



УДК 577.352.522+577.352.53 + 663.579.862

## ВПЛИВ ПОХІДНИХ ТІОСУЛЬФОКИСЛОТ НА ТРАНСПОРТНІ СИСТЕМИ ЗАРОДКІВ ХОЛОДНОКРОВНИХ

<sup>1</sup>Яремкевич О.С., <sup>2</sup>Бура М.В., <sup>2</sup>Мандзинець С.М., <sup>1</sup>Лубенець В.І., <sup>2</sup>Санагурський Д.І., <sup>1</sup>Новіков В.П.

<sup>1</sup>Національний університет «Львівська політехніка», кафедра технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології  
e-mail: yaremkevych.os@gmail.com

<sup>2</sup>Львівський національний університет імені Івана Франка, кафедра біофізики та біоінформатики  
e-mail: mcelevych@yahoo.com

Надійшла до редакції 25.02.2011

Досліджено вплив новосинтезованих біологічно активних речовин – солей тіосульфокислот – на процеси функціонування іонтранспортних систем зародків в'юна (*Misgurnus fossilis* L.), зокрема, на зміни динаміки мембранного потенціалу та ферментативну активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази плазматичних мембран зародків у ранньому періоді ембріогенезу. Проведена оцінка впливу цих речовин і показані порушення електрогенезу плазматичної мембрани. Це пов'язано зі зміною іонної проникливості мембрани, що може призводити до модуляції активності мембранозалежних ферментів, зокрема,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази.

**Ключові слова:** тіосульфони, мембранний потенціал, плазматична мембрана, зародки в'юна,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза.

### ВСТУП

Найбільшої уваги у дослідженнях біологічної активності тіосульфонатів приділялось вивченню їх антимікробної дії [1-7] та встановленню механізму цієї дії в біологічних об'єктах [8-9]. При вивченні механізмів дії на клітину будь-яких речовин, в першу чергу необхідно виявити їх вплив на плазматичну мембрану, а саме, на процеси, які підтримують її функціонування. До таких процесів, зокрема, належить функціонування іонтранспортних систем, які задіяні у підтриманні трансмембранного мембранного потенціалу.

Тіосульфони проявляють високу реакційну здатність, характеризуються широким спектром біологічної дії, мають вищу антимікробну активність і є стабільнішими, ніж їх близький аналог природний антибіотик аліцин (*Allium sativum* L.) [6]. Високий індекс і широкий спектр антимікробної активності тіосульфонатів, їх стабільність та низька токсичність дозволили запропонувати ці сполуки як лікарські субстанції [10-12]. Зокрема, етилтіосульфонілат (есулан) у вигляді 1% мазі запропонований як засіб лікування епідермофітії стоп, який завдяки кератолітичним властивостям забезпечує стабільний лікувальний ефект. Деякі з цих сполук проявляють антилейкозну активність, близьку до препарату «Мілеран» [6, 13-14]. Тіосульфони будучи джерелом сульфуру, беруть участь в детоксикації канцерогенів та стимулюють неспецифічний імунітет [15].

Встановлено, що амініотіосульфони [16], зокрема, феніловий естер метантіосульфокислоти має селективну протипухлинну дію і може конкурувати з іншими антилейкемічними засобами [16-17].

Тому, подальше дослідження тіосульфонатів є актуальним та перспективним, і дасть можливість поглибленого розуміння механізмів біологічного дії цих речовин, що матиме вагоме значення для фармакології і медицини.

Мета роботи полягала у вивченні впливу солей тіосульфокислот різної структури у концентрації  $10^{-3}$  г/мл, синтезованих на кафедрі ТБСФБ НУ «Львівська політехніка», а саме, метилтіосульфонату калію, етилтіосульфонату калію, параамінобензентіосульфонату калію та натрію, на біофізичні параметри плазматичних мембран зародків прісноводної кісткової риби в'юна *Misgurnus fossilis* L. в період раннього ембріогенезу, зокрема, на трансмембранний потенціал (ТМП) та активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази впродовж перших поділів бластомерів.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Овуляцію в'юна стимулювали внутрішньом'язовим введенням самкам хоріогонічного гонадотропіну (500 од.). Ікру одержували через 36 год. після стимуляції та запліднювали суспензією спермій за Нейфахом [18]. Сім'яники отримували після декапітації та розтину черевної порожнини самців. Через 5-10 хв після запліднення зиготи відмивали й

інкубували у фізіологічному розчині Гольфретера при температурі 20-22°C. Стадії розвитку контролювали візуально під бінокулярним мікроскопом МБС-9.

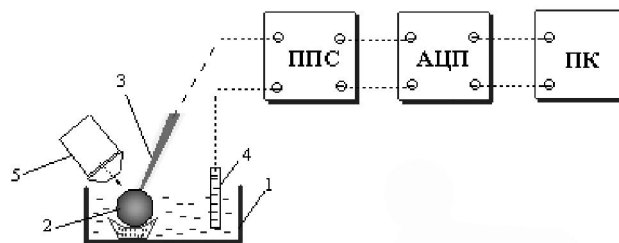
Для проведення досліджень ТМП були обрані водорозчинні аліфатичні та ароматичні похідні тіосульфокислот з різними функціональними групами: 1) параамінобензентіосульфат калію та натрію; 2) метил- та етилтіосульфат калію у концентрації  $10^{-3}$  М, будова та індивідуальність яких підтверджена методами тонкошарової хроматографії (ТШХ), даними інфрачервоної спектроскопії (ІЧ), протонного ядерногомагнітного резонансу ( $^1\text{H}$ ЯМР) та даними елементного аналізу.

Для визначення активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази зародки в'юна інкубували у досліджуваних розчинах у концентраціях  $10^{-3}$  до  $10^{-8}$  М протягом перших поділів бластомерів, а саме 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) та десятому (1024 бластомери), відповідно.

