



УДК. 577.597.352.42+547.856.1

МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ЗАРОДКІВ І ЛИЧИНОК В'ЮНА ЗА ВПЛИВУ АМІДНИХ ПОХІДНИХ 1,4-НАФТОХІНОНУ

**А. О. Безкоровайний^{1,3}, А. Р. Зинь³, Н. П. Гарасим¹,
Ю. Т. Лень^{2,3}, О. М. Фігурка², Д. І. Санагурський¹**

¹Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна

²Національний університет "Львівська політехніка"
вул. Степана Бандери, 12, Львів 79013, Україна

³Науково-дослідний експертно-криміналістичний центр
при ГУМВС України у Львівській області, вул. Конюшинна, 24, Львів 79040, Україна
e-mail: andriy.bezkorovajnyj@gmail.com

У статті наведено результати впливу новосинтезованих амідних похідних 1,4-нафтохінону (ФО-1 та ФО-2) на морфологію зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L. на ранніх стадіях ембріогенезу та личинок у перші дні розвитку. Амідні похідні додавали в інкубаційне середовище в кінцевій концентрації 10^{-3} – 10^{-7} М. Досліджувані амідні похідні у концентраціях 10^{-3} – 10^{-5} М проявляють ембріотоксичні властивості, зумовлюють сповільнення й аномалії раннього розвитку (деформування бластомерів, втрату контакту зі сусідніми зародковими клітинами), що в подальшому призводить до виражених морфологічних змін личинок в'юна. На підставі цих даних можна припустити, що амідні похідні проникають крізь перивітелінову оболонку та плазматичну мембрану бластомерів. Зародки та личинки в'юна, які перебували у середовищі з амідними похідними у концентраціях 10^{-6} та 10^{-7} М, розвивались нормально, і процес вилуплення відповідав контролю. Наявність морфолінового фрагмента у складі амідного похідного 1,4-нафтохінону зумовлює виражену ембріотоксичність порівняно з наявністю тут піперидинової групи. Для з'ясування механізмів впливу цих препаратів на зародкові клітини необхідні подальші дослідження.

Ключові слова: в'юн, ембріогенез, зародки, личинки, амідні похідні 1,4 нафтохінону.

ВСТУП

У медичній і ветеринарній практиці як бактеріостатичні, бактерицидні та фунгістатичні препарати застосовують похідні 1,4-нафтохінону. Цим похідним притаманний широкий спектр біологічної дії, зокрема, антибактеріальна, протигрибкова, протизапальна, противірусна та протиалергічна. Їх можна застосовувати як фармакологічні препарати для лікування респіраторних захворювань [6, 11, 14, 16]. Синтез нових амідних похідних на основі 1,4-нафтохінону та подальша їхня модифікація

є перспективним напрямом пошуку потенційних біологічно активних речовин, оскільки значна кількість похідних 1,4-нафтохінону проявляє фізіологічну активність різного типу [6, 11, 14].

На даний час хіноїдні сполуки належать до другого великого класу протипухлинних засобів, представники якого перебувають на різних стадіях доклінічних і клінічних досліджень [11, 14, 17].

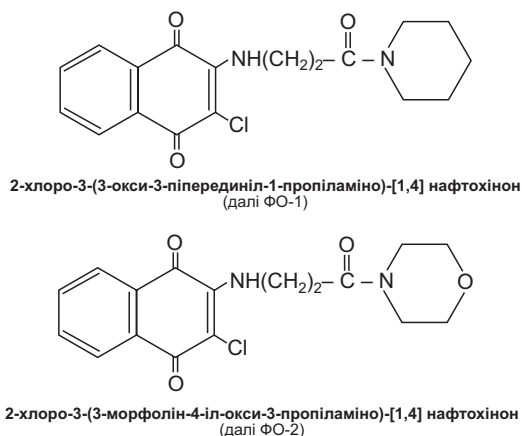


Рис. 1. Структура амідних похідних 1,4-нафтохінону
Fig. 1. Structure of 1,4-naphthoquinone amide derivatives

