

7. *Ogawa Y.* Purification of β -N-acetylhexosaminidase from egg white and the microsomal and lysosomal fractions of hen oviduct / *Ogawa Y., Nakamura R., Sato Y.* // *Agric. Biol. Chem.* – 1983. – V. 47. – P. 2085–2089.
8. *Droba B.* Properties of acid β -N-acetyl-D-glucosaminidase from cock semen. / *Droba B., Droba M.* // *Folia Biol. (Krak.)* – 1992. – V. 40 (1–2). – P. 67–71.
9. *Dżugan M.* Acid glycosidases from gander testes. / *Dżugan M., Droba M., Droba B.* // *Rocz. Nauk. Zoot.* – 1998. – V. 25. – P. 77–83.
10. *Dżugan M.* Seasonal changes in acid glycosidases from gander testes / *Dżugan M., Droba M., Droba B.* // *Comp. Biochem. Physiol. Part B* – 2000. – V. 127. – P. 383–390.
11. *Droba M.* Aktywność β -N-acetyloheksosaminidazy i β -Galaktozydazy w plazmie nasienia poszczególnych kogutów w cyklu rocznym / *Droba M.* // – *Rocz. Nauk. Zoot.* – 2002. – V. 29 (z. 1). – P. 137–143.
12. *Józefczyk R.* Acid glycosidases in the testes of Japanese quail / *Józefczyk R., Droba M.* // *Ann. Anim. Sci.* – 2004. – V. 4 (No. 2). – P. 363–370.
13. *Droba M.* Changes in the activity of acid glycosidases during posthatch development and regression after light reduction of Japanese quail testes and epididymides / *Droba M., Józefczyk R., Droba B., Witkowski A.* // *Comp. Biochem. Physiol. Part B* – 2007. – V. 146. – P. 364–369.
14. *Droba B.* Effect of individual versus group caging on multiple forms of β -N-acetylglucosaminidase in male Japanese quail testes (*Coturnix coturnix japonica*) / *Droba B., Droba M., Józefczyk R.* // *Arch. Geflugelk.* – 2010. – V. 74 (2). – P. 94–97.
15. *Droba M.* Acid glycosidases from hen oviduct and egg albumen. / *Droba M., Droba B., Błedniak D.* // *Comp. Biochem. Physiol. Part B* – 2005. – V. 142. – P. 391–397.
16. *Barrett A. J.* Lysosomal enzymes. In: *Dingle, J. T. (Ed.), Lysosomes: A Laboratory Handbook.* / *Barrett A. J., Heath M. F.* // *Elsevier North-Holland* – 1977. – P. 19–145.
17. *Bradford M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / *Bradford M.* // *Anal. Biochem.* – 1976. – V. 72. – P. 248–254.
18. *Sultana F.* The peri-albumen layer: a novel structure in the envelopes of an avian egg / *Sultana F., Yokoe A., Ito Y., Mao K.M., Yoshizaki N.* // *Journal of Anatomy* – 2003. – V. 203 – P. 115–122.
19. *Yoshizaki N.* Changes in shell membranes during the development of quail embryos. / *Yoshizaki N., Saito H.* // *Poultry Science* – 2002 – V. 81. – P. 246–251.

Рецензент: завідувач лабораторії живлення великої рогатої худоби, доктор сільськогосподарських наук, с. н. с. Вудмаска І. В.

УДК 577.21; 57.044

ПРОЦЕСИ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ У ЗАРОДКАХ В'ЮНА ЗА ДІЇ ПОХІДНИХ ТІОСУЛЬФОКИСЛОТ

*О. С. Яремкевич¹, Н. П. Головчак², С. В. Хом'як¹, В. І. Лубенець¹,
Д. І. Санагурський², В. П. Новіков¹*

¹Національний університет «Львівська політехніка»

²Львівський національний університет імені Івана Франка

Досліджено інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) новосинтезованих антимікробних біологічно активних речовин – похідних тіосульфокислот. Встановлено, що за дії метилтіосульфону калію, етилтіосульфону калію, 4-амінобензентіосульфону, нітробензентіосульфону калію та 4-амінобензентіосульфону натрію спостерігається посилення процесів

ПОЛ. І навпаки, толуетіосульфонат калію та 4-амінобензентіосульфонат натрію призводить до очевидного зниження рівня ТБК-активних продуктів, що свідчить про зниження даними речовинами інтенсивності процесів ПОЛ.

