

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА

БЕЗКОРОВАЙНИЙ АНДРІЙ ОЛЕГОВИЧ

УДК (577.352.4+577.152.1+577.27):597.551.2-053.13

**ЛІПІДНИЙ ПРОФІЛЬ, ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНІ ТА ТРАНСПОРТНІ
ПРОЦЕСИ ЗАРОДКІВ В'ЮНА ЗА ВПЛИВУ ПОХІДНИХ 1,4-НАФТОХІНОНУ**

03.00.02 – біофізика

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Львів – 2018

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у Львівському національному університеті імені Івана Франка Міністерства освіти і науки України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Санагурський Дмитро Іванович,
Львівський національний університет імені Івана Франка,
професор кафедри біофізики та біоінформатики

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Мартинюк Віктор Семенович,
Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
професор кафедри біофізики та медичної інформатики

кандидат біологічних наук, доцент
Фафула Роман Володимирович,
Львівський національний медичний університет імені Данила
Галицького, доцент кафедри біофізики

Захист відбудеться “ 06 ” липня 2018 р. о 14⁰⁰ год. на засіданні спеціалізованої вченої ради К 35.051.14 у Львівському національному університеті імені Івана Франка за адресою: 79005, м. Львів, вул. Грушевського, 4, біологічний факультет, ауд. № 333.

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці Львівського національного університету імені Івана Франка за адресою: 79005, м. Львів, вул. Драгоманова, 17.

Автореферат розіслано “ ____ ” _____ 2018 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради К 35.051.14,
кандидат біологічних наук, доцент

М. В. Бура

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. В останні десятиліття у науковій спільноті виникає зацікавленість хіноїдними сполуками. Завдяки своїм унікальним властивостям хіноїдні сполуки та їхні похідні застосовуються у різних галузях науки і техніки. Зростання наукового інтересу до похідних 1,4-нафтохінону викликано їхньою високою реакційною здатністю та можливістю синтезу на їх основі нових сполук із різноманітними замісниками та широким спектром біологічної активності.

Актуальним завданням на сьогодні є дослідження впливу новосинтезованих хімічних сполук на функціональні параметри зародкових об'єктів, які є високочутливою тест-системою, що дозволяє виявити негативну чи позитивну дію досліджуваної речовини.

Похідні 1,4-нафтохінону застосовують у медичній та ветеринарній практиці як бактеріостатичні, бактерицидні і фунгіцидні препарати. Їм притаманний широкий спектр біологічної дії, до якого належить протизапальна, протівірусна та протиалергічна дія (Klotz L. et al., 2014). Похідні 1,4-нафтохінону використовують для лікування респіраторних захворювань (Kumar S. et al., 2013). В сучасній медицині хінонові сполуки відносять до другого великого класу протипухлинних засобів, представники якого перебувають на різних стадіях доклінічних та клінічних досліджень (Wellington K.W., 2015). Але застосування багатьох 1,4-нафтохінонів часто обмежується їхньою надмірною токсичністю. Відповідно, вони можуть мати лікувальний або токсичний ефект, але це залежить від структури хінонового похідного та його концентрації.

Механізми, за допомогою яких 1,4-нафтохінони здатні викликати ці ефекти, є різноманітними і складними (Klotz L. et al., 2014) та залежать від хімічної структури замісників у хіноновій молекулі. Хінони є сполуками з високою відновною активністю, які можуть брати участь у редокс-циклі, через їхні семихінонові радикали, що призводить до формування активних форм Оксигену (АФО), включаючи супероксид, пероксид Гідрогену і, особливо, гідроксильний радикал. Утворення цих молекул може призвести до оксидативного стресу в клітині, через пошкодження клітинних макромолекул, таких як ліпіди, білки, ДНК (Klotz L., 2014). З іншого боку, хінони є акцепторами в реакції Міхаеля, і клітинні пошкодження можуть відбуватися внаслідок алкілування важливих клітинних білків/ДНК. Такий комплекс унікальних властивостей робить 1,4-нафтохінони цікавими об'єктами для розроблення різноманітних терапевтичних засобів.

