

УДК 591.3:597.551.2.:547.655.6+577. 352.4

**ДОСЛІДЖЕННЯ АКТИВНОСТІ  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-АЗИ МЕМБРАН ЗАРОДКІВ В'ЮНА  
ВПРОДОВЖ РАНЬОГО ЕМБРИОГЕНЕЗУ ЗА ВПЛИВУ ПОХІДНИХ  
1,4-НАФТОХІНОНУ**

*А.О. Безкорвайний<sup>1</sup>, А.Р. Зинь<sup>2</sup>, Н.П. Гарасим<sup>3</sup>, Ю.Т. Лень,<sup>4</sup> Д.І. Санагурський<sup>5</sup>*

<sup>1,3,5</sup> Львівський національний університет імені Івана Франка, вул. Грушевського, 4, м. Львів, 79005, Україна

<sup>1,2,4</sup> Львівський науково-дослідний експертно-криміналістичний центр МВС України, вул. Конюшинна, 24, Львів, 79040, Україна

Нафтохінони - група перспективних органічних сполук, що посідає значне місце серед природних речовин та їх синтетичних похідних, котрі володіють широким спектром біологічної активності [1, 2]. 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) [2, 3]. Механізми, за допомогою яких нафтохінони здатні викликати ці ефекти, є складними [4]. Як відомо, хінони – це сполуки з високою відносною активністю, які можуть брати участь у редокс-циклі через їхні семіхінонові радикали, що призводить до формування активних форм кисню (АФК), включаючи супероксид, пероксид водню і, особливо, гідроксил радикал.

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

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).

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

Питому активність АТФ-азної системи досліджуваних клітин оцінювали за різницею між концентрацією неорганічного фосфору (Pi), що утворився в середовищі інкубації за наявності та відсутності фрагментів мембран, поправку на вміст ендogenous Pi визначали при додаванні аліквоти тільки мембранного препарату зародків на відповідній стадії розвитку й виражали активність досліджуваної АТФ-ази зародків у мкмолях Pi у перерахунку за 1 год на 1 мг білка. Кількість продукту реакції Pi визначали за модифікованим методом Фіске-Суббароу [6], а вміст білка в суспензії мембранного препарату – за методом Лоурі [7].

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 (Statistics 17).

Для визначення частки впливу часу розвитку зародків (60; 150; 210; 270; 330 хв.) та

досліджуваних похідних 1,4-нафтохінону на активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази зародків, здійснювали двофакторний дисперсійний аналіз.

У результаті проведених досліджень на зародках в'юна *Misgurnus fossilis* L., встановлено, що похідні 1,4-нафтохінону дозозалежно інгібують активність  $\text{Mg}^{2+}$ -залежної  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази зародків в'юна плазматичної мембрани. Ці результати узгоджуються з даними отриманими на зародках в'юна за впливу амінокислотних похідних 1,4-нафтохінону [5], проте проявляють більш виражені інгібуючі властивості.

Найбільш виражених змін активність АТФ-ази зародків на досліджуваній стадії розвитку зазнавала за впливу амідних похідних ФО-1 та ФО-2 в концентрації  $10^{-3}$  М. За таких умов активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази на стадії 2 бластомерів знижувалася на  $92,03 \pm 5,16\%$  та  $93,7 \pm 4,9\%$  порівняно з контролем, тоді як при дії вихідної в їх синтезі сполуки (2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону) –  $90,2 \pm 6,8\%$ . Варто відмітити, що за дії у вищевказаній концентрації, амідні похідні ФО-1 та ФО-2 найбільше інгібують активність АТФ-ази на стадії 64 бластомерів  $93,7 \pm 3,4\%$  та  $96,14 \pm 1,2\%$  порівняно з контролем.

Подальше зниження концентрації досліджуваних хінонових похідних у середовищі інкубації ( $10^{-5}$  та  $10^{-7}$  М) призводило до дозозалежного зниження активності досліджуваної АТФ-ази зародків. Так, за впливу похідних ФО-1 та ФО-2 у концентрації  $10^{-5}$  М на стадії 2 бластомерів активність ферменту становила  $1,013 \pm 0,04$  та  $1,105 \pm 0,1$  мкмоль Рі /год на 1 мг білка, що становить  $91,2\%$  та  $92,3\%$  активності АТФ-ази в контролі. Наявність у середовищі інкубації досліджуваних амідних похідних у концентрації  $10^{-7}$  М призводила до достовірного зниження активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази, як і на попередніх досліджуваних стадіях розвитку.

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

Для оцінки впливу часу розвитку та досліджуваних сполук на активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази зародків в'юна, проведено двофакторний дисперсійний аналіз. Дослідження дії факторів часу та 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону на активність АТФ-ази показав, що частка впливу хінонового похідного ( $95,3\%$ ;  $p \geq 0,95$ ), переважає над часткою впливу іншого фактора ( $2,3\%$ ) та неврахованими чинниками. Частка впливу новосинтезованих амідних похідних ФО-1 та ФО-2 на активність досліджуваного ферменту становить  $96,23\%$  та  $96,33\%$  відповідно, проте дані статистично не достовірні. У результаті отриманих даних можна стверджувати, що досліджувані сполуки безпосередньо впливають на активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази зародків в'юна.

Отже, вплив 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону та амідних похідних ФО-1 та ФО-2 призводить до дозозалежних змін активності мембранозв'язаного ферменту зародків. Слід відзначити, що включення в структуру хіноїдної сполуки морфолінового та піперидинолового фрагментів, сприяє більш вираженим інгібувальним властивостям похідних ФО-1 та ФО-2 відносно 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону, який є вихідною сполукою їх синтезу. Таким чином, амідні похідні 1,4-нафтохінону можна віднести до дозозалежних модуляторів  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -активованого  $\text{Mg}^{2+}$ -залежного гідролізу АТФ.

#### Література

1. Kongayhip B. Synthesis of novel naphthoquinone aliphatic amides and esters and their anticancer evaluation / B. Kongkathip, S. Akkarasamiyo, K. Hasitapana et al. // Medicinal Chemistry. – 2013. – № 60. – P. 271–284.
2. Pradidphol N. First synthesis and anticancer activity of novel naphthoquinone amides / N. Pradidphol, N. Kongkathipa, P. Sittikul et al. // Medicinal Chemistry. – 2012. – № 49. – P. 253–270.
3. Wellington K. W. Understanding cancer and the anticancer activities of naphthoquinones. / K. W. Wellington. // RSC Advances. – 2015. – № 5. – P. 20309–20338.

4. Klotz L.O. 1,4-naphthoquinones: from oxidative damage to cellular and inter-cellular signaling / L.O. Klotz, X. Hou, C. Jacob // *Molecules*. – 2014. – Vol. 19. – P. 14902–14918.
5. Генегга А. Б. Особливості впливу нових амінокислотних похідних 1,4-нафтохінону на  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азну Активність зародків в'юна *in vitro* / А. Б. Генегга, С. М. Мандзинець, М. В. Бура, Д.І. Санагурський // *Біологічні Студії / Studia Biologica*. – 2011. – Т. 5., №3. – С. 59–66.
6. Fiske C. H. The Colorimetric Determination of Phosphorus / C. H. Fiske, Subbarow Y. // *J. Biol. Chem.* – 1925. – Vol. 66. – P. 375–400.
7. Lowry O. H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.G. Rosenbrough, A.L. Farr, R.C. Randall // *J. Biol. Chem.*– 1951. – 193. – P. 265–275.