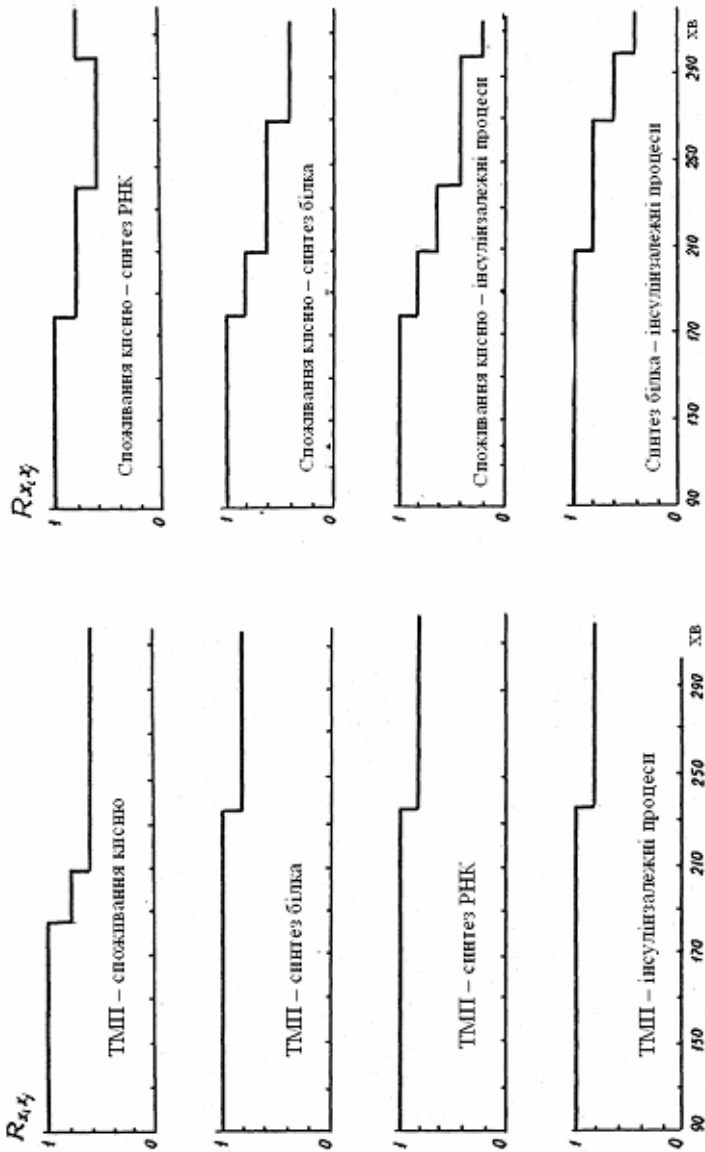


Рис. 6.10. Діаграми попарних взаємодій між параметрами

Для наочного зображення зміни сили взаємодії між двома елементами, що відображають одну з граней розвитку зародків в'юна в динаміці, використовували діаграму (рис. 6.9), побудовану

за градієнтними схемами (рис. 6.7). Для цього попарно розглядали всі можливі шляхи взаємодії між ланками генерування ТМП і іншими складовими системи на досліджуваному проміжку часу. Трансмембранний потенціал у вважали умовно інтегральним показником стану (або життєдіяльності) зародків в'юна, що розвиваються.

На діаграмах простежується характер зміни сили зв'язків між окремими елементами системи, що розвивається, а також “ступінь причетності” тих або інших процесів до генерування ТМП. Очевидно, що градієнт зменшення сили зв'язків між узятими параметрами має тенденцію до послідовного перемикання від субстратних синтетичних процесів (синтез білка, РНК) до енергетичної забезпеченості їх, що, отже, веде до певної зміни системи генерування ТМП.

Можна припустити, що ослаблення градієнта сили зв'язків між процесами синтезу білка і генерування ТМП є певним сигналом для ініціації дальшого етапу розвитку, який реалізується шляхом формування іншого субстратного профілю, необхідним наслідком якого потім буде побудова якісно нових структур зародка, що розвивається.

Щодо зв'язку інсулінзалежних процесів і дихання діаграми дають виразну картину чергування посилення й ослаблення, що пов'язано з розвитком зародків, чим, власне, може бути зумовлений коливальний характер клітинного метаболізму. Разом з тим загальне зменшення сили зв'язків свідчить про зростання ролі підсистем вищого порядку, що виникають у процесі ембріогенезу.

Описаний алгоритм є лише першою ланкою побудови загальної математичної моделі регулювання метаболічних процесів у зародків, що розвиваються. Він реалізований у вигляді відповідної програми на мові фортран, апробація якої засвідчила, що він приблизно відтворює структуру функціональних взаємодій окремих компонентів живої системи, що розвивається, навіть на підставі неповних експериментальних даних, а це дасть змогу підвищити ефективність планування і проведення досліджень регулювання раннього розвитку тварин.



## **Розділ 7.**

# **ФЕНОМЕНОЛОГІЧНИЙ ОПИС МЕТАБОЛІЧНИХ СХЕМ**

## **7.1. Комп'ютерне моделювання та числова оптимізація метаболических процесів: застосування до біосинтезу флавінових коферментів у дріжджів**

Рибофлавін, вітамін В<sub>2</sub>, є попередником флавінмононуклеотиду та флавінаденіндинуклеотиду – кофакторів для широкого класу ферментів метаболізму, має комерційну цінність як домішка в харчовій промисловості, кілька видів флавіногенних мікроорганізмів, зокрема, деякі види дріжджів, застосовують у промисловості для виробництва рибофлавіну шляхом ферментації. З огляду на це є актуальними біохімічні (Р.Г. Ахалкаци и др., 1970; И.А. Аршавский, 1979; Ю. Ашофф, 1984; В.А. Барабой, 2000; Е.Л. Барский и др., 2000) та генетичні (Д.Р. Бериташвили, Н.Н. Ротт, 1973; П.Г. Богач і ін., 1984; М.Д. Бе-

ресткина и др., 1987; М.Б. Бекенбит, Е.Г. Глаголева, 1988) дослідження флавіногенезу з метою отримання мутантів-надсинтетиків рибофлавіну для його біотехнологічного виробництва. Одним із можливих шляхів подолання обмежувальних факторів експериментального дослідження є аналіз властивостей відповідної моделі метаболізму із застосуванням комп'ютерного моделювання (В. Божкова и др., 1971; Д. Бериташвили, 1974; Ю. Ашофф, 1984). Математичний опис метаболічних систем дає змогу розраховувати очікувану відповідь метаболізму на генетичні модифікації та зміни зовнішнього середовища (Д.Р. Бериташвили и др., 1974; В.П. Божкова, 1991), ідентифікувати найважливіші об'єкти для метаболічної інженерії (В.П. Божкова и др., 1971; Л.В. Белоусов, 2000). Математичну методологію успішно використовують для визначення перспективних напрямків побудови генетичних мутантів і пояснення неочікуваних експериментальних результатів (Д.Р. Бериташвили и др., 1970; В.П. Божкова и др., 1974; С.В. Баденкова и др., 1982; А.В. Жулидов и др., 1985; В.П. Божкова, 1986; В.П. Божкова и др., 1987; В.П. Божкова, 1991). Ми досліджували можливості застосування засобів комп'ютерного програмування та методів числової оптимізації для раціональної метаболічної інженерії (зокрема, побудови мутантів дріжджів *P.guilliermondii* – надсинтетиків рибофлавіну) шляхом аналізу стаціонарної поведінки моделі метаболічної системи біосинтезу флавінових коферментів.

Модельний експеримент проводили в середовищі *MathCad 7 Pro*, застосовували засоби *Gepasi 3.1* (Л. Берталанфи, 1969; А.Н. Бессмертний и др., 1991, 2003) (програми *MS Windows* для моделювання стаціонарних станів і часової поведінки біохімічних

реакцій). Кінетичні змінні та параметри, необхідні для розрахунків, брали з доступних баз даних (Інтернет) і з експериментальних робіт – досліджень регулювання надсинтезу рибофлавіну (Р.Г. Ахалкаци и др., 1970; Д.Р. Бериташвили, Н.Н. Ротт, 1973; И.А. Аршавский, 1979; Ю. Ашофф, 1984; П.Г. Богач і ін., 1984; М.Д. Бересткина и др., 1987; М.Б. Бекенблит, Е.Г. Глаголева, 1988; В.А. Барабой, 2000; Е.Л. Барский и др., 2000).

Математично описати метаболічну систему можна за фундаментальними рівняннями Кірхгофа, що відомі як рівняння масового балансу:

$$\frac{dS_i}{dt} = \sum_{j=i}^n C_{i,j} v_j ; \quad i=1,2,\dots,n, \quad (7.1)$$

де  $S_i$  – концентрації метаболітів;  $v_j$  – швидкості реакцій, які каталізуються ферментами  $E_j$ ;  $C_{i,j}$  – стехіометрична матриця, утворена малими цілими числами, зазвичай 1 –1, 0, і фактично містить більше нулів, оскільки значна частина ферментів перетворює лише кілька метаболітів; у системі, що складається з  $n$  метаболітів та  $m$  ферментів,  $C_{i,j}$  буде  $n \times m$  матрицею.

Диференціальне рівняння (7.1), доповнюється кінетичними рівняннями ферментів:

$$v_j = v_j(S_1, \dots, S_n; p_1, \dots, p_m). \quad (7.2)$$

Загалом  $v_j$  – це швидкість реакції на одиницю кількості  $j$ -го фермента відносно до одного з його продуктів ( $S_n$ ). Тоді  $C_{i,j} v_j$  буде швидкістю реакції  $j$ -го фермента для  $i$ -го метаболіта.

Підставивши вираз (7.2) у рівняння (7.1), отримуємо:

$$\frac{dS_i}{dt} = f_i(S_1, \dots, S_n; p_1, \dots, p_m) \quad i=1,2,\dots,n. \quad (7.3)$$

Концентрації метаболітів ( $S_i$ ) і потоки ( $v_j$ ) є системними змінними, які обчислюють за модельними рівняннями (7.1–7.3), кінетичні константи ( $p_k$ ) відіграють роль параметрів, їх не визначають у моделі, а беруть з експериментально чи аналітично отриманих кінетичних даних ізольованих ферментів.

Параметр  $p_k$  може набувати різного вигляду, наприклад, це може бути концентрація ферментів ( $E_j$ ); максимальна активність ( $V_m$ ); константи Міхаеліса-Ментен ( $K_m$ ); константи інгібування ( $K_i$ ); концентрації зовнішніх ефекторів, активаторів ( $A$ ) чи інгібіторів ( $I$ ) тощо.

Рівняння (7.3) формують систему залежних від параметрів звичайних диференціальних рівнянь першого порядку, що описує поведінку метаболічної системи. Функція  $f$  є нелінійною завдяки перебігу бі- та тримолекулярних реакцій у метаболічному ланцюгу перетворень і нелінійному характеру кінетичних рівнянь ферментів. Отже, здебільшого розв'язок такої системи рівнянь не може бути отриманий аналітичним шляхом, а потребує застосування чисельних методів.

Стаціонарний стан системи визначають умови, за яких часова похідна системи змінних дорівнює нулю, тобто

$$f(S; p) = 0. \quad (7.4)$$

Наслідком нелінійності системного рівняння (7.4) дуже часто є наявність кількох мультистаціонарних станів, які можуть бути або стабільними, або нестабільними. Відповідно до визначення стаціонарності динамічних систем стаціонарний стан розглядають як стабільний, якщо після пертурбацій система

повертається до вихідного стану (або наближується до нього). Систему, що повертається до стабільності при  $t \rightarrow \infty$ , названо асимптотично стабільною (А. Рубин, 1989).

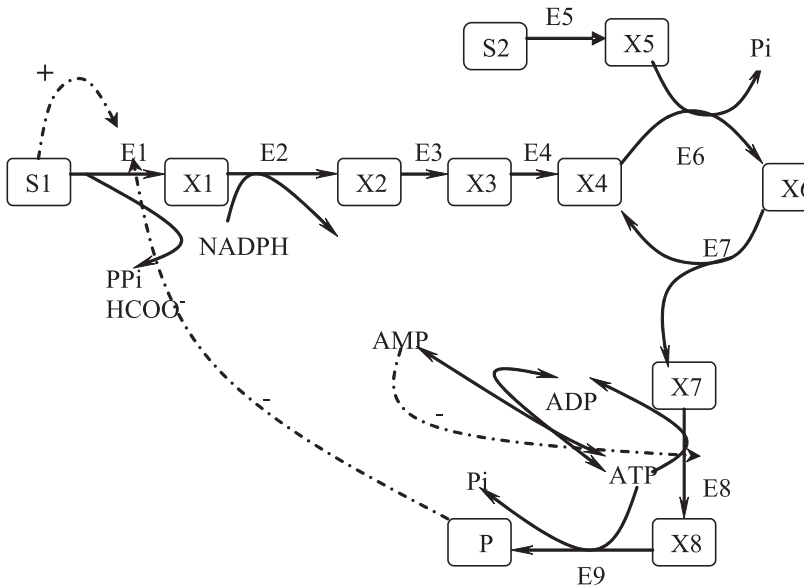


Рис. 7.1. Схематичне зображення метаболізму рибофлавіну у дріжджів *P. guilliermondii*. Назви метаболітів і повні назви ферментів подано у додатку. Пунктирні лінії – це регуляторні впливи, символи +/- –це відповідний ефект (активуючий чи інгібуючий). Швидкості реакцій, які є суттєвими для регуляторних взаємодій, описано в тексті.

Щоб обчислити динамічні зміни, необхідно розв'язати систему диференціальних рівнянь (7.3) для заданих значень параметрів. Динамічні зміни метаболічної системи додатково до впливу інгібіторів чи активаторів можуть бути зумовлені змінами параметрів системи, температури, рН середовища та ін. Динамічні зміни *in vitro* дуже часто досягаються за умов, коли система не може досягти стаціонарності внаслідок деградації вихідного

субстрату чи накопичення кінцевого продукту, який стає інгібітором реакції. Більше того, система може генерувати динамічні зміни автономно, якщо вона не перебуває в стабільному стаціонарному стані. В такому разі можуть бути виявлені осциляції субстрату, продуктів реакції чи проміжних метаболітів (В.С. Айзеншанд, А.Ю. Баранов, 1977; Н.А. Агаджанян, Н.Н. Шабатура, 1989; Р.Б. Балабан і ін., 2000). Часову залежність системних змінних визначають шляхом чисельного інтегрування (а не аналітичного дослідження) концентрацій метаболітів чи потоків як функцій від часу.

Сукупність реакцій, які беруть участь у метаболізмі флавінів у дріжджів, можна зобразити так (рис. 7.1):

Запропонованій кінетичній моделі (рис. 7.1) відповідає така система диференціальних рівнянь, складена відповідно до рівнянь масового балансу (1):

$$\begin{aligned}
 \frac{dS_1}{dt} &= -v_{E_1} \\
 \frac{dX_1}{dt} &= v_{E_1} - v_{E_2} \\
 \frac{dX_2}{dt} &= v_{E_2} - v_{E_3} \\
 \frac{dX_3}{dt} &= v_{E_3} - v_{E_4} \\
 \frac{dX_4}{dt} &= v_{E_4} - v_{E_6} + v_{E_7} \\
 \frac{dS_2}{dt} &= -v_{E_5}
 \end{aligned}
 \tag{7.5}$$

$$\begin{aligned}\frac{dX_5}{dt} &= v_{E_5} - v_{E_6} \\ \frac{dX_6}{dt} &= v_{E_6} - 2 \cdot v_{E_7} \\ \frac{dX_7}{dt} &= v_{E_7} - v_{E_8} \\ \frac{dX_8}{dt} &= v_{E_8} - v_{E_9} \\ \frac{dP}{dt} &= v_{E_9}\end{aligned}\tag{7.6}$$

Аналізуючи зображений на рисунку метаболічний шлях, ми ставили за мету знайти умови, за яких потік у напрямку утворення продукту реакції  $P$  є найвищим при мінімальних витратах субстратів ( $S1$  і  $S2$ ). Тому ми припустили, що технологічно впливаємо на концентрації ферментів (наприклад, клонуванням) і можемо маніпулювати їхніми кінетичними параметрами. Проблема полягає в тому, якими саме параметрами необхідно маніпулювати, щоб досягнути необхідного результату (в нашому прикладі – збільшення виходу продукту).

Пуринові попередники перетворюються у рибофлавін і згодом у флавінові коферменти ФМН і ФАД, піддаються складному регуляторному впливу як зовнішніх, так і внутрішніх ефекторів (Л. Берталанфі, 1969; А. Бессмертный и др., 1991). Структуру метаболічної системи та кінетику її ферментів описано відповідно до експериментальних даних (Д. Бериташвили, Н. Ротт, 1973; Ю. Ашофф, 1984; А. Жулидов и др., 1985). У моделі вважається, що фермент першої реакції синтезу рибофлавіну ГТФ-циклогідролаза ( $E1$ ) піддається неконкурентному інгібуванню з

боку продукту метаболізму  $P$ , тоді кінетичне рівняння швидкості реакції ( $v_{E1}$ ) матиме такий вигляд:

$$v = \frac{V \cdot \frac{S}{K_m}}{1 + \frac{I}{K_i} + \frac{S}{K_m} \cdot (1 + \frac{I}{K_i})} \quad (7.7)$$

де  $V$  – максимальна швидкість реакції;  $S$  – концентрація субстрату реакції;  $I$  – концентрація інгібітора реакції;  $K_i$  – константа інгібування;  $K_m$  – концентрація субстрату, при якій  $v=V/2$  для  $I=0$  (константа Міхаеліса).

Рівняння швидкості двосубстратних реакцій  $v_{E2}$ ,  $v_{E8}$ ,  $v_{E9}$ , (механізм *Ordered BI BI*) набудуть вигляду:

$$v = V_f \cdot (AB - PQ / K_{eq}) \left/ \begin{array}{l} AB \cdot (1 + P / K_{iP}) + K_{mB}(A + K_{iA}) + K_{mB}B + \frac{V_f}{V_r K_{eq}} \\ (K_{mQ}P \cdot (1 + \frac{A}{K_{iA}}) + Q \cdot (K_{mP} \cdot (1 + \frac{K_{mB}B}{K_{iA}K_{mB}}) + P \cdot (1 + \frac{B}{K_{iB}}))) \end{array} \right. \quad (7.8)$$

де  $V_f$  – максимальна швидкість прямої реакції;  $V_r$  – максимальна швидкість зворотної реакції;  $K_{eq}$  – константа рівноваги;  $K_{mA}$  – константа Міхаеліса для першого субстрату;  $K_{mB}$  – константа Міхаеліса для другого субстрату;  $K_{mP}$  – константа Міхаеліса для першого продукту;  $K_{mQ}$  – константа Міхаеліса для другого продукту;  $K_{iA}$  – константа інгібування першим субстратом прямої реакції;  $K_{iB}$  – константа інгібування другим субстратом прямої реакції;  $K_{iP}$  – константа інгібування зворотної реакції;

Рівняння швидкості реакцій, зrs каталізуються ферментами E3–E6, згідно з кінетикою Генрі – Міхаеліс – Ментен, матимуть вигляд:



$$v = \frac{V \cdot S}{K_m + S}, \quad (7.9)$$

де  $V$  – максимальна швидкість реакції;  $K_m$  – константа Міхаеліса;  $S$  – концентрації субстратів.

Математичний опис біосинтетичного шляху (7.5–7.6) ми задали в середовищі прикладної програми *Gepasi 3.1*, назначили довільно вибрані числові значення для різних параметрів і промодельовали стаціонарний стан заданої системи. Отримані результати прийняли як вихідні для дальших досліджень (наш “дикий тип”). Тоді вибрали 10 параметрів, які могли бути потенційними мішенями для генетичних маніпуляцій: всі концентрації ферментів, загальна концентрація кофакторів, а також кінетичні параметри (і ті, які визначають дію  $P$  як інгібітора  $E1$ ). Для параметрів визначили межі, в яких вони можуть змінювати свої значення під час оптимізації:

максимальні швидкості реакцій ( $V$ ) між 0,001 та 1 000;

загальна кількість пулу  $A$  ( $[A]+[AH]$ ) у межах від  $1E-6$  до  $1E+6$ ;

регулюючі константи (для  $P$ ) у межах від  $1E-7$  до  $1E+7$ .

У ході комп'ютерного експерименту алгоритми числової оптимізації реалізовували моделюючи стаціонарну поведінку системи, що дало змогу застосувати різні алгоритми оптимізації для досягнення поставленої мети. Досліджуючи біосинтетичний шлях (табл. 7.1-7.3), застосували п'ять оптимізаційних методів (В.П. Божкова, 1971; А.В. Жулидов и др., 1985; П.Г. Костюк і ін., 2001).

Таблиця 7.1

Розрахункові значення потоку ( $J_8$ ), отримані в результаті чисельного інтегрування з використанням різних оптимізаційних алгоритмів

Застосований метод	Значення потоку ( $J_8$ ) мкМ/с, $10^{-4}$	Кількість моделювань
“Дикий тип”	0,028	1
<i>Steepest descent</i>	0,32	18
<i>L-BFGS-B</i>	0,30	9
<i>Hooke and Jeevs</i>	0,96	193
<i>Genetic algorithm</i>	0,78	903
<i>Random search</i>	5,55	1 000

На підставі аналізу результатів комп’ютерного експерименту, наведених у таблиці, виявили, що найліпший результат визначення максимуму функції (потоку  $J_8$ ), що на два порядки перевищує значення “дикого типу”, отримано із застосуванням методу випадкового пошуку (*Random search*). Випадковий пошук – метод оптимізації, у процесі реалізації якого оптимум знаходять шляхом перевірки значень досліджуваної функції в серії комбінацій випадкових значень змінних параметрів. Випадкові значення генеруються у попередньо визначених межах, більше того, будь-які комбінації значень параметрів, які виходять за визначені межі, вилучають з розрахунку.

Порівнюючи значення кінетичних параметрів “дикого типу” з даними, отриманими у процесі оптимізації, можна зробити висновок, що оптимальні значення потоку  $J_8$  одержали за умов, коли концентрації ферментів  $E1, E4, E8$  досягали своїх верхніх граничних значень (від 10 до 100), тоді як концентрації інших ферментів набували нижніх граничних значень (у межах від 0,01 до 0,1).

Таблиця 7.2

Символ, $X_i$	Назва метаболіту
<i>S1</i>	Гуанозинтрифосфат (GTP)
<i>S2</i>	Рибулозо-5`-фосфат
<i>X1</i>	2,5-діаміно-4-окси-6-рибозиламінопіримідин-5`-
<i>X2</i>	фосфат
<i>X3</i>	2,5-діаміно-4-окси-6-рибітиламінопіримідин-5`-фосфат
<i>X4</i>	5-аміно-2,4-диокси-6-рибітиламінопіримідин-5`-фосфат
<i>X5</i>	5-аміно-2,4-диокси-6-рибітиламінопіримідин
<i>X6</i>	3,4-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфат
<i>X7</i>	6,7-диметил-8-рибітиллюмазин
<i>X8</i>	Рибофлавін
<i>P</i>	Флавінмононуклеотид (FMN) Флавінаденіндинуклеотид (FAD)

Таблиця 7.3

Символ, $E_i$	Назва ферменту	EC no.
<i>E1</i>	GTP-циклогідролаза	3.5.4.25
<i>E2</i>	Редуктаза	1.1.1.193
<i>E3</i>	Дезаміназа	3.5.4.26
<i>E4</i>	Фосфатаза	3.3.1.-
<i>E5</i>	3,4-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфат	—
<i>E6</i>	синтаза	2.5.1.9
<i>E7</i>	6,7-диметил-8-рибітиллюмазинсинтаза	2.5.1.9
<i>E8</i>	Рибофлавінсинтаза	2.7.1.26
<i>E9</i>	Рибофлавінкіназа	2.7.7.2
	АТФ: ФМН-денілілтрансфераза	

На підставі цих результатів ми можемо припустити, що для того, щоб досягнути максимуму виходу продукту (P) за незмінних концентрацій субстратів, необхідно:

забезпечити надекспресію ферментів *E1*, *E4*, *E8*;

максимально збільшити чутливість цих ферментів до їхніх субстратів (тобто зменшити  $K_m$ );

знизити інгібуючу дію продукту (P) на першу реакцію метаболізму.

## 7.2. Трансфлавінова модель

Сукупність реакцій, які задіяні у метаболізмі флавінів у дріжджів і були покладені в основу моделі, подано в табл. 7.4. Пуринові попередники перетворюються у рибофлавін і далі – у флавінові коферменти ФМН і ФАД, піддаються складному регуляторному впливу як зовнішніх, так і внутрішніх ефекторів (Д.Р. Бериташвили и др., 1969, 1970, 1974). Структуру метаболічної системи та кінетику ферментів описано відповідно до експериментальних даних (Д.Р. Бериташвили, Н.Н. Ротт, 1973). На основі даних про кінетичні властивості досліджуваної системи складену систему диференціальних рівнянь, описаних відповідно до рівнянь масового балансу (7.1):

$$\begin{aligned} \frac{dGTP}{dt} &= -v_{R1} \\ \frac{dX_1}{dt} &= v_{R1} - v_{R2} \\ \frac{dX_2}{dt} &= v_{R2} - v_{R3} \\ \frac{dX_3}{dt} &= v_{R3} - v_{R4} \\ \frac{dX_4}{dt} &= v_{R4} - v_{R6} + v_{R7} \\ \frac{dX_5}{dt} &= -v_{R5} \\ \frac{dX_6}{dt} &= v_{R5} - v_{R6} \end{aligned} \quad (7.10)$$

$$\frac{d X_6}{dt} = v_{R6} - v_{R7}$$

$$\frac{d IB}{dt} = 2 \cdot v_{R7} - v_{R8}$$

$$\frac{d FMN}{dt} = v_{R8} - v_{R9}$$

$$\frac{d FAD}{dt} = v_{R9}$$

Таблиця 7.4

Опис ферментативних реакцій які задіяні у метаболізмі  
рибофлавіну у дріжджів

Номер реакції	КФ	Назва ферменту	Схема реакції
R1	3.5.4.25	GTP-циклогідролаза <sup>a</sup>	GTP + 3H <sub>2</sub> O = HCOO <sup>-</sup> + PP <sub>i</sub> + 2,5-діаміно-4-окси-6-рибозиламінопіримідин-5'-фосфат
R2	1.1.1.193	Редуктаза <sup>c</sup>	2,5-діаміно-4-окси-6-рибозил-амінопіримідин-5'-фосфат + NADPH = 2,5-діаміно-4-окси-6-рибітил-амінопіримідин-5'-фосфат + NADP <sup>+</sup>
R3	3.5.4.26	Дезаміназа <sup>b</sup>	2,5-діаміно-4-окси-6-рибітил-амінопіримідин-5'-фосфат + H <sub>2</sub> O = 5-діаміно-4-окси-6-рибітил-амінопіримідин-5'-фосфат + NH <sub>3</sub>
	3.1.3.-	Фосфатаза <sup>b</sup>	5-діаміно-4-окси-6-рибітил-амінопіримідин-5'-фосфат = 5-діаміно-4-окси-6-рибітил-амінопіримідин
R5	-----	3,4-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфатсинтаза <sup>b</sup>	Рибулозо-5-фосфат (S2) = 3,4-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфат + HCOOH
R6	.5.1.9	6,7-диметил-8-рибітиллюмазин-синтаза <sup>d</sup>  Рибофлавін синтаза <sup>c</sup>	5-діаміно-4-окси-6-рибітил-амінопіримідин + 3,4-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфат = 6,7-диметил-8-рибітиллюмазин + P <sub>i</sub>
R7	2.5.1.9		2 6,7-диметил-8-рибітиллюмазин = Рибофлавін + 5-аміно-2,4-диокси-6-рибітиламінопіримідин
R8	2.7.1.26	Рибофлавін-кіназа <sup>c</sup>	Рибофлавін (RIB) + ATP = FMN + ADP
R9	2.7.7.2	Ф:ФМН-аденилил-транс-фераза <sup>c</sup>	FMN + ATP = FAD + P <sub>i</sub>

Враховуючи складність отриманої системи і жорсткі умови, яким має відповідати система, щоб досягнути стаціонарності, значення кінетичних параметрів ферментативних реакцій підібрані довільно на основі аналізу зібраних експериментальних даних і таким чином, щоб відтворювати характер змін у часі концентрацій продуктів біосинтезу, описаних у роботах Шавловського і співр. (А.В. Жулидов и др., 1985; П.Г. Костюк й ін., 2001).

Механізми дії ферментів описують за такими рівняннями:

$$^a -v = VS / K_m \left( 1 + I / K_i + S / K_m \left( 1 + I / K_i \right) \right)$$

$$^b -v = VS / K_m + S \quad (7.11)$$

$$^c -v = V_f \left( AB - PQ / K_{eq} \right) / \left( AB \left( 1 + P / K_{ip} \right) \right) + K_{mb} B + V_f / V_r K_{eq} \left( K_{mq} P \left( 1 + A / K_{ia} \right) \right) + Q \left( K_{mp} \left( 1 + K_{mb} B / K_{ia} K_{mb} \right) + P \left( 1 + B / K_{ib} \right) \right)$$

$$^d -v = V_f \left( AB - P / K_{eq} \right) / \left( AB + K_{mb} A + V_f / V_r K_{eq} \left( K_{mp} + P \left( 1 + A / K_{ia} \right) \right) \right),$$

де  $V$  – максимальна швидкість реакції;  $S$  – концентрація субстрату реакції;  $I$  – концентрація інгібітора реакції;  $K_i$  – константа інгібування;  $K_m$  – концентрація субстрату, при якій  $v=V/2$  для  $I=0$  (константа Міхаеліса),  $V_j$  – максимальна швидкість прямої реакції;  $V_r$  – максимальна швидкість зворотної реакції,  $K_{eq}$  – константа рівноваги;  $K_{mA}$  – константа Міхаеліса для першого субстрату;  $K_{mB}$  – константа Міхаеліса для другого субстрату;  $K_{mP}$  – константа Міхаеліса для першого продукту;  $K_{mQ}$  – константа Міхаеліса для другого продукту;  $K_{iA}$  – константа інгібування першим субстратом прямої реакції;  $K_{iB}$  – константа інгібування другим субстратом прямої реакції;  $K_{ip}$  – константа інгібування зворотної реакції.

У цьому розділі описано кінетичну поведінку моделі, яку було отримано в результаті проведеного модельного експерименту, порівняно результати моделювання з даними дослідження особливостей метаболізму рибофлавіну у дріжджів *Pichia guilliermondii* отриманими *in vivo*. Встановлено, що модель біосинтезу рибофлавіну і його похідних здатна відтворювати стан системи при різних заданих внутрішніх параметрах. Щоб дослідити відтворювальні можливості моделі, змінювали окремі параметри системи і знову розраховували систему рівнянь (7.10). Результати порівнювали як з даними вихідної моделі, так і з експериментально отриманими даними. З метою аналізу впливу змін внутрішніх параметрів системи вимірювали значення концентрацій метаболітів у кінцевій точці інтегрування. Для аналізу вибрали саме цю стадію, оскільки це критична точка, в якій можна виміряти значення концентрацій як продуктів біосинтезу, так і їхніх попередників.

У результаті чисельного інтегрування отримали динаміку накопичення продуктів біосинтезу – рибофлавіну та флавінових коферментів. Доведено, що вміст флавінів поступово наростає з виходом на стаціонарний рівень, а концентрація флавінових нуклеотидів, порівняно з аналогічною рибофлавіну була значно меншою (рис. 7.2, 7.3). Причому співвідношення рибофлавін/флавінові нуклеотиди на різних етапах збільшувалося до рівня в 5,9 разів на стаціонарній стадії, що узгоджується з експериментальними даними (А.В. Жулидов и др., 1985). Результати є подібні до описаних Шавловським і співр. даних про накопичення флавінів у культуральній рідині і в клітинах при вирощуванні дріжджів *Pichia guilliermondii* на середовищі з високим вмістом заліза.

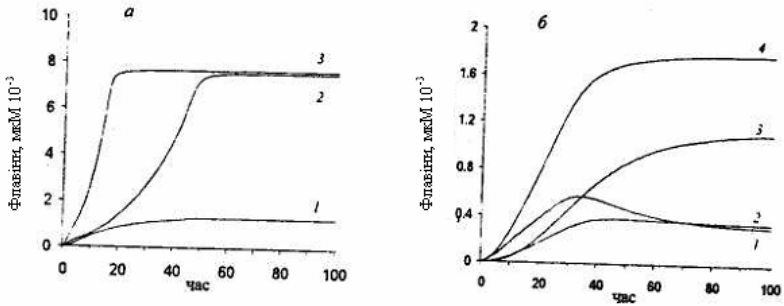


Рис. 7.2. Динаміка накопичення флавінів у моделі при низьких значеннях максимальної швидкості реакції ( $V$ ):

*а:* 1 – флавінові нуклеотиди; 2 – рибофлавін; 3 – динаміка накопичення рибофлавіну при насиченні ферменту (R6) субстратом (S2);

*б:* 1 – ФМН; 2 – рибофлавін; 3 – ФАД; 4 – сумарний вміст флавінів у клітині

Динаміка утворення продуктів значною мірою залежить від доступності субстратів. Зокрема, значне накопичення рибофлавіну, порівняно з флавіновими нуклеотидами в моделі, зумовлено досить низькою концентрацією другого субстрату для рибофлавінкінази – АТФ. На рис. 7.2 (б) зображено дані про вміст окремих флавінів, які отримано на моделі при підвищенні концентрації АТФ у 10 разів. Вони відповідають динаміці накопичення флавінів клітинами, описаній у роботі (А.В. Жулидов и др. 1985), згідно з якими в фазі сповільненого росту (30–60 год) вміст флавінів зростав головно за рахунок ФАД, кількість вільного рибофлавіну була найвищою на початку фази сповільненого росту, а перед початком стаціонарної фази значно зменшувалась. Також встановлено, що при насиченні ферменту 6,7-диметил-8-рибітиллюмазинсинтаза (R6) субстратом спостерігається значне зростання швидкості утворення продуктів біосинтезу, зокрема, рибофлавіну (рис. 7.2).



У дріжджів виявлено два механізми регулювання біосинтезу рибофлавіну: ретроінгібування за участю флавінів (Р.Б. Балабан і ін., 2000; Д.Р. Бериташвили и др., 1970; В.П. Божкова, 1991) і репресію на рівні транскрипції залізопротеїном (Л. Берталанфи, 1969; Д.Р. Бериташвили и др., 1969, 1970, 1974). Низка дріжджів при вирощуванні на середовищах з низьким вмістом заліза здійснює надсинтез рибофлавіну. Водночас відбувається дерепресія низки ферментів у метаболічному ланцюгу біосинтезу рибофлавіну (Л. Берталанфи, 1969). Нам було цікаво дослідити поведінку моделі при різних значеннях активності ферментів. З цією метою ми промодельовали зміни активності, змінюючи значення  $V$  у кінетичних рівняннях ферментів, і спостерігали за змінами, що відбувалися. Виявили, що зі збільшенням значення  $V$  у 10 і більше разів при незмінних значеннях концентрації субстратів, є незначне підвищення концентрації синтезованого рибофлавіну, а у поєднанні зі зростанням концентрації ГТФ - субстрату для першої реакції біосинтезу спостерігається значне зростання швидкості утворення і концентрації рибофлавіну на фоні незначного накопичення кінцевих продуктів біосинтезу – ФМН і ФАД (рис. 7.3).

Отримані результати добре узгоджуються з описаними в роботах (А.В. Жулидов и др., 1985; П.Г. Богач і ін. 1984) і засвідчують той факт, що ферменти флавіногенезу, ймовірно, не повністю насичені субстратами (В.П. Божкова, 1991) через конкуренцію з іншими реакціями обміну за попередник – гуанілові нуклеотиди. Крім того, доведено, що за наявності достатньої кількості субстрату зі зростанням максимальної швидкості ( $V$ ) реакції R1, R6, R7 простежується значне

накопичення одного з продуктів метаболізму, рибофлавіну, тоді як утворення кінцевих продуктів, ФМН та ФАД, лімітовано концентрацією другого субстрату рибофлавінкіназної реакції – АТФ. Також на моделі дослідили динаміку перебігу проміжних реакцій метаболізму рибофлавіну (рис. 7.4). що неможливо досягнути в експериментах *in vivo* чи *in vitro* через надзвичайну лабільність піримідинових попередників рибофлавіну (В.П. Божкова, 1991).

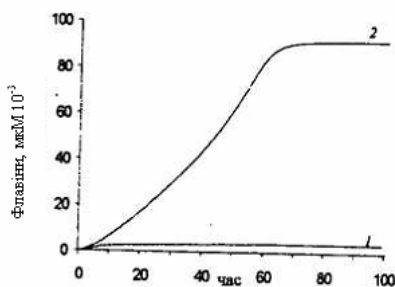


Рис. 7.3. Динаміка накопичення флавінів у моделі при високих: 1 – флавінові нуклеотиди; 2 – рибофлавін

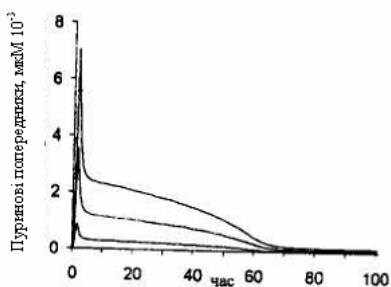


Рис. 7.4. Динаміка утворення проміжних метаболітів біосинтезу при значеннях максимальної швидкості реакції ( $V$ )

Зважаючи на важливу роль флавінових нуклеотидів як у метаболізмі клітин мікроорганізмів, так і при застосуванні в терапевтичних цілях, вважаємо актуальними дальші дослідження молекулярних основ регулювання флавіногенезу. Результати, описані в нашій роботі, є свідченням того, що комп'ютерне моделювання може бути одним із шляхів просування в цьому напрямку. І хоча теоретичні дискусії і математичне моделювання інколи і декому видаються віддаленими від реальності, проте аналіз наявних у цій галузі робіт дає змогу стверджувати, що

дослідження контролю метаболізму засобами комп'ютерного моделювання стає необхідним компонентом у розумінні того, як метаболічна система себе поводить, що може бути використано для модифікації її поведінки в конкретних медичних та біотехнологічних цілях.

## **Розділ 8. МАТЕМАТИЧНА МОДЕЛЬ КОЛИВНИХ ПРОЦЕСІВ**

### **8.1. Математична модель автоколивних мембраннозв'язаних процесів на ранніх стадіях ембріогенезу в'юна**

Відомо, що тонкі зсуви йонного балансу можуть запускати метаболічне активування в ядрі й цитоплазмі заплідненої яйцеклітини та ранніх зародків (С. Petzelt, 1972). Наприклад, зацікавлюють дані про збіг з ритмами поділу клітин осциляцій іонів кальцію, а також періодичних коливань активності  $\text{Ca}^{2+}$ -залежної АТФ-ази. У період синхронного поділу бластомерів відбуваються біохімічні і фізико-хімічні процеси, характер яких (неперервність та циклічність) та їхній зв'язок з поділом дають підстави зрозуміти взаємозв'язок пускових і регуляторних механізмів мітозу.

У результаті досліджень запліднених яйцеклітин були виявлені системи, провідна ланка яких працює в автоколивному

режимі. На користь цього узагальнення наведено численні аргументи включення амінокислот у білки і зміни пулу сульфгідрильних груп у коливному режимі з періодом близьким до 40 хв, що було виявлено під час синхронного дроблення голкошкірих (У. Мапо, 1968).

Експериментальними дослідженнями біоелектричних процесів, які відбуваються на ранніх стадіях ембріогенезу в'юна, було отримано криву зміни трансмембранного потенціалу та виявлено тісний взаємозв'язок між її коливаннями та ритмом дроблення бластомерів (Е.А. Гойда, 1993). Згідно з сучасними уявленнями ТМП залучається до синхронізації ферментативних і транспортних процесів, інтеграції фізичних і хімічних впливів на мембрану, передавання зовнішніх сигналів у клітину, регулювання енергетики та синтезу макромолекул, міжклітинної взаємодії та регулювання розвитку організму (Б.А. Гудвин, 1978; Л.П. Гринюс, 1986). Ці моменти привернули нашу увагу і змусили відкорегувати завдання дослідження.

У результаті аналізу характеру коливних змін ТМП нами було запропоновано гіпотезу, що на ранніх стадіях ембріогенезу в'юна виникає автоколивний процес, який, збуджуючи систему, веде до виникнення в ній власних згасаючих флуктуацій. У цьому разі сумарний трансмембранний потенціал, який ми одержуємо в результаті експериментальних вимірювань, має містити три складові:

$E_a$  – автоколивна складова;

$E_c$  – потенціал спокою;

$E_z$  – складова згасаючих коливань;

тобто  $E_{ТМП} = E_a + E_z + E_c$ . (8.1)

Запліднена яйцеклітина є високовпорядкованою біологічною системою зі складними механізмами регулювання, розвитку та самоорганізування, в якій цілком природно можуть виникати автоколивні процеси. Для таких систем характерним є те, що коливання в них виникають не за рахунок зовнішніх впливів (початкового поштовху чи впливу періодичної дії), а в результаті внутрішньої здатності такої системи самостійно регулювати надходження енергії від постійного джерела. В усіх автоколивних системах наявний резонатор (осцилятор), джерело живлення та зворотний зв'язок між ними. Оскільки мова йде про біоелектричні процеси у клітині, то резонатор доцільно промодельовати за допомогою коливного контуру, що утворений шляхом послідовного з'єднання ємності та індуктивності. Зворотний зв'язок – це відповідний біоелектричний механізм, за участю якого резонатор сам регулює надходження енергії від джерела.

Рівняння, що описує вільні коливання осцилятора, має вигляд (Парселл., 1975):

$$q''(t) + \omega_0^2 q(t) = 0. \quad (8.2)$$

Розв'язком рівняння (8.2) є функція:

$$q(t) = Q_1 \cos(\omega_0 t + \beta), \quad (8.3)$$

де  $Q_1$  – амплітуда коливань;  $q(t)$  – електричний заряд на мембрані клітини;  $\omega_0$  – кутова частота власних коливань;  $\beta$  – фаза коливань.

У рівнянні (8.2)  $\omega_0 = 1/\sqrt{LC}$ ,

де  $L$  – індуктивність;  $C$  – електрична ємність.

Реальні коливні системи на початкових етапах перехідного процесу мають ще одну складову – власні згасаючі коливання коливної системи. Згасаючі власні коливання виникають

практично у всіх реальних коливних системах, тому що процес відбувається у певному реальному середовищі, яке створює йому опір. Оскільки при створенні моделі біоелектричних процесів ми використовували методи електричних кіл, то можна скласти диференційне рівняння, що описує згасаючі власні коливання (Парселл., 1975):

$$L_1 q'' + Rq' + q/C_1 = 0, \quad (8.3)$$

де  $L_1$  – індуктивність;  $R$  – опір;  $C_1$  – ємність.

Записавши розв'язок рівняння (8.2) у вигляді  $q(t) = Q_2 e^{-\gamma t + b} \cos(\omega_1 t + \alpha)$ , ми отримали формули для обчислення автоколивної складової ТМП  $E_a = a_2 \cos(\omega_0 t + \beta)$  та складової згасаючих коливань  $E_3 = a_1 \cos(\omega_1 t + \alpha) e^{-\gamma t + b}$ . Підставляючи отримані значення складових ТМП у рівняння (8.1), одержуємо математичну модель, яка описує зміни ТМП на ранніх стадіях ембріогенезу:

$$E_{\text{ТМП}} = a_1 \cos(\omega_1 t + \alpha) e^{-\gamma t + b} + a_2 \cos(\omega_0 t + \beta) + E_c, \quad (8.4)$$

де  $a_1, a_2$  – амплітуди коливань;  $\omega_1, \omega_0$  – циклічні частоти коливань;  $\alpha, \beta$  – фази коливань;  $\gamma$  – декремент згасання коливань.

Модель (8.4) було отримано в результаті розв'язку двох диференційних рівнянь другого порядку з постійними коефіцієнтами, тому вона відображає значною мірою якісну картину процесу. Значення параметрів  $R$  та  $C$ , отримані в результаті математичного моделювання, збігаються з відомими із літературних джерел значеннями цих параметрів, отриманими експериментально. Загалом параметри  $R, C, Q, L$  є функціями часу, температури та інших факторів середовища. Запропонована математична модель дасть змогу з'ясувати вигляд цих функцій, дослідити вплив зовнішнього середовища на біоелектричні

параметри клітини, зрозуміти механізми їхньої зміни і взаємодії. Математичну модель (8.4) також було апробовано на низці експериментальних даних зміни ТМП за впливу катіонів деяких важких металів. У всіх випадках абсолютна похибка відтворення експериментальних даних за допомогою математичної моделі не перевищує 5 %.

На рис. 8.5 показано експериментально отриманий ТМП та результати його відтворення з використанням запропонованої математичної моделі. Максимальна похибка відтворення не перевищує 5 % (похибка експерименту -5 %).

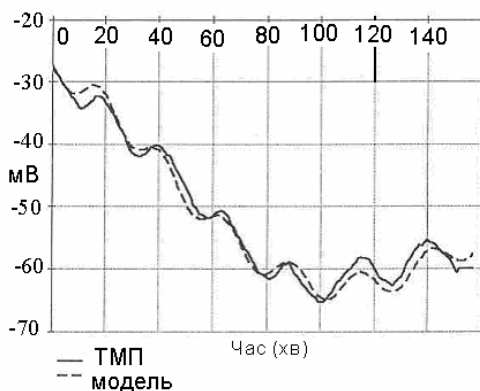


Рис. 8.5. Відтворення експериментально отриманого трансмембранного потенціалу (ТМП) за допомогою математичної моделі

Модель дає можливість глибше зрозуміти біофізичну природу коливних змін ТМП на ранніх стадіях ембріогенезу. За допомогою цієї моделі можна досліджувати біоелектричні параметри клітин і механізми їхньої взаємодії, визначати вплив зовнішнього середовища на них (І.В. Маслій, Д.І. Санагурський, 2001, 2002, 2003).



## Розділ 9. НОВИЙ КЛАС ДИНАМІЧНИХ МОДЕЛЕЙ «ЯК УНІВЕРСАЛЬНИЙ»

### 9.1. Опис процесів раннього ембріогенезу тварин з позиції “Нового класу динамічних моделей”

У роботі за основу було взято двопродуктову динамічну модель нового класу (В.М. Глушков, и др., 1983):

$$m(t) = \int_{a(t)}^t \alpha(\tau, t) y(\tau) m(\tau) d\tau \quad 0 \leq y(t) \leq 1, 0 \leq t \leq T$$
$$c(t) = \int_{a(t)}^t \beta(\tau, t) [1 - y(\tau)] m(\tau) d\tau, \quad (9.1)$$
$$F_0(t) = \int_{a(t_0)}^{a(t)} m(\tau) d\tau \quad F_1(t) = \int_{a(t)}^t m(\tau) d\tau, \quad F_2(t) = \int_{t_0}^t m(\tau) d\tau,$$

$$a(t) \geq a(t_0), 0 \leq a(t) \leq t, F(t) = \int_{t_0}^t [c(\tau) + m(\tau)] d\tau.$$

При параметризації, трансформованій до нашого об'єкта, в моделі використовували такі припущення:

1. Зростання сумарної маси ембріональних клітин обернено пропорційне зміні маси жовтка ембріона.