У науковій літературі описано впливи новосинтезованих амідних похідних 1,4-нафтохінону на ракові клітини різних ліній – KB (рак ротової порожнини), NCI-H187 (дрібноклітинний рак легені), MCF-7 (рак молочної залози) та лінії клітин Vero (епітелій нирки) [11, 14]. Результати цих досліджень доводять здатність вказаних амідних похідних зупиняти розвиток ракових клітин і проявляти слабку цитотоксичність щодо псевдонормальної лінії клітинної Vero [14, 16]. Встановлено, що однією з мішеней біологічної дії таких похідних є активний центр топоізомерази IIa (ензим, який впливає на топологію ДНК) [14, 17].

У зв'язку з особливостями амідних похідних 1,4-нафтохінону значний інтерес викликає синтез нових сполук, що містили б аліфатичні ланцюги різного складу, які можуть бути селективно токсичними для пухлинних клітин із мінімальною шкідливістю для здорових [11, 14]. Вивчення впливу амідних похідних на морфофункціональний стан зародкових клітин, а також на їхній подальший розвиток дасть змогу краще зрозуміти механізм їхньої дії на еукаріотичні клітини, цитотоксичні ефекти й оптимальні концентрації для розвитку здорових клітин.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктом дослідження були зародки прісноводної, костистої риби в'юна *Misgurnus fossilis* L., який широко використовують у дослідженні різних проблем сучасної біології та медицини [1, 10, 13]. Коротка тривалість періоду ембріогенезу, легкість отримання статевих продуктів і простота утримання цих риб у лабораторії пояснюють його популярність. Великі розміри яйцеклітин дають змогу спостерігати за розвитком після запліднення і контролювати кожен з етапів поділу під біокуляром [4, 5, 15].

В експерименті використовували самок в'юна зі середньою довжиною тіла $19,7 \pm 0,9$ см. Риби проходили акліматизацію в резервуарі з водою без годування протягом 7 діб перед дослідом. Запліднення проводили за загальноприйнятими методиками [9, 15, 18–20]. Стадії розвитку контролювали візуально під біокулярним мікроскопом МБС-10 з фотографічною насадкою ScopeTek DCM310-A, 3М.

Через 5–10 хв після запліднення відмиті зиготи інкубували у фізіологічному розчині Гольтфрєтера ($t = 20\text{--}22\text{ }^{\circ}\text{C}$), який містив розчини ФО-1 ($M_r = 346$) і ФО-2 ($M_r = 348$) у концентрації $10^{-3}\text{--}10^{-7}$ М (рис. 1). Середовище інкубації змінювали через кожні 15 хвилин.

Морфологічні дослідження та дослідження виживання піддослідних і контрольних об'єктів проводили за загальноприйнятими методиками [12, 18–20]. Досліди на виживання тривали протягом 5 діб від моменту запліднення до 10 діб після вилуплення.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що у зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L. контрольної групи поділ відбувався без відхилень від норми, і через кілька секунд після запліднення жовткова оболонка відділялася від поверхні ядра, утворюючи перивітеліновий простір. Паралельно формувався цитоплазматичний горбик. Через годину інкубації зародок складався з двох бластомерів, причому борозна першого поділу проходила меридіально, що узгоджується з критеріями нормального розвитку в'юна [2, 15, 20].

Через 1,5 год після запліднення зародки були представлені 4-ма бластомерами; борозна другого поділу теж проходила меридіально, але перпендикулярно до борозни першого поділу і т.д. Через 5 год після запліднення наставала стадія морули, а ще через годину починала формуватися бластула зародкових об'єктів. Через 10 год після запліднення відбувався процес гастрюляції. На 22-й стадії (через 22 год 42 хв після запліднення) з'являлася 3-тя пара сомітів тулуба (у цей час мезодермальні валики починають розпадатися на окремі клітини). На 36-й стадії розвитку (через 48 год 32 хв) починав формуватися орган приклеювання і у хвостовій мезодермі спостерігали більше 10-ти сомітів. На цій стадії починалася пігментація очей, але тіло ще не було пігментоване, зародки енергійно рухалися всередині оболонок [1, 12, 18, 19].

