

УДК: 577.35:577.25.5+577.17.02

ВПЛИВ 4-ТОЛУЕНТІОСУЛЬФОНАТУ КАЛІЮ НА МЕМБРАННИЙ ПОТЕНЦІАЛ ТА АТР-азну АКТИВНІСТЬ ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ ЗАРОДКІВ В'ЮНА

О. С. ЯРЕМКЕВИЧ¹, М. В. БУРА², С. М. МАНДЗИНЕЦЬ², О. Р. КУЛАЧКОВСЬКИЙ²,
В. І. ЛУБЕНЕЦЬ¹, Д. І. САНАГУРСЬКИЙ², В. П. НОВІКОВ¹

¹Національний університет «Львівська політехніка», Україна;
e-mail: ilenkova@polynet.lviv.ua;

²Львівський національний університет імені Івана Франка, Україна;
e-mail: mceleuych@yahoo.com

Досліджено вплив новосинтезованої біологічно активної речовини 4-толуентіосульфонату калію ($4 \cdot 10^{-5}$ М) на зміни електрофізіологічних параметрів зародків в'юна (*Misgurnus fossilis* L.): динаміку трансмембранного потенціалу (ТМП) плазматичних мембран та активність мембранного ензиму (Na^+, K^+ -АТР-ази) під час періоду синхронного дроблення бластомерів у ранньому ембріогенезі. Дано оцінку впливу цієї речовини та показані аперіодичні зміни рівня ТМП, які не збігаються з мітотичними циклами синхронного поділу бластомерів порівняно з контролем. Показано зменшення амплітуди у кожному періоді в середньому на 7–12 мВ та зменшення наростання максимальних значень коливань ТМП на 39 мВ порівняно з контролем. Це пов'язано з інгібуванням біосинтетичних процесів на перших годинах розвитку, що призводить до зниження активності Na^+, K^+ -АТР-ази на $75,5 \pm 4,1\%$ та $78,4 \pm 10,4\%$ відповідно як за дії високої ($4 \cdot 10^{-3}$ М), так і низької ($4 \cdot 10^{-9}$ М) концентрацій досліджуваної речовини з подальшим відновленням його активності до рівня контролю при низькій концентрації.

Ключові слова: тіосульфонати, трансмембранний потенціал, Na^+, K^+ -АТР-аза, зародки в'юна, плазматичні мембрани, гіалоплазма, бластомери, мітохондрії, гранулярний ендоплазматичний ретикулум.

В останні роки привертають увагу дослідження, спрямовані на створення синтетичних аналогів природних біорегуляторів, які поєднують у собі декілька фармакофорів та є одним із перспективних напрямів у пошуку лікарських препаратів [1–3]. Так, введення залишків сахаридів у молекули біоцидів знижувало токсичність та покращувало їхні властивості, при цьому характер біоцидної дії сахаридовмісних тіосульфонатів визначався положенням замісника в молекулі. Встановлено, що сполука, яка мала біля аміногрупи залишок цукрів як замісник, виявляла фунгіцидну активність стосовно культур грибів *Candida tenuis* і *Aspergillus niger*, а речовина із сахаридним замісником у сполуці (біля атома сульфуру) була активною відносно грампозитивних культур *Staphylococcus aureus* за повної відсутності дії на грибову флору у досліджуваних концентраціях [4].

Синтезовані тіосульфонати є близькими аналогами природного антибіотика аліцину. Вони виявляють сильні лікувальні властивості та є більш стійкими на противагу аліцину. Під час біотрансформаційних процесів тіосульфонати перетворюються на інші сполу-

ки сульфуру, зокрема аліцин, діалісульфіди, вінільні сульфуровмісні похідні, S-алілцистеїн та D-алілмеркаптоцистеїн. Так, S-алілцистеїн запобігав тромбоутворенню за рахунок інгібування агрегації та адгезії тромбоцитів, що суттєво впливало на перебіг серцево-судинних патологій [5]. Відомо, що діалісульфіди (DAS) та діалілдисульфід (DADS) в досліджах *in vivo* виявляють гіполіпідемічні ефекти [6], які зумовлені пригніченням діяльності 3-гідрокси-3-метилглутарил-CoA редуктази (HMGCR) – ключового ензиму синтезу холестеролу. Показано, що DAS та DADS не тільки знижують рівень холестеролу, але й запобігають утворенню ракових клітин [7]. Хоча молекулярні цитотоксичні механізми DAS та DADS не наводяться, відзначається зупинка клітинного циклу у фазі G2/M шляхом ініціації апоптозу та активації протеїнів-супресорів пухлин. Аліцин запобігає утворенню реактивних форм кисню шляхом регулювання II фази детоксикуючих ензимів і підвищує рівень клітинного глутатіону в культивованих ендотеліальних клітинах судин [8]. Сульфурні сполуки спричиняють затримку переважно у фазі G2/M клітинного циклу, стимулюють

мітохондріальний апоптозний шлях, збільшують ацетиляцію гістонів, а також впливають на міжклітинну комунікацію та беруть участь у розвитку загальної резистентності організму [9]. Ароматичні тіосульфонати через пригнічення рецепторів фібриногену GPIIb/IIIa та синтезу тромбоксану A2 ефективно інгібують агрегацію тромбоцитів та виступають як антикоагулянти, що є підґрунтям для створення на їхній основі нових антитромботичних препаратів для запобігання міокардіальних ускладнень та інсульту [10]. Гетероциклічні тіосульфонати, що містять кільця індолу, індоліну, бензоімідазолу і хіноксаліну, одержані науковцями з Мічегана, виявили високу ВІЛ-протеазну активність [11].

Виходячи з вищевказаного, подальше дослідження тіосульфонатів є актуальним та перспективним, оскільки це дасть можливість поглибленого розуміння механізмів біологічної дії цих речовин та покращення їхніх лікувальних властивостей і матиме вагоме значення для фармакології і медицини.

Мета роботи полягала у з'ясуванні впливу 4-толуентіосульфонату калію на трансмембранний потенціал (ТМП), активність Na^+, K^+ -АТФ-ази та ультраструктурні зміни бластомерів зародкових клітин прісноводної кісткової риби в'юна *Misgurnus fossilis* L. у період раннього ембріогенезу.

Матеріали і методи

Овуляцію у самок стимулювали внутрішньом'язовим введенням хоріогонічного гонадотропіну (500 од.). Ікру вилучали через 36 год після стимуляції та запліднювали в чашках Петрі суспензією сперміїв за Нейфахом [12]. Сім'яники одержували 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 °С. Стадії розвитку контролювали візуально за допомогою бінокулярного мікроскопа МБС-9.

Для проведення біохімічних досліджень зародки в'юна інкубували у розчині толуентіосульфонату калію відразу після запліднення, а проби відбирали через 60, 150, 210, 270 і 330 хв після запліднення яйцеклітин, що відповідає першому дробленню зиготи (2 бластомери), четвертому (16 бластомерів), шостому (64 бластомери), восьмому (256 бластомерів) та десятому (1024 бластомери) відповідно.

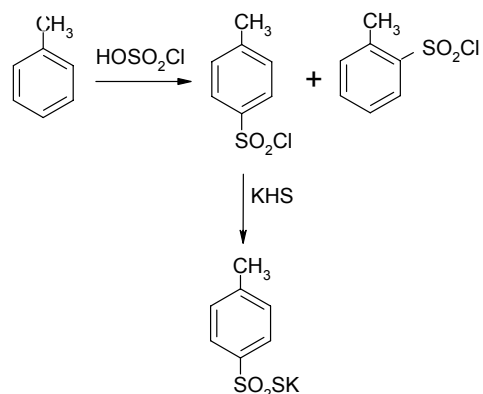
Мікросомну фракцію мембран зародків в'юна одержували методом диференційного центрифугування у градієнті густини саха-

рози [12]. Спочатку зародки гомогенізували в буферному розчині такого складу (ммоль/л): сахароза – 120,0; KCl – 130,0; MgCl_2 – 5,0; трис- HCl – 10,0 (рН 7,4; 4 °С). Потім рештки зародкового жовтка осаджували центрифугуванням (10 хв, 1600 g). Збагачену фрагментами плазматичних та ретикулярних мембран надосадову рідину, одержану після центрифугування при 10 000 g, 10-ти хв, зберігали при температурі -20 °С [13].

Активність Na^+, K^+ -АТФ-ази (3.6.1.37) клітин на різних стадіях бластуляції оцінювали за різницею вмісту неорганічного фосфату (P_i), утвореного в середовищі інкубації за наявності та відсутності в ньому фрагментів мембран, а також з урахуванням поправки на вміст у мембранному препараті ендогенного P_i і виражали в мкмольх P_i /хв на 1 мг протеїну. Кількість продукту реакції P_i тестували модифікованим методом Фіске–Суббароу [14], а вміст протеїну в мембранному препараті методом Лоурі [15].

У дослідженнях використовували реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації хч та зарубіжного виробництва: EGTA, NaN_3 (Merck, Німеччина); убаїн (Fluka, Швейцарія); АТФ (Acros, Бельгія); трис, тапсигаргін (Sigma, США). Вірогідність різниці одержаних показників порівняно з контролем визначали за *t*-критерієм Стьюдента.

Толуентіосульфонат калію синтезували на кафедрі технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології «Львівська політехніка» за схемою [16]:



Вихідною сполукою для синтезу цієї солі був *n*-толуенсульфохлорид, який одержували сульфохлоруванням толуену хлорсульфоновою кислотою та розділенням утвореної суміші *o*- і *n*-толуенсульфохлоридів. Окисно-відновною взаємодією *n*-ізомера з гідросульфідом калію була одержана калієва сіль *n*-толуентіосульфокислоти. Будова та індивідуальність даної речовини підтверджено методами тонкошарової хроматографії, даними інфрачервоної спект-

роскопії, протонного ядерно-магнітного резонансу та даними елементного аналізу.

Зародки в'юна на першій стадії розвитку (2 бластомери) фіксували протягом 1 год у 1,5%-му розчині глутарового альдегіду в 0,2 М кокадилатному буфері (рН 7,2 при 4 °С). Зразки промивали в кокадилатному буфері і додатково фіксували у 2%-му розчині тетраокису осмію в тому самому буфері. Потім відмивали від фіксаторів і обезводнювали у зростаючих концентраціях етилового спирту. Додатково двічі обезводнювали окисом пропілену і поміщали в епоксидну смолу (епон-812) [17]. Зрізи готували на ультрамікромомі УМТП-6 алмазним ножом, контрастували 15 хв 2%-им розчином ураніацетату і додатково цитратом свинцю по Рейнольдсу [18]. Зрізи переглядали і фотографували на електронному трансмісійному мікроскопі ПЕМ-100.

Зміни ТМП протягом перших дроблень і бластуляції за мінімального пошкодження морфологічної та функціональної цілісності зародків реєстрували за допомогою мікроелектродної установки для електрофізіологічних досліджень [19], блок-схему якої наведено на рис. 1.

Для проведення досліджень зародок в'юна фіксували у сферичній лунці камери з досліджуваною речовиною (рис. 1, 1), розмір якої становив менше діаметра клітини, що забезпечувало достатньо надійне його утримання. За допомогою механічних мікроманіпуляторів під мікроскопом вводили пірексовий мікроелектрод, заповнений 3 М розчином КСІ, опір якого перевищував 10 МОм. Для безпомилкового визначення мембранного потенціалу спокою потенціометричним методом контролювали та відбирали ті мікроелектроди, в яких потенціал кінчика не перевищував 5 мВ. Перед та після проведення досліду між електродами порів-

няння та вимірювання протягом 20–30 хв у дослідних розчинах встановлювали напругу, яку приймали за «нуль». Після проведення експерименту для дійсного значення потенціалу враховувався «дрейф нуля».

Результати та обговорення

Відразу після проколювання мікроелектродом плазматичної мембрани зародка в'юна в розчині Гольтфретера реєструється ТМП, амплітуда якого складає $-13,4 \pm 2,3$ мВ (рис. 2, крива 2, $n = 5$) та повільно протягом 15–20 хв збільшується до характерного для цієї стадії рівня – першого поділу (2 бластомери). Період коливань мембранного потенціалу в контролі впродовж всього дроблення бластомерів є приблизно однаковою величиною і складає 31 хв, що відповідає тривалості клітинного циклу. Як видно з рис. 2 (діапазон наростання потенціалу від -18 до -76 мВ), зміна ТМП носить коливальний характер: збільшуючись і зменшуючись в кожному мітотичному циклі у разі поступового наростання значень амплітуди на $-10 \div -14$ мВ та досягаючи максимальних значень $-58 \pm 2,8$ мВ ($n = 5$) у шостому поділі (64 бластомери). Фаза наростання рівня ТМП до цього моменту довша, ніж фаза спаду, що притаманно стадії раннього розвитку, коли борозни дроблення меридіальні і завжди перпендикулярні до попередніх. Після шостого поділу характер кривої динаміки ТМП у наступних циклах змінюється: фази наростання і спаду вирівнюються, а максимальне значення зменшується з -58 до -52 мВ. Саме цей період характеризується закладкою латитудинальних борозн (VI поділ), утворенням морули та повною десинхронізацією дроблення (IX та X поділи). Показано, що гіперполяризація мембрани (наростання рівня ТМП) зародків в'юна припадає на інтерфазу клітинного циклу, депольаризація

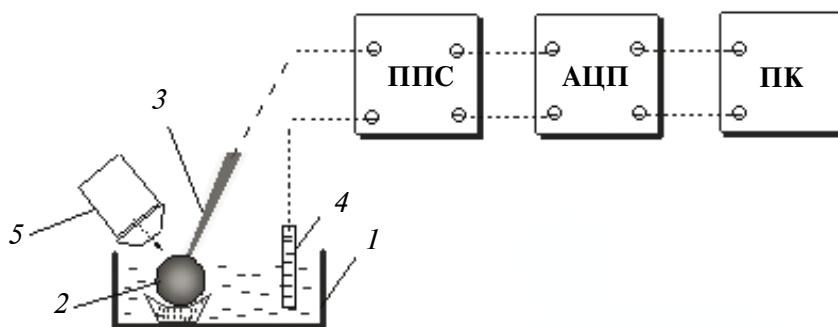


Рис. 1. Блок-схема установки: 1 – камера з досліджуваною речовиною; 2 – зародок; 3 – скляний пірексовий мікроелектрод, заповнений 3 М КСІ; 4 – індиферентний електрод; 5 – мікроскоп; ППС – підсилювач постійного струму; АЦП – аналого-цифровий перетворювач; ПК – персональний комп'ютер

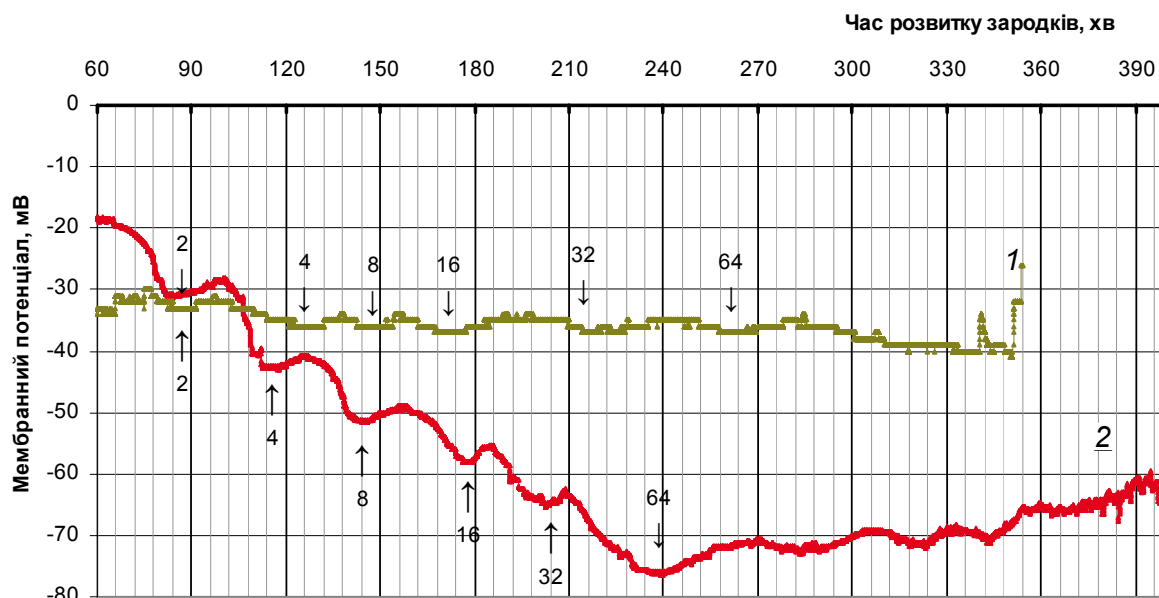


Рис. 2. Вплив толентіосульфонату калію ($4 \cdot 10^{-5}$ М) (1) на мембранний потенціал у ранньому розвитку зародків в'юна порівняно з контролем (2)

(спад ТМП) – на мітоз, максимальне значення якого було в прометафазі [20].

Динаміка ТМП, як вказують автори [20–22], істотно змінювалась внаслідок впливу зовнішніх факторів – фізичних та хімічних – і була чутливим показником гомеостазу клітини, що і спонукало нас розглянути деякі аспекти впливу хімічних факторів, а саме солей тіосульфокислот на зміни ТМП.

Внаслідок проведених досліджень виявлено, що під час неперервної реєстрації ТМП зародків, інкубованих у середовищі з додаванням досліджуваної речовини, спостерігаються аперіодичні зміни його рівня. Як видно (рис. 2, крива 1), у разі збереження коливань ТМП періоди першого (2 бластомери) та третього (8 бластомерів) поділів становлять 20 хв і за тривалістю не збігаються з мітотичними циклами синхронного поділу бластомерів порівняно з контролем (рис. 2, крива 2). Тоді як другий, четвертий, п'ятий та шостий клітинні поділи, навпаки, характеризуються збільшенням тривалості періоду коливань ТМП до 42, 39, 45 та 40 хв відповідно. Крім того, виявлено зменшення амплітуди у кожному періоді в середньому на $7 \div 12$ мВ та зменшення наростання максимальних значень коливань МП на 39 мВ порівняно з контролем. Такі результати свідчать про порушення електрогенезу клітинних мембран під впливом толентіосульфонату калію та про зміни проникності плазматичної мембрани і транспорту іонів, які можуть міняти активність низки ферментів, у тому числі

Na^+, K^+ -АТФ-ази, а також енергозабезпечення систем клітини і транслокацію катіонів, що й призводить до зниження рівня ТМП.

Для детальнішого розуміння дії толентіосульфонату калію нами проведено дослідження *in vivo* його впливу в концентраціях $4 \cdot 10^{-3}$ та $4 \cdot 10^{-9}$ М на активність мембранної Na^+, K^+ -АТФ-ази зародків упродовж стадій синхронного поділу бластомерів.

Як встановлено під час проведених досліджень *in vivo*, вплив цієї речовини призводить до зниження, у більшості випадків достовірного, активності Na^+, K^+ -АТФ-ази зародків порівняно з контролем (рис. 3). На перших годинах розвитку зародків виявлено вагоме вірогідне зниження активності мембранного ферменту за дії як високої ($4 \cdot 10^{-3}$ М), так і низької ($4 \cdot 10^{-9}$ М) концентрації толентіосульфонату калію на $75,5 \pm 4,1$ та $78,4 \pm 10,4\%$ відповідно.

На стадії 64 бластомерів (VI поділ, 210 хв) спостерігали частково стрімке відновлення активності Na^+, K^+ -АТФ-ази зародків в умовах впливу досліджуваного тіосульфонату у високій концентрації, хоча активність ферменту зародків на цій стадії в середньому на $44,9 \pm 0,8\%$ була зниженою порівняно зі значеннями у контролі, яке становило $0,255 \pm 0,014$ мкмоль P_i /хв на 1 мг протеїну. Однак, за низької концентрації толентіосульфонату калію, виявлено не стрімке, але поступове відновлення активності Na^+, K^+ -АТФ-ази зародків до рівня контролю.

Упродовж наступних годин розвитку (VIII поділ, 270 хв) встановлено поступове

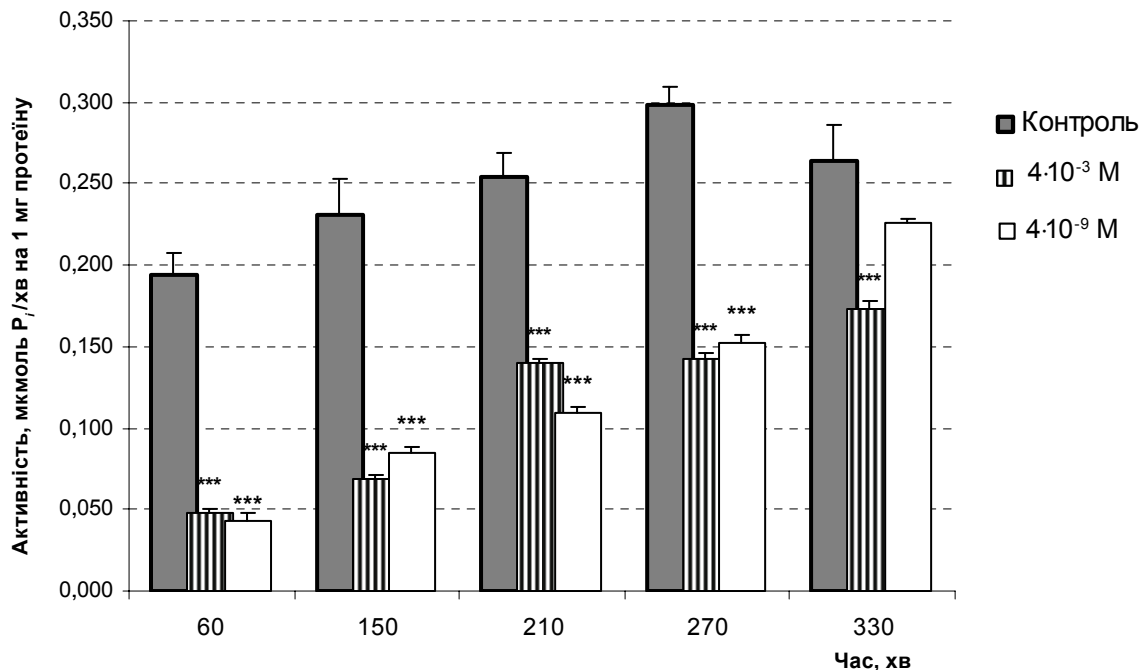


Рис. 3. Зміни активності Na^+, K^+ -АТФ-ази зародків в умовах впливу толуентіосульфонату калію ($4 \cdot 10^{-3}$ М, $4 \cdot 10^{-9}$ М) упродовж синхронних поділів (I, IV, VI, VIII, X) бластомерів порівняно з контролем. Вірогідні зміни порівняно із контролем: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

зростання активності Na^+, K^+ -АТФ-ази зародків за дії тіосульфонату калію при низькій концентрації, хоча порівняно з контролем його інгібувальний ефект все ж таки зберігається і є значним – активність ензиму зародків за таких умов становить лише 48% активності Na^+, K^+ -АТФ-ази контролю.

На останній стадії синхронного поділу бластомерів (X поділ, 330 хв) при високій концентрації виявлено незначне, але вірогідне зниження активності Na^+, K^+ -АТФ-ази зародків порівняно з контролем на $34,2 \pm 1,5\%$. Хоча, на відміну від контролю, де активність Na^+, K^+ -АТФ-ази знижується майже до попередніх значень, при низькій концентрації спостерігається продовження стрімкого підвищення активності мембранного ензиму. Саме цей період в нормальних умовах характеризується повною десинхронізацією дроблення бластомерів, зменшенням рівня ТМП плазматичних мембран, завершенням формування ранньої бластули та початком морфогенетичної функції ядер.