2. У перші шість годин ембріонального розвитку зародків в'юна у синхронному режимі здійснюється 10–11 кратний поділ клітин, причому сумарна маса клітин суттєво не змінюється.

3. Після шість годин ембріонального розвитку загальна маса клітин починає збільшуватися, а їхній поділ вже десинхронізований.

4. Поріг чутливості до регуляторних сигналів протягом раннього ембріогенезу має тенденцію до зниження.

На підставі зазначених припущень, а також за двопродуктовою динамічною моделлю запропоновано мінімальні моделі розвитку ембріональної системи. Розглянемо спочатку модель розвитку ембріона в'юна з моменту запліднення яйцеклітини – до шостої години після запліднення. Кількість клітин  $N$  обчислюємо за формулою  $N = 2^n$ , де  $N(t)$  – кількість клітин у зародку до моменту часу  $t$ ,  $n(t)$  – кількість поділів клітин у зародку до моменту часу  $t$ .

За двопродуктовою моделлю записуємо такі рівняння:

$$m(t) = \int_0^t \alpha(\tau, t) \lambda(\tau, t) y(\tau) m(\tau) dt, \quad M = M_0 + \int_0^t m(\tau) dt, \quad 0 \leq \lambda, \quad \mu \leq 1, \quad (9.2)$$

$$c(t) = \int_0^t \beta(\tau, t) [1 - y(\tau)] m(\tau) dt, \quad C = \int_0^t c(\tau) dt, \quad 0 \leq y(t) \leq 1, \quad (9.3)$$

$$P = P_0 + \int_0^t [\lambda(\tau, t) y(\tau) + \mu(\tau, t) \cdot (1 - y(\tau))] \cdot m(\tau) dt, \quad 0 \leq t \leq T, \quad (9.4)$$

$$G = P - M, \quad g = G', \quad p = P', \quad f = p + g + c, \quad (9.5)$$

$$F(t) = \int_0^t f(t) dt, \quad (9.6)$$

де  $m(t)$  – швидкість зміни ваги ембріональної клітини;  $\alpha(\tau, t)$  – питома швидкість приросту ваги зародка на одну ембріональну клітину, або внесок однієї клітини в момент часу  $\tau$  у швидкість зміни ваги зародка в момент часу  $t$ ;  $\lambda(\tau, t)$ ,  $\mu(\tau, t)$  – коефіцієнти потужностей, або інтенсивності використання синтетичної продуктивності клітин (у біологічній системі  $\lambda = \mu = 1$ );  $y(\tau)m(\tau)$  – частина внутрішніх ресурсів, яка використовується для синтезу продуктів внутрішнього споживання, або частина ваги клітини, необхідна для відтворення власних структур;  $M(t)$  – маса одного бластомера;  $c(t)$  – швидкість виділення регуляторних субстратів;  $\beta(\tau, t)$  – питома швидкість виділення регуляторних субстратів у момент  $\tau$ , або вклад однієї клітини в момент часу  $\tau$  у швидкість виділення регуляторних субстратів у момент часу  $t$ ;  $[1 - y(\tau)]m(\tau)$  – частина ваги клітини, яка в наступний момент часу реалізується на продукування субстратів регулювання розвитку;  $C(t)$  – загальна кількість виділених клітиною субстратів, які корегують розвиток;  $P(t)$  – вага зародка;  $G(t)$  – кінцеві продукти метаболізму клітини;  $f(\tau)$  – швидкість надходження продуктів живлення;  $F(t)$  – маса продуктів живлення, які надійшли з жовтка;  $T$  – кінець одного

якісного періоду розвитку зародка;  $t_0$  – початковий час експерименту.

Якщо  $y = \text{const}$ ,  $P$  і  $M$  у момент часу  $t=0$  позначили через  $P_0$  та  $M_0$ , тоді  $M_0 = P_0$ , оскільки  $n$  (кількість синхронних поділів у початковий момент часу) дорівнює нулю.

Припустимо, що в початковий момент часу  $c(0) = C_0 = 0$ ,  $S(0) = C_0 = 0$ .

Нехай:

$$\alpha = \alpha_0 \cdot \frac{m(\tau)}{M(\tau)y}, \quad \beta = \beta_0 \cdot \frac{m(\tau)}{M(\tau)[1-y]}, \quad (9.7)$$

тут  $\alpha_0$  і  $\beta_0$  – константи.

З урахуванням (9.2, 9.3, 9.7) маємо:

$$m(\tau) = \int_0^t \alpha_0 \cdot \frac{m^2(\tau)}{M(\tau)} dt, \quad m'(t) = \alpha_0 \frac{m^2(t)}{M(t)}, \quad (9.8)$$

$$M = M_0 + \int_0^t m(\tau) dt,$$

$$P(t) = M(t), \quad G = 0, \quad g = 0, \quad f(t) = m(t) + c(t), \quad \frac{dM}{dt} = m(t), \quad (9.9)$$

$$c(t) = \int_0^t \beta_0 \cdot \frac{m^2(\tau)}{M(\tau)} dt, \quad c'(t) = \beta_0 \frac{m^2(t)}{M(t)}. \quad (9.10)$$

Розв'язуючи (9.8, 9.9), за умови, що  $\alpha_0 \neq 0$ , одержимо:

$$M(t) = M_0 \left[ 1 + \frac{m_0}{M_0} \cdot (1 - \alpha_0)t \right]^{\frac{1}{1-\alpha_0}}, \quad (9.11)$$

$$m(t) = m_0 \left[ 1 + \frac{m_0}{M_0} \cdot (1 - \alpha_0)t \right]^{\frac{\alpha_0}{1-\alpha_0}}. \quad (9.12)$$

Розв'язавши (9.6), з врахуванням (9.11, 9.12), одержимо:

$$c = \frac{\beta_0}{\alpha_0} [m - m_0], C = \frac{\beta_0}{\alpha_0} (M - M_0) + \frac{\beta_0}{\alpha_0} \cdot m_0 t.$$

Розглянемо математичний опис розвитку взятої ембріональної системи за період від шостої до двадцятої години розвитку після запліднення.

Для цього також використовуємо рівняння (9.2–9.7), але тут  $y=y(\tau)$ , а

$$\alpha = \alpha_0 \frac{m(\tau)}{X(\tau)}, \beta = \beta_0 \frac{m(\tau)}{X(\tau)}, \quad (9.13)$$

$$\text{де } X(\tau) = \int_0^\tau y(u) \cdot m(u) du.$$

$$m(t) = \int_0^t \alpha(\tau, t) \lambda(\tau, t) y(\tau) m(\tau) dt, M = M_0 + \int_{t_0}^t m(\tau) dt, 0 \leq \lambda, \mu \leq 1, \quad (9.14)$$

$$c(t) = \int_0^t \beta(\tau, t) \mu(\tau, t) [1 - y(\tau)] m(\tau) dt, C = \int_{t_0}^t c(\tau) dt, 0 \leq y(t) \leq 1, \quad (9.15)$$

$$P = P_0 + \int_{t_0}^t [\lambda(\tau, t) y(\tau) + \mu(\tau, t) \cdot (1 - y(\tau))] \cdot m(\tau) d\tau, 0 \leq t \leq T,$$

$$G = P - M, g = G', p = P', f = p + g + c,$$

$$F(t) = \int_{t_0}^t f(\tau) d\tau, 0 < t_0 \leq t \leq T.$$

Підставляючи значення (9.13) в (9.14) та (9.15), одержимо:

$$m(t) = \int_{t_0}^t \alpha_0 \cdot \frac{m^2(\tau) y(\tau)}{X(\tau)} d\tau, m'(t) = \int_{t_0}^t \alpha_0 \cdot \frac{m^2(t) y(t)}{X(t)},$$

$$c'(t) = \beta_0 \frac{m^2(t)(1-y(t))}{Z(t)}, \text{ де } Z(t) = \int_0^t (1-y(u)) \cdot m(u) du.$$

Якщо зробити заміну  $x=ty$ , то:

$$c'(t) = \beta_0 \frac{m^2(t)(1-y(t))}{Z(t)}, \text{ де } Z(t) = \int_0^t (1-y(u)) \cdot m(u) du.$$

$$x' - \frac{y'}{y} x = \alpha_0 \frac{x^2}{X}; X' = x. \quad (9.16)$$

Припустимо, що  $\frac{y'}{y} = \gamma = const.$  Оскільки

$\forall_t \in [t_0, T], y(t) \leq 1$ , то

$$0 < \frac{y'}{y} = \gamma \leq \frac{\ln\left(\frac{1}{y_0}\right)}{T-t_0}, y = y_0 e^{\gamma(t-t_0)}.$$

Запишемо:

$$x' = \frac{dx}{dt} = \frac{dx}{dX} \cdot \frac{dX}{dt} = \frac{dx}{dX} x,$$

тоді (3.19) перепишемо у вигляді:

$$\frac{dx}{dX} \cdot x - \gamma x = \alpha_0 \frac{x^2}{X}, \text{ або } \frac{dx}{dX} - \alpha_0 \frac{x^2}{X} = \gamma.$$

Ми отримали лінійне диференційне рівняння типу

(Г. Корн, Н. Корн, 1984):

$$\frac{dx}{d\xi} - P(\xi)x = Q(\xi), \text{ тут } P(\xi) = -\alpha_0 / X, Q(\xi) = \gamma, \xi = X.$$

Розв'язавши його, одержимо:

$$x = (x_0 - \gamma \cdot X_0 / (1 - \alpha_0)) (X / X_0)^{\alpha_0} + \gamma \cdot X / (1 - \alpha_0),$$

де  $x_0 = x(t_0)$ ,  $X_0 = X(t_0)$ .

Тоді  $m(t) = x \cdot e^{\gamma(t-t_0)} / y_0$ . Аналогічно можна знайти  $c$ ,  $f$ ,  $M$  і  $F$ .

За цими моделями можна оцінювати баланс регуляторних субстратів у бластомерах протягом усього інтервалу розвитку, який розглядаємо. Порівняння процесів відповідно до розглянутих моделей у періоди синхронного поділу бластомерів (модель I – до шостої години розвитку), а також бластуляції і гастрюляції (модель II – до 20 годин розвитку) дають змогу простежити суттєву відмінність їхнього значення в регулюванні раннього ембріогенезу в'юна. Зміна величини  $y$  в моделі відображає вплив виснаження системи на її продуктивність.

У процесі знаходження швидкості зміни маси в моделі II проявляється експоненціальна залежність, яка спрямовує на пошуки коливних характеристик цього параметра в динаміці розвитку. В зв'язку з цим необхідно зауважити, що експериментальні дані, отримані на ембріональних системах у лабораторії Мано (Y. Mano, 1968) і іншими дослідниками, засвідчують наявність параметрів у ранньому ембріогенезі коливань інтенсивності синтезу білків, які містять сульфгідрильні групи, коливань іншого роду (Д.І. Санагурський, 2001).

Отримані моделі описують загальні принципи синтезу і використання регуляторних субстратів у процесі раннього ембріогенезу. Вони дають можливість оцінювати баланс регуляторних субстратів у бластомерах протягом інтервалу часу розвитку, який розглядають. Розроблені моделі матимуть свій дальший розвиток і конкретизацію при плануванні та проведенні експериментальних досліджень раннього ембріогенезу тварин (О.А. Гойда й ін., 1998).

## **Розділ 10. ЗАСТОСУВАННЯ МІКРОЕЛЕКТРОДНОЇ ТЕХНІКИ НА ІНШИХ КЛІТИНАХ**

### **10.1. Електрична активність епітеліально–м'язових і нервових клітин гідроїтів**

Скорочення стебельця та щупальців у деяких представників класу Hydrozoa, в яких простежується спонтанна електрична активність, ініціюються пейсмейкерами – клітинами-водіями ритму (Э. Кэндел, 1980; D.R. Stokes, N.V. Rushforth, 1979). У колоніальних форм гідроїтів спостерігають ефекти електричної активності, що супроводжуються скороченням епітеліально-м'язових клітин, проявляються на обмеженій частині тіла (стебельце, щупальця) або поширюються по всій колонії за допомогою системи з різними типами провідності: вільно-провідною і наростаюче-провідною. У разі вільно-провідної системи віддалі розповсюдження збудження залежить від параметрів стимулювання, а в наростаюче-провідній вона



знаходиться у функціональній залежності від кількості, частоти та інтенсивності стимулювання (Э. Кэндел, 1980; R. Josephson, 1967; A. Spenser, W. Schwab, 1980; D. Stokes, N. Rushforth, 1979).

За допомогою методів з використанням внутрішньоклітинних мікроелектродів отримано прямі докази про проведення сигналу по нервових клітинах рухових гігантських волокон у сифонофор (G.O. Mackie, 1978) і гігантських плавальних мотонейронах у гідромедуз (A.N. Spenser, R.A. Satterlie, 1980), де поодинокий ПД поширюється через всі нейрони провідної системи. Плавальні мотонейрони у *Poliorchis* утворюють загальну мережу і є електрично зв'язаними через щілинні контакти (A.N. Spenser, R.A. Satterlie, 1980). З'ясовуючи, як передається збудження від нейрона до нейрона у нервовій сітці, деякі автори висловили припущення, що між нейронами є хімічні синапси (J.A. Westfall, 1996). Було також доведена наявність у гідроїдів синапсів, активність яких блокується надлишком катіонів  $Mg^{2+}$  (G. Kass-Simon, L. Passano, 1978; P. Pierobon et al., 1995; A. Spenser, W. Schwab, 1980). У поодинокого поліпа *Corymorpha palma* скорочення стебельця, що проводяться по клітинах ектодерми, мають вигляд серії ПД, а від кількості ПД у пачці залежить ступінь скорочення стебельця (E.E. Ball, J.E. Case, 1973). Для того, щоб дослідити пульсування стебельця *Corymorpha palma* та його провідність, вчені діяли надлишком катіонів  $Mg^{2+}$  (E.E. Ball, J.E. Case, 1973). Отримані дані свідчать про те, що викликані електричним стимулюванням пульсування ініціюються на одному кінці стебельця і проходять по середній частині до протилежного кінця стебельця, що засвідчує блокування нервово-м'язового

контакту йонами  $Mg^{2+}$  у такий спосіб, що епітеліально-м'язові клітини не збуджуються нервовими клітинами. Отже, пульсування стебельця *Corymorpha palma* є епітеліальними, а нервова система відповідає за поширення і локальну збудливість епітеліальних клітин (E. Ball, J. Case, 1973; G. Kass-Simon, L. Passano, 1978; G. Mackie, 1978; P. Pierobon et al. 1995; A. Spenser, R. Satterii, 1980; A. Spenser, W. Schwab, 1980; J. Westfall, 1996).

Клітинам нервової системи гідроїдів властива багатофункціональність. Наприклад, гігантські плавальні мотонейрони *Poliorchis* є світлочутливими, а також є генераторами моторики, а ще здатні інтегрувати синаптичні потенціали та передавати рухові імпульси до ефекторів (P.A.V. Anderson, G.O. Mackie, 1977; A.N. Spenser, R.A. Satterii, 1980). Отже, вони виконують всі функції нервової системи, що являє собою три типи нервових клітин: чутливі нейрони, мотонейрони, інтернейрони. Багатофункціональні нейрони були виявлені й описані також у прісноводної гідри (M. Sakaguchi et al., 1996; H. Schaller et al., 1996; J. Westfall, 1996).

Зацікавлення механізмами ініціації і регулювання ритмічності скорочень у гідроїдів викликало появу низки теорій щодо цих процесів. Вважають, що більшість ритмічних реакцій у Hydrozoa контролюють пейсмейкерні клітини, або системи, які й виконують роль водія ритму (R.K. Josephson, 1967). Вивчаючи фенотипове дозрівання нейронів у формуванні нервової сітки гідри, довели здатність нейронів відповідати на оточуючі сигнали з антигеном L96 залежно від віку (R. Josephson, 1967; U. Technau, T. Holstein, 1996).

Результати досліджень розвитку електричної активності, встановлення чисельності подій та розповсюдження електричних

імпульсів окремих клітин гідри під час процесу регенерування засвідчили, що після початку його у відсотковому співвідношенні електричних імпульсів амплітуда зростала (J. Itayama, O. Sawada, 1995).

Отже, електрична активність епітеліальних та нервових клітин гідри полягає у генеруванні ритмічних серій ПД, які лежать в основі запуску скорочень м'язових відростків епітеліально-м'язових клітин (J. Itayama, O. Sawada, 1995; G. Kass-Simon, L. Passano, 1978).

## **10.2. Механізми генерування мембранного потенціалу в безхребетних тварин**

Відомо, що у стані спокою нервова клітина *Aplysia californica* підтримує на своїй поверхневій мембрані різницю потенціалів, яка становить близько 60 мВ, причому внутрішній бік заряджений електронегативно щодо зовнішнього (Э. Кэндел, 1980). Працюючи на гігантському аксоні кальмара, Ходжкін, Кац (1949 р.) і Кьортіс та Коул (1942 р.) встановили, що батарея, генеруюча напругу, черпає свою потенціальну енергію з неоднакового розподілу катіонів калію по обидва боки мембрани нервової клітини. Розподіл катіонів натрію та калію залежить від процесі метаболізму – транспортного механізму  $\text{Na}^+$  і  $\text{K}^+$ , або  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  – помпи, що підтримує всередині клітини концентрацію натрію низькою, а концентрацію калію - високою, активно транспортуючи  $\text{Na}^+$  з клітини назовні, а  $\text{K}^+$  - з зовнішнього середовища всередину. В результаті активності цієї

помпи всередині нервової клітини концентрація калію приблизно в 20 разів більша, а концентрація натрію в 10 разів менша, ніж в зовнішньому середовищі. У гігантському аксоні кальмара внутрішньоклітинна концентрація  $K^+$  становить 400 мМ, а зовнішньоклітинна – 20 мМ, внутрішньоклітинна концентрація  $Na^+$  становить 50 мМ, а зовнішньоклітинна – 440 мМ. Отже, у спокої мембрані притаманна висока проникність для йонів калію (приблизно у 100 разів більша, ніж для натрію) (Э. Кэндел, 1980; М. Czech, 1977; В. Hille, 1976; А. Hodgkin et al., 1952).

Вважають, що МП клітини формується механізмами, які функціонують у цитоплазмі, а також діяльністю йонних каналів плазматичної мембрани. Ці фактори підтримують певне співвідношення концентрації катіонів у клітині щодо концентрацій іонів у зовнішньому середовищі.

Відомо, що генерування пачкових та поодиноких ПД властиве для екто- та ентодермальних клітин гідри (R. Campbell et al., 1976; Т. Itajama, Y. Sawada, 1995). Причому в ентодермі амплітуда потенціалів дії значно менша, ніж у клітинах ектодерми.

Незважаючи на значну кількість численних досліджень, механізми, що лежать в основі генерування періодичних змін МП, вивчені недостатньо. Однак відомо, що у формуванні величини МПС безхребетних головну роль відіграють іони натрію, калію та хлору (П.Г. Богач та ін. 1984).

Доведено, що потенціал спокою епітеліальних клітин ентодерми та інтерстиціальних клітин *Hydra attenuata* має позитивні значення і становить від +3 до +25 мВ, а в ізольованих нервових клітинах вони негативні: від –5 до –25 мВ (R.D. Campbell

et al., 1976). Потенціал спокою у клітинах ектодерми гідри знижується при збільшенні концентрації йонів натрію до 18 мМ, що призводить до загибелі ізольованих клітин ентодерми протягом години. Зміна концентрації калію (0,2–3 мМ) не зумовлює помітних змін потенціалу спокою, збільшення концентрації вище 3 мМ призводить до швидкої загибелі клітин (R.D. Campbell et al., 1976).

При реєструванні мембранного потенціалу ізольованих клітин ентодерми спостерігали періодичні ритмічні деполяризації мембрани тривалістю 150–2 000 мс з повільним відновленням (від 500 мс до 2–4 с) і амплітудою від +2 до +5 мВ (R.D. Campbell et al., 1976).

Згідно з даними літератури щодо дослідження електричної активності ізольованих клітин ектодерми та ентодерми прісноводної гідри, ці клітини мають властивості спонтанно активованих збудливих клітин і здатні протягом тривалого періоду генерувати ритмічні потенціали дії (РПД) з середньою частотою 7–10 хв (L.M. Passano, C.B. McCullough, 1962, 1964).

### **10.3. Механізми синаптичного передавання у кишковопорожнинних тварин**

Відомо, що різні електричні сигнали нервових клітин *Aplysia californica* виникають у результаті зміни струмів, які протікають через клітинну мембрану. Зміна струму зумовлює зміни МП (Э. Кэндел, 1980).

Дослідження, проведені протягом останніх років, дали змогу виробити єдину теорію електричних властивостей нейронів, яка є основою сучасних уявлень про електричне передавання сигналів нервовими клітинами. Ця теорія має два джерела: дослідження йонних механізмів мембранних потенціалів і потенціалів дії Ходжкіном, Хакслі та Катцом (А.Л. Ходжкін, 1965; A.L. Hodgkin et al., 1952) та аналіз хімічного синаптичного передавання, проведений Катцом (В. Katz, R. Miledi, 1969; 1970).

Касс-Шімоном (G. Kass-Simon, 1976) було встановлено, що взаємодія між екто- та ентодермою гідри може здійснюватися через електротонічний контакт та через нейрональні контакти, або завдяки взаємодії цих механізмів. Іншими авторами (L.M. Passano, 1973; J.A. Westfall, D.R. Argast, 1982) підтверджено, що нервові клітини беруть участь в ініціації спонтанної активності. *Hydra attenuata*, оброблена колхіцином, є поведінково інертною та електрично незбудливою. Позбавлена нервових клітин, гідра не реагує на світло, їжу чи слабе механічне подразнення культурального середовища. Швидкість поширення пульсуючих скорочень у неї значно нижча, ніж у необроблених колхіцином контрольних тварин (N. Wanek, 1980; J. Westfall, D. Argast, 1982).

Нервові клітини гідри можуть генерувати повільні періодичні зміни МПС (M. Hassen et al., 1996). На сьогоднішній день встановлено мембранний потенціал, який був зумовлений арахідоною кислотою та її похідною 12-S-НЕТЕ, що має здатність збуджувати ділянку гіпостому гідри та брати участь у брунькуванні (M. Hassen et al., 1996).

Експериментами Беннета (M.V.L. Bennett, 1973) доведено, що електричне та хімічне передавання сигналів, яке здійснюється за допомогою нервових клітин, наявне у всіх досліджуваних безхребетних тварин. ПД розповсюджується між нейронами, не втрачаючи амплітуди до кінцевої ділянки аксона *Aplysia californica*, де він збуджує процес, який названо синаптичним передаванням (Э. Кэндел, 1980). Оскільки синаптичне передавання має важливе значення для розуміння того, як працює нервова система, доцільним було прослідкувати, як здійснюється синаптичне передавання в нервовій системі (Э. Кэндел, 1980; M. Bennett, 1973).

Відомо, що електричні та хімічні синапси розрізняють за механізмом дії, морфологією та можливим напрямком передавання сигналів. У хімічному синапсі потенціал дії в пресинаптичному нейроні призводить до виділення медіатора, який проникає через синаптичну щілину та взаємодіє з рецепторами на зовнішній мембрані постсинаптичної клітини (Э. Кэндел, 1980). Така хімічна взаємодія спричиняє появу струму в постсинаптичній клітині, який змінює її мембранний потенціал, створюючи або гальмівний, або збуджуючий постсинаптичний потенціал. Так, Беннет (1976 р.) прийшов до висновку, що найбільш типовим видом синапсу з електричним передаванням є щілинний контакт, при якому пре- та постсинаптична мембрани зв'язані протоплазматичними каналами, перекинутими у вигляді мостиків через щілину, й які з'єднують цитоплазму клітин (Э. Кэндел, 1980; M. Bennett, 1976).

У гангліях центральної нервової системи (ЦНС) молюсків виявлено нейрони, в яких відбуваються повільні періодичні

осциляції МП. Під час їхньої деполяризаційної фази МП досягає порогового рівня та виникає серія ПД, за якими слідує фаза гіперполяризації, що поступово переходить у стадію деполяризації. Такий тип активності нейронів молюсків було виявлено в ідентифікованих нейронах абдомінального ганглія *Aplysia californica* (A. Arvanitaki, N. Cholazonitis, 1968), *Limnea stagnalis* (J. Salanki, I. Kiss, 1969), *Helix pomatia* (D. Sakharov, J. Salaki, 1969), *Otala lactea* (H. Gainer, 1972), *Helisoma trivolvis* (S.B. Kater, C.R.S. Kanenko, 1972), *Onchidium verruculatum* (Y. Katayama, 1973).

Незалежно від розмірів, форми, локалізації та функції більшість нервових клітин безхребетних у загальних рисах відповідає моделі нейрона, що включає такі функціональні компоненти, як потенціал спокою, потенціал дії, збуджуючі та гальмівні синаптичні потенціали і генераторний потенціал сенсорних клітин (Э. Кэндел, 1980). За останні роки було проведено велику кількість досліджень щодо механізмів електричного передавання сигналів окремими нейронами, результатом яких стала йонна гіпотеза, відповідно до якої в основі ПС, ПД та синаптичних потенціалів лежить один механізм – пасивний рух неорганічних іонів “вниз” згідно з їхніми електричними градієнтами (Э. Кэндел, 1980).

Відомо, що різні типи змін потенціалів відрізняються залежно від того, які види йонів беруть участь в їхньому генеруванні. Питання про те, в якій послідовності активуються чи інактивуються механізми переміщення цих іонів і яким чином це переміщення залежить від мембранного потенціалу, вивчено недостатньо. Наприклад, Штрумвассер висловив припущення, що



гіперполяризація, що слідує за серією ПД, зумовлена активуванням електрогенної натрієвої помпи, що супроводжується транспортуванням іонів хлору (F. Strumwasser, 1967).

Коул та Кьортіс (K.S. Cole, H.J. Curtis, 1939) першими довели, що генерування ПД пов'язане з різким збільшенням іонної проникності мембрани. Вони виявили, що під час ПД опір мембрани гігантського аксона кальмара зменшується у 40 разів – з 1 000 до 25 Ом $\times$ см, а ємність мембрани змінюється менше, ніж на два відсотки. Пізніше Ходжкін та Катц (A.L. Hodgkin et al., 1952) встановили, що початкове збільшення йонної проникності під час ПД зумовлено тим, що мембрана стає на деякий час більш проникною для Na<sup>+</sup>, ніж для K<sup>+</sup>. Вони довели, що цей процес відбувається за рахунок відкриття натрієвих каналів, в результаті чого виникає зміна потенціалів. Деполяризація збільшує проникність для йонів натрію, що призводить до переходу всередину клітини незначної кількості Na<sup>+</sup> і спричиняє подальшу деполяризацію, яка підвищує проникність для Na<sup>+</sup> ще більше. Така реакція змінює від'ємний знак мембранного потенціалу до +55 мВ (потенціал рівноваги для Na<sup>+</sup>). Зростаюча деполяризація врешті виключає механізм, який створює підвищену проникність для Na<sup>+</sup>. Така інактивація Na<sup>+</sup> супроводжується дальшим збільшенням високої проникності для K<sup>+</sup>, що викликана деполяризацією. В гігантському аксоні кальмара при кожному імпульсі через 1 см<sup>2</sup> поверхні у клітину входить від 3 $\times$ 10<sup>-12</sup> до 4 $\times$ 10<sup>-12</sup> М Na<sup>+</sup> і така ж кількість K<sup>+</sup> виходить (A.L. Hodgkin et al., 1952).

У дослідах на гігантському аксоні кальмара Бейкер, Ходжкін та Шоу (P.F. Bacer et al., 1962) замінили йони зовнішнього та внутрішнього середовищ іншими йонами. Вчені вилучали цитоплазму з аксона, розправляли волокно, наповнюючи його штучними розчинами. У аксона, що містив 600 мМ KCl і був поміщений у морську воду (10 мМ K<sup>+</sup> і 470 мМ Na<sup>+</sup>), потенціал внутрішньої порожнини волокна становив – 60 мВ. Коли вони замінили всередині K<sup>+</sup> ([K<sup>+</sup>]<sub>в</sub>) на Na<sup>+</sup> ([Na<sup>+</sup>]<sub>в</sub>), МП знижувався до нуля. Збільшення кількості [Na<sup>+</sup>]<sub>в</sub> аксона зменшувало овершут імпульсів і зупиняло їхнє генерування; подібний результат був отриманий в експериментах із зменшенням зовнішньої концентрації Na<sup>+</sup> ([Na<sup>+</sup>]<sub>з</sub>) (P.F. Bacer et al., 1962).

Роль катіонів Na<sup>+</sup> у генерування ПД вивчали Хакслі і Штемпфлі (A. Huxley, R. Stamfli, 1951) на поодиноких перехватах Ранв'є нервових волокон жаби. Вони встановили наявність лінійної залежності між величиною овершута і логарифмом концентрації Na<sup>+</sup> у розчині так само, як у гігантських аксонах кальмара, та підтвердили, що є приблизно пропорційні співвідношення між максимальною крутизною наростання ПД і [Na<sup>+</sup>]<sub>з</sub>. В дослідах на гігантських аксонах омара *Homarus americanus* Дальтоном було отримано подібні результати досліджень (Dalton, 1958).

Отже, джерело генерування ПД забезпечує різниця концентрацій Na<sup>+</sup> по обидва боки мембрани.

При дальшому вивченні збудливих клітин мембран деякі вчені (A. Kleinhaus, J. Prichard, 1976; T. Narahashi, 1974), використовуючи внутрішньоклітинні мікроелектроди, діяли тетродотоксином на скелетні м'язові волокна, щоб встановити, на

які саме типи йонних каналів діє цей препарат. Доведено, що тетродотоксин блокує виникнення ПД шляхом вибіркового інгібування натрієвої провідності мембрани та не впливає на калієву провідність (Т. Narahashi, 1974). Однак натрієві йонні канали, виявлені у нейронах п'явки, є нечутливими до дії тетродотоксину (A.L. Kleinhaus, J.W. Prichard, 1976).

Відомо, що для виділення медіатора у нервово-м'язовому синапсі жаби необхідні йони кальцію, які у нормі містяться у зовнішньоклітинному середовищі в більшій концентрації, ніж всередині нервової клітини (B. Katz, R. Miledi, 1969). На нервово-м'язових та центральних синапсах спинного мозку жаби, кішки, кальмара та аплізії було виявлено, що перехід кальцію у клітину є важливою ланкою між деполяризацією нервового закінчення і вивільненням ацетилхоліну (V. Castellucci, E.R. Kandel, 1974; B. Katz, R. Miledi, 1969; R. Miledi, 1973). У випадку, якщо вилучити йони кальцію з зовнішнього середовища, передавання сигналу припиниться (Э. Кэндел, 1980). Збільшення кількості йонів  $\text{Ca}^{2+}$  всередині клітини ( $[\text{Ca}^{2+}]_в$ ) полегшує синаптичне передавання навіть за наявності тетродотоксину (B. Katz, R. Miledi, 1969). Підвищення зовнішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_в$ ) у п'ять разів (від 11 до 55 мМ) змінює нахил кривої “вхід-вихід” таким чином, що деполяризація на 7,5 мВ є достатньою для 10-кратного збільшення постсинаптичного струму. На підтвердження гіпотези про те, що пресинаптична деполяризація зумовлює переміщення  $[\text{Ca}^{2+}]_в$  всередину клітини, свідчить той факт, що в гігантському аксоні кальмара під час ПД йони  $\text{Ca}^{2+}$  входять у клітину (B. Katz, R. Miledi, 1969; 1969; R. Llinas, C. Nicholson, 1975).

Катц і Міледі (В. Katz, R. Miledi, 1969) встановили, що деполяризацію зумовлює вхід кальцію в нервові закінчення. Якщо ж введення його затримується до закінчення деполяризації, медіатор не вивільнюється. Деполяризація під час ПД спричиняє вивільнення медіатора, змінюючи властивості мембрани біля закінчення аксона таким чином, що в ній закриваються кальцієві потенціал-залежні канали. Роль іонів кальцію в цьому процесі була підтверджена Міледі (1973 р.), який спостерігав посилене виділення медіатора після введення кальцію в пресинаптичне нервове закінчення гігантського синапса кальмара (В. Katz, R. Miledi, 1969; R. Miledi, 1973).

Отже, МП керує вивільненням медіатора, регулюючи кальцієву провідність. Щоб збільшити внутрішньоклітинну концентрацію йонів  $\text{Ca}^{2+}$  до величини, достатньої для запуску вивільнення, більшості синапсів необхідна деполяризація на 25 мВ. Дальша деполяризація спричиняє велике додаткове збільшення кальцієвої провідності ( $g_{\text{Ca}}$ ). В деяких синапсах навіть незначна стійка деполяризація пресинаптичних закінчень може частково інактивувати ( $g_{\text{Ca}}$ ), тоді, як легка гіперполяризація знімає інактивацію (Э. Кэндел, 1980).

Гедульдїг, Юнге та Гранер (M.P. Czech, 1977; Dalton, 1958) виявили, що в клітинах нейронів *Aplysia* у генерування ПД беруть участь катіони кальцію. Коли ізольовану клітину нейрона поміщали в безкальцієвий розчин, спостерігали генерування ПД лише з частковим зменшенням величини овершута; вилучення йонів кальцію пригнічувало генерування імпульсів. Вважають, що відповідні струми проходять через різні канали мембрани. Доведено, що потенціалзалежні кальцієві канали нервово-м'язових

клітин ракоподібних можуть бути заблоковані катіонами  $\text{Co}^{2+}$  (D. Geduldin, D. Junge, 1968), а також  $\text{La}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  (P. Hess et al., 1986; R.W. Tsien, 1990). Внесок кальцію в ПД, очевидно, зростає, коли клітина розряджається багаторазово (Э. Кэндел, 1980).

Також встановлено, що поблизу зовнішнього отвору кальцієвого каналу соматичної мембрани нейронів молюсків є структура, що ефективно хелатує двовалентні катіони (П.Г. Костюк, О.А. Крышталь, 1981). У немодифікованому стані з цією структурою зв'язаний іон кальцію, завдяки чому зберігається селективність каналу до дво- й одновалентних катіонів. Вилучення йона  $\text{Ca}^{2+}$  зі структури призводить до певної конформаційної перебудови, при якій канал втрачає селективність (П.Г. Костюк, 1986; Я.М. Шуба, 1983; 1991). За допомогою флуоресцентних зондів (indo-1, fura-2) виявлено буферні властивості цитоплазми, де цитозольні білки впливають на катіони  $\text{Ca}^{2+}$  (П.Г. Костюк, 1986).

Відомо, що зі зниженням зовнішньоклітинної концентрації кальцію до  $10^{-6}$  М кальцієві канали поодиноких кардіоміоцитів втрачають свою селективність і набувають здатність пропускати катіони натрію (P. Hess et al., 1986). Тут селективність для йонів  $\text{Ca}^{2+}$  пояснюють наявністю фільтра розміщеного при вході у канал. Константа зв'язування проникаючого катіона з цим фільтром визначає ступінь його проникнення через канал. Чим цей ступінь менший, тим вища проникність катіона. Отже, чим константа зв'язування більша, тим менша проникність двовалентних катіонів і вони діють як блокатори (P. Hess et al., 1986).

Вважають, що тіла клітин і аксональні мембрани можуть використовувати для генерування імпульсів різні йонні механізми (П.Г. Костюк, 1978). Однак виявлено, що немодифіковані кальцієві

канали L-типу клітин синоатріального вузла кролів мають високу проникність для іонів натрію (F. Porciatti, D. Di Francesco, 1990). В нейрональних клітинах *Aplysia* типу R15, L7, L10 і L11 механізми генерування імпульсів не потребують іонів кальцію і залежать зазвичай виключно від  $\text{Na}^+$  (H. Bryant, D. Weinreich, 1978; D. Carpenter, R. Gunn, 1970; D. Carpenter, 1973; F. Strumwasser, 1974).

Функціональне значення комбінованого натрій-кальцієвого механізму не з'ясовано до кінця, але в деяких клітинах іони кальцію використовуються для внутрішньоклітинної сигналізації і можуть активувати один або кілька клітинних процесів. Наприклад, у багатьох нейронів один із компонентів затриманого збільшення  $g_K$  включається вхідним потоком іонів  $\text{Ca}^{2+}$  під час висхідної фази потенціалу дії (R.W. Meech, N.V. Stander, 1975). Припускають також, що спонтанна електрична активність епітеліально-м'язових та нервових клітин гідри відбувається за участю кальцієвих каналів, через які проходять катіони натрію (A.N. Spenser, W.E. Schwab, 1980).

#### **10.4. Фармакологічні особливості рецепторів гама–аміномасляної кислоти та глутаматних рецепторів**

На сьогоднішній день достовірно ідентифікованими нейромедіаторами є такі хімічні речовини: катехоламіни – дофамін, адреналін і норадреналін; 5-гідрокситриптамін (серотонін); гістамін; дикарбонові амінокислоти –

глутамінова та аспарагінова (збуджуючі амінокислоти); гама-аміномасляна кислота (ГАМК) і гліцин (гальмівні амінокислоти). Протягом тривалого часу вважали, що нервові закінчення одного й того ж нейрона виділяють один і той самий нейромедіатор (принцип Дейла). Але доведено, що нейрони, які розвиваються, синтезують і виділяють більше, ніж один нейромедіатор. Разом з низькомолекулярними медіаторами виділяються також нейроактивні пептиди.

Взаємодія нейромедіатора з рецепторами постсинаптичної мембрани приводить до виникнення постсинаптичного потенціалу. Постсинаптичні потенціали можуть приводити як до деполяризації, так і до гіперполяризації.

Потенціали, що зумовлюють деполяризацію є збуджувальними, а гіперполяризацію – гальмівними. Їх позначають відповідно ЗПСП та ГПСП (П.Г. Костюк, 1986).

Виникнення ЗПСП переважно пов'язане зі збільшенням провідності постсинаптичної мембрани для йонів натрію, калію і, можливо, кальцію, зумовлене активуванням йонних каналів, що мають низьку селективність. Потенціал реверсії для синаптичного струму, який виникає, дорівнює приблизно 0 мВ. Сумарний струм через постсинаптичну мембрану направлений у клітину. Інколи ЗПСП виникає в результаті зниження провідності мембрани для йонів калію. Водночас взаємодія нейромедіатора з рецептором приводить до появи всередині клітини вторинного посередника, який зумовлює низку подій, унаслідок яких закриваються калієві канали.

Нейромедіатори, що є причиною виникнення ГПСП, активують хлорні або калієві канали. Потенціали реверсії для цих іонів у нервових клітинах ( $E_{Cl}$  і  $E_K$ ) становлять відповідно  $-60$  і  $-70$  мВ, а ПС – приблизно  $-50$  мВ.

Активування як хлорних, так і калієвих каналів спричиняє гіперполяризацію мембрани. Синаптичний струм під час ГПСП протікає через активовані нейромедіатором канали з клітини.

Для вивчення властивостей іонних каналів, які активуються нейромедіаторами, реєструють струми, що протікають через поодинокі йонні канали за умови фіксування потенціалу на фрагменті мембрани (петч-клемп).

Йонний канал ГАМК<sub>A</sub>-рецептора є лігандзв'язаним каналом, який активується гама-аміномасляною кислотою, нейромедіатором у численних синапсах ЦНС ссавців. ГАМК<sub>A</sub>-рецептор являє собою глікопротеїн, який складається з кількох субодиниць п'ять з яких – це  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , та  $\rho$ . ГАМК<sub>A</sub>-рецептор – це йонний канал, який є вибірково проникним для іонів хлору. Функцією ГАМК<sub>A</sub>-рецептора в ЦНС дорослих хребетних є швидке гальмівне синаптичне передавання внаслідок зв'язування двох молекул ГАМК і швидкого зростання проникності мембрани для іонів хлору.

Слід зазначити, що ГАМК діє також через рецептори, зв'язані з G-білками (ГАМК<sub>B</sub> -метаботропні рецептори) і ГАМК<sub>C</sub> -рецептори, які є нечутливими до дії бікукуліну (йонотропні рецептори) та проникними для аніонів хлору.

В таблиці 3.1 подано фармакологічні особливості ГАМК-рецепторів.



Відомо, що серед похідних амінокислот ГАМК наявна у значній кількості в пресинаптичних нервових закінченнях хребетних та безхребетних тварин (Дж. Эклс, 1966; D. Belelli et al., 1996; K.W. Gee, 1988; J.J. Lambert et al., 1995; G.G. Lunt, 1991; J.A. Peters et al., 1988). ГАМК збільшує проникність постсинаптичних мембран для  $K^+$ , і, отже, віддаляє МП від порогового рівня, при якому виникає ПД.

Таблиця 10.1

## Фармакологія ГАМК-рецепторів

	ГАМК <sub>A</sub> -рецептори	ГАМК <sub>B</sub> -рецептори
Агоністи	ГАМК, мусцімол, ізогуацин, ТНІР	ГАМК, баклофен
конкурентні антагоністи	бікукулін	факлофен
блокатори каналів	пikротоксин	–
алостеричні агоністи	бензодіазепін, барбітурат	–
зворотні агоністи за бензодіазепіном	бета-карболін (DMCM)	–
антагоніст за бензодіазепіном	Ro 15 1788	–

Примітка. ТНІР: 4, 5, 6, 7- тригідроізоксазолпіридин

ГАМК-рецептори відповідають за гальмування електричної активності. Утворення ГАМК проходить при метаболічних перетвореннях альфа-кетоглутарової кислоти в гама-амінобутиратному шунті (ГАМК –  $H_2NCH_2-CH_2-CH_2-COOH$ ).

Утворення ГАМК може здійснюватися також із діаміна путресцина (Н.Е. Кучеренко, 1988).

ГАМК перетворюється при декарбоксілюванні глютаму в реакції, яка каталізується глютамат-декарбоксилазою (M.G. Darlison, 1992). Простетичною групою цієї декарбоксилази служить піридоксальфосфат.

Гама-амінобутират інактивується шляхом трансамінування з утворенням півальдегіду бурштинової кислоти, який далі окиснюється в сукцинат. Після перших доповідей у 1987 та 1989 роках про наявність ГАМК<sub>A</sub>-та глютаматних рецепторів на ізольованих клітинах, виділених з мозку хребетних тварин, з'явилася велика кількість публікацій, пов'язаних з доповненнями у послідовності кожного з поліпептидних ланцюгів, або відповідних субодиниць, виявлених у інших хребетних.

Було описано 14 субодиниць ГАМК-рецепторів та 12 субодиниць глютаматних рецепторів (H. Luddens, W. Wisden, 1991; D. Wilson-Shaw et al., 1991).

У 1991 році було опубліковано дані про амінокислотну послідовність двох різних поліпептидів ГАМК- та глютаматних рецепторів (H. Luddens, W. Wisden, 1991; M.G. Darlison, 1992; D. Wilson-Shaw et al., 1991). Експерименти, проведені на ізольованих нейронах *Lymnea stagnalis* та *Drosophila melanogaster*, дали змогу описати структуру поліпептидів ГАМК<sub>A</sub>-рецепторів та простежити за цією послідовністю в еволюційному аспекті.

Збуджуючі амінокислоти, такі як глютамат і аспартат, містяться в багатьох синапсах центральної нервової системи хребетних. За даними Кертіса (H.J. Curtis, K.S. Cole, 1942) глютамат спричиняє деполяризацію в нейронах спинного мозку. Цей ефект є

швидким і може бути зумовлений також іншими амінокислотами (L-аспартат, L-гомоцистат, L-цистеїн-сульфат).

Швидкість цього ефекту свідчить про те, що глутамат та інші агоністи зумовлюють деполяризацію, діючи безпосередньо на каналні рецептори. За допомогою методів петч-клемп (конфігурація “outside-out”) було підтверджено цю гіпотезу. Доведено, що глутамат ефективно діє навіть за браком будь-яких внутрішньоклітинних компонентів (С. Hammond, 1996).

Виділяють дві основні групи каналних рецепторів, які активуються збуджуючими амінокислотами. Таке визначення основане на спорідненості рецептора й глутаматних вибіркових структур аналогів, особливо з N-метилом-D-аспартат (NMDA). Отже, таке визначення зроблене між тими каналами глутаматних рецепторів, які активуються NMDA-, й тими каналами глутаматних рецепторів, які активуються АМРА, або каїнатом.

Слід зазначити, що глутамат діє також через рецептори, що зв'язані з G-білками (глутаматні метаботропні рецептори, mGluR). Дослідження, проведені на мозку щура та миші, дали можливість ідентифікувати субодиниці АМРА-рецепторів, названих GluR-1, GluR-2, GluR-3, GluR-4 та субодиниці каїнатних рецепторів (GluR<sub>5</sub>, GluR<sub>6</sub>, GluR<sub>7</sub> та KA-1, KA-2) і субодиниці NMDA-рецепторів (NR1, NR2).

За допомогою методу петч-клемп, досліджуючи *in vitro* нейрони, які формують синапси спинного мозку та гіпокампа хребетних тварин, інші вчені прийшли до висновку, що вхідні постсинаптичні струми через NMDA-та не-NMDA-рецептори, які

є результатом активування збуджуючих рецепторів, мають два компоненти (С. Hammond, 1996). Зважаючи на властивості NMDA- та не-NMDA- рецепторів (табл. 3.1), досліджено, що на компонент не-NMDA-рецептора не впливають зміни зовнішньоклітинної концентрації катіонів  $Mg^{2+}$ , або дія APV. Встановлено, що не-NMDA компонент зникає за наявності CNQX-селективного антагоніста AMPA-рецепторів. З іншого боку, NMDA компонент генерується у безмагнієвому середовищі та зникає під впливом APV- конкурентного антагоніста NMDA-рецепторів.

Таблиця 10.2

## Агоністи та антагоністи NMDA- та не-NMDA-рецепторів

Рецептори	не-NMDA канали		NMDA канали
	AMPA-рецептори	Каїнатні	
найбільш селективні агоністи	AMPA, квісквалат	каїнат	NMDA
змішані агоністи	глутамат, аспартат	глутамат, аспартат	глутамат, аспартат
конкурентні антагоністи	CNQX, NBQX	CNQX, NBQX	D-APV (або DAPS) CPP
блокатори каналів	–	–	MK 801
неконкурентні антагоністи за гліциновим сайтом	–	–	7-хлор кінуренат

Примітка. 1. AMPA –  $\alpha$ -аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксалон пропіонат; 2. D-APV або D-APV – D-2-аміно-5-фосфонепентанат; 3. CNQX – 6-ціано-7-мітроквіноксалін-2,3-діон; 4. NMDA – N-метил-D-аспартат; 5. MK801 – 5-метил-10,11-дигідро-5H-добензоциклопентен-5,10-імін малат; 6. NBQX – 6-нітро-7-сульфамобензоквіноксалін-2,3-діон; 7. CPP – (2-карбоксіпіперазин-4-ил) пропіл-1-фосфонічно кислий

Таким чином, при стимулюванні нейрона у безмагнієвому середовищі виникає вхідний струм, який має два компоненти: перший компонент має велику амплітуду та швидко інактивується, а другий – повільний компонент.