На 39-й стадії (3-тя доба після вилуплення) з'являлися вусики. У тілі починали утворюватися пігментовані клітини, тоді як очі вже були помітно пігментовані. Через 49–51 годину після запліднення розпочиналася стадія вилуплення і ще не сформовані личинки прикріплювалися за допомогою органа приклеювання до поверхні чашки. Через добу після вилуплення у в'юнів зростала довжина тіла, встановлювався еритроцитарний кровообіг, починалося закладання зовнішніх зябер. Передличинкова стадія завершувалася через 10 годин після вилуплення. Личинки в'юна, які розвивалися за нормальних умов, були рухливими, з подовгастою формою тіла, розвиненими плавниками та зябрами, вираженою пігментацією [7, 12, 20].

Додавання до середовища інкубації зародків амідних похідних нафтохінонів ФО-1 та ФО-2 у концентрації 10^{-3} М призводило до затримки поділу бластомерів – приблизно на 45 хв для ФО-1 та на 60 хв для ФО-2 порівняно з контролем (рис. 2). За наявності в середовищі досліджуваних похідних нафтохінонів у концентрації 10^{-3} М повну затримку розвитку зародків в'юна спостерігали на стадії 32-х бластомерів. Це супроводжувалося руйнуванням плазматичної мембрани зародків і витіканням жовтка у перивітеліновий простір (рис. 3). Ймовірно, амідні похідні нафтохінону проникають крізь перивітелінову оболонку та плазматичну мембрану зародків, що супроводжується руйнуванням останньої та призводить до загибелі зародка [3, 6].

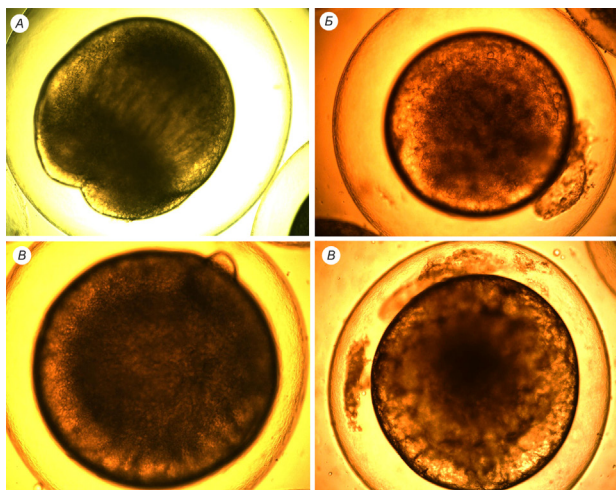


Рис. 2. Зародки в'юна на стадії 2 бластомерів за дії ФО-1 і ФО-2 у концентрації 10^{-3} М: А – контроль; Б – ФО-1; В – ФО-2

Fig. 2. Loach embryos at stage of 2 blastomeres under the influence of FO-1 and FO-2 at of 10^{-3} M concentration: A – control; Б – FO-1; В – FO-2

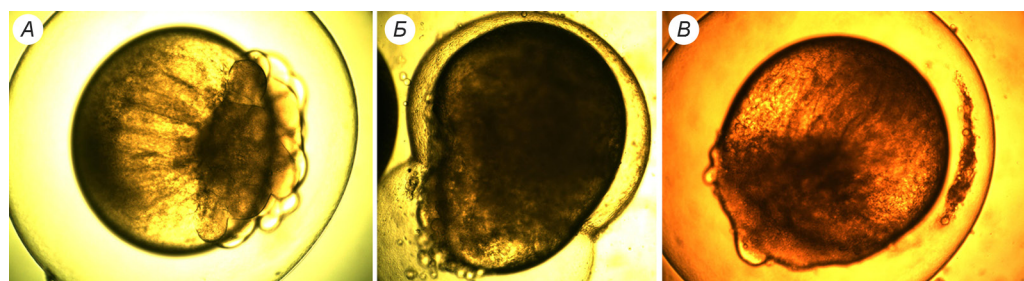


Рис. 3. Зародки в'юна на стадії 32-х бластомерів (3,5 год розвитку) за дії амідних похідних нафтохінону в концентрації 10^{-3} М: А – контроль; Б – затримка розвитку; В – вихід жовтка

