ISSN 0206-5657. Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2011. Випуск 57. С. 38–46
Visnyk of the Lviv University. Series BIology. 2011. Issue 57. P. 38–46

БІОФІЗИКА

УДК: 663.579.862+577.352+597.551.2-131

# ДИСПЕРСІЙНИЙ АНАЛІЗ ВПЛИВУ ПОХІДНИХ ТІОСУЛЬФОКИСЛОТ НА ЗМІНИ АКТИВНОСТІ $Na^+$, $K^+$-АТФ-АЗИ ЗАРОДКІВ В'ЮНА ЗА УМОВ ДОСЛІДЖЕННЯ *IN VITRO*

**О. Яремкевич[1], І. Поліщук[2], С. Мандзинець[2], М. Бура[2], Д. Санагурський[2], В.Лубенець[1], В.Новіків[1]**

*[1]Національний університет «Львівська політехніка»*
*вул. С. Бандери,12, Львів 79013, Україна*
*e-mail: yaremkevych.os@gmail.com*
*[2]Львівський національний університет імені Івана Франка*
*вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна*
*e-mail: mcelevych@yahoo.com*

Проведено оцінку впливу метил- і параамінобензентіосульфонатів калію у концентраціях $10^{-3}$÷$10^{-8}$ 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 досліджуваних біологічно активних речовин і залежать від часу розвитку зародків. Найбільша чутливість $Na^+$, $K^+$-АТФ-ази мембран зародків до змін концентрації всіх досліджуваних похідних тіосульфокислот існує в період розвитку від 210 до 270 хв, а найменша – на стадії 16 бластомерів (150 хв). Міра мінливості активності $Na^+$, $K^+$-АТФ-ази мембран визначається і впливом тіосульфонатів у різних концентраціях, і фактором часу розвитку зародків. Проведений дисперсійний аналіз виявив незначний внесок інших неврахованих факторів у зміни активності досліджуваного мембранного ферменту – 2,7÷13,7% для метилтіосульфонату калію та 3,8÷6,4% для параамінобензентіосульфонату калію. За допомогою дисперсійного аналізу встановлено, що $Na^+$, $K^+$-АТФ-азна активність зародків в'юна проявляє високу чутливість до дії досліджуваних тіосульфонатів і майже не залежить від періоду розвитку зародків.

*Ключові слова:* зародки в'юна, активність $Na^+$, $K^+$-АТФ-ази, тіосульфонати, дисперсійний аналіз.

Тіосульфонати – сірковмісні біологічно активні сполуки, синтетичні аналоги природних біорегуляторів, зокрема, діючої субстанції часнику (*Allium sativum* L.). Високий індекс і широкий спектр антимікробної активності тіосульфоестерів, їхня стабільність і низька токсичність дали змогу запропонувати ці сполуки як лікарські препарати [1–3, 5, 6]. Під час біотрансформаційних процесів тіосульфонати перетворюються на інші сполуки сульфуру, зокрема аліцин, діалілсульфіди, вінільні сульфуровмісні похідні, S-алілцистеїн та D-алілмеркаптоцистеїн. Встановлено, що S-алілцистеїн запобігає тромбоутворенню, інгібуючи агрегацію й адгезію тромбоцитів і виступає як антикоагулянт, що призводить до полегшення перебігу серцево-судинних патологій [23], знижує рівень холестерину у крові [25], має антиоксидантні властивості [17], пригнічує ріст ракових клітин, інгібуючи клітинний цикл [13, 14], і захищає печінку від токсинів [20]. Діалілсульфід (DAS) і діалілдисульфід (DADS) проявляють гіполіпідемічні ефекти, котрі, на думку авторів [22], у дослідах *in vivo* були пов'язані з пригніченням власне даними сполуками активності 3-гідрокси-3-метилглутарил-CoA редуктази (HMGR) – ключового ферменту синтезу хо-