Наявність іонів  $Mg^{2+}$ , або їхній брак, та наявність APV не впливають на перший компонент, але блокують другий (С. Hammond, 1996). Встановлено, що ранній компонент є результатом синаптичного активування АМРА-рецепторів. Пізній компонент спричинений активуванням NMDA-рецепторів, оскільки за наявності катіонів  $Mg^{2+}$  цей компонент є дуже пом'якшений негативними потенціалами, але він є при всіх позитивних струмах. За наявності APV пізній компонент зникає при будь-яких струмах. Отже, пізній компонент вхідного синаптичного струму спричинений активуванням NMDA-рецепторів.

Канал NMDA-рецептора є “подвійно-ворітним” (С. Hammond, 1996). Відомі лише дві умови, за яких відбувається його активування: наявність ліганда глютамату (і, можливо, гліцину) та деполяризація мембрани. Слід зауважити, що NMDA канали блокуються йонами  $Mg^{2+}$  при струмі близькому до потенціалу спокою клітини. Чутливість до струму NMDA каналів, спричинена катіонами  $Mg^{2+}$ , радикально відрізняється від чутливості до струму  $Na^+$  і  $Ca^{2+}$  каналів, що є внутрішньою особливістю білка, коли не спостерігається зовнішньо- та внутрішньоклітинне блокування йонів. Отже, виникає питання, чи наявність нейротрансмітера у синаптичній щілині є достатньою, щоб спричинити постсинаптичну реакцію NMDA.

Відомо також, що не-NMDA- та NMDA-рецептори співіснують на постсинаптичній мембрані (С.І. McBain, М.І. Mayer, 1994). Так, Едмондс та ін. (В. Edmonds et al., 1995) спробували дати відповідь, якою буде частина синаптичного струму, що формується активуванням NMDA-рецепторів. Нейротрансмітером у більшості синапсів ЦНС хребетних слугує глутамат. Вивчаючи вплив ендogenousного глутамату на не-NMDA- та NMDA-рецептори у разі фіксування петч-клемп на постсинаптичних нейронах та порівнюючи з ідентифікованими пресинаптичними нейронами, вчені висунули таку гіпотезу.

Глутамат виділяється в синаптичну щілину, де зв'язується з постсинаптичним NMDA-рецептором так само, як і з не-NMDA-рецептором. Коли мембранний потенціал наближається до потенціалу спокою клітини, велика щілина NMDA-рецептора блокується йонами  $Mg^{2+}$ , які наявні в синаптичній щілині. Тому виділений глутамат активує не-NMDA-рецептори (В. Edmonds et al., 1995).

Доведено (С. Hammond, 1996), що стимулювання пресинаптичних нейронів гіпокампа в разі браку йонів  $Mg^{2+}$  зумовлює постсинаптичну деполяризацію, що є результатом синаптичного вхідного струму та пов'язана з перехрещенням NMDA та не-NMDA каналів. Якщо немає катіонів  $Mg^{2+}$  та за наявності APV, спостерігається зниження тривалості постсинаптичної деполяризації.

Компонент, поява якого спричинена активуванням NMDA-рецепторів, має повільнішу фазу зростання деполяризації й триває довше, ніж компонент, опосередкований не-NMDA-

рецепторами. Отже, коли NMDA-рецептори є активовані, пік постсинаптичної деполяризації не завжди простежується, але тривалість такої деполяризації є значно більшою.

Використання селективних антагоністів NMDA- чи не-NMDA-рецепторів дало можливість вивчати кожен з цих рецепторів окремо (під час синаптичних відповідей) у разі дії ендогенних збуджуючих кислот. Відомо, що клас не-NMDA-рецепторів поділяється на дві групи: рецептори, які активуються АМРА та квіскваліатом і мають до них високу спорідненість (В. Edmonds et al., 1995; С. Hammond, 1996; С. J. McBain, М. L. Mayer, 1994). Канал, активований квіскваліатом (10 мкмоль/л), у зовнішньоклітинному середовищі на культурі спинних нейронів щура, є проникним для одновалентних катіонів: використання квіскваліату при МП  $-60$  мВ спричиняє одиничний вхідний струм, який є результатом входу йонів  $\text{Na}^+$  та виходу йонів  $\text{K}^+$  через той самий канал (причому вхід натрію більший, ніж калію) (С. J. McBain, М. L. Mayer, 1994). Кінетика струмів є різною. Цей АМРА-рецептор має незначну проникність для катіонів  $\text{Ca}^{2+}$ , а його провідність лише частково залежить від струму. Тим паче, дослідження, проведені на інших об'єктах, засвідчили, що деякі АМРА-рецептори є проникними для йонів кальцію (С. Hammond, 1996).

Більшість каналів, які активовані квіскваліатом, мають провідність 8 пСм, яка є малочутливою до змін мембранного потенціалу. Крім того, одиничний струм реверсує при потенціалі, близькому до 0 мВ, якщо зовнішньо- та внутрішньоклітинні оточуючі середовища містять подібну концентрацію

одновалентних катіонів. Це значить, що канал, який активується квіскваліагом є проникним для катіонів. Щоб перевірити цю гіпотезу, потенціал реверсії струму був зафіксований у різних внутрішньо- та зовнішньоклітинних концентраціях іонів  $\text{Na}^+$  та  $\text{K}^+$ . Коли зовнішньоклітинна концентрація  $\text{Na}^+$  зменшується від 140 до 50 ммоль/л, замінюючи йони  $\text{Na}^+$  холіонами, потенціал реверсії стає негативним (він зменшується від 0 до  $-20$  мВ). Якщо йони  $\text{Cs}^+$  замінюють внутрішньоклітинні йони  $\text{K}^+$ , реверсія струму не відбувається. Ці результати дають змогу переконатися, що канал, активований квіскваліагом, є проникним для йонів  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  та  $\text{Cs}^+$  і непроникний для холіну.

Було доведено (P. Jonas, N. Vumashhev, 1995), що цей канал має низьку проникність для двовалентних катіонів, особливо йонів  $\text{Ca}^{2+}$ . Отже, зміни, здійснені цими іонами, не впливають на потенціал реверсії квіскваліатного потоку, зафіксованого на нейронах у конфігурації “whole-cell”. Подібним чином лише незначні зміни фотометрично зафіксованої внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  можуть бути виміряні під час відповіді, зумовленої квіскваліагом при струмі  $-60$  мВ. Автори звертають увагу на важливість фіксування потенціалу в клітинах, оскільки поріг активування для потенціалзалежних  $\text{Ca}^{2+}$  каналів, є нижчим, ніж поріг входження йонів  $\text{Ca}^{2+}$  через ці канали.

Дарлісон (M.G. Darlison, 1992) вивчав фармакологічні властивості ГАМК- та глутаматних рецепторів на молюсках та дрозофілі, що стало стимулом до дальших досліджень в електрофізіології та фармакології білків іонних каналів у безхребетних.



Він виявив, що у хребетних та безхребетних тварин наявні ГАМК- та L-глутаматні рецептори в низки йон-селективних каналів. У хребетних тварин іонотропні ГАМК-рецептори (ГАМК<sub>A</sub>) проникні для іонів Cl<sup>-</sup>, оскільки глутаматні рецептори/канали, які підрозділяються на NMDA- та не-NMDA типи, є проникними тільки для катіонів.

Електрофізіологічні дослідження на м'язових волокнах сарани засвідчують наявність подібних двох типів іонних каналів, які при використанні глутамату спричиняють кожную деполяризацію (опосередковану при N-рецепторах) волокон (Т. Рік, 1985; Н. Shinozaki, 1988). Під час експериментів на кишковопорожнинних, зокрема, на абдомінальних м'язових гангліях молюсків *Aplisia californica*, було продемонстровано вплив глутамату на нейрони та встановлено, що цей вплив зумовлюють три різні шляхи: чітко виражена гіперполяризація, що супроводжується транспортуванням іонів Cl<sup>-</sup>, сильна деполяризація, причиною якої є провідність Na<sup>+</sup>, та менша гіперполяризація у відповідь на провідність K<sup>+</sup>, що, очевидно, служить ланкою зв'язку при G-білковому з'єднанні рецептора. Подібні результати йонної відповіді були зареєстровані при дослідженнях на нейронах *Aplisia* з використанням ГАМК (М. Hollman et al., 1989; Н. Luddens, W. Wisden, 1991). Отже, іонотропні ГАМК- та глутаматні рецептори у хребетних розміщені переважно в межах центральної нервової системи, тоді як у безхребетних ці рецептори/канали наявні в обидвох "типах" нервової системи та периферійній – у комах.

Вчені Дарлісон та Рош, продовжуючи вивчати цейнапрямок, надавали перевагу експериментам з відомим опором в комах класу циклодинів інсектицидів, які містять диелдрин, ендрин та гептахлор-епоксид (R.H. French-Constant, R.T. Roush, 1991; G.M. Darlison, 1992). Складники були запропоновані при вивченні дії ГАМК-рецептора, який є блокатором хлорних каналів. У комах опір до циклодієнів з'являвся на початку мутації поодинокого гена. Явище це спостерігали і на інших об'єктах, наприклад, фруктовій мусі, домашній мусі та м'ясна мусі.

З вищесказаного можливий досить незвичний висновок, який полягає у виявленні поліпептиду в молюсків та *Drosophila* (розміри якого 54 500 та 60 600 Да відповідно) схожого у послідовності та передбаченні вторинної структури до субодиниць ГАМК<sub>A</sub>-рецепторів у мозку хребетних тварин. Структурно, порядок Lymnaea більш схожий до  $\beta$ -субодиниці ГАМК<sub>A</sub>-рецепторів у хребетних (49–52 % схожості), ніж до якихось інших лігандних воріт хлорних каналів.

## **10.5. Іонна проникність мембран та генерування потенціалів дії при збудливих та гальмівних синаптичних процесах у нейронах безхребетних**

У класичній серії досліджень Фетта і Катца (P. Fatt, B. Katz, 1951; 1953) на нервово-м'язових синапсах

жаби та краба вивчали роль іонної проникності при синаптичному передаванні. Вчені виявили, що струми, пов'язані зі збуджуючими та гальмівними синаптичними впливами, генеруються в постсинаптичній клітині завдяки змінам мембранної провідності. Пізніше Екклс, Фетт та Кумс (Дж. Экклс, 1971; 1959; J. Coombs et al., 1955) довели справедливість цих принципів для центральних нейронів. Відомо, що у м'язових та нервових клітинах іонні канали контролюються рецепторами, що знаходяться на зовнішній поверхні постсинаптичної мембрани. Активування різних рецепторів призводить до виникнення збуджуючих та гальмівних постсинаптичних потенціалів (Э. Кэндел, 1980). Синаптичні потенціали можуть супроводжуватися збільшенням або зменшенням іонної проникності. Збуджуючі постсинаптичні потенціали зумовлюють деполяризацію та збудження завдяки тому, що взаємодія медіатора з рецептором призводить до різкого збільшення  $g_{Na}$ , а інколи і  $g_K$ . Оскільки  $g_{Na}$  і  $g_K$  зростають одночасно, потенціал інверсії для збудження становить  $-10$  мВ (який є приблизно середнім між натрієвим  $+55$  мВ і калієвим  $-75$  мВ) (Э. Кэндел, 1980).

Дія гальмівних постсинаптичних потенціалів спричинена тим, що вони заважають МП зони генерування підійти до порога виникнення імпульсів. Такий ефект досягається за рахунок збільшення мембранної провідності та гіперполяризації мембрани (Э. Кэндел, 1980). В пре- та постсинаптичній зоні гальмівний аксон виділяє один і той самий медіатор – гама-аміномасляну кислоту, яка зумовлює збільшення проникності для аніонів  $Cl^-$  (A. Takeuchi,

N. Takeuchi, 1966). У синаптичних закінченнях збуджуючого аксона збільшення  $g_{Cl}$  знижує амплітуду пресинаптичних імпульсів; одночасно вхід аніонів  $Cl^-$  нейтралізує частину позитивних зарядів, які переносять катіони  $Na^+$ , чим дещо зменшує деполяризацію і, можливо, знижує кількість вхідних іонів  $Ca^{2+}$  (Э. Кэндел, 1980). Пресинаптичне гальмування виявлено також у нейронах центральної нервової системи ссавців, де воно пов'язане з деполяризацією пресинаптичних закінчень, які зменшують амплітуду ПД (Дж. Экклс, 1966). Унаслідок взаємодії медіатора з рецептором різко збільшується проникність мембрани для катіонів  $K^+$  чи для аніонів  $Cl^-$  (Э. Кэндел, 1980; Дж. Экклс, 1966; A. Takeuchi, N. Takeuchi, 1966).

Отже, встановлено, що для епітеліально-м'язових клітин ектодерми гідри характерна електрична активність у вигляді періодичного генерування потенціалів дії, яке відбувається за принципом “все або нічого”.

## 10.6. Дослідження електричних показників гідри

Прісноводна гідра належить до типу Hydrozoa, ряду Hydrida, роду Hydra, виду *Hydra oligactis* Pallas. Гідра є зручним об'єктом для проведення біологічних досліджень на клітинному рівні. Так, розміри клітин, особливості поведінки та морфологічні характеристики гідри, а також можливість культивувати організм у лабораторних умовах, дають змогу

виконувати дослідження, використовуючи метод відведення мембранного потенціалу спокою та електричної активності від клітин за допомогою скляних мікроелектродів (М.Д. Бересткина и др., 1987; А.В. Иванов и др., 1981; И.И. Канаев, 1952; А.Н. Липин, 1950; Э. Хадора, З.Венер 1989; E.M. Jonson, 1984; A.N. Spenser, W.E. Schwab, 1980).

Для досліджень гідру відбирають з природних водойм із проточною водою та культивують при температурі середовища +18–20 °С. Окремо відбирають дорослих особин без стадії брунькування віком до семи днів, яких використовують у експериментах. За допомогою пастерівської піпетки поміщають одну особину у чашки Петрі з оргскла (об'єм 7 см<sup>3</sup>), де є інкубаційне середовище. Для адаптації та ліпшого прикріплення гідри до дна чашки поміщають об'єкт за добу до експерименту. Світловий режим підтримують за допомогою люмінесцентних ламп. Аерацію середовища забезпечують шляхом сполучення поверхні чашки з об'ємом акваріума, який підлягає інтенсивному постачанню повітря. Висока чутливість гідри до забруднень середовища, а саме: здатність до накопичення важких металів, її морфологічні та фізіологічні показники дають можливість стежити за змінами, що відбуваються під впливом факторів хімічного навантаження, порівняно з нормальним фізіологічним станом об'єкта досліджень, за яким проводять контроль згідно з літературними даними (М.Д. Бересткина и др., 1987; И.И. Канаев, 1952).

Відомо, що нервова система гідри має вигляд нервової сітки, розгалуженої по всьому організму тварини (O. Koizumi,

H. Bode, 1991; O. Koizumi et al., 1990). Нервова сітка гідри стійкої структури продукує та втрачає нейрони, які безперервно утворюються в стовпчику тіла та сконцентровані у відділі шлунка (M. Sakaguchi et al., 1996). На сьогоднішній день невідомо, чи можливі синаптичні контакти між нервовими клітинами гідри та якого вони типу. Однак, відповідно до даних П'єробона та співав. (P. Pierobon et al., 1995) у мембранній фракції гомогенату клітин *Hydra vulgaris* при хімічному стимулюванні виявлено ГАМК-рецептори .

### **10.7. Внутрішньоклітинне відведення мембранного потенціалу спокою та електричної активності епітеліально – м'язових клітин ектодерми гідри**

Мікроелектрод вколюють у клітини ектодерми гідри у ділянці підошви під бінокулярним мікроскопом.

Вимірювали МПС і електричну активність клітин ектодерми за допомогою установки, схему якої зображено на рис. 10.1. Установку розміщують у заземленій камері (1). Для уникнення механічних вібрацій металевий столик мікроскопа (2) закріплюють до нижньої частини камери. Чашку Петрі місткістю 8 мл та діаметром 40 мм використовують для експериментальної камери (3) з культуральним середовищем – розчином Гольтфретера (4).

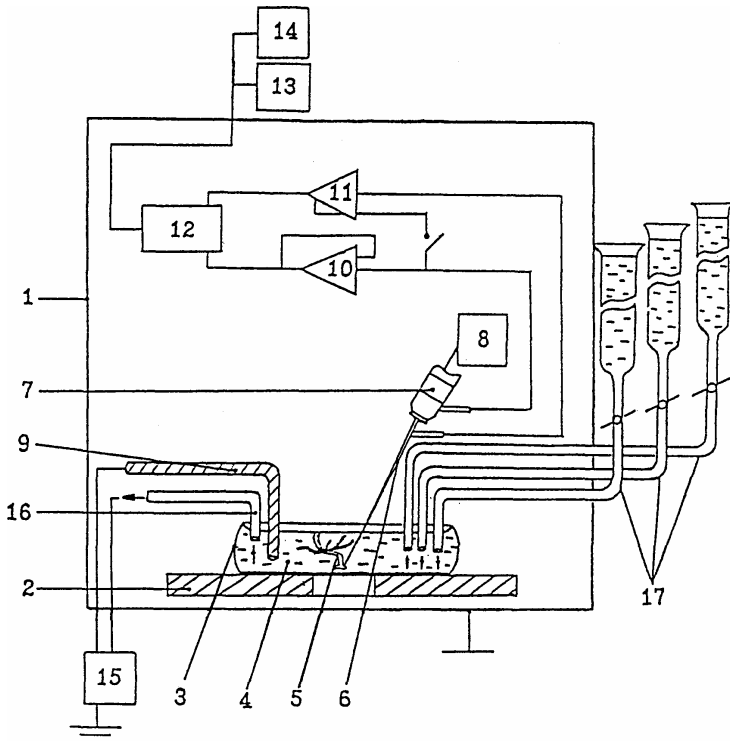


Рис. 10.1. Схема установки для дослідження електричної активності клітин гідри:

1 – заземлена камера; 2 – столик мікроскопа; 3 – експериментальна камера; 4 – культуральне середовище; 5 – об’єкт досліджень; 6 – мікроелектрод; 7 – тримач; 8 – мікроманіпулятор; 9 – порівняльний електрод; 10, 11 – мікроелектродні підсилювачі; 12 – підсилювач-перетворювач; 13 – осцилограф С1-83; 14 – потенціометр із самописцем; 15 – перистальтична помпа; 16 – трубка перистальтичної помпи; 17 – колонки з досліджуваними середовищами

Прикріплення об’єкта досліджень (5) підшоною до дна експериментальної камери дає змогу вводити мікроелектрод (6). Мікроелектрод являє собою мікропіпетку з скла “Пірекс” (діаметр кінчика 0,5 мкм), яку наповнюють 3М КСІ через фільтрувальну насадку (діаметр пор 0,2 мкм). Опір мікроелектрода становить  $10 \pm 2$  МОм.

Закріплюють мікроелектрод у тримачі (7) мікроманіпулятора (8) з пристроєм для переміщення мікроелектрода у трьох взаємоперпендикулярних площинах, завдяки чому з'являється змога підводити мікроелектрод з максимальною точністю до клітин підошви гідри.

Як індиферентний електрод (9) використовують скляний капіляр з агаровим містком, один кінець якого поміщають у розчин експериментальної камери, а від іншого відводять трубку у колбу з 3 М розчином КС1, де поміщений порівняльний електрод від рН-метра, заповнений насиченим розчином КС1.

Мікроелектроди з'єднують відповідно до точок електричної схеми за допомогою хлор-срібного містка. Для підсилення досліджуваних мембранних потенціалів засто-совують підсилювачі (10, 11, 2), зібрані на базі інтегральних мікросхем К 544 УДІА за принциповими схемами (И. Магура, 1981; Р. Первис, 1983). Контролюють генерування ПЕА та зміни величини МП за допомогою осцилографа С1-83 (13). Реєструють результати експериментів на стрічках самописного потенціометра КСП-4 (14), або інших носіїв інформації.

Протоку культурального середовища під час дослідів забезпечують зі швидкістю 0,5 мл/хв за допомогою перистальтичної помпи НП-1М (15), відвідну трубку (16) якої поміщають в експериментальну камеру. Культуральне та досліджуване середовища поміщають у колонки (17) місткістю 100 мл і діаметром 30 мм. Виходи трубок від колонок також поміщають у експериментальну камеру.



## **10.8. Електронно– мікроскопічне дослідження клітин гідри**

Електронно-мікроскопічні дослідження проводять за допомогою електронного трансмісійного мікроскопа ПЕМ-100. Фіксують зразки для електронно-мікроскопічних досліджень за загальноприйнятими методиками (J.H. Luft, 1961; E.S. Reynolds, 1963). Зрізи готують на ультрамікротомі УМТП-6 за допомогою алмазного ножа; контрастують солями свинцю за методикою Рейнольдса (E.S. Reynolds, 1963).

## **10.9. Електрична активність клітин ектодерми Hydra oligactis P. у нормі**

Досліджуючи епітеліально-м'язові та нервові клітини представників класу Hydrozoa методом внутрішньоклітинного відведення за допомогою скляних мікроелектродів, виявили характерну складну електричну активність у вигляді ПД та ПЕА, які відображають їхній діяльний стан. Описано параметри спонтанної електричної активності клітин ектодерми прісноводної гідри в умовах нормального культурального середовища та доведено, що МПС клітин зазвичай становить  $-38 \pm 3,0$  мВ. Важливу роль у процесі електричної активності відіграють іонні механізми, які вивчені недостатньо. Тому доцільним стало виявлення механізмів генерування електричної активності клітин ектодерми прісноводної гідри

шляхом встановлення залежності параметрів клітин ектодерми за умови нормального культурального середовища.

Для чіткого контролю та уникнення виходу мікроелектрода з клітини ектодерми *Hydra oligactis*, що траплялось при скоротливих рухах тулуба та щупалець гідри, точку для внутрішньоклітинного відведення МП обирають близькою до підшови. Оскільки на параметри електричної активності клітин гідри впливають такі показники, як розміри організму, фаза харчового циклу та ін. (R.D. Campbell et al., 1976; A.N. Spenser, W.E. Schwab, 1980) для стабільних записів електричної активності відбирають особини з подібними характеристиками (И.И. Канаев, 1952). Під час введення мікроелектрода в клітину МПС становив  $-27 \pm 5$  мВ, а через 5–10 хв стабілізувався на показнику від  $-38$  до  $-40$  мВ, який залежав залежності від ступеня пошкодження плазматичної мембрани клітини ектодерми при введенні мікроелектрода. Контрольними показниками вважають величину МПС від  $-35$  до  $-40$  мВ.

З'ясовано, що специфічна електрична активність виникає при скороченні епітеліально-м'язових клітин ектодерми гідри і полягає у періодичному виникненні спонтанних короткотривалих деполяризацій (відносно величини потенціалу спокою), які мають ритмічну динаміку.

Виявлено, що під час ПЕА (рис. 10.2) при значеннях МП вищих, ніж  $-38$  мВ відбувалася деполяризація мембрани (рис. 10.2, А), а при нижчих – така деполяризація не виникала (рис. 10.2, Б).

Потенціал спокою клітин ектодерми гідри становить у середньому  $-37$  мВ ( $n = 9$ ). Перед початком пачки спайків

деполяризувалася мембрана в межах 2–3 мВ протягом 5 с. Пауза між сусідніми пачками триває  $150 \pm 0,3$  с. Тривалість окремої пачки становить 25–30 с.

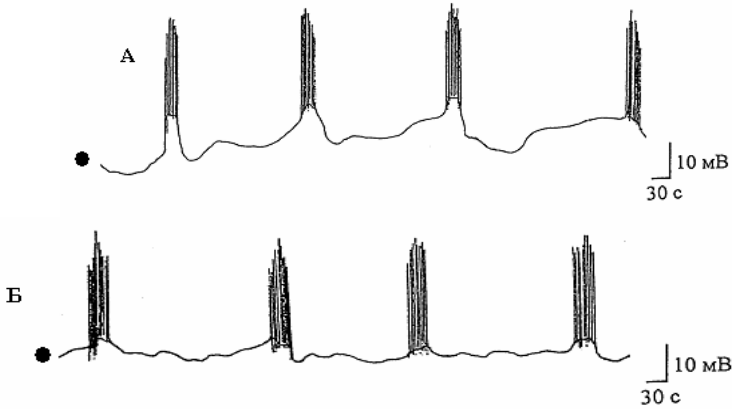


Рис. 10.2. Типи електричної активності клітин ектодерми гідри:

А – величина потенціалу спокою -40 мВ;

Б – величина потенціалу спокою -25 мВ.

Примітка. Крапками відмічено середнє значення потенціалу спокою для кожного із записів

Останній ПД у пачці закінчується невеликою гіперполяризацією (на 3–5 мВ) мембрани відносно величини ПС, яка переходить у повільну деполяризацію протягом міжпачкового інтервалу. Період спокою між пачками імпульсів становить  $100 \pm 5$  с ( $n=15$ ). Серії складаються переважно з 7–10 спайків (рис. 10.3–10.4).

Незначна кількість електричної активності мала вигляд поодиноких ПД. Отже, при ПД, яким передує повільна деполяризація (при значеннях МП вищих, ніж  $-38 \pm 0,3$  мВ) можна припустити, що така деполяризація відображає активність пейсмекерної клітини, а коли ж повільної деполяризації немає,

або вона мало помітна (при значеннях МП нижчих, ніж  $-38 \pm 0,3$  мВ), то це означає, що мікроелектрод знаходиться в пейсмерній клітині, до якої збудження надходить від пейсмерної клітини, що генерує ПД з повільною пейсмерною деполяризацією.

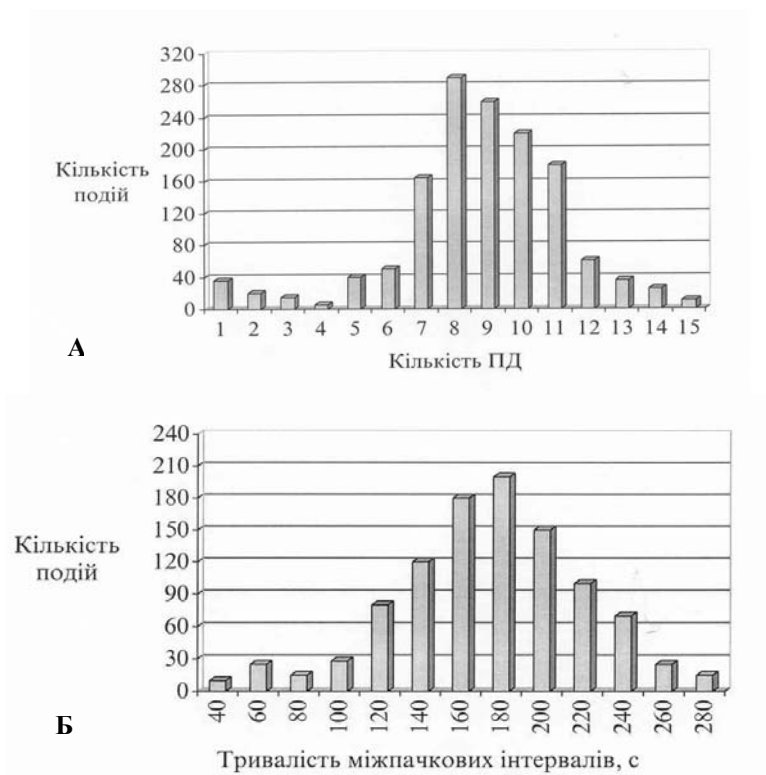


Рис. 10.3. Характеристика пачкової електричної активності клітин ектодерми гідри у нормі при статистичному обробленні даних ( $n = 15$ ):

А - кількість ПД у пачці (310 зареєстрованих пачок); Б - тривалість міжпачкових інтервалів ( $n = 200$ )

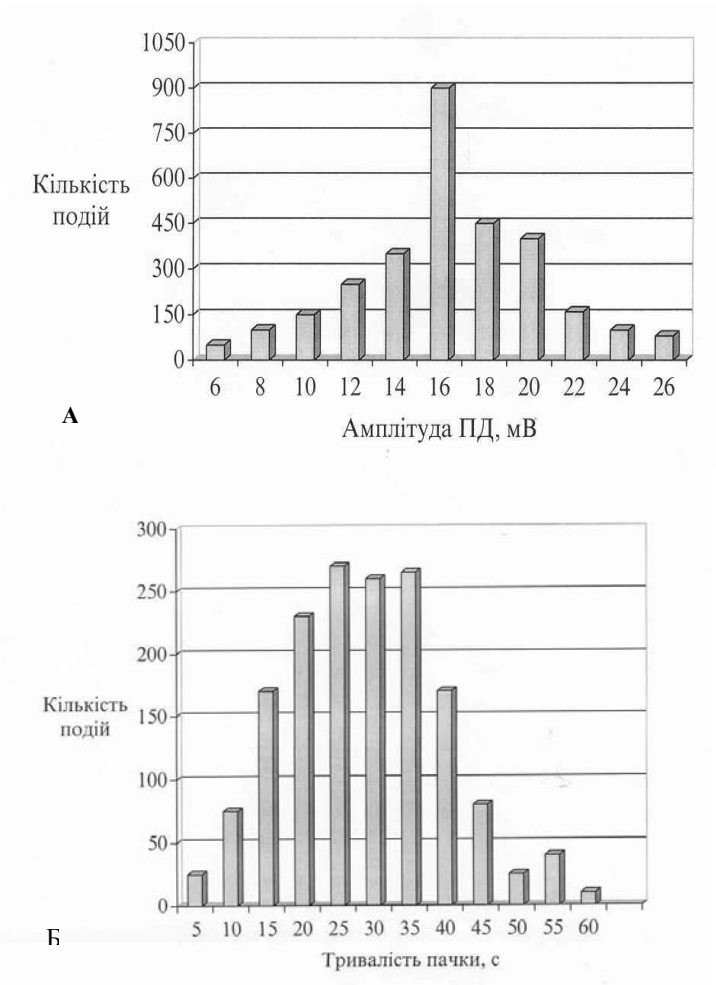


Рис. 10.4. Характеристика пачкової електричної активності клітин ектодерми гідри у нормі при статистичному обробленні даних (n = 15):

А – амплітуда ПД (900 спайків); Б – тривалість пачки (n = 280)

Аналіз спонтанної електричної активності клітин ектодерми прісноводної гідри за умов нормального культурального середовища засвідчив, що поздовжні скорочення епітеліально-м'язових клітин ектодерми *Hydra oligactis* мають

ступінчасту динаміку. За електричними параметрами це явище було охарактеризоване як спонтанно активована спайкова електрична активність (Р.В. Тизьо, 1998), яку також досліджують на ізольованих клітинах ектодерми *Hydra attenuata* Pallas (R.D. Campbell et al., 1976).

За проведеним аналізом змін параметрів ПЕА та порівнюючи їх з даними інших авторів (М. Клевець, 1987; Л. Страйер, 1985; Р. Тизьо та ін, 1988; М. Шуба, 1965; R. Stampfli, S. Nishie, 1956), де при різних концентраціях іонів Na, Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> використано специфічні блокатори йонних каналів цих катіонів, можна підтвердити висновок, що ПД клітин ектодерми генеруються за участю катіонів Na<sup>+</sup>; транспортування йонів Ca<sup>2+</sup> спричиняє опосередковану дію на параметри ПЕА; формування фази реполяризації ПД, а також слідова пачкова гіперполяризація пов'язані з активуванням K<sup>+</sup> каналів з клітини.

Відомо, що для клітин ектодерми кишковопорожнинних характерна епітеліальна електрична провідність, яка координується завдяки нервовим клітинам (J. Itayama, O. Sawada, 1995).

Використовуючи мікроелектродну техніку та метод петч-клемп встановили, що нервові клітини *Hydra attenuata*, яким властивий від'ємний мембранний потенціал спокою (M. Hassen et al., 1996), здатні спонтанно генерувати серії ПД (R. Campbell et al., 1976; O. Koizumi et al., 1990).

Оскільки дані про електричну активність нервових клітин ектодерми гідри фрагментарні, доцільно дослідити наявність ГАМК- та глутаматних рецепторів на клітинах ектодерми

прісноводної гідри і з'ясувати роль цих рецепторів у регулюванні ЕА клітин ектодерми *Hydra oligactis*.

### **10.10. Динаміка електричних параметрів клітин ектодерми прісноводної гідри при гії блокаторів гама – аміномасляної кислоти та глутаматних рецепторів**

У процесі вивчення динаміки розвитку дифузної нервової системи *Hydra actinia* (J.C. Kinnamon, J.A. Westfall, 1982) встановлено, що більшість нейронів зосереджена в ділянці шлунка та підшви (O. Koizumi et al., 1990), де вони постійно продукуються разом з безперервним поділом епітеліальних клітин. Схаллер та ін. (H.C. Schaller et al., 1996), вивчаючи розвиток нервових клітин гідри, виявили компоненти провідних шляхів цих клітин також у ділянці гіпостома та підшви. Особливості розвитку нервових клітин гіпостома досліджували за допомогою пептидів, які є активаторами голови та низькомолекулярних дієвих речовин – інгібіторів підшви. Оскільки у ссавців активатори морфогенезу голови продукуються біля нервових та нейроендокринних клітин, подібність процесів у нервовій системі гідри (J. Kinnamon, J. Westfall, 1982; O. Koizumi, H. Bode, 1991; O. Koizumi et al., 1990) та здатність нервових клітин відповідати на оточуючі сигнали (M. Ohashi et al., 1999; H. Schaller

et al., 1996) дає можливість припускати те, що ГАМК- та глутаматні рецептори наявні на клітинах ектодерми гідри. Метою наших дальших досліджень стало виявлення рецепторів на клітинах ектодерми прісноводної гідри мікроелектродним методом з використанням специфічних блокаторів.

Шляхом біохімічного аналізу гомогенату клітин *Hydra vulgaris* було доведено, що в досліджуваних клітинах наявні ГАМК-рецептори (M. Hassen et al., 1996). Автори зазначають, що вони чутливі до мусцімолу та бензодіазепінів і беруть участь у регулюванні харчової реакції. Також досліджено вплив нейростероїдів, загальних анестетиків та антагоністів ГАМК<sub>A</sub>-рецепторів (A. Concas et al., 1998; P. Pierobon et al., 1995). Такі нейростероїди, як тетрагідропрогестерон і тетрагідродезоксикортикостерон підвищували зв'язування [3H]-ГАМК з мембранами гідри. Ліганди діазепаму бензодіазепінового рецептора (100 мкмоль/л), клоназепаму (100 мкмоль/л) та абекарнілу (30 мкмоль/л) теж підвищували зв'язування [3H]-ГАМК з мембранами гідри. Цей ефект усувався під впливом флумазенілу, антагоніста бензодіазепіну (100 мкмоль/л). Навпаки, 4-хлордіазепам, ліганд периферійних бензодіазепінових рецепторів не впливав на зв'язування [3H]-ГАМК у мембранах гідри.

Загальні анестетики, пропофол та альфаксалон, подібно діяли (+38% та +30% відповідно) на зв'язування [3H]-ГАМК. Більше того, [3H]-ГАМК зв'язування в мембранах гідри повністю блокувалось антагоністом ГАМК<sub>A</sub>-рецепторів SR 95 531. Модуляція ГАМК<sub>A</sub>-рецепторів *in vitro* під впливом різних препаратів була пов'язана з їхньою дією на харчову реакцію гідри,



яку викликали глутатіоном у живих тварин. Тетрагідропрогестерон та тетрагідродезоксикортикостерон (від 1 до 10 мкмоль/л) впливали, залежно від дозування, тривалості відкриття ротового отвору, зумовленого глутатіоном (10 мкмоль/л) при максимальних впливах +33% та 29% відповідно. Альфаксалон (10 мкмоль/л) аналогічно (+33%) збільшував ефект глутатіону.

Ефекти стероїдів на харчову реакцію блокувались SR 95 531, залежно від дозування, *t*-бутилбіклофосфоротіонатом (1 мкмоль/л), специфічним блокатором хлорних каналів, але не бікукуліном.

Ці результати засвідчили, що модуляція ГАМК<sub>A</sub>-рецепторів стероїдами, яка є характерною для хребетних та безхребетних тварин, та фармакологічні властивості цих рецепторів збереглися в ході еволюції (A. Concas et al., 1998).

3-гідрокси-5-прегнан-20-один (тетрагідродезоксикортикостерон, THDOC) є найбільш потенційними та ефективними і позитивними алостеричними модуляторами центральних ГАМК<sub>A</sub>-рецепторів у ссавців. Діючи в особливо визначеному місці стероїда в рецепторному комплексі ГАМК<sub>A</sub>, ці складові підсилюють активність каналів (K.W. Gee, 1988; J.J. Lambert et al., 1995; N.C. Lan et al., 1991; S.M. Paul, R.H. Purdy, 1992; J.A. Peters et al., 1988). Низькі наномолярні концентрації цих нейростероїдів посилюють струми, спричинені ГАМК у нейронах, тоді як вищі концентрації прямо стимулюють Cl<sup>-</sup> -потоки (N.L. Harrison et al., 1987; M.D. Majewska et al., 1986; J.A. Peters et al., 1988). Усі ці ефекти подібні до таких ефектів, зумовлених за допомогою класичних позитивних алостеричних модуляторів ГАМК<sub>A</sub>-рецептора, як бензодіазепіни,

барбітурати та загальні анестетики, і є протилежними до ефектів, зумовлених антагоністами ГАМК (G.A. Cottrell et al., 1987; T.G. Hales, J.J. Lambert, 1991; R.L. Macdonald, R.W. Olsen, 1994; J.A. Peters et al., 1988).

Хоча численними дослідженнями доведено наявність ГАМК-рецепторів у нервовій системі хребетних та безхребетних, а також у бактерій, чутливість цих рецепторів до стероїдних анестетиків з'являлась у процесі еволюції (D. Beelli et al., 1996; R. Chen et al., 1994; A. Hosie, D. Sattelle, 1996; G. Lunt, 1991; J. Schaeffer, A. Bergstrom, 1988). Отже, якщо стероїдна модуляція ГАМК<sub>A</sub>-рецепторів добре збереглася в процесі еволюції хребетних, ГАМК<sub>A</sub>-рецептори у безхребетних мають обмежену чутливість або нечутливість до статевих стероїдів (A.M. Hosie, D.B. Sattelle, 1996; A.E. Oliver et al., 1991; J.J. Rauh, 1993).

Досліджено також вплив нейростероїдів, загальних анестетиків, лігандів бензодіазепінового рецептора та ГАМК антагоністів, які є модуляторами ГАМКА-рецепторів у ссавців, на ГАМК-рецептори, наявні в мембранах клітин гідри. Більше того, було досліджено зв'язок між біохімічними впливами цих речовин на ГАМКА-рецептори гідри та модуляцію її харчових реакцій. Поведінкова реакція спричинена малою кількістю глутатіону (GSH) після того, як здобич було впіймано або за допомогою GSH, якщо здобичі не було, вважається простою та надійною моделлю для дослідження хеморецепції (H. Grundfest et al., 1955; M. Kim et al., 2000; W. Loomis, 1969).

Харчову реакцію вивчали за допомогою процедур, описаних Ленгофом (H.M. Lenhoff et al., 1983). Інкубаційний час

зв'язування [3Н]-ГАМК при температурі 4 °С стабілізувався через п'ять хвилин. Попередньо було з'ясовано (J.A. Westfall, D.R. Argast, 1982), що дослідження насиченості зв'язування [3Н]-ГАМК на заморожування-розморожування, а також на відмивання мембранних препаратів з гідри дали змогу виявити наявність лише однієї популяції місць зв'язування, що засвідчує низьку здатність ( $V_{max} = 4,75$  пМ/мг білка) та високу спорідненість ( $KD = 76$  пМ). Як і очікували, бікукулін (1–100 мкмоль/л) не дуже вплинув на зв'язування [3Н]-ГАМК у гомогенатах клітин гідри, але (залежно від дозування) мав інгібувальний вплив на зв'язування з мембран мозку щура (табл. 10.3).

Таблиця 10.3

Дія бікукуліну та SR 955 331 на зв'язування [3Н]-ГАМК у гомогенаті клітин *Hydra vulgaris*

Речовина	Концентрація (мкмоль/л)	Специфічне [3Н]-ГАМК	%
Бікукулін	1	97.2 ± 6.0	97
Бікукулін	10	91.3 ± 8.0	91
SR 955 331	1	27.8 ± 2.0	27
SR 955 331	10	2.0 ± 0.3	2

Щоб встановити особливості [3Н]-ГАМК зв'язування було досліджено впливи антагоніста SR 955 331 ГАМК<sub>A</sub>-рецептора, похідного ГАМК піридазинілу (M. Neauime et al., 1986). На противагу, бікукулін SR 955 331 (1-10 мкмоль/л) інгібував [3Н]-ГАМК зв'язування у гомогенаті клітин гідри, і з кори головного мозку щура, залежно від концентрації табл. 10.3).

Характеризуючи біохімічні особливості ГАМК-передавання в гідри, оцінювали вплив центральних та

периферійних лігандів бензодіазепінового рецептора (діазепам, клоназепам, абекарніл, 4-хлородіазепам) та загальних анестетиків (пропофол, альфаксалон) на  $[^3\text{H}]$ -ГАМК зв'язування з гомогенату клітин гідри. Діазепам (100 мкмоль/л), клоназепам (100 мкмоль/л), та бетакарболін, похідний абекарнілу (30 мкмоль/л) збільшував  $[^3\text{H}]$ -ГАМК зв'язування подібно (максимальний вплив +22, +20, +24 %, відповідно), тоді як збільшення, спричинені меншими дозами (3–10 мкмоль/л) названих препаратів, не досягли статистичної достовірності.

Більші концентрації цих препаратів не збільшували  $[^3\text{H}]$ -ГАМК зв'язування. Вплив діазепаму, клоназепаму та абекарнілу був антагонізований флумазенілом (100 мкмоль/л) центрального бензодіазепінового рецептора (табл. 10.4). Як встановлено попередньо (G. Biggio et al., 1990; M. Serra et al., 1992) діазепам, клоназепам та абекарніл також збільшили  $[^3\text{H}]$ -ГАМК зв'язування з мембранами клітин мозку щура. Навпаки, 4-хлородіазепам (3–30 мкмоль/л) не підтвердив  $[^3\text{H}]$ -ГАМК зв'язування ні з мембранами клітин гідри, ні з мембранами нейронів щура.

Таблиця 10.4

Дія лігандів бензодіазепінового рецептора за наявності антагоніста флумазенілу (100 мкмоль/л) на зв'язування  $[^3\text{H}]$ -ГАМК у гомогенаті клітин гідри *Hydra vulgaris*

Речовина	Концентрація (мкмоль/л)	$[^3\text{H}]$ -ГАМК зв'язування (%)	
		Речовина	Флумазеніл + Речовина
Діазепам	100	124,2 ± 4.0	106,0 ± 3.0
Клоназепам	100	21,0 ± 5.0	102,0 ± 4.0
Абекарніл	30	126,0 ± 6.0	98,0 ± 7.0

Більш виразне збільшення в [3Н]-ГАМК зв'язуванні з мембранами гідри спостерігали за наявності загальних анестетиків. Пропофол (100 пМ) та синтетичний стероїд, похідний альфаксалону (10 пМ), збільшили зв'язування на 38 та 30 % відповідно. Ці препарати також збільшували [3Н]-ГАМК зв'язування з мембранами кори головного мозку щура (A. Concas et al., 1991; N. Harrison et al., 1987).

Отже, кишковопорожнинні, особливо представники роду *Hydra*, мають найпростішу та, ймовірно, еволюційно найстарішу нервову систему серед тварин. У гідри нервова система організована як нервова мережа, що пронизує тіло тварини, із підвищеною концентрацією нейронів біля гіпостома та підшови (J.A. Westfall, 1996). Нейропептиди, катехоламіни та ацетилхолін були виявлені в цих тварин (M. Calberg, 1992; P. Castano, S. Rossi, 1978; G. Kass-Simon, L. Passano, 1978; A. Spenser, 1989), але їхні біологічні функції вивчені набагато менше в гідри, ніж у гідроїдних поліпів та медуз (A.N. Spenser, 1989). Завдяки роботам деяких авторів (S. Bellis et al., 1991; G. Venturini, A. Carolei, 1992) з'явилася нова інформація про фізіологічну роль цих нейротрансмітерів. Доведено, що ГАМК збільшує тривалість харчової реакції у *Hydra vulgaris*, а вплив ГАМК опосередкований популяцією ГАМК-рецепторів при впливах бензодіазепінів (P. Pierobon et al., 1995). Більше того, біохімічні дослідження засвідчили участь ГАМК у пейсмерних координаційних системах гідри (A. Pannacione et al., 1996). Висновки, зроблені цими авторами, про те, що ГАМК-рецептори *Hydra vulgaris* потенційно модулюються нейростероїдами, дають можливість переконалися, що ця фармакологічна

властивість є давньою, і, що ці рецептори збереглися впродовж еволюції.

Вивчали вплив бікукуліну – блокатора ГАМК-рецепторів – на зміни електричної активності клітин гідри, початково фіксуючи контрольні серії пачкової електричної активності ( $n = 7$ ), коли МПС становив  $-35,7 \pm 2$  мВ, амплітуда ПД  $19,4 \pm 0,5$  мВ, кількість ПД у середньому становила 7 в пачці, а тривалість пачки – 80 мс, міжпачковий інтервал тривав  $140 \pm 0,3$ с.

Як виявилось, дія на клітини гідри зовнішнім розчином, в якому наявний бікукулін у концентрації 5 мкмоль/л, призводила до значних змін спонтанної електричної активності (рис. 10.5). Протягом 10 хв від початку дії бікукуліну спостерігали деполаризацію мембрани: від  $-39 \pm 0,2$  до  $-32 \pm 0,4$  мВ. Амплітуда ПД зростала від  $18,8 \pm 0,3$  до  $28 \pm 0,2$  мВ. Далі настав розлад пачкової активності та відбувалося генерування, переважно, поодиноких ПД. Увагу привертає брак фази спокою між пачками ПД, яка становила у контролі  $140 \pm 0,3$  с, що може бути наслідком усунення гальмівної дії ГАМК-рецепторів на генерування ПД з частотою 7 за хвилину.

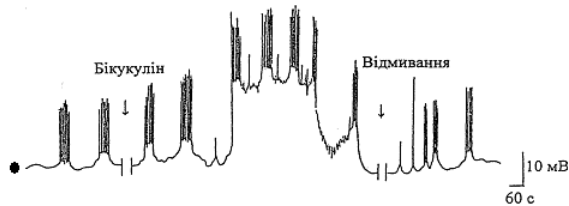


Рис. 10.5. Зміна пачкової електричної активності клітин ектодерми гідри під впливом бікукуліну (5 мкмоль/л).

Примітка. Точкою позначено величину потенціалу спокою ( $-39$  мВ). Стрілки вказують на час дії блокатора

Дія бікукуліну в концентрації 10 мкмоль/л спричинювала розлад ПЕА та збільшувала амплітуду ПД (рис. 10.6). Простежувалася деполяризація мембрани: від  $-37 \pm 0,2$  до  $-25 \pm 0,4$  мВ, амплітуда ПД становила від  $19,5 \pm 0,2$  до  $35 \pm 0,3$  мВ.