Fig. 3. Loach embryos at the stage of 32 blastomeres (3.5 h development) in the presence of naphthoquinone amide derivatives used in 10^{-3} M concentration: A – control; Б – stop of development; В – yolk release into the perivitelline space

Додавання до середовища інкубації амідних похідних нафтохінонів ФО-1 та ФО-2 у концентрації 10^{-4} М призводило до затримки поділів бластомерів – приблизно на 30 хв для ФО-1 та 45 хв для ФО-2, порівняно з контролем. Подальший розвиток зародків зупинявся на стадії 64-х бластомерів (рис. 4).

Оскільки застосування розчинів амідних похідних нафтохінону ФО-1 і ФО-2 у концентраціях 10^{-3} М та 10^{-4} М призводило до зупинки поділу бластомерів на початкових етапах раннього розвитку, для подальших морфологічних досліджень було обрано менші концентрації досліджуваних речовин, а саме від 10^{-5} М до 10^{-7} М.

Утворення 2-х бластомерів у зародків за дії амідних похідних у концентрації 10^{-5} М відбувалось із затримкою приблизно на 10 хвн – для ФО-1 і 20 хв – для ФО-2, порівняно з зародками контролю.

Наступні стадії поділу бластомерів не відповідали часовим нормам розвитку в контролі, де простежували утворення 64-х бластомерів (6 поділ) через 3,5 год. Інкубація зародків у середовищі з ФО-1 і ФО-2 у концентрації 10^{-5} М зумовлювала затримку розвитку та, ймовірно, порушення структури плазматичної мембрани (рис. 5). Подальша інкубація зародків у середовищі, що містило досліджувані чинники, супроводжувалася затримкою розвитку, причому цей процес наростав.

Рис. 4. Зародки в'юна на стадії 64-х бластомерів за дії амідних похідних нафтохінону в концентрації 10^{-4} М: А – контроль; Б – ФО-1; В – ФО-2

Fig. 4. Loach embryos at stage of 64 blastomeres under the effects of naphthoquinone amide derivatives used in 10^{-4} M concentration: А – control; Б – FO-1; В – FO-2

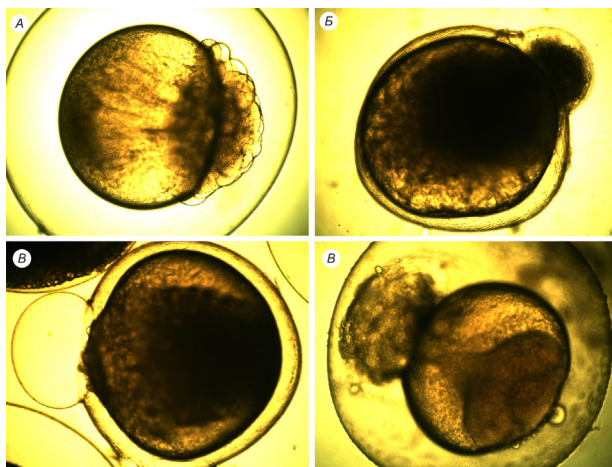
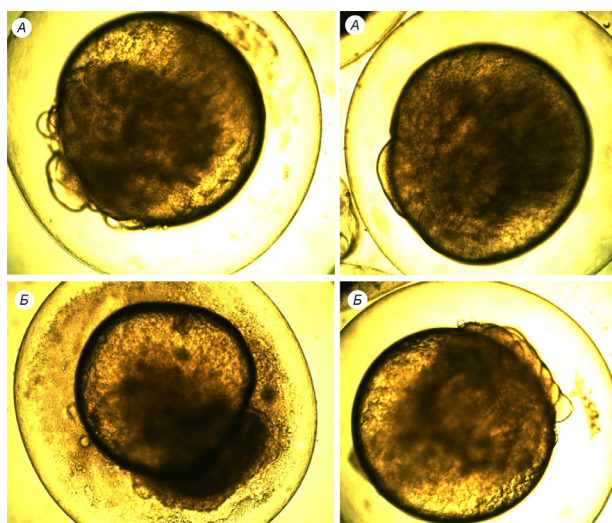


