

**ВМІСТ ТБК-ПОЗИТИВНИХ ПРОДУКТІВ У ЗАРОДКАХ В'ЮНА
MISGURNUS FOSSILIS L. НА РІЗНИХ ЕТАПАХ РОЗВИТКУ ЗА ВПЛИВУ
АМІНОКИСЛОТНИХ ПОХІДНИХ 1,4-НАФТОХІНОНУ**

***А. Генегі¹, А. Тарновська¹, М. Яремчук¹, А. Будевич¹, О. Семочко²**

¹Львівський національний університет імені Івана Франка

вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна

e-mail: anastasiya.heneha@lnu.edu.ua; anastasiyah2@gmail.com

²Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

вул. Пекарська, 69, Львів 79010, Україна

Нафтохінони відіграють важливу роль серед природних речовин і їхніх синтетичних похідних, оскільки вони мають широкий спектр біологічної активності. Амінокислотні похідні 1,4-нафтохінону мають перспективи практичного використання в медицині та фармакології. Для з'ясування можливого механізму дії амінокислотних похідних 1,4-нафтохінону досліджено вміст ТБК-позитивних продуктів у зародкових клітинах в'юна *Misgurnus fossilis* L. упродовж ембріогенезу. Зародки прісноводної риби в'юна *Misgurnus fossilis* L. є зручною й адекватною системою для з'ясування механізмів дії фізичних і хімічних факторів.

Встановлено, що глутамінове похідне 1,4-нафтохінону має найкраще виражені біологічні ефекти та викликало достовірне зростання ТБК-позитивних продуктів упродовж ембріогенезу щодо контролю на стадії 2 та 256 бластомерів (60-та і 270-та хв розвитку зародків) на 47 % і 43 %, відповідно ($p \geq 0,99$). На стадіях 16 і 64 бластомери спостерігається тенденція до підвищення вмісту МДА за дії глутамінового похідного 1,4-нафтохінону в концентрації 10^{-5} М, порівняно з контролем. Також на стадії 10-го поділу за впливу глутамінового похідного 1,4-нафтохінону вміст МДА щодо контрольного зразка знижується на 2 %, ймовірно, за рахунок активації ферментативних систем антиоксидантного захисту. Підвищення інтенсивності процесів ліпопероксидації стимулює активацію ферментів антиоксидантної системи. Тому для аналізу прооксидантно-антиоксидантного стану зародків в'юна необхідно дослідити активність ферментів, які забезпечують антиоксидантний захист.

Отримані результати дають змогу припустити, що за дії похідного 1,4-нафтохінону відбувається активація процесів перекисного окиснення ліпідів у зародкових клітинах в'юна *Misgurnus fossilis* L. упродовж ембріогенезу.

Ключові слова: ТБК-позитивні продукти, зародки, амінокислотні похідні 1,4-нафтохінону, ембріональні клітини, в'юни

Одним із розділів сучасної фармацевтичної та органічної хімії, який активно розвивається, є хімія хіноїдних сполук, де важливе місце займають нафтохінон і його похідні. Цей клас сполук привертає увагу завдяки їхнім фізіологічним, хімічним, фізико-хімічним властивостям, зокрема, їхній здатності до зворотного окисно-відновного процесу, що забезпечує різноманітну високу біологічну активність похідних 1,4-нафтохінону [10].

Нафтохінони як група органічних сполук відіграють важливу роль серед природних речовин і їхніх синтетичних похідних, оскільки вони мають широкий спектр біологічної активності [7, 8]. Вчені описали протиракову активність амідних похідних 1,4-нафтохінону на клітинах різних ліній, таких як KB (рак ротової порожнини), NCI-H187 (дрібноклітинний рак легень), MCF-7 (рак молочної залози) та лінії клітин Vero (епітелій нирки мавпи) [10].