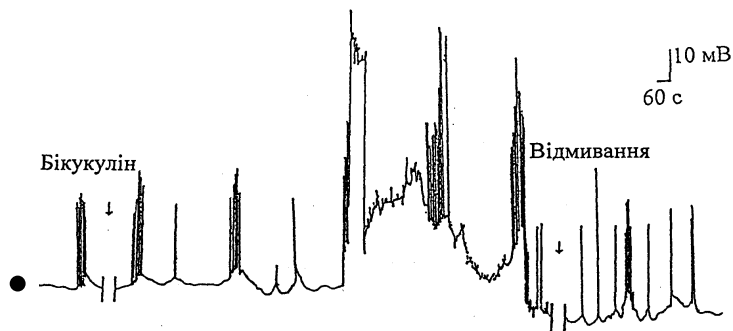


Рис. 10.6. Зміна пачкової електричної активності клітин ектодерми гідри під впливом бікукуліну (10 мкмоль/л).

Примітка. Точкою позначено величину потенціалу спокою ( $-38$  мВ). Стрілки вказують на час дії блокатора

Слід відзначити, що при дії бікукуліну зростала рухова активність гідри. Такий ефект дії бікукуліну вдавалось усунути шляхом його відмивання протягом 35 хв. Через 20 хвилин після початку відмивання бікукуліну спостерігали відновлення ПЕА, кількість ПД у пачках водночас зменшувалася, порівняно з контролем. Через 30–35 хв повністю відновлювалося ПЕА.

Характерні зміни параметрів ПЕА при дії бікукуліну спостерігали в концентрації 15 мкмоль/л (рис. 10.7). Через 5 хв від початку впливу бікукуліну нами відмічено значне зростання амплітуди ПД від  $19,1 \pm 0,2$  до  $39 \pm 0,3$  мВ та брак міжпачкового інтервалу. Нормальна пачкова електрична активність клітин з'являлася через 30–35 хв після відмивання.

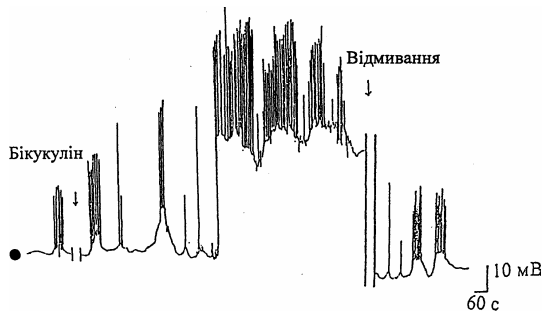


Рис. 10.7. Зміна пачкової електричної активності клітин ектодерми гідри під впливом бікукуліну (15 мкмоль/л).

Примітка. Точкою позначено величину потенціалу спокою (-39 мВ). Стрілки вказують на час дії блокатора

Оскільки аплікація бікукуліну спричиняє розлад ПЕА та збільшує амплітуду ПД, можна стверджувати про наявність ГАМК-рецепторів, які відповідають за процеси гальмування електричної активності, на зовнішній поверхні плазматичної мембрани клітин ектодерми прісноводної гідри.

Іншою серією досліджень стала зміна електричної активності клітин ектодерми гідри при дії конкурентних антагоністів глутаматних рецепторів. Відомо, що NMDA- та не-NMDA-рецептори співіснують на постсинаптичній мембрані нейронів спинного мозку та гіпокампа хребетних тварин (В. Edmonds et al., 1995; С. Hammond, 1996; С. McVain, М. Mayer, 1994). Оскільки відомості про наявність таких рецепторів у нервовій системі кишковопорожнинних фрагментарні, метою чергової серії наших досліджень було виявлення глутаматних рецепторів на плазматичній мембрані клітин ектодерми *Hydra oligactis* Pallas з використанням їхніх специфічних блокаторів.

Доведено, що селективні йонотропні глутаматні AMPA-рецептори складаються з чотирьох близькоспоріднених



субодиниць: від GluR-1 до GluR-4 (або від GluR-A до GluR-D) (С. Hammond, 1996). Чотири передбачені поліпептидні порядки, кожен приблизно довжиною 900 амінокислот, засвідчили майже 70 % схожість (підрозділи GluR-1 та GluR-2) і 73 % (GluR-2 та GluR-3). Ці субодиниці, виражені *in vitro*, є більш споріднені до AMPA та менш споріднені до типу каїнатного рецептора глутаматних воріт іонних каналів. За даними досліджень гібридизації *in situ* доведено, що ці субодиниці достатньо та по-різному виражені в мозку вищих тварин. Хоча ці різні субодиниці GluR здатні формувати гомомеричні канали, коли вони виражені в ооцитах *Xenopus* або у культивованих клітинах ссавців, вважають, що канали формуються *in vivo* різними комбінаціями субодиниць. Отже, з чотирма підрозділами рецептора вже є дуже велика кількість комбінацій потенціалу, навіть якщо ще не відомо точної стехіометрії зв'язків (природних угруповань) субодиниць.

Відповідь струму на глутаматне використання гомомеричних GluR каналів, виражених у трансфектованих клітинах, вивчають у внутрішньоклітинному середовищі, яке містить катіони  $\text{Na}^+$  та  $\text{Ca}^{2+}$ . У клітинах, які виражають лише GluR-2 субодиницю, струм, спричинений глутаматом, наявний у натрієвому розчині, але його майже немає у кальцієвому розчині. Цей гомомеричний канал має низьке відношення дво- або одновалентної проникності. Більше того, зв'язок гетеромеричного GluR-2(R)+GluR-3 субодиниць формує непроникні олігомеричні канали катіонів  $\text{Ca}^{2+}$  в ооцитах. Ситуація інша в разі браку субодиниць GluR-2(R), оскільки гомомеричні GluR-1 і GluR-2, або гетеромеричні GluR-1 + GluR-3 канали відкриті для катіонів  $\text{Ca}^{2+}$ . Тому наявність позитивно зарядженого ланцюга однієї

амінокислоти (R) буде визначати відношення дво- або одновалентної проникності і, отже, GluR-2(R) домінуватиме над особливостями входу йона через гетеромеричний канал GluR (С. Hammond, 1996).

NMDA-рецептори є проникні для одновалентних іонів та катіонів  $\text{Ca}^{2+}$ : вони блокуються катіонами  $\text{Mg}^{2+}$  при потенціалі спокою, залежного від струму. Канали NMDA-рецепторів активуються кількома агоністами, з яких NMDA є найбільш ефективним. Вони формують катіон-селективні канали з високою проникністю катіонів  $\text{Ca}^{2+}$ , з винятковою чутливістю до катіонів  $\text{Mg}^{2+}$  і залежністю від струму, а їхня діяльність модулюється гліцином.

Для виявлення глутаматних рецепторів *in vivo* у клітинах прісноводної гідри, ми використали специфічні блокатори NMDA-рецепторів – DI-APV у концентраціях 5, 10 та 15 мкмоль/л та блокатор АМРА-рецепторів – CNQX у концентраціях 5, 10 та 15 мкмоль/л.

Дія CNQX у концентрації 5 мкмоль/л веде до поступового припинення генерування пачкової електричної активності (рис. 10.8).

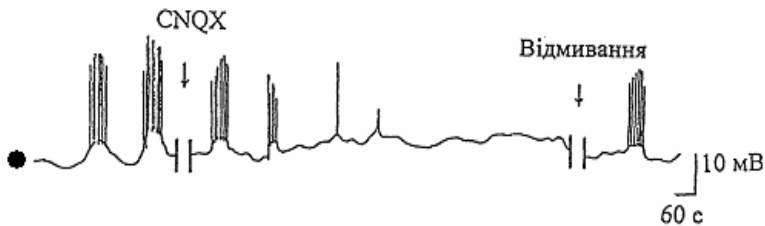


Рис. 10.8. Зміни ПЕА клітин гідри під дією CNQX (5 мкмоль/л).

Примітка. Точкою позначено величину потенціалу спокою (-39 мВ). Стрілки вказують на час дії блокатора

Разом з тим МПС не зазнавав істотних змін. Повільні коливання МПС, які у контролі супроводжують ПЕА, також не простежувалися у разі дії концентрації CNQX. Однак спостерігали поодинокі ПД, амплітуда яких становила  $9,2 \pm 0,4$  мВ. Відновлення ПЕА з контрольними параметрами відбувалося через 25 хв від початку відмивання. CNQX у концентрації 10 мкмоль/л спричиняє зворотне блокування генерування потенціалів дії повністю (рис. 10.9). Під час дії блокатора на клітини гідри рухова активність об'єкта досліджень суттєво не змінювалася. Пачкова електрична активність відновлювалася через 20 хв. Під час відмивання зменшувалася кількість ПД: від 7 до 4,1.

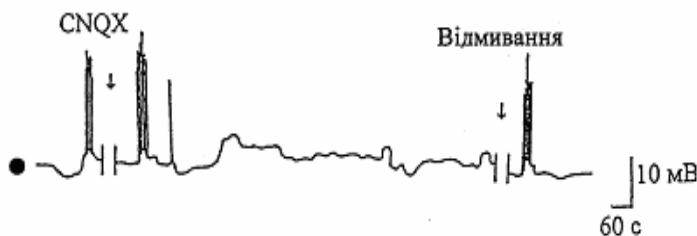


Рис. 10.9. Зміни ПЕА клітин гідри під дією CNQX (10 мкмоль/л).

Примітка. Точкою позначено величину потенціалу спокою (-41 мВ).

Стрілки вказують на час дії блокатора

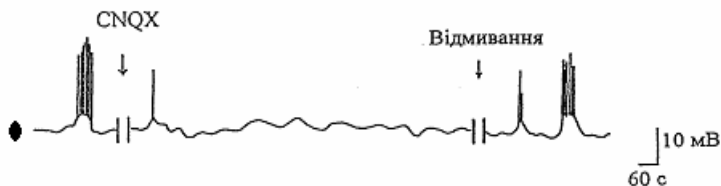


Рис. 10.10. Зміни ПЕА клітин гідри під дією CNQX (15 мкмоль/л).

Примітка. Точкою позначено величину потенціалу спокою (-45 мВ).

Стрілки вказують на час дії блокатора

Зі збільшенням концентрації CNQX до 15 мкмоль/л ми спостерігали через 2 хв після введення розчину миттєве зникнення пачкової електричної активності (рис. 10.10). Дія блокатора тривала 5 хв. Генерування ПД з'явилося через 30 хв після відмивання.

Отже, блокування ПЕА під дією CNQX дає змогу зробити припущення про наявність функціональних глутаматних рецепторів у системі, що генерує збудження епітеліально-м'язових клітин гідри. Повне припинення генерування ПД під впливом CNQX свідчить про те, що активування AMPA-рецепторів на клітинах гідри є необхідною умовою виникнення та проведення збудження між епітеліально-м'язовими клітинами гідри.

Дія D1-APV у концентрації 5 та 10 мкмоль/л спричиняла блокування генерування ПД частково (рис. 10.11), однак спостерігали серію поодиноких ПД, амплітуда яких становила  $16 \pm 0,3$  мВ. Відновлення нормальної пачкової електричної активності після початку відмивання відбувалося протягом 20 хв.

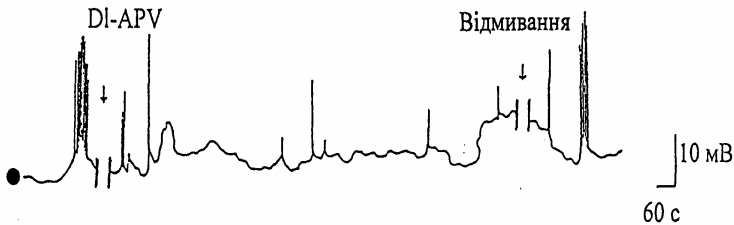


Рис. 10.11. Зміни ПЕА клітин гідри під впливом D1-APV (10 мкмоль/л).

Примітка. Точкою позначено величину потенціалу спокою (-39 мВ). Стрілки вказують на час дії блокатора

Вплив D1-APV у концентрації 15 мкмоль/л, а також спільна дія з блокатором AMPA-рецепторів CNQX призводить до повного

блокування генерування потенціалів дії з дальшим відновленням після відмивання.

Отже, проведені нами дослідження дають можливість стверджувати про наявність глутаматних рецепторів на рухових нейронах клітин *Hydra oligactis* Pallas L., вважаючи, що АМРА- та NMDA-рецептори гідри беруть участь у процесах збудження.

### **10.11. Електронно – мікроскопічне дослідження нервово – м'язових синапсів прісноводної гідри**

Для цього фіксують зразки клітин гідри в 1,5 % розчині глутарового альдегіду приготовленому в 0,2 М розчині кокадилату  $\text{Na}^+$  (рН=7,2) протягом 2 год при температурі 4 °С. Післяфіксацію проводять в 2 % розчині  $\text{OsO}_4$  на цьому ж буфері протягом 2 год. Зразки обезводнюють у зростаючих концентраціях етилового спирту і поміщають в епоксидну смолу Епон – 812 (J.H. Luft, 1961). Зрізи готують на ультрамікротомі УМТП-6 за допомогою алмазного ножа; контрастували солями свинцю за Рейнольдсом (E.S. Reynolds, 1963). При перегляді та фотографуванні зразків вдалося отримати зображення синаптичного контакту між закінченням нервової клітини та епітеліально-м'язовими клітинами (рис. 10.12).

Припускаємо, що ГАМК- та глутаматні рецептори можуть бути розміщені на постсинаптичній мембрані епітеліальних клітин гідри, підставою є біохімічні та морфологічні докази наявності

синаптичних контактів між нервовими клітинами гідри (A. Jane et al., 1997; J. Westfall, 1996) і між нервовими та епітеліально-м'язовими клітинами (Anderson P.A. 1985), про що свідчать виконані нами електронно-мікроскопічні дослідження (рис. 10.12).

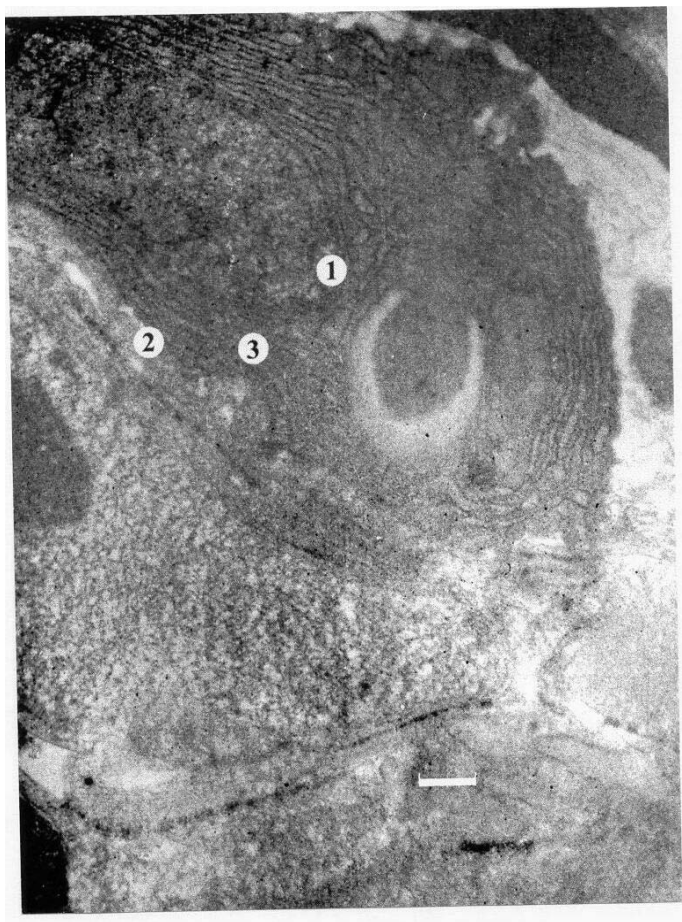


Рис. 10.12. Синаптичний контакт між нервовою та епітеліально-м'язовою клітинами гідри: 1 – епітеліально-м'язова клітина; 2 – нервова клітина; 3 – синаптичний контакт.

Примітка. Біла лінія рівна шкалі 2,17 мкм

## **10.12. Дослідження впливу катіонів магнію, свинцю та ртуті на електричну активність клітин ектодерми зігри**

Клітини ектодерми прісноводної гідри контактують безпосередньо з зовнішнім середовищем. Відомо, що через ці клітини формується реакція організму на зміни хімічного складу середовища (M.S. Christian, G.E. Lightkep, 1982). Спостереження за морфологічними змінами гідри під впливом токсикантів засвідчили, що наявність мінімальних домішок солей перехідних металів у культуральному середовищі спричиняє їхнє нагромадження клітинами організму (М.Д. Бересткина и др., 1987; R.V. Hune et al., 1992). Катіони дво- та тривалентних металів специфічно впливають на потенціалзалежні йонні канали та на механізм електрогенного транспортування плазматичних мембран різних типів клітин (Х. Зигель, 1982).

Для гідробіонтів одним з найважливіших наслідків зміни проникності плазматичної мембрани є порушення осморегулювання. Катіони свинцю, ртуті, алюмінію та інші речовини призводять до порушення процесів оксигенації у клітинах гідробіонтів та активного мембранного транспортування. До таких порушень відносять зниження активності  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -помпи. Для підтримання рівноваги калію та натрію у клітині морські організми виділяють надлишок  $\text{Na}^+$ , а прісноводні – воду, поглинаючи катіони натрію. Якщо осмотичність внутрішнього середовища підвищується, то це відбувається за рахунок

збільшення концентрації сечовини та амінокислот (B. Schmidt-Nielsen, 1974). Порушення  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -проникності та порушення роботи йонної помпи відносять до основних шляхів токсичної дії ртуті та деяких інших металів (F. Strumwasser, 1967).

Речовини, які зумовлюють порушення проникності плазматичних мембран та роботи натрій-калієвої помпи, спричиняють набряк клітинних структур та тканини загалом (О.Ф. Филенко, 1988). Такі метали, як свинець та цинк осідають у вигляді гранул в різних тканинах гідробіонтів, що позначається на змінах структурних елементів клітини.

Літературні дані щодо особливості поведінки гідроїдів для дослідження впливу катіонів перехідних металів на процеси індикації забруднень водного середовища є епізодичні. Однак Косевичем (И.А. Косевич, 1992), в дослідженнях на *Obelia loveni* було доведено вплив катіонів міді та цинку на чутливість організму. Протягом 30–60 хв після внесення катіонів міді (50–200 мкг/л) у середовище з об'єктом спостерігали зменшення приросту верхівки на одну пульсацію, а інколи навіть до повного зупинення росту. Після припинення впливу міді відновлювалися ростові пульсації. У разі більш високих концентрацій міді відновлення не відбувалося. При дії катіонів цинку, концентрації яких були на порядок вищі, спостерігали за змінами параметрів ростових пульсацій верхівок у колоніях гідроїдів (И.А. Косевич, 1992).

Іншими вченими (M. Hassel, S. Berking, 1990; 1988), котрі працювали з *Hydra vulgaris*, було доведено, що катіони літію у високих концентраціях спричиняють порушення диференціації клітин під час розмноження та росту досліджуваного організму.



Токсичний вплив хімічних елементів на організм визначають за механізмом дії на концентрацію та активність енергетичних субстратів у клітинах, які беруть участь у формуванні йонного градієнта (Х. Зигель, 1982) та механізмом впливу на проникність клітинних мембран (Н.С. Строганов, О.П. Данильченко, 1983).

Відомо, що йони  $Mg^{2+}$  у живих системах відіграють важливу регуляторну функцію, є антагоністами катіонів  $Ca^{2+}$ , активаторами низки ферментативних систем і одночасно їхніми інгібіторами, є активатором ацетилхолінестерази (Р.А. Andereson, 1985), тому важливим стало вивчення впливу магнію, що дасть можливість більш реально оцінити механізми, які лежать в основі електричної активності клітин гідри.

Так, залежно від діючої концентрації, катіони зумовлюють зниження частоти виникнення пачкової електричної активності, зменшення загальної їхньої кількості, а також амплітуди потенціалів дії. Такі ефекти пов'язані з відомою властивістю катіонів лужноземельних металів блокувати йонну провідність натрієвих і деяких типів кальцієвих каналів збудливих клітин (Р. Тизьо, О. Гойда, 1996; R. Tyzio, O. Goida 1996).

Під час дії катіонів магнію в концентрації 1,6 мкмоль/л спостерігали слабку гіперполяризацію мембрани (від  $-37,0 \pm 0,5$  до  $-42,1 \pm 0,3$  мВ) та збільшення амплітуди ПД на 50 % (рис. 10.13), порівняно з контролем. Тривалість міжпачкового інтервалу збільшувалася від 150 до 210 с. Разом з тим кількість ПД у пачці та тривалість пачки зменшувалися на 50 %.

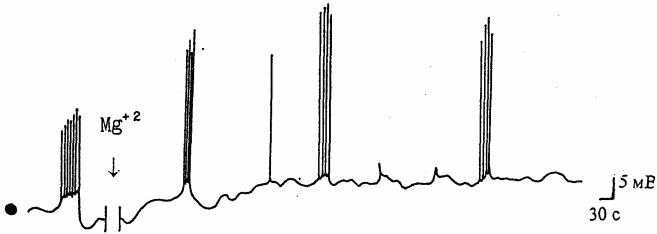


Рис. 10.13. Зміна пачкової електричної активності клітин ектодерми гідри при дії катіонів  $Mg^{2+}$  (1,6 мкмоль/л).

Примітка. Точкою позначено величину потенціалу спокою ( $-37$  мВ). Стрілки вказують на час дії катіонів  $Mg^{2+}$ .

У разі заміни культурального розчину на середовище з концентрацією катіонів  $Mg^{2+}$  2,5 мкмоль/л депресивний стан генерування електричної активності тривав 25–30 хв. Протягом цього періоду гіперполяризація мембрани зростала від  $-40,3 \pm 0,4$  до  $-51,7 \pm 0,3$  мВ. Збільшувалася амплітуда ПД на 100 %, порівняно з контролем, та зростала тривалість міжпачкового інтервалу (від 160 до 320 с). Кількість ПД у пачці та тривалість пачки зменшувалися на 65 % (рис. 10.14).

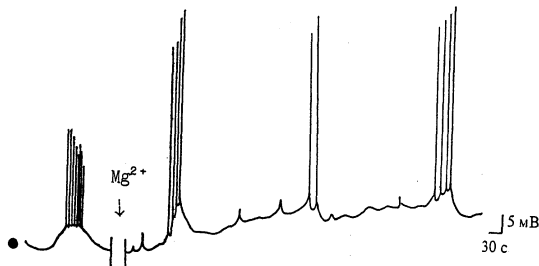


Рис. 10.14. Зміна пачкової електричної активності клітин ектодерми гідри при дії катіонів  $Mg^{2+}$  (2,5 мкмоль/л).

Примітка. Точкою позначено величину потенціалу спокою ( $-37$  мВ). Стрілки вказують на час дії катіонів  $Mg^{2+}$ .

Отже, йони  $Mg^{2+}$ , блокуючи вхід катіонів  $Ca^{2+}$  в пресинаптичних нервових закінченнях, пригнічують виділення медіаторів ГАМК та глутамату і цим самим впливають на характер спонтанної активності. Результати свідчать про те, що йони  $Mg^{2+}$  є антагоністами катіонів кальцію, ще раз підтверджуючи, що йони  $Ca^{2+}$  беруть опосередковану участь у генеруванні ПЕА клітин ектодерми гідри.

Давно відомо, що свинець змінює йонну проникність мембран та блокує активність транспортних систем (В. Venugopal, Т. Luckey, 1978). Крім того, зв'язуючись з карбоксильними, фосфатними та сульфгідрильними групами мембран, збільшує їхню жорсткість, одночасно блокуючи канали (М.А. Lessler, М.С. Walters, 1973). Особливо чутливі до негативних впливів свинцю нейрони центральної та периферійної нервової системи (Ю.А. Ершов, Т.В. Плетенева, 1989). Оскільки йони ртуті теж мають інгібувальний вплив та здатні утворювати стійкі комплекси з біологічно-важливими молекулами, наприклад, білками, інгібуючи їхню активність (Н.С. Mel, Т.А. Reed, 1981) та змінюючи  $Na^{+}$ -  $Ca^{2+}$ - обмін (В.В. Манько, 1998), важливо дослідити їхній вплив на зміну електричної активності клітин ектодерми гідри у різних концентраціях, що дасть можливість розширити знання про механізми збудливих процесів, які тут протікають.

Оскільки йони  $Pb^{2+}$  та  $Hg^{2+}$  мають дуже широкий спектр дії (Ю.А. Ершов, Т.В. Плетенева, 1989; В.В. Манько, 1998; М.А. Lessler, М.С. Walters, 1973; Н.С. Mel, Т.А. Reed, 1981; В. Venugopal, Т.Д. Luckey, 1978), в т. ч. вони можуть мати пригнічувальний вплив на рецепторну функцію різного типу об'єктів, справедливо

вияснити, чи цей вплив подібний до застосовуваних нами у роботі інгібувальних факторів.

Нами встановлено, що йони свинцю в концентрації 0,1 мкмоль/л спричиняють незначну деполяризацію мембрани (від  $-37,5 \pm 0,4$  до  $-35,3 \pm 0,8$  мВ), кількість ПД у пачках збільшувалася на 20 %, тривалість міжпачкового інтервалу зростала від 150 до 300 с, порівняно з контролем. Однак найбільш вираженим був ефект дії свинцю на амплітуду ПД, яка зменшувалася від  $19,4 \pm 0,7$  до  $7,3 \pm 1,4$  мВ (рис. 10.15).

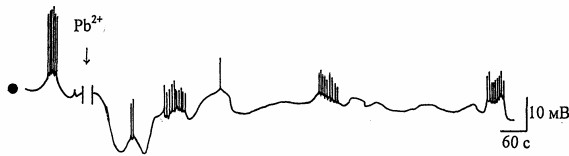


Рис. 10.15. Зміна пачкової електричної активності клітин ектодерми гідри при дії катіонів  $Pb^{2+}$  (0,1 мкмоль/л).

Примітка. Точкою позначено величину потенціалу спокою ( $-37$  мВ). Стрілки вказують на час дії катіонів  $Pb^{2+}$

Під впливом катіонів свинцю в концентрації 2,5 мкмоль/л спостерігали деполяризацію мембрани: від  $-38,3 \pm 0,5$  до  $-24,9 \pm 0,8$  мВ, кількість ПД у пачках зменшувалася на 10,5 %, тривалість міжпачкового інтервалу збільшувалась на 257 % і амплітуда ПД зменшувалася від 19,6 до 6,4 мВ, порівняно з контролем (рис. 10.16).

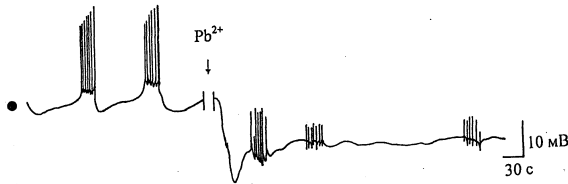


Рис. 10.16. Зміна пачкової електричної активності клітин ектодерми гідри при дії катіонів  $Pb^{2+}$  (2,5 мкмоль/л).

Примітка. Точкою позначено величину потенціалу спокою ( $-38$  мВ). Стрілки вказують на час дії катіонів  $Pb^{2+}$

Аплікація катіонів ртуті в концентрації 0,001 мкмоль/л спричиняла тривалий (15–25 хв) депресивний ефект у генеруванні електричної активності. Протягом цього періоду спостерігали стійку деполяризацію мембрани: від  $-37,7 \pm 0,4$  до  $-23,3 \pm 1,1$  мВ. Генерування ПД протягом цього періоду зменшувалося на 20 %. Ефект простежувався, коли концентрації становили від 0,1 мкмоль/л і вище. Деполяризація мембрани була від  $-38,1 \pm 0,5$  до  $-16,1 \pm 1,2$  мВ.

Кількість ПД у пачках зменшувалася на 50 %, а тривалість міжпачкового інтервалу – від 150 до 350 с, порівняно з контролем (рис. 10.17).



Рис. 10.17. Зміна пачкової електричної активності клітин ектодерми гідри при дії катіонів  $\text{Hg}^{2+}$  (0,1 мкмоль/л).

Примітка. Точкою позначено величину потенціалу спокою ( $-38$  мВ). Стрілки вказують на час дії катіонів  $\text{Hg}^{2+}$

Найбільш вираженими були зміни параметрів пачкової активності, які виникали при дії катіонів  $\text{Hg}^{2+}$  в концентрації 2,5 мкмоль/л. Спостерігали значну деполяризацію мембрани (від  $-38,0 \pm 0,4$  до  $-5,3 \pm 0,3$  мВ) та зменшення амплітуди ПД (від 22,5 до 7,0 мВ). Тривалість міжпачкового інтервалу зменшувалася на 70 %, порівняно з контролем. Несуттєво змінювалися такі параметри, як тривалість пачки (від 30 до 25 с) та кількість ПД у пачці (від 6 до 5)

(рис. 10.18). Зміни параметрів пачкової електричної активності клітин ектодерми гідри під дією катіонів  $Mg^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  та  $Pb^{2+}$  узагальнено в таблиці 10.4.

Ефекти впливу  $Pb^{2+}$  та  $Hg^{2+}$  можуть бути пояснені здатністю катіонів цих металів частково або повністю блокувати провідність кальцієвих і натрієвих іонних каналів плазматичної мембрани клітин ектодерми, що беруть участь у генеруванні ПД. Водночас простежується чітка залежність ефекту від концентрацій катіонів у розчині.

Отже, результати наших досліджень засвідчують інгібувальний характер впливу катіонів свинцю та ртуті на перебіг спонтанної електричної активності клітин ектодерми гідри. Дія катіонів магнію на електричну активність клітин ектодерми *Hydra oligactis* дає змогу переконатися у блокуванні нервово-м'язового передавання контакту, коли епітеліально-м'язові клітини, очевидно, не збуджуються нервовими клітинами, що відповідають за поширення збудження епітеліальними клітинами.

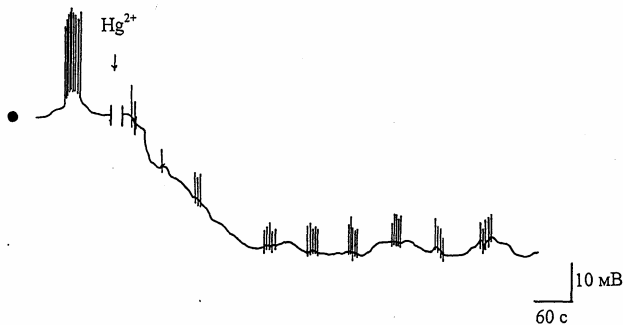


Рис. 10.18. Зміна пачкової електричної активності клітин ектодерми гідри при дії катіонів  $Hg^{2+}$  (2,5 мкмоль/л).

Примітка. Точкою позначено величину потенціалу спокою ( $-38$  мВ). Стрілки вказують на час дії катіонів  $Hg^{2+}$

Таблиця 10.5

Зміни параметрів пачкової електричної активності клітин ектодерми гідри під дією катіонів  $Mg^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  та  $Pb^{2+}$  ( $M \pm m$ )

Умови	Мембранний потенціал, мВ	Амплітуда потенціалу дії, мВ	Кількість потенціалів дії у пачці	Тривалість пачки, с	Тривалість міжпачкового інтервалу, с
Контроль	-37,5 ± 0,4	21,4 ± 0,9	6,0 ± 2	30 ± 0,5	150 ± 0,3
1,6 мкМ $Mg^{2+}$	-42,1 ± 0,3*	34,8 ± 0,8*	4,0 ± 2 *	20 ± 0,4	210 ± 0,3
2,5 мкМ $Mg^{2+}$	-51,7 ± 0,3*	45,1 ± 0,4*	4,0 ± 1 *	25 ± 0,5	320 ± 0,8
0,001 мкМ $Hg^{2+}$	-23,3 ± 1,1 *	14,8 ± 0,5 *	5,0 ± 1 *	15 ± 0,2	230 ± 0,2
0,1 мкМ $Hg^{2+}$	-16,1 ± 1,2 ▼	6,5 ± 0,5 *	3,0 ± 2 ▼	10 ± 0,4 ▼	360 ± 0,2 ▼
2,5 мкМ $Hg^{2+}$	-5,3 ± 0,3 *	7,0 ± 2,0 *	5,0 ± 1 *	25 ± 0,4	55 ± 0,3 *
0,1 мкМ $Pb^{2+}$	-35,3 ± 0,8 *	7,3 ± 1,4 ▼	8,0 ± 1 *	50 ± 0,7 *	300 ± 0,4
2,5 мкМ $Pb^{2+}$	-24,9 ± 0,8 *	6,4 ± 1,4 ▼	7,0 ± 2 *	25 ± 0,3	210 ± 0,7

Примітки: \* – достовірність змін щодо контролю з  $p < 0,05$ ;

▼ – достовірність змін щодо контролю з  $p < 0,01$ ;

\* – достовірність змін щодо контролю з  $p < 0,001$

Отже, наші результати узгоджуються з даними літератури (Х. Зигель, 1982; О. Филенко, 1988; А. Spenser, W. Schwab, 1980), згідно з якими катіони ртуті та свинцю блокують спонтанну електричну активність епітеліально-м'язових клітин колоніального гідроїдного поліпа *Coelophora* і викликають токсичне ушкодження при використанні їх у високих концентраціях, а дія катіонів магнію викликає блокування синаптичної передачі у гідроїдів (Е.Е. Ball, J.E. Case, 1973; А.Н. Spenser, W.E. Schwab, 1980). В результаті наших досліджень встановлено концентрації даних катіонів у культуральному середовищі, що призводять до незворотних змін, тобто викликають втрату рухової здатності і пошкодження клітин

ектодерми, крім цього показано, що вплив цих катіонів не є аналогічним до інгібіторів ГАМК- та глутаматних рецепторів (Тизьо Р.В. та ін., 1998; Тизьо Р.В. та ін., 1998; 1988).

### **10.13. Електрична активність клітин ектодерми гідри з позиції впливу різних факторів**

Відомо, що електрична активність епітеліально-м'язових клітин гідри має нейрогенне походження і генерується в результаті синаптичного збудження (H. Bode et al., 1990; S. Minobe et al., 1995; P. Nangia, S. Mookerjee, 1991; J. Westfall, D. Argast 1982). Електрична активність нейронів є початковою ланкою, що зумовлює вивільнення різних нейромедіаторів з рухових нервових закінчень, які синаптичним шляхом і викликають електричну та скорочувальну активність епітеліально-м'язових клітин. Однак наявність синаптичних контактів між цими клітинами була доведена лише за допомогою електронно-мікроскопічних та біохімічних досліджень (В.Л. Зима, 1999; В.Л. Зима, 1997; М.Ф. Шуба, 1999; 2000). З огляду на сказане і виникла необхідність дослідити наявності ГАМК та глутаматних рецепторів у мембрані епітеліально-м'язових клітин електрофізіологічними методами.

Під впливом бікукуліну електрична активність генерувалася не у вигляді періодичних серій ПД, а безперервно. Це свідчить про блокування гальмування, яке функціонує в



природних умовах і яке опосередковане активуванням ГАМК-рецепторів епітеліально-м'язових клітин.

У наших дослідженнях при дії на клітини гідри зовнішнім розчином, що містив бікукулін (5 мкмоль/л), відбувалися значні зміни спонтанної електричної активності клітин ектодерми гідри. Спостерігали деполяризацію мембрани від  $-39 \pm 0,2$  до  $-32 \pm 0,4$  мВ протягом 10 хв від початку аплікації бікукуліну. Амплітуда ПД зростала від  $18,8 \pm 0,3$  до  $28 \pm 0,2$  мВ, а далі – настав розлад пачкової активності та відбувалося генерування переважно поодиноких ПД.

У разі дії бікукуліну в концентрації 10 мкмоль/л амплітуда ПД змінювалася від  $19,5 \pm 0,2$  до  $35 \pm 0,3$  мВ та відбувалася деполяризація мембрани від  $-37 \pm 0,2$  до  $-25 \pm 0,4$  мВ. Необхідно зауважити, що при цій аплікації бікукуліну зростала рухова активність гідри. Такий ефект дії бікукуліну вдавалось усунути шляхом відмивання протягом 35 хв.

Характерні зміни параметрів ПЕА під час дії цього блокатора спостерігали в концентрації 15 мкмоль/л. Нами не було зафіксовано появу міжпачкового інтервалу та значного зростання амплітуди ПД від  $19,1 \pm 0,2$  до  $39 \pm 0,3$  мВ.

Отже, нами отримано електрофізіологічні докази наявності ГАМК<sub>A</sub>-рецепторів, очевидно, розміщених на постсинаптичній мембрані епітеліально-м'язових клітин гідри, що на підставі біохімічних досліджень було припущено Конкасом та співавт. (J.A. Westfall et al., 1991). Ми припускаємо, що ГАМК<sub>A</sub>-рецептори розміщені на рухових клітинах гідри, оскільки на сьогодні відомі також морфологічні докази наявності синаптичних контактів між

нервовими клітинами гідри (Г.Ф. Лакин, 1990; D.W. Towle et al., 1991), між нервовими та епітеліально-м'язовими клітинами (В.К. Рибальченко, 1970). Про це свідчать теж наші електронно-мікроскопічні дослідження.

Зокрема, нам вдалось отримати зображення синаптичного контакту між нервовою та епітеліально-м'язовою клітинами. Крім того, на світлинах нами зафіксовано велику кількість і-клітин (рис. 10.19), які є попередниками нервових клітин (М.Ф. Шуба, 1998; V.V. Mountcastle, R.J. Baldessarini, 1974).

Під впливом конкурентного антагоніста NMDA-рецепторів D1-APV (5 та 10 мкмоль/л) спостерігали часткове блокування генерування ПД та поодинокі ПД амплітудою  $16 \pm 0,3$  мВ.

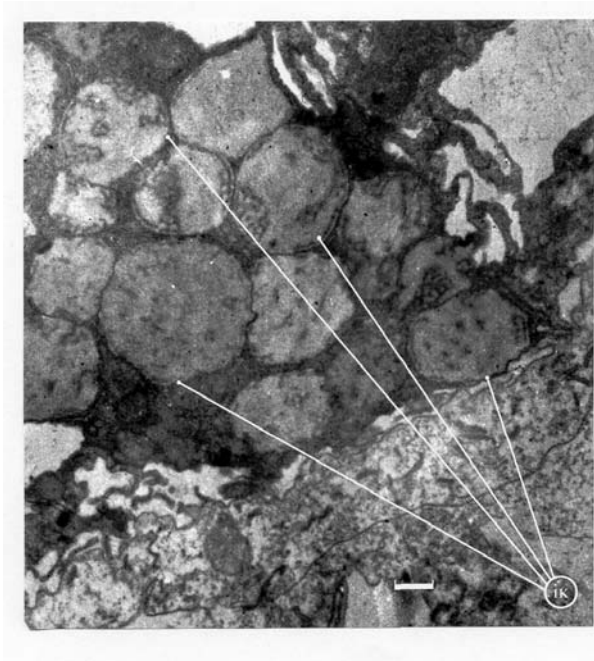


Рис. 10.19. Скупчення інтерстиціальних клітин (біла лінія рівна шкалі 2,17 мкм).

Під впливом D1-APV при концентрації 15 мкмоль/л нами відмічено припинення генерування ПД, яке тривало протягом всього часу аплікації антагоніста. Це свідчить про участь NMDA-рецепторів у регулюванні пачкової електричної активності клітин гідри.

Отже, крім ГАМК-рецепторів ми припускаємо наявність у клітинах гідри NMDA-рецепторів, які у ЦНС вищих тварин беруть участь у генеруванні збуджувальних синаптичних потенціалів, хоча нами не знайдено подібних відомостей у літературі.

Важливо, що більш виражений гальмівний ефект на ПЕА ми спостерігали під впливом конкурентного антагоніста AMPA-рецепторів CNQX. Після збільшення концентрації до 15 мкмоль/л ми спостерігали через 2 хв після введення розчину миттєве зникнення пачкової електричної активності.

Можемо констатувати, що в нервовій системі гідри наявні і збуджувальні, і гальмівні синаптичні механізми регулювання електричної активності епітеліально-м'язових клітин, які генеруються пейсмеркерними системами.

Нами одержано підтвердження наявності цих рецепторів у плазматичній мембрані нервових клітин гідри та з'ясовано їхню роль у регулюванні електричної активності епітеліально-м'язових клітин. Зміни електричної активності, що виникають у результаті впливу бікукуліну – конкурентного блокатора ГАМК-рецепторів та специфічних блокаторів глутаматних рецепторів – D1- APV і CNQX, логічно простежити від активування рецептора до ролі іонтранспортних систем плазматичної мембрани клітин ектодерми гідри, яку показано на узагальнюючій схемі (рис. 10.20). Під впливом бікукуліну електрична активність генерувалася не у вигляді періодичних серій ПД, а безперервно. Це можна пояснити

блокуванням гальмування, яке функціонує у природних умовах і опосередковане активування ГМК-рецепторів мембрани епітеліально-м'язових клітин.

На сьогоднішній день роль катіонів  $Mg^{2+}$ , які в живих системах відіграють регуляторну функцію і є антагоністами йонів  $Ca^{2+}$ , мало вивчена. Тому наступна серія досліджень присвячена вивченню впливу катіонів  $Mg^{2+}$ , що, на нашу думку, дає змогу зрозуміти механізми, які лежать в основі електричної активності клітин прісноводної гідри.

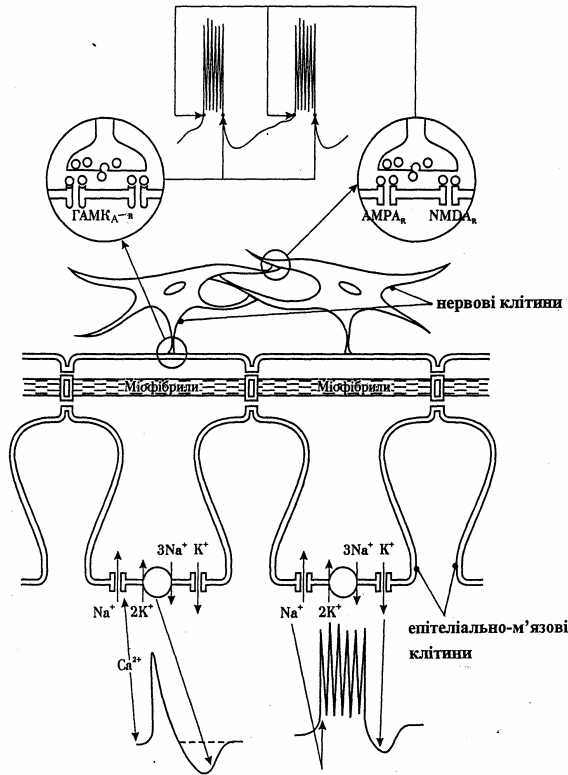


Рис. 10.20. Роль ГМК та глутаматних рецепторів і йонтранспортних систем у регулюванні електричної активності клітин ектодерми *Hydra oligactis* Pallas

Так, Едмондсом та групою авторів (В. Edmonds et al., 1995) була висунута гіпотеза про те, що щілина NMDA-рецепторів блокується йонами  $Mg^{2+}$ , які наявні в синаптичній щілині ЦНС вищих тварин. Тому глутамат, який є нейротрансмітером у більшості синапсів ЦНС хребетних, активує не-NMDA-рецептори. Іншими дослідниками (С. Hammond, 1996) встановлено, що стимулювання пресинаптичних нейронів гіпокампа, у разі браку катіонів  $Mg^{2+}$ , спричиняє постсинаптичну деполяризацію, що є результатом синаптичного входного струму та пов'язана з перехрещенням NMDA- та не-NMDA-каналів.

Оскільки канали NMDA-рецепторів є проникними для одновалентних іонів та катіонів  $Ca^{2+}$  і блокуються катіонами  $Mg^{2+}$  при струмі наближеному до потенціалу спокою (С. Hammond, 1996), нас зацікавило, якою ж буде дія катіонів магнію у зовнішньоклітинному розчині на клітини ектодерми *Hydra oligactis*. Отже, при дії катіонів магнію у концентрації 1,6 мкмоль/л ми спостерігали незначну гіперполяризацію мембрани (від  $-38,4 \pm 2,0$  до  $-42,1 \pm 2,1$  мВ) та збільшення амплітуди ПД на 50 %, порівняно з контролем (рис. 10.21 і 10.22).

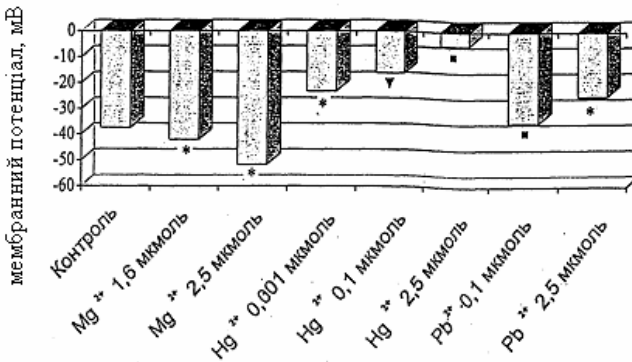


Рис. 10.21. Вплив катіонів  $Mg^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  та  $Pb^{2+}$  у різних концентраціях на величину мембранного потенціалу (мВ) клітин ектодерми гідри.

Примітка. достовірність змін щодо контролю:

\* -  $p < 0,05$ ; - з  $p < 0,01$ ; \* - з  $p < 0,001$

У разі збільшення концентрації катіонів  $Mg^{2+}$  до 2,5 мкмоль/л гіперполяризація зростала від  $-39,3 \pm 0,4$  до  $-51,7 \pm 0,8$  мВ, амплітуда ПД збільшувалася на 100 %, порівняно з контролем. Хоча, залежно від діючої концентрації, ці катіони знижують частоту виникнення ПЕА, зменшення їхньої загальної кількості та амплітуди потенціалів дії.

Ми припускаємо, що такі ефекти пов'язані з відомою властивістю катіонів лужноземельних металів блокувати йонну провідність натрієвих та деяких типів кальцієвих каналів збудливих клітин, що узгоджується з деякими даними літератури (Р. Тизьо, О. Гойда, 1996; R. Tyzio, O. Goida, 1996).

Отримані результати свідчать про те, що катіони магнію є антагоністами катіонів кальцію, а йони  $Ca^{2+}$  беруть опосередковану участь у генеруванні ПЕА клітин ектодерми гідри.

Відомо, що катіони свинцю змінюють проникність мембран, блокуючи активність транспортних систем (B. Venugopal, T. Luckey, 1978) та каналів (M.A. Lessler, M.S. Walters, 1973). Оскільки нейрони центральної та периферійної нервової системи вищих тварин особливо чутливі до негативного впливу катіонів свинцю (Ю.А. Ершов, Т.В. Плетенева, 1989), доцільним було з'ясувати вплив катіонів  $Pb^{2+}$  та подібність дії до впливу попередніх інгібувальних факторів на клітини ектодерми прісноводної гідри.

Амплітуда ПД зменшувалася від  $19,4 \pm 0,7$  до  $5,3 \pm 1,4$  мВ (рис. 10.22). Зі збільшенням концентрації до 2,5 мкмоль/л спостерігали деполяризацію мембрани від  $-39,3 \pm 2,5$  до  $-24,9 \pm 2,5$  мВ, кількість потенціалів дії зменшувалася в пачках на 19,5 % (рис. 10.21; рис. 10.25).