© Яремкевич О., Поліщук І., Мандзинець С., 2011

лестерину. Показано, що DAS і DADS здатні не тільки знижувати рівень холестерину, але й запобігати утворенню ракових клітин [24]. Хоча детальні молекулярні цитотоксичні механізми дії DAS і DADS невідомі, відзначено зупинку клітинного циклу у фазі G2/M шляхом ініціації апоптозу й активації білків-супресорів пухлин [24]. Аліцин, запобігаючи утворенню реактивних форм кисню способом регулювання II фази детоксикуючих ферментів, підвищує рівень клітинного глутатіону в культивованих ендотеліальних клітинах судин [15]. Сульфурні сполуки викликають затримку переважно у фазі G2/M клітинного циклу, стимулюють мітохондріальний апоптозний шлях, збільшують ацетиляцію гістонів, також впливають на міжклітинну комунікацію та беруть участь у розвитку загальної резистентності організму [16]. Ароматичні тіосульфонати через пригнічення рецепторів фібриногену GPIIb/IIIa та синтезу тромбоксану A2 є ефективними інгібіторами агрегації тромбоцитів і виступають як антикоагулянти, що є підґрунтям для створення на їхній основі нових антитромботичних препаратів для запобігання міокардіальних ускладнень та інсульту [19]. Гетероциклічні тіосульфонати, що містять кільця індолу, індоліну, бензоімідазолу і хіноксаліну, виявили високу ВІЛ-протеазну активність [21].

При вивченні механізмів дії чинників різноманітної природи значна увага приділяється особливостям їхньої взаємодії власне з плазматичною мембраною (ПМ), котра є найпершою ланкою у сприйнятті позаклітинних сигналів [3], проведенні та трансдукції клітинної відповіді. Одним із найбільш чутливих показників впливу різних чинників на стан ПМ є зміна функціонального стану іонтранспортних систем, у тому числі й АТФ-аз Р-типу. $Na^+$, $K^+$-активована, $Mg^{2+}$-залежна-АТФ-аза (АТФ-гідролаза, уабаїнчутлива Na+, K+-АТФ-аза, $Na^+$, $K^+$-помпа, ЕС 3.6.1.37), котра поєднує транспортно-гідролітичну [4-5] і рецепторну функцію [5], специфічно взаємодіючи з екзогенними інгібіторами – серцевими глікозидами або їх ендогенними аналогами [4–5].

Оскільки відомо, що зародки в'юна (*Misgurnus fossilis* L.) у період раннього ембріогенезу є адекватною тест-системою для дослідження впливу різних фармакологічних [3, 4] та хімічних [7] чинників на живі організми, та завдяки короткому періодові ембріогенезу, плазматичні мембрани зародків в'юна є зручним об'єктом для досліджень $Na^+$, $K^+$-АТФ-ази.

У попередніх дослідженнях встановлено, що дія тіосульфонатів веде до достовірних дозозалежних змін активності $Na^+$, $K^+$-АТФ-ази зародків: найбільш інгібувальний вплив виявлено за наявності в середовищі інкубації калієвих солей тіосульфокислот у концентраціях $10^{-3} \div 10^{-5}$ М, тоді як додавання до середовища тіосульфонатів у низьких концентраціях (порядок $10^{-8}$ М) веде до підвищення активності $Na^+$, $K^+$-АТФ-ази зародків порівняно з контролем [12].

Мета даної роботи полягала у кількісній оцінці впливу чинника часу (тривалості розвитку) та тіосульфонатів (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.

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

## Матеріали та методи

Отже, з метою кількісної оцінки впливу похідних тіосульфокислот (n=5) у загальну мінливість показника (зміни активності $Na^+$, $K^+$-АТФ-ази) на різних стадіях розвитку за-

родків в'юна проведено по 10 серій однофакторного дисперсійного аналізу (рис. 1) та по 12 серій двофакторного дисперсійного аналізу (рис. 2).

