

АКТИВНІСТЬ Na^+ , K^+ -АТФ-АЗИ МЕМБРАН ЗАРОДКІВ В'ЮНА УПРОДОВЖ РАНЬОГО ЕМБРІОГЕНЕЗУ ЗА ДІЇ АМІДНИХ ПОХІДНИХ НАФТОХІНОНУ

А. Безкорвайний^{1,2}, А. Зинь², Н. Гарасим¹, Д. Санагурський¹

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

²Львівський науково-дослідний експертно-криміналістичний центр МВС України
вул. Конюшинна, 24, Львів 79040, Україна
e-mail: andriy.bezkorovajnyj@gmail.com

У статті наведені дані про вплив похідних 1,4-нафтохінону на активність Na^+ , K^+ -активованої, Mg^{2+} -залежної аденозинтрифосфатази мембран зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L. на ранніх стадіях розвитку. Встановлено, що 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінон, 2-хлоро-3-(3-оксо-3-(піперидин-1-іл)пропіламіно)-1,4-нафтохінон, 2-хлоро-3-(3-(морфолін-4-іл)-3-оксопропіламіно)-1,4-нафтохінон дозозалежно інгібують Na^+ , K^+ -АТФ-азну активність мембран. За допомогою двофакторного дисперсійного аналізу виявлено, що переважаючий вплив на активність цієї АТФ-ази чинять 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінон і амідні похідні 1,4-нафтохінону. Слід відзначити, що включення в структуру хіноїдної сполуки морфолінового та піперидинілового фрагментів сприяє більш вираженим інгібувальним властивостям похідних ФО-1 та ФО-2 щодо 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону, який є вихідною сполукою їхнього синтезу. Тому похідні 1,4-нафтохінону можна залучити до дозозалежних модулаторів Na^+ , K^+ -активованого Mg^{2+} -залежного гідролізу АТФ.

Ключові слова: мембранний транспорт, Na^+ , K^+ -АТФ-аза, зародки в'юна, амідні похідні 1,4-нафтохінону.

Нафтохінони – група органічних сполук, що посідає важливе місце серед природних речовин і їхніх синтетичних похідних, котрі мають широкий спектр біологічної активності [7]. У науковій літературі описано вплив амідних похідних 1,4-нафтохінону на ракові клітини різних ліній – KB (рак ротової порожнини), NCI-H187 (дрібноклітинний рак легень), MCF-7 (рак молочної залози) та лінії клітин Vero (епітелій нирки мавпи) [7, 9]. Механізми, за допомогою яких нафтохінони здатні викликати ці ефекти, є складними [7]. Хінони є сполуками з високою відновною активністю. Вони можуть брати участь у редокс-циклі через їхні семихінонові радикали, що призводить до формування активних форм кисню (АФК), включаючи супероксид, пероксид водню і, особливо, гідроксильний радикал.

Поєднання в одній молекулі хіноїдного та гетероциклічного фрагментів у нових біологічно активних сполуках підвищуватимуть їхню фізіологічну дію [10]. Морфоліновий та піперидиніловий фрагменти широко використовуються у фармакологічних препаратах з антибактеріальними, протизапальними, болезаспокійливими, протипухлинними властивостями, виступають як інгібітори протеїназ [8]. Крім того, проявляють себе як потужні і селективні ліганди в ряді різних біологічних ефектів і можуть брати участь у донорно-акцепторних взаємодіях. У зв'язку з особливостями амідних похідних 1,4-нафтохінону значний інтерес викликає синтез нових сполук, які міститимуть аліфатичні ланцюги різного складу та їхній біологічний скринінг для створення ефективних малотоксичних лікарських засобів [18, 20].

Попередньо проведені нами дослідження на зародках і личинках в'юна [1] показали, що амідні похідні 1,4-нафтохінону в концентраціях 10^{-3} – 10^{-5} М проявляють ембріотоксичну дію, зумовлюючи сповільнення й аномалії розвитку зародків і личинок. Це свідчить про здатність досліджуваних похідних нафтохінону проникати крізь перивітелінову оболонку і плазматичну мембрану бластомерів, призводячи до порушення цілісності цитоплазматичної мембрани та, в кінцевому результаті, до загибелі зародків. Проте у зародків і личинок в'юна за розвитку в середовищі, що містило хінонові похідні в концентраціях 10^{-6} та 10^{-7} М, не було відхилень від норми. Встановлено, що досліджувані сполуки призводять до зменшення вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів. Крім цього, за їхньої дії зростає активність супероксиддисмутази та каталази у зародкових клітинах в'юна в період раннього ембріогенезу [5].