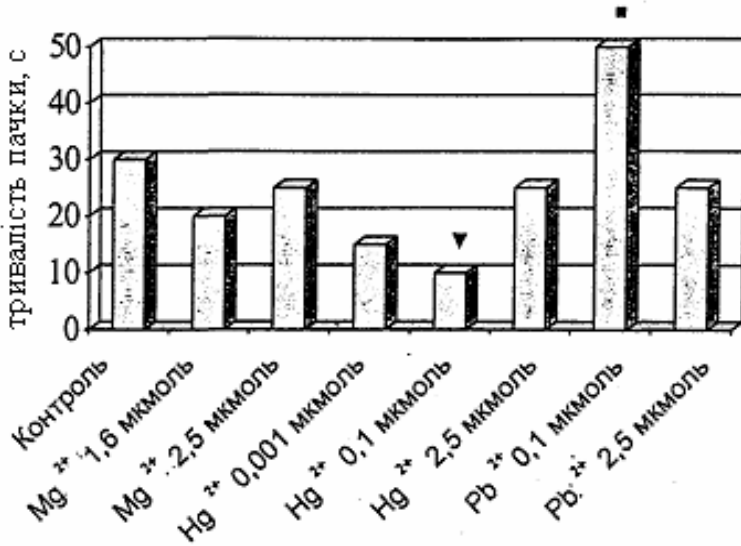


Рис. 10.22. Дія катіонів Mg<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup> та Pb<sup>2+</sup> у різних концентраціях на тривалість пачки (с) клітин ектодерми гідри.

Примітка. Позначення достовірності як на рис. 10.21

Встановлено, що катіони Pb<sup>2+</sup> у менших концентраціях (0,1 мкмоль/л) спричиняють незначну деполяризацію мембрани: від  $-37,5 \pm 0,5$  до  $-35,7 \pm 0,2$  мВ, тривалість міжпачкового інтервалу збільшувалася від 150 до 360 с (рис. 10.24).

Ураховуючи широкий спектр дії катіонів Pb<sup>2+</sup> (Ю.А. Ершов, Т.В. Плетенева, 1989; В.В. Манько, 1998; М.А. Lessler, М.С. Walters, 1973; Н.С. Mel, Т.А. Reed, 1981; В. Venugopal, Т.Д. Luckey, 1978), очевидним стає інгібувальний вплив на рецепторну функцію об'єкта досліджень. Зокрема, результати наших досліджень засвідчують інгібувальний характер впливу катіонів свинцю на перебіг спонтанної електричної активності клітин ектодерми гідри.

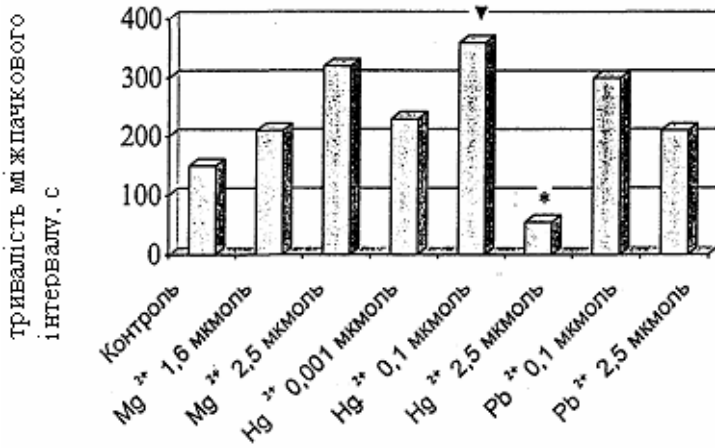


Рис. 10.23. Дія катіонів  $Mg^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  та  $Pb^{2+}$  у різних концентраціях на тривалість міжпачкового інтервалу (с) клітин ектодерми гідри.

Примітка. Позначення достовірності як на рис. 10.21

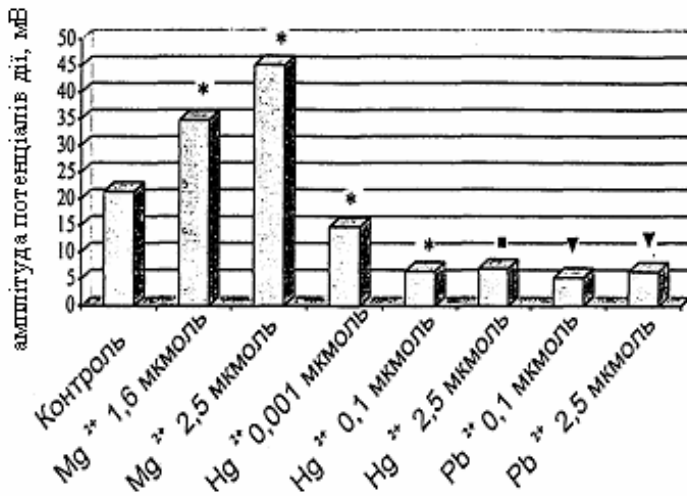


Рис. 10.24. Дія катіонів  $Mg^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  та  $Pb^{2+}$  у різних концентраціях на амплітуду потенціалів дії (мВ) клітин ектодерми гідри.

Примітка. Позначення достовірності як на рис. 10.21



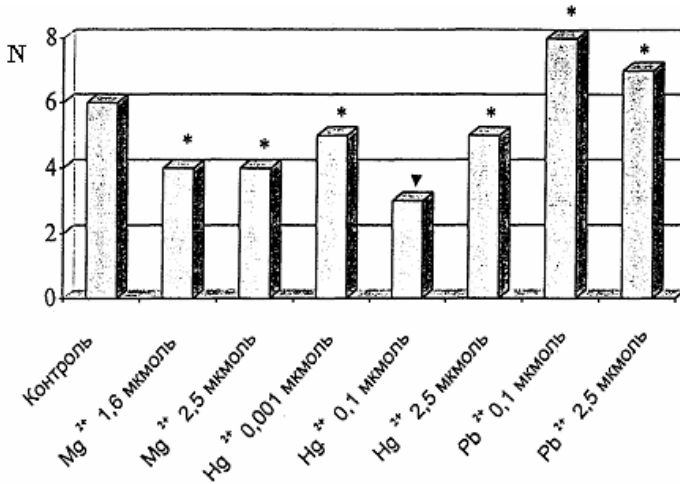


Рис. 10.25. Вплив катіонів  $Mg^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  та  $Pb^{2+}$  у різних концентраціях на параметри пачкової електричної активності клітин ектодерми гідри:

N – кількість потенціалів дії у пачці.

Примітка. Позначення достовірності як на рис. 10.21

Катіони  $Hg^{2+}$  також мають інгібувальний вплив на різні показники ЕПА клітин ектодерми гідри, очевидно, за рахунок здатності утворювати стійкі комплекси з такими біологічно важливими молекулами, як білки (В.В. Манько та ін., 2001) та змінюючи  $Na^+/Ca^{2+}$ -обмін (В.В. Манько, 1998).

Підсумовуючи усе сказане, можна виділити основні штрихи, на яких ми зупинялися в роботі.

1. Встановлено подібність у характері змін біоелектричних і фізико-хімічних показників ТПМ та активності  $Na^+, K^+$ -АТФ-ази за умов впливу різних концентрацій катіонів важких металів у ранньому ембріогенезі в'юна, тобто додозалежна деполяризація мембрани бластомерів супроводжується зниженням активності  $Na^+, K^+$ -АТФ-ази

мембран. Отже, поглиблено знання про механізм впливу важких металів на досліджуванні об'єкти, що підтверджено електронно- мікроскопічними дослідженнями бластомерів в'юна за цих умов, зокрема, виявлено значні ультраструктурні зміни їхніх органел. Доведено часову залежність між параметрами коливної динаміки ТМП та морфогенезом зародків в'юна, інкубованих за наявності катіонів важких металів, – амплітуда та частота коливань ТМП значно зменшується, відбувається сповільнення розвитку зародків. Морфогенетичним аналізом виявлено суттєві відставання в розвитку личинок в'юна та появу у них різних аномалій.

2. З'ясовано, що солі, які містять катіони  $Pb^{2+}$  та  $Hg^{2+}$ , інгібують спонтанну електричну активність клітин ектодерми гідри, а під дією катіонів  $Hg^{2+}$  відбувається гідрополяризація мембрани та збільшення амплітуди ПД. Вперше отримано електрофізіологічні докази наявності ГАМК та глутаматних рецепторів на плазматичній мембрані епітеліально-м'язових клітин ектодерми прісноводної гідри, з'ясовано їхню роль у регулюванні пачкової електронної активності клітин. Встановлено, що ГАМК- рецептори відповідають за процеси гальмування, а глутаматні – за процеси збереження досліджуваних клітин. Доведено подібність часових взаємозв'язків між динамікою біоелектричних, енергозабезпечувальних і мембранно-транспортних процесів у ранньому

ембріогенезі в'юна та шпорцевої жаби, що свідчить про універсальність наявних змін у холоднокровних. Отримано нові дані про принципи часового організування зародків холоднокровних.

3. Запропоновано новий підхід до моделювання змін МП на ранніх стадіях ембріогенезу в'юна, коли за допомогою диференціальних рівнянь можна описувати згасаючі власні коливання. Вперше запропоновано математичну модель процесів раннього ембріогенезу тварин, яка основана на новому класі динамічних моделей. За допомогою цієї моделі подано опис найбільш суттєвих процесів розвитку зародків в'юна на основі виявлених причинно-наслідкових залежностей між динамікою біоелектричних та метаболічних параметрів ембріональних об'єктів. А також узагальнено функціональні взаємодії між досліджуваними процесами на молекулярному та вищих рівнях організування біосистем з використанням тріадних структур.
4. Проаналізовано можливості комп'ютерного моделювання та числової оптимізації метаболічних процесів на прикладі біосинтезу флавінових коферментів у дріжджів.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Агаджанян Н.А., Шабатура Н.Н.* Биоритмы, спорт, здоровье. – М.: Физкультура и спорт, 1989. – 209 с.
2. *Адрианов В.К., Курелла Г.А., Литвин Ф.Ф.* О взаимосвязи потенциалов покоя и фотосинтеза. – В кн.: Физико-химические основы авторегуляции в клетках. – М.: Наука, 1968. – С. 200–206.
3. *Айзенштанд В.С., Баранов А.Ю.* Современные проблемы оогенеза. АН СССР, науч.совет. – М.: Наука, 1977. – 319 с.
4. *Антомонов Ю.Т.* Моделирование биологических систем. – Киев: Наук. думка, 1977. – 260 с.
5. *Антер М.* Кибернетика и развитие. – М.: Мир, 1970. – 215 с.
6. *Аршавский И.А.* Физиологические механизмы и закономерности индивидуального развития. – М.: Наука, 1979. – 186 с.
7. *Ахалкаци Р.Г., Тимофеева М.Я., Помойницкий В.Д., Кафиани К.А.* // Клеточное ядро и ультраструктура. – М.: Наука, 1970. – 376 с.
8. *Ашмарин И.П., Ключарев А.А.* Ингибиторы синтеза Белка. – Л.: Наука, 1975. – 280 с.

9. Ашофф Ю. Обзор биоритмов // Биологические ритмы: В 2 т. / Под ред. Ю. Ашоффа. – М.: Мир, 1984. – Т.1. – С. 12–21.
10. Баденкова С.В., Добродеев О.П., Сухова Т.Е. Распределение свинца в разрезе верховых торфяников как показатель нарастающего загрязнения атмосферы // Вестн. Москов. ун-та. География, 1982. – № 3. – С. 53–58.
11. Балабан Р.Б., Курант В.В., Столяр О.Б., Бродін С.В., Грубінко В.В. Вплив іонів важких металів на активність трансаміназ в організмі коропа // Біологія тварин, 2000. – Т. 2. – № 1. – С. 87–92.
12. Барабой В.А. Антиокислительная и биологическая активность мелатонина // Укр. биохим. ж-л, 2000. – Т. 72. – № 3. – С. 5–11.
13. Барский Е.Л., Саванина Я.В., Лебедева А.Ф. Действие различных тяжелых металлов на рост клеток *Pseudomonas diminuta* и образование металлсвязывающих белков // Вестн. Москов. ун-та. – Сер. 16. – Биология, 2000. – № 4. – С. 40–43.
14. Бекенблит М.Б., Глаголева Е.Г. Электричество в живых организмах. – М.: Наука, 1988. – 285 с.
15. Белоусов Л.В. Цитомеханический контроль морфогенеза // Цитология, 2000. – Т. 42. – № 1. – С. 84–91.
16. Беляева В.Н., Черфас Н.Б. О процессах созревания и оплодотворения в яйцеклетках вьюна // Вопр. ихтиологии, 1965. – № 5. – Вып. 1 (34). – С. 82–90.

17. Бересткина М.Д., Данильченко О.П., Тушмалова Н.А. *Hydra attenuata* в качестве тест-объекта при оценке загрязненности сточных и природных вод // Биоиндикация и биотестирование природных вод. – Л.: Гидрометеиздат, 1987. – Вып. 8. – С. 71–76.
18. Бериташвили Д.Р. Исследование динамики калия и натрия, аденозинтрифосфатаз и аденилатциклазы в раннем эмбриогенезе вьюна: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 1974. – 24 с.
19. 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 раннего эмбрионального развития. – М.: Наука, 1974. – С. 15–17.
20. Бериташвили Д.Р., Квавилашвили И.Ш., Кафиани К.А. Изменение отношения  $K^+/Na^+$  в зародышах вьюна на ранних стадиях развития // Цитология, 1969. – Т. 9. – № 5. – С. 574–581.
21. Бериташвили Д.Р., Квавилашвили И.Ш., Ротт Н.Н., Игнатьева Г.М. Накопление калия в развивающейся бластодерме форели // Онтогенез, 1970. – Т. 1. – № 6. – С. 628–630.
22. Бериташвили Д.Р., Кутателадзе Т.В., Маршани Д.О., Кафиани К.В. Аденозинтрифосфаты в эмбриональном развитии вьюна // Онтогенез, 1974. – Т. 5. – № 4. – С. 363–371.
23. Бериташвили Д.Р., Ротт Н.Н. Накопление калия в развивающейся бластодерме карпа // Онтогенез, 1973. – Т. 4. – № 4. – С. 424–426.

24. *Берталанфи Л.* Общая теория систем (краткий обзор). – В кн.: Исследования по общей теории систем. – М.: Прогресс, 1969. – С.23.
25. *Бессмертный А.Н., Гринь Н.В., Говорунова Н.Н.* Об обосновании предельно допустимой концентрации сульфата олова в атмосферном воздухе населенных мест // Гигиена и санитария, 1991. – № 9. – С. 62–64.
26. Биологические ритмы: В 2 т. / Под ред. Ю. Ашоффа. – М.: Мир, 1984. – Т. 2. – 262 с.
27. Биомониторинг исторического прошлого тяжёлых металлов в природных экосистемах / *А.В. Жулидов, А.Д. Покаржевский, А.А. Гусев* / Радиоэкология почвенных животных. – М., 1985. – С. 186–198.
28. Біофізика / *П.Г. Костюк, В.Л. Зима, І.С. Магура, М.С. Мірошниченко, М.Ф. Шуба.* – К.: Обереги, 2001. – 542 с.
29. *Богач П.Г., Клевець М.Ю., Рибальченко В.К.* Основы електрофізіології. – К.: Вища шк., 1984. – 231 с.
30. *Божкова В.П.* рН в раннем эмбриогенезе морских ежей // Цитология, 1991. – Т. 33. – № 11. – С. 153–159.
31. *Божкова В.П.* Динамика изменений мембранных характеристик в процессе дробления зародышей вьюна и аксолотля: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – М., 1971. – 27 с.
32. *Божкова В.П.* Роль клеточной поверхности в стимуляции размножения клеток // Онтогенез, 1986. – Т. 17. – № 5. – С. 453–469.

33. Божкова В.П., Квавилашвили И.Ш., Ротт Н.Н., Чайлахян Л.М. Исследование электрохимических свойств мембран развивающихся зародышей аксолотля и вьюна в период деления дроблений // Биофизика мембран: Материалы симпоз. – Каунас: Б. и., 1971. – С. 165–174.
34. Божкова В.П., Квавилашвили И.Ш., Чайлахян Л.М. Некоторые электрофизиологические характеристики дробящегося яйца аксолотля // Цитология, 1974. – Т. 16. – С. 590–596.
35. Божкова В.П., Ковалев С.А., Чайлахян Л.М., Шилинская Э.Н. Исследование электрической связи между клетками зародышей вьюна на ранних стадиях развития // Онтогенез, 1971. – Т. 2. – № 5. – С. 512–516.
36. Божкова В.П., Литинская Л.Я., Сидорова В.Ю. и др. Изменение внутриклеточного рН в клеточном цикле зародышей морских ежей в период делений дробления // Онтогенез, 1987. – Т. 18. – № 2. – С. 134–139.
37. Божкова В.П., Розанова Н.В. Современное состояние проблемы щелевых контактов и представление об их роли в развитии // Онтогенез, 1998. – Т. 29. – № 1. – С. 5–20.
38. Божкова В.П., Ротт Н.Н., Квавилашвили И.Ш., Чайлахян Л.М. Измерение электрической связи между клетками зародышей аксолотля в период делений дробления // Онтогенез, 1973. – Т. 4. – № 5. – С. 523–526.



39. Божкова В.П., Чайлахян Л.М. Специфическая роль ионов в предзародышевом и зародышевом развитии // Внешняя среда и развивающийся организм. – М.: Наука, 1977. – С. 210–256.
40. Бойко Н., Целевич М., Санагурський Д. Вплив іонів важких металів на активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази та динаміку трансмембранного потенціалу зародків в'юна // Вісник Львів. ун-ту. – Сер. біол., 2002. – Вип. 29. – С. 25–31.
41. Бойко Н.М., Гойда О.А. Морфогенез та електричні параметри мембран зародків в'юна за умов наявності в середовищі важких металів // Актуальні проблеми мед., біол., ветер. і сільськ. госп., 1996. – С. 85–86.
42. Бойко Н.М., Гойда О.А., Дика М.В. Вплив іонів важких металів на електрогенез мембран зародків в'юна // Тези доповідей VII Українського біохімічного з'їзду. – Ч. I. – Київ, 1997. – С. 36–37.
43. Бойко Н.М., Кулачковський О.Р., Ковалишин І.В., Целевич М.В., Санагурський Д.І. Вплив катіонів нікелю та марганцю на ультраструктуру бластомерів зародків в'юна // Вісн. Харків. ун-ту. – Сер. “Біофізичний вісник”. 2002. – Вип. 1(10). – С. 62–67.
44. Бойко Н.М., Санагурський Д.І. Вплив антибіотиків класу фторхінолонів на динаміку трансмембранного потенціалу зародків в'юна // Біологія тварин, 2000. – Т. 2. – № 2. – С. 135–137.
45. Бойко Н.М., Санагурський Д.І. Вплив іонів важких металів на динаміку трансмембранного потенціалу зародків риб // Вісн. Харків. ун-ту. – Сер. Біофіз. вісник, 2000. – Вип. 2(7). – С. 42–46.

46. *Бойко Н.М., Санагурський Д.І.* Вплив катіонів важких металів на електрофізіологічні параметри мембран зародків в'юна // Тези доп. III з'їзду Укр. біофіз. т-ва. – Львів, 2002. – С. 248.
47. *Бойко Н.М., Санагурський Д.І.* Динаміка трансмембранного потенціалу зародків в'юна в умовах впливу іонів важких металів // Вісн. Львів. ун-ту. – Сер. біол., 2000. – Т. 25. – С. 3–7.
48. *Бойко Н.М., Целевич М.В., Кулачковський О.Р., Ковалишин І.В., Санагурський Д.І.* Ультраструктура бластомерів зародків в'юна за умов впливу катіонів важких металів // Матер. міжнар. конфер. пам'яті І.В. Шостаковської – Львів, 2002. – С.13.
49. *Бойко Н.М., Целевич М.В., Санагурський Д.І.* Зміна активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази мембран зародків в'юна під впливом катіонів важких металів // Зб. наук. праць: Проблеми екологічної та медичної генетики і клітинної імунології. – Київ; Луганськ; Харків, 2002. – Вип. 2(41). – С. 17–23.
50. *Бойко Т.Ф.* Металлоносность поверхностных вод и рассолов. – М.: Недра, 1969. – 120 с.
51. *Болдырев А.А.* Строение и функции биологических мембран. – М.: Знание, 1987. – 63 с.
52. *Брагинский А.П.* Теоретические аспекты проблемы “нормы и патологии” в водной экотоксикологии // Теор. аспекты водной токсикологии. – Л.: изд-во – 1981. – С. 29–40.
53. *Брагинский А.П., Щербань Э.П.* Острая токсичность тяжелых

металлов для водных беспозвоночных при различных температурных условиях // Гидробиол. ж-л, 1978. – Т. 14. – № 6. – С. 86–92.

54. *Брежестовский П.Д., Гойда Е.А., Медына И.Р., Чабан В.В.* Роль цитоскелета в регуляции циклических изменений электрических параметров мембран зародышей вьюна *Misgurnus fossilis* // Онтогенез, 1993. – № 3. – С. 81–91.

55. *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.

56. *Бродский В.Я.* О природе околочасовых (ультрадианных) внутриклеточных ритмов. Сходство с фракталами // Изв. АН. – Сер. Биол., 1998. – № 3. – С. 316–329.

57. *Бродский В.Я.* Околочасовые (ультрадианные) клеточные ритмы: начало исследований. Некоторые итоги // Онтогенез, 2000. – Т. 31. – № 6. – С. 316–329.

58. *Бродский В.Я., Нечаева А.В.* Ритм синтеза белка. – М.: Наука, 1988. – 239 с.

59. *Бродский В.Я., Нечаева Н.В., Звездина Н.Д. и др.* Изменение концентрации ионов кальция и ритм синтеза белка в культуре гепатоцитов // Изв. АН. – Сер. биол., 2002. – № 1. – С. 10–16.

60. *Бузников Г.А.* Нейротрансмиттеры в эмбриогенезе. – М.: Наука, 1987. – 232 с.

61. Бузников Г.А. Низкомолекулярные регуляторы зародышевого развития. – М.: Наука, 1967. – 265 с.
62. Бузников Г.А. Низкомолекулярные физиологически активные вещества в регуляции первых делений дробления. – В кн.: Межклеточные взаимодействия в дифференцировке и росте. – М.: Наука, 1970. – С. 150–159.
63. Бузников Г.А. Роль медиаторов нервной системы в индивидуальном развитии // Онтогенез, 1971. – Т. 2. – № 1. – С. 5–13.
64. Бузников Г.А. Моноамины и ацетилхолин как регуляторы процессов эмбриогенеза. – В кн.: Проблемы экспериментальной биологии. – М.: Наука, 1977. – С. 304–310.
65. Бузников Г. А., Турпаев Т.М. Особенности внутри- и межклеточной сигнализации на биологических моделях ооцит – ранний зародыш – нейрон. – В кн.: Внутриклеточная сигнализация / Под ред. П.Г. Костюка, М.А. Островского. – М.: Наука, 1988. – 236 с.
66. Бюннинг Э. Ритмы физиологических процессов. – М.: Мир. – 1961. – 184 с.
67. Веренинов А.А. ст., Веренинов А.А. мл. Ионный электрический и водный баланс в животной клетке. Система с активным транспортом катионов, гольдмановскими каналами и симпортом типа  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2 \text{Cl}^-$
68. Веренинов А.А., Марахова И.И. Транспорт ионов у клеток в культуре. – Л.: Наука, 1986. – 292 с.

69. Виллоуз А.О.Д., Никитина Л.А., Безуглов В.В., Грецкая Н.М., Бузников Г.А. О возможном функциональном взаимодействии серотонина и нейропептидов в регуляторных процессах эмбриогенеза (опыты на зародышах моллюска *Tritonia medea*) // Онтогенез, 2000. – Т. 31. – № 2. – С. 132–138.
70. Владимирова И.Г., Злочевская М.Б., Озернюк Н.Д. Динамика интенсивности дыхания в раннем онтогенезе амфибий // Онтогенез, 2000. – Т. 31. – № 5. – С. 350–354.
71. Вовканич Л.С., Дубицький Л.О. Вплив катіонів лужноземельних і перехідних металів на неспецифічну проникність внутрішньої мембрани мітохондрій // Експеримент. фізіол. та біохім, 1998. – Т. 1. – № 1. – С. 4–8.
72. Воздействие физико-химических факторов внешней среды на организм.: Сб. науч. тр. / Ред. Р.С. Орлов и др. 1988.
73. Высокопроницаемые контактные мембраны / М.Б. Беркинблит, В.П. Божкова, Л.Ю. Бойцова и др.– М.: Наука, 1981. – 466 с.
74. Гапочка Л.Д., Дрожжина Т.С., Карауш Г.А., Озрина Р.Д., Парина О.В. Реакции зеленой водоросли *Scenedesmus quadricauda* на токсическое действие меди в процессе роста // Вестн. Москов. ун-та. – Сер. биол., 1989. – № 2. – С. 60–64.
75. Гинзбург А.С. Оплодотворение у рыб и проблема полиспермии. – М.: Наука, 1968. – 368 с.
76. Гласс Л., Мэки М. От часов к хаосу: ритмы жизни. – М.: Мир, 1991. – 248 с.

77. Гленсдорф П., Пригожин И. Единство физических законов и уровней описания. – В кн.: Термодинамическая теория структуры, устройчивости и флуктуаций. – М.: Мир, 1973. – С. 258–263.
78. Глушков В.М., Иванов В.В., Яненко В.М. Моделирование развивающихся систем. – М.: Наука, 1983 – 350 с.
79. Глушков В.М., Иванов В.В., Яненко В.М. Моделирование внутри- и межклеточных взаимодействий на основе одного класса динамических макромоделей. – Киев : Изд-во АН УССР, ИК, 1978 – 40 с.
80. Гойда Е.А. Биофизические аспекты раннего онтогенеза животных. – Киев: Наук. думка, 1993. – 224 с.
81. Гойда Е.А., Гумецкий Р.Я. Математическая модель динамики мембраносвязанных процессов в раннем эмбриогенезе животных // Тр. Междунар. симп. “Критерии самоорганизации в физ.-хим. и биол. системах”. – М., 1995. – С. 52–57.
82. Гойда Е.А., Гуц Е.С., Деркач М.Ф.и др. Диалоговая система связи оператора с ЭВМ “Минск-32” для задач текущего биометрического анализа экспериментальных данных. – Вестн. Львовс. ун-та. – Сер. Биол. Моделирование и распознавание речи. – Львов: 1974. – вып. 8. – С. 67–81.
83. Гойда Е.А., Кусень С.Й., Санагурський Д.И. // Механизмы контроля раннего эмбрионального развития: Тез. докл. – Тбилиси: Б. и., 1974. – С. 32–37.

84. *Гойда Е.А., Медына И.Р.* Ионная проводимость клеточных мембран развивающихся зародышей вьюна // Физиолог. ж-л, 1988. – Т. 34. – № 6. – С. 38–45.
85. *Гойда Е.А., Медына И.Р.* Мембранная проводимость и влияние внеклеточной концентрации кальция на динамику мембранного потенциала в раннем развитии вьюна // Тр. IV Всесоюз. междуниверситет. конфер. по “Биол. клетки”. – Ч. 1. – Тбилиси: Изд-во ГиГУ, 1985. – С. 167–169.
86. *Гойда Е.А., Медына И.Р., Санагурский Д.И., Стельмах Н.С.* Характеристики электрофизиологических параметров мембран эмбриональных клеток вьюна при ингибировании  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы // Онтогенез, 1989. – Т. 20. – № 2. – С. 164–170.
87. *Гойда Е.А., Медына И.Р., Чабан В.В., Тызъо Р.В.* Роль активности  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы и уровня рН в регуляции ионной проводимости мембран эмбриональных клеток // Цитология, 1990. – Т. 32. – № 9. – С. 924–925.
88. *Гойда Е.А., Мукалов И.О., Мурацки И.Г., Санагурский Д.И.* О взаимосвязи трансмембранного потенциала и потребления кислорода на начальных стадиях развития вьюна: Тез. докл. Всесоюз. симпозиума “Регуляторные системы обмена веществ в раннем эмбриогенезе”. – Львов, 1979. – С. 11–13.
89. *Гойда Е.А., Ротт Н.Н., Санагурский Д.И.* Изменение трансмембранного потенциала вьюна при действии колхицина // Онтогенез, 1981. – Т. 12. – № 6. – С. 643–647.

90. *Гойда Е.А., Санагурский Д.И., Медына И.Р., Стельмах Н.С.* Влияние оуабаина на динамику трансмембранного потенциала у развивающихся зародышей вьюна // Матер. VII Всесоюз. совещ. эмбриологов. – Л.; М.: Наука, 1986. – С. 52.
91. *Гойда Е.А., Санагурский Д.И., Стельмах Н.С., Медына И.Р.* Калийзависимые эффекты влияния инсулина на поляризацию мембран зародышей вьюна // Биофизика, 1986. – Т. 31. – № 5. – С. 891–896.
92. *Гойда О.А.* Трансмембранні потенціали в ембріогенезі тварин // Вісн. АН УРСР, 1983. – № 12. – С. 27–38.
93. *Гойда О.А., Бойко Н.М., Полуйко В.Ю.* Мембранний електрогенез та швидкість споживання кисню в ранньому розвитку зародків риб // Вісн. Київс. ун-ту ім. Т. Шевченка, 1996. – Вип. 2. – С. 27–35.
94. *Гойда О.А., Гумецький Р.Я., Дика М.В.* Результати моделювання часового тренду мембранозв'язаних біоелектричних процесів у ранньому ембріогенезі в'юна // Проблеми патології в експерименті та клініці, 1998. – Т. 19. – С. 96–101.
95. *Гойда О.А., Маслій І.В., Санагурський Д.І.* Опис процесів раннього ембріогенезу з позицій нового класу динамічних моделей // Зб. тезів доп. II з'їзду Укр. біоф. т-ва. – Харків, 1998. – С. 168.
96. *Гойда О.А., Санагурський Д.І., Мурашин І.Т., Кусень С.Й.* Мембранний потенціал клітин в середовищі з гідрокортизоном,



інсуліном і РНК.// Укр. фізіол. ж-л., 1977. – Т. 23. – № 2. – С. 208–212.

97. *Гойда О.А., Чабан В.В., Медина І.Р.* Електрофізіологічні параметри іонтранспортних систем у риб і амфібій за період їхнього раннього розвитку // Фізіол. ж-л, 1992. – Т. 38. – № 6. – С. 102–105.

98. *Гринюс Л.П.* Транспорт макромолекул у бактерій. – М.: Наука, 1986. 240 с.

99. *Гринь Н.В., Говорунова Н.Н., Павлович Л.В. и др.* Эмбриотоксическое действие сульфата олова при ингаляционном поступлении в организм // Гигиена и санитария, 1988. – № 7. – С. 81–82.

100. *Грубов В.И., Ивахненко А.Г.* Промышленная кибернетика. – Киев: Наук. думка, 1966. – 447 с.

101. *Грузина Т.Г., Балакина М.Н., Карамушка В.И. и др.* Трансмембранный потенциал и АТФ-азная активность плазматической мембраны бактерий при воздействии тяжелых металлов // Укр. биохим. ж-л, 1997. – Т. 69. – № 1. – С. 54–59.

102. *Губанов М.И., Утенбергенев А.А.* Медицинская биофизика. – М.: Медицина, 1978. – 335 с.

103. *Гудвин Б.А.* Аналитическая физиология клеток и делящихся организмов. – М.: Мир, 1978. – 237 с.

104. *Гудвин Б.Г.* Временная организация клетки. – М.: Мир, 1966. – 251 с.

105. Данко И.М., Казьмин С.Д., Колосов Е.В. Роль одновалентных катионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  в регуляции клеточной пролиферации и биосинтеза макромолекул // Усп. соврем. биологии, 1984. – Т. 97. – № 3. – С. 366–377.
106. Демидович Б. А. Основы вычислительной математики. – М.: Наука, 1970. – 764 с.
107. Демина Л.Л. Формы миграции тяжелых металлов в океан. – М.: Наука, 1982. – 120 с.
108. Деркач М.П., Гумецкий Р.Я., Чабан М.Е. Курс варіаційної статистики. – К.: Вища шк., 1977. – 208 с.
109. Детлаф Т.А., Руднева Т.Б. Безразмерная характеристика продолжительности зародышевого развития шпорцевой лягушки // Онтогенез, 1973. – Т. 4. – № 5. – С. 461–470.
110. Детлаф Т.А., Детлаф А.А. О безразмерных характеристиках продолжительности развития в эмбриологии // Докл. АН СССР, 1960. – Т. 134. – № 1. – С. 199–202.
111. Динерман А.А. Роль загрязнителей окружающей среды в нарушении эмбрионального развития. – М.: Медицина, 1990. – 190 с.
112. Добровольский О.К. Влияние тяжелых металлов на окружающую среду. – Киев: Наук. думка, 1987. – 164 с.
113. Догель В.А. Учебник зоологии беспозвоночных. – Л., 1934. – С. 81–82.

114. Дондуа А. К. Сравнительно-эмбриологический очерк особенностей клеточных циклов в раннем развитии животных // Клет. размнож. и процессы дифференциации. – Л.: Наука, 1983. – С. 22–75.
115. Дубицький Л.О., Вовканич Л.С. Взаємодія катіонів лужноземельних і перехідних металів з  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінником плазматичної мембрани секреторних клітин шлункових залоз // Укр. біохім. ж-л, 2001. – Т. 73. – № 6. – С. 41–49.
116. Дубицький Л.О., Вовканич Л.С. Взаємодія катіонів металів з  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальними центрами  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи плазматичної мембрани секреторних клітин шлункових залоз // Укр. біохім. ж-л, 2003. – Т. 75. – № 2. – С. 39–46.
117. Дубицький Л.О., Вовканич Л.С. Залежність інгібуючих ефектів катіонів металів на поглинання  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями печінки щурів від їхніх фізико-хімічних властивостей // Укр. біохім. ж-л, 2000. – Т. 72. – № 1. – С. 42–47.
118. Дубицький Л.О., Вовканич Л.С., Добуш Т. Фізико-хімічні механізми взаємодії катіонів металів з кальційтранспортними системами секреторної клітини // Тези доп. III з'їзду Укр. біофіз. т-ва. – Львів. 2002. – С. 75.
119. Дубова И.А., Жулидов А.В. Влияние повышенных количеств кадмия и ртути, содержащихся в корме, на рост и развитие *Rassulus Ressleri* (Lohm) (diplopoda) // Матер. докл. 9 Всесоюзн.

совещ. “Проблемы почвенной зоологии”. – Тбилиси: 1987. – С. 90–92.

120. *Дыбан А.П., Баранов В.С., Котин А.М.* Действие некоторых антибиотиков нуклеинового обмена на эмбриогенез млекопитающих. – В кн.: Внешняя среда и развивающийся организм. – М.: Наука, 1977. – С. 293–317.

121. *Евсиков А.В.* Механизмы регуляции раннего эмбриогенеза мыши // Онтогенез, 2000. – Т. 31. – № 3. – С.178–191.

122. *Ембріологія / За ред. О.Є. Кузів.* – Тернопіль: Укрмедкнига, 1998. – 80 с.

123. *Ермаков А.С., Белоусов Л.В.* Морфогенетические и дифференцировочные последствия релаксации механических натяжений в бластуле шпорцевой лягушки // Онтогенез, 1998. – Т. 29. – С. 450–458.

124. *Ермаков В.В., Ковальский В.В.* Биологическое значение селена. – М.: Наука, 1975. – 197 с.

125. *Ершев Ю.А., Плетнева Т.В.* Механизмы токсического действия неорганических соединений. – М.: Медицина, 1989. – С. 67–78.

126. *Ершов Ю.А.* Термодинамика квазиравновесий в биологических системах. – М. 1983. – 140 с.

127. *Ершов Ю.А., Плетнева Т.В.* Механизмы токсического действия неорганических соединений. – М.: Медицина, 1989. – 272 с.

128. Жуков Е.К., Итина Н.А., Магазанник Л.Г. и др. Развитие сократительной функции мышц двигательного аппарата. – Л.: Наука, 1974. – С. 128–133.
129. Жулидов А.В. Выведение тяжёлых металлов из организма беспозвоночных животных // Экотоксикология и охрана природы. – М.: Наука, 1988. – 255 с.
130. Жулидов А.В. Физико-химическое и химическое состояние металлов в природных водах: токсичность для пресноводных организмов // Экологическое нормирование и моделирование антропогенного воздействия на водные экосистемы. – Л., 1988. – Вып. 1. – С. 78–82.
131. Земсков Е.А., Абрамова Е.Б., Клячко О.С. и др. Казеинкиназная активность в раннем развитии вьюна // Изв. АН. – Сер. биол., 1998. – № 2. – С. 230–234.
132. Зигель Х. Ионы металлов в биологических системах. Амбивалентные свойства нуклеотидов. – М.: Мир, 1982. – 168 с.
133. Зима В.Л. Влияние температуры на флуоресцентные характеристики ИНДО-1 при взаимодействии с сывороточными альбуминами и ионами кальция // Физика живого, 1999. – Т. 7. – № 1. – С. 48–53.
134. Зима В.Л. Клеточные кальциевые сигналы: природа, регистрация и количественная оценка // Укр. біохім. ж-л, 2000. – Т. 2. – С. 5–13.

135. *Зима В.Л.* Количественная оценка цитозольного свободного кальция с помощью ИНДО-1 // *Фізика живого*, 1997. – Т. 5. – С. 69–75.
136. *Зима В.Л., Дячок О.М.* Клеточные кальциевые сигналы: природа, регистрация и количественный анализ // *Укр. біохім. ж-л*, 2000. – Т. 72. – № 2. – С. 5–13.
137. *Золотухина Е.Ю., Гавриленко Е.Е.* Влияние ионов цинка и меди на фотосинтез и дыхание морских микроводорослей // *Физиол. растений*, 1985. – Т. 34. – № 2. – С. 266–275.
138. *Золотухина Е.Ю., Долгушина И.В., Неверов К.В.* Влияние некоторых тяжелых металлов на фотостойчивость хлорофилла морских зеленых макроводорослей // *Вестн. Москов. ун-та. – Сер. 16. Биология*, 1993. – № 1. – С. 64–71.
139. *Зотин А.И.* Физиология водного обмена у зародышей рыб и круглоротых. – М.: Изд-во АН СРСР, 1961. – 122 с.
140. *Зотин А.И., Мильман Л.С., Фаустов В.С.* Изменение содержания АТФ в яйцах морского ежа под действием ингибиторов клеточного деления // *Ж-л общ. биологии*, 1965. – Т. 26. – № 5. – С. 546–554.
141. *Иванов А.В., Полянский Ю.И., Стрелков А.А.* Большой практикум по зоологии беспозвоночных (простейшие, губки, кишечнополостные, гребневики, плоские черви, немертены, круглые черви). – М.: Выс. шк. 1981. – С. 192–208.

142. *Ивашкив Л.Я., Гумецкий Р.Я., Санагурский Д.И.* Анализ зависимостей в динамике физико-химических характеристик раннего эмбриогенеза холоднокровных животных // Сб. тез. 6 Пущинской школы-конференции молодых ученых “Биология – наука XXI века”. – Пущино. 2002. – Т. 1. – С. 12–13.
143. *Игнатьева Г.М.* Временные соотношения между началом синтеза РНК в ядрах и проявлением их морфогенетической функции у аксолотля // Онтогенез, 1972. – Т. 3. – № 6. – С. 626–629.
144. *Игнатьева Г.М., Костомарова А.А.* Продолжительность митотического цикла и период синхронных дроблений и ее зависимость от температуры у зародышей вьюна // ДАН СРСР, 1966. – Т. 168. – № 5. – С. 1221–1224.
145. *Игнатьева Г.М.* Ранний эмбриогенез рыб и амфибий. – М.: Наука, 1979. – 176 с.
146. *Игошева Н.Б., Павлов А.Н., Анищенко Т.Г.* Методы анализа сердечного ритма. – Саратов: Колледж, 2001. – 120 с.
147. *Іваницька З.Я., Личковський Е.І., Санагурський Д.І.* Розв’язок моделі локалізації головних потенціалогенеруючих іонів у мембранах живих систем // Експ. та клін. фізіологія і біохімія, 2007. – 2(37). – С. 10–16.
148. *Івашків Л., Градюк М., Санагурський Д.* Аналіз кроскореляцій у часових змінах фізико-хімічних показників розвитку зародків в’юна // Вісн. Львів. ун-ту. – Сер. біол. Львів, 2001. – № 27. – С. 3–11.

149. *Івашків Л., Гумецький Р., Санагурський Д.* Часові співвідношення динаміки метаболічних та біоелектричних характеристик раннього ембріогенезу в'юна та шпорцевої жаби // Вісн. Львів. ун-ту. – Сер. біол. Львів, 2002. – № 29. – С. 15–24.
150. *Івашків Л.Я.* Дослідження динаміки фізико-хімічних характеристик раннього ембріогенезу в'юна при дії різних факторів // Матер. II всеукр. наук. конф. студентів та аспірантів “Біологічні дослідження молодих вчених на Україні”. – К. 2002. – Вип. 1. – С. 19–20.
151. *Івашків Л.Я., Градюк М.Б., Санагурський Д.І.* Особливості часової організації мембранозв'язаних процесів у ранньому ембріогенезі тварин // Вісн. Харків. ун-ту. – Сер. Біофіз. вісник, 2001. – Т. 1(8). – № 525. – С. 42–50.
152. *Івашків Л.Я., Гумецький Р.Я., Санагурський Д.І.* Аналіз динаміки фізико-хімічних характеристик раннього ембріогенезу в'юна при цитостатичних та температурних впливах // 36. тезів доповідей III з'їзду Укр. біофіз. т-ва. – Львів: – 2001. – С. 153.
153. *Івашків Л.Я., Гумецький Р.Я., Санагурський Д.І.* Дослідження змін фізико-хімічних показників розвитку зародків в'юна методами кореляційного та спектрального аналізів // Вісн. Харків. ун-ту. – Сер. Біофіз. вісник, 2001. – № 528. – Т. 2 (9). – С. 51–57.
154. *Івашків Л.Я., Гумецький Р.Я., Санагурський Д.І.* Дослідження часових залежностей у динаміці фізико-хімічних характеристик



раннього онтогенезу холоднокровних тварин // Наука і молодь: Матер. міжнар. наук. конф. студентів та молодих вчених "Політ-2002". – К. – С. 198.

155. *Івашків Л.Я., Санагурський Д.І., Рибальченко Т.В.* Дослідження крос-кореляцій між змінами фізико-хімічних показників розвитку зародка *X. laevis* у період синхронних дроблень // Вісн. Київ. нац. ун-ту ім. Т. Шевченка: Проблеми регуляції фізіологічних функцій, 2002. – № 8. – С. 24–28.

156. *Канаев И.И.* Гидра. – М., Л.: Изд-во АН СССР, 1952. – 370 с.

157. Канцерогены в окружающей среде / Под ред. *Л.М. Шабад*– М., 1975. – 216 с.

158. *Карамушка В.И., Ульберг З.Р., Грузина Т.Г.* Энергозависимая аккумуляция Au(III) приводит к ингибированию систем трансформации энергии у бактерий // Прикл. биохим. микробиол., 1991. – Т. 27. – № 1. – С. 119–126.

159. *Карначук О.В.* Влияние шестивалентного хрома на образование сероводорода сульфатредуцирующими бактериями // Микробиология, 1995. – Т. 64. – № 3. – С. 315–319.

160. *Катиц В.* Нерв, мышца и синапс. – М.: Мир, 1969. – С.

161. *Кафиани К.А., Костомарова А.А.* Информационные молекулы в раннем развитии животных. – М.: Наука, 1978. – 335 с.

162. *Кафиани К.А., Маленков А.Г.* Роль ионного гомеостаза клетки в явлениях роста и развития // Успехи совр. Биологии, 1976. – Т. 81. – С. 445–463.

163. *Квавилашвили И.Ш.* Исследование электрических свойств

клеточных мембран в раннем эмбриогенезе вьюна: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – М., 1971. – 25с.

164. *Квавилашвили И.Ш., Божкова В.П., Кафиани К.А., Чайлахян Л.М.* Изменение мембранного потенциала яиц вьюна в раннем эмбриогенезе // *Онтогенез*, 1971. – Т. 2. – № 2. – С. 213–216.

165. *Квавилашвили И.Ш., Божкова В.П., Чайлахян Л.М.* Периодические изменения сопротивления и мембранного потенциала яиц вьюна, сопровождающие деления дробления // *Онтогенез*, 1971. – Т. 2. – № 4. – С. 425–430.

166. *Кендэл М.Дж., Стьюарт А.* Многомерный статистический анализ и временные ряды. – М.: Наука, 1976. – 736 с.

167. *Клевец М.Ю., Манько В.В., Федирко Н.В.* Зависимость тока натрий-кальциевого обмена через мембрану клеток слюнной железы личинки хирономуса от рН внеклеточного раствора // *Нейрофизиология*, 1996. – Т. 28. – № 4/5. – С. 193–196.

168. *Клевец М.Ю.* Роль ионов кальция в формировании величины натриевого и калиевого токов утечки мембраны секреторных клеток // *Львов.* – 1987. – 12 с. – Деп. В УкрНИИНТИ 22.12.87 г. № 3260-Ук87.

169. *Клевец М.Ю., Манько В.В., Федірко Н.В.* Струм  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обміну мембрани секреторних клітин слинної залози личинки *Chironomus plumosus* L // *Фізіологічний ж-л*, 1998. – Т. 44. – № 3. – С. 160–161.

170. *Клименко О.С.* Вплив адреналіну на дихання і фосфорилування в тканинах головного мозку // *Фізіологічний ж-л*, 1974. – Т. 20. – № 2. – С. 210–215.
171. *Коломыйцева М.Г., Габович Р.Д.* Микроэлементы в медицине. – М.: Медицина, 1970. – 289 с.
172. *Колотенко Т.А.* Тензорная модель множества иерархических систем пространственно- временных связей головного мозга // *Проблемы бионики*, 1978. – Т. 21. – № 1. – С. 8–26.
173. *Кометиани З.П., Джариашвили Г.М.* Эффект нейроромонов на Na-K-помпу // *Изв. АН ГССР. – Сер. биол.*, 1975. – № 12. – С. 190–196.
174. *Кондрашова М.Н., Григоренко Е.В.* Появление стресса на уровне митохондрий, их стимуляция гормонами и регуляция гидроаэроионами // *Ж-л общ. биологов*, 1985. – Т. 46. – № 4. – С. 516–526.
175. *Корвин-Павловская Е.Г., Неклюрова И.В., Слепцова Л.А., Голиченков В.А.* Исследование регуляционных процессов в раннем развитии вьюна при уменьшении объема желтка зиготы // *Вестн. Москов. гос. ун-та. Сер. 16. – Биология*, 1996. – № 4. – С.33–36.
176. *Корн Г., Корн Н.* Справочник по математике для научных работников и инженеров. – М.: Наука. 1984. – 831 с.
177. *Косевич И.А.* Чувствительность колониальных гидроидов к повышенным концентрациям ионов меди и цинка // *Экология*, 1992. – № 1.– С. 89–91.