Рис. 5. Зародки в'юна на стадії 64-х бластомерів за дії амідних похідних нафтохінону в концентрації 10^{-5} М: А – ФО-1; Б – ФО-2

Fig. 5. Loach embryos at stage of 64 blastomeres under the effect of naphthoquinone amide derivatives used in 10^{-5} M concentration: А – FO-1; Б – FO-2



Поряд із тим, у незначної кількості зародків (менше 5 %) виявлено нормальне формування зародкових клітин. У личинок в'юна, які вижили у середовищах з ФО-1 та ФО-2 в концентрації 10^{-5} М, на першу добу спостерігали затримку розвитку, і більшість зародків ставали нерухомими (рис. 6).

Подальший розвиток личинок за дії амідних похідних нафтохінону у досліджуваних концентраціях характеризувався затримкою розвитку та зупинкою процесу вилуплення, порівняно з контрольними зародками на 3-тю добу розвитку.

У більшості досліджуваних личинок на 3-тю добу після вилуплення та в подальшому розвитку спостерігали зміни у хвостовому відділі, який був коротшим, порівняно з інтактними рибами, також мало місце незначне збільшення розмірів голови. Личинки були малорухливими, в окремих із них була порушена координація рухів і спостерігався набряк перикарда (рис. 7, 8).

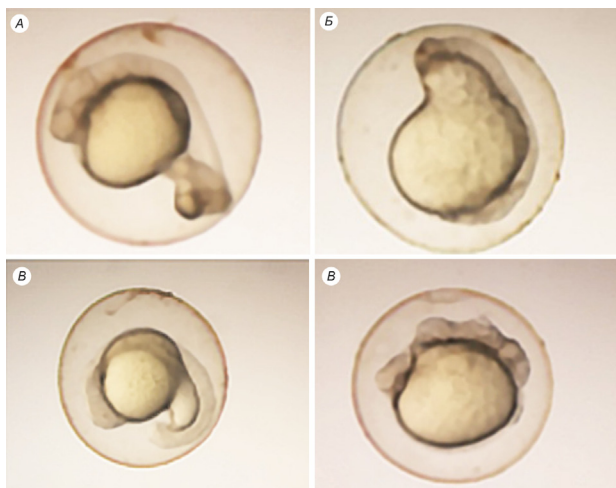


Рис. 6. Личинки в'юна на першу добу дії амідних похідних нафтохінону в концентрації 10^{-5} М: А – контроль; Б – ФО-1; В – ФО-2

Fig. 6. Loach larvae on the first day of the effect of naphthoquinone amide derivatives used in 10^{-5} M concentration: A – control; Б – FO-1; В – FO-2

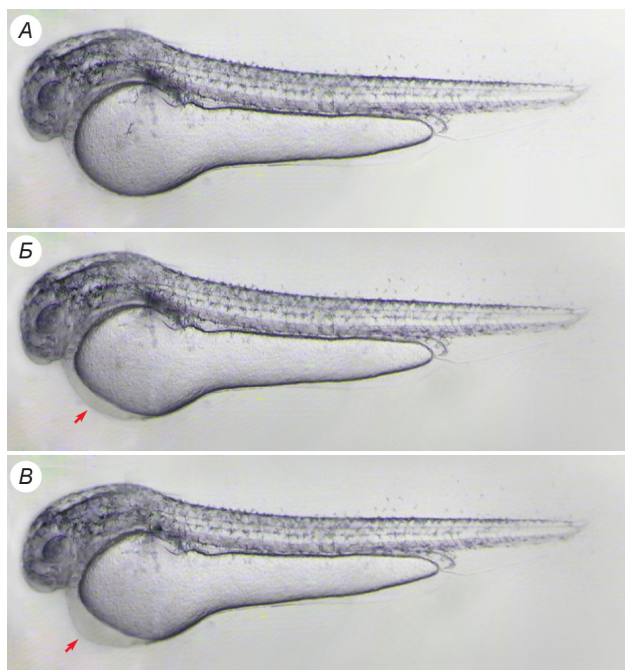


Рис. 7. Личинки в'юна на 3-тю добу розвитку за дії амідних похідних нафтохінону в концентрації 10^{-5} М: А – контроль; Б – ФО-1; В – ФО-2