Мікосомну фракцію мембран зародків в'юна одержували методом диференційного центрифугування у градієнті густини сахарози. Спочатку зародки гомогенізували в буферному розчині, такого складу (ммоль/л): сахароза – 120,0;  $\text{KCl}$  – 130,0;  $\text{MgCl}_2$  – 5,0;  $\text{Tris-HCl}$  – 10,0 (рН 7,4; 4°C). Потім рештки зародкового жовтка осаджували центрифугуванням (10 хв, 1600 g). Збагачену фрагментами плазматичної та ретикулярної мембран надосадову рідину, одержану після 10-хвилинного центрифугування при 10 000 g, зберігали при температурі – 20°C [19].

Активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -активованої,  $\text{Mg}^{2+}$ -залежної аденозинтрифосфатази (КФ 3.6.1.37) клітин на різних стадіях бластуляції визначали за різницею вмісту неорганічного фосфату ( $P_i$ ), утвореного в середовищі інкубації за наявності та відсутності в ньому фрагментів мембран, а також з врахуванням поправки на вміст у мембранному препараті ендogenous  $P_i$  і виражали у мкмоль/год. на 1 мг білка. Кількість продукту реакції  $P_i$  визначали модифікованим методом Фіске-Суббароу [20], а вміст білка в мембранному препараті – методом Лоурі [21].

Усі виміри електрофізіологічних параметрів зародкових клітин протягом перших дроблень і бластуляції при мінімальному пошкодженні морфологічної та функціональної цілісності була використана установка для електрофізіологічних досліджень (рис.1).



**Рис. 1.** Установка для електрофізіологічних досліджень: 1 – камера з досліджуваною речовиною; 2 – зародок; 3 – скляний пірексовий мікроелектрод; 4 – індиферентний електрод; 5 – мікроскоп; ППС – підсилювач постійного струму; АЦП – аналого-цифровий перетворювач; ПК – персональний комп'ютер.

Для проведення досліджень зародок в'юна фіксували у сферичній лунці камери з досліджуваною речовиною (1, рис.1), розмір якої становив менше діаметра клітини, що забезпечувало достатньо надійне його утримання. За допомогою механічних мікроманіпуляторів, контролюючи під мікроскопом МБС-9, вводили пірексовий мікроелектрод, заповнений 3М розчином  $\text{KCl}$ , опір якого перевищував 10 МОм. Для безпомилкового визначення мембранного потенціалу спокою потенціометричним методом контролювались та відбирались ті мікроелектроди, у яких потенціал кінчика не перевищував 5 мВ. Перед та після проведення дослідження між електродом порівняння та вимірювальним електродом протягом 20-30хв у дослідних розчинах встановлювалась та фіксувалась напруга, яка приймалась за "нуль". Після проведення експерименту для дійсного значення потенціалу враховувався "дрейф нуля".

Реєстрацію рівня мембранного потенціалу (МП) проводили за допомогою монолітного операційного підсилювача типу ОРА128 (рис. 2), в якому використовується особлива геометрія діелектрично ізолюваних польових транзисторів, що забезпечує вищі параметри ніж в гібридних операційних підсилювачах.

Сигнал з виходу підсилювача подається на вхід аналого-цифрового перетворювача (АЦП) (рис. 3). В даному випадку використовується АЦП фірми МАХІМ типу МАХ1243. Це десятирозрядний АЦП, який забезпечує похибку перетворення не більшу як 0,3% (відносна похибка, диференціальна нелінійність, похибка зміщення, похибка внутрішнього підсилювача).

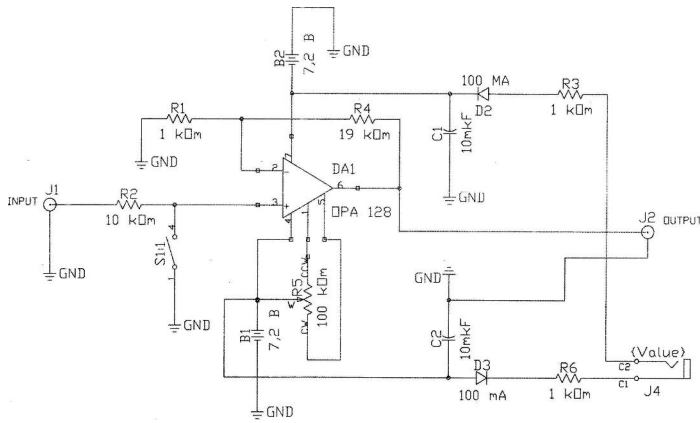


Рис. 2. Схема підсилювача

Напруга живлення +5 В. Нам необхідно досліджувати біопотенціали, що змінюються в діапазоні  $\pm 100$  мВ. При коефіцієнті підсилення підсилювача біопотенціалів – 20, напруга на вході АЦП змінюватиметься в діапазоні  $\pm 2$  В. Даний АЦП може перетворювати вхідну напругу від 0 до + оптимальних U.