178. *Костомарова А.А.* Вьюн *Misgurnus fossilis L.* – В кн.: Объекты биологии развития. – М.: Наука, 1975. – С. 308–323.
179. *Костомарова А.А.* Дифференцировка изолированной от желтка бластодермы вьюна в различных средах инкубации: В сб.: Клеточная дифференцировка и инкубационные механизмы. – М.: Наука, 1965. – С. 160–173.
180. *Костомарова А.А., Нейфах А.А.* Метод отделения бластодермы у зародышей вьюна и возможности его применения // Ж-л общ. биологов, 1964. – Т. 25. – С. 386–388.
181. *Костюк П.Г.* Исследование физических и химических основ биологических процессов. – Киев: Наук. думка, 1978. – С. 20–26.
182. *Костюк П.Г.* Кальций и клеточная возбудимость. – М.: Наука, 1986. – С. 241–255.
183. *Костюк П.Г.* Микроэлектродная техника. – Киев: Наук. думка, 1960. – 127 с.
184. *Костюк П.Г.* Роль неорганических ионов в деятельности возбудимой клетки // Исслед. физ. и хим. основ биолог. процессов. – Киев: Наук. думка, 1978. – С. 20–26.
185. *Костюк П.Г., Крышталь О.А.* Механизмы электрической возбудимости нервной клетки. – М.: Наука, 1981. – 204 с.
186. *Костюк П.Г., Миронов С.Л., Шуба Я.М.* Два селективных фильтра кальциевого канала соматической мембраны нейронов моллюсков // Нейрофизиология, 1983. – 15. – № 4. – С. 420–427.

187. *Красовский Г.Н.* Экспериментальные данные о предельно допустимой концентрации кобальта в водоемах // Гигиена и санитария, 1971. – С. 95–96.
188. *Крыжановский С.Г.* Эколого-морфологические закономерности развития карповых, вьюновых и сомовых рыб (Cyrprinoidae и Suluroidei) // Тр. Ин-та морф. животных. – М.: 1949. – Вып. 1. – С. 186–195.
189. *Кулик В.А.* Деякі методи моделювання кібернетичних систем за допомогою їх нормальної роботи. – К.: Автоматика, 1966. – Т. 3. – С. 17–19.
190. *Курський М.Д., Кучеренко С.М.* Біомембранологія. – К.: Вища шк., 1993. – 260 с.
191. *Кусень С.Й., Олешко П.С.* Зміни активності кислотої і лужної РНК-аз під час раннього ембріогенезу в'юна *Misgurnus fossilis* L. // Укр. біохім. ж-л, – 1974 – Т.46. – № 2. – С. 168–171.
192. *Кусень С.И., Санагурский Д.И., Муращик И.Г., Гойда Е.А.* Изменения трансмембранного потенциала у развивающихся зародышей вьюна под влиянием инсулина, ингибирования транскрипции и трансляции // Биофизика, 1980 – Т. 25. – № 4. – С. 658–663.
193. *Кусень С.Й., Сенькус Я.Т., Сологуб Л.І.* Активність глюкозо-6-фосфатази і фруктозо-1,6-дифосфатази в яйцеклітинах в'юна при інкубації в розчинах деяких субстратів і гормонів // ДАН УРСР, 1974. – Т. 5. – № 10. – С. 153–155.

194. *Кусень С.Й., Сологуб Л.І., Олексин Г.О., Сенькусь Л.Т.* Дослідження впливу глюкози, лактату і фумарату, а також гормонів на активність ферментів початкових етапів гліколізу і пентозофосфатного цикла незапліднених ікринок в'юна // Укр. біохім. ж-л, 1974. – Т. 46. – № 3. – С. 389–392.
195. *Кусень С.И., Сологуб Л.И., Пашковская И.С. и др.* Изучение роли гормонов в регуляции биохимических процессов в раннем эмбриогенезе // Тез. докл. Всесоюз. симпоз. “Регуляторные системы обмена веществ в раннем эмбриогенезе”. – Львов, 1979. – С. 23–25.
196. *Кусень С.И., Сологуб Л.И., Явдоченко О.И., Сенькусь Л.Т.* Исследования регуляции обмена углеводов в раннем эмбриогенезе // Укр. біохім. ж-л, 1975. – № 5. – С. 670–679.
197. *Кусень С.И., Стойка Р.С.* Молекулярные механизмы в действии полипептидных факторов роста. – М.: Наука, 1985. – 240 с.
198. *Кусень С.И. и др.* Влияние экстрактов яйцеклеток у зародышей в'юна на лактатдегидрогеназную активность при действии инсулина // Укр. біохім. ж-л, – 1978. – Т. 50. – № 6. – С. 769–792.
199. *Кучеренко Н.Е.* Биохимия / Н.Е. Кучеренко, Ю.Д. Бабенюк, А.Н. Васильев // – Киев: Вища шк., 1988. – С. 407.
200. *Кэндел Э.* Клеточные основы поведения. – М.: Мир, 1980. – С. 204–205.

201. Лазарева А.В., Ротт Н.Н., Гойда Е.А. и др. Изменение содержания циклического АМФ в зародышах вьюна на протяжении клеточного цикла в период дробления // Онтогенез, 1984. – Т. 15. – № 2. – С. 171–176.
202. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк., 1990. – 372 с.
203. Ламаш Н.Е. и др. Динамика свойств аденилатциклазной системы в процессе роста ооцитов морской звезды *Aphelasterias japonica* // Онтогенез, 1994. – Т. 25. – №2. – С. 24–30.
204. Лебедев В.С., Кузовникова Т.И., Корнев А.П., Федоров Ю.И. Закономерности индуцированного медью транспорта стрептомицина в *Escherichia coli* // Биофизика, 1987. – Т. 32. – № 4. – С. 638–641.
205. Левицкий Д.О. Кальций и биологические мембраны. – М.: Высш. шк., 1990. – 124 с.
206. Лейбуш Б.Н., Бондарева В.М. Инсулиновый рецептор плазматических мембран клеток печени морского ерша *Scorpaena roscus* в сравнении с рецептором млекопитающих // Ж-л эвол. биохим. и физиол., 1981. – Т. 17. – № 2. – С. 141–147.
207. Логвиненко Е.М., Трач В.М., Кащенко В.Е. и др. // Биохимия, 1977. – Т.42. – № 9. – С. 1649–1654.
208. Логвиненко Е.М., Шавловский Г.М., Закальский А.Е. // Микробиология, 1979. – Т. 48. – № 4. – С. 755–758.
209. Логвиненко Е.М., Шавловска Г.Д., Закальский А.Е., Заходило Н.В. // Биохимия, 1982. – Т. 47. – № 1. – С. 28–32.

210. Логвиненко Е.М., Шавловский Г.М., Конторская Н.Ю. // Генетика, 1987. – Т.23. – № 9. – С. 1699–1701.
211. Липин А.Н. Пресные воды и их жизнь. – М.: Гос.уч.-пед. изд-во Мин. Просв. РСФСР, 1950. – С. 172–173.
212. Магура И.С. Проблемы электрической возбудимости нейрональной мембраны. – Киев: Наук. думка, 1981. – 208 с.
213. Манько В., Ларина О., Клевець М. Залежність струму  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обміну плазматичної мембрани екзокринних секреторних клітин від функціонування  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -помпи // Вісн. Львів. ун-ту. - Сер. біолог., 2001. – № 27. – С. 218–224.
214. Манько В.В. Вплив катіонів перехідних металів на  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмін плазматичної мембрани клітини // Укр. біохім. ж-л, 1998. – Т. 70. – № 6. – С. 3–12.
215. Манько В.В., Клевець М.Ю., Федірко Н.В. Вплив катіонів нікелю і кадмію на амплітуду вхідного струму  $\text{Na}$ - $\text{Ca}$ -обміну мембрани секреторних клітин екзокринних залоз // Експеримен. та клін. фізіологія і біохімія, 1997. – Т. 2. – С. 214–215.
216. Марголис Л.Б. Синхронизация процессов в клеточном цикле // Цитология, 1970. – Т. 12. – № 6. – С. 697–713.
217. Мартыненко О.А. Влияние инсулина на электрофизиологические свойства одиночных мышечных волокон у животных раннего возраста. – В кн.: Инсулиновая обеспеченность организма в старости. – Киев: 1977. – С. 77–84.



218. *Маслій І.В., Санагурський Д.І.* Математична модель автоколивних мембраноз'язаних процесів на ранніх стадіях ембріогенезу в'юна // Актуальні проблеми мед., біол., вет. і с.госп. Сер. – Медицина і біологія – Львів, 2001. – С. 74–76.
219. *Маслій І.В., Санагурський Д.І.* Особливості формування трансмембранного потенціалу в період раннього ембріогенезу в'юна // Фізика живого (Біофізика і далі), 2003.– Т. 11. – № 1.– С. 72–79.
220. *Маслій І., Санагурський Д.* Системний підхід до аналізу мембранопов'язаних процесів у період раннього ембріогенезу риб // Вісн. Львів. ун-ту. – Сер. біол., 2002. – Вип. 31. – С. 16–21.
221. *Медина І.Р., Стельмах Н.С., Санагурський Д.І., Гойда Е.А.* Влияние внеклеточного кальция на уровень и динамику трансмембранного потенциала в раннем развитии вьюна // Онтогенез, 1987. – С. 91–95.
222. *Медына И.Р., Гойда Е.А.* Электрофизиологические характеристики мембран в период дробления рыб и амфибий // Онтогенез, 1992. – Т. 23. – № 2. – С. 117–131.
223. *Медына И.Р., Гойда Е.А., Брежестовский П.Д.* Механочувствительные калиевые каналы – один из факторов колебаний потенциала покоя в раннем эмбриогенезе вьюна // Биол. мембраны, 1988. – Т. 5. – № 9. – С. 960–969.

224. *Медына И.Р., Гойда Е.А., Санагурский Д.И., Стельмах Н.С.* Проводимость мембран зародышей вьюна в период дробления // Матер. VII Всесоюз. совещ. эмбриологов. – М.: Наука, 1986. – С. 61.
225. *Медына И.Р., Санагурский Д.И., Стельмах Н.С., Гойда Е.А.* Влияние внеклеточного кальция на ионную проводимость мембран в раннем развитии вьюна. – Сб.: Структурные особенности и функциональные свойства биологических систем. – М.: Наука, 1987. – С. 70–72.
226. *Мельник В.А.* Электрохимические свойства яйцеклеток и ранних эмбриональных клеток карпа: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Киев, 1978. – 23 с.
227. *Мельник В.П.* Мембранні електричні потенціали незапліднених і запліднених яйцеклітин коропа // Фізіол. ж-л, 1971. – Т. 13. – № 5. – С. 622–626.
228. *Мельник В.П., Сабодаш В.М.* Исследование ионной проницаемости цитоплазматических мембран в раннем эмбриогенезе карпа *Syrpinus carpio* // Цитология и генетика, 1976. – Т. 10. – № 1. – С. 18–21.
229. *Мельник В.П., Сабодаш В.М.* Мембранні потенціали клітин коропа (*Syrpinus carpio*) в ранньому ембріогенезі // Докл. АН УРСР, 1977. – Т. 3. – С. 274–275.
230. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен): Учеб. пособие / Под ред. *М.И. Прохоровой.* – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. – 272 с.

231. *Мещерский Р.М.* Методика микроэлектродного исследования. – М.: Медгиз, 1960. – 108 с.
232. *Милсум Д.Ж.* Анализ биологических систем управления. – М.: Мир, 1968. – 502 с.
233. *Мильман Л.С., Юровицкий Ю.Г.* Механизмы энзиматической регуляции углеводного обмена в раннем эмбриогенезе. – М.: Наука, 1973. – 235 с.
234. *Моисеева Н.И.* Структура биоритмов как один из критериев возможностей физиологической адаптации организма // Физиол. ж-л, 1978. – Т. 64. – №11. – С. 1632–1640.
235. *Москалев Ю.И.* Минеральный обмен. – М.: Медицина, 1985. – 288 с.
236. *Мукалов И.О., Гойда Е.А., Кусень С.И., Данилевич Н.И.* Перекисное окисление липидов на раннем эмбриогенезе вьюна // Биофизика, 1984. – Т. 29. – № 1. – С. 60–64.
237. *Мур-Ид М., Салзмен Ф.* Внутренняя временная упорядоченность // Биологические ритмы: В 2 т. / Под ред. Ю. Ашоффа.– М.: Мир, 1984. – Т. 1.– С. 240–274.
238. *Надеенко В.Г., Садилова М.С., Лепченко В.Г.* Эмбриотоксический эффект как критерий гигиенического нормирования неорганических веществ в воде и атмосферном воздухе. – В кн.: Основные вопросы проблемы отдалённых последствий воздействия промышленных ядов / Под ред. А.К. Плясунова и Г.А. Пашковой. – М., 1976. – С. 78–83.

239. *Нейфах А.А.* Использование метода радиоактивной инактивации ядер для исследования их функций в раннем развитии рыб // Журн. общ. биол. – 1959. – Т. 20. – С. 202–213.
240. *Нейфах А.А.* Молекулярная биология процессов развития. – М.: Наука, 1977. – 311 с.
241. *Нейфах А.А., Костомарова А.А.* Исследование транспорта РНК из ядра в цитоплазму у ранних зародышей вьюна *Misgurnus fossilis* и гибридов *Misgurnus fossilis* ♀ × *Carassius auratus auratus* ♂ // Онтогенез, 1973. – № 4. – С. 331–339.
242. *Нейфах А.А., Тимофеева М.Я.* Проблемы регуляции в молекулярной биологии развития. – М.: Наука, 1978. – 336 с.
243. *Никаноров А.М., Жулидов А.В.* Биомониторинг металлов в пресноводных экосистемах. – Л.: Гидрометеоиздат, 1991. – 312 с.
244. *Никаноров А.М., Жулидов А.В., Покаржевский А.Д.* Биомониторинг тяжелых металлов в пресноводных экосистемах. – Л.: Гидрометеоиздат, 1985. – 144 с.
245. *Никольская И.С., Радзинская Л.И.* Изучение механизма действия колхицина II. Влияние колхицина на клеточный метаболизм // Ж-л общ. биол., 1969. – Т. 30. – № 4. – С. 470–480.
246. *Никольская И.С., Радзинская Л.И., Зотин А.И.* Изучение механизма действия колхицина I. Влияние колхицина на дробление и развитие зародышей // Ж-л общ. биол., – 1967. – Т. 28. – № 4. – С. 472–478.

247. *Новашин С.М., Сазыкин Ю.Ю., Фомин И.П.* Антибиотики и микроорганизмы // Антибиотики, 1977. – Т. 9. – №4. – С. 781–789.
248. *Ноздрюхина Л.Р.* Биологическая роль микроэлементов в организации животных и человека. – М.: Наука, 1977. – 186 с.
249. Объекты биологии развития / Под ред. *Б.Л. Астаурова* – М.: Наука, 1975. – С. 308–323, 392–441.
250. *Озернюк Н.Д.* Энергетический обмен в раннем онтогенезе рыб. – М.: Наука, 1985. – 175 с.
251. *Павлидис Т.* Математические модели // Биологические ритмы: В 2 т. / Под ред. Ю. Ашоффа. – М.: Мир, 1984. – Т. 1. – С. 70–86.
252. *Парселл.* Электричество и магнетизм. – М.: Наука, 1975. – 440 с.
253. *Первис Р.* Микроэлектродные методы внутриклеточной регистрации и ионофореза. – М.: Мир, 1983. – 208 с.
254. *Полищук Р.А.* К вопросу о выборе тестов для оценки альгицидности ядов (фотосинтез, дыхание и фотосинтетические пигменты) // Биология моря, 1975. – Вып. 35. – С. 58–65.
255. Пространственно-временная организация онтогенеза / Под ред. *В.А. Голиченкова, Ю.А. Романова.* – М.: Изд-во Москов. ун-та, 1998. – 288 с.
256. *Протасова Т.Н.* Гормональная регуляция активности ферментов. – М.: Медицина, 1975. – 237с.
257. *Прохоров Л.Ю.* Параметры роста и развития млекопитающих,

- клеточная пролиферация в культуре и максимальная продолжительность жизни // Онтогенез, 1999. – Т. 30. – № 3. – С. 176–187.
258. *Ретин В.С.* Критические факторы химической регуляции развития. – М.: Медицина, 1980. – 244 с.
259. *Рибальченко В.К.* Участие ионов кальция в трансмембранных электрических процессах клеток гладких мышц: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Киев, 1970. – 28 с.
260. *Романов Ю.А., Маркина В.В.* Пространственно-временная организация энергетического обмена в печени // Хронобиология и хрономедицина / Под ред. Ф.И. Комарова. – М.: Медицина, – 1989. – С. 52.
261. *Романов Ю.А.* Временная организация и информация в биологических системах // Авиакосмич. экол. медицина, 1995. – Т. 29. – № 1. – С. 4–9.
262. *Романовский Ю.М., Степанова Н.В., Чернавский Д.С.* Математическая биофизика. – М.: Наука, 1984. – 304 с.
263. *Ротт Н.Н.* Клеточные деления в предгастроулярный период развития // Онтогенез, 1989. – Т. 11. – № 1. – С. 3–23.
264. *Ротт Н.Н.* Клеточные циклы в раннем эмбриональном развитии. – М.: Наука, 1987. – 207 с.
265. *Ротт Н.Н.* Особенности и регуляция клеточных циклов в раннем эмбриогенезе животных: Автореф. дисс. ... д-ра биол. наук. – М.: ИБР АН СССР, 1984. – 42 с.

266. *Ротт Н.Н.* Ритмические процессы в раннем эмбриогенезе приуроченные к клеточным делениям // *Онтогенез*, 1984. – Т. 15. – №1. – С. 5–20.
267. *Ротт Н.Н., Божкова В.П.* Десинхронизация и темп клеточных делений у разновозрастных химерных зародышей вьюна // *Онтогенез*, 1980. – Т. 11. – № 2. – С. 199–202.
268. *Ротт Н.Н., Божкова В.П., Квавилашвили И.Ш. и др.* Развитие изолированных бластодерм вьюна при культивировании в разных солевых средах // *Онтогенез*, 1978. – Т. 9. – № 5. – С. 457–469.
269. *Ротт Н.Н., Попов В.В.* Изменение продолжительности митотического цикла и его фаз в раннем эмбриогенезе вьюна *Misgurnus fossilis* // Демонстрация на IX Междунар. эмбриол. конф. – М.: Наука, 1969. – С. 68–69.
270. *Ротт Н.Н., Шевелева Г.А.* Изменение характера клеточных делений на ранних стадиях диплоидных и гаплоидных зародышей вьюна // *Цитология*, 1967. – Т. 9. – № 10. – С. 1265–1275.
271. *Рубин А.Б.* Биофизика: в 2 кн.: – Кн.1: Теоретическая биофизика. – М.: Наука, 1947 – 300с.
272. *Рябова Л.В., Васецкий С.Г.* Морфологические критерии и предполагаемые механизмы кортикальной сократимости ооцитов шпорцевой лягушки // *Онтогенез*, 1996. – Т. 27. – С. 165–172.
273. *Рябова Л.В., Елизаров С.М., Васецкий С.Г.* Эффекты актинсвязывающей казеиновой киназы инъецированной в ооциты и яйца шпорцевой лягушки // *Онтогенез*, 2000.– Т. 31. – № 1. – С. 14–20.

274. *Самошкіна Н.А.* Гистоантографічний аналіз синтезу нуклеїнових кислот і митотических циклів в ранньому ембріогенезі млекопитаючих: Автореф. дисс. ... д-ра біол. наук:– Л., 1978. – 42 с.
275. *Санагурський Д.І.* Трансміембранний потенціал в ранньому ембріогенезі вьюна *Misgurnus fossilis* L. при гормональних впливах: Автореф. дис... канд. біол. наук. – Київ, 1983. – 23 с.
276. *Санагурський Д.І., Гойда Е.А.* Описання біологічних структур с позицій їх організації // Пробл. Біоніки. – Вип. 24. – Харків: Вища шк., 1980. – С. 100–105.
277. *Санагурський Д.І., Гойда Е.А., Стельмах Н.С., Кусень С.І.* Вплив адреналіну на динаміку ТМП розвиваючихся зародків вьюна // Біофізика, 1982. – Т. 27. – № 2. – С. 252–275.
278. *Санагурський Д.* Інформаційний обмін у системі “біологічний об’єкт – середовище” // Форум, 2001.– № 1(3). – С. 35–39.
279. *Санагурський Д.І., Гойда Е.А.* Спектральний аналіз, як метод ідентифікації стану біосистем. – В сб.: Докл. МОИП. – М., 1989. – С. 121–127.
280. *Санагурський Д.І.* Оцінка динаміки біологічних параметрів за допомогою кореляційних функцій // Актуальні проблеми мед., біол., вет. і с.госп.: Кн. наук. статей. – Львів, 1998. – Кн. 4. – С. 237–240.
281. *Санагурський Д.І.* Тріадні взаємодії структурно-функціональний аналог поведінки біологічних систем на різних



рівнях їх організації // Актуальні проблеми мед., біол., вет. і с.госп.: Кн. наук. статей. – Львів, 1997. – Кн. 3. – С. 78–82.

282. *Санагурський Д.І., Маслій І.В., Гойда О.А., Петрух А.В.* Опис деяких процесів раннього ембріогенезу тварин з позицій нового класу динамічних моделей // Актуальні проблеми мед., біол, вет. та с.госп.: Кн. наук. статей. – Львів, 1998. – Кн. 4. – С. 240–244.

283. *Светлов П.Г., Быстров В.Д., Корсакова Т.Ф.* К морфологии и физиологии ранних стадий развития костистых рыб // Архив анат., гистол., эмбриол., 1962. – Т. 42. – № 1. – С. 22–37.

284. *Сельков Е. Е.* Временная организация энергетического метаболизма и физиологическое состояние организма. – М.: Наука, 1978. – С. 15–32.

285. *Сельков Е.Е.* Два альтернативных автоколебательных стационарных состояния в метаболизме тиолов – два альтернативных типа размножения клеток: нормальный и злокачественный // Биофизика, 1970. – Т. 15. – № 6. – С. 1065–1073.

286. *Сельков Е.Е.* Исследование механизма гликолитических колебаний. Релаксационная модель. – В кн.: Математические модели биологических систем. – М.: Наука. – 1971. – С. 5–24.

287. *Сельков Е. Е., Дынник С.Н.* Гистерезис и множественность стационарных состояний в открытой реакции  $S \xrightarrow{E(R,T)P}$ , катализируемых олигомерным ферментом  $E(R,T)$  // Биофизика, 1976 – Т. 21. – С. 213–219.

288. Сенцова О.Ю., Максимов С.Н. Влияние тяжелых металлов на микроорганизмы // Усп. микробиол., 1985. – Т. 20. – С. 227–252.
289. Сири́н А.С., Гаврилова Л.П. Рибосома. – М.: Наука, 1971. – 217 с.
290. Скулачев В.П. Трансформация энергии в биомембранах. – М.: Наука, 1972. – 203 с.
291. Уолтер Ч. Кинетика ферментативных реакций. – М.: Мир, 1969. – 124 с.
292. Стойка Р.С., Дробот Л.Б., Сушельницкий С.И. и др. Клетки ранних зародышей вьюна связывают трансформирующий фактор роста  $\beta$  // Онтогенез, 1993. – Т. 24. – № 1. – С. 38–42.
293. Стойка Р.С., Кусень С.И. Полипептидные факторы роста в эмбриогенезе животных // Онтогенез, 1988. – Т. 19. – № 3. – С. 229–239.
294. Стойка Р.С., Кусень С.И., Федышин Я.Я., Сушельницкий С.И. Полипептидные факторы роста зародышей вьюна на стадии бластулы // Укр. биохим. ж-л, 1987. – Т. 50. – № 5. – С. 27–32.
295. Страйер Л. Биохимия. – Москва.: Мир, 1985. Т. 3.– С. 338–340; Т. 2. – С. 274.
296. Строганов Н.С., Данильченко О.П. Теоретические проблемы водной токсикологии. Норма и патология. – М.: Наука, 1983. – 185 с.
297. Сутковой Д.А., Альферов А.И. Влияние инсулина на окислительное фосфорилирование в митохондриях печени и

сердца адреналэктомированных крыс // Укр. биохим. ж-л, 1978. – Т. 50. – № 3. – С. 332–334.

298. *Сухомлинова М.Ю., Киреев И.И., Фанс Д. и др.* Количественный и ультраструктурный анализ хондриома в овогенезе и эмбриогенезе морского ежа *Paracentrotus lividus* // Биол. мембраны, 2000. – Т. 17. – № 5. – С. 484–493.

299. *Сухорская И.Е., Сологуб Л.И., Пашковская И.С., Сенькусь Я.Т.* Инсулин и 17-оксикортикостероиды в неоплодотворенных яйцеклетках и зародышах вьюна // Укр. биохим. ж-л, 1983. – Т. 55. – № 1. – С. 29–32.

300. *Тарновская А.В., Санагурский Д.И.* Особенности изменения фракционного состава липидов мембран зародышей вьюна под влиянием ионов кальция // Сб. тез. 6 Пущинской школы-конференции молодых ученых “Биология – наука XXI века”. – Пущино, 2002. – Т. 1. – С. 98.

301. *Тарновська А.В., Санагурський Д.І.* Вплив іонів кальцію, магнію та високомолекулярних сполук на виживання зародків риб // Вісн. Львів. ун-ту. Серія біол., 2002. – №.31. – С. 3–15.

302. *Тарновська А.В., Санагурський Д.І.* Особливості зміни фракційного складу ліпідів зародків в'юна під впливом іонів кальцію та магнію // Зб. тез доп. III з'їзду Укр. біофіз. т-ва. – Львів, – 2001. – С. 149.

303. *Тизьо Р.В., Баштовий Д.Ю., Демчук В.Л., Санагурський Д.І.* Генерація спонтанної електричної активності клітинами ектодерми прісноводної гідри // Зб. тез доп. II з'їзду Укр. біофіз. т-ва. – Харків. – 1998. – С. 73.
304. *Тизьо Р.В.* Електрична активність клітин ектодерми *Hydra oligactis* Pallas та її зміни під впливом катіонів перехідних металів: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Львів, 1998. – С. 15.
305. *Тизьо Р.В., Гойда О.А.* Електричні параметри плазматичних мембран прісноводної гідри (*Hydra oligactis*) та їх використання для тестування токсичності водного середовища // Тези доп. міжнар. наради “Актуальні питання фізіології в аспекті екологічних проблем України”. – Чернівці, 1995. – С. 55.
306. *Тизьо Р.В., Гойда О.А.* Особливості електричної активності клітин ектодерми прісноводної гідри *Hydra oligactis* Pallas // Актуальні проблеми мед., біол., ветер. і с. госп.: Кн. наук. статей. – Львів: Віче, 1996. – С. 38–42.
307. *Тизьо Р.В., Санагурський Д.І., Проць І.О., Баштовий Д.Ю.* Зміни параметрів електричної активності клітин ектодерми прісноводної гідри під впливом інгібіторів іонтранспортних систем // Експеримент. фізіологія та біохімія, 1998. – № 2(6). – С. 7–10.
308. *Тизьо Р.В., Санагурський Д.І., Проць І.О., Баштовий Д.Ю.* Роль іонтранспортних систем у генерації спонтанної електричної активності клітинами ектодерми прісноводної гідри *Hydra oligactis*

// Наук. вісник. Проблеми та перспективи розвитку лісового господарства, – 1988. – Вип. 9.1. – С. 77–80.

309. *Токин Б.П.* Общая эмбриология. – М.: Высш. шк., 1987. – 478 с.

310. *Торчинский Ю.М.* Сера в белках. – М.: Наука, 1977. – С. 43–46.

311. *Уикли Б.* Электронная микроскопия для начинающих. – М.: Мир, 1975. – 325 с.

312. *Унагар Д.* Роль белковой структуры и адсорбция ионов в механизме возбуждения клетки // Цитология, 1959. – Т. 11. – № 6. – 640 с.

313. *Федишин Я.Я., Стойка Р.С., Кусень С.И.* Обнаружение протеазочувствительных факторов со свойствами трансформирующего фактора роста  $\beta$ -типа в ранних зародышах вьюна // Онтогенез, 1990 – Т. 21. – С. 63–68.

314. *Федірко Н.В.* Вплив катіонів Cd, Ni, La на  $\text{Na}^+$ -залежний вхід  $\text{Ca}^{2+}$  у клітини слинної залози личинки *Chironomus plumosus* L // Фізіологічний ж-л, 1998. – Т. 44. – № 3. – С. 176.

315. *Филенко О.Ф.* Водная токсикология. – Московский госуниверситет. Черноголовка. – 1988. – С. 47–51.

316. *Фильченков А.А., Стойка Р.С., Быкорез А.И.* Трансформирующие факторы роста. – Киев: Наук. думка, 1994. – 290 с.

317. *Фролькис В.В., Мурадян Х.К., Гураева Н.М.* Влияние гидрокортизона на мембранный потенциал и синтез фракций РНК клеток печени. – ДАН СССР, 1976. – Т. 227. – № 3. – С. 739–741.

318. Фролькис В.В. Об образовании гиперполяризующего фактора при активации биосинтеза белка в клетках печени // Физиол. ж-л, 1980. – Т. 26. – № 4. – С. 558–560.
319. Хадора Э., Венер З. Общая зоология. – М.: Мир, 1989. – С. 352–354.
320. Хованова Н.А., Хованов И.А. Методы анализа временных рядов. – Саратов: Колледж, 2001. – 120 с.
321. Ходжкин А.Л. Нервный импульс. – М.: Мир, 1965. – с.
322. Холмухамедов Э.Л., Чухлова Э.А. Влияние ионов двухвалентных металлов на колебания ионных потоков в митохондриях печени крыс // Укр. биол. ж-л, 1985. – Т 57. – № 4. – С. 43–49.
323. Хороший П., Стефанків Ю., Санагурський Д. Окислення сукцинату та  $\alpha$ -кетоглутерату в мітохондріях зародків в'юна *Misgurnus fossilis* на ранніх стадіях розвитку // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол., 2002. – №. 28. – С. 62–69.
324. Христофорова Н.К. Биоиндикация и мониторинг загрязнения морских вод тяжелыми металлами. – Л.: Наука, 1989. – 192 с.
325. Хронобиология и хрономедицина / Под ред. Ф.И. Комарова, С.И. Рапопорта. – М.: Триада, 2000. – 488 с.
326. Целевич М.В., Бойко Н.Н., Санагурський Д.И. Влияние ионов тяжелых металлов на активность  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы мембран зародышей вьюна // Сб. тезисов 6 Пущинской школы-конференции молодых ученых “Биология – наука XXI века”. – Пущино, 2002. – Т. 1. – С. 38–39.

327. *Цимбрик А., Санагурський Д.* Комп'ютерне моделювання та числова оптимізація метаболічних процесів: застосування до біосинтезу флавінових коферментів у дріжджів // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол., 2000. – Вип. 26. – С. 6–14.
328. *Цимбрик А., Санагурський Д.* Математичне моделювання біосинтезу рибофлавіну та флавінових коферментів: відтворення IN MODEL динаміки процесу у дріжджів *Pichia Guilliermondi* // Зб. тез доп. III з'їзду Укр. біофіз. т-ва. – Львів, – 2001. – С. 161.
329. *Цимбрик А.Є., Санагурський Д.І.* Моделювання біосинтезу рибофлавіну та його похідних дріжджами при різних внутрішніх параметрах системи // Вісн. Харків. ун-ту. Сер. Біофіз. вісник, 2000. – № 497. – Т. 2(7). – С. 60–65.
330. *Чабан В.В.* Участь вторинних посередників у змінах електрофізіологічних властивостей мембран зародкових клітин: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – К.: АН України ін-т Фізіології ім. О.О. Потєбні, 1993. – 24 с.
331. *Чиквашвили Ш.Д.* Электрофизиологические характеристики мембран клеток зародышей лягушки *Rana Ridibunda* в раннем развитии: Автореф. дисс...канд. биол. наук – Тбилиси, 1979. – 25 с.
332. *Чулицкая Е. В.* Характер перехода от синхронного дробления к асинхронному у зародышей осетра и лягушки при разных температурах // Ж-л общ. биологии, 1967. – Т. 28. – № 4. – С. 1449–1460.

333. Шавловский Г.М., Бабяк Л.Я., Сибирний А.А., Логвиненко Е.М. // Генетика, 1985. – Т. 21. – № 3. – С. 368–374.
334. Шавловский Г.М., Кузнецова Р.А., Логвиненко Е.Н., Струговщикова Л.И. О роли метаболита гуаниловых соединений в сверхсинтезе рибофлавина у дрожжей / Витамины. – Киев: Наук. думка, 1974. – 152 с.
335. Шавловский Г.М., Логвиненко Е.М., Трач В.М., Колтун Л.В. Об участии механизмов ретроингибирования и репрессии в регуляции флавиногенеза у дрожжей / Витамины. – Киев: Наук. думка, 1976. – Т. 9. – С. 99–104.
336. Шавловский Г.М., Логвиненко Е.М., Закальский А.Е. // Биохимия, 1983. – Т. 48. – № 5. – С. 837–843.
337. Шавловский Г.М., Логвиненко Е.М. // Прикл. биох. и микробиологии, 1988. – Т. 24. – № 4. – С. 435–447.
338. Шавловский Г.М., Логвиненко Е.М., Сибирний А.А. и др. // Микробиология, 1981. – Т. 50. – № 6. – С. 1008–1011.
339. Шавловский Г.М., Логвиненко Е.М., Струговщикова Л.И., Кащенко В.Е. // Укр. биохим. ж-л, 1975. – Т. 47. – № 5. – С. 649–660.
340. Шавловский Г.М., Логвиненко Е.М. // Укр. биохим. ж-л, 1985. – Т. 57. – № 4. – С. 104–112.
341. Шавловский Г.М., Сащенко В.Е., Катгун Л.В. и др. // Микробиология, 1977. – Т. 46. – № 3. – С. 578–579.



342. Шавловский Г.М., Струговицкова Л.Н // Микробиология, 1969. – Т. 38. – № 1. – С. 5–12.
343. Шавловский Г.М., Струговицкова Л.Н. // Микробиология, 1968. – Т. 37. – № 3. – С. 389–394.
344. Шноль С.Э. Физико-химические факторы биологической эволюции. – М. Наука, 1979. – 263 с.
345. Шуба М.Ф. Механізми неадренаргічної та нехолінергічної синаптичної передачі в гладеньких м'язах шлунково-кишкового тракту // Нейрофізіологія, 1998. – № 4/5. – С. 265–270.
346. Шуба М.Ф. Электрофизиологические свойства мембраны гладких мышечных клеток // Протоплазматические мембраны и их функциональная роль. – Киев: Наукова думка, 1965. – 256 с.
347. Шуба Я.М. Исследования модифицированных с помощью ЭДТА кальциевых каналов мембраны нервной клетки: Автореф. дисс. ... канд.биол.наук / Киев, 1983. – 24с.
348. Шуба Я.М. Потенциалзависимые кальциевые каналы: типы, кинетика, фармакология, регуляция: Автореф. дисс. ... д-ра биол.наук / Киев: 1991. – 36 с.
349. Экклс Дж. Тормозные пути центральной нервной системы. – М.: Мир, 1971. – 168 с.
350. Экклс Дж. Физиология нервных клеток. – М.: Ил. 1959. –с.
351. Экклс Дж. Физиология синапсов. – М.: Мир, 1966. – 395 с.
352. Юровицкий Ю.Г. Отношения зародыша и желтка в развитии костистых рыб // Онтогенез, 1999. – Т. 30. – № 3. – С. 205–209.

353. Юровицкий Ю.Г., Нефедова З.А., Сидоров В.Н. Динамика содержания липидов в эмбриональном и личиночном развитии лосося // Онтогенез, 1996. – Т. 27. – С. 89–94.
354. Якимович И.А., Стойка Р.С., Кусень С.И. Выявление и характеристика веществ со свойствами фактора роста фибробласта в клетках зародышей вьюна // Онтогенез, 1992. – Т. 22. – № 3. – С. 29–33.
355. Adams S.O., Nissley S.P., Handwerger S., Rechler M.M. Developmental patterns of insulin – like growth factor – I and II synthesis // Nature, 1983. – Vol. 302. – P. 150–153.
356. Ahmed A., Tajmirriahi H.A. Interaction of toxic metal ions  $Cd^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ , and  $Pb^{2+}$  with light-harvesting proteins of chloroplast thylacoid membranes. An FTIR spectroscopic study // J. Inorg. Biochem, 1993. – V. 50. – P. 235–243.
357. Albert A.P., Large W.A. The effect of external divalent cations on spontaneous non-selective cation channel currents in rabbit portal vein myocytes // J. Physiol, 2001. – Vol. 15. – № 536 (Pt. 2). – P. 409–420.
358. Allington C., Shamovsky I.L., Ross G.M., Riopelle R.J. Zinc inhibits p75NTR-mediated apoptosis in chick neural retina // Cell. Death. Differ., 2001. – Vol.8. – № 5. – P. 451–456.
359. Al-Nasser I.A. Cadmium hepatotoxicity and alterations of the mitochondrial function // J. Toxicol. Clin. Toxicol., 2000. – Vol. 38. – № 4. – P.407–413.

360. *Ammini C.V., Haus wirth W.W.* Mitochondrial gene expression is regulated at the level of transcription during early embryogenesis of *Xenopus laevis* // *J. Biol. Chem.*, 1999. – Vol. 274. – № 10. – P. 6265–6271.
361. *Andersson P.A.* Physiology of a bidirectional, excitatory, chemical synapse // *J. Neurophysiol.*, 1985. – Vol. 53(3). – P. 821–835.
362. *Anderson P.A.V., Mackie G.O.* Electrically coupled, photosensitive neurons control swimming in a jellyfish // *Science*, N.Y., 1977. – Vol. 197. – P. 186–188.
363. *Arndt E.A.* Die Aufgaben des Kerns während der Oogenese der Teleostee // *Z. Zellforsch.*, 1960. – Vol. 51. – II, № 3. – P. 356–378.
364. *Artigas P., Gadsby D.C.*  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -pump ligands modulate gating of palytoxin-induced ion channels // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003. – Vol. 100 (2). – P. 501–505.
365. *Arvanitaki A., Cholazonitis N.* Electrical properties and temporal organization in oscillatory neurons (*Aplysia*) // In: *Neurobiology of invertebrates.*, New York; Budapest: Plenum Press, 1968. – P. 169–199.
366. *Ashby W.* Design for brain. – London, 1960. – 161 p.
367. *Astolfi S., Zuchi S., Chiani A., Passera C.* In vivo and in vitro effects of cadmium on  $\text{H}^+$ -ATPase activity of plasma membrane vesicles from oat (*Avena sativa* L.) roots // *J. Plant. Physiol.*, 2003. – Vol. 160 (4). – P. 387–393.
368. *Bacer P.F., Hodgkin A.L. Shaw T.I.* Replacement of the axoplasm

of the giant nerve fibers with artificial solutions // *J.Physiol.(London)*, 1962. – Vol. 164. – P. 330–354.

369. Baksi S.N., Hughes M.J. Effects of chronic lead ingestion by the weanling rat on adrenal catecholamine levels // *J. Auton. Nerv. Syst.*, 1983. – Vol. 3. – P. 287–289.

370. Bal N., Wu C.C., Catty P., Guillain F., Mintz E. Cd<sup>2+</sup> and the N-terminal metal-binding domain protect the putative membranous CPC motif of the Cd<sup>2+</sup>-ATPase of *Listeria monocytogenes* // *Biochem. J.*, 2003. – Vol. 369 (3) – P. 681–685.

371. Balinsky B. I. Ober den Teilungsrhythmus bei der Entwicklung des Eies der Ascidie *Ciona intestinalis* // *W. Roux Arch. Entwicklungsmech. Organism*, 1931. – Vol. 125. – № 2–3. – P. 155–175.

372. Ball E.E., Case J.E. Electrical activity and behavior in the solitary hydroid *Corymorpha palma*. I. Conducting systems // *Biol.Bull.mar.biol.Lab.*, Woods Hole, 1973. – Vol. 145. – P. 243–264.

373. Batra N., Nehru B., Bansal M.P. Influence of lead and zinc on rat male reproduction at biochemical and histopathological levels // *J. Appl. Toxicol.*, 2001. – Vol. 21. – № 6. – P. 507–512.

374. Beck B.L., Henjum D.C., Antonijczuk K., Zaharia O., Korza G., Ozols J., Hopfer S.M., Barber A.M., Sunderman F.W. Jr. pNiXa, a Ni<sup>2+</sup>-binding protein in *Xenopus* oocytes and embryos, shows identity to Ep45, an estrogen-regulated hepatic serpin // *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 1992. – Vol. 77. – № 1. – P. 3–16.

375. *Benjamin W.B., Singer I.* Actions of insulin, epinephrine, and dibutyryl cyclic adenosine 5'-monophosphate on fat cell protein phosphorylations. Cyclic adenosine 5'-monophosphate dependent and independent mechanisms // *Biochemistry*, 1975. – Vol. 14. – P. 3301–3309.
376. *Belelli D., Callachan H., Hill-Venning C., Peters G.A., Lambert J.* Interaction of positive allosteric modulators with human and *Drosophila* recombinant GABA receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes // *Br.J.Pharmac*, 1996. – Vol. 118. – P. 563–576.
377. *Bellis S.L., Grosvenor W., Kass-Simon G., Rhoads D.E.* Chemoreception in *Hydra vulgaris* (*attenuata*): initial characterisation of two distinct binding sites for L-glutamin acid // *Biochim. biophys.Acta*, 1991. – Vol. 1061. – P. 89–94.
378. *Bennett M., Trincaus J.* Electrical coupling between embryonic cells by way of extracellular space and specialized junctions // *J. Cell. Biol.*, 1970. – Vol. 44. – № 3. – P. 592–610.
379. *Bennett M.V.L.* Electrical transmission: A functional analysis and comparison to chemical transmission // In: *Cellular Biology of Neurons*, 1976. – Vol.1., Sect.1. *Handbook of Physiology* ed. by E.R.Kandel, Baltimore, Williams and Wilkins.
380. *Bennett M.V.L.* Function of electrotonic junctions in embryonic and adult tissues // *Fed. Roc.*, 1973. – Vol. 32. – P. 65–75.
381. *Benzieger T.H.* The thermostabile control of human metabolic

heart production // Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1961. – V. 47. – P. 730–739.

382. *Berridge M.J.* Inositol trisphosphate and calcium signalling // Nature, 1993. – Vol. 361. – № 28. – P. 315–325.

383. *Berridge M.J.* Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers // J. Biochem., 1984. – Vol. 220. – P. 345–360.

384. *Beyersmann D., Hechtenberg S., Block C., Kirchherr H.* Effect of heavy metal ion on cellular regulation process // Abstr. 3-rd Eur. Meet. Environ. Hyg. Zentrale Hug und Wemweitmed, 1994. – Vol. 194. – № 4. – P. 345.

385. *Bianchini A., Wood C.M.* Physiological effects of chronic silver exposure in *Daphnia magna* // Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol., 2002. – Vol. 133 (1–2). – P. 137–145.

386. *Biggio G., Concas A., Corda M.G., Giorgi O., Sanna E., Serra M.* GABAergic and dopaminergic transmission in the rat cerebral cortex: effect of stress, anxiolytic and anxiogenic drugs // Pharmac. Ther., 1990. – Vol. 48. – P. 121–142.

387. *Birge W.J., Roberts O.W., Black J.A.* Toxicity of metal mixture to chick embryos. – Bull. Environ. Contam. Toxicol., 1976. – Vol. 16. – P. 314–318.

388. *Block M.L., Mody W.J.* Changes in sodium, calcium and potassium currents during early embryonic development of the ascidian // J. Physiol., 1987. – Vol. 393. – P. 619–634.

389. *Bodas E., Aleu J., Pujol G., Martin-Satue M., Marsal J., Solsona C.* ATP crossing the cell plasma membrane generates an ionic current in *Xenopus oocytes* // *J. Biol. Chem.*, 2000. – Vol. – 275, № 27. – P. 20268–20273.
390. *Bode H.R., Gee L.W., Chow M.A.* Neuron differentiation in *Hydra* involves dividing intermediates // *Dev.Biol.*, 1990. – Vol. 139(2). – P. 231–243.
391. *Boiteaux A.* The glycolytic oscillator: model for the cellular clock // *Hoppe-Seylers Ztschr. physiol. Chem.*, 1982. – Vol. 363. – № 6. – P. 540.
392. *Boominathan R., Doran P.M.* Organic acid complexation, heavy metal distribution and the effect of ATPase inhibition in hairy roots of hyperaccumulator plant species // *J. Biotechnol.*, 2003. – Vol. 101 (2). – P. 131–146.
393. *Boron W.F.* Intracellular pH regulation in epithelial cells // *Annu Rev. Physiol.*, 1986. – Vol. 48. – P. 377–388.
394. *Boyko N., Goyda O.* The heavy metal ion influence on membrane electric parameters and morphogenesis of loach embryo // *Book of Abstracts of 4th International Students' Scientific Conference, Gdansk, Poland.* – 1996. – P. 37.
395. *Bozhkova V.P.* The specificity of gap junctional channels in early fish embryos and its significance for pattern formation in development // *Membr Cell Biol.*, 1998. – Vol. 11. – P. 803–815.

396. *Brauner C.J., Wood C.M.* Effect of long-term silver exposure on survival and ionoregulatory development in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryos and larvae, in the presence and absence of added dissolved organic matter // *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, 2002. – Vol. 133 (1–2). – P. 161–173.
397. *Bryant H., Weinreich D.* Transsynaptic connections in *Aplysia* examined with tetraethylammonium // *J. Physiol. (London)*, 1978. – Vol. 244. – P. 181–195.
398. *Bumett A.L., Diehl N.A.* The nervous system of hydra. 1. Types, distribution and origin of nerve elements // *J. Exp. Zool.*, 1974. – Vol. 157. – P. 217–226.
399. *Burden H.W., Lawrence I.E., Jr.* Presence of biogenic amines in early rat development. // *Am. J. Anat.*, 1973. – Vol. 136. – P. 251–257.
400. *Burns C.P., Rozengurt E.* Extracellular  $\text{Na}^+$  and initiation of DNA synthesis: role of intracellular pH and  $\text{K}^+$  // *J. Cell Biol.*, 1984. – Vol. 98. – №3. – P. 1082–1089.
401. *Busenberg S., Tang B.* Mathematical models of the early embryonic cell cycle: the role of MPF activation and cyclin degradation // *J. Math. Biol.*, 1994. – Vol. 32. – № 6. – P. 573–596.
402. *Calberg M.* Localization of dopamine in the fresh water hydrozoan *Hydra attenuata* // *Cell. Tiss. Res.*, 1992. – Vol. 270. – P. 601–607.
403. *Calvert-Evers J.* Temporal variations in protein tyrosine



phosphatases and kinases during cell proliferation and differentiation // PhD thesis. – Johannesburg: Witwatersrand Univ., 2000. – 250 p.

404. *Calvino M.A., Pena C., Rodriguez de Lores Arnaiz G.* Metabotropic glutamate receptor involvement in phosphoinositide hydrolysis stimulation by an endogenous  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase inhibitor and ouabain in neonatal rat brain // *Brain. Res. Dev. Brain. Res.*, 2002. – Vol. 138 (2). – P. 167–175.

405. *Campbell R.D., Josephson R.K., Schwab W.E., Rushforth N.B.* Excitability of nerve-free hydra // *Nature, Lond.*, 1976. – Vol. 262. – P. 388–390.