Аналіз наукової літератури свідчить про можливість впливу різних за структурою похідних 1,4-нафтохінону на прооксидантно-антиоксидантну та іонтранспортні системи живих об'єктів (Elingold I. et al., 2009). Недостатньо висвітленими залишаються питання участі процесів пероксидації, функціонування антиоксидантної системи (АОС) та мембранного транспорту у регуляції нормального метаболічного стану зародкових клітин за дії хінонових похідних, що є актуальним та перспективним як із фундаментальної, так і з практичної точки зору.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано відповідно до тематики наукових досліджень кафедри біофізики та біоінформатики Львівського національного університету імені Івана Франка як складову частину науково-дослідних тем: «Прооксидантно-антиоксидантний

гомеостаз та системи мембранного транспорту біооб'єктів за дії фізико-хімічних чинників» (№ держреєстрації 0116U001633, 2016–2018 рр.), «Стан іонтранспортних та антиоксидантної систем біооб'єктів за дії фізико-хімічних чинників» (№ держреєстрації 0113U000866, 2013–2015 рр.).

Мета і завдання дослідження. Мета роботи полягала у з'ясуванні особливостей впливу похідних 1,4-нафтохінону на ліпідний профіль, прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз та функціонування мембранопов'язаних систем активного транспорту іонів зародкових клітин в'юна *Misgurnus fossilis* L. Для досягнення мети у роботі вирішували такі **завдання**:

1. Здійснити прогноз біологічної активності похідних 1,4-нафтохінону: 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону; 2-хлоро-3-(3-оксо-3-(піперидин-1-іл)пропіламіно)-1,4-нафтохінону (ФО-1) та 2-хлоро-3-(3-(морфолін-4-іл)-3-оксопропіламіно)-1,4-нафтохінону (ФО-2).

2. З'ясувати вплив досліджуваних похідних 1,4-нафтохінону на ліпідний профіль зародків упродовж раннього ембріогенезу в'юна.

3. Дослідити зміну інтенсивності процесів ліпопероксидації бластомерів зародків в'юна протягом синхронних поділів за дії похідних 1,4-нафтохінону різних концентрацій.

4. Вивчити вплив похідних 1,4-нафтохінону на активність ферментів антиоксидантної системи (супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази) протягом раннього розвитку в'юна.

5. Дослідити дію похідних 1,4-нафтохінону Na^+ , K^+ - та сумарну Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазні активності зародків в'юна впродовж раннього ембріогенезу.

6. Вивчити морфологічні та ультраструктурні зміни бластомерів зародків за наявності в середовищі інкубації похідних 1,4-нафтохінону різних концентрацій.

7. Визначити ступінь впливу похідних 1,4-нафтохінону на зміну досліджуваних показників, застосовуючи дисперсійний аналіз.

Об'єкт дослідження: процеси регуляції прооксидантно-антиоксидантної та транспортних систем зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L., за дії похідних 1,4-нафтохінону.

Предмет дослідження: ліпідний профіль, пероксидне окиснення ліпідів, стан АОС, транспортні системи та ультраструктура зародків в'юна, за дії похідних 1,4-нафтохінону.

Методи досліджень: біофізичні методи (хромато-мас-спектрометричний та спектрофотометричний методи, комп'ютерний біологічний скринінг), біометричні методи (дисперсійний та кореляційний аналізи), методи світлової та електронної мікроскопії.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше досліджено ліпідний профіль зародків в'юна на окремих стадіях раннього ембріогенезу за дії хінонових похідних. Встановлено, що ліпідний склад яйцеклітини та зародків в'юна в контролі характеризується високим рівнем фосфатидилхоліну, холестеролу, моноацилгліцеролу та диацилгліцеролу. За впливу 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону і амідних похідних ФО-1, ФО-2 на зародки в'юна протягом раннього ембріогенезу ліпідний склад зазнає змін, хінонові похідні суттєво діють на фосфоліпідну фракцію зародків.