Механізми, за допомогою яких нафтохінони можуть викликати ці ефекти, досить складні. Відомо, що хінони мають високу відновну активність і можуть брати участь у редокс-циклі через їхні семіхінонові/гідрохінонові радикали, що забезпечує утворення активних форм кисню, таких як супероксид, пероксид водню і, особливо, гідроксильний радикал [7]. 1,4-Нафтохінони можуть виступати як акцептори у реакції Міхаеля, що зумовлює алкілювання життєво важливих клітинних білків та/або ДНК [14].

Синтетичні *N*-похідні 1,4-нафтохінону мають перспективи практичного використання в медицині та фармакології, оскільки є низькотоксичними, проявляють активність у реакціях як із пероксидними, так і з алкільними радикалами, гальмують окиснення за надлишкового й низького тиску O_2 , частково захищають ліпіди у разі гіпоксії та за небезпеки виникнення інфаркту [8, 10, 12]. У зв'язку з особливою цінністю нафтохінонів і амінокислот незаперечний інтерес становлять дослідження зі синтезу сполук, що містять одночасно амінокислотні фрагменти і хіноїдну систему зв'язків, оскільки вони можуть бути потенційними лікарськими засобами [12, 14].

Перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ) у нормі є життєво важливою ланкою в регуляції багатьох мембранозалежних процесів – у регуляції проникності і транспорту речовин крізь мембрану, регуляції мембраноасоційованих ферментів та ліпідного складу мембран, у синтезі простагландинів, лейкотрієнів, тромбоксанів, стероїдних гормонів, холестеролу, в метаболізмі катехоламінів [1–6]. Проте відомо, що під час багатьох захворювань підсилюється оксидативний стрес [1, 2, 5], у результаті чого активуються процеси ПОЛ, а це спричиняє значні зміни в обмінних процесах клітини та структурно-функціональній цілісності клітинних мембран, супроводжується дисбалансом ферментативних і неферментативних компонентів системи антиоксидантного захисту, вивільненням лізосомних ферментів, зміною транспорту іонів Ca^{2+} [1–6].

У мітохондріях унаслідок вільнорадикальних реакцій можуть пошкоджуватись як ферменти матриксу, так і компоненти дихального ланцюга. Це призводить до втрати енергетичного потенціалу, електростимулювальної функції, порушення контролю за іонними потоками та медіаторними системами. Через це у тканинах можуть виникати такі патологічні стани, як запальні, нейродегенеративні та злоякісні зміни, що можуть призвести до загибелі клітин.

Щоб уникнути розвитку різних ускладнень у ході захворювань, важливо своєчасно блокувати пусковий механізм патології, знижуючи інтенсивність вільнорадикальних процесів у організмі за допомогою антиоксидантів. Експериментальна та клінічна медицина мають значний досвід у розробці та застосуванні препаратів із антиоксидантною дією для лікування різних патологій.

Отже, детальне вивчення впливу амінокислотних похідних 1,4-нафтохінону на процеси біологічного окиснення ліпідів мембран зародкових клітин прісноводної риби в'юна *Misgurnus fossilis* L. в період раннього ембріогенезу є актуальним і перспективним. Це дослідження сприятиме кращому розумінню механізмів біологічної дії цих речовин, а також покращенню їхніх лікувальних властивостей, що матиме значення для фармакології та медицини.

Матеріали та методи

У ході проведених досліджень використовували зародки в'юна *Misgurnus fossilis* L. Овуляцію стимулювали внутрішньом'язовим введенням самкам 500 од. хоріогонічного гонадотропіну. Сім'яники виділяли після декапітації та розтину черевної порожнини самців. Ікру отримували через 36 год після стимуляції та запліднювали в чашках Петрі

суспензією спермій за Нейфахом [2, 3, 6]. Зародки в'юна в умовах контролю інкубували у фізіологічному розчині Гольтфретера; за умовами дослідів – зародки розвивались у розчині амінокислотної похідної 1,4-нафтохінону (рис. 1) у відповідній концентрації, далі відбирали клітини на досліджуваних стадіях (2, 16, 64, 256 та 1024 бластомери). Стадії розвитку контролювали візуально під біокулярним мікроскопом МБС-9.

Принцип методу визначення вмісту ТБК-активних продуктів ґрунтується на активуванні ПОЛ іонами двовалентного заліза до рівня, який можна зареєструвати спектрофотометрично. За високої температури в кислому середовищі МДА реагує з ТБК, утворюючи забарвлений триметиновий комплекс із максимумом поглинання за 532 нм [5]. Кількість білка у пробах визначали за методом Лоурі.

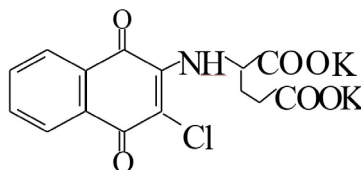


Рис. 1. Структурна формула калієвої солі 2-глутамін-3-хлор-1,4-нафтохінон (глутамінове похідне 1,4-нафтохінону)

Статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням програмного пакета для персональних комп'ютерів *Microsoft Excel*, достовірність змін встановлювали за t-критерієм Ст'юдента. Зокрема, визначали середнє арифметичне значення (М), стандартну похибку (m) та середнє квадратичне відхилення (σ). Критичні рівні достовірності під час перевірки статистичних гіпотез у дослідженнях відповідали значенням 0,95, 0,99 та 0,999.

Результати і їхнє обговорення

Встановлено, що дія досліджуваного глутамінового похідного в концентрації 10^{-5} М упродовж раннього ембріогенезу веде до виражених змін вмісту малонового діальдегіду (МДА) (вторинного продукту перекисного окиснення ліпідів), порівняно з контролем.

Під час аналізу отриманих даних встановили, що на стадії 2 бластомерів за впливу глутамінового похідного у концентрації 10^{-5} М вміст МДА щодо контролю зростає на 47 % ($p \geq 0,99$).

На стадіях 16 та 64 бластомери за впливу даного похідного вміст МДА більший, ніж у контрольному значенні, проте дані статистично є недостовірними. Достовірне підвищення МДА (на 43 %, $p \geq 0,99$) спостерігаємо на стадії 8 поділу щодо контролю.

Також на стадії 10 поділу спостерігається тенденція до зниження вмісту МДА за впливу глутамінового похідного 1,4-нафтохінону щодо контрольного зразка.

Відомо, що підвищення інтенсивності процесів ліпопероксидації стимулює активацію ферментів антиоксидантної системи. Тому для аналізу прооксидантно-антиоксидантного стану зародків в'юна необхідно дослідити активність ферментів, які забезпечують антиоксидантний захист.

Отримані дані свідчать про активацію процесів перекисного окиснення ліпідів за дії глутамінового похідного 1,4-нафтохінону на 60-ту (2 бластомери) та 270-ту хв розвитку зародків (256 бластомерів). Надмірна активація процесів ПОЛ призводить до порушення структури мембран, дисбалансу у ліпідному обміні, токсичного впливу на тканини. Відомо, що через 1,5 год після запліднення яйцеклітин в'юна зростають вільнорадикальні процеси, а це відображається у збільшенні вмісту МДА. Це може бути пов'язано з інтенсивним