Вихідним матеріалом дослідження були експериментальні дані [12], а саме – середні значення активності $Na^+,K^+$-АТФ-ази плазматичної мембрани за дії похідних тіосульфокислот на послідовних стадіях розвитку зародків в'юна: двох (60 хв), 16 (150 хв), 64 (210 хв) бластомерів, восьмого (270 хв) і десятого (330 хв) поділів.

Мікросомну фракцію мембран зародків в'юна одержували методом диференційного центрифугування у градієнті густини сахарози, за методикою, описаною М. Д. Луциком та ін. [6]. Зародки попередньо гомогенізували у буферному розчині такого складу (ммоль/л): сахароза – 120,0; KCl – 130,0; $MgCl_2$ – 5,0; тріс-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 [6].

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 $Na^+$, $K^+$-АТФ-ази, додавали розчини тіосульфонатів до кінцевої концентрації $10^{-3}\div10^{-8}$ М.

Питому активність $Na^+$, $K^+$-АТФ-азної системи досліджуваних клітин 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 $P_i$ в перерахунку за 1 год на 1 мг білка. Кількість продукту реакції $P_i$ визначали за модифікованим методом Фіске-Суббароу [9], а вміст білка в суспензії мембранного препарату – за методом Лоурі [8].

Експериментальний матеріал опрацьовували методом одно- та двофакторного дисперсійного аналізу. Для кожного з тіосульфонатів – метилтіосульфонату й параамінобензентіосульфонату калію визначали відносні частки впливу різних концентрацій цих речовин ($10^{-3}\div10^{-8}$ М) та чинника часу розвитку зародків (60, 150, 210, 270 та 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 тіосульфонатів (досліджуваний чинник) у фіксовані моменти розвитку зародків в'юна. Проведено п'ять серій дисперсійного аналізу для кожного тіосульфонату за даними, отриманими в певний момент розвитку (60, 150, 210, 270 та 330 хв); $N_c$=6 (шість концентрацій); *двофакторний дисперсійний аналіз* для оцінки впливу кожного з похідних тіосульфокислот 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 похідних тіосульфокислот у певній концентрації за аналогічний період. Було проведено шість серій двофакторного дисперсійного аналізу (шість різних концентрацій) для кожного з тіосульфонатів; $N_c$=2 (без та за наявності тіосульфонату), $N_t$=5 (п'ять моментів часу).

Дисперсійний аналіз і вірогідність отриманих результатів дослідження виконували у програмі EXCEL. Критичні рівні значимості показників під час перевірки статистичних гіпотез у дослідженнях становили 0,05 та 0,01.

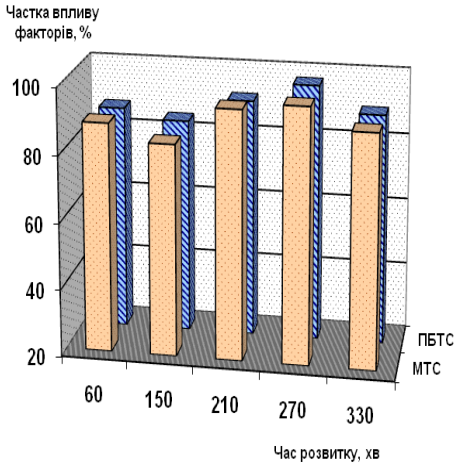



Рис. 1. Вплив похідних тіосульфокислот (МТС – метилтіосульфонату калію, ПБТС – параамінобензентіосульфонату калію) у різних концентраціях на активність $Na^+$, $K^+$-АТФ-ази зародків на різних стадіях розвитку зародків в'юна, $p<0,01$.

**Результати і їхнє обговорення**

У результаті проведеного однофакторного дисперсійного аналізу було показано, що метилтіосульфонат і параамінобензентіосульфонат калію у досліджуваних концентраціях однаково впливають на зміни активності оуабаїнчутливої АТФ-ази зародків в'юна (рис. 1). Тобто достовірної різниці між впливом тіосульфонатів (часток впливу факторів) у зміни мінливості досліджуваного показника (зміни $Na^+$, $K^+$-АТФ-азної активності зародків в'юна) не виявлено.