Вперше показано здатність 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону та амідних похідних (ФО-1, ФО-2) інгібувати сумарну активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежних АТФаз мембран. Відзначено дозозалежне зниження активності Na^+ , K^+ -АТФази клітин мембран впродовж раннього ембріогенезу. На підставі експериментальних досліджень з'ясовано ймовірні біофізичні механізми впливу 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону та новосинтезованих амідних похідних ФО-1 і ФО-2 на морфофункціональні параметри розвитку зародків в'юна. Вперше встановлено, що за дії досліджуваних похідних 1,4-нафтохінону у зародкових клітинах відбувається порушення інтенсивності вільнорадикальних реакцій, що відображається у зміні вмісту продуктів ліпопероксидації. Дія 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону, ФО-1 та ФО-2, у концентраціях 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} М «*in vivo*» та у концентраціях 10^{-7} , 10^{-5} , 10^{-3} М *in vitro*, призводить до зростання активності супероксиддисмутази (СОД) та каталази (КАТ) на фоні зниження активності глутатіонпероксидази (ГПО) на всіх етапах раннього ембріогенезу в'юна.

Практичне значення одержаних результатів. Одержані результати розширюють і доповнюють уявлення про механізми впливу похідних 1,4-нафтохінону на Na^+ , K^+ - та сумарну Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежні АТФазні ферменти, прооксидантно-антиоксидантну систему, морфологію та ультраструктуру бластомерів зародків в'юна. Результати цієї роботи мають важливе значення для розробки нових фармакологічних препаратів на основі похідних 1,4-нафтохінону, які міститимуть аліфатичні ланцюги різного складу.

Здобуті результати можуть бути використані у навчальному процесі при викладанні загального курсу «Біофізика» та спецкурсів: «Біофізика мембран», «Біофізика клітини» на біологічному факультеті Львівського національного університету імені Івана Франка.

Особистий внесок здобувача полягає у виконанні всього обсягу експериментальних досліджень, поданих у дисертаційній роботі, статистичному опрацюванні отриманих результатів, підборі та опрацюванні даних літератури. За участю наукового керівника д.б.н., професора Д. І. Санагурського проведено планування напрямів дослідження, аналіз, інтерпретація одержаних результатів і формулювання висновків.

У проведенні електронно-мікроскопічних досліджень брав участь старший науковий співробітник, к.б.н. О. Р. Кулачковський, а у виконанні дисперсійного та кореляційного аналізів – доцент, к.б.н. Н. П. Гарасим.

Апробація результатів дисертації. Матеріали результатів дисертації були представлені на наукових семінарах кафедри біофізики та біоінформатики (Львів, 2013–2017 рр.), Міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2014, 2016, 2017, 2018 рр.), I Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів із міжнародною участю «Сучасні проблеми викладання та наукових досліджень біології у ВНЗ України» (Дніпропетровськ, 2014 р.), VII всеукраїнській науково-практичній конференції для молодих учених і студентів «Біологічні дослідження – 2016» (Житомир, 2016 р.), VIII всеукраїнській науково-практичній конференції для молодих учених і студентів «Біологічні дослідження – 2017» (Житомир, 2017 р.), IV міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні питання сучасної науки» (Одеса, 2016 р.),

Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченій 20-річчю заснування наукового фахового видання України «Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія Біологія» (Тернопіль, 2017 р.).

Публікації. За результатами дисертації опубліковано 5 статей у фахових наукових журналах (один з яких входить до міжнародної наукометричної бази даних Scopus) і 9 тез доповідей у матеріалах міжнародних та українських наукових конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається з: анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів досліджень, обговорення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел (217 найменувань), а також трьох додатків. Роботу викладено на 186 сторінках (з них основного тексту 132 сторінки), ілюстровано 53 рисунками та 13 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. В розділі «Огляд літератури» висвітлено і проаналізовано сучасні дані щодо основних біологічних властивостей похідних 1,4-нафтохінону, їх впливу на механізми регуляції передачі міжклітинного сигналу. Охарактеризовано активність похідних 1,4-нафтохінону залежно від особливостей їхньої структури та включення замісників.

Матеріали і методи досліджень. Досліджувані похідні 1,4-нафтохінону: 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінон, ФО-1 та ФО-2 (рис. 1) надано співробітником кафедри технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології Національного університету «Львівська політехніка» к.х.н. О. М. Фігуркою.