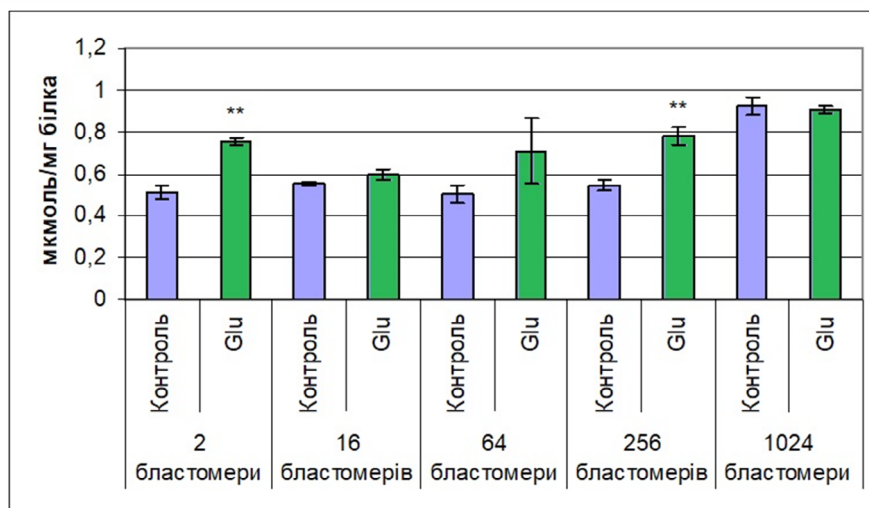


Рис. 2. Вміст ТБК-позитивних продуктів у зародків в'юна за дії глютамінового похідного у концентрації 10^{-5} М на різних стадіях розвитку ($p \geq 0,99$)

поділом бластомерів. На 6-ту год розвитку зародків спостерігається зростання інтенсивності процесів ліпопероксидації, що пов'язують з десинхронізацією поділів зародкових клітин в'юна. Пояснення механізмів впливу похідних 1,4-нафтохінону на пероксидні процеси в зародках в'юна *Misgurnus fossilis* L. на різних етапах поділу бластомерів слід шукати в активації антиоксидантної ензиматичної системи.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Боднарчук Н. О., Мандзинець С. М., Петрух Л. І., Санагурський Д. І. Стан системи антиоксидантного захисту зародків в'юна за впливу флуореніди // Біологія тварин. 2016. Т. 18. № 2. С. 9–17
2. Боднарчук Н. О., Мандзинець С. М., Петрух Л. І., Санагурський Д. І. Вміст первинних і вторинних продуктів ліпопероксидації у зародках в'юна за дії флуореніди // Біол. студії / Stud. Biologica. 2016. Т. 10. № 1. С. 53–60.
3. Гойда О. А. Біофізичні аспекти раннього онтогенезу тварин. К.: Наук. думка, 1993, 224 с.
4. Гончарук Є. Г. Коришун М. М. Вільнорадикальне окиснення як універсальний неспецифічний механізм пошкоджуючої дії шкідливих чинників довкілля (огляд літератури та власних досліджень) // Журнал Акад. мед. наук України. 2004. Т. 10. № 1. С. 131–150.
5. Головач Н. П., Тарновська А. В., Коцюмбас Г. І., Санагурський Д. І. Процеси перекисного окиснення ліпідів у живих організмах: монографія. Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2012. 252 с.
6. Тарновська А., Генеза А., Семочко О., Яремчук М. Перекисне окиснення ліпідів у зародках в'юна протягом раннього ембріогенезу за впливу антибіотика фторхінолонового ряду бороцину // Молодий вчений. 2018. Т. 9 (2). С. 290–293.
7. Klotz L., Xiaoqing H., Claus J. 1,4-naphthoquinones: from oxidative damage to cellular and inter-cellular signaling // Molecules. 2014. Vol. 19. Issue. P. 14902–14918.
8. Liu Z., Shen Z., Xiang S. et al. Evaluation of 1,4-naphthoquinone derivatives as antibacterial agents: activity and mechanistic studies // Front Environ. Sci. Eng. 2023. Vol. 17 (3). P. 31.

