

ДИСПЕРСІЙНИЙ АНАЛІЗ ВПЛИВУ АМІНОКИСЛОТНИХ ПОХІДНИХ 1,4-НАФТОХІНОНУ НА АКТИВНІСТЬ Na^+ , K^+ -АТФ-АЗИ МЕМБРАН ЗАРОДКІВ В'ЮНА

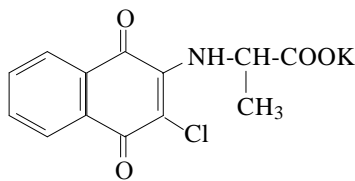
А. Генега, М. Бура, Д. Санагурський

*Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: anastasiyah2@gmail.com*

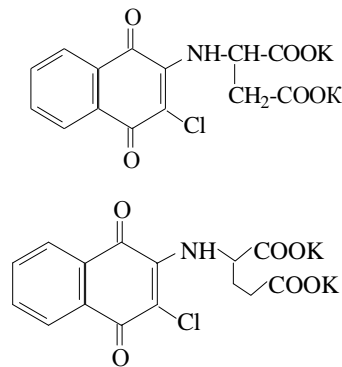
Оцінено вплив амінокислотних похідних 1,4-нафтохінону (у концентраціях 10^{-5} – 10^{-9} М) на активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази в ранній період розвитку (60–330 хв) зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L. (чинник часу) з використанням однофакторного дисперсійного аналізу. Встановлено, що їхній внесок у мінливість активності досліджуваного мембранного ферменту є більш вагомим на стадії 8 поділу (210 хв розвитку зародків, 256 бластомерів) і дещо знижується на стадії 10 поділу бластомерів (6 година розвитку, 1024 бластомери). Зародки на стадії 8 поділу бластомерів чутливіші до впливу фізичних і хімічних чинників, що підтверджується результатами дисперсійного аналізу.

Ключові слова: 1,4-нафтохінон, амінокислотні похідні, активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази, бластомери, зародки в'юна.

Амінокислотні похідні 1,4-нафтохінону є перспективним класом сполук, оскільки містять у своїй структурі хіноїдну систему зв'язків і амінокислотний залишок (рис. 1). Препарати на основі похідних 1,4-нафтохінону ефективно застосовують для лікування розладів функції головного мозку (церебрального інфаркту, крововиливу головного мозку, атеросклерозу) і вони мають високу антиоксидантну, цитолітичну й цитостатичну активності [5, 9, 11].



Калієва сіль 2- α -аланін-3-хлор-1,4-нафтохінону
(0,5г/70 мл H_2O - 7,143 мг/мл)



Калієва сіль 2-аспарагін-3-хлор-1,4-нафтохінону
(0,5г/70 мл H₂O - 7,143 мг/мл)

Калієва сіль 2-глутамін-3-хлор-1,4-нафтохінону
(0,5г/60 мл H₂O - 8,33 мг/мл)

Рис. 1. Структурні особливості амінокислотних похідних 1,4-нафтохінону на прикладі аланінового, аспарагінового та глутамінового похідних.

Попередніми дослідженнями було встановлено [2], що вплив амінокислотних похідних 1,4-нафтохінону на зародки в'юна *Misgurnus fossilis* L. упродовж ембріогенезу реалізується на мембранному рівні, а саме через інгібування Na⁺, K⁺-АТФ-ази.

Дисперсійний аналіз – статистичний метод, який дає можливість вивчати результати дослідження, в якому задіяні кілька порівнюваних груп. Даний аналіз зручно використовувати в тих випадках, коли досліджують вплив фактора на ознаку [1]. Дисперсійний аналіз, як відомо, дає змогу не лише оцінити вірогідність впливу різних чинників на досліджуваний показник і їхній внесок у загальну мінливість показника (у межах 100 %), а за значенням відносних (відсоткових) часток впливу чинників порівнювати ці впливи.

Тому доцільно застосувати дисперсійний аналіз для з'ясування впливу фактора часу на активність Na⁺, K⁺-АТФ-ази мембран зародків на різних етапах розвитку за дії амінокислотних похідних 1,4-нафтохінону.