406. *Carpenter D., Gunn R.* The dependence of pacemaker discharge of *Aplysia* neurons upon  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  // *J.Cell.Physiol.*, 1970. – Vol. 75. – P. 121–128.

407. *Carpenter D.O.* Ionic mechanisms and models of endogenous discharge of *Aplysia* neurones // *Symposium Neurobiol.Invert.*, Tihany, 1973. – P. 35–38.

408. *Carpenter S.I., Stahley I.* Placentale hermiabiliti of lead // *Environ. Hlth. Persp. exp. is.*, 1974. – Vol. 7. – P. 129–131.

409. *Castano P., Rossi S.* Cytochemical ultrastructural and fluorescence study of the nervous net of *Hydra* // *J.Sudmicrosc.Cytol.*, 1978. – Vol. 10. – P. 381–395.

410. *Castellucci V., Kandel E.R.* A quantal analysis of the synaptic depression underlying habituation of the gill withdrawal reflex in

Aplisia // Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 1974. – Vol. 71. – P. 5004–5008.

411. *Charp P. A., Whitson G. L.* Calcium and cyclic nucleotide interactions during the cell cycle // Nuclear-cytoplasmic interactions in the cell cycle. – N. Y.: Acad. press, 1980. – P. 309–333.

412. *Chen B., Hales B.F.* Cadmium-induced rat embryotoxicity in vitro is associated with an increased abundance of E-cadherin protein in the yolk sac // Toxicol. Appl. Pharmacol., 1994. – Vol. 128. – № 2. – P. 293–301.

413. *Chen R., Belelli D., Lambert J.J., Peters J.A., Reyes A.* Cloning and functional expression of a Drosophila Y-aminobutyric acid receptor // Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A., 1994. – Vol. 91. – P. 6069–6073.

414. *Chen X., Jennings D.B., Medeiros D.M.* Impaired cardiac mitochondrial membrane potential and respiration in copper-deficient rats // J. Bioenerg. Biomembr., 2002. – Vol. 34 (5). – P. 397–406.

415. *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.

416. *Christian M.S., Lightkep G.E.* Adaptation of the hydra assay for Applied Use // Teratology, 1982. – Vol. 25. – Iss. 2. – P. 134.

417. *Ciapa B., Pesando D., Wilding M., Whitaker M.* Cell-cycle calcium transients driven by cyclic changes in inositol trisphosphate levels // Nature, 1994. – Vol. 368. – P. 875–878.

418. *Clark W.R., Rutter W.J.* Synthesis and accumulation of insulin in the fetal rat pancreas. // Dev. Biol., 1972. – Vol. 29. – P. 468–481.

419. *Clarkson T. W.* Faktors involved in heavy metal poisoning // Fed. Proc. – 1977. – Vol. 36, – P. 1634–1639.
420. *Cole K.S., Curtis H.J.* Electric impedance of the squid giant axon during activity // J.Gen.Physiol, 1939. – P. 649–670.
421. *Concas A., Pierobon P., Mostallino M.C., Porcu P., Marino G., Minei R., Biggio G.* Modulation of gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors and the feeding response by neurosteroids in *Hydra vulgaris* // Neuroscience, 1998. – Vol. 85(3).– P. 979–988.
422. *Concas A., Santoro G., Serra M., Sanna E., Biggio G.* Neurochemical action of the general anaesthetic propofol on the chloride ion channel coupled with OABA $\pi$  receptors // Brain Res., 1991. – 542. – P.225–232.
423. *Cone C.D.*// Not. aeronaut and spase adm. Sci.: Publ, 1970. – P. 7164.
424. *Coombs J.S., Eccles J.C., Fatt P.* The specific ionic conductances and the ionic movements across the motoneural membrane that produce the inhibitory post-synaptic potential // J.Physiol.(London), 1955. – Vol. 130 – P. 326–373.
425. *Cottrell G.A., Lambert J.J., Peters J.A.* Modulation of GABA receptor activity by alphaxalone // Br.J.Pharmac., 1987. – Vol. 90. – P. 382–386.
426. *Cross M.N., Cross P.S., Brinster R.L.* Changes in membrane potential during mouse egg development // Develop. Biol., 1973. – Vol. 33. – № 2. – P. 412–416.

427. *Curtis H.J., Cole K.S.* Membrane resting and action potentials from the squid giant axon // *J.Cell.Comp.Physiol.*, 1942. – Vol. 19.–P. 135–144.
428. *Czech M. P.* Molecular basis of insulin action // *Annu. Rev. Biochem.*, 1977. – Vol. 46. – P. 359–384.
429. Dalton, 1958 – цитовано за Ходоров Б.И. Общая физиология возбудимых мембран. – М.: Наука, 1975. – 406 с.
430. *Dang Z.C., Berntssen M.H., Lundebye A.K., Flik G., Wendelaar Bonga S.E., Lock R.A.* Metallothionein and cortisol receptor expression in gills of Atlantic salmon, *Salmo salar*, exposed to dietary cadmium // *Aquat. Toxicol.*, 2001. – Vol. 53. – № 2. – P. 91–101.
431. *Darlison M.G.* Invertebrate GABA and glutamate receptors: molecular biology reveals predictable structures but some unusual pharmacologies // *Trends Neurosci.*, 1992. – Vol. 15. – P.469–474.
432. *Das, Busse H.G.* Long-term oscillation in glycolysis // *J. Biochem.*, 1985. – Vol. 97. – № 3. – P. 719–727.
433. *David C.N., Plotnick I.* Distribution of interstitial stem cells in hydra // *Development biology*, 1980. – Vol. 76.–P. 175–178.
434. *Davies A.G.* An assesmant of the basis of mercury tolerance in *Dunaliella tertiolecta* // *J. Mar. Biol. Ass. UK*, 1976. – Vol. 56. – P. 39–57.
435. *De Laat S., Buwalila P.J., Habets A.M.* Intracellular ionic dictribution, cell membrane permeability and membrane potential of

the *Xenopus* egg during first cleavage // *Exp. Cell Rez.*, 1974. – Vol. 89.  
– № 1 – P. 1–14.

436. *De Pablo F., Roth J., Hernandez E., Pruss R.M.* Insulin is present in chicken eggs and early chick embryos // *Endocrinology*, 1982. – Vol. 111. – P. 1909–1916.

437. *De Rome L., Gadd G.M.* Measurement of copper uptake in *Saccharomyces cerevisiae* using a  $\text{Cu}^{2+}$  – selective electrode // *FEMS Microbiol. Lett.*, 1987. – Vol. 43. – № 1. – P. 283–287.

438. *Deppe U., Schierenberg E., Cole T. et al.* Cell lineage of the embryo of the nematode *Caenorhabditis elegans* // *Proc. Nat. Acad. Sci. US*, 1978. – Vol. 75. – № 1. – P. 376–380.

439. *Dickmann Z., Dey S.K., Gupta J.S.* Steroidogenesis in rabbit preimplantation embryos. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1975. – Vol. 72. – P. 298–300.

440. *Dostal L.A., Hopfer S.M., Lin S.M., Sunderman F.W. Jr.* Effects of nickel chloride on lactating rats and their suckling pups, and the transfer of nickel through rat milk // *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1989. – Vol. 101. – № 2. – P. 220–231.

441. *Drechsel D.N., Hyman A.A., Hall A., Clotzer M.* A requirement for Rho and Cdc42 during cytokinesis in *Xenopus* embryos // *Current Biology*, 1997. – Vol. 7. – № 1. – P. 12–23.

442. *Dube F., Epel D.* The hierarchy of requirements for an elevated pHi during development of sea urchin embryos // *Cell*, 1985. – Vol. 40. – P. 657–666.

443. *Ducibella T., Anderson E.* The effect of  $\text{Ca}^{2+}$  on tight junction formation and fluid transport in the developing mouse embryos // *J. Cell. Biol.*, 1976. – P. 95–102.
444. *Dupont G., Golbeter A.* Oscillations et ondes de calcium intracellulaire // *Bul. Groupe Etude rythmes biol.*, 1993. – Vol. 25. – № 4. – P. 92.
445. *Dwivedi R.S., Kaur G., Strivastava R.C., Murti C.R.* Effect of tin on SH-containing enzymes in liver of rats // *Chemosphere*, 1983. – Vol. 12. – P. 330–340.
446. *Ed. Stein G.S., Baserga R., Giordano A., Denhardt D.T.* The molecular basis of cell cycle and growth control. – N.Y.: Wiley-Liss, 1999. – 389 p.
447. *Edmonds B., Gibb A.J., Colquhoun D.* Mechanisms of activation of glutamate receptors and the time course of excitatory synaptic currents // *Ann. Rev. Physiol.*, 1995. – Vol. 57. – P. 495–519.
448. *Edmunds L. N. (Jr.), Adams K. J.* Clocked cell cycle clocks // *Science*, 1981. – Vol. 211. – № 4486. – P. 1002–1013.
449. *Elbert T., Ray W.J., Kovalik Z.J. et al.* Chaos and physiology: deterministic chaos in excitable cell assemblies // *Physiol. Rev.*, 1993. – Vol. 74. – P. 1–47.
450. *Emanuelson H.* Cell multiplication in the chick blastoderm up to the time of laying // *Exp. Cell Res.*, 1965. – Vol. 39. – № 3. – P. 386–399.
451. *Epel D. B.* Experimental analysis of the role of intracellular

calcium in the activation of the sea urchin egg at fertilization // The cell surface mediator of developmental processes. – N. Y.L.: Acad. press, 1980. – P. 169–186.

452. *Fatt P., Katz B.* An analysis of the end-plate potential recorded with an intracellular electrode // J.Physiol.(London), – 1951 – Vol. 115. – P. 320–370.

453. *Fatt P., Katz B.* The effect of inhibitory nerve impulses on a crustacean nerve fibre // J.Physiol.(London), – 1953. – Vol. 121. – P. 374–389.

454. *Faurskov B., Bjerregaard H.F.* Chloride secretion in kidney distal epithelial cells (A6) evoked by cadmium // Toxicol. Appl. Pharmacol., 2000. – Vol. 163. – № 3. – P. 267–278.

455. *Ferreira G.M.N.* Reversible phosphorylation of proteins in proliferating and differentiating cells // PhD thesis. – Johannesburg: Witwatersrand Univ., 1994. – 374 p.

456. *Ffrench-Constant R.H., Roush R.T.* // Genet.Res., 1991. – Vol. 57. – P. 17–21.

457. *Fitzgerald P.R., Peterson J., Lue-Hing C.* Heavy metals in fluids and tissues of fetal calves and in young calves of nursing cows exposed or not exposed to anaerobically digested wastewater sludge // Am. J. Vet. Res., 1985. – Vol. 46. – № 1. – P. 165–168.

458. *Flickinger R.A., Freedman M.L., Stambrook P.J.* Generation times and DNA replication patterns of cells of developing frog embryos // Develop. Biol., 1967. – Vol. 16. – № 5. – P. 457–474.

459. *Foe V.E., Alberts B.M.* Studies of nuclear and cytoplasmic behaviour during the five mitotic cycles that precede gastrulation in *Drosophila* embryogenesis // *J. Cell. Sci.*, 1983. – Vol. 61. – P. 31–70.
460. *Froesch E.R., Schmid C., Schwander C., Zapf J.* Actions of insulin – like growth factors // *Annu. Rev. Physiol.*, 1985. – Vol. 47. – P. 443–467.
461. *Furshpan E. I., Potter D. D.* Low-resistance junctions between cells in embryos and tissue culture // *Curr. Top. Develop. Biol.*, 1968. – Vol. 3. – P. 95–128.
462. *Gadd G.M., Griffiths A.J.* Microorganisms and heavy metals toxicity // *Microb. Ecol.*, 1978. – Vol. 4. – № 1. – P. 303–317.
463. *Gainer H.* Patterns of protein synthesis in individual, identified molluscan neurons // *Brain Res.*, 1972. – Vol. 39. – P. 387–402.
464. *Gale T.F.* The interaction of mercury with cadmium and zinc in mammalian embryonic development // *Environ. Res.*, 1973. – Vol. 6. – P. 1341–1347.
465. *Gandhi C.S., Shuck K., Lear J.D. et al.* Cu(II) inhibition of the proton translocation machinery of the influenza A virus M2 protein // *J. Biol. Chem.*, 1999. – Vol. 274. – № 9. – P. 5474–5482.
466. *Geduldung D., Junge D.* Sodium and calcium components of action potentials in the *Aplysia* giant neurone // *J. Physiol. (London)*, 1968. – Vol. 199. – P. 347–365.
467. *Geduldung D., Gruener R.* Voltage clamp of the *Aplysia* giant neurone: Early sodium and calcium currents // *J. Physiol. (London)*, 1970. – Vol. 211. – P. 217–244.



468. *Gee K.W.* Steroid modulation of the GABA<sup>^</sup>enzodiazepine receptor-linked chloride ionophore // *Molec.Neurobiol.*, 1988. – Vol. 2. – P. 291–317.
469. *Geilenkirchen W. L. M., Jansen J., Coosen R., Vanwijk R.* Changes in content of cyclic AMP and cyclic GMP in eggs of *Mactra solidissima* during 2nd cleavage // *Cell Biol. Intern. Rep.*, 1977. – Vol. 1. – № 5 – P. 419–426.
470. *Gerencser G.A., Kornette K.M.* Intracellular K<sup>+</sup> activities in *Aplysia* gut: effects of transport inhibitors on the Na<sup>+</sup> pump // *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 1998. – Vol. 119. – № 2. – P. 563–567.
471. *Gil Z., Magleby K.L., Silberberg S.D.* Two-dimensional kinetic analysis suggests nonsequential gating of mechanosensitive channels in *Xenopus* oocytes // *Biophys. JSl.*, 2001. – P. 2082–2099.
472. *Gilani S.H., Alibhai Y.* Teratogenicity of metals to chick embryos // *J Toxicol Environ Health*, 1990. – Vol. 30. – № 1. – P. 23–31.
473. *Glenn B.S., Stewart W.F., Schwartz B.S., Bressler J.* Relation of alleles of the sodium-potassium adenosine triphosphatase alpha 2 gene with blood pressure and lead exposure // *Am. J. Epidemiol.*, – 2001. – Vol. 15. – № 6. – P. 537–545.
474. *Goering P.L., Klaassen C.D.* Altered subcellular distribution of cadmium following cadmium pretreatment: possible mechanism of tolerance to cadmium-induced lethality // *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1983. – Vol. 70. – № 2. – P. 195–203.

475. *Goida Ye.A., Oshchapovskii V.V., Sanagurskii D.I.* A new approach to the evaluation of the relationship of different parameters influencing the dynamics of the transmembrane potential in developing loach embryos // *Biophysics*, 1996. – Vol. 41. – № 2. – P. 386–389.
476. *Golgeberger A.L., West B.J.* Fractals in physiology and medicine // *Yale J. Biol. Med.*, 1987. – Vol. 60. – № 5. – P. 421–435.
477. *Graham C.F., Morgan R.W.* Changes in the cell cycle during early amphibian development // *Develop. Biol.*, 1966. – Vol. 14. – № 3. – P. 439–460.
478. *Grandin N., Charbonneau M.* Cycling of intracellular pH during cell division of *Xenopus* embryos is a cytoplasmic activity depending on protein synthesis and phosphorylation // *J. Cell Biol.*, 1990. – Vol. 111. – P. 523–532.
479. *Grbac-Ivankovic S., Antonijczuk K., Varghese A.H. et al.* Lipovitellin 2 beta is the 31 kD Ni<sup>2+</sup>-binding protein (pNiXb) in *Xenopus* oocytes and embryos // *Mol. Reprod. Dev.*, 1994. – Vol. 38. – № 3. – P. 256–263.
480. *Gries G.E., Wagner G.J.* Association of nickel versus transport of cadmium and calcium in tonoplast vesicles of oat roots // *Abstract Volume*, 1998. – Vol. 204. – № 3. – P. 390–396.
481. *Grimmelikhujzen C.J.P., Carstensen K., Darmer D. Et al.* Coelenterate neuropeptides: structure, action and biosynthesis // *Am. Zool.*, 1992. – Vol. 32. – P. 313–321.

482. *Grosvenor W., Bellis S.L., Kass-Simon G., Rhoads D.E.* Chemoreception in Hydra // *Chem. Senses*, 1992. – Vol. 21. – P. 313–321.
483. *Grundfest H., Kao C.I., Monroy A., Tyler A.* Existence of a resting potential in the egg of the starfish *Asterias forbesii* // *Biol. Bull*, 1955. – Vol. 100. – P. 346.
484. *Gu C. X., Juranka P. F., Morris C. E.* Stretch-activation and stretch-inactivation of shaker-IR, a voltage-gated  $K^+$ -channel // *Biophys. J*, 2001. – P. 2678–2693.
485. *Hagiwara S., Takahashi K.* Surface density of calcium ions and calcium spikes in the barnacle muscle fiber membrane // *J.Gen.Physiol.*, 1967. –Vol. 50. – P. 583–601.
486. *Hagiwara S., Yoshida S., Yoshii M.* Transient and delayed potassium currents in the egg cell membrane of the coelenterate *Renilla koellikeri* // *J. Physiol.*, 1981. – Vol. 318. – P. 123–141.
487. *Hales T.G., Lambert J.J.* The actions of propofol on inhibitory amino-acid receptors of bovine adrenomedullary chromaffin cells and rodent central neurons // *Br. J. Pharmac.*, 1991. – Vol. 104. – P. 619–628.
488. *Hamill O.P., Martinac B.* Molecular basis of mechanotransduction in living cells // *Physiol. Rev.*, 2001. – Vol. 81. – P. 685–740.
489. *Hammond C.* Cellular and Molecular Neurobiology // Academic Press. INSERM U.159. – Paris, – 1996. – P. 251–269.

490. *Han J.K.* Oscillation of inositol poliphosphates in the embryonic cleavage cycle of the *Xenopus laevis* // *Biochem. Biophys. Res Commun.*, 1995. – Vol. 206. – P. 775–780.
491. *Hanton D.P., Gale T.F., Ferm V.N.* Permiability of the syrian hamster placenta to manganous ions during early embryogenesis // *J.Reprod. Fert.*, 1975. – Vol. 44. – P. 109–112.
492. *Hara K; Tydeman P., Kirschner M.* A cytoplasmic clock with the same period as the division cycle in *Xenopus* eggs // *Proc. Nat. Acad. Sci. US*, 1980. – Vol. 77. – № 1. – P. 462–466.
493. *Harrison N.L., Majewska M.D., Harrington J.W., Barkes J.L.* Structure–activity relationships for steroid interaction with the Y-aminobutyric acidA receptor complex // *J.Pharmac.exp.Ther.*, 1987. – Vol. 241. – P. 224–231.
494. *Haspel J., Sunderman F.W. Jr., Hofper S.M. et al.* A nickel-binding serpin, pNiXa, induces maturation of *Xenopus* oocytes and shows synergism with oncogenic ras-p21 protein // *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 1993. – Vol. 79. – № 2. – P. 131–140.
495. *Hassel M., Berking S.* Lithium ions interfere with pattern control in *Hydra vulgaris* // *Roux Archives of Developmental Biology*, 1990. – Vol. 198. – Iss.7. – P. 382–388.
496. *Hassel M., Berking S.* Nerve-cell and nematocyte production in hydra is deregulated by lithium ions // *Roux Archives of Developmental Biology*, 1988. – Vol. 197. – Iss. 8. – P. 471–475.

497. *Hassen M., Leitz T., Muller W.A.* Signals and signal-transduction system in the control of development in Hydra and Hydractinia // *Int. J. Dev. Biol.* – Germany, 1996. – Vol. 40(1). – P. 323–330.
498. *Hauptman O., Albert D.M., Plowman M.C. et al.* Ocular malformations of *Xenopus laevis* exposed to nickel during embryogenesis // *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 1993. – Vol. 23. – № 6. – P. 397–406.
499. *Havelaar A.C., de Gast I.L., Snijders S. et al.* Characterization of a heavy metal ion transporter in the lysosomal membrane // *FEBS Lett.*, 1998. – Vol. 436. – № 2. – P. 223–227.
500. *Heauime M., Chambon J.P., Leyris R. et al.* Biochemical characterization of the interaction of three pyridazinyl-GABA derivatives with the GABA receptor complex // *Brain Res.*, 1986. – Vol. 384. – P. 224–231.
501. *Hess B.* Oscillation in multienzymatic systems. – В кн.: *IV Международный биофиз. конгресс.* – М.: 1972. – С. 154.
502. *Hess B.* The glycolytic oscillators // *J Exp. Biol.*, 1979. – Vol. 81. – P. 7–14.
503. *Hess P., Lansmann J.B., Tsien R.W.* Calcium channel selectivity for divalent and monovalent cations. Voltage and concentrations dependence of single channel current in ventricular heart cells // *J.Gen.Physiol.*, 1986. – Vol. 88. – № 2. – P. 293–319.
504. *Higgins I.J., Hammond R.C., Sariaslani F.S. et al.* Biotransformation of Hydrocarbons and Related Compounds by Whole

Organism Suspensions of Methane – Grown // Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1979. – Vol. 89. – № 2. – P. 671–677.

505. *Hille B.* Ionic basis of resting potentials and action potentials // In: Cellular Biology of Neurons Physiology. The Nervous system, 1976. – P.41.

506. *Hiramoto Y.* Changes in electric properties upon fertilization in the sea urchin eggs // Exp. Cell Res., 1959. – Vol. 18. – P. 421–424.

507. *Hirano T., Takahashi K.* Development of ionic channels and cell-surface antigens in the cleavage-arrested one-cell embryo of an ascidian // J. Physiol., 1987. – Vol. 386. – P.113–133.

508. *Hisanaga J; Sakai M.* Cytoplasmic dinein of the sea urchin egg. II. Purification, characterization and interactions with micro-tubule and Ca-calmodulin // J. Biochem., 1983. – Vol. 93. – №1. – P. 87–98.

509. *Hodgkin A.L., Huxley A.F., Katz B.* Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo* // J. Physiol. London, 1952. – Vol. 116. – P. 424–448.

510. *Hojima Y., Behta B., Romanic A.M., Prockop D.J.* Cadmium ions inhibit procollagen C-proteinase and cupric ions inhibit procollagen N-proteinase // Matrix. Biol., 1994. – Vol. 14. – № 2. – P. 113–120.

511. *Hollman M., O'Shea-Greenfid A., Rogers S.W., Heinemann S.* // Nature, 1989. – Vol. 342. – P. 643–648.

512. *Hopfer S.M., Fay W.P., Sunderman F.W. Jr.* Serum nickel concentrations in hemodialysis patients with environmental exposure // Ann. Clin. Lab. Sci., 1989. – Vol. 19. – № 3. – P. 161–167.

513. *Hopfer S.M., Plowman M.C., Sweeney K.R. et al.* Teratogenicity of  $\text{Ni}^{2+}$  in *Xenopus laevis*, assayed by the FETAX procedure // *Biol. Trace. Elem. Res.*, 1991. – Vol. 29. – № 3. – P. 203–216.
514. *Hori R.* On the membrane potential of the unfertilized eggs of medeke *Oryzias latipes* and changes accompanying activation // *Embryologia*, 1958. – Vol. 4. – P. 279–291.
515. *Hosie A.M., Sattelle D.B.* Allosteric modulation of an expressed homo-oligomeric GABA-gated chloride channel of *Drosophila melanogaster* // *Br.J.Pharmac.*, 1996. – Vol. 117. – P. 1229–1237.
516. *Howe P.H., Draetta G., Leof E.B.* Transforming growth faktor  $\beta_1$  inhibition of  $\text{p34}^{\text{cdc}2}$  phosphorylation and histone H1 kinase activity is associated with  $\text{G}_1/\text{S}$ -phase growth arrest // *Mol. and Cell. Biol.*, 1991. – Vol. 11. – P. 1185–1194.
517. *Hua S., Inesi G., Nomura H., Toyoshima C.*  $\text{Fe}^{2+}$ -catalyzed oxidation and cleavage of sarcoplasmic reticulum ATPase reveals  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP sites // *Biochemistry*, 2002. – Vol. 41(38). – P. 11405–11410.
518. *Huff R.L., Bik-Hes K.B.* Metabolism in vitro of a acetate and certain steroids by six-day-old rabbit blastocysts // *J. Reprod. Fertil.*, 1966. – Vol. 11. – P. 63.
519. *Huxley A., Stamfli R.* // *J.Physiol. (Gr.Brit.)*, 1951. – Vol. 112. – P.476.
520. *Hyne R.V., Rippon G.D., White J., Ellender G.* Accumulation of

uranium by freshwater hydra into discharged nematocysts // *Aquatic Toxicology*, 1992. – Vol. 23. – Iss. 3–4. – P. 231–245.

521. *Ishida K., Yasumasu I.* Accelerative effect of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate and dibutyl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate on the cleavage cycle of the sea urchin eggs // *Acta embryol. et morphol. exp.*, 1981. – № 2. – P. 115–119.

522. *Ishida K., Yasumasu I., Suzuki A.* Cyclic AMP shortens mitotic phase of sea urchin egg cleavage cycle // *Cell Differ. Suppl.*, 1985. – P. 119.

523. *Ishikawa M., Kohno T.* Effect of calmodulin on ATPase of isolated sea urchin egg-cortex // *Develop., Growth and Differ.*, 1984. – Vol. 26. – № 4. – P. 368.

524. *Itajama T., Sawada Y.* Development of electrical activity in regenerating aggregates of hydra cells // *J.Exp.Zool.*, 1995. – Vol. 273(6). – P. 519–526.

525. *Itayama J., Sawada O.S.* The recognition distribution and ultrastructure of hydrozoan nerve elements // *J. Morphol.*, 1995. – Vol. 123. – P. 43–62.

526. *Ito S., Sato E., Loewenstein W.R.* Studies of the formation of a permeable cell membrane junction. II. Evolving junctional conductance and junctional insulation // *J. Membr. Biol.*, 1974. – Vol. 19. – P. 339.

527. *Ivashkiv L., Humetskyi R., Sanagurskyi D.* Analysis of the dynamics of the physical-chemical characteristics during early



embryogenesis of loach under cytostatic and temperature influence // 4th Parnas Conference “Molecular mechanisms of cell activation: biological signals and their target enzymes”. – Wrocław, 2002. – P.63.

528. *Jaffe L.F.* Calcium explosions as triggers of development // *Ann. N. G. Acad. Sci.*, 1980. – Vol. 339. – P. 86-101.

529. *Jaffe L F.* Electrical control of development // *Ann. Bioph. Biog.*, 1977. – № 6. – P. 445–476.

530. *Jaffe L.F.* Organization of early development by calcium pattern // *Bioessays.*, 1999. – Vol 21. – P. 657–667.

531. *Jane A., Westfall J.A., Kelley L., Sayyar I.* Ultrastructure of neurons and synapses in the tentacle epidermis of sea anemone *Calliactis parasitica* // *Kansas State University, Manhattan, Dep. Of Anatomy and Physiology*, 1997. – P. 207–216.

532. *Johnson J.D., Epel D., Paul M.* Intracellular pH and activation of sea urchin eggs after fertilization // *Nature*, 1976. – Vol. 262. – P. 661–664.

533. *Jonas P., Bumashv N.* Molecular mechanisms controlling calcium entry through AMPA-type glutamate receptor channels // *Neuron*, 1995. – Vol. 15.– P. 987–990.

534. *Jonson E.M.* Use of Hydra for assesment of development Toxicity in vitro // *In Vitro–Journal of Tissue Culture Association*, 1984. – Vol. 20. – Iss. 3. – P. 262.

535. *Josephson R.K.* Conduction and contraction in the column of hydra // *J. Exp.Biol.*, 1967. – Vol. 47. – P. 179–190.

536. *Josephson R.K., Schwab W.E.* Electrical properties of an excitable epithelium // *J. Gen. Physiol.*, 1979. – Vol. 74. – P. 213–236.
537. *Kahn C.R., Baird K.* The fate of insulin bound to adipocytes. Evidence for compartmentalization and processing // *J. Biol. Chem.*, 1978. – Vol. 253. – P. 4900–4906.
538. *Kanno Y., Yamami T., Muneoka Y., Shiba Y.* Effects of heavy metal ions on the electrical properties of mucous epithelial cells in the newt stomach // *J. Toxicol. Sci.*, 1978. – Vol. 3. – № 1. – P. 39–50.
539. *Kapron-Bras C.M., Hales B.F.* Genetic differences in heart-induced tolerance to cadmium in cultured mouse embryos are not correlated with changes in a 68-kD heat shock protein // *Teratology*, 1992. – Vol. 46. – № 2. – P. 191–200.
540. *Kass-Simon G.* Coordination of juxtaposed muscle layers as seen in Hydra // *Coelenterate ecology and behavior* / Ed.G.O.Mackie. Plenum Press, New York, 1976. – P. 705–714.
541. *Kass-Simon G., Passano L.M.* A neuropharmacological analysis of the pacemakers and conducting tissues of *Hydra attenuata* // *J. comp. Physiol.*, 1978. – Vol.128.– P. 71–79.
542. *Katayama Y.* Electrophysiological identification of neurones and neural networks in the perioesophageal ganglion complex of the marine pulmonate, *Onchidium verruculatum* // *J. Exp. Biol.*, 1973. – Vol. 59. – P. 739–751.
543. *Kater S.B., Kanenko C.R.S.* An endogenously bursting neuron in

the gastropod mollusc, *Helistoma trivolis*: characterization of activity in vivo // *J. Comp. Physiol.*, 1972. – Vol. 79. – P. 1–14.

544. *Katz B., Miledi R.* Further study of the role of calcium in synaptic transmission // *J. Physiol. (London)*, 1970. – Vol. 207. – P. 789–801.

545. *Katz B., Miledi R.* Tetrodotoxin – resistant electrical activity in presynaptic terminals // *J. Physiol. (London)*, 1969. – Vol. 203. – P. 459–487.

546. *Katz B., Miledi R.* The effects of divalent cations on transmission in the squid giant synapse // *Publ. Sin. Zool. Napoli.*, 1969. – Vol. 37. – P. 303–310.

547. *Kaufman S., Wille J.J.* The mitotic oscillator in *Physarum polycephalum* // *J. Theor. Biol.*, 1975. – Vol. 55. – № 1. – P. 47–93.

548. *Keating T.J., Cork R.J., Robinson K.R.* Intracellular free calcium oscillations in normal and cleavage-blocked embryos and artificially activated eggs of *Xenopus laevis* // *J. Cell Science*, 1994. – Vol. 107. – P. 2229–2237.

549. *Keef K.D., Anderson U., O'Driscoll K., Ward S.M., Sanders K.M.* Electrical activity induced by nitric oxide in canine colonic circular muscle // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.*, 2002. – Vol. 282. – № 1. – P. 23–29.

550. *Kemp P.J., Kim K.J., Borok Z., Crandall E.D.* Re-evaluating the  $\text{Na}^+$  conductance of adult rat alveolar type II pneumocytes: evidence for the involvement of cGMP-activated cation channels // *J. Physiol.*, 2001. – Vol. 1. – № 536 (Pt. 3). – P. 693–701.

551. *Kilburn K.H., Warshaw R., Boylen C.T. et al.* Cross-shift and chronic effects of stainless-steel welding related to internal dosimetry of chromium and nickel // *Am. J. Ind. Med.*, 1990. – Vol. 17. – № 5. – P. 607–615.
552. *Kim M.S., Kim B.J., Woo H.N. et al.* Cadmium induces caspase-mediated cell death: suppression by Bcl-2 // *Toxicology*, 2000. – Vol. 145. – № 1. – P. 27–37.
553. *Kimelman D., Kirschner M.* Sinergistic induction of mesoderm by FGF and TGF- $\beta$  and the identification of an mRNA coding for FGF in the early *Xenopus* embryo // *Cell*, 1987. – Vol. 51. – P. 869–877.
554. *Kinnamon J.C., Westfall J.A.* Types of neurons and synaptic connections at hypostome–tentacle junctions in *Hydra* // *Jurnal of Morphology*, 1982. – Vol. 173(1). – P.119–128.
555. *Klaasen C.D.* Heavy metals and heavy metals antagonists // *The pharmacological basis of therapeutics/ Ed. A.Y. Gilman.* – New York, 1980. – P. 1615–1637.
556. *Kleinhaus A.L., Prichard J.W.* Sodium dependent tetrodotoxin-resistant action potentials in a leech neuron // *Brain Res.*, 1976. – Vol. 102. – P. 368–373.
557. *Knight J.A., Plowman M.R., Hopfer S.M., Sunderman F.W. Jr.* Pathological reactions in lung, liver, thymus, and spleen of rats after subacute parenteral administration of nickel sulfate // *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 1991. –Vol. 21. – № 4. – P. 275–283.

558. *Koizumi O., Bode H.R.* Plasticity in the nervous system of adult hydra. III. Conversion of neurons to expression of a vasopressin – like immunoreactivity depends on axial location // *J. Neurosci.*, 1991. – Vol. 11(7). – P. 2011–2020.
559. *Koizumi O., Heimfeld S., Bode H.R.* Plasticity in the nervous system of adult hydra. II. Conversion of ganglion cells of the body column into epidermal sensory cells of the hypostome // *J.Dev.Biol.*, 1988. – Vol. 129(2). – P.358–371.
560. *Koizumi O., Mizumoto H., Sugiyama T., Bode H.R.* Nerve net formation in the primitive nervous system of Hydra-an overview // *Neurosci. Res. Suppl.*, 1990. – № 13. – P. 165–170.
561. *Koizumi T., Yokota T., Shirakura H., Tatsumoto H., Suzuki K.T.* Potential mechanism of cadmium-induced cytotoxicity in rat hepatocytes: inhibitory action of cadmium on mitochondrial respiratory activity // *Toxicology*, 1994. – Vol. 92. – № 1–3. – P. 115–125.
562. *Kostellow A.B., Morril G.A.* Intracellular sodium ion concentration changes in the early amphibian embryo and the influence on nuclear metabolism // *Exp. Cell Res.*, 1968. – Vol. 50. – № 3. – P. 639–644.
563. *Kotyza J., Varghese A.H., Korza G., Sunderman F.W. Jr.* Interactions of serine proteinases with pNiXa, a serpin of *Xenopus* oocytes and embryos // *Biochim. Biophys. Acta.*, 1998. – Vol. 1382. – № 2. – P. 266–276.

564. *Kotyzova D., Sundeman F.W.* Maternal exposure to Cd(II) causes malformations of *Xenopus laevis* embryos // *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 1998. – Vol. 28. – № 4. – P. 224–235.
565. *Kozuka M., Takahashi K.* Changes in holding and ion-channel // *J. Physiol.*, 1982. – Vol. 323. – P. 267–286.
566. *Kroeger H., Lezzi M.* Regulation of gene action in insect development // *Annual. Rev. Entomol.*, 1966. – Vol. 11. – P. 1–22.
567. *Lambert J.J., Belelli D., Hill-Venning C., Peters J.A.* Neurosteroids and GABA receptor function // *Trends pharmac.Sci.*, 1995. – Vol. 16. – P. 295–303.
568. *Lan N.C., Chen J.S., Belelli D. et al.* A steroid recognition site is functionally coupled to an expressed recombinant human Y-aminobutyric acidA receptors // *J.Neurochem.*, 1991. – Vol. 57.– P. 1818–1821.
569. *Lane M., Baltz J.M., Bavister B.D.* Regulation of intracellular pH in Hamster preimplantation embryos by the sodium hydrogen ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ) antiporter // *Biol. Reprod.*, 1998. – Vol. 59. – P. 1483–1490.
570. *Lange O.* Całość i rozwój w swietle cybernetyki. – Warszawa: PWN, 1962. – P. 544–546.
571. *Larson R.A.* Plant defenses against oxidative stress // *Arch. Insect. Biochem. and Physiol.*, 1995. – Vol. 29. – № 2. – P. 175–186.
572. *Lee D.C., Rochford R., Torado G.J., Villareal L.P.* Developmental expression of rat transforming growth faktor- $\alpha$  RNA // *Mol. Cell. Biol.*, 1985. – Vol. 5. – P. 3644–3646.

573. *Lee J.H., Gomora J.C., Cribbs L.L., Perez-Reyes E.* Nickel block of three cloned T-type calcium channels: low concentrations selectively block  $\alpha_1H$  // *J. Biophys.*, 1999. – Vol. 77. – № 6. – P. 3034–3042.
574. *Lenhoff H.M., Heagy W., Denner J.* Bioassay for, and characterization of, activators and inhibitors of the feeding response // in *Hydra Research Methods* (Lenhoff H.M.). – Plenum, New York, 1983. – P. 443–451.
575. *Lessler M.A., Walters M.S.* Erythrocyte Osmotic fragility in the presence of  $Pb^{2+}$  or  $Hg^{2+}$  // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1973. – Vol. 142. – P. 548–553.
576. *Levesque H.M., Dorval J., Hontela A., Van Der Kraak G.J., Campbell P.G.* Hormonal, morphological, and physiological responses of yellow perch (*Perca flavescens*) to chronic environmental metal exposures // *J. Toxicol. Environ. Health. A.*, 2003. – Vol. 66 (7). – P. 657–676.
577. *Lewin B.* Driving the cell cycle: M phase kinase, its partners and substrates // *Cell*, 1990. – Vol. 61. – P. 743–752.
578. *Lewis C.G., Belniak R.M., Hopfer S.M., Sunderman F.W. Jr.* Cobalt in periprosthetic soft tissue. Observations in 6 revision cases // *Acta. Orthop. Scand.*, 1991. – Vol. 62. – № 5. – P. 447–450.
579. *Lewis M., Worobey J., Ramsay D.S., McCormack M.K.* Prenatal exposure to heavy metals: effect on childhood cognitive skills and health status. |// *Pediatrics.*, 1992 – Vol. 89. – № 6. – P. 1010–1015.

580. *Lienesch L.A., Dumont J.N., Bantle J.A.* The effect of cadmium on oogenesis in *Xenopus laevis* // *Chemosphere.*, 2000. – Vol. 41. – № 10. – P. 1651–1658.
581. *Liu T., Nakashima S., Hirose K. et al.* A metallothionein and CPx-ATPase handle heavy-metal tolerance in the filamentous cyanobacterium *Oscillatoria brevis* // *FEBS Lett.*, 2003. – Vol. 542 (1-3). – P. 159–163.
582. *Llinas R., Nicholson C.* Calcium role in depolarization secretion coupling: an aequorin study in squid giant synapse // *Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.*, 1975. – Vol. 72. – P. 187–190.
583. *Lloyd A., Rossi E.L.* Ultradian rhythms in life process. – London: Springer-Verlag, 1992. – 419 p.
584. *Lloyd D., Poole R.K., Edwards S.W.* The cell division cycle: temporal organization and control of cell growth and reproduction. – N.Y.: Acad. Press, 1982.
585. *Loomis W.F.* Glutathione contractions of *Hydra* // *Ann. N.Y.Acad.Sci.* – 1969. – Vol. 156. – 62. – P.209–228.
586. *Loomis W.F., Lenhoff H.M.* Growth and sexual differentiation of *Hydra* in mass culture // *J.Exp.Zool.*, 1956. – Vol.132. – P. 555–573.
587. *Loutrup-Rein H., Nelson L, Lovtrup S.* Changes in the content of ATP and GTP during the development of *Xenopus laevis* // *Exp. Cell Res.*, 1974. – Vol. 86. – № 1. – P. 206–209.
588. *Lucis O.I., Shaik J.A., Embril I.A.* Cadmium as a trace element and



cadmium binding component in human cells // *Experientia*. – 1970. – Vol. 26. – P. 1109–1110.

589. *Luddens H., Wisden W.* // *Trends Pharmacol.Sci.*, 1991. – Vol. 12. – P. 49–51.

590. *Luft J.H.* Improvements in epoxy resin embedding methods // *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 1961. – Vol. 9. – P. 409–414.

591. *Lumb G.D., Sunderman F.W. Sr.* The problem of latency in the development of tumors following exposure to nickel compounds // *Sci. Total. Environ.*, 1994. – Vol. 148. – № 2–3. – P. 185–190.

592. *Lummis S.C.R., Nicoletti G., Johnston G.A.R., Holand G.* Gamma-aminobutyric acid–modulated benzodiazepine binding sites in bacteria // *Life Sci.*, 1991. – Vol. 49. – P.1079–1086.

593. *Lundquist A.A.* quantitative analysis of mitotic gradients during early development in *Calliphora erythrocephala* Meie (Diptera) // *J. Morphol.*, 1981. – Vol. 168. – № 3. – P. 239–245.

594. *Lunt G.G.* GABA and GABA receptors in invertebrates // *Semin.Neurosci.*, 1991. – Vol. 3. – P. 251–258.

595. *Luo S.Q., Plowman M.C., Hopfer S.M., Sunderman F.W. Jr.* Embryotoxicity and teratogenicity of  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  for *Xenopus laevis*, assayed by the FETAX procedure // *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 1993. – Vol. 23. – № 2. – P. 111–120.

596. *Luo S.Q., Plowman M.C., Hopfer S.M., Sunderman F.W. Jr.*  $\text{Mg}^{2+}$ -deprivation enhances and  $\text{Mg}^{2+}$ -supplementation diminishes the

embryotoxic and teratogenic effects of  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , and  $\text{Cd}^{2+}$  for frog embryos in the FETAX assay // *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 1993. – Vol. 23. – № 2. – P. 121–129.

597. *Macdonald R.L., Olsen R.W.* CABAA receptor channels // *Rev. Neurosci.*, 1994. – Vol. 17. – P. 569–602.

598. *Macfie S.M., Tarmohamed Y., Welbourn P.M.* Effect of cadmium, cobalt and nickel on growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: The influence of cell wall and pH // *Arch. Env. Contam. Toxicol.*, Vol. 27. – № 4. – P. 454–458.

599. *Mackie G.O.* Coordination in physonectid siphonophores // *Mar. Behav. Physiol.*, 1978. – Vol. 5. – P. 325–346.

600. *Maeno T.* Electrical characteristics and activation potential of *Bufo* eggs // *J. Gen. Physiol.*, 1959. – Vol. 43. – P. 139–157.

601. *Majewska M.D., Harrison N.L., Schwarts R.D. et al.* Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor // *Science*, 1986. – Vol. 232. – P. 1004–1007.

602. *Makowski G.S., Lin S.M., Brennan S.M. et al.* Detection of two Zn-finger proteins of *Xenopus laevis*, TFIIIA, and p43, by probing western blots of ovary cytosol with  $^{65}\text{Zn}^{2+}$ ,  $^{63}\text{Ni}^{2+}$ , or  $^{109}\text{Cd}^{2+}$  // *Biol. Trace. Elem. Res.*, 1991. – Vol. 29. – № 2. – P. 93–109.

603. *Maller J.L. Koontz J.M.* A study of the induction of cell division in amphibian oocytes by insulin // *Dev. Biol.*, 1981. – Vol. 85. – P. 309–316.

604. Maller J.L. Xenopus oocytes and the biochemistry of cell division // *Biochemistry*, 1990. – Vol. 29. – P. 3157–3166.
605. *Mano Y.* Regulation system of protein synthesis in early embryogenesis in the sea urchin // *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1968. – Vol. 33. – № 5. – P. 877–882.
606. *Marcum B.A., Dark D.A.* Structural and functional organization of the nervous system in hydra. 1. Feeding behavior recovery during repopulation of nerve free Hydra // *American Zoologist*, 1985.– Vol. 25.– IssA – P.101.
607. *Mark G. Darlison.* Invertebrate GABA and glutamate receptors // *J. molecular biology reveals predictable structures but some unusual pharmacologies* // *TINS*, 1992. – Vol. 15. – № 12.
608. *Markovich D., James K.M.* Heavy metals mercury, cadmium, and chromium inhibit the activity of the mammalian liver and kidney sulfate transporter sat-1 // *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1999. – Vol. 154. – № 2. – P. 181–187.
609. *Markovich D., Knight D.* Renal Na-Si cotransporter NaSi-1 is inhibited by heavy metals // *Am. J. Physiol.*, 1998. – Vol. 274. – № 2. – P. 283–289.
610. *Maroto R., Hamill O.P.* Brefeldin a block ofIntegrin-dependent mechanosensitive ATP release from xenopus oocytes reveals a novel mechanism of mechanotransduction // *J. Biol. Chem.*, 2001. – Vol. 276. – P. 23867–23872.

611. *Mason A.Z., Simkiss K.* Sites of mineral deposition in metal-accumulating cells // *Exp. Cell. Res.*, 1982. – Vol. 139. – № 2. – P. 383–391.
612. *Massa E.M., Morero R.D., Bloj B., Farias R.N.* Hormone action and membrane fluidity: effect of insulin and cortisol on the Hill coefficients of rat erythrocyte membrane-bound acetylcholinesterase and (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1975. – Vol. 66. – P. 115–122.
613. *McBain C.J., Mayer M.L.* NMDA–receptor structure and function // *PhysiolRev.*, 1994. – Vol. 74. – P. 723–759.
614. *McDonald T., Sachs H., Orr C., Ebert J.* External potassium and bady Hamster Kidney cells: intracellular ions, ATP, growth, DNA-synthesis and membrane potential // *Develop. Biol.*, 1972. – Vol. 28. – P. 290–303.
615. *Medeiros D.M., Jennings D.* Role of copper in mitochondrial biogenesis via interaction with ATP synthase and cytochrome c oxidase // *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2002. – Vol. 34 (5). – 389–395.
616. *Medina I., Bregestovski P.* Sensitivity of stretch-activated K<sup>+</sup> channels changes during cell-cleavage cycle and may be regulated by camp-dependent protein kinase // *Proc. Roy Soc. London*, 1991. – Vol. 245. – №1278. – P. 95–102.
617. *Meech R.W., Stander N.B.* Potassium activation in *Helix aspersa* under voltage clamp: A component mediated by calcium influx // *J. Physiol.(london)*, 1975. – Vol. 249. – P. 211–239.

618. *Meeker G.* Intracellular potassium requirement for protein synthesis and mitotic apparation in sea urchin eggs // *Exp. Cell Res.*, 1970. – Vol. 63. – P. 165–170.
619. *Meinelt T., Playle R.C., Pietrock M. et al.* Interaction of cadmium toxicity in embryos and larvae of zebrafish (*Danio rerio*) with calcium and humic substances // *Aquat. Toxicol.*, 2001. – Vol. 54. – № 3–4. – P. 205–215.
620. *Mel H.C., Reed T.A.* Biophysical responces of red cell-membrane sestems to very low concentrations of inorganic mercury // *Cell Biophysics*, 1981. – Vol. 3. – № 3. – P. 233–250.
621. *Mendes P., Kell D.B.* Nonlinear optimization of biochemical pathways:applications to metabolic engineering and parameter estimation // *Bioinform.*, 1998. – Vol. 14. – P. 869–883.
622. *Mendes P., Kell D.B.* Numerical optimization and simulation for rational metabolic engeneering // In *BioThermoKinetics in the past genomic era* Eds. C.Harsson, I.-L.Pahlman and H. Gustaffson, Chalmers Reproservice. Gateborg, 1998. – P. 348–349.
623. *Mertz W.* Some aspekts of nutritional trace element research // *Fed. Proc.*, – 1970. – Vol. 29. – P. 1482–1488.
624. *Mesiano S., Browne C.A., Thorburn G.D.* Detection of endogenous epidermal growth factor – like activity in the developing chick embryo // *Dev. Biol.*, 1985. – Vol. 110. – P. 23–28.
625. *Miledi R.* Transmitter release induced by injection of calcium ions

into nerve terminals // Proc.R.Soc.London, 1973. – Vol. 183. – P. 412–425.