Ключові слова: ТІОСУЛЬФОНАТИ, ПЕРЕКИСНЕ ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ, ЗАРОДКИ В'ЮНА

Тіосульфонати – це сірковмісні біологічно активні сполуки із загальною формулою RSO_2SR' ; синтетичні аналоги природних біорегуляторів, зокрема, діючої речовини часнику (*Allium sativum* L.). Високий індекс і широкий спектр антимікробної активності тіосульфоестерів, їх стабільність та низька токсичність дозволили запропонувати ці сполуки як лікарські субстанції [1–5].

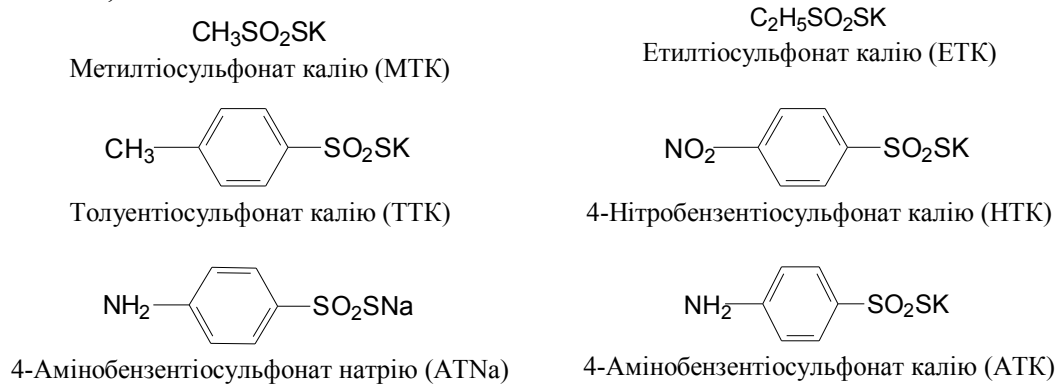
Сучасна концепція лікувальних та протекторних засобів спрямована на розробку методів, які б запобігали ушкодженню і загибелі всіх типів клітин. Згідно з точкою зору багатьох дослідників [6–9] лікарські препарати, які використовуються сьогодні або створюються як протекторні засоби, повинні мати комплексний вплив на кілька ключових стадій патобіохімічного каскаду. Важливою властивістю таких лікарських речовин та протекторів повинна бути наявність антиоксидантного ефекту.

Відомо, що процеси біологічного окиснення займають центральне місце в метаболізмі клітин. В останні роки широко обговорюється роль активних форм кисню (АФК) та ініційованих ними вільнорадикальних процесів, що призводять до різних патологічних процесів. За нормальних фізіологічних умов рівень ПОЛ знаходиться на невисокому рівні та підтримується завдяки рівновазі про- та антиоксидантів, а вони, у свою чергу, є важливими складовими гомеостазу організму [10]. ПОЛ в нормі є життєво важливою ланкою в регуляції багатьох мембранозалежних процесів – регуляції проникності і транспорту речовин через мембрану, регуляції мембранасоційованих ферментів та ліпідного складу мембран, у синтезі простагландинів, лейкотриєнів, тромбоксанів, стероїдних гормонів, холестеролу, метаболізмі катехоламінів [11]. Проте відомо, що під час багатьох захворювань підсилюється оксидативний стрес [12–15], в результаті якого активуються процеси ПОЛ, що викликає значні зміни в обмінних процесах клітини та структурно-функціональній цілісності клітинних мембран, супроводжується дисбалансом ферментативних і неферментативних компонентів системи антиоксидантного захисту, вивільненням лізосомних ферментів, зміною транспорту іонів Ca^{2+} [16]. ПОЛ може призводити до інактивації мембранних рецепторів, а також таких ферментів, як глюкозо-6-фосфатази та Na/K-АТФаза, котра приймає безпосередню участь у підтримці іонного гомеостазу клітини [17]. За дії вільнорадикальних реакцій в мітохондріях можуть пошкоджуватись як ферменти матрикса, так і компоненти дихального ланцюга. Отже, пошкоджені процесами ПОЛ мембрани втрачають енергетичний потенціал, електрозбудливу функцію, контроль за іонними потоками та медіаторними системами, виникають патологічні (запальні, нейродегенеративні, злоякісні) зміни в тканинах, що в результаті веде клітину до загибелі.