Fig. 7. Loach larvae on 3rd day of development in the presence of naphthoquinone amide derivatives used in 10^{-5} M concentration: A – control; Б – FO-1; В – FO-2

За розвитку личинок в'юна у середовищі, що містило ФО-1 та ФО-2 в концентраціях 10^{-6} та 10^{-7} М, личинки не мали відхилень від норми та відповідали розвитку контролю. Зародки на 3-тю добу розвитку були рухливими, мали подовгасту форму тіла, розвинені плавники та зябра, виражену пігментацію (рис. 7, А).

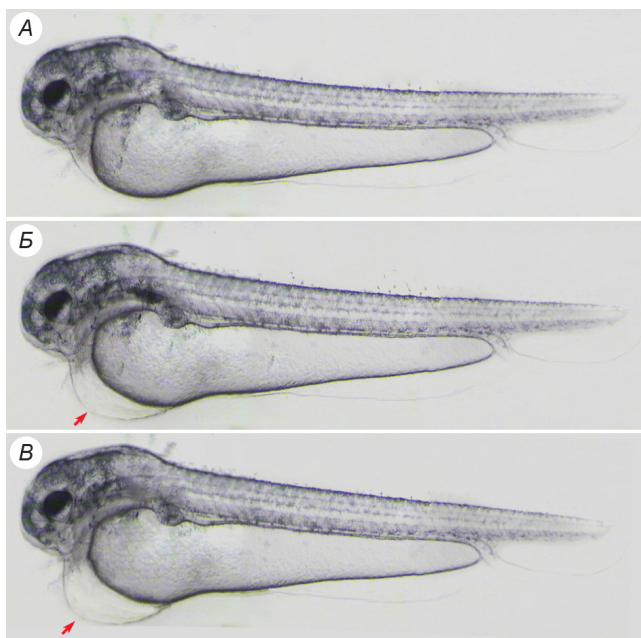


Рис. 8. Личинки в'юна на 5-ту добу за дії амідних похідних нафтохінону у концентрації 10^{-5} М: А – контроль; Б – ФО-1; В – ФО-2

Fig. 8. Loach larvae on the 5th day of action of naphthoquinone amide derivatives used in 10^{-5} M concentration: A – control; Б – FO-1; В – FO-2

Отже, амідні похідні 1,4-нафтохінону в концентраціях 10^{-3} – 10^{-5} М проявляють ембріотоксичну дію, зумовлюючи сповільнення й аномалії розвитку, такі, як деформування бластомерів із втратою контакту зі сусідніми зародковими клітинами. Це може свідчити про здатність досліджуваних похідних нафтохінону проникати крізь перивітелінову оболонку і плазматичну мембрану бластомерів. Це, у свою чергу, призводить до зміни функціонального стану цитоплазматичної мембрани, що проявляється у порушенні її цілісності та проникності, тим самим сприяючи виходу в середовище інкубації внутрішньоклітинних компонентів. Результати аналізу отриманих даних свідчать про наявність морфолінової групи у 2-хлоро-3-(3-морфолін-4-іл-окси-3-пропіламіно)-[1,4] нафтохіноні, що зумовлює виражену ембріотоксичність, порівняно з наявністю піперидинової групи у складі 2-хлоро-3-(3-окси-3-піперидиніл-1-пропіламіно)-[1,4] нафтохінону.

ВИСНОВОК

Амідні похідні 1,4-нафтохінону спричиняють затримку росту і розвитку зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L. У зародків, які розвивались із досліджуваними субстанціями, виявлено залежність ступеня затримки розвитку на подальших стадіях поділу бластомерів від концентрації субстанції.

Для з'ясування механізмів впливу даних препаратів на зародкові клітини необхідні подальші дослідження амідних похідних 1,4-нафтохінону.