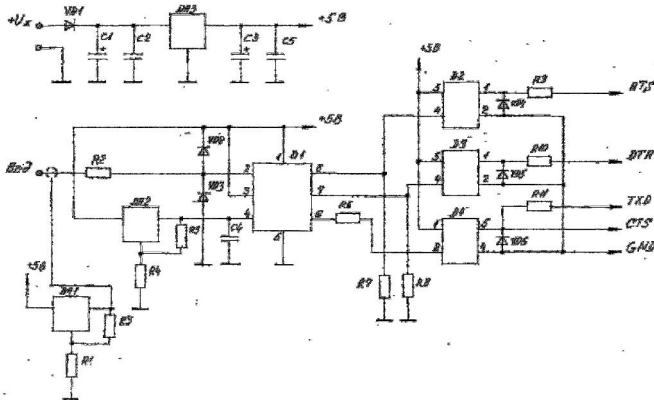


Рис.3. Схема аналого-цифрового перетворювача

Для роботи з вхідним сигналом в діапазоні  $\pm 2$  В застосуємо зміщення потенціалу вхідного роз'єму на +2 В і вибираємо опорну напругу +4 В. АЦП під'єднаний до комп'ютера через послідовний порт. Сигнали від АЦП до комп'ютера і від комп'ютера до АЦП передаються через опторозв'язки, що зменшує вплив роботи комп'ютера на роботу підсилювача біопотенціалів.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Під час неперервної реєстрації МП зародків в розчині Гольтфретера (контроль) спостерігались періодичні зміни його рівня, які були синхронні з циклами клітинного поділу (рис. 4, 5, криві 3). Гіперполяризація мембрани зародків в'юна припадала на інтерфазу клітинного циклу, деполяризація - на мітоз [21]. Максимальне значення МП досягалося у прометафазі. У цей час під мікроскопом добре видно початок закладки борозни наступного поділу. Період коливань МП в контролі протягом цього часу дроблення blastomerів є приблизно однаковою величиною і складає 31 хв, що відповідає тривалості

клітинного циклу. Зменшення амплітуди та частоти коливань трансмембранного потенціалу супроводжується сповільненням розвитку зародків [22], яке підтверджувалось морфологічним аналізом личинок в'юна. Динаміка МП, як вказують автори [23], істотно змінюється внаслідок впливу зовнішніх факторів – фізичних та хімічних, і є чутливим показником гомеостазу клітини, що спонукало нас дослідити вплив похідних тіосульфокислот на зміни МП.

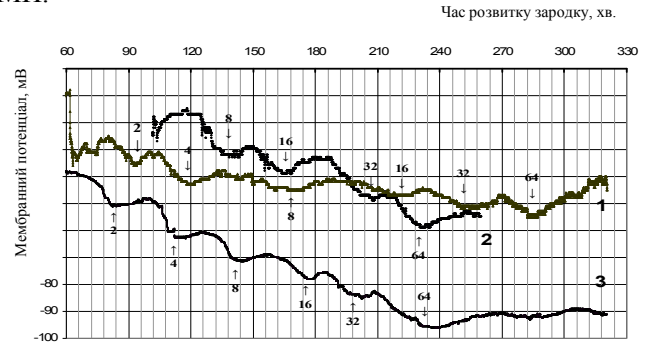


Рис. 4. Вплив параамінобензентіосульфату натрію (1) та параамінобензентіосульфату калію (2) у концентрації  $4 \cdot 10^{-3}$  М на ТМП в ранньому розвитку зародків в'юна у порівнянні з контролем (3)

У результаті проведених досліджень виявлено, що під час неперервної реєстрації ТМП зародків в'юна, інкубованих у всіх досліджуваних речовинах (рис. 4 та 5, криві 1, 2) значення періоду та амплітуди коливань мембранного потенціалу зберігались, як і у контрольних, тільки на протязі перших двох поділів. Заслужує уваги те, що за умов дії параамінобензентіосульфату калію не спостерігали достовірних змін у періодах та амплітудах коливань мембранного потенціалу у порівнянні з контролем, які склали в середньому для періоду ( $32,4 \pm 2$  хв.) та амплітуд ( $13 \pm 1,4$  мВ) відповідно (рис. 4, крива 2). На відміну від цього, за дії параамінобензентіосульфату натрію спостерігалось значне достовірне зменшення амплітуди коливань ТМП, яке в середньому становило  $8 \pm 2,2$  мВ (рис. 4, крива 1). Що до значень періоду коливань мембранного потенціалу, які характеризують затримку чи прискорення розвитку, то бачимо, що ці значення зберігались, як і у контрольних, тільки на протязі перших двох поділів (2-4 blastomerів), а у наступних (від 8 blastomerів) спостерігалось помітне порушення строгої періодичності коливань ТМП та зниження абсолютних величин досліджуваного показника у порівнянні з контролем на 28 мВ.

При дослідженні метилтіосульфату калію (рис. 5, крива 1) були виявлені зміни у наростанні максимальних значень рівня ТМП, де спостерігаємо деполяризацію мембрани на 5-6-ому поділі клітини на протигагу з нормальним гіперполяризуючим ефектом у контролі.

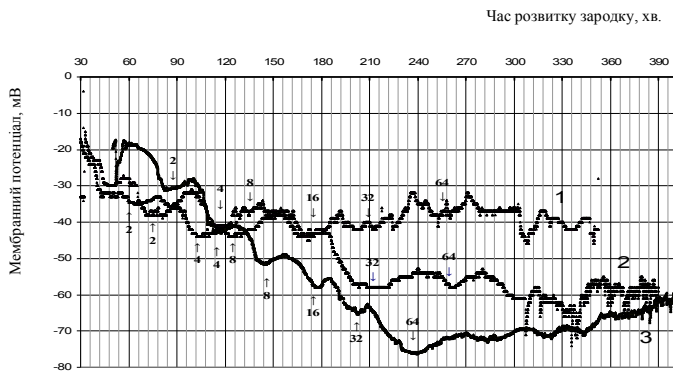


Рис. 5. Вплив метилтіосульфату калію (1), етилтіосульфату калію (2) у концентрації  $4 \cdot 10^{-3}$  М на ТМП в ранньому розвитку зародків в'юна у порівнянні з контролем (3)

За умов дії етилтіосульфату калію (рис. 5, крива 2) також спостерігаємо аперіодичні та асинхронні процеси, хоча наростання максимальних значень дещо більше наближаються до контрольних, становлять ( $-48$  мВ) та досягаються не на VI, а на VIII поділі бластомерів.