Уникнути різноманітних ускладнень при перебігу захворювань можна шляхом своєчасного блокування пускового механізму патології, тобто зниженням інтенсивності ПОЛ в організмі за допомогою антиоксидантів. Експериментальна і клінічна медицина має значний досвід розробки і використання препаратів з антиоксидантною дією за різних патологій. Тому, детальне дослідження впливу похідних тіосульфоєкислот на процеси біологічного окиснення ліпідів мембран зародкових клітин прісноводної риби в'юна *Misgurnus fossilis* L. в період раннього ембріогенезу є актуальним і перспективним, і наблизить до розуміння механізмів біологічної дії цих речовин, покращення їх лікувальних властивостей, що матиме вагомe значення для фармакології та медицини.

Матеріали і методи

У експерименті були використані синтезовані на кафедрі технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології «Національного університету Львівська політехніка» натрієві та калієві солі тіосульфоокислот різної структури у концентрації 10^{-5} г/мл, а саме:



Дослідження проводили на зародках в'юна (*Misgurnus fossilis* L.). Овуляцію стимулювали внутрішньом'язовим введенням самкам 500 од. хоріогонічного гонадотропіну. Сім'яники виділяли після декапітації та розтину черевної порожнини самців. Ікру отримували через 36 год після стимуляції, яку запліднювали в чашках Петрі суспензією спермійів за Нейфахом [18]. Через 5–10 хв після запліднення зиготи відмивали й інкубували їх при температурі 20–22 °С у дослідних розчинах. Контрольні проби інкубували у фізіологічному розчині Гольфретеера. На десятій стадії розвитку (1024 бластомерів) зародки гомогенізували та отримані зразки заморожували при -20 °С. У відібраних зразках реакцією малонового діальдегіду з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) визначали вміст ТБК-активних продуктів ПОЛ (вторинних продуктів ліпопероксидації) при довжині хвилі 532 нм [19]. Кількість білка у пробах визначали за методом Лоурі.

Дані досліджень обробляли статистично з вирахуванням середніх арифметичних величин M , середньої квадратичної похибки σ та відхилення від середнього арифметичного m між показниками.

Статистичну обробку усіх даних результатів досліджень проводили з використанням програми «Excel-2003» для Windows. Для оцінки достовірності різниці між статистичними характеристиками двох альтернативних сукупностей даних обраховували коефіцієнт Стьюдента. Результати обробки відображалися у вигляді діаграм.

Результати й обговорення

Під час аналізу отриманих даних встановили, що за дії окремих досліджуваних похідних тіосульфоокислот відбувається інтенсифікація процесів ПОЛ. У зародках в'юна інкубованих у розчині метилтіосульфонату калію (МТК) спостерігається достовірне підвищення вмісту ТБК-активних продуктів (на 13,6 % відносно контролю). За дії етилтіосульфонату калію (ЕТК) відбувається зростання інтенсивності процесів ліпопероксидації на 23,8 %. Вміст ТБК-активних продуктів за дії нітробензентіосульфонату калію (НТК) перевищує контроль на 25,4 %, за дії 4-амінобензентіосульфонату калію (АТК) – на 11,7 % (рис. 1).