За таких умов вплив вказаних тіосульфонатів у діапазоні досліджуваних концентрацій на мінливість активності $Na^+$, $K^+$-АТФ-ази встановлено на різних стадіях розвитку зародків в'юна. Вплив досліджуваних тіосульфонатів є мінімальним на стадії 16 бластомерів (150 хв, відносні частки становлять у середньому 85,0% для метилтіосульфонату і параамінобензентіосульфонату калію) та максимальний – на стадії 8 поділу бластомерів (270 хв, відносні частки становлять у середньому 96,7% в обох випадках ($p=0,01$). На стадії 2 бластомерів (60 хв) частка впливу метилтіосульфонату калію становить 88,7%, а за дії параамінобензентіосульфонату калію – 87,3%. За умов впливу обох досліджуваних похідних тіосульфокислот спостерігаємо тенденцію до зменшення їхньої дії на загальну мінливість досліджуваного показника на 6-й годині розвитку (10 поділ).

Для $Na^+$, $K^+$-АТФ-ази мембран зародків характерна найбільша чутливість до похідних тіосульфокислот у досліджуваному діапазоні концентрації в період розвитку від 210 до 270 хв, а найменша – на стадії 16 бластомерів (150 хв).

Щоб порівняти вплив ефектів різних концентрацій тіосульфонатів ($10^{-3}\div10^{-8}$ М) на активність $Na^+$, $K^+$-АТФ-ази мембран бластомерів в'юна у різний час розвитку зародків в'юна, проведено 12 серій двофакторного дисперсійного аналізу, результати якого представлено на рис. 2.

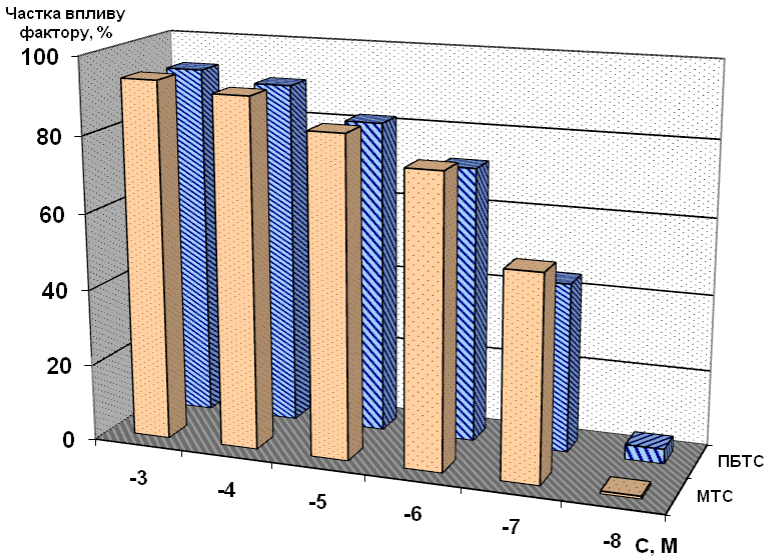


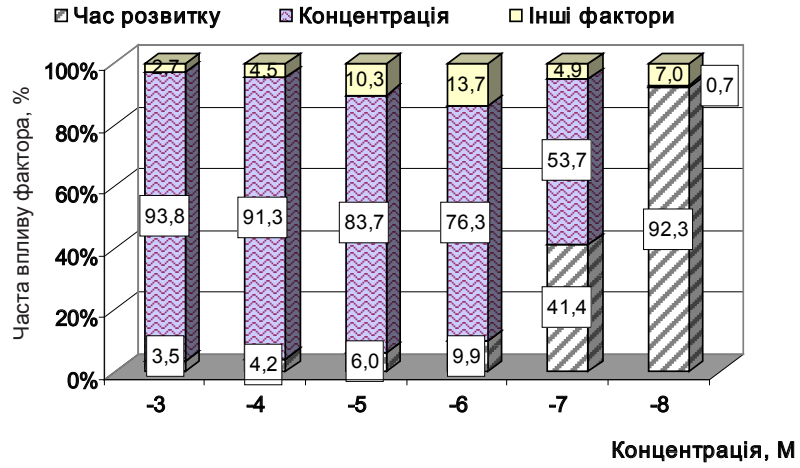

Рис. 2. Оцінка впливу похідних тіосульфокислот у різних концентраціях на активність $Na^+$, $K^+$-АТФ-ази зародків на різних стадіях розвитку зародків в'юна, $p<0,01$.

Визначено відносні частки впливу досліджуваних тіосульфонатів у різних концентраціях і фактора часу на фоні впливу інших, не врахованих у експерименті чинників, а також оцінено достовірність впливу цих факторів. Рівень достовірності для отриманих результатів впливу фактора концентрацій ($10^{-3}$÷$10^{-7}$М) похідних тіосульфокислот становить $p<0,01$, окрім впливів $10^{-8}$ М метилтіосульфонату ($p=0,44$) та параамінобензентіосульфонату калію ($p=0,83$).

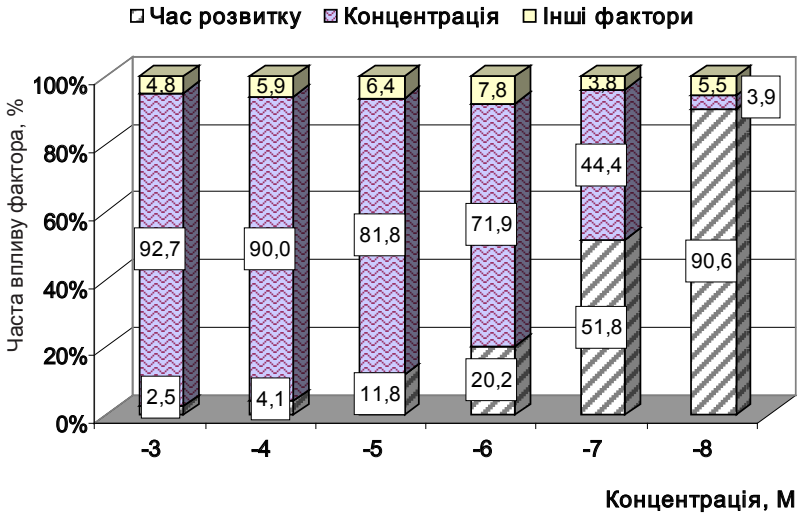
Таким чином показано, що зміни активності $Na^+$, $K^+$-АТФ-ази зародків, згідно з проведеним дисперсійним аналізом, визначаються дією різних концентрацій досліджуваних тіосульфонатів. Максимальна частка впливу для цих речовин (94÷90%) визначена для тіосульфонатів у концентраціях $10^{-3}$÷$10^{-4}$М з подальшим зменшенням частки впливу на зміни активності ферменту (зі зменшенням концентрації тіосульфонатів), а мінімальна частка впливу характерна для дії досліджуваних речовин за низької концентрації $10^{-8}$М, відповідно для метилтіосульфонату калію – 0,7%, а для параамінобензентіосульфонату калію – 3,9%.

Аналізуючи результати двофакторного дисперсійного аналізу, виявили, що внесок фактора часу в загальну мінливість ферментативної активності натрієвої помпи за дії обох біологічно активних сполук є незначною за високих концентрацій $10^{-3}$÷$10^{-6}$М та перебуває в межах 3,5÷9,9% для метилтіосульфонату калію і 2,5÷20,2% для параамінобензентіосульфонату калію. Для дії обох тіосульфонатів у концентраціях $10^{-7}$ та $10^{-8}$ М внесок фактора часу у зміни активності $Na^+$, $K^+$-АТФ-ази зародків був значним і становив 41,4÷92,3% ($p=0,99$) для метилтіосульфонату калію і 51,8÷90,6% ($p=0,99$) для параамінобензентіосульфонату калію (рис. 3).

Ці результати свідчать, що вплив вказаних біологічно активних речовин у досліджуваних концентраціях змінюється протягом розвитку зародків в'юна. Отже, міра




*а*




*б*

Рис. 3. Двофакторний дисперсійний аналіз впливу МТС (*а*), ПБТС (*б*) у різних концентраціях і тривалості розвитку зародків на активність $Na^+$, $K^+$-АТФ-ази зародків в'юна на різних стадіях їхнього розвитку.

мінливості активності $Na^+$, $K^+$-АТФ-ази мембран визначається впливом тіосульфонатів різного діапазону концентрацій і фактором часу розвитку зародків. Проведений дисперсійний аналіз виявив досить незначний внесок інших неврахованих факторів у зміни активності досліджуваного мембранного ферменту зародків, частка впливу якого перебувала в межах від 2,7 до 13,7%.

Ймовірно, тіосульфонати у високих концентраціях ($10^{-3}$М) хоч і є модуляторами активності АТФ-ази зародків, однак їхній інгібувальний ефект упродовж раннього

розвитку досить вагомий, і ферментативна активність $Na^+$, $K^+$-помпи не може повністю відновитися до початкового рівня, тоді як додавання до середовища тіосульфонату калію в низьких концентраціях ($10^{-8}$М) веде до відновлення активності $Na^+$, $K^+$-АТФ-ази зародків до рівня контролю. Ймовірно, тіосульфонати можуть включатися в ті ланки метаболізму зародків, які безпосередньо пов'язані зі синтезом і формуванням бластодерм зародків, що і призводить до порушення функціонування систем мембранного транспорту.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. А.с. №198538 СССР. Способ лечения грибковых заболеваний кожи «Эсуланом» / (СССР) // Б.И., 1967, № 14.
2. *Болдырев Б. Г., Колмакова Л. Е., Першин Г. М. и др.* Эсулан – новое средство для лечения эпидермофитии стоп // Хим.-фарм. журн. 1968. Т. 2. № 4. С. 12–16.
3. *Гойда О. А.* Биофизические аспекты раннего онтогенеза животных. К.: Наук. думка, 1993. 224 с.
4. *Капля А. А.* Структурная организация изоферментов $Na^+$, $K^+$-АТФ-азы в плазматической мембране // Укр. біохім. журн. 1997. Т. 69 (5–6). С. 12–24.
5. *Лопина О. Д.* $Na^+$, $K^+$-АТФ-аза: структура, механизм и регуляция активности // Биол. мембраны. 1999.Т. 16 (6). С. 584–603.
6. *Луцик М. Д., Кусень С. И., Лукьяненко А. В.* Очистка и частичная характеристика плазматических мембран клеток зародышей вьюна // Онтогенез. 1986. Т. 17. №3. С. 314–321.
7. *Мандзинець С. М., Целевич М. В., Янович Д. В., Санагурський Д. І.* Зміна ферментативної активності $Na^+$, $K^+$ - помпи зародків риб за умов впливу івермектину // Біологія тварин. 2007. Т. 9 (1–2). С. 217–221.
8. *Лубенець В. І., Новіков В. П., Лужецька-Швед О. В.* та ін. Хімія і застосування ефірів тіосульфокислот// Вісн. ДУ «ЛП». Хімія, технологія речовин та їх застосування. 1997. № 332. С. 215–219.
9. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен). Учеб. пособие / Под ред. М.И. Прохоровой. Л.: Изд-во Ленинград. ун-та, 1982. 272 с.
10. Патент 2 573 077. Франція, МКИ C 07 D 235/28; A 61 K 31/47. Nouveaux derives thiosulfonates, leur procede de preparation ainsi que les compositions pharmaceutiques les contenant / Sebille Bernard, Beuzard Yves, Demarne Henri (Франція). – № 8417286; Заявлен. 13.11.84; Опубл. 16.05.86 // РЖХ. 9О138П. Stubb J. Controlling radical reactions // Monthly Nature. 1994. Vol. 2. N 8. P. 33.
11. *Сопрунюк Н. Г., Яницкая Л. В., Лубенец В. И., Швед О. В.* Защитные свойства тиолсульфонатов // Защита металлов. 1996. Т. 32. № 5. С. 534–536.
12. *Яремкевич О., Бура М., Мандзинець С.* та ін. Зміни динаміки мембранного потенціалу зародків в'юна під впливом тіосульфонатів// Вісн. НУ „ЛП". Хімія, технологія речовин та їх застосування. 2009. Вип. 644. С. 78–85.
13. *Amagase H., Milner J. A.* Impact of various sources of garlic and their constituents on 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene binding to mammary cell DNA // Carcinogenesis. 1993. Vol. 14. N 8. P. 1627–1631.
14. *Gail M. H., You W. C., Chang Y. S.* et al. Factorial trial of three interventions to reduce the progression of precancerous gastric lesions in Shandong, China: design issues and initial data // Control Clin. Trials. 1998. Vol. 19. N 4. P. 352–369.
15. *Hirsch J., Amariglio N., Savion N.* Allicin up-regulates cellular glutathione level in vascular endothelial cells // Eur. J. Nutr. 2009. Vol. 48. N 2. P 67–74.

16. *Iciek M., Kwiecień I., Włodek L.* Biological properties of garlic and garlic-derived organosulfur compounds // Environ. Mol. Mutagen. 2009. Vol. 50 (3). P. 247–265.
17. *Ide N., Lau B. H.* Garlic compounds protect vascular endothelial cells from oxidized low density lipoprotein-induced injury // J. Pharm. Pharmacol. 1997. Vol. 49 (9). P. 908–911.
18. *Lowry O. H., Rosebrough N. G., Farr A. L., Randall R. C.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193. N 1. P. 265–275.
19. *MacDonald J., Marchand M., Langler R.* Improving upon the *in vitro* biological activity of antithrombotic disulfides // Blood Coagul. Fibrinolysis. 2004. Vol. 15 (6). P. 447–450.
20. *Nakamura K., Maeda H., Nakagawa T.* et al. Estimation of total liver uptake and liver uptake per unit of liver volume of Tc-99m(Sn)-N-pyridoxyl-5-methyltryptophan (Tc-99m-PMT) using SPECT // Kaku. Igaku. 1988. Vol. 25 (12). P. 1363–1369.
21. *Prasad V. N. V.* Synthesis of Heterocyclic Thiosulfonates // J. Org. Lett. 2000. Vol. 2 (8). P. 1069–1072.
22. *Rai S. K., Sharma M., Tiwari M.* Inhibitory effect of novel diallyldisulfide analogs on HMG-CoA reductase expression in hypercholesterolemic rats: CREB as a potential upstream target // Life Sci. 2009. Vol. 85(5–6). P. 211–219.
23. *Steiner M., Li W.* Aged garlic extract, a modulator of cardiovascular risk factors: a dose-finding study on the effects of AGE on platelet functions // J. Nutr. 2001. Vol. 131 (3s). P. 980S–984S.
24. *Song J. D., Lee S. K., Kim K. M.* et al. Molecular mechanism of diallyl disulfide in cell cycle arrest and apoptosis in HCT-116 colon cancer cells // J. Biochem. Mol. Toxicol. 2009. Vol. 23 (1). P. 71–79.
25. *Yeh Y. Y., Yeh S. M.* Garlic reduces plasma lipids by inhibiting hepatic cholesterol and triacylglycerol synthesis // Lipids. 1994. Vol. 29 (3). P. 189–193.

*Стаття: надійшла до редакції 01.07.11*

*доопрацьована 17.10.11*

*прийнята до друку 18.10.11*

## ANALYSIS OF VARIANCE OF INFLUENCE OF THIOSULPHONIC ACID DERIVATIVES ON THE $Na^+$, $K^+$-ATP-ASE ACTIVITY OF LOACH EMBRYOS *IN VITRO*

**H. Yaremkevych[1], I. Polischuk[2], S. Mandzynets[2], M. Bura[2], D. Sanagurskyi[2], V. Lubenec[1], V. Novikov[1]**

*[1]Lviv National Polytechnic University*
*12, S. Bandera St., Lviv 79013, Ukraine*
*e-mail: yaremkevych.os@gmail.com*
*[2]Ivan Franko National University of Lviv*
*4, Hrushevskyi St., Lviv 79005, Ukraine*
*e-mail: mcelevych@yahoo.com*

The evaluation of influences of potassium salts of metyltiosulphonate and *n*-amino-benzentiosulphonate in the concentrations $10^{-3} \div 10^{-8}$ M (dose factor) on the $Na^+$, $K^+$-ATP-ase activity in the early period of development (60–330 min.) of loach embryos (time factor) using 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 all investigated thiosulphonic acid derivatives existed during the development from 210 minutes to 270 minutes and the lowest one was at the stage of 16 blastomeres (150 min). The measure of the variability of activity of $Na^+$, $K^+$-ATP-ase membranes was determined and the influence of various concentrations of thiosulphonic acid derivatives, and the embryo development time factor. The conducted analysis of variance revealed a minor contribution of other unaccounted factors in the study of changes in the activity of the membrane enzyme – 2,7 ÷ 13,7% for potassium metyltiosulphonate and 3,8 ÷ 6,4% for potassium aminobenzentiosulphonate.

*Key words:* loach embryo, $Na^+$, $K^+$-ATP-ase activity, thiosulphonic acid derivatives, analysis of variance.

## ДИСПЕРСИОННЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ПРОИЗВОДНЫХ ТИОСУЛЬФОКИСЛОТ НА ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ $Na^+$, $K^+$-АТФ-АЗЫ ЗАРОДЫШЕЙ ВЬЮНА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТА *IN VITRO*

**О. Яремкевич[1], И. Полищук[2], С. Мандзинец[2], М. Бура[2], Д. Санагурский[2], В. Лубенец[1], В. Новиков[1]**

*[1]Национальный университет «Львівська политехника»*
*ул. С. Бандеры,12, Львов 79013, Украина*
*e-mail: yaremkevych.os@gmail.com*
*[2]Львовский национальный университет имени Ивана Франко*
*ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина*
*e-mail: mcelevych@yahoo.com*

Произведена оценка влияния метилтиосульфоната и парааминобензентиосульфоната калия в концентрациях $10^{-3} \div 10^{-8}$ М (фактор дозы) на активность $Na^+$, $K^+$-АТФ-азы в раннем периоде развития (60–330 мин) зародышей вьюна (фактор времени) с использованием одно- и двухфакторного дисперсионного анализа. Установлено, что изменение активности фермента зависит от действия исследуемых биологически активных веществ и от времени развития зародышей. Наибольшая чувствительность $Na^+$, $K^+$-АТФ-азы мембран зародышей к изменениям концентрации всех исследуемых производных тиосульфокислот присуща в период развития от 210 до 270 мин, а наименшая – на стадии 16-ти бластомеров (150 мин). Мера изменчивости активности $Na^+$, $K^+$-АТФ-азы мембран определяется и влиянием различных концентраций тиосульфонатов, и фактором времени развития зародышей. Проведенный дисперсионный анализ определил достаточно незначительный вклад других факторов, которые не принимались во внимание, в изменение активности мембранного фермента – 2,7÷13,7% для метилтиосульфоната калия и 3,8÷6,4% для парааминобензентиосульфоната калия. С помощью дисперсионного анализа установлено, что $Na^+$, $K^+$-АТФ-азная активность зародышей вьюна определяет высокую чувствительность к действию исследуемых тиосульфонатов и почти не зависит от периода развития зародышей.

*Ключевые слова:* зародыши вьюна, активность $Na^+$, $K^+$-АТФ-азы, тиосульфонаты, дисперсионный анализ.