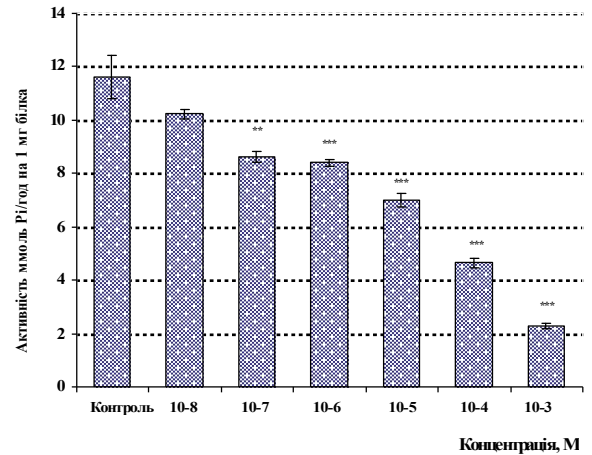
Отже, результати дослідження ТМП показали, що за дії похідних тіосульфокислот відбувається порушення електрогенезу плазматичної мембрани, що свідчить про зміни її іонної проникливості. Ці зміни можуть призводити до модуляції активності ферментів, зокрема,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази, яка відіграє важливу роль у підтриманні рівня ТМП.

Це твердження підтверджують результати дослідження активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази *in vitro* зародків за умов впливу калієвих солей метилтіосульфату та параамінобензентіосульфату упродовж 6 годин розвитку (рис. 6-9). У ході проведених досліджень активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази встановлено, що дія досліджуваних тіосульфатів у концентраціях  $10^{-3}$ – $10^{-8}$  М упродовж 6 годин розвитку зародків веде до виражених змін активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази зародків у порівнянні з контролем.

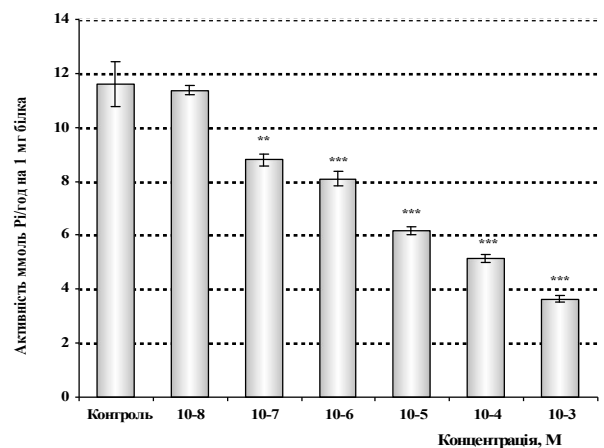
Встановлено, що дія вищевказаних тіосульфатів у високих концентраціях призводить до зниження активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази зародків на стадії розвитку 2 бластомерів у порівнянні з контролем (рис. 6). Слід зазначити, що найбільш виражена інгібувальна дія характерна для метилтіосульфату калію у концентрації  $10^{-3}$  М, за таких умов відмічено достовірне зниження активності ферменту на  $80,4 \pm 4,1$  % у порівнянні з контролем. Тоді як за дії параамінобензентіосульфату калію у концентрації  $10^{-3}$  М такого вираженого зниження активності ферменту не виявлено ( $60,6 \pm 2,6$  %). Поступове зниження концентрації досліджуваних тіосульфатів у середовищі інкубації призводило до вираженого зростання активності ферменту.

Слід зазначити, що як за дії метилтіосульфату калію, так і за дії параамінобензентіосульфату

калію у концентраціях  $10^{-8}$  М спостерігали недостовірне зниження активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази зародків у порівнянні з контролем, тобто змін активності мембранного ферменту зародків не виявлено.



А

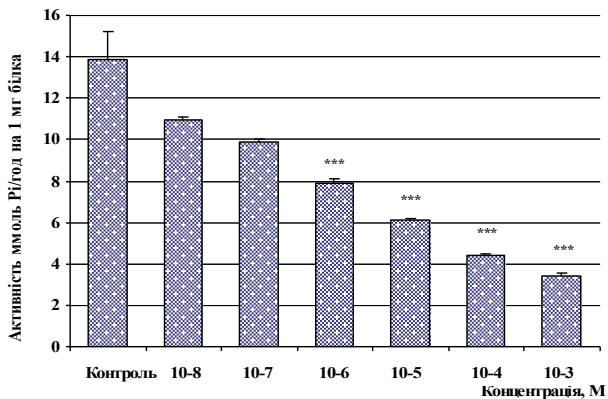


Б

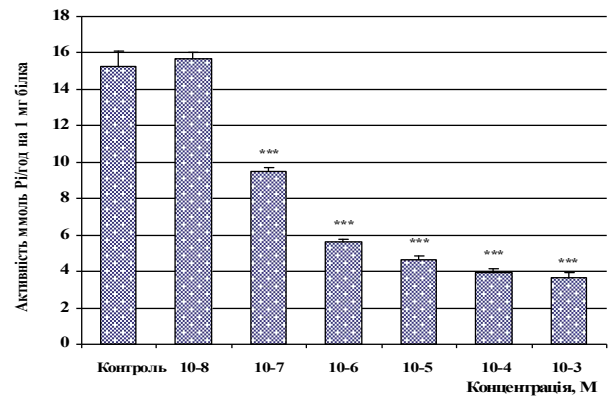
Рис. 6. Зміни активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази зародків за умов впливу тіосульфатів (А-метилтіосульфату калію (МТК), Б – параамінобензентіосульфату калію (АТК)) на стадії розвитку 2-х бластомерів.

Зірівні зміни порівняно із контролем: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ .

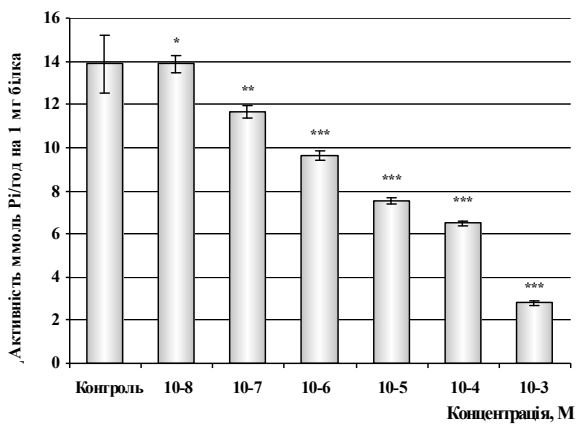
На стадії розвитку 16-ти бластомерів (рис. 7), як і на попередній досліджуваній стадії (2 бластомери), після внесення в середовище інкубації тіосульфатів виявлено концентраційну залежність змін активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази зародків у порівнянні з контролем. За умов впливу  $10^{-3}$  М метилтіосульфату калію виявлено зниження активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази зародків на  $75,2 \pm 2,5$  %, а при дії  $10^{-3}$  М параамінобензентіосульфату калію – на  $79,8 \pm 3,5$  % у порівнянні з контролем.