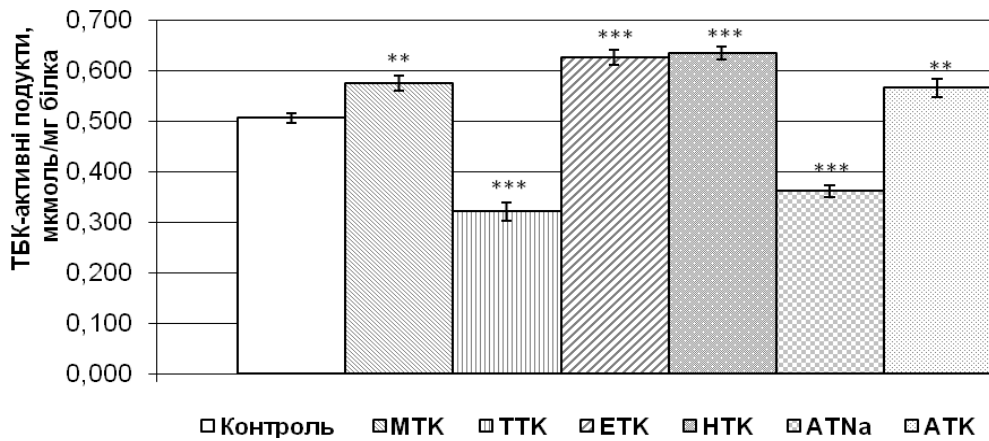


Рис. 1. Вміст ТБК-активних продуктів на X стадії розвитку (1024 бластомери) зародків в'юна інкубованих у розчинах метилтіосульфату калію (МТК), толуентіосульфату калію (ТТК), етилтіосульфату калію (ЕТК), нітробензентіосульфату калію (НТК), *n*-амінобензентіосульфату натрію (АТNa) та *n*-амінобензентіосульфату калію (АТК) у концентрації 10^{-5} М в порівнянні з контролем.

Отже, за дії всіх аліфатичних тіосульфатів – МТК, ЕТК та деяких ароматичних – НТК та АТК збільшується вміст вторинних продуктів вільнорадикального окиснення ліпідів, що, ймовірно, може викликати суттєві порушення у клітинному метаболізмі – зміни мембранної проникності, процеси інактивації іонних транспортних Na^+/K^+ та Ca^{2+} систем. Відомо, що для нормального функціонування цих систем потрібен задовільний стан мембранних ліпідів. Отже, процеси мембранного транспорту та ПОЛ взаємопов'язані. З попередніх досліджень [20] встановлено, що дія МТК та АТК у високих концентраціях (10^{-3} – 10^{-5} М) призводить до порушень електрогенезу клітинних мембран, що свідчить про зміни проникності плазматичної мембрани зародкових клітин та інгібування активності Na^+ , K^+ -АТФази. Інактивація Na^+ , K^+ -АТФази внаслідок окиснення тіолових груп мембранних білків за дії фармакологічних чинників може призводити до сповільнення «викачування» іонів кальцію або натрію з клітини та до збільшення внутрішньоклітинних концентрацій цих іонів та істотних порушень функцій клітини. Висока концентрація цитозольного Ca^{2+} викликає активацію протеолітичних ферментів та високоактивних молекул (цитохрому С, супероксидних радикалів), що в кінцевому випадку ведуть до індукції апоптозу або до розвитку некротичних процесів. Ці припущення підтверджуються нашими дослідженнями, які засвідчили зростання інтенсивності процесів ПОЛ за дії МТК та АТК.

Потрібно зазначити, що дія АТК та МТК призводить до незначного підвищення вмісту вторинних продуктів ПОЛ (на 11,7 та 13,6 % відповідно). Відомо, що незначне підвищення інтенсивності процесів ліпопероксидації стимулює активацію ферментів антиоксидантної системи, тому для того, щоб зробити висновки про прооксидантно-антиоксидантний стан зародків в'юна потрібно вивчити активність ферментів антиоксидантного захисту.

За дії ТТК та АТNa, навпаки, спостерігається зменшення рівня ТБК-активних продуктів на 36,6 % та 28,5 % відповідно порівняно з контролем, що свідчить про зниження даними речовинами інтенсивності процесів ПОЛ, можливо, за рахунок активації ферментативних систем антиоксидантного захисту. Відомо, що зниження

інтенсивності процесів ліпопероксидації нижче контрольних значень негативно впливає на процеси життєдіяльності клітин, оскільки дані процеси потрібні клітині для оновлення ліпідів клітинних мембран, утворення біологічно активних речовин.

Висновки

Отже, за дії МТК, ЕТК, НТК та АТК збільшується вміст вторинних продуктів вільнорадикального окиснення ліпідів. ТТК та АТNa призводить до зниження інтенсивності процесів пероксидного окиснення ліпідів.

Перспективи подальших досліджень. Доцільно вивчити вплив похідних тіосульфокислот на стан прооксидантно-антиоксидантної системи зародків в'юна.

H. Yaremkevych, N. Holovchak, S. Homyak, V. Lubenec, D. Sanagurskyi, V. Novikov

LIPID PEROXIDATION PROCESSES IN THE LOACH EMBRYOS UNDER THE INFLUENS OF TIOSULPHONIC ACID DERIVATIVES

S u m m a r y

The level of lipid peroxidation of novel synthesized antimicrobial biologically active substances – tiosulphonic acid derivatives were investigated. It was established that the activation of the lipid peroxidation processes was observed when potassium salts of metyltiosulphonate, etyltiosulphonate, nitrobenzentiosulphonate, 4-aminobenzentiosulphonate and sodium 4-aminobenzentiosulphonate were added. And to the contrary, the addition of potassium toluentiosulphonate and sodium 4-aminobenzentiosulphonate leads to the obvious reduction of TBA-active products, that indicates a decrease of intensity of lipid peroxidation processes.

E. С. Яремкевич, Н. П. Головчак, С. В. Хомьяк, В. И. Лубенец,

Д. И. Санагурский, В. П. Новиков

ПРОЦЕССЫ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ У ЗАРОДЫШЕЙ ВЬЮНА ПРИ ДЕЙСТВИИ ПРОИЗВОДНЫХ ТИОСУЛЬФОКИСЛОТ

А н н о т а ц и я

Исследовано интенсивность процессов пероксидного окисления липидов (ПОЛ) новосинтезированных антимикробных биологически активных веществ – производных тиосульфокислот. Установлено, что при действии метилтиосульфоната калия, этилтиосульфоната калия, 4-аминобензентиосульфоната, нитробензентиосульфоната калия и 4-аминобензентиосульфоната натрия наблюдается усиление процессов ПОЛ. И наоборот, толуентиосульфонат калия и 4-аминобензентиосульфонат натрия приводит к очевидному снижению уровня ТБК-активных продуктов, что свидетельствует о снижении данными веществами интенсивности процессов ПОЛ.

1. *Лубенець В. І.* Хімія і застосування ефірів тіосульфокислот / В. І. Лубенець, В. П. Новіков, О. В. Лужецька-Швед та ін. // Вісник ДУ «Львівська політехніка»: «Хімія, технологія речовин та їх застосування». – 1997. – № 332. – С. 215–219.
2. *Сопрунюк Н. Г.* Защитные свойства тиолсульфонатов / Н. Г. Сопрунюк, Л. В. Яницкая, В. И. Лубенец, О. В. Швед // Защита металлов. – 1996. – Т. 32, № 5. – С. 534–536.
3. А.с. №198538 СССР. Способ лечения грибковых заболеваний кожи «Эсуланом» / Б. Г. Болдырев, Г. М. Першин, С. Н. Милованова, Л. М. Пожарская, М. А. Королева, Л. Е. Колмакова (СССР) // Б. И., 1967. – № 14. – 4 с.
4. *Болдырев Б. Г.* Эсулан – новое средство для лечения эпидермофитии стоп / Б. Г. Болдырев, Л. Е. Колмакова, Г. М. Першин [и др.] // Хим. фарм. журн. – 1968. – Т. 2, № 4. – С. 12–16.
5. Патент 2 573 077 Франция, МКИ С 07 D 235/28; А 61 К 31/47. Nouveaux derives thiosulfonates, leur procede de preparation ainsi que les compositions pharmaceutiques les contenant / Sebille Bernard, Beuzard Yves, Demarne Henri (Франція). – № 8417286; Заявл.