Матеріали та методи

Овуляцію самок стимулювали внутрішньом'язовим введенням хоріогонічного гонадотропіну (500 од.). Ікру вилучали через 36 год після стимуляції та запліднювали в чашках Петрі суспензією спермійів за Нейфахом [8]. Через 5–10 хв після запліднення зиготи відмивали та інкубували у фізіологічному розчині Гольтфрета при температурі 20–22° С.

Зародки в'юна в умовах контролю інкубували у фізіологічному розчині Гольтфрета. У досліджувані зразки додавали амінокислотну похідну 1,4-нафтохінону у відповідній концентрації. Мікосомну фракцію мембран зародків в'юна одержували методом диференційного центрифугування у градієнті густини сахарози, як описано у роботі Луцика [6]. Стадії розвитку зародків контролювали візуально під бінокулярним мікроскопом МБС-9.

Дослідження активності Na⁺, K⁺-активованої, Mg²⁺-залежної АТФ-ази під впливом амінокислотних похідних 1,4-нафтохінону (аланіну, аспарагіну та глутаміну) та в контролі (у

мкмоль P_i /год·мг білка) проводили на різних стадіях розвитку зародків упродовж періоду дроблення бластомерів в'юна (стадії 2, 16, 64 бластомерів та 8 і 10 поділи (256 та 1024 бластомерів відповідно)). Активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази клітин на різних стадіях бластуляції оцінювали за різницею вмісту неорганічного фосфату (P_i), утвореного в середовищі інкубації за наявності та відсутності в ньому фрагментів мембран, а також з урахуванням поправки на вміст у мембранному препараті ендogenous P_i і виражали в мкмоль P_i /год на 1 мг білка. Кількість продукту реакції P_i тестували модифікованим методом Фіске–Суббароу [12], а вміст білка в мембранному препараті – методом Лоурі [13].

У дослідженнях використовували реактиви вітчизняного виробництва EGTA, («Merk» Німеччина); оубаїн («Fluka», Швейцарія); АТФ («Acros», Бельгія); Tris («Sigma», США). Вірогідність різниці одержаних показників з контролем визначали за t-критерієм Стюдента [4]. Статистичну обробку та графічне представлення виконували за допомогою програмного пакета Microsoft Excel.

Результати і їхнє обговорення

З метою кількісної оцінки впливу концентрацій амінокислотних похідних 1,4-нафтохінону, а саме аланінового, глутамінового й аспарагінового похідних (N=8, N=5) у загальну мінливість активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази на різних стадіях розвитку зародків в'юна проведено по 10 серій однофакторного дисперсійного аналізу, результати якого представлено на рис. 2.

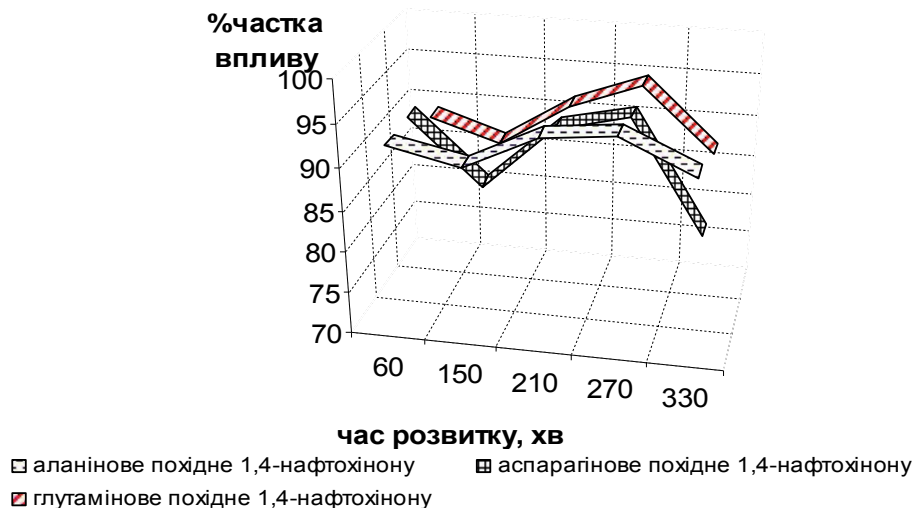


Рис. 2. Результати однофакторного дисперсійного аналізу впливу фактора часу на активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази упродовж раннього ембріогенезу в'юна.