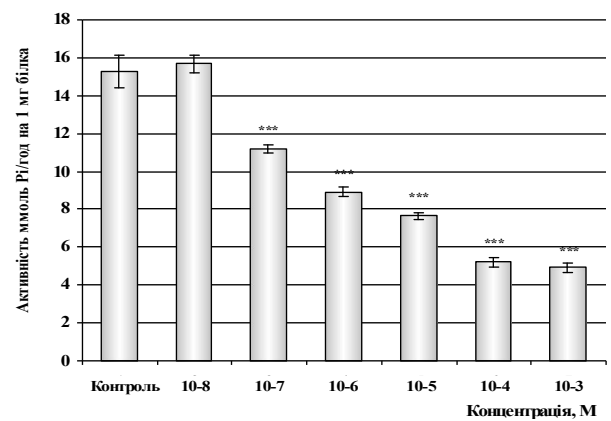
А



А



Б



Б

**Рис. 7.** Зміни активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази зародків за умов впливу тіосульфатів (А – МТК, Б – АТК) на стадії розвитку 16 бластомерів.

**Рис. 8.** Зміни активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази зародків за умов впливу тіосульфатів (А – МТК, Б – АТК) на стадії розвитку 64 бластомерів.

На стадії розвитку 64 бластомери (рис. 8) спостерігали найбільш виражене зниження активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази мембран зародків за умов впливу метилтіосульфату калію у концентрації  $10^{-3}$ – $10^{-6}$  М. При цьому активність ензиму становила в середньому  $4,5 \pm 0,2$  мкмоль Рі/год на 1 мг білка, що складає 30 % активності у контролі. Тоді як дія параамінобензентіосульфату калію лише у концентраціях  $10^{-3}$ – $10^{-4}$  М призводила до зниження активності ферменту більше ніж на  $65,8 \pm 3,2\%$  у порівнянні з контролем.

При зниженні концентрації похідних тіосульфокислот до  $10^{-8}$  М виявлено, що дія метилтіосульфату та параамінобензентіосульфату калію на досліджуваній стадії розвитку призводила до зростання активності ферменту у порівнянні з контролем в середньому на  $2,6 \pm 0,1\%$ , тобто значення  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазної активності за таких умов не відрізнялася від контролю.

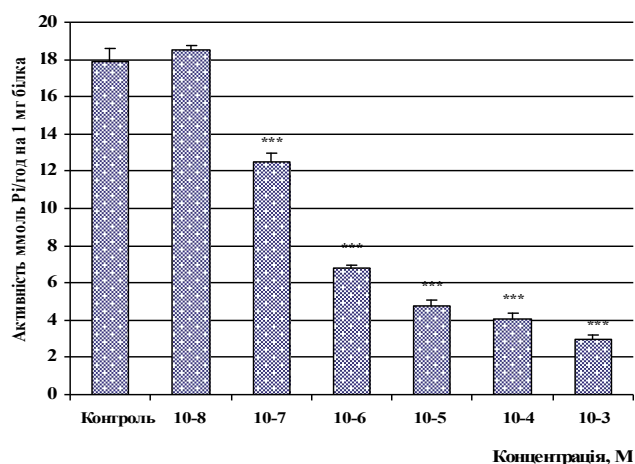
Упродовж п'яти годин розвитку (стадія 8-го поділу бластомерів) оубайнчутлива АТФазна активність плазматичних мембран зародків у контролі зростала, досягала максимального значення і становила  $17,9 \pm 0,7$  мкмоль Рі/год на 1 мг білка (рис. 9). На цій стадії розвитку внесення в середовище інкубації досліджуваних тіосульфатів у вищезазначених концентраціях також призводило до дозозалежних змін

активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази зародків, як і на попередніх стадіях розвитку.

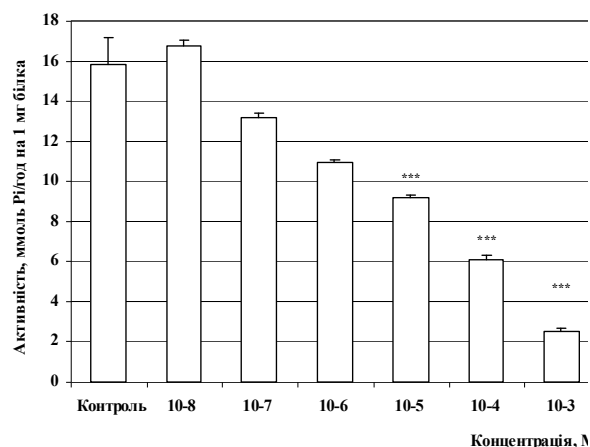
За дії тіосульфатів у високих концентраціях ( $10^{-3}$ – $10^{-4}$  М) активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази зародків не перевищувала  $3,9 \pm 0,3$  та  $5,0 \pm 0,2$  мкмоль Рі/год на 1 мг білка відповідно, що складає 22 та 33% активності у контролі. При подальшому зменшенні концентрації біологічно активних речовин у середовищі інкубації (метилтіосульфату калію та параамінобензентіосульфату калію) до  $10^{-8}$  М, виявлено виражене, однак недостовірне, зростання активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази зародків на  $3,4 \pm 0,1\%$  та  $12,8 \pm 0,3\%$  у порівнянні з контролем.