- 13.11.84; Опубл. 16.05.86 // РЖХ. 90138П. Stubb J. Controlling radical reactions // Monthly Nature. – 1994. – Vol. 2, № 8. – P. 33.
6. *Беленічев І.* Лікування церебральної патології: нові можливості / Беленічев І., Сидорова І. // Ліки України. – 2004. – №10. – С. 107–108.
 7. *Бухтіярова Н. В.* Пошук речовин з антирадикальною і антиперекисною активністю серед похідних хіназолону-4 та 4-амінохіназолону : Автореф. дис. ... канд. мед. наук. / Бухтіярова Н. В. – К., 2003.– 22 с.
 8. *Виленский Б. С.* Применение церебролизина при ишемическом инсульте/ Виленский Б. С., Семенова Г. М., Широков Е. А. // Журн. неврол. и психиатрии. – 1999. – № 4.– С. 65–69.
 9. *Владимиров В. И.* Зависимость качества эмбрионов и личинок карпа от возраста самок, содержания аминокислот в икре и добавок их в воду в начале развития. Разнокачественность раннего онтогенеза у рыб / Владимирова В. И. –К. : Наук. думка, 1974. – С. 94–114.
 10. *Гиріна О.* Перебіг вільнорадикальних процесів і підбір антиоксидантної терапії при ішемічній хворобі серця / Гиріна О., Глушенко А. // Ліки України. – 2003. – № 4. – С. 13–19.
 11. *Stubb J.* Controlling radical reactions / Stubb J. // Monthly Nature. – 1994. – Vol. 2, № 8. – P. 33.
 12. *Гончарук Є. Г.* Вільнорадикальне окиснення як універсальний неспецифічний механізм пошкоджуючої дії шкідливих чинників довкілля (огляд літератури та власних досліджень) / Гончарук Є. Г., Коршун М. М. // Ж. акад. мед. наук України. – 2004. – Т.10, № 1. – С. 131–150.
 13. *Полянська О. С.* Активність процесів ліпопероксидації при нестабільній стенокардії та інфаркті міокарда / Полянська О. С. // Бук. мед. вісник. – 2002. – Т.6, № 2.– С. 77–79.
 14. *Сорокіна І.* Роль вільнорадикальних процесів у патогенезі ішемічної хвороби серця, артеріальної гіпертензії та їх корекція / Сорокіна І. // Ліки України. – 2003. – № 2. – С. 18–19.
 15. *Ланкин В. З.* Свободнорадикальные процессы при заболеваниях сердечно-сосудистой системы / Ланкин В. З., Тихазе А. К., Беленков Ю. Н. // Кардиология. – 2000. – Т. 40, № 7. – С. 48–61.
 16. *Michiels, C.* Cytotoxicity of linoleic acid peroxide, malondialdehyde and 4-hydroxynonenal towards human fibroblast / C. Michiels, J. Remalec // Toxicology, 2004. – Vol. 66. – № 2. – P. 225–234.
 17. *Болдырев А. А.* Антиоксидантные системы в тканях мышей с ускоренным темпом старения / А. А. Болдырев, М. О. Юнева, Е. В. Сорокина та ін. // Биохимия. – 2001. – Т. 66. – С. 1157–1163.
 18. *Нейфах А. А., Тимофеева М. Я.* Проблемы регуляции в молекулярной биологии развития.– М.: Наука, 1978. –336 с.
 19. *Тимирбулатов Р.Р., Селезнев Е.И.* Методы повышения интенсивности свободнорадикального окисления липидосодержащих компонентов крови и его диагностическое значение // Лаб. Дело. –1981.– № 4. – С. 209–211.
 20. *О. Яремкевич, М. Бура, С. Мандзинець, В. Лубенець та ін.* Зміни динаміки мембранного потенціалу зародків в'юна під впливом тіосульфатів //Вісник НУ „ЛП”. Хімія, технологія речовин та їх застосування. – 2009. – В. 644. – С. 78–85.

Рецензент: головний науковий співробітник лабораторії екологічної фізіології та якості продукції, доктор сільськогосподарських наук, с. н. с. Рівіс Й. Ф.