Як видно на рис. 2, після проведення однофакторного дисперсійного аналізу впливу

часу розвитку на активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази спостерігаємо загальну тенденцію, що на 90 хв розвитку зародки є найменш чутливі до амінопохідних 1,4-нафтохінону. Максимальний вплив на мінливість активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази спостерігається на стадії 8 поділу бластомерів (210 хв, або 256 бластомерів). На стадії 8 поділу утворюється морула. Після даного поділу відбувається десинхронізація каріокінезу, а до наступної стадії шапочка бластомерів розташовується над жовтком, починається асинхронний поділ ядер, інтенсифікується синтез нових РНК [3]. Відповідно, зародки на даній стадії чутливі до впливу фізичних і хімічних чинників, що підтверджується результатами дисперсійного аналізу.

Спостерігаємо тенденцію до зменшення дії амінокислотних похідних 1,4-нафтохінону на 6 годину розвитку (10 поділ, або 1024 бластомери). На стадії 2 бластомерів частка впливу аланінового похідного 1,4-нафтохінону становить 83,0%, а за дії глутамінового й аспарагінового похідних 1,4-нафтохінону 76,8 та 83,1% відповідно. Найменший вплив на стадії 16 бластомерів (2,5 година розвитку) спостерігаємо за дії аспарагінового похідного 1,4-нафтохінону на активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази. Максимальний вплив на стадії 16 бластомерів проявляє аланінове похідне 1,4-нафтохінону (рис. 2).

Отже, зародки в'юна на стадії 8 поділу бластомерів чутливіші до впливу аланінового, глутамінового й аспарагінового похідних 1,4-нафтохінону, що підтверджується результатами дисперсійного аналізу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Атраментова Л. А., Утевская О. М.* Статистические методы в биологии. Горловка: Ліхтар, 2008. 248 с.
2. *Генега А. Б., Мандзинець С. М., Бура М. В.* та ін. Особливості впливу нових амінокислотних похідних 1,4-нафтохінону на Na^+ , K^+ -АТФ-азну активність зародків в'юна *in vitro* // *Studia Biologica*. 2010. Т. 4. №3. С. 31–44.
3. *Гойда Е. А.* Биофизические аспекты раннего онтогенеза животных. К.: Наук. думка, 1993. 224 с.
4. *Гумецький Р. Я., Паляниця Б. М., Чабан М. Е.* Математичні методи в біології: теоретичні відомості, програмований практикум, комп'ютерні тести. Л.: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2004. 111 с.
5. *Ідріссі А. Ель, Журахівська Л. Р., Марінцова Н. Г.* та ін. Синтез нових амінопохідних 1,4-нафтохінону // *Вісн. нац. ун-ту «Львівська політехніка»*. 2001. № 426. С. 111–114.
6. *Луцки М. Д., Лук'яненко А. В., Кусень С. И.* Метод массового механического удаления оболочек из зародышей в'юна // *Онтогенез*. 1983. Т. 14. № 6. С. 386–388.
7. *Мандзинець С. М., Целевич М. В., Янович Д. В.* та ін. Зміна ферментативної активності Na^+ , K^+ -помпи зародків риб за умов впливу івермектину // *Біологія тварин*. 2007. Т. 9.

№ 1–2. С. 217–221.

8. *Нейфах А. Е.* Молекулярная биология процессов развития. М.: Наука, 1977. 311 с.
9. *Степанюк Г. І., Шеремета Р. О., Новиков В. П.* та ін. Церебропротекторна дія амінокислотомісних похідних 1,4-нафтохінону на моделі гострої ішемії головного мозку // Одеський мед. журнал. 2005. Т. 89. № 3. С. 43–45.
10. *Целевич М. В., Мандзинець С. М, Санагурський Д. І.* Na^+ , K^+ -АТФ-азна активність мембран зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L. при дії антибіотиків // Фізіол. журнал. 2004. Т. 50. № 5. С. 64–68.
11. *Юшкова В. В.* Протигіпоксичні та протиішемічні властивості амінокислотомісних похідних 1,4 – нафтохінону: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.03.05. К., 1999. 19 с.
12. *Fiske C. H., Subbarow Y.* The colorimetric determination of phosphorus // J. Biol. Chem. 1925. Vol. 66. P. 375–400
13. *Lowry O. H., Rosebrough N. G., Farr A. L.* et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent// J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193. P. 265–275.

Стаття: надійшла до редакції 03.06.14

доопрацьована 02.10.14

прийнята до друку 03.10.14

ANOVA IMPACT INFLUENCE OF AMINO ACID DERIVATIVES OF 1,4-NAPHTHOQUINONE ON Na^+ , K^+ -ATP-ase LOACH MEMBRANE ACTIVITY

A. Heneha, M. Bura, D. Sanagursky

Ivan Franko National University of Lviv

4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine

e-mail: anastasiyah2@gmail.com

The effect of amino acid derivatives of 1,4-naphthoquinone (in concentrations 10^{-5} – 10^{-9} M) on the activity of Na^+ , K^+ -ATP-ase in the early period of development (60-330 min) embryos of loach *Misgurnus fossilis* L. (time factor) using univariate analysis of variance. Established that their contribution to the variability of the investigated membrane enzyme activity is more significant in 8 division (210 min of embryos, 256 blastomeres) and slightly decreases at the 10 stage of blastomeres division (6 hour development, 1024 blastomeres). Embryos at stage of 8 division of blastomeres are more sensitive to the effects of physical and chemical factors, as confirmed by the results of the analysis of variance.

Keywords: 1,4-naphthoquinone, amino acid derivatives, the activity of Na^+ , K^+ -ATP-ase, blastomeres, embryos of loach.

**ДИСПЕРСИОННИЙ АНАЛІЗ ВЛИЯНИЯ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
1,4-НАФТОХИНОНА НА АКТИВНОСТЬ Na⁺, K⁺ -АТФ-АЗЫ МЕМБРАН
ЗАРОДЫШЕЙ ВЬЮНА**

А. Генега, М. Бура, Д. Санагурский

Львовский национальный университет имени Ивана Франко

ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина

e-mail: anastasiyah2@gmail.com

Оценено влияние аминокислотных производных 1,4-нафтохинона (в концентрациях 10^5 – 10^9 М) на активность Na⁺, K⁺ -АТФ-азы в ранний период развития (60-330 мин) зародышей вьюна *Misgurnus fossilis* L. (фактор времени) с использованием однофакторного дисперсионного анализа. Установлено, что их вклад в изменчивость активности исследуемого мембранного фермента является более весомым на стадии 8 деления (210 мин развития зародышей, 256 бластомеров) и несколько снижается на стадии 10 деления бластомеров (6 час развития, 1024 бластомера). Зародыши на стадии 8 деления бластомеров чувствительны к воздействию физических и химических факторов, что подтверждается результатами дисперсионного анализа.

Ключевые слова: 1,4-нафтохинон, аминокислотные производные, активность Na⁺, K⁺ -АТФ-аза, бластомеры, зародыши вьюна.

УДК 616.152/153- 073.7

**ЗАСТОСУВАННЯ РФА ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЕЛЕМЕНТНОГО
СКЛАДУ СИРОВАТКИ КРОВІ**

А. Мешков, В. Кузнецов, Л. Гребеник, Л. Суходуб

Сумський державний університет

вул. Римського-Корсакова, 2, Суми 40007, Україна

e-mail: guhosotsu@gmail.com

У статті розглянуто особливості застосування рентгено-флуоресцентного аналізу (РФА) для вивчення зразків біологічного походження. Основна увага приділена використанню РФА для оцінки мінерального складу рідких проб. Розглянуто приклад застосування цього методу для визначення концентрації міді у сироватці крові за спрощеним експериментальним алгоритмом, який передбачає додавання стандарту елемента до зразка з подальшим розрахунком, виходячи з існування лінійної залежності інтенсивності піків у РФ-спектрах від концентрації елемента. Наведений принцип розрахунку з урахуванням концентрації стандарту у пробі сироватки крові та інтенсивності піків елемента у РФ-спектрах.