1. Belousov L.V., Dabyagan N.V., Chunaeva M.Z. **The benefit to a large workshop on embryology**. Moscow: MGU, 1990. 1. 104 p. (In Russian).
2. Belousov L.V. Cytomechanics control of morphogenesis. **Cytology**, 2000; 42 (1): 84–91. (In Russian).
3. Buchkevych I., Yaremkevich O., Figurka O. et al. Amino acid derivatives of 6,7 N substituted 1,4-naphthoquinone and investigation of their influence on embryo morphology of loach during embryogenesis Ukrainica. **Bioorganica Acta**, 2010; 1: 34–41. (In Ukrainian).
4. De Laat S. W., Buwalda R. J., Habets A. M. Intracellular ionic distribution, cell membrane permeability and membrane potential of the *Xenopus* egg during first cleavage. **Cell Research**, 1974; 89: 1–14.
5. Fujimoto T., Kataoka T., Sakao S. et al. Developmental stages and germcelline age of the Loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). **Zoological Science**, 2006; 23: 977–989.
6. Heneha A. **Effect of amino acid derivatives of 1,4-naphthoquinone in membrane processes during embryogenesis of loach**. Lviv: Publishing House of Ivan Franko LNU, 2012. 160 p. (In Ukrainian).
7. Hojda E.A. **Biophysical aspects of early ontogenesis of animals**. Kiev: Naukova Dumka, 1993. 224 p. (In Russian).
8. Hojda E.A., Ochapovskiy V.V., Sanagurskiy D.I. A new approach to the evaluation of the relationship of various parameters affecting the dynamics of transmembrane potential in developing embryos of loach. **Biophysics**, 1996; 41(2): 393–399. (In Russian).
9. Neifach A.A. Molecular biology of development processes. Moscow: Nauka, 1977. 311 p. (In Russian).
10. Kafyany K.A., Malenkov A.G. Role of ion homeostasis in cells growth and development phenomena. **Advances in Modern Biology**, 1976; 81: 445–463. (In Russian).
11. Kongkathip B., Akkarasamiyo S., Hasitapana K. et al. Synthesis of novel naphthoquinone aliphatic amides and esters and their anticancer evaluation. **Medicinal Chemistry**, 2013; 60: 271–284.
12. Kostomarova A.A. Loach *Misgurnus fossilis*. In the book: **The objects of developmental biology**. Moscow: Nauka, 1975; 308–323. (In Russian).
13. Kostyuk P.G. **Study of physical and chemical bases of biological processes**. Kyiv: Naukova Dumka, 1978. p. 20–26. (In Ukrainian).
14. Pradidphol N., Kongkathipa N., Sittikul P. et al. First synthesis and anticancer activity of novel naphthoquinone amides. **Medicinal Chemistry**, 2012; 49: 253–270.
15. Sanagurskiy D.I. **Biophysics objects**. Lviv: Publishing House of Ivan Franko LNU, 2008. 522 p. (In Ukrainian).
16. Wellington K.W. Understanding cancer and the anticancer activities of naphthoquinones. **RSC Advances**, 2015; 5: 20309–20338.
17. Wu C.C., Li T.K., Farh L. et al. Structural basis of type II topoisomerase inhibition by the anticancer drug topotecan. **Science**, 2011; 333: 459–462.
18. Yaremkevych A., Bura M., Mandzynets S. et al. Changes in membrane potential dynamics of loach embryos under the influence of tirosulfonate. Lviv Polytechnic. **Chemistry**, 2009; 644: 78–85. (In Ukrainian).
19. Zyn A.R., Golovhak N.P., Tarnavska A.V. et al. Effect of sodium hypochlorite on prooxidant-antioxidant homeostasis loach embryos during early embryogenesis. **Studia Biologica**, 2012; 6(1): 67–76. (In Ukrainian).
20. Zyn A.R., Bezkorovajnyj A.O., Garasim N.P. et al. The morphological and ultrastructural changes in loach embryos during embryogenesis and for the actions of sodium hypochlorite. **Visnyk of Lviv University. Biological Series**, 2014; 67: 18–28. (In Ukrainian).