9. *Otoni F. M., Gomes E. R., Pádua R. M.* et al. Synthesis and cytotoxicity evaluation of glycosidic derivatives of lawsone against breast cancer cell lines // *Bioorg Med. Chem. Lett.* 2020. Vol. 30 (2). P. 126817.
10. *Pradidphol N., Kongkathip N., Sittikul P.* et al. First synthesis and anticancer activity of novel naphthoquinone amides // *Eur. J. Med. Chem.* 2012. Vol. 49. P. 253–270.
11. *Santos E. W. P., Sousa R. C., Franca M. N. F.* et al. Inhibitory effect of O-propargyllawsone in A549 lung adenocarcinoma cells BMC // *Complement Med Ther.* 2023. Vol. 23 (1). P. 333
12. *Shen X., Liang X., He C.* et al. Structural and pharmacological diversity of 1,4-naphthoquinone glycosides in recent 20 years // *Bioorg Chem.* 2023. Vol. 138. P. 106643.
13. *Wang Y., Luo Y. H., Piao X. J.* et al. Novel 1,4-naphthoquinone derivatives induce reactive oxygen species-mediated apoptosis in liver cancer cells // *Mol. Med. Rep.* 2019. Vol. 19 (3). P. 1654–1664.
14. *Wellington K. W.* Understanding cancer and the anticancer activities of naphthoquinones // *RSC Advances.* 2015. N 5. P. 20309–20338.

Стаття надійшла до редакції 11.06.24

доопрацьована 05.07.24

прийнята до друку 09.07.24

THE CONTENT OF TBA-POSITIVE PRODUCTS IN EMBRYOS OF LOACH *MISGURNUS FOSSILIS* L. AT DIFFERENT STAGES OF DEVELOPMENT UNDER THE INFLUENCE OF AMINO ACID DERIVATIVES OF 1,4-NAPHTHOQUINONE

A. Heneha^{*1}, A. Tarnovska¹, M. Yaremchuk¹, A. Budevych¹, O. Semochko²

¹*Ivan Franko Lviv National University*

4, Hrushevskyyi St., Lviv 79005, Ukraine

e-mail: anastasiya.heneha@lnu.edu.ua; anastasiyah2@gmail.com

²*Danylo Halytsky Lviv National Medical University*

69, Pekarska St., Lviv 79010, Ukraine

Naphthoquinones play an important role among natural substances and their synthetic derivatives, as they have a wide range of biological activity. Amino acid derivatives of 1,4-naphthoquinone have prospects for practical use in medicine and pharmacology. To clarify the possible mechanism of action of amino acid derivatives of 1,4-naphthoquinone, the content of TBA-positive products in embryonic cells of the loach *Misgurnus fossilis* L. during embryogenesis was investigated. Embryos of the freshwater fish loach *Misgurnus fossilis* L. are a convenient and adequate system for elucidating the mechanisms of action of physical and chemical factors.

It has been established that the glutamine derivative of 1,4-naphthoquinone has the most pronounced biological effects and caused significant changes in TBK-positive products during embryogenesis relative to the control at stages 2 and 256 blastomeres (60 and 270 minutes of embryo development) by 47 % and 43 %, respectively ($p \geq 0.99$). At stages 16 and 64 blastomeres, there is a tendency to increase the content of MDA under the action of the glutamine derivative of 1,4-naphthoquinone at a concentration of 10^{-5} M compared to the control. Also, at the 10th division stage under the influence of the glutamine derivative of 1,4-naphthoquinone, the MDA content decreases by 2 % compared to the control sample, possibly due to the activation of enzymatic systems of antioxidant protection. Increasing

the intensity of lipid peroxidation processes stimulates the activation of antioxidant system enzymes. Therefore, to analyze the prooxidant-antioxidant state of loach embryos, it is necessary to study the activity of enzymes that provide antioxidant protection.

The obtained results allow us to suggest that under the action of the derivative of 1,4-naphthoquinone, activation of lipid peroxidation processes occurs in embryonic cells of the loach *Misgurnus fossilis* L. during embryogenesis.

Keywords: TBA-positive products, embryos, amino acid derivatives of 1,4-naphthoquinone, embryonic cells, loach