На 10-й стадії поділу бластомерів також спостерігаємо стабільне достовірне зниження оубайнчутливої АТФазної активності зародків за дії досліджуваних речовин за високих концентрацій ( $10^{-3}$ – $10^{-6}$  М) для метилтіосульфату калію на  $84,3 \pm 31,1\%$  та для параамінобензентіосульфату калію на  $85,12 \pm 27,6\%$  відповідно у порівнянні з контролем (рис. 10). За дії обидвох речовин у низьких концентраціях ( $10^{-8}$  М) активність ферменту відновлюється повністю та перевищує контрольну на  $5,83\%$  для метилтіосульфату калію та на  $18,83\%$  для параамінобензентіосульфату калію.

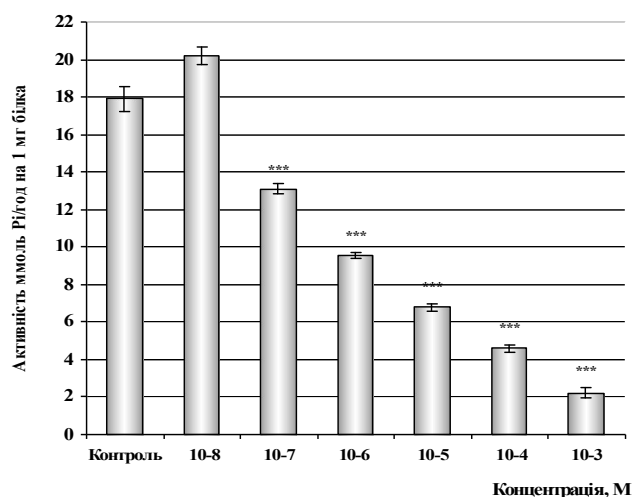




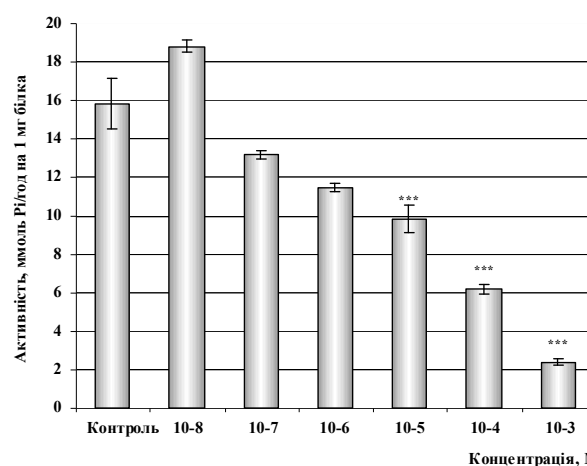
А



А



Б



Б

**Рис. 9.** Зміни активності Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФази зародків за умов впливу тіосульфатів (А – МТК, Б – АТК) на 8-й стадії поділу бластомерів.

**Рис. 10.** Зміни активності Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФази зародків за умов впливу тіосульфатів (А- МТК, Б – АТК) на 10-й стадії поділу бластомерів.

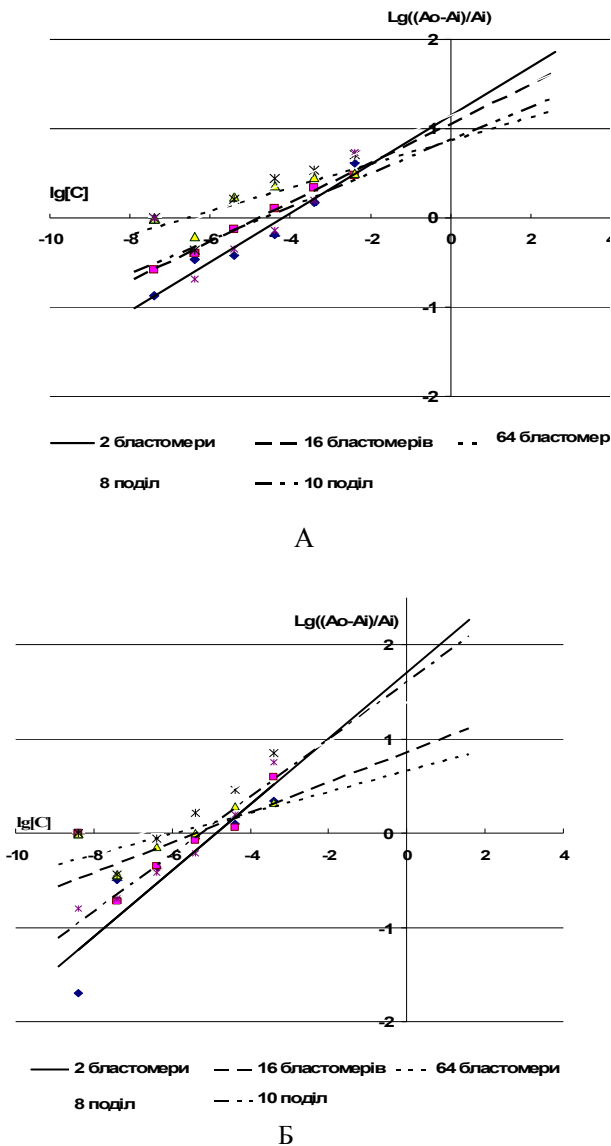
Отже, встановлено, що *in vitro* дія метилтіосульфату та параамінобензентіосульфату калію у високих концентраціях ( $10^{-3}$ – $10^{-5}$  М) призводить до достовірного та вираженого зниження активності Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФази зародків в'юна на всіх стадіях їх розвитку у порівнянні з контролем в межах від 60% до 80%.

Поступове зниження концентрації тіосульфатів у середовищі інкубації призводило до відновлення активності ферменту. За низьких концентрацій ( $10^{-8}$  М) у порівнянні з контролем спостерігається незначне зниження (2 і 16 бластомери), а на 6-му, 8-му та 10-му поділі бластомерів зростання активності Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФази.