Враховуючи це, вивчення впливу новосинтезованих амідних похідних 1,4-нафтохінону різних концентрацій на активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази зародкових клітин протягом раннього ембріогенезу є актуальним і перспективним напрямом досліджень, які допоможуть краще зрозуміти механізми біологічної дії цих речовин.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на зародках прісноводної риби в'юна *Misgurnus fossilis* L. через 60, 150, 210, 270 і 330 хв після запліднення яйцеклітин. Використовували зародки під час стадій, які відповідають першому дробленню зиготи (2 бластомери), четвертому (16 бластомерів), шостому (64 бластомери), восьмому (256 бластомерів) і десятому (1024 бластомери). Отримання ікри та зародків проводили за загальноприйнятими методами [2, 4].

Мікросомальну фракцію мембран одержували методом диференційного центрифугування гомогенату зародків у градієнті густини сахарози [3]. Перед початком експерименту аліквоти мембранної фракції переносили у стандартне середовище інкубації такого складу (ммоль/л): NaCl – 30,0; KCl – 125,0; MgCl_2 – 3,0; Tris-Cl – 50,0 ($\text{pH}=7,4$; $t=21$ °C).

Дослідження впливу похідних нафтохінону на активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази зародків були проведені *in vitro* [4]. У середовище інкубації перед початком реакції гідролізу додавали 0,1 мл розчину 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону ($\text{M}_r=211$), 2-хлоро-3-(3-оксо-3-(піперидин-1-іл)пропіламіно)-1,4-нафтохінону ($\text{M}_r=346$, далі ФО-1), 2-хлоро-3-(3-(морфолін-4-іл)-3-оксопропіламіно)-1,4-нафтохінону ($\text{M}_r=348$, далі ФО-2) у концентраціях 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} М.

Одержані проби розводили відповідним розчином інкубаційного середовища так, щоб в 0,1 мл проби вміст білка не перевищував 100-250 мкг (кількість білка визначали за методом Лоурі [8]). У пробірку вносили по 0,1 мл однієї й тієї ж проби, доливали по 1 мл інкубаційного середовища та 0,1 мл АТФ- Na_2 . В одну з контрольних пробірок додавали 0,1 мл 0,1 мМ розчину оубаїну.

АТФ-гідролазну реакцію ініціювали додаванням 0,1 мл 3 ммоль/л АТФ та інкубували 15 хв при $t = 23$ °C. Для припинення гідролізу й осадження білка у пробірки додавали 10%-ну ТХО (у співвідношенні 1:1) і центрифугували 10 хв при 1600 g. До надосадової рідини, що містить P_i , доливали 1,5 мл ацетатного буфера – для нейтралізації ТХО ($\text{pH} = 3,9-4,0$); 0,2 мл 2%-ного молібдату амонію і 0,2 мл 2%-ної свіжоприготованої аскорбінової кислоти. Проби перемішували і залишали за кімнатної температури на 20 хв до розвитку забарвлення. Після закінчення цього часу визначали величину екстинкції на спектрофотометрі SPECORD M40 при довжині хвилі 700 нм. По калібрувальній кривій через величину екстинкції визначали вміст неорганічного фосфору (P_i) за модифікованим методом Фіске-Суббароу [6].

Na^+ , K^+ -АТФ-азну активність мембран зародків (у мкмольх P_i /мг білка за год) розраховували за формулою:

$$A = 6P_i/aM,$$

де: P_i – вміст фосфору в пробі, знайдений по кривій, a – вміст білка у пробі; M – молекулярна маса фосфору.

У дослідженнях використовували трис-НCl (Ambion, США), ЕДТА (Invitrogen, США), ouabain („Fluka”, Швейцарія), АТФ („Acros”, Бельгія). Всі інші реактиви були вітчизняного виробництва кваліфікації хч та чда.

Одержані експериментальні дані обробляли статистично за допомогою програми Microsoft Excel-2007. Достовірність змін встановлювали за t -критерієм Стьюдента.

Перевірку нормальності вибірки здійснювали за допомогою критерію Колмогорова-Смірнова, з використанням пакету програм для статистичного аналізу SPSS (Statistics17).

Для визначення частки впливу часу розвитку зародків (60; 150; 210; 270; 330 хв.) та досліджуваних похідних 1,4-нафтохінону на активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази зародків, здійснювали двофакторний дисперсійний аналіз.

Результати і їхнє обговорення

Нами встановлено, що в контролі активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази плазматичної мембрани зародків на стадії 2 бластомерів становить $11,6 \pm 0,82$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка, і це узгоджується з попередніми дослідженнями [2, 4]. Дія амідних похідних ФО-1 та ФО-2 у концентраціях 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} М на стадії 2 бластомерів (табл. 1) призводить до зниження активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази плазматичної мембрани. Найбільш виражених змін активність досліджуваної АТФ-ази зародків на цій стадії розвитку зазнавала за впливу амідних похідних ФО-1, ФО-2 та 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону в концентрації 10^{-3} М. За таких умов активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази на стадії 2 бластомерів знижувалася на $92 \pm 5,16$ %, $94 \pm 7,9$ % та $92 \pm 6,8$ % відповідно, порівняно з контролем. Варто відмітити, що впродовж розвитку зародків в'юна активність ферменту зберігається на цьому ж рівні за впливу досліджуваних факторів (див. таблицю).

Активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази (мкмоль P_i /год на 1 мг білка) у зародках в'юна на різних етапах розвитку за дії похідних 1,4-нафтохінону ($M \pm m$, $n = 10$)

Сполука	Концентрація, М	Стадія раннього розвитку (кількість бластомерів)				
		2	16	64	256	1024
Контроль		11,610±0,8	12,926±0,7	15,273±0,8	17,918±0,8	15,835±1,3
2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінон	10^{-7}	4,7±0,1 ***	5,2±0,3 ***	5,8±0,2 ***	6,7±0,1 ***	5,65±0,4 ***
	10^{-5}	1,698±0,5 ***	1,772±0,22 ***	1,94±0,05 ***	2,380±0,2 ***	1,922±0,05 ***
	10^{-3}	0,926±0,4 ***	1,214±0,05 ***	1,48±0,1 ***	1,957±0,2 ***	1,032±0,1 ***
ФО-1	10^{-7}	3,5±0,3 ***	3,8±0,2 ***	3,7±0,1 ***	3,81±0,11 ***	3,6±0,3 ***
	10^{-5}	1,016±0,04 ***	1,51±0,1 ***	1,121±0,2 ***	1,276±0,13 ***	1,12±0,2 ***
	10^{-3}	0,888±0,01 ***	0,96±0,1 ***	0,590±0,1 ***	0,943±0,05 ***	0,607±0,02 ***
ФО-2	10^{-7}	3,3±0,4 ***	3,6±0,011 ***	3,45±0,2 ***	3,66±0,21 ***	3,37±0,34 ***
	10^{-5}	1,105±0,1 ***	1,205±0,06 ***	1,035±0,16 ***	1,265±0,16 ***	1,121±0,15 ***
	10^{-3}	0,73±0,05 ***	0,71±0,1 ***	0,56±0,04 ***	0,635±0,001 ***	0,536±0,04 ***

Примітка: *** – різниця, порівняно з контролем, вірогідна ($p \geq 0,999$).

Нижчі концентрації (10^{-5} та 10^{-7} М) хінонових похідних у середовищі інкубації призводили до менш інтенсивного зниження активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази зародків. Так, за впливу похідних ФО-1 та ФО-2 у концентрації 10^{-5} М на стадії 2 бластомерів активність

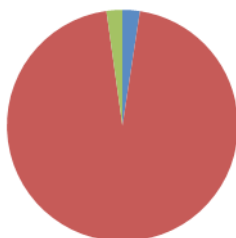
ферменту становила $1,016 \pm 0,04$ та $1,105 \pm 0,1$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка, що дорівнює приблизно 10 % активності АТФ-ази в контролі (спадання на ~90 %). Така активність ферменту зафіксована на етапі розвитку 16; 64; 256 та 1024 бластомерів (див. таблицю).

Наявність у середовищі інкубації ФО-1 та ФО-2 у концентрації 10^{-7} М зумовлювали достовірне зниження активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази приблизно на 75 %. Вихідна сполука 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінон у концентрації 10^{-7} М веде до менш вираженого спадання активності ферменту ~ на 62 %.

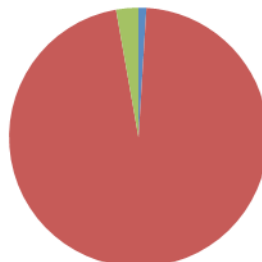
Отже, 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінон, ФО-1 та ФО-2 у високих досліджуваних концентраціях зумовлює однакове значне зниження активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази впродовж досліджу. ФО-1 та ФО-2 у низькій концентрації (10^{-7} М) більш виражено знижує активність ферменту в зародках в'юна, порівняно з вихідною сполукою.

Слід відзначити, що вплив новосинтезованих амідних похідних має специфічний характер, оскільки їхня наявність в інкубаційному середовищі навіть у мікромольних кількостях призводить до зниження активності досліджуваного мембранного ферменту зародків.

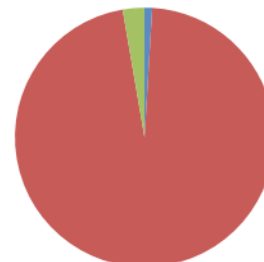
**2-хлоро-3-гідрокси-
1,4-нафтохінон**



ФО-1



ФО-2



■ невраховані чинники

■ концентрація

■ час розвитку

Результати дисперсійного аналізу впливу часу розвитку та похідних 1,4-нафтохінону на показники активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази зародків в'юна в період раннього ембріогенезу

Для оцінки впливу часу розвитку та досліджуваних сполук на активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази зародків в'юна проведено двофакторний дисперсійний аналіз (див. рисунок). Дослідження дії факторів часу та 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону на активність АТФ-ази показав, що частка впливу хінонового похідного (95,3 %) переважає над часткою впливу часу розвитку (2,3 %) і неврахованих чинників. Частка впливу новосинтезованих амідних похідних ФО-1 та ФО-2 на активність досліджуваного ферменту становить 96,23 і 96,33 %, відповідно. У результаті отриманих даних можна стверджувати, що досліджувані сполуки безпосередньо впливають на активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази зародків в'юна.

У результаті проведених досліджень на зародках в'юна *Misgurnus fossilis* L. встановлено, що похідні 1,4-нафтохінону дозозалежно інгібують активність Mg^{2+} -залежної Na^+ , K^+ -АТФ-ази зародків в'юна плазматичної мембрани. Ці результати узгоджуються з даними, отриманими на зародках в'юна за впливу амінокислотних похідних 1,4-нафтохінону [4], однак проявляють більш виражені інгібуючі властивості. Слід відзначити, що включення у структуру хіноїдної сполуки морфолінового та піперидинілового фрагментів сприяє більш вираженим інгібувальним властивостям похідних ФО-1 та ФО-2 відносно 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону, який є вихідною сполукою їхнього синтезу. Таким чином, амідні похідні 1,4-нафтохінону можна віднести до дозозалежних модулаторів Na^+ , K^+ -активованого Mg^{2+} -залежного гідролізу АТФ.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Безкоровайний А. О., Зинь А. Р., Гарасим Н. П. та ін.* Морфологічні зміни зародків і личинок в'юна за впливу амідних похідних 1,4-нафтохінону // Біологічні Студії / *Studia Biologica*. 2015. Т. 9. № 3-4. С. 79–88.
2. *Зинь А. Р., Мандзинець С. М., Головчак Н. П. та ін.* Активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази мембран зародків в'юна впродовж раннього ембріогенезу за дії гіпохлориту натрію // Біологічні Студії / *Studia Biologica*. 2011. Т. 5. № 3. С. 59–66.
3. *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.
4. *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* // Біологічні Студії / *Studia Biologica*. 2010. Т. 4. № 3. С. 31–44.
5. *Bezkorovajnyj A.O., Zyn A. R., Harasym N.P. et al.* Loach embryos prooxidant-antioxidant status under the influence of amide derivatives of 1,4-naphthoquinone // *Ukr. Biochem. J.* 2016. Vol. 88. N 3. P. 46–53.
6. *Fiske C. H., Subbarow Y.* The Colorimetric Determination of Phosphorus // *J. Biol. Chem.* 1925. Vol. 66. P. 375–400.
7. *Klotz L. O., Hou X., Jacob C.* 1,4-naphthoquinones: from oxidative damage to cellular and inter-cellular signaling // *Molecules*. 2014. Vol. 19. P. 14902–14918.
8. *Lowry O. H., Rosenbrough N. G., Farr A.L. et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 193. P. 265–275.
9. *Mohammed Al-Ghorbani, A. Bushra Begum, S. V. Zabiulla Mamatha et al.* Piperazine and morpholine: synthetic preview and pharmaceutical applications. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2015. Vol. 7. № 5. P. 281–301.
10. *Wellington K. W.* Understanding cancer and the anticancer activities of naphthoquinones // *RSC Advances*. 2015. Vol. 5. P. 20309–20338.

Стаття: надійшла до редакції 26.07.16

доопрацьована 1.09.16

прийнята до друку 5.09.16

**Na^+ , K^+ -АТФ-АЕ ACTIVITY OF LOACH EMBRYOS MEMBRANES
DURING EARLY EMBRYOGENESIS UNDER THE INFLUENCE OF AMIDE
DERIVATIVES OF 1,4-NAPHTHOQUINONE**

A. Bezkorovajnyj^{1,2}, A. Zyn², N. Harasym¹, D. Sanagursky¹

¹ *Ivan Franko National University of Lviv, Ukraine*

² *Lviv Expert Center of Scientific Researches*

Ministry of Internal Affairs of Ukraine

e-mail: andriy.bezkorovajnyj@gmail.com

The data on the impact of derivatives of 1,4-naphthoquinone on the activity of Na^+ , K^+ -activated Mg^{2+} -dependent ATP-ase loach embryos *Misgurnus fossilis* L. in the early stages of development are presented. It was established that 2-chloro-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone, 2-chloro-3-(3-oxo-3-(piperidine-1-yl)propylamine)-1,4-naphthoquinone, 2-chloro-3-(3-(morpholine-4-yl)-3-oxopropylamine)-1,4-naphthoquinone inhibit Na^+ , K^+ -

ATP-ase membranes in dose-dependent manner. The results of the two-factor ANOVA test indicated 2-chloro-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone and 1,4-naphthoquinone amide derivatives (FO-1, FO-2) had predominant influence on the ATP-ase. It should be noted that the inclusion of morpholine and piperidine compounds fragments into the quinone structure promotes more pronounced inhibitory properties of derivatives FO-1 and FO-2 relative to 2-chloro-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone which is the starting compound for their synthesis. Derivatives of 1,4-naphthoquinone might be considered as dose-dependent modulators of Na^+ , K^+ -activated Mg^{2+} -dependent hydrolysis of ATP.

Keywords: membrane transport, Na^+ , K^+ - ATP-ase, loach embryos, amide derivatives of 1,4-naphthoquinone.

АКТИВНОСТЬ Na^+ , K^+ -АТФ-АЗЫ МЕМБРАН ВЬЮНА В ТЕЧЕНИЕ РАННЕГО ЭМБРИОГЕНЕЗА ПОД ВЛИЯНИЕМ АМИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 1,4-НАФТОХИНОНА

А. Безкоровайний^{1,2}, А. Зинь², Н. Герасим¹, Д. Санагурський¹

¹ Львовской национальной университет имени Ивана Франко, Украина

² Львовский научно-исследовательский экспертно-криминалистический
центр МВД Украины

e-mail: andriy.bezkorovajnyj@gmail.com

В работе приведены данные о влиянии производных 1,4-нафтохинона на активность Na^+ , K^+ -активированной, Mg^{2+} -зависимой аденозинтрифосфатазы зародышей вьюна *Misgurnus fossilis* L. на ранних этапах эмбриогенеза. Установлено, что 2-хлоро-3-гидрокси-1,4-нафтохинон, 2-хлоро-3-(3-оксо-3-(пиперидин-1-ил)пропиламина)-1,4-нафтохинон, 2-хлоро-3-(3-морфолин-4-ил)-3-оксопропиламина)-1,4-нафтохинон дозозависимо ингибирует Na^+ , K^+ -АТФ-азную активность мембран. С помощью двухфакторного дисперсионного анализа установлено, что преобладающее влияние на активность АТФ-азы оказывают 2-хлоро-3-гидрокси-1,4-нафтохинон и амидные производные 1,4-нафтохинона (ФО-1 и ФО-2). Следует отметить, что включение в структуру хиноида морфолинового и пиперидинового фрагментов способствует более выраженным ингибирующим свойствам производных ФО-1 и ФО-2 относительно 2-хлор-3-гидрокси-1,4-нафтохинона, который является исходным соединением их синтеза. Следовательно, амидные производные 1,4-нафтохинона можно отнести к дозозависимым модуляторам Na^+ , K^+ -активированного, Mg^{2+} -зависимого гидролиза АТФ.

Ключевые слова: мембранный транспорт, Na^+ , K^+ -АТФ-аза, зародыши вьюна, амидные производные 1,4-нафтохинона.