Отже, можна зробити висновок, що тіосульфонати у високих концентраціях ($4 \cdot 10^{-3}$ М) хоч і є модуляторами активності АТФ-ази зародків, однак їхній інгібувальний ефект упродовж раннього розвитку є вагомим, і ензимна активність Na^+, K^+ -помпи не може повністю

відновитися до початкового рівня, тоді як додавання до середовища тіосульфонату калію у низьких концентраціях ($4 \cdot 10^{-9}$ М) веде до відновлення активності Na^+, K^+ -АТФ-ази зародків до рівня контролю. Ймовірно тіосульфонати можуть включатися в ті ланки метаболізму зародків, які безпосередньо пов'язані із синтезом та формуванням їхніх бластодерм, що призводить до порушення функціонування систем мембранного транспорту.

Морфологічні дослідження зародків в'юна, інкубованих у середовищі за присутності толуентіосульфонату калію у концентрації $4 \cdot 10^{-3}$ М протягом двох діб розвитку, не показали суттєвих змін у формуванні зародкових шарів та затримки розвитку. Спостерігається відділення жовткової оболонки від поверхні бластомера, утворення перивітелінового простору і формування цитоплазматичного горбика, як і у контрольних дослідах. Перший поділ відбувається через 60 хв (2 бластомери) і кожний наступний – через 30 ± 2 хв, і відповідає визначеним стадіям за таблицями нормального розвитку [23]. Наступні стадії утворення бластомерів також відповідають часовим нормам – 2-га година розвитку – чітко прослідковується утворення 8 бластомерів (на кривих динаміки ТМП утворення 3 стадії розвитку також збігається в часі) (рис. 4, Б, I). Подальша інкубація за-

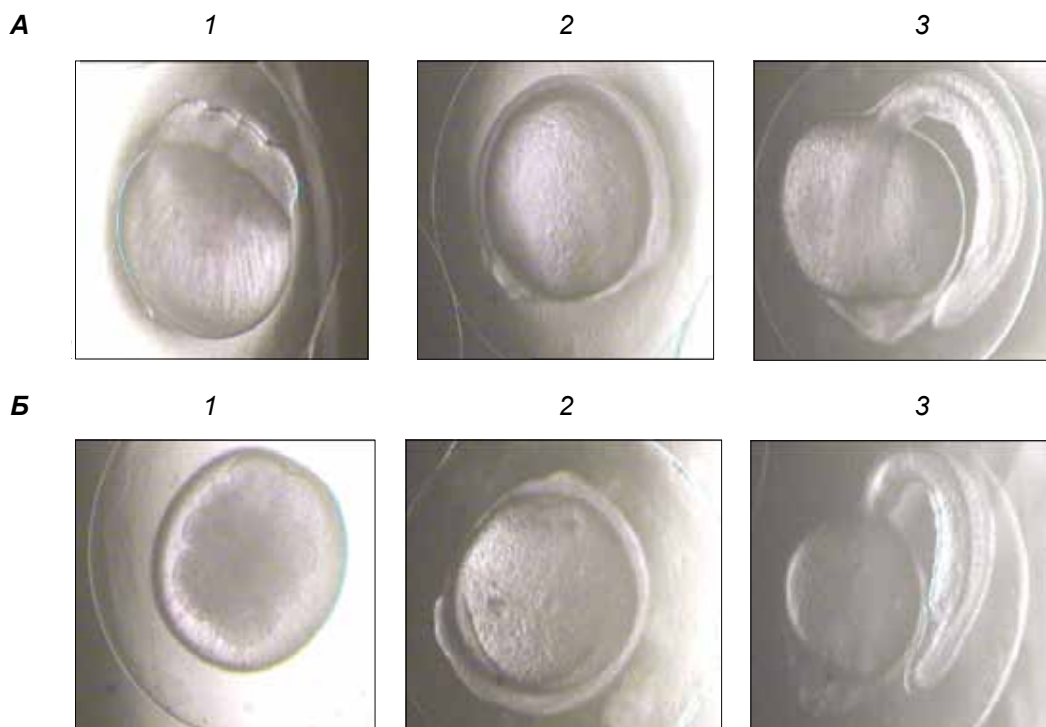


Рис. 4. Розвиток зародків в'юна протягом двох днів за дії біологічно активної речовини толуентіо-сульфонату калію (Б, $4 \cdot 10^{-3}$ М) на різних стадіях ембріогенезу: 1 – 8 бластомерів; 2 – 24 стадія; 3 – 36 стадія порівняно з аналогічними стадіями контролю (А)

родків в'юна в середовищі з тіосульфатами не спричинює морфологічних змін протягом доби розвитку, оскільки спостерігаємо появу 7–8-ї пар тулубових сомітів на всіх об'єктах, як і в контролі, що відповідає 24 (рис. 4, Б, 2) та 36 стадіям перед вилупленням (рис. 4, Б, 3). Це очевидно пов'язано з нетоксичним впливом досліджуваної речовини на ембріональний розвиток в'юна за рахунок його інтенсивного метаболізму та включенням адаптаційних механізмів у зародків, що швидко розвиваються. Однак вплив цієї речовини виявляється тільки в кількості вже сформованих передличинок у період вилуплення, що становить 30% від їхньої кількості у контролі. У подальшому розвитку не спостерігаються відхилення у встановленні еритроцитарного кровообігу та появи пігментації.

Електронно-мікроскопічне дослідження ультратонких зрізів бластомерів зародків в'юна проводили в середовищі з високою концентрацією ($4 \cdot 10^{-3}$ М) толуентіосульфату калію на перших годинах розвитку. Показано суттєві метаболічні зміни, пов'язані з наявністю великої кількості збільшеного розміру травних вакуолей з нечіткою мембраною. Плазматичні мембрани жовткових гранул характеризуються розпушеністю, хоча і зберігають свою ціліс-

ність. Гіалоплазма – негомогенна, що може бути наслідком коагуляції протеїнів цитоскелета, деструкції та руйнування цитоплазматичних ензиматичних комплексів, які в порівнянні з контролем (рис. 5, а, б) мають гомогенну структуру середньої електронної щільності. У гіалоплазмі зустрічаються гіпертрофовані канали агранулярного ендоплазматичного ретикулу (АЕР) низької електронної щільності та вакуолізовані цистерни гранулярного ендоплазматичного ретикулу (ГЕР), які втратили рибосоми (рис. 5, в). Проте в глибоких шарах цитоплазми зафіксовано значне руйнування мембран ГЕР, внаслідок чого полісоми розпадаються на моносоми. Присутність у середовищі інкубації препарату у вищезазначеній концентрації призводить до змін у мітохондріях, які втрачають свої нормальні форми, а саме приймають неправильну форму зі зруйнованими кристами та матриксом низької електронної щільності (рис. 5, в).

Електронно-мікроскопічне дослідження бластомерів в'юна в умовах інкубації зародків у присутності толуентіосульфату калію, дозволило встановити відшарування цитоплазми, яке пов'язане передусім з легким проникненням самої речовини у клітину, про що також свідчать розрідження цитоплазми та набряк

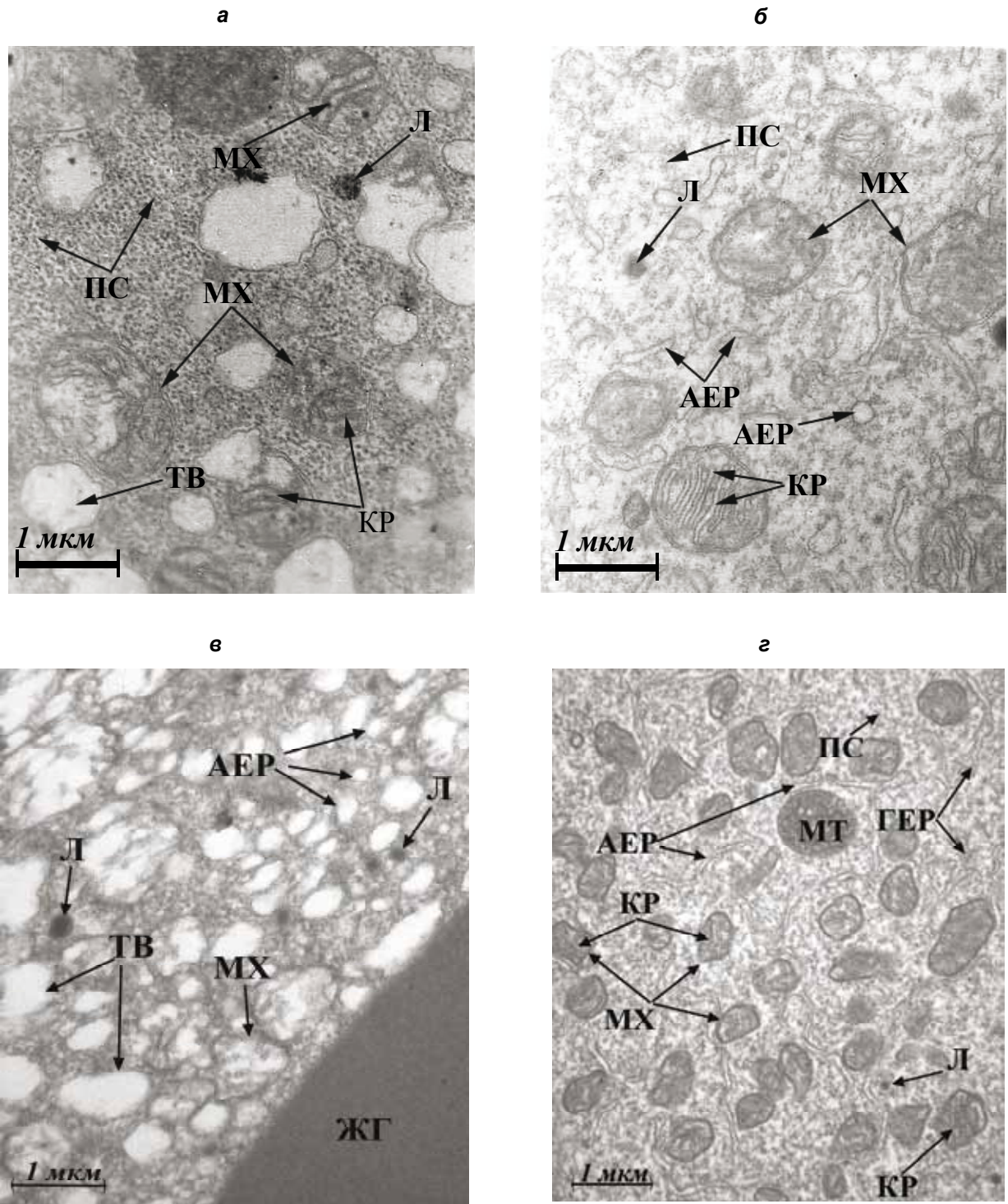


Рис. 5. Ультраструктура бластомерів зародків в'юна на стадії 2 бластомерів за нормальних умов (а, б) та за умов дії толуентіосульфонату калію у концентрації $4 \cdot 10^{-3}$ М (в), у концентрації $4 \cdot 10^{-9}$ М (г): АЕР – агранулярний ендоплазматичний ретикулум; GER – гранулярний ендоплазматичний ретикулум; ЖГ – жовткові гранули; КГ – комплекс Гольджі; КР – кристи мітохондрій; Л – лізосоми; М – моносоми; МТ – мультівезикулярні тільця; МХ – мітохондрії; ПС – полісоми; ТВ – травні вакуолі. (Електронна мікрофотографія, збільшення $\times 10\ 000$)

зародків [24, 25]. Деструкція мітохондріальних мембран можливо пов'язана з частковим посиленням пероксидного окислення ліпідів, власне за рахунок активації ензимів антиоксидантної системи [26]. Відомо, що в патології клітини важливу роль відіграє також інактивація іонтранспортних ензимів, в активний центр яких входять тіолові групи, в першу чергу АТР-гідролаз. Інактивація ензимів сповільнює «викачування» іонів кальцію або натрію з клітини, що призводить до збільшення їхньої внутрішньоклітинної концентрації і пошкодження клітини. Окислення тіолових груп мембранних протеїнів під впливом фармакологічних чинників спричинює появу дефектів у ліпідному шарі клітин та мітохондрій, що підтверджується зміною ультраструктури зародкових клітин. Під дією різниці електричних потенціалів на мембранах через такі пори у клітину надходить значно більше іонів натрію, а в мітохондрії — іонів калію. Внаслідок цього збільшується осмотичний тиск — бластомери набухають, що більше пошкоджує мембрану та призводить до розвитку некротичних процесів.

Під час інкубації у середовищі з толуентіосульфатом калію у концентрації $4 \cdot 10^{-9}$ М спостерігаються менш виражені зміни ультраструктури всіх органел бластомерів порівняно з контролем. Мітохондрії мають чітко виражені округлі форми із вмістом низької електронної щільності та чіткими кристами, хоча поряд з цим зустрічаються мітохондрії із вмістом високої електронної густини, нечіткими кристами неправильної форми (рис. 5, з). Окрім цього, спостерігаються невеликі первинні лізосоми і ділянки протеолізу.

Отже, вплив толуентіосульфату калію на ультраструктурну організацію зародків на стадії двох бластомерів є концентраційнозалежним. Зокрема, наявність низької концентрації препарату в середовищі інкубації не спричинює значних порушень, тоді як висока концентрація препарату призводить до виражених паранекротичних або некробіотичних процесів уже на першій годині розвитку, що пов'язано з порушенням в'язкості цитоплазми та дезорганізацією ензиматичних систем клітини.

Таким чином, проведені дослідження дають змогу зробити висновок, що дія тіосульфатів веде до вірогідних дозозалежних змін активності мембранозв'язаного ензиму зарод-

ків. У високій концентрації толуентіосульфат калію ($4 \cdot 10^{-3}$ М) виявляє найбільшу інгібувальну дію на Na^+, K^+ -АТР-азу, тоді як внесення його у середовище в низькій концентрації ($4 \cdot 10^{-9}$ М) зумовлює відновлення активності ензиму порівняно з контролем. Очевидно у низьких концентраціях біологічно активні тіосульфати або їхні первинні метаболіти здатні включатися у метаболічні процеси зародків, які в цей момент інтенсивно розвиваються та ростуть, що підвищує інтенсивність процесів їхнього обміну.

Показано, що під час досліджень ТМП зародкових клітин за дії толуентіосульфату калію в концентрації $4 \cdot 10^{-5}$ М прослідковуються зміни в періодах коливань: перший (2 бластомери) і третій (8 бластомерів) поділи становлять 20 хв, а другий, четвертий, п'ятий та шостий характеризуються збільшенням тривалості періоду до 42, 39, 45 та 40 хв відповідно, що не збігається з тривалістю мітотичних циклів синхронних поділів бластомерів у контролі. Спостерігається також зменшення амплітуди в кожному періоді в середньому на 7–12 мВ та зменшення наростання максимальних значень коливань ТМП на 39 мВ порівняно з контролем. Це пов'язано з інгібуванням біосинтетичних процесів, що і призводить до зниження активності мембранного ензиму (Na^+, K^+ -АТР-ази). Проведені ультраструктурні дослідження показали, що толуентіосульфат калію впливає на субмікроскопічні структури, котрі беруть участь у синтезі протеїну, внаслідок чого змінюється кількість, розміщення та електронна щільність рибосом, спостерігається деструкція мітохондрій, що спричинює порушення внутрішньоклітинної біоенергетики. Проте, на підставі цих даних, неможливо зробити висновок про спрямованість та інтенсивність протеїнового синтезу.

З огляду на вищезазначене, можна стверджувати, що тіосульфати є перспективними речовинами для створення лікарських препаратів і пошук серед них антимиотичних і антипроліферативних засобів дозволить у подальшому застосувати їх у хіміотерапії онкологічних захворювань та для лікування аутоімунних патологій.

Робота виконана за підтримки Державного фонду фундаментальних досліджень, проект № Ф25.5/075.

**ВЛИЯНИЕ
4-ТОЛУЕНТИОСУЛЬФОНАТА КАЛИЯ
НА МЕМБРАННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ
И АТР-азную АКТИВНОСТЬ
ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ
ЗАРОДЫШЕЙ ВЬЮНА**

*Е. С. Яремкевич¹, М. В. Бура²,
С. М. Мандзинец², О. Р. Кулачковский²,
В. И. Лубенец¹, Д. И. Санагурский²,
В. П. Новиков¹*

¹Национальный университет «Львовская
политехника», Украина;
e-mail: ilenkova@polynet.lviv.ua;

²Львовский национальный университет
имени Ивана Франко, Украина;
e-mail: mcelevych@yahoo.com

Исследовано влияние биологически активного вещества 4-толуентиосульфоната калия ($4 \cdot 10^{-5}$ М) на изменение электрофизиологических параметров зародышей вьюна (*Misgurnus fossilis* L.): динамику трансмембранного потенциала (ТМП) плазматических мембран и активность мембранного энзима (Na^+ , K^+ -АТР-азы) в период синхронных дроблений бластомеров в раннем эмбриогенезе. Проведена оценка влияния данного вещества и показаны аperiodические изменения уровня ТПМ, которые не совпадают с митотическими циклами синхронного деления бластомеров в контроле. Наблюдаются уменьшение амплитуды в каждом периоде на 7–12 мВ и уменьшение нарастания максимальных значений колебаний ТМП на 39 мВ по сравнению с контролем. Это связано с ингибированием биосинтетических процессов в первые часы развития, что и приводит к снижению активности Na^+ , K^+ -АТР-азы на $75,5 \pm 4,1\%$ и $78,4 \pm 10,4\%$ соответственно как при действии высокой ($4 \cdot 10^{-3}$ М), так и низкой ($4 \cdot 10^{-9}$ М) концентраций с дальнейшим возобновлением активности до уровня контроля при действии низкой концентрации.

Ключевые слова: тиосульфаты, трансмембранный потенциал, Na^+ , K^+ -АТР-аза, зародыши вьюна, плазматическая мембрана, бластомеры дробления, митохондрия, гранулярный эндоплазматический ретикулум.

**THE INFLUENCE OF POTASSIUM
4-TOLUENETHIOSULFONATE
ON MEMBRANE POTENTIAL
AND ATPase ACTIVITY OF PLASMATIC
MEMBRANES OF LOACH EMBRYOS**

*H. S. Yaremkevych¹, M. V. Bura²,
S. M. Mandzynets², O. R. Kulachkovskyi²,
V. I. Lubenec¹, D. I. Sanagurskyi²,
V. P. Novikov¹*

¹Lviv National Polytechnic University, Ukraine;
e-mail: ilenkova@polynet.lviv.ua;

²Ivan Franko L'viv National University, Ukraine;
e-mail: mcelevych@yahoo.com

S u m m a r y

The influence of novel biologically active substance potassium 4-toluenethiosulfonate in concentration of $4 \cdot 10^{-5}$ M on the changes of electrophysiological parameters of embryonic cells in early development of fish (*Misgurnus fossilis* L.) was investigated including the changes of membrane potential (TMP) and enzyme activity of plasmatic membranes of loach embryos during the period of synchronous division of blastomers in the early period of development. The evaluation of influence of these matters was studied and aperiodic changes of the level of TMP were shown. The diminishing of amplitude in every period by 7–12 mV and diminishing of growth of maximal values of vibrations of TMP by 39 mV in comparison to control was noticed. It was related to inhibition of some biosynthetic processes and results in the decline of activity of membrane enzyme (Na^+ , K^+ -ATPase) by $75.5 \pm 4.1\%$ and $78.4 \pm 10.4\%$ both at the action of high ($4 \cdot 10^{-3}$ M) and low ($4 \cdot 10^{-9}$ M) concentrations, accordingly, at first hours of development with subsequent renewal of its activity to the level of control only for the actions of low concentration.

Key words: thiosulfonate, membrane potential, Na^+ , K^+ -ATPase, loach embryos, plasma membrane, blastomers divisions, mitochondria, rough endoplasmic reticulum.

1. Громова В. П. // Укр. біохім. журн. – 2005. – 77, № 3. – С. 87–95.
2. Filimonov D., Poroikov V., Borodina Yu., Glorizova T. // J. Chem. Inf. Comput. Sci. – 1999. – 39, N 4. – P. 666–670.
3. Бражко О. А. // Тези доповідей «XXI Українська конференція з органічної хімії» / Чернігів, Україна, 2007. – С. 22.
4. Вуйцик Л. Б., Гевусь О. І., Лубенець В. І. та ін. // Вісник НУ «ЛП», Хімія, технологія речовин та їх застосування. – 2008. – Вип. 622. – С. 38–43.
5. Steiner M., Li W. // J. Nutr. – 2001. – 131(3s). – P. 980S–984S.
6. Rai S. K., Sharma M., Tiwari M. // Life Sci. – 2009. – 85, N 5–6. – P. 211–219.
7. Song J. D., Lee S. K., Kim K. M. et al. // J. Biochem. Mol. Toxicol. – 2009. – N 1. – P. 71–79.
8. Hirsch J., Amariglio N., Savion N. // Eur. J. Nutr. – 2009. – 48, N 2. – P. 67–74.
9. Iciek M., Kwiecień I, Wlodek L. // Environ. Mol. Mutagen. – 2009. – 50, N 3. – P. 247–265.
10. MacDonald J. A., Marchand M. E., Langler R. F. // Blood Coagul. Fibrinolysis. – 2004. – 15, N 6. – P. 447–450.
11. Prasad V. N. V. // J. Org. Lett. – 2000. – 2, N 8. – P. 1069–1072.
12. Нейфах А. Е. Молекулярная биология процессов развития. – М.: Наука, 1977. – 311 с.
13. Луцик М. Д., Кусень С. И., Лукьяненко А. В. // Онтогенез. – 1986. – 17. – С. 314–321.
14. Fiske C. H., Subbarow Y. // J. Biol. Chem. – 1925. – 66. – P. 375–400.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. G., Farr A. L., Randall R. C. // J. Biol. Chem. – 1951. – 193. – P. 265–275.
16. Лубенець В. І. // Укр. хім. журн. – 2003. – 69, № 8. – С. 114–121.
17. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. – М.: Мир, 1975. – 325 с.
18. Reynolds E. S. // J. Cell Biol. – 1963. – 17. – P. 208–212.
19. Санагурський Д. І. Об'єкти біофізики / Монографія – Львів: Видавничий центр ЛНУ ім. Ів. Франка. – 2008. – 522 с.
20. Гойда О. А. Биологические аспекты раннего онтогенеза животных. – К.: Наук. думка, 1993. – 224 с.
21. Санагурський Д. И. Трансмембранный потенциал в раннем эмбриогенезе вьюна (*Misgurnus fossilis* L.) при гормональных воздействиях. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – К., 1983. – 23 с.
22. Санагурський Д. І. Трансмембранный биоэлектрогенез: модифікуючі впливи на нього, структурно-функціональний аналіз і моделі. Автореф. дис. ... д-ра біол. наук. – К., 2003. – 39 с.
23. Костомарова А. А. Вьюн *Misgurnus fossilis*. – В кн.: Объекты биологии развития. – М.: Наука, 1975. – С. 308–323.
24. Целевич М. В., Тарновська А. В., Санагурський Д. І. // Біологія тварин. – 2005. – 7, № 1–2. – С. 143–151.
25. Burkhardt J. E., Walterspiel J. N., Schaad U. B. // Clin. Infect. Dis. – 1997. – P. 1196–1204.
26. Blanco G., Sanchez G., Melton R. J. et al. // J. Histochem. Cytochem. – 2000. – 48, N 8. – P. 1023–1032.

Отримано 09.07.2010