Для оцінки характеристики варіабельності змін активності Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФази зародків в'юна за умов дії метилтіосульфату калію (рис. 11, А) та параамінобензентіосульфату калію (рис. 11, Б) визначено константи їх напівінгібування ( $I_{50}$ ), шляхом лінеаризації одержаних кривих доза-ефект у логарифмічних координатах Хілла [24].

Найменший ступінь інгібування активності досліджуваного мембранного ферменту виявлено для метилтіосульфату калію на стадіях 2, 16 бластомерів та на 10-му поділі бластомерів. Тоді, як для параамінобензентіосульфату калію характерна менша інгібувальна дія, тобто Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФаза зародків упродовж досліджувальних стадій розвитку володіє нижчою чутливістю, ніж до метилтіосульфату калію. Це свідчить про стійкість зародків до впливу біологічно активних речовин саме на цих стадіях їх розвитку. Ймовірно, така стійкість зумовлена здатністю похідних тіосульфокислот утворювати міцні комплекси з молекулами інших речовин, що утруднює їх проникнення через клітинну мембрану.

Найбільший інгібувальний вплив похідних тіосульфокислот виявлено на стадії розвитку 6-го та 8-го поділу для метилтіосульфату калію та 8-го поділу бластомерів для параамінобензентіосульфату калію. Ці стадії розвитку зародків вважаються найбільш чутливими до дії будь-яких зовнішніх чинників, тому необхідне невелике введення діючої



**Рис. 11.** Лінеаризація концентраційної залежності інгібування  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази зародків в'юна упродовж раннього ембріогенезу метилтіосульфонатом калію (А) та параамінобензентіосульфонатом калію (Б) у системі координат Хілла.

Значення констант напівінгібування  $I_{50}$  (М)  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази зародків в'юна похідних тіосульфокислот на різних стадіях розвитку

Похідні тіосульфокислот	Стадії розвитку зародків в'юна				
	2 бластомери	16 бластомерів	64 бластомери	8 поділ	10 поділ
Метилтіосульфонат калію	$6,28 \times 10^{-5}$	$1,72 \times 10^{-5}$	$2,68 \times 10^{-7}$	$5,16 \times 10^{-7}$	$2,09 \times 10^{-5}$
Параамінобензентіосульфонат калію	$1,36 \times 10^{-5}$	$4,15 \times 10^{-6}$	$1,17 \times 10^{-6}$	$1,8 \times 10^{-7}$	$5,55 \times 10^{-6}$

речовини в середовищі інкубації, щоб знизити активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази плазматичних мембран зародків на 50%. Це пояснюється проходженням на даному етапі розвитку в зародкових клітинах біосинтетичних процесів, які потребують перерозподілу пулів макроергів.

## ВИСНОВКИ

У результаті проведених досліджень встановлено, що дія тіосульфатів *in vitro* веде до достовірних дозозалежних змін активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази зародків в'юна: найбільш інгібувальний вплив виявлено за наявності в середовищі інкубації біологічно активних речовин у концентраціях  $10^{-3}$ – $10^{-5}$  М, тоді як додавання до середовища тіосульфатів у малих концентраціях (порядок  $10^{-8}$  М) веде до підвищення активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази зародків у порівнянні з контролем.

При дослідженні ТМП зародкових клітин за дії похідних тіосульфокислот концентрацією  $10^{-3}$  г/мл прослідковуються зміни в амплітуді, періоді коливань в порівнянні з контролем та спостерігається очевидний зсув у наростанні максимальних значень рівня ТМП, що свідчить про порушення іонних транспортних систем у мембранах, які лежать в основі всіх коливань потенціалу і відіграють важливу роль під час генерації електричних потенціалів у клітині. Це пов'язано з інгібуванням біосинтетичних процесів та зміни іонної проникливості плазматичної мембрани за дії досліджуваних речовин у високих концентраціях, що і призводить до зниження активності мембранного ферменту ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази), яка відіграє важливу роль у підтриманні рівня ТМП. На нашу думку, тіосульфати у низьких концентраціях легко метаболізуються та призводять до підвищення інтенсивності обмінних процесів у зародках, які в цей час інтенсивно розвиваються та ростуть. Саме цим можна пояснити відновлення активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази у наших дослідженнях.

(Робота виконана за підтримки Державного фонду фундаментальних досліджень, проект №Ф.25.5/075)

## Література

- Болдырев Б.Г., Билозор Т.К., Влязю Р.И. [и др.]. Противомикробная и физиологическая активность эфирных тиосульфокислот и возможные пути их практического использования в различных областях народного хозяйства // Биоповреждения в промышленности. – Горький: ГГУ, 1983. – С. 44-52.
- Стадницька Н.С., Лубенець В. І., Новіков В. П. [та ін.]. Синтез та біологічна активність S-алкіл(8-хінолін)тіосульфатів // Физиологично активні речовини. – 2000. – Т. 30, № 2. – С. 27-29.
- Баранович Д.Б., Комаровська О.З., Лубенець В.І., Новіков В.П. Синтез і біологічна активність S-алкілбензолтіосульфатів // Физиологично активні речовини. – 2001. – № 2 (30). – С. 33-36.
- Айзенман Б.Е., Скоробагатько Т.И., Болдырев Б.Г., Аристархова Л.Н. О противомикробной активности эфирных тиосульфокислот производных циклопентана и циклогексана // В сб.: Физиологически активные вещества. – К.: Наукова думка, 1975. – Вып. 7. – С.113-115.