EFFECT OF 1,4-NAPHTHOQUINONE AMIDE DERIVATIVES ON MORPHOLOGICAL CHANGES IN LOACH EMBRYOS AND LARVAE

A. Bezkorovayny^{1,3}, A. Zyn³, N. Harasym¹, J. Len^{2,3}, O. Figurka², D. Sanagursky¹

¹Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine

²National University "Lviv Polytechnica", 12, Bandera St., Lviv 79013, Ukraine

³Expert Centr of Scientific Researches Ministry of Internal Affairs of Ukraine
24, Konyushynna St., Lviv 79040, Ukraine
e-mail: andriy.bezkorovajnyj@gmail.com

The article presents the results of effect of new synthesized 1,4-naphthoquinone amide derivatives (FO-1 and FO-2) on morphological changes in loach *Misgurnus fossilis* L. embryos at early stages of embryogenesis and in larvae treated with these amide derivatives used in 10^{-3} – 10^{-7} M concentration range. The amide derivatives used in 10^{-3} – 10^{-5} M concentrations showed the embryotoxic action, caused deceleration and abnormal development (blastomeres deformation, loss of contact with neighboring germ cells) and further lead to expressed morphological changes in loach larvae. Based on these data, it can be suggested that amide derivatives penetrate the perivitelline membrane of embryos and the plasma membrane of blastomeres. However, embryos and larvae loach cultivation of medium supplemented with amide derivatives in lower 10^{-6} and 10^{-7} M concentrations developed normally and hatching process matched up with development time in control. It was found that the presence of morpholine fragment in derivatives of 1,4-naphthoquinone caused more pronounced embryotoxicity comparing with derivatives containing piperidine group. Clarification of the mechanisms of the effect of these drugs on the embryonic cells requires further study.

Keywords: loach, embryogenesis, embryos, larvae, 1,4-naphthoquinone amide derivatives.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЗАРОДЫШЕЙ И ЛИЧИНОК ВЬЮНА ПОД ВЛИЯНИЕМ АМИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 1,4-НАФТОХИНОНА

**А. Безкоровайный^{1,3}, А. Зынь³, Н. Гарасим¹, Ю. Лен³,
О. Фигурка², Д. Санагурский¹**

¹Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина

²Национальный университет "Львовская политехника"
ул. Бандеры, 12, Львов 79013, Украина

³Научно-исследовательский экспертно-криминалистический
центр при ГУМВД Украины во Львовской области
ул. Конюшинная, 24, Львов 79040, Украина
e-mail: andriy.bezkorovajnyj@gmail.com

В статье приведены результаты влияния новосинтезированных амидных производных 1,4-нафтохинона (ФО-1 и ФО-2) на морфологию зародышей вьюна *Misgurnus fossilis* L. на ранних стадиях эмбриогенеза и личинок в первые дни развития. Амидные производные добавляли в инкубационную среду, в конечной concentra-

ции 10^{-3} – 10^{-7} М. Исследуемые амидные производные в концентрациях 10^{-3} – 10^{-5} М проявляют эмбриотоксические свойства, обуславливающие замедление и аномалии раннего развития (деформирование бластомеров, потерю контакта с соседними зародышевыми клетками), что приводит в дальнейшем к выраженным морфологическим изменениям личинок вьюна. На основании этих данных можно предположить, что амидные производные проникают сквозь перивителиновую оболочку и плазматическую мембрану бластомеров. Зародыши и личинки вьюна, которые развивались в среде с концентрации амидных производных 10^{-6} и 10^{-7} М, развивались нормально, и процесс *вылупления* соответствовал контролю. Наличие морфолинового фрагмента в составе амидного производного 1,4-нафтохинона обуславливает более высокую эмбриотоксичность по сравнению с пиперидиновой группой. Для выяснения механизмов влияния данных препаратов на зародышевые клетки необходимы дальнейшие исследования.

Ключевые слова: вьюн, эмбриогенез, зародыши, личинки, амидные производные 1,4-нафтохинона.

Одержано: 08.07.2015