626. *Minobe S., Koizumi O., Sugiyama T.* Nerve cell differentiation in nerve-free tissue of epithelial hydra from precursor cells introduced by grafting. I. Tentacles and hypostome // Dev. Biol., 1995. – Vol. 172(1). – P. 170–181.

627. *Mita I., Obata C.* Timing of early morphogenic events in leleapluid starfish embryos // Ibid., 1984. – Vol. 229. – № 2. – P. 215–222.

628. *Mitani S.* The reduction of calcium current associated with early differentiation of the murine embryo // J. Physiol. (Lond.), 1985. – Vol. 363. – P. 71–86.

629. *Mitchison J.M.* The Biology of Cell Cycle // Cambridge Univ. Press., 1971. – P. 313.

630. *Mizejewski G.J., Antelman D.E., Keenan J.F., Preiss I.L.* Effects of heavy metals on alpha-fetoprotein in maternal sera and amniotic fluid of pregnant mice // Toxicology, 1990. – Vol. 64. – № 1. – P. 19–32.

631. *Moody W.J., Bosma M.M.* A nonselective cation channel activated by membrane deformation in oocytes of the ascidian *Boltenia Villosa* // J. Memb.Biol., 1989. – Vol. 107. – P. 179–188.

632. *Moore R.D.* Effects of insulin upon ion transport // Biochim. et biophys. acta., 1983. – Vol. 737. – № 1. – P. 1–49.

633. *Morpeth F.F., Massey V.* Metal binding to D-lactate

- dehydrogenase // *Biochemistry*, 1982. – Vol. 21. – № 6. – P. 1318–1323.
634. *Morril G., Kostellow A., Murphy J.* Sequetal from of ATP-ase activity of correlated with changes in cation binding and membrane potential from meiosis to first cleavage in *Rana pipiens* // *Exp. Cell. Res.*, 1971. – Vol. 66. – P. 288–298.
635. *Morril G., Watson D.* Transmembrane electropotential changes in amphibian eggs at ovulation, activation and first cleavage // *J. Cell. Physiol.*, 1966. – Vol. 67. – P. 85–92.
636. *Morris C.E.* Mechanosensitive ion channels // *Membr. Biol.*, 1990. – Vol. 113. – P. 93–97.
637. *Mountcastle V.B., Baldessarini R.J.* Sinaptic transmission // In: *Medical Physiology*, 13th ed., 1974. – Vol. 1.– ed by V.B. Montcastle. St Louis, Mosby, P. 12–223.
638. *Muller E., Nells A.* Cations plant hormones and the cell potential in maïse coleoptiles. – *Exchanges ioniques transmembran. veg. Colleg.*, Roven-Paris, 1977. – P. 377–385.
639. *Murray A.W., Kirschner M.W.* Dominoes and clocks: the union of two views of cell cycle regulation // *Science*, 1989. – Vol. 246. – P. 614–621.
640. *Muto A., Kumo S., Inoue T. et al.* Calcium waves along the cleavage furrows in cleavage-stage *Xenopus* embryos ant its inhibition by heparin // *J. Cell Biol.*, 1996. – Vol. 135. – P. 186–190.
641. *Naab F., Volcomirsky M., Burlon A. et al.* Metabolic alterations without metal accumulation in the ovary of adult *Bufo arenarum*

females, observed after long-term exposure to  $Zn^{2+}$ , followed by toxicity to embryos // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 2001. – Vol. 41. – № 2. – P. 201–207.

642. *Nakamura T. Y., Iwata Y., Sampaolesi M. et al.* Stretch-activated cation channels in skeletal muscle myotubes from sarcoglycan-deficient hamsters // *Am. J. Physiol.*, 2001. – Vol. 281. – P. 690–699.

643. *Nangia P., Mookerjee S.* Nerve commitment during head regeneration in *Hydra* // *Indian J. Exp. Biol.*, 1991. – №12. – P.1152–1154.

644. *Narahashi T.* Chemical as tools in the study of excitable membranes // *Physiol.Revs.*, 1974. – Vol. 54. – P.813–889.

645. *Nasu T., Shibata A.*  $Na^{+}$ -independent glucose utilization during  $Mn^{2+}$ -induced contraction in ileal longitudinal smooth muscle // *Eur. J. Pharmacol.*, 1997. – Vol. 27. – № 333 (2-3). – P. 199–205.

646. *Obeyesekere M.N., Tucker S.L., Zimmerman S.O.* Mathematical model for the cellular concentration of cyclin and MPF // *Biochem. and Biophys Res. Com.*, 1992. – Vol. 184. – № 2. – P. 782–789.

647. *Obrig T.G., Culp W.J., McKeehan W.L., Hardesty B.* The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. // *J. Biol Chem.*, 1971. – Vol. 246. – P. 174–181.

648. *Ochiai E.I.* Toxicity of heavy metals and biological defense: principles and application in bioinorganic chemistry // *J. Chem. Educ.*, 1995. – Vol. 72. – № 6. – P. 479–484.



649. *Ohara K.* // *Develop. Biol.*, 1988. – Vol. 122. – № 2. – P. 333–356.
650. *Ohashi M., Satoh K., Itoh T.* Acetylcholine-induced membrane potential changes in endothelial cells of rabbit aortic valve // *Br. J. Pharmacol.*, 1999. – Vol. 126. – № 1. – P. 19–26.
651. *Okamura Y., Takahashi K.* Neural induction suppresses early expression of the inward-rectifier  $K^+$  channel in the ascidian blastomere // *J. Physiol.*, 1993. – Vol. 463. – P. 245–268.
652. *Okazaki Y; Mabuchi I., Kimura I., Sakai H.* Binding sites of SH reagents in dividing sea urchin egg // *Exp. Cell Res.*, 1973. – Vol. 82. – № 2. – P. 325–334.
653. *Oliver A.E., Deamer D.W., Akeson M.* Evidence that sensitivity to steroid anesthetics appears late in evolution // *Brain Res.*, 1991. – Vol. 557. – P. 298–302.
654. *Onosaka S, Kawakami D, Min KS, Oo-Ishi K, Tanaka K.* Induced synthesis of metallothionein by ascorbic acid in mouse liver // *Toxicology*, 1987. – Vol. 43. – № 3. – P. 251–259.
655. *Orr C., Ioshikawa-Fukada M., Ebert J.* Potassium effect on DNA synthesis and multiplication of baby hamster kidney cells // *Proc. Nat. Ac. Sci. USA*, 1972. – Vol. 69. – P. 243–247.
656. *Owen J.M., Quinn C.C., Leach R. et al.* Effect of extracellular cations on the inward rectifying  $K^+$  channels Kir2.1 and Kir3.1/Kir3.4 // *Exp. Physiol.*, 1999. – Vol. 84. – № 3. – P. 471–488.
657. *Owen N.E., Villereal M.L.* Efflux of Ca from human fibroblasts in

response to serum or growth factors // *J. Cell Physiol.*, 1983. – Vol. 117.  
– № 1. – P. 23–29.

658. *Pannacione A., Pierobon P., Kass-Simon G.* Aminoacid transmission in Hydra//*Soc. Neurosci Abstr.*, 1996. – Vol. 22. – P. 529.

659. *Passano L.M.* Behavioral control system in medusae: a comparison between hydro- and scyphonomedusae // *Publ. Setomar. biol. Lab.*, 1973.–Vol. 20. – P. 615–645.

660. *Passano L.M., McCullough C.B.* Coordinating Systems and behavior in Hydra. II.The rhythmic potential system // *J. Exp. BioL*, 1964. – Vol. 42. – P. 205–231.

661. *Passano L.M., McCullough C.B.* The light response and the rhythmic potentials of hydra // *Proc. Nath. Acad. Sci. U.S.A.*, 1962. – Vol. 48. – P. 1376–1382.

662. *Paul S.M., Purdy R.H.* Neuroactive steroids // *Fedn. Am. Socsexp. Biol.*, 1992. – Vol. 6. – P. 2311–2322.

663. *Pawlic-Skowronska B., Skowronski T.* Cyanobacteria and its interaction to heavy metals // *Wiad. Bot.*, 1996. – Vol. 40. – № 3–4. – P. 17–30.

664. *Paynton B.V.* RNA-binding proteins in mouse oocytes and embryos: expression of gene encoding Y box, DEAR box RNA helicase and polyA binding proteins // *Developmental Genetics*, 1998. – Vol. 23. – № 4. – P. 285–298.

665. *Peluffo R.D., Berlin J.R.* Electrogenic  $K^+$  transport by the  $Na^+-K^+$

pump in rat cardiac ventricular myocytes // *J. Physiol.*, 1997. – Vol. 15. – № 501. – P. 33–40.

666. *Perez-Coll C.S., Herkovits J., Salibian A.* Effects of cadmium on the development of an amphibian // *Arch. Biol. Med. Exp. (Santiago)*, 1985. – Vol. 18. – № 1. – P. 33–39.

667. *Peters J.A., Kirkness E.F., Callachan M., Lambert J.J., Turner A.J.* Modulation of the OABA $\pi$  receptor by depressant barbiturates and pregnane steroids // *Br.J.Pharmac.*, 1988. – Vol. 94. – P. 1257–1269.

668. *Peters J.M., Duncan J.R., Wiley L.M., Keen C.L.* Influence of antioxidants on cadmium toxicity of mouse preimplantation embryos in vitro // *Toxicology*, 1995. – Vol. 99. – № 1–2. – P. 11–18.

669. *Petzelt C.* Further evidence that Ca<sup>2+</sup>-activated ATP-ase is connected with the cell cycle // *Ibid.*, 1972. – Vol. 74. – № 1. – P. 156–162.

670. *Phillips K.P., Leveille M.C., Claman P., Baltz J.M.* Intracellular pH regulation in human preimplantation embryos // *Human Reproduction*, 2000. – Vol. 15. – № 4. – P. 896–904.

671. *Piek T.* *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology. Nervous System: Structure and Motor Function.*// Perhamon Press., 1985. – Vol. 11. – P. 55–118.

672. *Pierobon P., Concas A., Santoro G. et al.* Biochemical and functional identification of GABA receptors in *Hydra vulgaris* // *Life Sci.* – Italy, 1995. – Vol. 56(18). – P. 1485–1497.

673. *Piersma A.H., Roelen B., Roest P. et al.* Cadmium-induced inhibition of proliferation and differentiation of embryonal carcinoma cells and mechanistic aspect of protection by zinc // *Teratology*, 1993. – Vol. 48. – № 4. – P. 335–341.
674. *Pillai A., Laxmi Priya P.N., Gupta S.* Effects of combined exposure to lead and cadmium on pituitary membrane of female rats // *Arch. Toxicol.*, 2002. – Vol. 76 (12). – P. 671–675.
675. *Plowman M.C., Grbac-Ivankovic S., Martin J. et al.* Malformations persist after metamorphosis of *Xenopus laevis* tadpoles exposed to  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ , or  $\text{Cd}^{2+}$  in FETAX assays // *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, 1994. – Vol. 14. – № 3. – P. 135–144.
676. *Plowman M.C., Peracha H., Hopfer S.M., Sunderman F.W. Jr.* Teratogenicity of cobalt chloride in *Xenopus laevis*, assayed by the FETAX procedure // *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, 1991. – Vol. 11. – № 2. – P. 83–92.
677. *Pool R.* Is healthy to be chaotic ? // *Science*, 1989. – Vol. 243. – P. 604–607.
678. *Popper H.H., Woldrich A., Grigar E.* Comparison of chromate and vanadate toxicity and its relationship to oxygen radical formation // *Zbl. Hyg. Und Umweltmed*, 1991. – Vol. 194. – № 4. – P. 373.
679. *Porciatti F., Di Francesso D.* High  $\text{Na}^+$  permeability of L-type  $\text{Ca}^{2+}$ -channels in isolated rabbit SA node cells // *J. Physiol.*, 1990. – Vol. 426. – P. 18.

680. Powers R.D., Tupper J.T. Ion transport and permeability of the mouse egg // *Exp. Cell Res.*, 1975. – Vol. 91. – P. 413–421.
681. Prakash N.T., Rao K.S. Modulation an antioxidant enzymes in different tissues of marine bivalve *Perna viridis* during heavy metal exposure // *Mol. Cell. Biochem.*, 1995. – Vol. 146. – № 2. – P. 107–113.
682. Pringle J. W.S. On the parallel between bearing and evolution. – In: *Behavior*, 1951. – P. 174.
683. Rapkine L. Chemical processes during cellular division // *Ann. physiol. et phys.-chim. biol.*, 1931. – Vol. 7. – P. 382–417.
684. Rauh J.J., Vassalo J.G., Lummis S.C.R. et al. Steroids reveal differences between GABA-operated chloride channels of insects and vertebrates // *Molec. Neuropharmac.*, 1993. – Vol. 43. – P. 1–9.
685. Rebhun L.I. Calcium, sulfhydryls and the mitotic apparatus // *Amer. Zool.*, 1976. – Vol. 16. – № 3. – P. 469–482.
686. Resh M.D., Nemenoff R.A., Guidotti G. Insulin stimulation of (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-adenosine triphosphatase-dependent 86Rb<sup>+</sup> uptake in rat adipocytes. // *J. Biol. Chem.*, 1980. – Vol. 255. – P. 10938–10945.
687. Revilla A., Bennet M.V., Barrio L.C. Molecular determinants of membrane potential dependence in vertebrate gap junction channels // *Proc. Natl. Acad. Sci U.C.A.*, 2000. – Vol. 97. – № 26. – P. 14760–14765.
688. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy // *Journal of Cell Biology*, 1963. – Vol. 17. – P.208–212.

689. Ringelband U. Salinity dependence of vanadium toxicity against the brackish water hydroid *Cordylophora caspia* // *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2001. – Vol. 48. – № 1. – P. 18–26.
690. Rink T., Tsien R.Y., Warner A.E. Free calcium in *Xenopus* embryos measured with ion-selective microelectrodes // *Nature*, 1980. – Vol. 283. – № 5748. – P. 658–660.
691. Rizzino A Early mouse embryo prodyce and release faktors with transforming growth faktor activity // *In Vitro*, 1985. – Vol. 21. – P. 531–536.
692. Robson E.A. The behaviour and neuomuskular system of *Gonactinia prolifera*, a swimming sea-anemone // *J. Exper. Biol.*, 1971. – Vol. 55. – P. 611–640.
693. Rosen B.P. Transport and detoxification systems for transition metals, heavy metals and metalloids in eukaryotic and prokaryotic microbes // *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.*, 2002. – Vol. 133 (3). – P. 689–693.
694. Sakaguchi M., Mizusina A., Kobayakawa Y. Structure, development and maintenance of the nerve net of the body column in *Hydra* // *J.Comp.Neurol.*, 1996. – Vol. 334(1). – P. 41–45.
695. Sakai H., Dan K. Studies on sulfhydryl groups during cell division of sea urchin eggs // *Exp. Cell Res.*, 1959. – Vol. 16. – № 1. – P. 24–41.
696. Sakharov D.A., Salaki J. Physiological and pharmacological identification of neurons system of *Helix pomatia* // *J.Gen.Physiol.*, 1969. – Vol. 35. – P. 19–30.

697. Salanki J., Kiss I. Identified cells in the central nervous system of *Lymnea stagnalis* (Gastropoda) // *Annal.BioL*, Tihany, 1969. – Vol. 36. – P. 63–75.
698. Salanki Y., D'eri Y., Platokhin A., Sh -Rozsa K. The neurotoxicity of environmental pollutants: the effects of tin ( $\text{Sn}^{2+}$ ) on acetylcholine-induced currents in greater pond snail neurons // *Neurosci. Behav. Physiol.*, 2000. – Vol. 30. – № 1. – P. 63–73.
699. Sanagursky D.I., Tsymbryk A.E. Using the cybernetic framework in simulation of the riboflavin pathway in *Pichia guilliermondii* and prediction the response of its to genetic perturbation // *Conference of genetics and molecular biology for students and young scientists.* – Lviv, 2000. – P. 72.
700. Savinell J.M., Palsson B.O. Network analysis of intermediary metabolism using linear optimisation. I. Development of mathematical formalism // *J. Theor. Biol.*, 1992. – Vol. 154. – P. 421–454.
701. Sawai T. Cyclic changes in the cortical layer of non-nucleated fragments of newt's egg // *J. Embryol. and Exp. Morphol.*, 1979. – Vol. 51. – P. 163–193.
702. Scavo L., Alemany J., Roth J., de Pablo F. Insulin-like growth factor I activity is stored in the yolk of the avian egg // *Biochem. And Biophys. Res. Communs.*, 1989. – Vol. 162. – P. 1167–1173.
703. Schaeffer J.M., Bergstrom A.R. Identification of gamma-aminobutyric acid and its binding sites in *Coenorhabditis elegans* // *Life Sci.*, – 1988. – Vol. 43. – P. 1701–1706.

704. Schaller H.C., Hermans-Borgmeyer I., Hoffmeister S.A. Neuronal control of development in Hydra // *Int.J.Dev.Biol.*, 1996. – Vol. 40(1). – P. 339–344.
705. Schiffer R.B., Sunderman F.W. Jr., Baggs R.B., Moynihan J.A. The effects of exposure to dietary nickel and zinc upon humoral and cellular immunity in SJL mice // *J. Neuroimmunol.*, 1991. – Vol. 34. – № 2–3. – P. 229–239.
706. Schmidt-Nielsen B. Osmoregulation: effect of salinity and heavy metals // *Fed.Proc.*, 1974. – Vol. 33. – № 10 – P. 2137–2146.
707. Schroeder H.A., Nason A.P. Interaction of trace metals in rat tissues. Cadmium and nickel with zinc, chromium, copper, and manganese // *J. Nutr.*, 1974. – Vol. 104. – P. 167–178.
708. Schubert J. Chelating agents in biological systems // *Environ. Hlth.*, 1981. – Vol. 2414. – P. 629–633.
709. Scott B.J., Bradwell A.R. Identification of the serum binding proteins for iron, zinc, cadmium, nickel and calcium // *Clin. Chem.*, 1983. – Vol. 2414. – P. 629–633.
710. Serra M., Foddi C., Chiani C.A. et al. Pharmacology of  $\gamma$ -aminobutyric acidA receptors complex after the in vivo administration of the anxiolytic and anticonvulsant P-carboline derivative abecamil // *J.Pharmac.exp.Ther.*, 1992. – Vol. 263. – P. 1360–1368.
711. Shen S.S., Steinhardt R.A. Direct measurement of intracellular pH during metabolic depression of the sea urchin egg // *Nature*, 1978. – Vol. 272. – № 5650. – P. 253–254.



712. *Shigemoto T., Okada Y.* External-anion-dependent anionic current in blastoderm cells of early medaka fish embryo // *J. Physiol. (Lond.)*, 1996. – Vol. 495. – P. 51–63.
713. *Shinagawa A.* The internal of the cytoplasmic cycle observed in non-nucleate egg fragments is longer than that of the cleavage cycle in normal eggs of *Xenopus laevis* // *J. Cell. Sci.*, 1983. – Vol. 64. – P. 147–162.
714. *Shinozaki H.* *Prog // Neurobiol.*, 1988. – Vol. 30. – P. 399–35.
715. *Shtauber J.L., Florence T.M.* Mechanism of toxicity of ionic copper and copper complexes to algae // *Mar. Biol.*, 1987. – № 94. – P. 511–519.
716. *Shuba M.F.* TTX-sensitive Na- and nifedipin-sensitive  $Ca^{2+}$  channels in rat vas deferens smooth muscle cells. // *J. Biochem. and Biophys. Acta.*, 1999. – Vol. 1419. – P. 343–352.
717. *Shuba M.F.* Voltage-dependent inhibition of the muscarinic cationic current in guinea-pig ileal cells by SK&F96365. // *British J. Pharmacology*, 2000. – Vol. 129 (4). – P. 695–702.
718. *Shukla G.S., Chandra S.V.* Effects of manganese on carbohydrate metabolism and mitochondrial enzymes in rats // *Acta. Pharmacol. Toxicol.*, 1982. – Vol. 51. – № 3. – P. 209–216.
719. *Signoret J., Lefresne J.* Détermination par incorporation de thymidine tritiée des phases du cycle cellulaire chez le germe d'*Axolotl* et période synchrone de la segmentation // *C. r. Acad. sci. D.*, 1974. – Vol. 279. – № 14. – P. 301–313.

720. *Sillers P., Forer A.*  $\text{Ca}^{++}$  in fertilization and mitosis: the phosphatidylinositol cycle in sea urchin gametes and zygotes is involved in control of fertilization and inilisis // *Cell Biol. Intern. Rep.*, 1985. – Vol. 9. – № 3. – P. 275–281.
721. *Slack C., Warner A.* Intracellular and extracellular potential in the early amphibian embryo // *J. Physiol. A.*, 1973. – Vol. 232. – P. 313–330.
722. *Slack C., Warner A.E., Warner R.L.* The distribution of sodium and potassium in amphibian embryos during early development // *J. Physiol.*, 1973. – Vol. 232. – P. 297–312.
723. *Sliider G., Begg D. A.* Control mechanisms of the cell cycle: role of the spatial arrangement of spindle components in the timing events // *Ibid.*, 1983. – Vol. 97. – № 3. – P. 877–886.
724. *Spenser A.N.* Chemical and electrical synaptic transmission in the Cnidaria (ed. Anderson P.A.V.). Plenum. – New York, 1989. – P. 33–53.
725. *Spenser A.N., Satterie R.A.* Electrical and dye-coupling in a identified group of neurons in a coelenterate // *J. Neurobiol.*, 1980. – Vol. 11. – P. 13–19.
726. *Spenser A.N., Schwab W.E.* Symple nervous systems. 3. Hydrozoa // *Shellton. England*, 1980. – P. 73–147.
727. *Stampfli R., Nishie S.* *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta.*, 1956. – Vol. 14. – P. 93.
728. *Stephano J.L., Gould M.C.* The intracellular calcium increase at fertilisation in *Urechis caupo* oocytes: activation without waves // *Dev. Biol.*, 1997. – Vol. 191. – № 1. – P. 53–68.

729. *Stokes D.R., Rushforth N.B.* Contraction pulse system in hydroids // *Comp.Biochem.Physiol.*, 1979. – Vol. 64A. – P. 207–212.
730. *Stoytchev T., Kadiiska M.* Heavy metals and enzyme induction // *Acta. Physiol. Pharmacol. Bulg.*, 1983. – Vol. 9. № 1. – P. 29–34.
731. *Strumwasser F.* Neuronal principles organizing periodic behaviours. In: *The Neurosciences: Third Study Mass., M.I.T // Press.*, 1974. – P. 459–478.
732. *Strumwasser F.* Types of information stored in single neurons. In: *invertebrate Nervous Systems: Their significance for Mammalian Neurophysiology // Conference on invertebrate Nervous System*, ed by C.A.G.Wiersma, Chicago University of Chicago Press., 1967. – P. 291–319.
733. *Sunderman F.W. Jr.* Carcinogenicity of metal alloys in orthopedic prostheses: clinical and experimental studies // *Fundam. Appl. Toxicol.*, 1989. – Vol. 13. – № 2. – P. 205–216.
734. *Sunderman F.W. Jr.* Mechanisms of nickel carcinogenesis // *Scand. J. Work. Environ. Health*, 1989. – Vol. 15. – № 1. – P. 1–12.
735. *Sunderman F.W. Jr.* Search for molecular mechanisms in the genotoxicity of nickel // *Scand. J. Work. Environ. Health*, 1993. – Vol. 19. – P. 75–80.
736. *Sunderman F.W. Jr.* The influence of zinc on apoptosis // *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 1995. – Vol. 25. – № 2. – P. 134–142.
737. *Sunderman F.W. Jr., Hopfer S.M., Nichols W.W. et al.* Chromosomal abnormalities and gene amplification in renal cancers

induced in rats by nickel subsulfide // *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 1990. – Vol. 20. – № 1. – P. 60–72.

738. *Sunderman F.W. Jr., Hopfer S.M., Plowman M.C., Knight J.A.* Carcinogenesis bioassays of nickel oxides and nickel-copper oxides by intramuscular administration to Fischer-344 rats // *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 1990. – Vol. 70. – № 1. – P. 103–113.

739. *Sunderman F.W. Jr., Hopfer S.M., Sweeney K.R. et al.* Nickel absorption and kinetics in human volunteers // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1989. – Vol. 191. – № 1. – P. 5–11.

740. *Sunderman F.W. Jr., Mongillo F.J., Plowman M.C., Brennan S.M.* Uptake and release of  $^{63}\text{Ni}^{2+}$  by *Xenopus* embryos during early cleavage stages // *Biol. Met.*, 1990. – Vol. 2. – № 4. – P. 214–218.

741. *Sunderman F.W. Jr., Plowman M.C., Hopfer S.M.* Embryotoxicity and teratogenicity of cadmium chloride in *Xenopus laevis*, assayed by the FETAX procedure // *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 1991. – Vol. 21. – № 6. – P. 381–391.

742. *Sunderman F.W. Jr., Plowman M.C., Kroftova O.S.* Effects of teratogenic exposures to  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ , and  $\text{Cu}^{2+}$  on metallothionein and metallothionein-mRNA contents of *Xenopus* embryos // *Pharmacol. Toxicol.*, 1995. – Vol. 76. – № 3. – P. 178–184.

743. *Sunderman F.W. Jr., Varghese A.H., Kroftova O.S. et al.* Characterization of pNiXa, a serpin of *Xenopus laevis* oocytes and embryos, and its histidine-rich, Ni(II)-binding domain // *Mol. Reprod. Dev.*, 1996. – Vol. 44. – № 4. – P. 507–524.

744. *Sunderman F.W., Plowman M.C., Hopfer S.M.* Teratogenicity of cadmium chloride in the South African frog, *Xenopus laevis* // IARC Sci. Publ., 1992. – Vol. 118. – P. 249–256.
745. *Supritiowicz F.A., Muzia D.* Fluctuation of lick  $\text{Ca}^{2+}$ -sequestering activity of permeabilized sea urchin embryos during the cell cycle // Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1985. – Vol. 82. – № 8. – P. 2389–2393.
746. *Swann K., Whitaker M.* Stimulation of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -exchanger of sea urchin eggs by phorbol ester // Nature, 1985. – Vol. 314. – № 6008. – P. 274–277.
747. *Swanson C.A., Arkin A.P., Ross J.* An endogenous calcium oscillator may control early embryonic division // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997. – Vol. 94. – P. 1194–1199.
748. *Szubinska B.* Further observations on the morphology of the yolk in the Teleostei // Acta biol. Cracov., ser. Zool., 1961. – Vol. 4. – P. 1–19.
749. *Taglietti V., Toselli M.* A study of stretch-activated channels in the membrane of frog oocytes: interactions with  $\text{Ca}^{2+}$  ions // J. Physiol., 1988. – Vol. 407. – P. 311–328.
750. *Takahashi K., Okamura Y.* Ion channels and early development of neural cell // Physiological Rev., 1998. – Vol. 78. – № 2. – P. 307–337.
751. *Takeda K., Kawamura M.* The functional unit of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase is a monomeric  $\alpha$  protomer // Biochem. Biophys. Res. Commun., 2001. – Vol. 280. – № 5. – P. 1364–1366.

752. *Takeuchi A., Takeuchi N.* On the permeability of the presynaptic terminal of the butyric acid // *J.Physiol.*, 1966. – Vol. 183. – P. 433–449.
753. *Technau U., Holstein T.W.* Phenotypic maturation of neurons and continuous precursor migration in the formation of the peduncle nerve net in Hydra // *Dev.Biol.*, 1996. – Vol. 177 (20). – P. 599–615.
754. *Templeton D.M., Sunderman F.W. Jr., Herber R.F.* Tentative reference values for nickel concentrations in human serum, plasma, blood, and urine: evaluation according to the TRACY protocol // *Sci. Total. Environ.*, 1994. – Vol. 148. – № 2–3. – P. 243–251.
755. *Teragawa C.K., Bode H.R.* Migrating interstitial cells differentiate into neurons in hydra // *Dev.BioL*, 1995. – Vol. 171 (2). –P. 286–293.
756. *Thaker J., Chhaya J., Nuzhat S. et al.* Effects of chromium (VI) on some ion-dependent ATPases in gills, kidney and intestine of a coastal teleost *Periophthalmus dips* // *Toxicology*, 1996. – Vol. 112. – № 3. – P. 237–244.
757. *Thoman M., Gerhart J.C.* Absence of dorsal-ventral differences in energy metabolism in early embryos of *Xenopus laevis* // *Dev. Biol.*, 1979. – Vol. 68. – P. 191–202.
758. *Thompson J., Bannigan J.* Effects of cadmium on formation of the ventral body wall in chick embryos and their prevention by zinc pretreatment // *Teratology*, 2001. – Vol. 64. – № 2. – P. 87–97.
759. *Towle D.W., Baksinski A., Richard N.E., Kordylewski M.* Characterisation of an endogenous  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter in *Xenopus Laevis* oocytes // *J. Exp. Biol.*, 1991. – Vol. 159. – P. 359–569.

760. *Tsien R.W.* Calcium channels stores and oscillations // *Annu.Rev.Cell.Biol.*, 1990. – № 6. – P. 715–760.
761. *Tupper J., Saunders J., Edwards Ch.* The onset of electrical communication between cells in the developing starfish embryo // *J. Cell Biol.*, 1970. – Vol. 46. – № 1. – P. 187–191.
762. *Tupper J.T.* Potassium exchangeability, potassium permeability and membrane potential: Some observation in relation to protein synthesis in the early echinoderm embryo // *Develop. Bid.*, 1973. – Vol. 32. – № 1. – P. 140–154.
763. *Twardzik D.R.* Differential expression of transforming growth faktor  $\alpha$  during prenatal development of the mouse // *Cancer Res.*, 1985. – Vol. 45. – P. 5413–5416.
764. *Tyzio R., Goida O.* Electrical activity parameters of *Hydra oligactis* Pallas ectoderm cells // Fourth International Stud. Scientific Conference. Gdansk, Poland. Book of abstracts, 1996. – P. 36.
765. *Tyzio R., Goida O.* Electrical activity changes of *Hydra oligactis* Pallas cells under influence of heavy metals ions // 41-st Biophysical Society Annual Meeting. New Orleans, Louisiana, USA, 1997. – P. 2444.
766. *Van den Biggelaar J. A. M.* Timing of the phases of the cell cycle with tritiated thymidine and feulgen cytophotometry during the period of synchronous division in *Lumnaea* // *J. Embryol and Exp. Morphol.*, 1971. – Vol. 26. – № 3. – P. 351–366.
767. *Van Haarlem R., Van Wijk R., Fikkert A. H. M.* Analysis of the variability in cleavage times and demonstration of a mitotic gradient

during the cleavage stages of *Nothobranchius guen-their* // Cell and Tissue Kinet., 1981. – Vol. 14. – № 3. – P. 285–300.

768. *Vandenberg R.J., Mitrovic A.D., Johnston G.A.* Molecular basis for differential inhibition of glutamate transporter subtypes by zinc ions // Mol. Pharmacol., 1998. – Vol. 54. – № 1. – P. 189–196.

769. *Venturini G., Carolei A.* Dopaminergic receptors in Hydra. Pharmacological and biochemical observations // Comp.Biochem.Physiol., 1992. – Vol. 102. – P. 39–43.

770. *Venugopal B., Luckey T.D.* Metal toxicity in mammals. – New York: Plenum press., 1978. – Vol. 2. – 409 p.

771. *Vijverberg H.P., Oortgiesen M., Leinders T., Van-Kleef R.G.* Metal interactions with voltage- and receptor-activated ion channels // Environ. Health. Perspect., 1994. – Vol. 102. – № 3. – P. 153–158.

772. *Voskoboinik I., Camakaris J., Mercer J.F.* Understanding the mechanism and function of copper P-type ATPases // Adv. Protein. Chem., 2002. – Vol. 60. – P. 123–150.

773. *Wald F.* Ionic differences between somatic and axonal action potentials in snail giant neurones // J.Physiol.(London), 1972. – Vol. 220. – P. 267–281.

774. *Waldegger S., Schmidt F., Herzer T. et al.* Heavy metal mediated inhibition of rBAT-induced amino acid transport // Kidney Int., 1995. – Vol. 47. – № 6. – P. 1677–1681.

775. *Wanek N., Campbell R.D., Marcum B.A.* Histological structure of



epithelial hydra and evidence for the complete absence of interstitial and nerve cells // *J. Experimental Zoology*, 1980. – Vol. 212. – P. 1–11.

776. *Ward D.G., Cavieres J.D.* Inactivation of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  – ATPase following  $\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{ATP}$  binding at a low affinity site in the protomeric enzyme unit // *J. Biol. Chem.*, 2003. V. 278 (17). – P. 14688–14697.

777. *Weber W.M.* Endogenous ion channels in oocytes of *Xenopus laevis*: recent developments // *Membrane Biol.*, 1999. – Vol. 170. – P. 1–12.

778. *Weisenberg R. C.* Microtubule formation in vitro in solutions containing low calcium concentrations // *Science*, 1972. – Vol. 177. – № 4054. – P. 1104–1105.

779. *Westfall J.A.* Ultrastructure of synapses in the first-evolved nervous systems // *J. Neurocytol.*, 1996. – Vol. 25 (12). – P. 735–746.

780. *Westfall J.A., Argast D.R.* Neuronal distributions in the pedal disk of *Hydra* // *American Zoologist.*, 1982. – Vol. 22. – Iss.4. – P. 935.

781. *Westfall J.A., Argast D.R.* Neuronal distributions in the pedal disk of *Hydra*: Multifunctional features of a gastrodermal sensory cell in *Hydra*: three-dimensional study // *J. Neurocytol.*, 1991. – Vol.20 (4). – P. 251–261.

782. *Whitaker M., Irvint R.* Inositol 1,4,5-trisphosphate microinjection activation sea urchin eggs // *Nature*, 1984. – Vol. 312. – P. 636–639.

783. *Wilson-Shaw D., Robinson M., Gambarana C. et al.* // *FEBS Lett.*, 1991. – Vol. 284. – P.211–215.

784. *Woodward D.J.* Electrical sings of new membrane production during cleavage of *Rana pipiens* eggs // *J. Gen. Physiol.*, 1968. – Vol. 52. – № 3. – P. 509–531.
785. *Woodward D.J.* Electrophysiological correlates of cell division in frog eggs // *Physiologist.*, 1965. – №2. – P. 308–314.
786. *Yamuuchi T., Fujisuwa H.* A calmodulin-depcndciit protein kinase that is involved in the activation of tryptophan-5-monooxyge-nase is especially distributed in brain tissues // *FEBS Lett.*, 1981. – Vol. 129. – № 1. – P. 117–119.
787. *Yang O., Angerer R.C., Angerer L.M.* An EGF-like protein in sea urchin embryos // *Ibid.*, 1989.– Vol. 109. – P. 306a.
788. *Yao Y., Choi J., Parker I.* Quantal puffs of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  evoked by inositol trisphosphate in *Xenopus* oocytes // *J. Physiol.*, 1995. – Vol. 482. – P. 533–553.
789. *Yasumasu I., Fujiwara A., Ishida K.* Periodic change in the content of adenosine 3'5'-cyclic monophosphate with close relation to the cycle of cleavage in the sea urchin egg. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1973. – Vol. 54. – P. 628–632.
790. *Yucebilgic G., Bilgin R., Tamer L., Tukul S.* Effects of lead on  $\text{Na}^+, \text{K}^+ - \text{ATPase}$  and  $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$  activities and lipid peroxidation in blood of workers // *Int. J. Toxicol.*, 2003. Vol. 22 (2). – P. 95–97.
791. *Zapf J., Schoenle E., Froesch E.R.* Insulin-like growth factors I and II: some biological actions and receptor binding characteristics of two

purified constituents of nonsuppressible insulin-like activity of human serum // *Eur. J. Biochem.*, 1978. – Vol. 87. – P. 285–296.

792. *Zhang G.H., Yamaguchi M., Kimura S.* Effect of heavy metal on rat liver microsomal  $\text{Ca}^{2+}$  - ATP-ase and  $\text{Ca}^{2+}$  sequestering. Relation to SH groups // *J. Biol. Chem.*, 1990. – Vol. 265. – № 4. – P. 2184–2189.

793. *Zhang Y., Gao F., Popov V.L. et al.* Mechanically gated channel activity in cytoskeleton-deficient plasma membrane blebs and vesicles from *Xenopus* oocytes // *J. Physiol. Lond.*, 2000. – Vol. 523. – P. 117–130.

794. *Zhang Y., Hamill O.P.* Calcium-, voltage- and osmotic stress-sensitive currents in *Xenopus* oocytes and their relationship to single mechanically gated channels // *J. Physiol. Lond.*, 2000. – Vol. 523. – P. 83–99.

795. *Zhang Y., Hamill O. P.* On the discrepancy between whole-cell and membrane patch mechanosensitivity of *Xenopus* oocytes // *J. Physiology*, 2000. – Vol. 523. – № 1. – P. 101–115.

796. *Zichittella A.E., Shi H.G., Arguello J.M.* Reactivity of cysteines in the transmembrane region of the  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase alpha subunit probed with  $\text{Hg}^{2+}$  // *J. Membr. Biol.*, 2000. – Vol. 1. – № 177 (3). – P. 187–197.

797. *Zierler K.J.* Sodium flux and distribution in skeletal muscle.- *Scand. J. Clin. and Lab. Universit.*, 1972. V. 29. – P. 343–349.

## Зміст

Перелік умовних позначень.....	3
Вступ.....	6
Розділ 1. БІОЕЛЕКТРОГЕНЕЗ ТА МЕТАБОЛІЗМ	
1.1. Трансмембранний біоелектрогенез на ранніх стадіях ембріонального розвитку тварин.....	8
1.2. Зміни метаболічних процесів на ранніх стадіях ембріонального розвитку тварин.....	23
1.3. Зміни концентрації вторинних посередників та медіаторів у ранніх ембріональних циклах зародків тварин.....	30
1.4. Залежність між змінами біоелектричних і метаболічних процесів у початковому онтогенезі тварин.....	37
Розділ 2. ВПЛИВ ФІЗИЧНИХ ТА ХІМІЧНИХ ЧИННИКІВ НА БІОЕЛЕКТРОГЕНЕЗ	
2.1. Вплив катіонів важких металів на біологічні об'єкти.....	42
2.2. Катіони важких металів та транспортні властивості мембран.....	49
2.3. Токсикологічні аспекти дії катіонів важких металів на біологічні об'єкти, та модифікуючий їхній вплив на ТМП зародків в'юна.....	52
2.4. Безперервне реєстрування ТМП.....	79
2.5. Визначення активності $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -активованої, $\text{Mg}^{2+}$ - залежної АТФ-ази в гомогенаті клітин зародків в'юна.....	85
2.6. Електронно-мікроскопічне дослідження клітин зародків в'юна.....	87
2.7. Зміни ТМП в процесі раннього розвитку в'юна, пов'язані з тривалістю клітинних циклів.....	88
2.8. Вплив температури інкубаційного середовища на ритміку ТМП у зародків в'юна, що розвиваються.....	91
2.9. Вплив біологічно активних речовин на йонні градієнти, транспортні властивості мембран і величину ТМП.....	94
2.10. Проблема гормонального регулювання обміну речовин у ранньому ембріогенезі.....	97

2.11.	Дія колхіцину на величину і характер коливань ТМП зародків в'юна.....	102
2.12.	Характеристика ТМП зародків в'юна за наявності в середовищі інкубування гідрокортизону.....	105
2.13.	Вплив різних концентрацій інсуліну на динаміку ТМП у ранньому розвитку в'юна.....	107
2.14.	Зміни ТМП зародків в'юна під впливом адреналіну.....	111
2.15.	Динаміка ТМП зародків в'юна, що розвиваються, при сумісній дії інсуліну та адреналіну.....	114
2.16.	Зміни динаміки ТМП зародків в'юна, що розвиваються, інгібуванням трансляції і транскрипції.....	118
2.17.	Вплив актиноміцину Д на ТМП зародків в'юна.....	118
2.18.	Зміни ТМП під впливом пуроміцину і циклогексїміду.....	120
2.19.	Модифікація гормональних ефектів відносно динаміки ТМП зародків в'юна при інгібуванні у них трансляції і транскрипції.....	122
Розділ 3. АНАЛІТИЧНІ МЕТОДИ АНАЛІЗУ КОЛИВАНЬ ТМП		
3.1.	Спектральний аналіз періодичних коливань ТМП зародків в'юна у нормі та за умов впливу катіонів важких металів.....	129
3.2.	Зміна активності $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -активованої, $\text{Mg}^{2+}$ -залежної АТФ-ази мембран зародків в'юна внаслідок впливу катіонів важких металів.....	139
Розділ 4. УЛЬТРАСТРУКТУРА ЗАРОДКІВ ТА МОДИФІКУЮЧІ ВПЛИВИ		
4.1.	Зміна ультраструктури бластомерів зародків в'юна на різних стадіях розвитку у нормі та під впливом катіонів важких металів.....	150
Розділ 5. АЛГОРИТМИ ПОБУДОВИ «ЛОГІЧНИХ» СТРУКТУР, СХЕМ, ЯК АНАЛОГ БІОЛОГІЧНИХ ЧВИЩ		
5.1.	Якісний та порівняльний аналіз динаміки біоелектричних, енергозабезпечувальних і мембранно-транспортних процесів у ранньому ембріогенезі в'юна та шпорцевої жаби.....	184

5.2.	Аналіз часових співвідношень аперіодичних змін, метаболічних і біоелектричних характеристик зародків в'юна у період дроблення.....	202
5.3.	Дослідження коливних змін клітинних характеристик у ранньому ембріогенезі зародків в'юна.....	220
5.4.	Зміни метаболічних і біоелектричних показників за нормальних та екстремальних умов розвитку зародків в'юна.....	239
5.5.	Оцінення часових залежностей між змінами біоелектричних, енергозабезпечуваних і мембранно-транспортних характеристик зародків шпорцевої жаби на стадії дроблення.....	246
5.6.	Співставлення часових взаємозв'язків між динамікою досліджуваних процесів у ранньому ембріогенезі в'юна та шпорцевої жаби.....	251
Розділ 6. СХЕМИ І МОДЕЛІ МЕМБРАННОЗВ'ЯЗАНИХ ПРОЦЕСІВ У ЕМБРІОНАЛЬНИХ СИСТЕМАХ		
6.1.	Структурно-функціональний аналіз між процесами на різних рівнях організації у біологічних системах.....	258
6.2.	Математичний підхід до інтерпретації структури і регуляторної взаємодії динамічних параметрів, що описують стан об'єкту в певному інтервалі часу.....	267
6.3.	Засоби і методи аналізу результатів отриманих в експерименті.....	274
6.4.	Дослідження динаміки процесів: кореляційний і спектральний аналіз часових рядів.....	281
6.5.	Схема та етапи дослідження динаміки метаболічних та біоелектричних процесів.....	289
6.6.	Оцінення достовірності результатів часового ряду та їхня інтерпретація.....	295
6.7.	Оцінення динаміки трансмембранного потенціалу в ранньому розвитку в'юна за допомогою кореляційних функцій (реальна ситуація).....	297

Розділ 7. ФЕНОМЕНОЛОГІЧНИЙ ОПИС МЕТАБОЛІЧНИХ  
СХЕМ

- 7.1. Комп'ютерне моделювання та числова оптимізація  
метаболических процесів: застосування до біосинтезу  
флавінових коферментів у дріжджів..... 305
- 7.2. Трансфлавінова модель..... 316

Розділ 8. МАТЕМАТИЧНА МОДЕЛЬ КОЛИВАЛЬНИХ  
ПРОЦЕСІВ

- 8.1. Математична модель автоколивних мембраннозв'язаних  
процесів на ранніх стадіях ембріогенезу в'юна..... 324

Розділ 9. «НОВИЙ КЛАС ДИНАМІЧНИХ МОДЕЛЕЙ» ЯК  
УНІВЕРСАЛЬНИЙ

- 9.1. Опис процесів раннього ембріогенезу тварин з позицій  
“Нового класу динамічних моделей”..... 329

Розділ 10. ЗАСТОСУВАННЯ МІКРОЕЛЕКТРОДНОЇ ТЕХНІКИ  
НА ІНШИХ ОБ'ЄКТАХ

- 10.1. Електрична активність епітеліально-м'язових і нервових  
клітин гідродів..... 336
- 10.2. Механізми генерування мембранного потенціалу  
в безхребетних тварин..... 339
- 10.3. Механізми синаптичного передавання  
у кишковопорожнинних тварин..... 341
- 10.4. Фармакологічні особливості рецепторів гама-  
аміномасляної кислоти та глутаматних рецепторів..... 350
- 10.5. Іонна проникність мембран та генерування потенціалів  
дії при збудливих та гальмівних синаптичних процесах  
у нейронах безхребетних..... 362
- 10.6. Дослідження електричних показників гідри..... 364
- 10.7. Внутрішньоклітинне відведення мембранного потенціалу  
спокою та електричної активності епітеліально-м'язових  
клітин ектодерми гідри..... 366
- 10.8. Електронно-мікроскопічне дослідження клітин гідри..... 369
- 10.9. Електрична активність клітин ектодерми  
*Hydra oligactis* P. у нормі..... 369

10.10.	Динаміка електричних параметрів клітин ектодерми прісноводної гідри при дії блокаторів гама-аміноасляної кислоти та глутаматних рецепторів.....	375
10.11.	Електронно-мікроскопічне дослідження нервово-м'язових синапсів прісноводної гідри.....	389
10.12.	Дослідження впливу катіонів магнію, свинцю та ртуті на електричну активність клітин ектодерми гідри.....	391
10.13.	Електрична активність клітин ектодерми гідри з позицій впливу різних факторів.....	400
	Список літератури.....	412



Навчальне видання

**САНАГУРСЬКИЙ Дмитро Іванович**

## **ОБ'ЄКТИ БІОФІЗИКИ**

Монографія

Редактор *Л. Макітринська*  
Технічний редактор *С. Сенник*  
Комп'ютерне верстання *В. Демчук*

Підп. до друку 09.12.2008. Формат 60×90/16. Папір друк.  
Друк. на різогр. Умовн. друк. арк. 32,8. Обл.-вид. арк. 34,3.  
Тираж 100 прим. Зам.

Видавничий центр Львівського національного університету  
імені Івана Франка. 79000 Львів, вул. Дорошенка, 41

Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи до Державного реєстру  
видавців, виготівників і розповсюджувачів видавничої продукції.  
Серія ДК № 3059 від 13.12.2007.

**Санагурський Д.І.**

С 18                   Об'єкти біофізики: Монографія – Львів. Видавничий центр  
ЛНУ імені Івана Франка, 2008. – 522 с.

ISBN 978-966-613-641-4

У монографії висвітлено частину проблем, які охоплюють наукові інтереси автора. Зокрема, проблеми, що стосуються питання генерування потенціалів спокою та дії прісноводної гідри, впливу на ці явища іонів важких металів. Досліджено також проблеми генерування потенціалу спокою на зародкових об'єктах (зародках в'юна), роботу деяких мембранних транспортних систем а також проаналізовано і вплив на них іонів важких металів.

В окремих розділах монографії розглянуто математичні моделі та зроблено структурно-функціональний аналіз на підставі експериментальних даних.

**УДК 577.35**  
**ББК Е 0\*71**