5. Комаровська О.З., Стадницька Н.С., Баранович Д.Б. [та ін.]. Фунгібактеріальна активність деяких тиосульфоестерів // Вісник НУ "Львівська політехніка". Хімія, технологія речовин та їх застосування. – 2001. – № 426. – С. 137-140.
6. Лубенець В.І., Новіков В.П., Луژهцька-Швед О.В. [та ін.]. Хімія і застосування ефірів тиосульфокислот // Вісник ДУ "Львівська політехніка". "Хімія, технологія речовин та їх застосування". – 1997. – № 332. – С. 215-219.
7. Сопрунюк Н.Г., Яницкая Л.В., Лубенець В.И., Швед О.В. Защитные свойства тиосульфонов // Защита металлов. – 1996. – Т. 32, № 5. – С. 534-536.
8. Block S.S., Weidner J.P., Walsh A. Sulfur disinfectants: antimicrobial activity of thiosulfonates // J. Org. Chem. – 1964. – N3. – P. 117-121.
9. Толстиков В.В., Козлова Н.В., Ярцева И.В., Приображенская М.Н. «Химерные антибиотики» – даунорубини и его аналоги N-ацелированные брунеомицином (стрептонигрином) // Биоорг. Химия. – 1989. – Т.15, № 2. – С. 227-280.
10. А.с. №198538 СССР. Способ лечения грибковых заболеваний кожи "Эсула-ном" / Болдырев Б.Г., Першин Г.М., Милованова С.Н., Пожарская Л.М., Королева М.А., Колмакова Л.Е. (СССР) // Б.И., 1967. – № 14.
11. Болдырев Б.Г., Колмакова Л.Е., Першин Г.М. [и др.]. Эсулан – новое средство для лечения эпидермофитии стоп // Хим. фарм. журн. – 1968. – Т. 2, № 4. – С.12-16.
12. 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 (Франция). – № 8417286; Заявлен. 13.11.84; Опубл. 16.05.86 // РЖХ. 90138П.
13. Водолаская Н.А., Хомченковский Б.И., Болдырев Б.Г., Билозор Т.К. О противоопухолевой активности некоторых эфиров тиосульфокислот, в том числе – тиааналогов и гомологов милерана // ДАН СССР. – 1966. – Т. 170, № 5. – С. 1081-1083.
14. Хомченковский Е.И., Болдырев Б.Г., Билозор Т.К. О противолейкозной активности, токсичности и действии на кровотообразование эфиров тиосульфокислот – тиааналогов милерана // ДАН СССР. – 1960. – Т. 170, № 6. – С. 1453-1455.
15. Maher J. The Physiological Functions of Phytonutrients, Part III // Dynamic Chiropractic. – 2003. – V. 21. – Issue 26.
16. Markley L., Dunbar J. Aminothiosulfonates // J. Org. Chem. – 1972. – V. 37, N15. – P. 2512-2514.
17. Hayashi S., Furukawa M., Yamamoto J., Hamamura K. The antitumor properties Thiosulfonates // Chem. Pharm. Bull. – 1967. – V.15. – P. 1310-1315.
18. Нейфах А.А. Молекулярная биология процессов развития. – М.: Наука, 1977. – 311с.
19. Луцук М.Д., Кусень С.И., Лук'яненко А.В. Очистка и частичная характеристика плазматических мембран клеток зародышей вьюна // Онтогенез. – 1986. – № 17. – С. 314-321.
20. Fiske C.H., SubbaRow Y. The colorimetric determination of phosphorus // J. Biol. Chem. – 1925. – V. 66. – P. 375 – 400.
21. Lowry O.H., Rosebrough N.G., Farr A.L., Randall R.C. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – 193, N1. – P.265-275.
22. Гойда О.А. Биофизические аспекты раннего онтогенеза животных. – К.: Наук. думка, 1993. – 224 с.
23. Санагурский Д.І. Трансмембранный биоэлектрогенез: модифікуючі впливи на нього, структурно-функціональний аналіз і моделі: Автореф. дис. д-ра біол. наук: К., 2003.- 39 с.
24. Санагурский Д.І. Трансмембранный потенциал в раннем эмбриогенезе вьюна (*Misgurnus fossilis* L.) при гормональных воздействиях: Автореф. дис канд. биол. наук: К., 1983. – 23 с.
25. Келети Т. Основы ферментативной кинетики // Пер. с англ. – М.: Мир, 1990. – 350 с.

## ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ТИОСУЛЬФОКИСЛОТ НА ТРАНСПОРТНЫЕ СИСТЕМЫ ЗАРОДЫШЕЙ ЛАДНОКРОВНЫХ

Яремкевич Е.С., Бура М.В., Мандзынец С.М., Лубенець В.І., Санагурский Д.И., Новіков В.П.

Исследовано влияние новосинтезированных биологически активных веществ – солей тиосульфокислот – на процессы ункционирования ионтранспортных систем зародышей вьюна (*Misgurnus fossilis* L.), в частности на изменения динамики мембранного потенциала и ферментативную активность  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы плазматических мембран зародышей в раннем эриде их развития. Проведена оценка влияния этих веществ и показано нарушение электрогенеза плазматической мембраны. Это связано с изменением ионной проницаемости мембраны, что может приводить к модуляции активности ферментов, в частности,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы.

**лючевые слова:** тиосульфонаты, мембранный потенциал, плазматическая мембрана, зародыши вьюна,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза.

## THE INFLUENCE OF THIOSULFONATES ON TRANSPORT SYSTEMS OF EMBRYOS OF COLD-BLOODED ANIMALS

Yaremkevych H., Bura M., Mandzynets S., Lubenec V., Sanagurskyi D., Novikov V.

The influence of newly synthesized biologically active substances – salts of thiosulfonic acids – on the processes of functioning of ion-transport systems of loach embryos (*Misgurnus fossilis* L.) was studied. Namely their effect on the changes of the dynamics of membrane potential and enzymatic activity of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase of plasma membranes in the early period of embryo development was investigated. The estimation of influence of these substances was conducted and distortion of plasma membrane electrogenesis was shown. These phenomena are resulted by the changes in the ion permeability of membrane which may lead to modulation of enzyme activity, particularly,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase.

**Key words:** thiosulfonates, membrane potential, plasma membrane, loach embryos,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase.