



УДК 577.352.4+547.556.4+597.551.2-131

ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ НОВИХ АМІНОКИСЛОТНИХ ПОХІДНИХ 1,4-НАФТОХІНОНУ НА Na^+ , K^+ -АТФ-азну АКТИВНІСТЬ ЗАРОДКІВ В'ЮНА *IN VITRO*

А. Б. Генега¹, С. М. Мандзинець¹, М. В. Буря¹, О. С. Яремкевич²,
В. П. Новіков², Н. Г. Марінцова², Д. І. Санагурський¹

¹Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: mcelevyuch@yahoo.com

²Національний університет „Львівська політехніка”
вул. Бандери, 12, Львів 79013, Україна

Досліджено *in vitro* вплив амінокислотних похідних 1,4-нафтохінону на активність Na^+ , K^+ -активованої, Mg^{2+} -залежної аденозинтрифосфатази зародків в'юна на ранніх етапах ембріогенезу. Проведено оцінку впливу різних концентрацій похідних на ферментативну активність Na^+ , K^+ -помпи плазматичних мембран в'юна протягом періоду синхронного дроблення бластомерів на основі визначених констант напівінгібування I_{50} . Встановлено, що дія калієвих солей N-(2-хлор-1,4-нафтохіноніл-3)-аланіну та гістидину веде до протилежних достовірних змін активності мембранозв'язаного ферменту зародків на стадії 10-го поділу бластомерів. Отже, амінокислотні похідні 1,4-нафтохінону можна віднести до дозозалежних модуляторів Na^+ , K^+ -активованого Mg^{2+} -залежного гідролізу АТФ, який здійснюється мембранними везикулами зародків, однак механізм їхньої дії остаточно не з'ясований, що потребує проведення подальших досліджень.

Ключові слова: калієві солі N-(2-хлор-1,4-нафтохіноніл-3)-аланіну та гістидину, Na^+ , K^+ -АТФ-аза, зародки в'юна, поділ бластомерів.

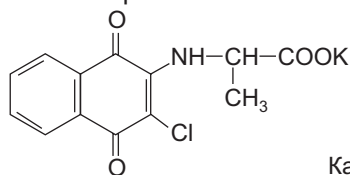
ВСТУП

У теперішній час на стадії розробки та клінічної апробації перебуває низка лікарських засобів на основі амінокислот, їхніх аналогів і пептидів [1, 5, 11], використання яких у медичній практиці є ефективним та обґрунтованим при лікуванні широкого кола хвороб і патологічних станів. Тому пошук нових похідних природних пептидів є цікавим як з теоретичної, так і з практичної точки зору.

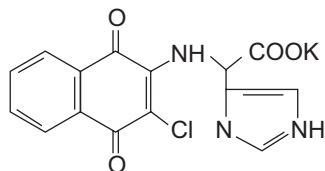
Одним із розділів сучасної фармацевтичної та органічної хімії, що динамічно розвиваються, є хімія хіноїдних сполук, у якій важливе місце посідають нафтохінон та його похідні. Сполуки цього класу викликають інтерес завдяки фізіологічним, хімічним, фізико-хімічним властивостям, зокрема, здатності до зворотного окисно-відновного процесу, що й зумовлює різноманітну високу біологічну активність похідних 1,4-нафтохінону [1, 12].

Синтетичні *N*-похідні 1,4-нафтохінону мають перспективи практичного використання в медицині та фармакології, оскільки володіють низькою токсичністю, проявляють активність у реакціях як з пероксидними, так і з алкільними радикалами, гальмують окиснення при надлишковому й низькому тиску O_2 , частково захищають ліпіди при гіпоксії та при небезпеці виникнення інфаркту [2, 4]. 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.

Одержані на кафедрі технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології Національного університету „Львівська політехніка” нові низькотоксичні сполуки (рис. 1) мають високу протигіпоксичну, протиішемічну і протисудомну дію, можуть бути використані у фармацевтичній промисловості для створення нових лікарських препаратів з церебропротекторною дією [1, 2, 6]; хімічна структура зображена нижче на рис. 1.



Калієва сіль 2- α -аланін-3-хлор-1,4-нафтохінону



Калієва сіль 2-гістидин-3-хлор-1,4-нафтохінону

Рис. 1. Структурні формули калієвих солей 2-амінокислот-3-хлор-1,4-нафтохінон

Fig. 1. Chemical structure of potassium salts of 2-aminoacids-3-chlorine-1,4-naphthoquinone

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 [7, 8], 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, убаїнчутлива Na^+ , K^+ -АТФ-аза, Na^+ , K^+ -помпа, ЕС 3.6.1.37), котра поєднує транспортно-гідролітичну [13, 27, 30] і рецепторну функцію [25], специфічно взаємодіючи з екзогенними інгібіторами – серцевими глікозидами або їхніми ендogenous аналогами [13, 14]. Однак відомості про зміну активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази за умов впливу біологічно активних речовин є нечисленними. Тому детальне дослідження впливу цих похідних на зародкові клітини прісноводної риби в'юна *Misgurnus fossilis* L. у період раннього ембріогенезу є актуальним і перспективним та дасть можливість глибше зрозуміти механізми біологічної дії цих речовин, покращити їхні лікувальні властивості, що матиме вагоме значення для фармакології та медицини.

Відомо, що зародки в'юна (*Misgurnus fossilis* L.) у період раннього ембріогенезу є адекватною тест-системою для дослідження впливу різних фармакологічних

[16, 23] та хімічних [3, 24] чинників на живі організми. Тому мета роботи полягала у з'ясуванні ймовірних механізмів впливу новосинтезованих калієвих солей амінокислот і нафтохінону на зміни Na^+ , K^+ -АТФ-азної активності на різних стадіях розвитку зародків в'юна.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження проводили на зародках в'юна (*Misgurnus fossilis* L.) через 60, 150, 210, 270 і 330 хв після запліднення яйцеклітин під час стадій, які відповідають першому дробленню зиготи (2 бластомери), четвертому (16 бластомерів), шостому (64 бластомери), восьмому (256 бластомерів) і десятому (512 бластомерів). Овуляцію стимулювали внутрішньом'язовим введенням самкам хоріогонічного гонадотропіну (500 од.). Ікру одержували через 36 год після стимуляції хоріогонічним гонадотропіном (500 од.) і запліднювали в чашках Петрі суспензією спермійів за Нейфахом [18, 19]. Після запліднення (через 5–10 хв) зиготи відмивали й інкубували у розчині Гольтфретера ($t = 21^\circ\text{C}$). Стадії розвитку контролювали візуально під бінокулярним мікроскопом МБС-9.

Мікросомну фракцію мембран зародків в'юна одержували методом диференційного центрифугування у градієнті густини сахарози, за методикою, описаною М. Д. Луциком та ін. [15]. Зародки попередньо гомогенізували у буферному розчині такого складу (ммоль/л): сахароза – 120,0; KCl – 130,0; MgCl_2 – 5,0; трис- HCl – 10,0 (рН 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 $t = -20^\circ\text{C}$ [15].

Перед початком експерименту аліквоту суспензії мембранного препарату (10 мкл) переносили у стандартне середовище інкубації, яке містило (ммоль/л): NaCl – 125,0; KCl – 30,0; MgCl_2 – 3,0; CaCl_2 – 0,01; ATP-Na_2 – 3; трис- HCl – 50,0 (рН 7,4; 21°C). Для визначення Na^+ , K^+ -АТФ-азної активності до середовища інкубації додавали 1 ммоль/л убаїну. В інкубаційне середовище, в якому визначали активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази, додавали розчини калієвих солей аланінового та гістидинового похідних 1,4-нафтохінону до кінцевої концентрації 10^{-3} , 10^{-5} – 10^{-9} 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 мкмольх P_i у перерахунку за год на 1 мг білка. Кількість продукту реакції P_i визначали за модифікованим методом Фіске-Суббароу [17], а вміст білка в суспензії мембранного препарату – за методом Лоурі [29]. Вірогідність одержаних показників визначали за t -критерієм Стьюдента.

Статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням програмного пакета для персональних комп'ютерів Microsoft Excel, достовірність змін встановлювали за t -критерієм Стьюдента [9].

Для оцінки характеристики варіабельності змін активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази зародків за умов дії калієвих солей амінокислотних похідних 1,4-нафтохінону визначено константи напівінгібування (I_{50}), шляхом лінеаризації одержаних кривих доза-ефект у логарифмічних координатах [10]. Числові значення I_{50} для досліджуваних

факторів на різних стадіях розвитку визначали у точці перетину одержаних прямих з віссю абсцис за допомогою програми GraphPad Prism5. Обчислення лінеаризованих графіків проводили з використанням методу найменших квадратів (значення коефіцієнта кореляції r становило 0,90–0,99).

У роботі застосовували такі реактиви: ЕГТА, NaN_3 („Merk”, Німеччина), убаїн („Fluka”, Швейцарія), АТР („Acros”, Бельгія), трис-гідроксиметил-амінометан. Інші реактиви вітчизняного виробництва, кваліфікації х.ч. або ч.д.а.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті проведених досліджень встановлено, що дія досліджуваних аланінового та гістидинового похідних 1,4-нафтохінону у концентраціях 10^{-3} , 10^{-5} – 10^{-9} М упродовж раннього ембріогенезу веде до виражених змін активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази зародків порівняно з контролем.

Активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази ПМ зародків на стадії 2 бластомерів становить $11,6 \pm 0,82$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка ($n = 10$) [23, 26]. Встановлено, що дія похідного аланіну в концентрації 10^{-3} М на стадії 2 бластомерів (рис. 2, А) призводить до вагомого зниження активності мембранопов'язаного ферменту порівняно з впливом похідного гістидину. Найбільш виражених змін активності АТФ-ази зародків на досліджуваній стадії розвитку зазнавала за наявності в середовищі калієвої солі аланіну в концентраціях 10^{-3} – 10^{-6} М. За таких умов активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази знижувалася відповідно на $82,7 \pm 10,2$ та $73,9 \pm 4,1\%$ порівняно з контролем, тоді як при дії гістидинового похідного 1,4-нафтохінону у зазначених концентраціях лише наявність у середовищі інкубації калієвої солі гістидину в концентраціях 10^{-3} М призводила до вираженого зниження активності ферменту. Зменшення концентрації досліджуваної амінокислоти вела до більше ніж 50% зниження активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази зародків порівняно з контролем. Так при дії 10^{-5} та 10^{-6} М гістидинового похідного 1,4-нафтохінону активність ферменту становила $4,9 \pm 0,2$ та $5,2 \pm 0,2$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка, що становить у середньому 43,7% активності АТФ-ази в контролі. Слід відзначити, що вплив новосинтезованих біологічно активних речовин має специфічний характер, оскільки їхня присутність в інкубаційному середовищі навіть у мікромольних концентраціях призводить до зниження активності досліджуваного мембранного ферменту зародків.

Подальше зниження концентрації (10^{-7} – 10^{-9} М) досліджуваних амінокислотних похідних у середовищі інкубації призводило до дозозалежного зростання активності досліджуваної АТФ-ази зародків. Слід відзначити, що калієва сіль аланіну в усіх досліджуваних концентраціях вела до більш вираженого зниження активності ферменту порівняно з похідним гістидину. Так у разі дії гістидинового похідного 1,4-нафтохінону в концентрації 10^{-9} М спостерігали недостовірне зниження активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази на $5,9 \pm 0,1\%$ порівняно з контролем.

На стадії розвитку 16 бластомерів (рис. 3, А), як і на попередній досліджуваній стадії, після внесення в середовище інкубації похідних аланіну та гістидину виявлено концентраційну залежність змін активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази зародків порівняно з контролем ($13,9 \pm 1,2$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка).

Na^+ , K^+ -АТФ-азна активність мембран зародків на стадії розвитку 64 бластомерів (рис. 4, А) при внесенні у стандартне Mg^{2+} -вмісне середовище інкубації становить $15,3 \pm 0,9$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка. Слід відзначити, що загалом при наявності в середовищі інкубації досліджуваних концентрацій аланінового і гістидино-

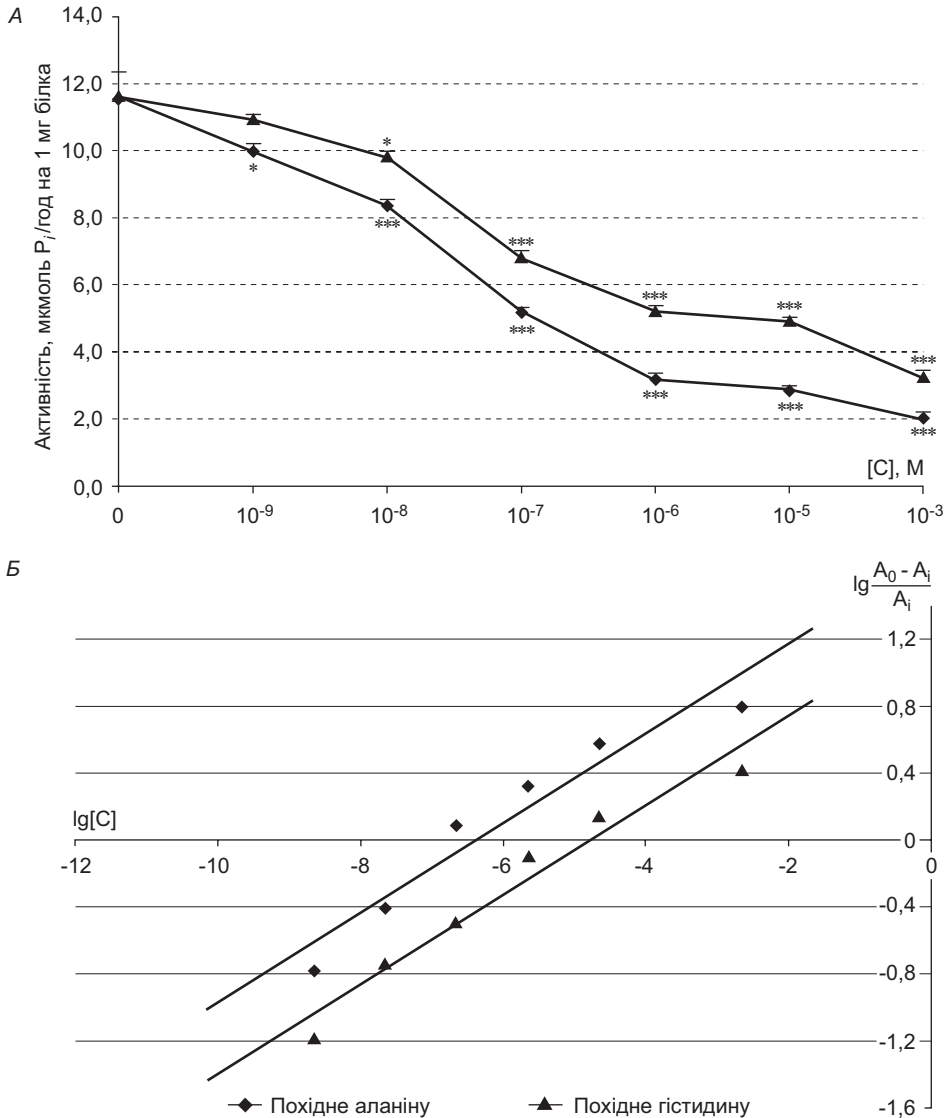


Рис. 2. Вплив калієвих солей N-(2-хлор-1,4-нафтохіноніл-3)-аланіну та гістидину на Na^+ , K^+ -АТФ-азну активність зародків в'юна на стадії розвитку 2 бластомерів.

Тут і далі: А – Na^+ , K^+ -АТФ-азна активність зародків в'юна за умови впливу похідних амінокислот у концентраціях 10^{-3} , 10^{-5} – 10^{-9} М;

Б – Лінеаризація концентраційної залежності інгібування Na^+ , K^+ -АТФ-ази похідними амінокислот у логарифмічних координатах.

Вірогідні зміни порівняно із контролем: * – $p > 0,95$; ** – $p > 0,99$; *** – $p > 0,999$

Fig. 2. The effect of the potassium salts N-(2-chlorine-1,4-naphthoquinone-3)-alanine and histidine on the activity of Na^+ , K^+ -ATPase of loach embryos on the stage of 2 blastomers.

Here and after: А – the activity of Na^+ , K^+ -ATPase of loach embryos with potassium salts N-(2-chlorine-1,4-naphthoquinone-3)-alanine and histidine (10^{-3} , 10^{-5} – 10^{-9} M);

Б – Linearization of concentration dependence inhibition by amino acid derivatives of Na^+ , K^+ -ATPase in the logarithmic coordination.

Significance level shown inside the figure, determined by Student's t-test: * – $p > 0,95$; ** – $p > 0,99$; *** – $p > 0,999$

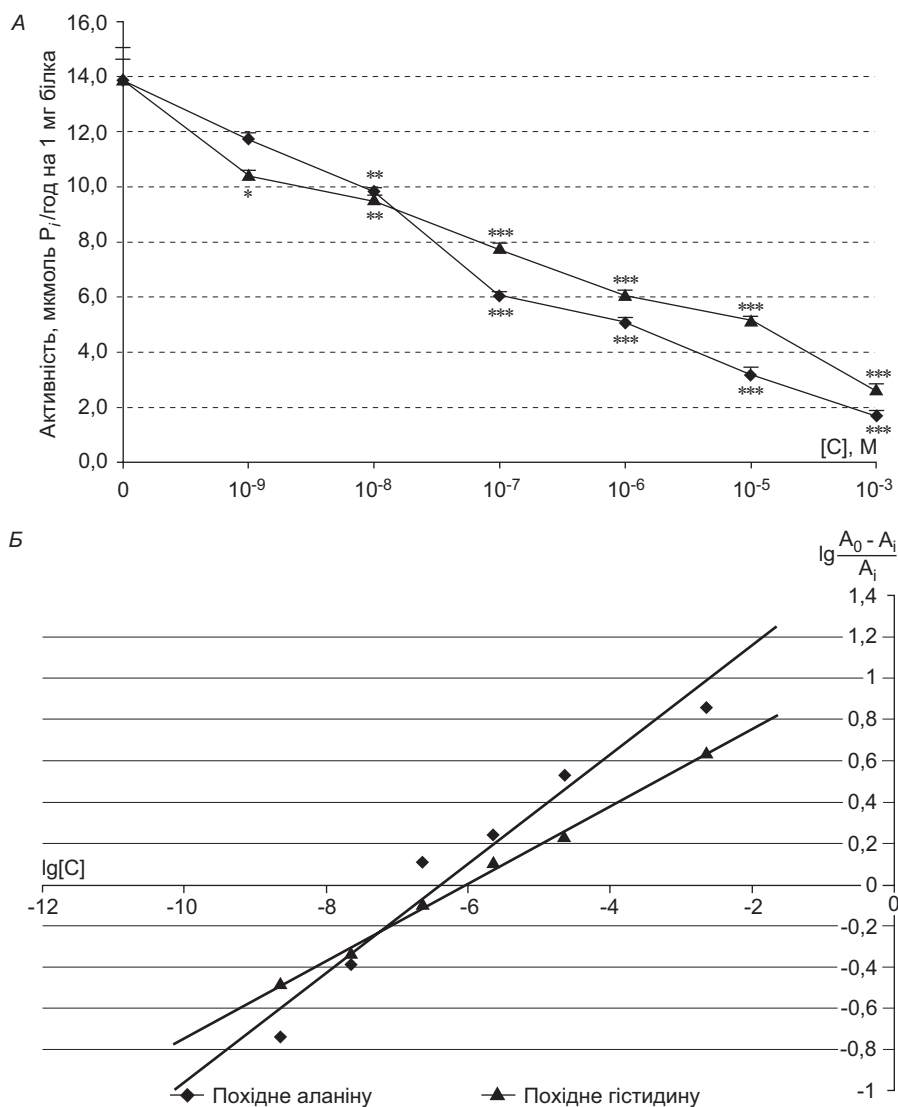


Рис. 3. Вплив калієвих солей N-(2-хлор-1,4-нафтохінон-3)-аланіну та гістидину на Na⁺, K⁺-АТФ-азну активність зародків в'юна на стадії розвитку 16 бластомерів

