УДК 597.551.2-131:577.3.11+577.352+615.28

# ДИСПЕРСІЙНИЙ АНАЛІЗ ВПЛИВУ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНОГО ПОЛІМЕРУ НА $NA^+$, $K^+$-АТФ-АЗНУ АКТИВНІСТЬ ЗАРОДКІВ В'ЮНА ЗА УМОВ ДОСЛІДЖЕННЯ *IN VITRO*

Ю.С. ЗДВІЖКОВ[1], С.М. МАНДЗИНЕЦЬ[1], О.С. ЗАІЧЕНКО[2], М.В. БУРА[1]

[1]*Львівський національний університет імені Івана Франка, кафедра біофізики та біоінформатики, вул. Грушевського, 4, Львів, 709005, тел. (032)239-47-90*
*e-mail: mcelevych@yahoo.com, zdvizhkov_yura@ukr.net*
[2]*Національний університет «Львівська політехніка», кафедра технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології, VIII навч. корпус, пл. Св. Юра, 2, Львів, 79013, e-mail: zaichenk@polynet.lviv.ua*

*Проведено оцінку впливу міцелоутворюючої поверхнево-активної речовини (NВП-ВА-МА) у концентраціях $10^{-4}\div10^{-7}$ М (чинник дози) на активність $Na^+$, $K^+$–АТФ-ази у ранній період розвитку (60÷330 хв) зародків в'юна (чинник часу) з використанням одно- та двофакторного дисперсійного аналізу. Визначено, що зміни активності ферменту зумовлені дією досліджуваної біологічно активної речовини та залежать від часу розвитку зародків. Найбільша чутливість $Na^+$, $K^+$–АТФ-ази мембран зародків до змін концентрації досліджуваного новосинтезованого водорозчинного полімеру існує в період розвитку від 210 до 270 хв, а найменша – на стадії 2 бластомерів (60 хв). Міра мінливості активності $Na^+$, $K^+$–АТФ-ази мембран визначається і впливом поверхнево-активної речовини у різних концентраціях, і фактором часу розвитку зародків. Проведений дисперсійний аналіз виявив внесок впливу інших неврахованих факторів на зміну активності досліджуваного мембранного ферменту зародків – 3,6÷40,9%.*

*Ключові слова: поверхнево-активна речовина, NВП-ВА-МА, активність $Na^+$, $K^+$–АТФ-ази, зародки в'юна, дисперсійний аналіз.*

**Вступ.** Останнім часом все більша увага приділяється біологічно активним полімерним речовинам, котрі можна використовувати в медицині та фармацевтичній промисловості як лікарські, так і допоміжні засоби, що здатні впливати на обмінні процеси у клітинах, органах або організмі загалом (Roiter Y., Minko S., 2005; Speiser P., 2007). Актуальні завдання медицини направлені на розвиток нових нанорозмірних носіїв з низькою токсичністю, спрямованої відповіді на місцеві та дистантні ефекти і можливостей візуалізації дії препарату та результатів діагностики (Euliss L. et al., 2006; Lupitskyy R. et al., 2005; Torchilin V., 1999). Модифікація поверхні є одним із основних методів, що використовують для контролю функцій матеріалу, таких як змочуваність, адгезія, оптичні властивості тощо (Manabe N. et al., 2006; Uhlmann P. et al., 2005; Voronov A., Shafranska O., 2003). Створення таких наночастинок з полімерною оболонкою, що забезпечує їх колоїдну стабільність, біосумісність, функціональність і реактивність, виявляє значну цінність для отримання нанорозмірних носіїв біомедичного застосування (Novikov V. et al., 2004; Okubo M. et al., 2000).

Відомо, що у фармацевтичній промисловості застосовують водорозчинні препарати, які повинні транспортувати лікарські речовини до органа-мішені і забезпечувати при цьому пролонгуючу дію та максимальний терапевтичний ефект. Виходячи з вищесказаного, особливу зацікавленість викликає створення водорозчинних полімерних препаратів із певними фізико-хімічними властивостями, які можуть солюбілізувати водонерозчинні біологічно активні сполуки різної хімічної будови, що відрізняються між собою за бактерицидними, фунгіцидними та цитостатичними властивостями (Федорова О. та інші, 2004; Minko S., Roiter Y., 2005).

Однією із міцелоутворюючих ПАР є новосинтезований на кафедрі органічної хімії НУ „ЛП" поверхнево-активний полімер – N-вінілпіролідон (NВП)-вінілацетат-(ВА)-малеїновий ангідрид (МА) (1:1:1) (абревіатура NВП-ВА-МА); хімічна структура зображена на рис. 1.

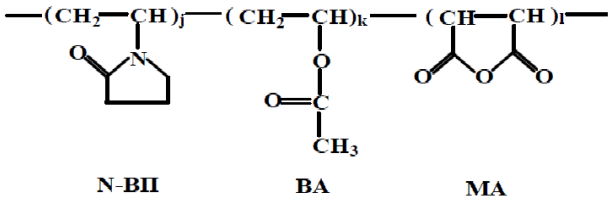


***Рис. 1. Структурна формула поверхнево-активного полімеру NВП-ВА-МА.***

***Fig. 1.Structural formula of surface-active polymer NВП-ВА-МА.***

Вважають, що в основі механізму дії поверхнево-активних речовин на живі організми є порушення функціонального стану плазматичних мембран (ПМ), обмінних процесів, водно-сольового балансу клітини, опосередкована взаємодія з мембранними ферментами і рецепторами (Зайцева О.В., 2000; Кондратюк В.А. та інші, 2000; Проданчук М.Г., Мудрий І.В., 2000). Тому з біофізичної точки зору є актуальним дослідження дії цих полімерів на активність мембранних ферментів зародкових клітин, плазматичні мембрани яких є важливим центром морфогенетичних перебудов у ранньому ембріогенезі та найпершою ланкою у сприйнятті різноманітних зовнішніх сигналів (Антонов В.Ф., 1997; Гойда О.А., 1993).

Оскільки зародки в'юна *(Misgurnus fossilis* L.) у період раннього ембріогенезу є адекватною тест-системою для дослідження впливу різних фармакологічних (Целевич М.В. та інші, 2004) та хімічних чинників на живі організми, і завдяки короткому періоду ембріогенезу, плазматичні мембрани зародків в'юна є зручним об'єктом для досліджень $Na^+$, $K^+$–АТФ-ази.

Мета даної роботи полягала у кількісній оцінці впливу чинника часу (тривалості розвитку) та NВП-ВА-МА (у різних концентраціях) на зміни активності $Na^+$, $K^+$–АТФ-ази зародків в'юна в період раннього ембріогенезу, тобто проаналізувати часову динаміку та концентраційну залежність цих змін.

**Об'єкти і методи.** Для з'ясування найбільш вагомого внеску у зміни активності $Na^+$, $K^+$–АТФ-ази, а саме, різних концентрацій біологічно активних речовин, тривалості розвитку зародків чи інших неврахованих чинників, було проведено дисперсійний аналіз впливу вищезазначених факторів (за відносними частками) на мінливість значень досліджуваного показника.

З метою кількісної оцінки впливу ПАР (n=5) у загальну мінливість показника (зміни активності $Na^+$, $K^+$–АТФ-ази) на різних стадіях розвитку зародків в'юна проведено по 10 серій однофакторного дисперсійного аналізу (рис. 2) та по 5 серій двофакторного дисперсійного аналізу (рис. 3). Вихідним матеріалом дослідження були експериментальні дані, а саме – середні значення активності $Na^+$, $K^+$–АТФ-ази плазматичної мембрани за дії *N*ВП-ВА-МА на різних стадіях розвитку зародків в'юна: 2 (60 хв), 16 (150 хв), 64 (210 хв) бластомерів, восьмого (270 хв) і десятого (330 хв) поділів (Яремкевич О. та інші, 2008).

Мікросомну фракцію мембран зародків в'юна одержували методом диференційного центрифугування у градієнті густини сахарози, за методикою, описаною Луциком М.Д. та ін (Луцик М.Д. и др., 1986). Зародки попередньо гомогенізували у буферному розчині наступного складу (ммоль/л): сахароза – 120,0; KCl – 130,0; $MgCl_2$ – 5,0; трис-HCl – 10,0 (pH 7,4; 4°C). Рештки зародкового жовтка осаджували центрифугуванням упродовж 10 хв при 1600 g. Надосадову рідину, збагачену фрагментами плазматичної та ретикулярної мембран, одержану після центрифугування 10 хв при 10 000 g, зберігали при температурі t=-20°C (Луцик М.Д. и др., 1986).

Для визначення сумарної АТФ-азної активності використовували стандартне середовище інкубації такого складу, мМ: АТФ-$Na_2$ – 3,0; $MgCl_2$ – 3,0; NaCl – 100,0; KCl – 30,0; ЕГТА – 1,0; буфер трис-HCl – 30,0 (pH 7,4; 21°C). Для визначення $Na^+$, $K^+$–АТФ-азної активності до середовища інкубації додавали 1 ммоль/л уабаїну. В інкубаційне середовище, в якому визначали активність АТФ-ази, додавали розчини нанополімеру до кінцевої концентрації $10^{-4}\div10^{-7}$ М.

Питому активність $Na^+$, $K^+$–АТФ-азної системи бластомерів оцінювали за різницею між кількістю $P_i$, що утворився в середовищі інкубації за наявності та відсутності фрагментів мембран; поправку на вміст ендогенного $P_i$ визначали при додаванні аліквоти тільки мембранного препарату зародків на відповідній стадії розвитку й виражали активність досліджуваної АТФ-ази зародків у мкмолях $P_i$ у перерахунку за год на 1 мг білка. Кількість продукту реакції $P_i$ визначали за модифікованим методом Фіске-Суббароу (Fiske C.H., SubbaRow Y., 1925), а вміст білка в суспензії мембранного препарату – за методом Лоурі (Lowry O.H. et al., 1951).

Експериментальний матеріал опрацьовували методом одно- та двофакторного дисперсійного аналізу. Для досліджуваного *N*ВП-ВА-МА визначали відносні частки впливу різних концентрацій цієї речовини ($10^{-4}\div10^{-7}$М) та чинника часу розвитку зародків (60, 150, 210, 270, 330 хв) на зміни активності $Na^+$, $K^+$–АТФ-ази з урахуванням впливу неврахованих у експерименті факторів, а також оцінювали статистичну значимість цих впливів. (Для всіх серій аналізу $N_t$ – кількість градацій за чинником часу (тривалість розвитку); $N_c$ – кількість градацій за іншим досліджуваним чинником).

У дослідженнях використовували: *однофакторний дисперсійний аналіз* впливу на активність $Na^+$, $K^+$–АТФ-ази різних концентрацій полімеру (досліджуваний чинник) у фіксовані моменти розвитку зародків в'юна. Проведено десять серій дисперсійного аналізу для біологічно активної речовини за даними, отриманими в певний момент розвитку (60, 150, 210, 270 та 330 хв); $N_c$=5 (п'ять концентрацій); *двофакторний дисперсійний аналіз* для оцінки впливу полімеру у концентраціях (перший досліджуваний чинник) на зміни активності $Na^+$, $K^+$–АТФ-ази в різний період розвитку (60,

150, 210, 270 та 330 хв) зародків в'юна (другий досліджуваний чинник). Зміни активності ферменту в контролі протягом досліджуваного періоду розвитку порівнювали зі змінами за дії ПАР в певній концентрації за аналогічний період. Було проведено п'ять серій двофакторного дисперсійного аналізу (п'ять різних концентрацій) для досліджуваного полімеру; $N_c$=2 (без та за наявності полімеру), $N_t$=5 (п'ять моментів часу). У дисперсійному аналізі використовували засоби *EXCEL*, якими оцінювали також достовірність отриманих результатів дослідження. Критичні рівні ймовірності показників під час перевірки статистичних гіпотез у дослідженнях становили 0,095 та 0,999.

**Результати та їх обговорення.** У результаті проведених 10 серій однофакторного дисперсійного аналізу було показано, що полімер у досліджуваних концентраціях зумовлює мінливість показника – активності оуабаїнчутливої АТФ-ази зародків в'юна (рис. 2). За таких умов в діапазоні досліджуваних концентрацій встановлено вагомий внесок впливу полімеру на мінливість активності $Na^+$, $K^+$–АТФ-ази на різних стадіях розвитку в'юна (Яремкевич О. та інші, 2008).

Уже на перших стадіях за дії біологічно активного полімеру виявлено вагомий внесок впливу *N*ВП-ВА-МА у зміни активності $Na^+$, $K^+$–АТФ-ази мембран зародків. Досліджуваний мембранний фермент проявляє найменшу чутливість до впливу досліджуваної ПАР на стадії 2 бластомерів (60 хв, відносна частка впливу фактора становить 71,5%) та максимальну – на стадії 8 поділу бластомерів (270 хв, відносна частка – 94,3%). На стадії 10 поділу встановлено незначне недостовірне зниження внеску фактора наявності у середовищі полімеру (досліджуваного ПАР у відповідних концентраціях ($10^{-4}$÷$10^{-7}$ М) у зміні активності АТФ-ази (330 хв, відносна частка – 77,9%). Таким чином, за умов впливу полімеру спостерігаємо тенденцію до збільшення його дії на загальну мінливість досліджуваного показника протягом розвитку зародків. Подібні за значенням частки впливу ПАР не відображають ступеня інгібування активності, оскільки частка впливу, як уже зазначено, виявляє лише внесок у зміни активності того чи іншого чинника на фоні впливу інших, неврахованих у експерименті чинників.

Дисперсійний аналіз, як відомо, дає змогу не лише оцінити вірогідність впливу різних чинників на досліджуваний показник та їхній внесок у загальну мінливість показника (у межах 100%), а за значенням відносних (відсоткових) часток впливу чинників порівнювати ці впливи.

Результати однофакторного дисперсійного аналізу (див. рис. 2) підтверджують попередньо отримані експериментальні дані про значну залежність активності $Na^+$, $K^+$–АТФ-ази від наявності в середовищі ПАР в певній концентрації протягом раннього розвитку зародків (Яремкевич О. та інші, 2008). Водночас на підставі результатів дисперсійного аналізу з'ясовано, що дія досліджуваної речовини на активність $Na^+$, $K^+$–АТФ-ази на різних стадіях розвитку (відмінності було виявлено в попередньо отриманих експериментальних даних (Яремкевич О. та інші, 2008)) суттєво не відрізняється. Тобто підтверджено концентраційну залежність активності АТФ-ази за дії досліджуваного полімеру.

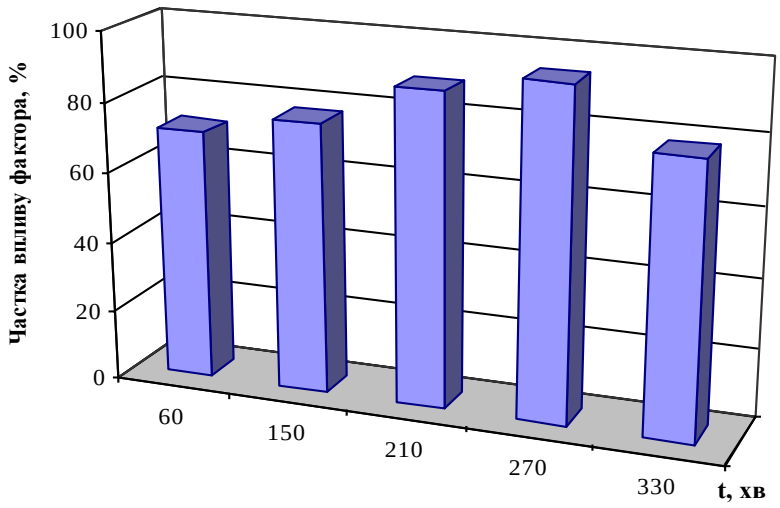


***Рис.2. Оцінки впливу зміни концентрацій полімеру на активність $Na^+$, $K^+$-АТФ-ази для різних стадій розвитку зародків в'юна, p > 0,999.***

***Fig. 2. Assessment of polymer concentration changing impact on the activity of $Na^+$, $K^+$-ATP-ase for different stages of loach embryos development, p> 0,999.***

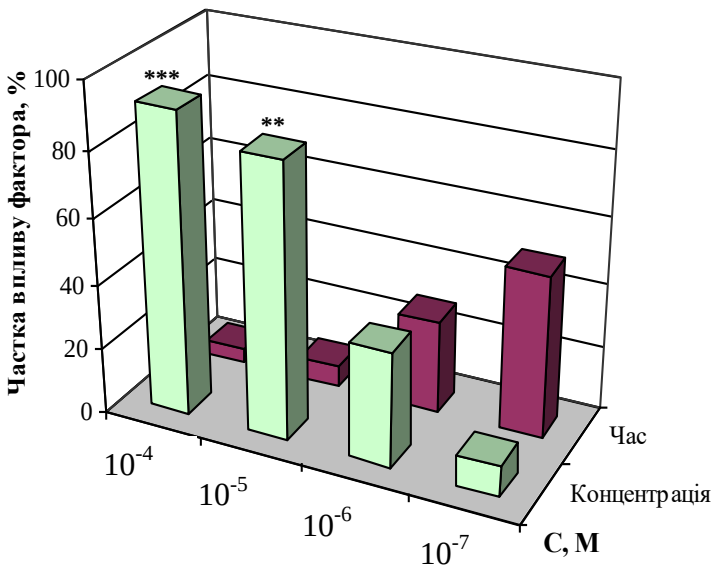


***Рис. 3. Оцінки впливу ПАР у різних концентраціях на активність $Na^+$, $K^+$-АТФ-ази зародків в'юна.***
*Примітка: ** – p>0,99, *** – p>0,999 (вплив чинника часу розвитку та інших чинників недостовірний).*

***Fig. 3. Impact assessment of surfactant in various concentrations on $Na^+$, $K^+$-ATP-ase activity of loach embryos.***
*Note: ** - p> 0,99, *** - p> 0,999 (impact factor of time and other factors not significant).*

З метою порівняння впливу ефектів різних концентрацій полімеру ($10^{-4}$÷$10^{-7}$ М) у зміни активності $Na^+$, $K^+$–АТФ-ази мембран бластомерів в'юна в різний час розвитку проведено 5 серій двофакторного дисперсійного аналізу, результати якого представлено на рис. 3.

Визначено відносні частки впливу полімеру у різних концентраціях та фактору часу на фоні впливу інших, неврахованих у експерименті чинників, а також, оцінено достовірність впливу цих факторів. Рівень ймовірності для отриманих результатів впливу фактору у концентраціях $10^{-4}$÷$10^{-5}$ М становить відповідно 0,999 та 0,99, окрім впливу $10^{-5}$ М та $10^{-6}$ М полімеру на $Na^+$, $K^+$–АТФ-азну активність – тоді рівень достовірності становив p=0,72.

Таким чином, показано, що зміни активності $Na^+$, $K^+$–АТФ-ази зародків в'юна, згідно проведеного дисперсійного аналізу, визначаються дією різних концентрацій досліджуваного полімеру. Максимальну частку впливу для цієї речовини (у середньому 88%) встановлено для впливу ПАР у концентраціях $10^{-4}$÷$10^{-5}$ М з подальшим зменшенням частки впливу у зміни активності досліджуваного ферменту (пропорційна зі зменшенням концентрації полімеру). Мінімальна частка впливу характерна для дії досліджуваної речовини за низької концентрації $10^{-7}$ М полімеру та становить 9,2%.

Аналізуючи результати двофакторного дисперсійного аналізу, виявлено, що внесок фактора часу у загальну мінливість ферментативної активності натрієвої помпи за дії біологічно активної сполуки за високих концентрацій ($10^{-4}$÷$10^{-5}$ М) знаходиться в межах 4,4÷6,9%. Однак за таких умов внесок частки фактора часу у мінливість досліджуваного показника є недостовірним. Для дії ПАР у концентраціях $10^{-6}$ та $10^{-7}$ М внесок фактору часу у зміни активності $Na^+$, $K^+$–АТФ-ази зародків є хоч і вагомим, але становить 29% та 50% відповідно, та є не достовірним, p=0,45) (рис. 4). Ці результати свідчать, що вплив полімеру у досліджуваних концентраціях змінюється протягом розвитку зародків в'юна. Отже, міра мінливості активності $Na^+$, $K^+$–АТФ-ази мембран визначається впливом ПАР концентрацій різного діапазону та фактором часу розвитку зародків. Проведений дисперсійний аналіз виявив досить значний внесок інших неврахованих факторів у зміни активності досліджуваного мембранного ферменту зародків, частка впливу якого знаходилася в межах від 3,6% до 40,9%. До таких факторів можна віднести освітленість, забрудненість середовища та ін.

Ймовірно, що певна частина міцелоутворюючих молекул полімеру *N*ВП-ВА-МА може утворювати білково-ліпідні комплекси з фрагментами мікросомної фракції мембран зародків (або везикули), у яких $Na^+$, $K^+$–АТФ-аза буде функціонувати в нормальному режимі. Зокрема, полімер ($10^{-4}$÷$10^{-5}$ М) зумовлює значний інгібувальний ефект АТФ-азної активності зародків, однак його вплив впродовж раннього розвитку є вагомим, тоді як додавання до середовища інкубації полімеру у низьких концентраціях ($10^{-7}$ М) веде до відновлення активності $Na^+$, $K^+$–АТФ-ази зародків до рівня контролю.

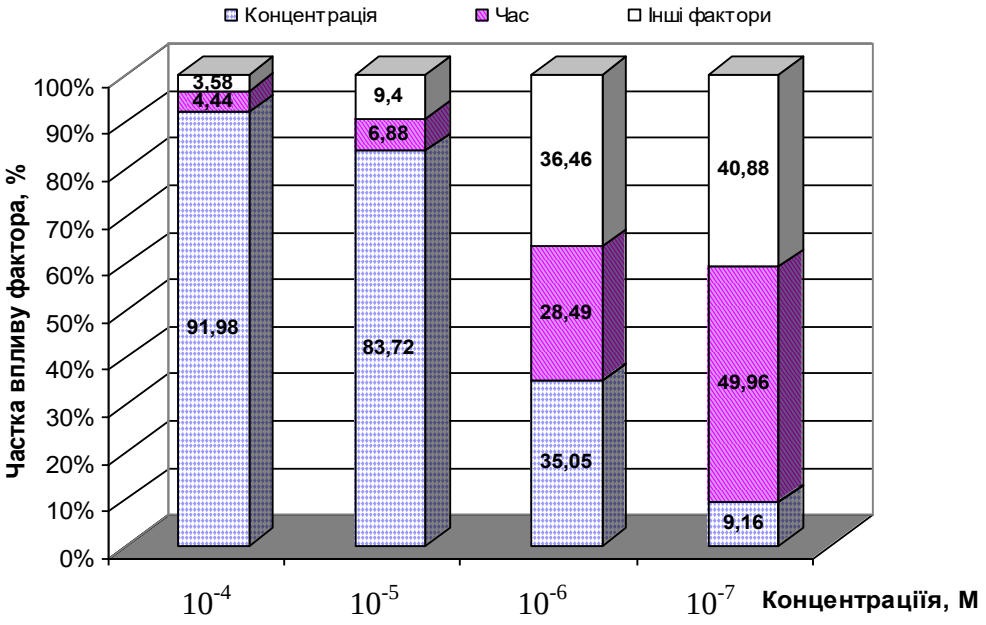


***Рис. 4. Двофакторний дисперсійний аналіз впливу NВП-ВА-МА у різних концентраціях та тривалості розвитку зародків на активність $Na^+$, $K^+$-АТФази зародків в'юна на різних стадіях їх розвитку.***

***Fig. 4. Two-factor variance analysis of NВП-ВА-МА influence in different concentrations and duration of germs development on the activity of $Na^+$, $K^+$-ATPase of loach embryos at different stages of their development.***

**Висновки.** На підставі виконаного дисперсійного аналізу можна стверджувати з високою достовірністю (p>0,99), що зміни активності $Na^+$, $K^+$–АТФ-ази зумовлені дією досліджуваного полімеру. Підтверджено вагому концентраційну залежність активності мембранного ферменту від дії полімеру в період дроблення бластомерів в'юна (60÷330 хв). Також за допомогою дисперсійного аналізу з'ясовано, що концентраційна залежність впливу полімеру на різних стадіях розвитку суттєва, тобто дія полімеру не залежить від фактора розвитку зародків в'юна і ця залежність не достовірна.

Таким чином, інгібування $Na^+$, $K^+$–АТФ-ази зародків в'юна на ранніх етапах ембріогенезу поверхнево-активною речовиною *N*ВП-ВА-МА можна пояснити її емульгуючими та сенсибілізуючими властивостями, здатністю порушувати цілісність мембрани, модифікуючи при цьому білки, порушувати обмінні процеси у зародках, знижуючи активність досліджуваного мембранного ферменту, внаслідок морфо-фізіологічних перебудов у зародкових клітинах протягом раннього ембріогенезу.

**Список літератури:**


1. Антонов В.Ф. Мембранный транспорт // Сорос. обозрев. журн. Биология. – 1997. – № 4. – С. 2-9.
2. Гойда О.А. Биофизические аспекты раннего онтогенеза животных. К.: Наукова думка, 1993. 224 с.
3. Зайцева О.В. Поверхнево-активні речовини як стимулятори вільнорадикальних процесів // Довкілля та здоров'я. – 2000. – № 2. С. 8-11.
4. Кондратюк В.А., Гунько Л.М., Гнатюк М.С. та ін. Гігієнічне нормування додецилбензолсульфокислоти у воді водойм // Довкілля та здоров'я. – 2000. – № 1. – С. 6-9.
5. Луцик М.Д., Кусень С.И., Лук'яненко А.В. Очистка и частичная характеристика плазматических мембран клеток зародышей вьюна // Онтогенез. – 1986. – Т. 17, № 3. – С. 314-321.
6. Проданчук М.Г., Мудрий І.В. Поверхнево-активні речовини в агропромисловому комплексі: еколого-гігієнічні аспекти. К.: Наук. думка, 2000. 128 с.
7. Федорова О., Мітіна Н., Заярнюк Н., Комаровська О. та ін. Водорозчинні полімерні аддукти есулану з бактерицидними та антигрибковими властивостями // Вісн. НУ «ЛП». Сер. хімія, технологія речовин та їх застосування. – 2004. – № 516. – С. 63-65.
8. Целевич М.В., Мандзинець С.М., Санагурський Д.І. $Na^+$, $K^+$–АТФ-азна активність мембран зародків в'юна Misqurnus fossilis L. при дії антибіотиків // Фізіол. журн. – 2004. – Т. 50, № 5. – С. 64-68.
9. Яремкевич О., Перун М., Целевич М., Заіченко О., Новіков В., Санагурський Д. Na+, K+-АТФ-азна активність зародків в'юна in vitro за впливу поверхнево активного полімеру // Вісник Львів. ун-ту, Сер. Біол. – 2008. – Вип. 47. – С. 32-41.
10. Euliss L.E., DuPont J.A., Gratton S., et al. Imparting size, shape, and composition control of materials for nanomedicine // J. Chemical Society Reviews. – 2006. – V. 35, № 11. – P. 1095-1104.
11. Fiske C.H., SubbaRow Y. The colorimetric determination of phosphorus // J. Biol. Chem. – 1925. – V. 66. – P. 375-400.
12. Lowry O.H., Rosebrough N.G., Farr A.L., Randall R.C. Protein measurement with the Folin phenol

reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – V. 193, № 1. – P. 265-275.
13. Lupitskyy R., Roiter Y., Tsitsilianis C., Minko S. From smart polymer molecules to responsive nanostructured surfaces // J. Langmuir. – 2005. – V. 21, № 19. – P. 8591-8593.
14. Manabe N., Hoshino A., Liang Y.Q. et al. Quantum dot as a drug tracer in vivo. // J. IEEE Trans. Nanobioscience. – 2006. – V. 5. – P. 263-267.
15. Minko S., Roiter Y. AFM single molecule studies of adsorbed polyelectrolytes // J. Current Opinion in Colloid & Interface Science. – 2005. – V. 10. – P. 9-15.
16. Novikov V., Zaichenko A., Fedorova E., Petrina R. Oligomer surface-active and colloidal carriers for poor water soluble biocide transportation in aqueous media // Polymers of special applications: Abstracts of III Polish-Ukrainian conference. Poland. 2004. – P. 15.
17. Okubo M., Takekoh R., Sugano H. Production of micron-sized, monodispersed, multilayered composite polymer particles by multistep seeded dispersion polymerization // J. Colloid Polymer Science. – 2000. – V. 278, № 6. – P. 559-564.
18. Roiter Y., Minko S. AFM Single Molecule Experiments at the Solid-Liquid Interface: In Situ Conformation of Adsorbed Flexible Polyelectrolyte Chains // J. American Chemical Society. – 2005. – V. 127, № 45. – P. 15688-15689.
19. Speiser P. Appl. Biochem. Biotech. – 2007. – Vol. 13. – P. 820-831.
20. Torchilin V. P. Polymeric micelles in diagnostic imaging // J. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 1999. – V. 16, № 1. – P. 305-319.
21. Uhlmann P., Houbenov N., Minko S., Stamm M. Surface functionalization by smart binary polymer brushes to tune physico-chemical characteristics at biointerfaces // J. e-Polymers. – 2005. – № 075. – P. 1-10.
22. Voronov A., Shafranska O. Dependence of thin polystyrene films stability on the thickness of grafted polystyrene brushes // J. Polymer. – 2003. – V. 44, № 1. – P. 277-281.

## ANALYSIS OF VARIANCE OF INFLUENCE OF SURFACE-ACTIVE POLYMER ON THE $Na^+$, $K^+$-ATP-ase ACTIVITY OF LOACH EMBRYOS IN VITRO

**Y. Zdvizhkov, S. Mandzynets, O. Zaichenko, M. Bura**

*The evaluation of influence of micelleforming surface-active substance (NBП-BA-MA) in the concentrations $10^{-4}\div10^{-7}$ M (dose factor) on the $Na^+$, $K^+$–ATP-ase activity in the early period of development (60 – 330 min) of loach embryos (time factor) with the use of one- and two-factor analysis of variance has been performed. It has been detected, that the changes of enzyme activity are mainly caused by the action of the investigated biologically active substance and depended on embryos development time. The greatest sensitivity of $Na^+$, $K^+$–ATP-ase membranes of embryos to the changes in concentration of investigated newly synthesized water-soluble polymer existed during the development from 210 minutes to 270 minutes and the lowest one was at the stage of 2 blastomeres (60 min). The measure of the variability of activity of $Na^+$, $K^+$–ATP-ase membranes was determined by the influence of various concentrations of surfactant, and by the embryo development time factor. The conducted analysis of variance revealed a contribution of other unaccounted factors in the study of changes in the activity of the membrane enzyme – 3,6÷40,9% for micelleforming surface-active substance.*

*Key words: surface-active polymer, $Na^+$, $K^+$–ATP-ase activity, loach embryos, analysis of variance.*

*Отримано редколегією 24.06.2011*