Fig. 3. The effect of the potassium salts N-(2-chlorine-1,4-naphtoquinone-3)-alanine and histidine on the activity of Na⁺, K⁺-ATPase of loach embryos on the stage of 16 blastomers

вого похідних 1,4-нафтохінону, як і на попередніх стадіях розвитку, спостерігалось дозозалежне достовірне зниження активності Na⁺, K⁺-АТФ-ази зародків.

Як і на попередніх стадіях розвитку зародків, дія амінокислотних похідних 1,4-нафтохінону у концентрації 10⁻³÷10⁻⁷ М призводила до вираженого зниження активності Na⁺, K⁺-АТФ-ази (більше, ніж на 50% порівняно з контролем в обох випадках). На стадії 64 бластомерів похідне аланіну проявляло більш виражений інгібувальний вплив порівняно з похідним гістидину (рис. 4, А).

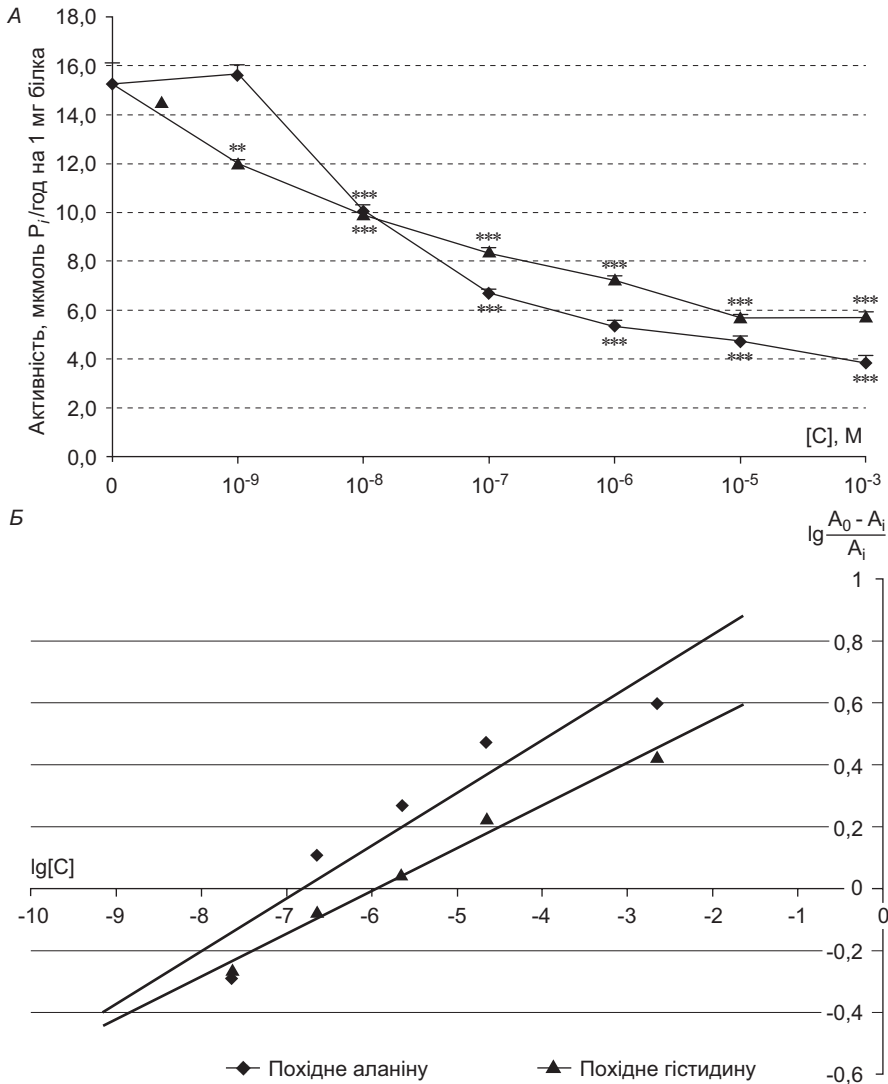


Рис. 4. Вплив калієвих солей N-(2-хлор-1,4-нафтохіноніл-3)-аланіну та гістидину на Na^+ , K^+ -АТФ-азну активність зародків в'юна на стадії розвитку 64 бластомерів

Fig. 4. The effect of the potassium salts N-(2-chlorine-1,4-naphtoquinone-3)-alanine and histidine on the activity of Na^+ , K^+ -ATPase of loach embryos on the stage of 64 blastomers

Слід відзначити, що наявність у середовищі інкубації амінокислотних похідних у концентрації 10^{-8} М призводила до однакового зниження активності ферменту зародків. Na^+ , K^+ -АТФ-азна активність за таких умов знижувалася на $34,5 \pm 0,7\%$ і становила відповідно $10,0 \pm 0,2$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка.

При додаванні до середовища інкубації досліджуваних амінокислотних похідних у концентрації 10^{-9} М, як і на стадії 16 бластомерів, виявлено, що дія калієвої солі N-(2-хлор-1,4-нафтохіноніл-3)-аланіну призводила до недостовірного зростан-

ня активності ферменту порівняно з контролем на $2,3 \pm 0,1\%$, тобто значення Na^+ , K^+ -АТФ-азної активності за таких умов не відрізнялося від контролю. На відміну від аланіну, дія калієвої солі N-(2-хлор-1,4-нафтохіноніл-3)-гістидину у тій же концентрації призводила до достовірного зниження активності ферменту на $21,5 \pm 0,3\%$.

Протягом п'яти годин розвитку (стадія 8 поділу бластомерів, рис. 5, А) уабаїнчутлива АТФ-азна активність ПМ зародків досягала максимального значення і становила $17,9 \pm 0,7$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка. При внесенні в середовище інкубації досліджуваних амінокислотних похідних виявлено подібні зміни Na^+ , K^+ -АТФ-азної активності, як і на попередніх стадіях розвитку зародків.

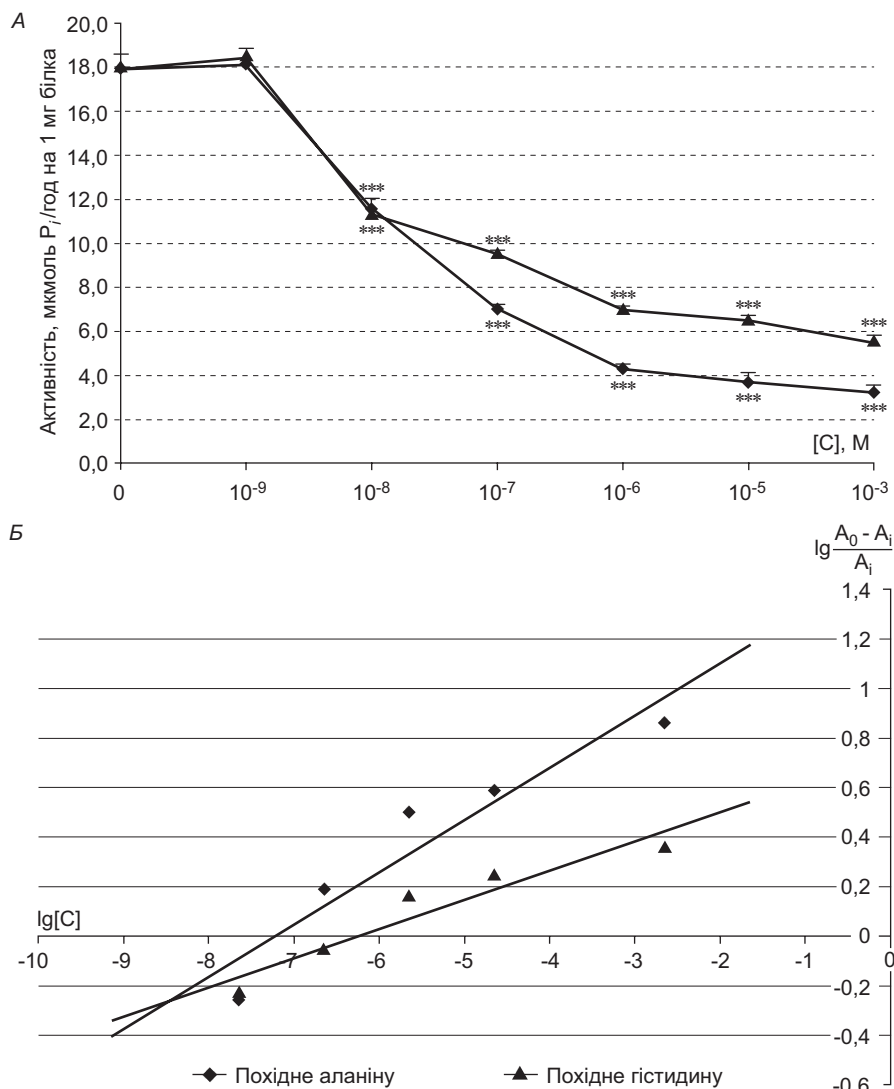


Рис. 5. Вплив калієвих солей N-(2-хлор-1,4-нафтохіноніл-3)-аланіну та гістидину на Na^+ , K^+ -АТФ-азну активність зародків в'юна на стадії 8 поділу бластомерів

Fig. 5. The effect of the potassium salts N-(2-chlorine-1,4-naphtoquinone-3)-alanine and histidine on the activity of Na^+ , K^+ -ATPase of loach embryos on the stage of 8 blastomers division

Додавання до середовища 10^{-3} – 10^{-6} М калієвої солі α -N-(2-хлор-1,4-нафтохіноніл-3)-аланіну призводило до вагомого зниження активності мембранного ферменту зародків у середньому на $79,1 \pm 7,6\%$, і становило $3,7 \pm 0,4$ мкмоль P_i/год на 1 мг білка, тобто лише 21% активності у контролі. Подібна тенденція до зниження активності Na⁺, K⁺-АТФ-ази виявлена і при внесенні в середовище інкубації похідного гістидину, однак слід зазначити, що за умов впливу цієї амінокислотної похідної активність АТФ-ази становила приблизно 41% активності у контролі.

Як і на стадії 64 бластомерів (рис. 4, А), додавання в середовище обидвох амінокислотних похідних у концентрації 10^{-8} М на стадії 8 поділу бластомерів зумовлювало зниження активності Na⁺, K⁺-АТФ-ази до одного рівня, який становив відповідно $11,4 \pm 0,3$ мкмоль P_i/год на 1 мг білка. При зниженні концентрації досліджуваних амінокислотних похідних до 10^{-9} М спостерігали аналогічні зміни, активність за умов впливу обидвох речовин була майже однаковою. При цьому слід зазначити, що наявність 10^{-9} М калієвих солей амінокислот у середовищі вела до зростання активності АТФ-ази порівняно з контролем. У разі дії калієвої солі β -N-(2-хлор-1,4-нафтохіноніл-3)-аланіну в зазначеній вище концентрації відзначено зростання Na⁺, K⁺-АТФ-азної активності на $0,7 \pm 0,01\%$, а при дії похідного гістидину – на $2,9 \pm 0,1\%$ порівняно з контролем (зростання активності було недостовірне).

На стадії 10 поділу бластомерів (рис. 6, А) при дії калієвих солей досліджуваних амінокислот спостерігається чітка залежність зміни активності Na⁺, K⁺-АТФ-ази від концентрації досліджуваних похідних 1,4-нафтохінону в обидвох випадках.

Як і на попередніх досліджуваних стадіях розвитку, калієва сіль N-(2-хлор-1,4-нафтохіноніл-3)-аланіну у діапазоні концентрацій 10^{-3} – 10^{-7} М проявляє більшу інгібувальну дію на функціонування Na⁺, K⁺-АТФ-ази зародків, ніж гістидинове похідне 1,4-нафтохінону. Слід зазначити, що активність АТФ-ази зародків при дії перших трьох концентрацій похідного аланіну знижувалася в середньому на $63,3 \pm 2,4\%$ порівняно з контролем, який становив $15,8 \pm 1,1$ мкмоль P_i/год на 1 мг білка. Тоді як у разі впливу калієвої солі N-(2-хлор-1,4-нафтохіноніл-3)-гістидину зниження активності ферменту більше ніж на 50% спостерігали тільки при 10^{-3} та 10^{-5} М (рис. 6, А).

Наявність у середовищі інкубації 10^{-8} М досліджуваних амінокислотних похідних призводила до достовірного зниження активності Na⁺, K⁺-АТФ-ази, як і на попередніх досліджуваних стадіях розвитку (рис. 6, А). При подальшому зменшенні концентрації калієвих солей N-(2-хлор-1,4-нафтохіноніл-3)-аланіну та гістидину в середовищі інкубації до 10^{-9} М виявлено виражене достовірне зростання активності Na⁺, K⁺-АТФ-ази зародків на $17,3 \pm 0,3$ та $20,6 \pm 0,9\%$ відповідно порівняно з контролем.

Максимального значення Na⁺, K⁺-АТФ-азна активність зародків [3, 23, 26], як і активність Mg²⁺-АТФ-ази [24], досягає на восьмій стадії поділу бластомерів. Вважають, що такі зміни активності мембранозв'язаних ферментів пов'язані з підвищенням інтенсивності експресії молекул цих ферментів під час ембріогенезу, які, власне, й посилюються на цій годині розвитку зародків [20, 26]. Так при дослідженні характеру роботи Na⁺, K⁺-АТФ-ази на зародках морських їжаків *Strongylocentrotus purpuratus* і *Litechinus pictus* [28] показано, що її активність для незаплідненої яйцеклітини та при заплідненні майже ідентична, а швидке зростання Na⁺, K⁺-АТФ-азної активності відбувається від стадії бластули до стадії ранньої гастрული, після чого залишається незмінною до стадії вилуплення. Подібні зміни Na⁺, K⁺-АТФ-азної активності до стадії ранньої гастрული описано й для іншого виду морського їжака *Hemicentrotus pulcherrimus* [28]. У кінці періоду синхронних поділів бластомерів

активуються макромолекулярні синтези, особливо масивний синтез нових мРНК [5, 8, 19–22], що потребує значних енерговитрат і приводить до перерозподілу макроергів, із чим, ймовірно, і пов'язана відсутність значних змін ферментативної активності енергозалежних систем транспорту на цьому етапі розвитку зародків.

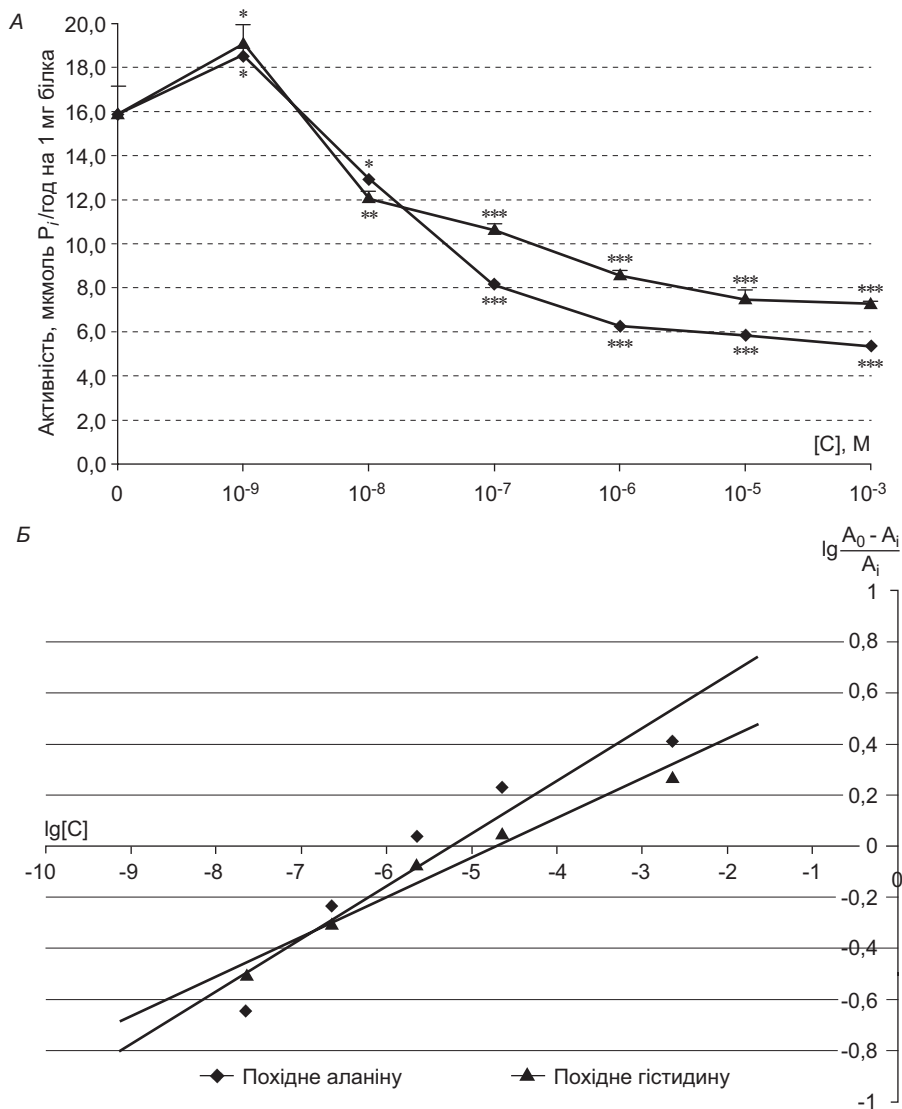


Рис. 6. Вплив калієвих солей N-(2-хлор-1,4-нафтохінон-3)-аланіну та гістидину на Na⁺, K⁺-АТФ-азну активність зародків в'юна на стадії 10 поділу бластомерів

Fig. 6. The effect of the potassium salts N-(2-chlorine-1,4-naphtoquinone-3)-alanine and histidine on the activity of Na⁺, K⁺-ATPase of loach embryos on the stage of 10 blastomeres division

На стадії 10 поділу падає мітотичний індекс і зростає морфогенетична активність ядер, а всі біосинтетичні процеси потребують перерозподілу пулів макроергів. Враховуючи структуру аланінвмісного похідного, ймовірно, в цей період прохо-

дить полегшене включення його в біосинтетичні процеси зародків, що й призводить до часткового активування роботи АТФ-ази [20, 22, 23].

Для оцінки характеристики варіабельності змін активності Na⁺, K⁺-АТФ-ази зародків за умов дії амінокислотних похідних визначено константи напівінгібування (I_{50}) (рис. 2–6, Б), шляхом лінеаризації одержаних кривих доза-ефект у модифікованих логарифмічних координатах Хілла [10]. Числові значення I_{50} для досліджуваних факторів на різних стадіях розвитку визначали у точці перетину одержаних прямих із віссю абсцис.

Слід зазначити, що на різних етапах дроблення бластомерів чутливість (спорідненість) Na⁺, K⁺-АТФ-ази до дії досліджуваних речовин значно варіює. Найвищі значення констант напівінгібування I_{50} , тобто найменший ступінь інгібування активності мембранного ферменту досліджуваними амінокислотними похідними виявлено на стадіях розвитку 2 та 64 бластомерів для гістидинового похідного (див. таблицю). Ймовірно, отримані значення активності Na⁺, K⁺-АТФ-ази зародків за дії досліджуваних амінокислотних похідних можна пояснити здатністю молекул похідних 1,4-нафтохінону утворювати міцні комплекси з молекулами інших речовин (зокрема, хелатні комплекси з катіонами металів), що утруднює їхнє проходження крізь ПМ [1, 6]. Встановлено також здатність 2-аргініно-3-хлор-1,4-нафтохінону суттєво не змінювати осмотичну резистентність біомембран, оскільки його молекули частково зв'язуються з їхнього ліпідною фазою [1]. Тому інгібування мембранозв'язаного ферменту зародків в'юна на цих стадіях розвитку має менш виражений характер.

Константи напівінгібування I_{50} (мкМ) АТФ-ази зародків в'юна амінокислотними похідними 1,4-нафтохінону на різних стадіях розвитку

The half-inhibition constants I_{50} (μM) of the loach embryos Na⁺, K⁺-ATP-ase by potassium salts of 2-aminoacids-3-chlorine-1,4-naphtoquinone at different stages of development

Похідні амінокислот	Стадії розвитку зародків			
	2 бластомери	16 бластомерів	64 бластомери	8 поділ
Аланіну	0,49 (r = 0,88)	0,43 (r = 0,96)	0,18 (r = 0,91)	0,04 (r = 0,90)
Гістидину	8,61 (r = 0,91)	0,95 (r = 0,93)	3,49 (r = 0,99)	0,48 (r = 0,87)

Для похідного аланіну, на відміну від впливу похідного гістидину, на всіх досліджуваних стадіях характерний більш виражений інгібувальний вплив, тобто нижчі значення I_{50} . Це, як було зазначено вище, узгоджується із проходженням на даному етапі розвитку в зародкових клітинах біосинтетичних процесів, котрі потребують перерозподілу пулів макроергів [21, 22]. Доведено, що молекули похідних амінокислот впливають на функціональний стан цитоплазматичної мембрани по загальному механізму – змінюють її проникність, тим самим сприяючи виходові в середовище інкубації внутрішньоклітинних компонентів, зв'язуються з білками, змінюючи їхню конформацію, і пригнічують активність локалізованих у мембранах ферментів, впливаючи на вміст сульфгідрильних груп у процесі раннього онтогенезу [22]. Крім цього, відомо, що природні амінокислоти в зародкових об'єктах швидко руйнувалися би ферментами або ж включалися у метаболічні процеси. Тому в ряді випадків вплив похідних амінокислот є більш ефективним, ніж вплив їхніх природних аналогів. Отже, в цей період розвитку зародки є надзвичайно чутливими до дії будь-яких зовнішніх чинників, і потрібна невелика кількість „інгібітора” в середовищі інкубації, щоб знизити активність Na⁺, K⁺-АТФ-ази ПМ зародків на 50%.

ВИСНОВКИ

Встановлено, що дія калієвих солей N-(2-хлор-1,4-нафтохіноніл-3)-аланіну та гістидину веде до протилежних достовірних змін активності мембранозв'язаного ферменту зародків лише на стадії 10 поділу бластомерів. Таким чином, амінокислотні похідні 1,4-нафтохінону можна віднести до дозозалежних модуляторів Na^+ , K^+ -активованого Mg^{2+} -залежного гідролізу АТФ, який здійснюється мембранними везикулами зародків, однак механізм їхньої дії остаточно не з'ясований, що потребує проведення подальших досліджень.

Робота виконана за підтримки Державного Фонду Фундаментальних Досліджень (№25.5/075).

1. Абдеррахім Е.І., Журахівська Л.Р., Марінцова Н.Г. та ін. Синтез нових амінопохідних 1,4-нафтохінону. **Вісн. НУ „Львівська політехніка”**, 2001; 426: 111–114.
2. Беленічев І., Сидорова І. Лікування церебральної патології: нові можливості. **Ліки України**, 2004; 10:107–108.
3. Бойко Н.М., Целевич М.В., Санагурський Д.І. Активність Na^+ , K^+ -АТФази мембран зародків в'юна (*Misgurnus fossilis* L.) за дії катіонів важких металів. **Укр. біохім. журнал**, 2004; 76(2): 59–63.
4. Бухтіярова Н.В. Пошук речовин з антирадикальною і антиперекисною активністю серед похідних хіназолону-4 та 4-амнохіназолону: автореф. дис.... канд. мед. наук. Київ, 2003. 22 с.
5. Веренинов А.А., Марохова І.І. Транспорт іонів у кліток в культурі. Ленинград: Наука, 1986. 292 с.
6. Виленский Б.С., Семенова Г.М., Широков Е.А. Применение церебролизина при ишемическом инсульте. **Журн. неврол. и психиатрии**, 1999; 4: 65–69.
7. Генега А. Електричні характеристики мембран зародків риб за дії хімічних чинників. **Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол.**, 2009; 49: 13–22.
8. Гойда О.А. Биофизические аспекты раннего онтогенеза животных. Киев: Наукова думка, 1993. 224 с.
9. Деркач М.П., Гумецький Р.Я., Чабан М.Е. Курс варіаційної статистики. Київ: Вища школа, 1977. 208 с.
10. Дубицький Л.О., Вовканич А.С. Взаємодія катіонів металів з Ca^{2+} -транспортувальним центром Ca^{2+} -помпи плазматичних мембран секреторних клітин шлункових залоз. **Укр. біохім. журнал**, 2003; 75: 39–46.
11. Ель Ідріссі А., Червєцова В.Г., Кричківська А.М. та ін. Дослідження дії суспензійної мазі на основі карнозин похідної 2,3-дихлоро-1,4-нафтохінону при контактному алергічному дерматиті. **Фармац. журнал**, 2003; 5: 103–104.
12. Журахівська Л.Р., Комаровська О.З., Новіков В.П., Марінцова Н.Г. Синтез, гостра токсичність, протиішемічна активність нових амінокислотних похідних 1,4-нафтохінону. **Фармац. журнал**, 2005; 3: 67–73.
13. Капля А.А. Структурная организация изоферментов Na^+ , K^+ -АТФ-азы в плазматической мембране. **Укр. біохім. журнал**, 1997; 69 (5–6): 12–24.
14. Лопина О.Д. Na^+ , K^+ -АТФ-аза: структура, механізм і регуляція активності. **Биол. мембраны**, 1999; 16(6): 584–603.
15. Луцук М.Д., Лукьяненко А.В., Кусень С.И. Очистка и частичная характеристика плазматических мембран клеток зародышей в'юна. **Онтогенез**, 1986; 17 (3): 314–321.
16. 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; 9(1–2): 217–221.
17. **Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен)**: учеб. пособие / Под ред. М.И. Прохоровой. Ленинград: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. 272 с.

18. Нейфах А.А., Тимофеева М.Я. **Проблемы регуляции в молекулярной биологии развития**. Москва: Наука, 1978. 336 с
19. Нейфах А.А. **Молекулярная биология процессов развития**. Москва: Наука, 1977. 311 с.
20. Озернюк Н.Д. Изменение АТФ-азной активности в период оогенеза вьюна. **Онтогенез**, 1971; 2(4): 431–434.
21. Озернюк Н.Д. **Энергетический обмен в раннем онтогенезе рыб**. Москва: Наука, 1985. 175 с.
22. Ротт Н.Н. **Клеточные циклы в раннем эмбриональном развитии**. Москва: Наука, 1987. 207 с.
23. 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; 50(5): 64–68.
24. Целевич М.В. Вплив катіонів двовалентних металів на базальну Mg^{2+} -АТФ-азну активність плазматичних мембран зародків в'юна (*Misgurnus fossilis* L.). **Studia Biologica**, 2008; 2(1): 59–68.
25. Anner B.M. The receptor function of the Na^+ , K^+ -activated adenosine triphosphatase system. **Biochem. J**, 1985; 227(1):1–11.
26. Beritashvili D.R., Kutateladze T.V., Margiani D.O., Kafiani K.A. Adenosine triphosphatase in the embryonic development of the loach. **Sov. J. Dev. Biol**, 1975; 5(4): 320–326.
27. Jorgensen P.L., Deguchi N., Maunsbach A.B. Ultrastructure of the sodium pump: Comparison of thin sectioning, negative staining, and freeze-fracture of purified, membrane-bound (Na^+ , K^+)-ATPase. **J. Cell Biol**, 1977; 75: 619–634.
28. Leong P.K., Manahan D. Metabolic importance of Na^+/K^+ -ATPase activity during sea urchin development. **J. Exp. Biol**, 1997; 200: 2881–2892.
29. Lowry O.H., Rosebrough N.G., Farr A.L., Randall R.C. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem**, 1951; 193(1): 265–275.
30. Vasilets L.A., Schwarz W. Structure-function relationships of cation binding in the Na^+/K^+ -ATPase. **Biochim. Biophys. Acta**, 1993; 1154 (2): 201–222.

THE EFFECT OF NEW AMINO ACID DERIVATIVES OF 1,4-NAPHTHOQUINONE ON THE Na^+ , K^+ -ATPase ACTIVITY OF LOACH EMBRYOS *IN VITRO*

A. B. Henega¹, S. M. Mandzynets¹, M. V. Bura¹, H. S. Yaremkevych²,
V. P. Novikov², N. G. Marintsova², D. I. Sanagurski¹

¹Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskiyi St., 79005 Lviv, Ukraine
e-mail: mcelevykh@yahoo.com

²Lviv National Polytechnic University, 12, Bandera St., Lviv 79013, Ukraine

The effect of amino acid derivatives of 1,4-napthoquinone on the loach embryos Na^+ , K^+ -activated Mg^{2+} -dependent ATPase *in vitro* during the early stages of embryogenesis was investigated. We analysed the effect different concentrations of derivatives on the enzymatic activity of Na^+ , K^+ pump with the half-inhibition constants (I_{50}) during the synchronous blastomer divisions. It has been shown, that effect potassium salts N-(2-chlorine-1,4-napthoquinone-3)-alanine and histidine lead to changes of activity of membrane enzyme of embryos on the stage of 10 division. Thus, amino acid derivatives of 1,4-napthoquinone might be considered as dose-dependent modulators of Na^+ , K^+ -activated Mg^{2+} -dependent hydrolysis of ATP membrane vesicles.

Key words: potassium salts N-(2-chlorine-1,4-napthoquinone-3)-alanine and histidine, Na^+ , K^+ -ATPase, loach embryos, blastomer divisions.

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ НОВЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ НА Na^+ , K^+ -АТФ-азную АКТИВНОСТЬ ЗАРОДЫШЕЙ ВЬЮНА *IN VITRO*

А. Б. Генега¹, С. М. Мандзинець¹, М. В. Бура¹, О. С. Яремкевич²,
В. П. Новиков², Н. Г. Маринцова², Д. И. Санагурский¹

Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, 79005 Львов, Украина
e-mail: mcelevyuch@yahoo.com

²*Национальный университет «Львовская политехника»*
ул. С. Бандеры, 12, Львов 79013, Украина

Исследовано *in vitro* влияние аминокислотных производных 1,4-нафтохинона на активность Na^+ , K^+ -активированной, Mg^{2+} -зависимой аденозинтрифосфатазы зародышей вьюна на ранних этапах эмбриогенеза. Проведена оценка влияния разных концентраций производных на ферментативную активность Na^+ , K^+ -помпы плазматических мембран зародышей вьюна на протяжении периода синхронного дробления бластомеров на основании определенных констант полуингибирования I_{50} . Установлено, что воздействие калиевых солей N-(2-хлор-1,4-нафтохинонил-3)-аланина и гистидина ведет к противоположным достоверным изменениям активности мембраносвязанного фермента зародышей только на стадии 10-го деления бластомеров. Таким образом, аминокислотные производные 1,4-нафтохинона можно отнести к дозозависимым модуляторам Na^+ , K^+ -активированного, Mg^{2+} -зависимого гидролиза АТФ, который осуществляется мембранными везикулами зародышей, но механизм их действия окончательно не установлен, поэтому необходимо проводить дальнейшие исследования.

Ключевые слова: калиевые соли N-(2-хлор-1,4-нафтохинонил-3)-аланина и гистидина, Na^+ , K^+ -АТФ-аза, зародыши вьюна, деление бластомеров.

Одержано: 23.07.2009