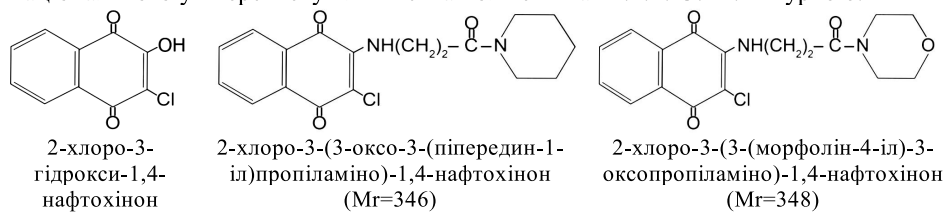


Рис. 1 Структурні формули досліджуваних похідних 1,4-нафтохінону (за номенклатурою IUPAC)

Дослідження проводили на зародках прісноводної риби в'юна *Misgurnus fossilis* L., які в період раннього ембріогенезу є адекватною тест-системою для дослідження впливу різноманітних фармакологічних та хімічних чинників на живі організми. Для експерименту використовували зародки, які отримували за методом Нейфаха (Нейфак А.А., 1977). Стадії розвитку, які відповідали першому (2 бластомери), четвертому (16 бластомерів), шостому (64 бластомери), восьмому (256 бластомерів) і десятому (1024 бластомери) дробленню зиготи, контролювали візуально під бінокулярним мікроскопом МБС-10. Через 5–10 хв після запліднення відмиті зиготи інкубували у фізіологічному розчині Гольтфретера ($t = 20-22\text{ }^{\circ}\text{C}$), який містив розчин хінонових сполук (2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону, ФО-1, ФО-2) різних концентрацій, а саме 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} М, за умов *in vivo*. В

дослідженнях *in vitro* використовували сполуки у концентраціях 10^{-7} , 10^{-5} , 10^{-3} М. Зародки в'юна, на різних стадіях розвитку, гомогенізували за допомогою гомогенізатора Поттера-Ельвенгейма у розчині Гольфрета. По 1 мл гомогенату кожної проби заморожували у морозильній камері при -20 °С, в подальшому їх використовували для дослідження. Кількість білка у кожному зразку визначали за методом Лоурі (Lowry O.H. et al., 1951). Виділення бластодерми із зародків та їх дисоціацію до ізольованих клітин проводили за методикою Бериташвілі (Бериташвілі Д.Р., 1974). Виділення гетерогенної фракції плазматичної мембрани із клітин зародків в'юна здійснювали за методами, описаними Evans W.H. і Луциком М.Д. (Evans W.H., 1980; Луцик М.Д., 1986). Загальне ліпідне екстрагування із яйцеклітин та зародків в'юна здійснювали згідно з методикою (Di Paolo G. et al., 2012).

Активність мембранозв'язаних іонтранспортних АТФ-гідролаз (Na^+ , K^+ -АТФази та сумарної Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежних АТФаз) визначали за модифікованим методом Фіске-Суббароу (Fiske C.H. et al., 1925). Інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) оцінювали за вмістом ТБК-позитивних продуктів (Тимирбулатов Р.А. и др., 1981). Функціонування АОС оцінювали за активністю ферментів: СОД, КАТ, ГПО. Супероксиддисмутазну активність вимірювали за методом (Костюк В.А., 1990), каталазну активність визначали за швидкістю розкладання пероксиду Гідрогену (Королюк М.А. и др., 1988). Глутатіонпероксидазну активність вивчали за методом, який ґрунтується на розвитку кольорової реакції внаслідок взаємодії SH-груп із реактивом Елмана (Моин В.И., 1986). Для електронно-мікроскопічного дослідження ембрональних клітин в'юна зрізи отримували за Рейнольдсом (Голиченков В.А., 1996).

Комп'ютерний скринінг прогнозованої біологічної активності похідних 1,4-нафтохінону здійснювали з допомогою веб ресурсу PASS Online (Filimonov D.A. et al., 2014).

Для оцінки достовірності різниці між статистичними характеристиками двох альтернативних сукупностей даних обраховували коефіцієнт Стьюдента. Достовірною вважалася різниця, при показниках $p \geq 0,95$; $p \geq 0,99$; $p \geq 0,999$. Двофакторний дисперсійний і кореляційний аналізи впливу досліджуваних розчинів на функціональні параметри зародкових об'єктів проводили за допомогою пакету програм статистичної обробки засобами *Microsoft Office Excel-2010*. Результати обробки представлені у вигляді рисунків.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Прогнозування біологічної активності похідних 1,4-нафтохінону за допомогою веб-ресурсу PASS Online. Згідно з даними прогнозованої біологічної активності PASS 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінон володіє широким спектром інгібувальної активності відносно великого числа ферментів, може проявляти психотропну дію та протипухлинну активність щодо дрібноклітинного раку легень. Біологічна активність, визначена за допомогою програми PASS для амідних похідних (ФО-1) та (ФО-2), вказує на їхню здатність блокувати кальцієві канали N-типу, інгібувати зворотне захоплення нейротрансмітерів та проникнення мембран, мати протипухлинну активність щодо множинної мієломи.

Дослідження морфологічних змін розвитку зародків в'юна за наявності в інкубаційному середовищі похідних 1,4-нафтохінону. Досліди на виживання проводили із зародками, які інкубували в розчині Гольтфретера (контроль) і в розчині Гольтфретера, що містив 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінон та амідні похідні ФО-1 та ФО-2 в концентраціях від 10^{-3} до 10^{-7} М, впродовж п'яти діб від моменту запліднення до десяти діб після вилуплення личинок. Інкубація зародків із похідними 1,4-нафтохінону, в концентраціях 10^{-3} – 10^{-4} М вела до сповільнення розвитку та загибелі зародків на початкових етапах раннього ембріогенезу. У личинок в'юна, які вижили у середовищі з 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохіноном, похідними ФО-1 та ФО-2 у концентрації 10^{-5} М, на першу добу спостерігали затримку розвитку, відсутність рухової активності. Проте розвиток зародків у розчині похідних ФО-1 та ФО-2 (10^{-6} та 10^{-7} М) відповідав контрольним показникам.

Ліпідний склад зародків в'юна за впливу похідних 1,4-нафтохінону. Досліджено ліпідний профіль зародків, які розвивалися за наявності у середовищі інкубації 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону, амідних похідних ФО-1 та ФО-2 (10^{-5} М; рис. 2, 3). Встановлено, що ці сполуки впливали на ліпідний склад зародків та призводили до зниження вмісту ліпідів на всіх досліджуваних стадіях розвитку. Зокрема, на стадії 2 бластомерів за впливу 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону у концентрації 10^{-5} М вміст моноацилгліцеролу та диацилгліцеролу знижувався на $22,02 \pm 0,01$ % та $32,03 \pm 0,02$ % відповідно, порівняно з контролем. Новосинтезовані похідні ФО-1 та ФО-2 у зазначеній концентрації також знижували вміст моноацилгліцеролу (на $17,02 \pm 0,01$ % та $22,03 \pm 0,02$ % відповідно) і диацилгліцеролу (на $25,80 \pm 0,01$ % та $24,2 \pm 0,01$ % відповідно).

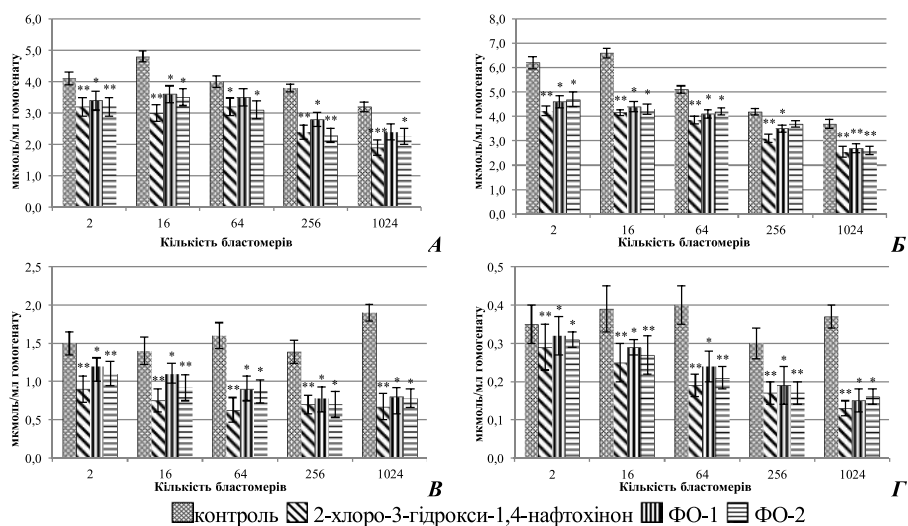


Рис. 2. Вміст моноацилгліцеролу (А), диацилгліцеролу (Б), фосфатидилхоліну (В) та фосфатидилетаноламіну (Г) у зародках в'юна на окремих стадіях розвитку, за впливу 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону, ФО-1 та ФО-2 ($M \pm m$, $n = 10$) у концентрації 10^{-5} М

Тут і надалі – * – $p \geq 0,95$; ** – $p \geq 0,99$, *** – $p \geq 0,999$

Досліджувані хінонові похідні суттєво впливали на фосфоліпідну фракцію зародків в'юна. Найбільш чутливими до цих сполук, на стадії 2 бластомерів виявилися фосфатидилхолін, фосфатидилетаноламін та фосфатидилінозитол.

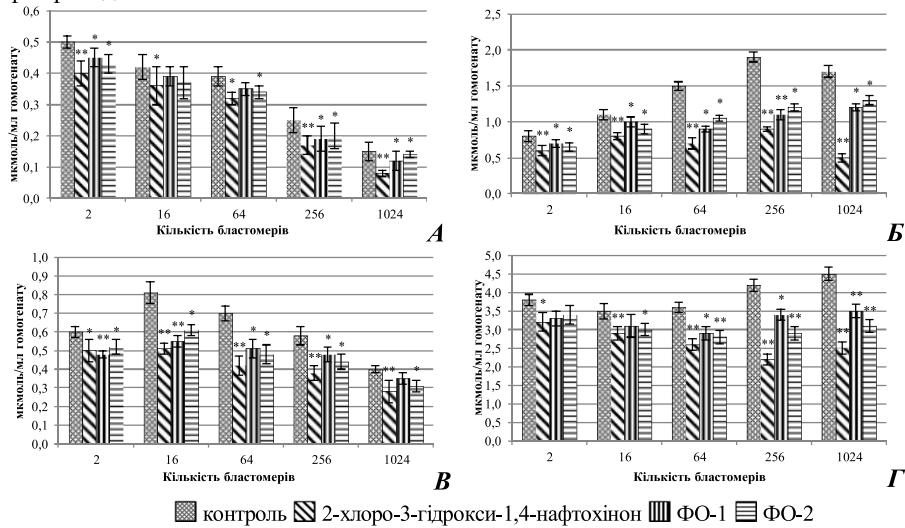


Рис. 3. Вміст фосфатидилінозитолу (А), фосфатидилсерину (Б), лізофосфатидилхоліну (В) та холестеролу (Г) у зародках в'юна на окремих стадіях розвитку, за впливу 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону, ФО-1 та ФО-2 ($M \pm m$, $n = 10$) у концентрації 10^{-5} М

Вміст фосфатидилхоліну знижувався на $40,02 \pm 0,01$ %; $20,03 \pm 0,01$ % та $16,7 \pm 0,01$ % за впливу 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону, ФО-1 та ФО-2 відповідно. Привертає увагу той факт, що вказані зміни ліпідного складу зародків спостерігали вже на ранніх етапах розвитку. Варто зазначити, що вплив 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону на досліджувані показники є більш вираженим, ніж амідних похідних ФО-1 та ФО-2. Таким чином, наведені вище кількісні зміни показників стану ліпідного профілю можуть призвести до зміни біофізичних властивостей плазматичної мембрани та порушення метаболічних процесів клітини.

Дослідження дії похідних 1,4-нафтохінону на вміст ТБК-позитивних продуктів на окремих етапах розвитку зародків в'юна. Встановлено, що на стадії розвитку зародків 2 бластомери за дії вихідної сполуки синтезу амідних похідних – 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону (10^{-5} М) вміст ТБК-позитивних продуктів достовірно ($p \geq 0,999$) знижувався відносно контролю на $87,10 \pm 0,02$ %. За впливу новосинтезованих амідних похідних 1,4-нафтохінону на цій стадії розвитку зародків у зазначених концентраціях також відбувалося зменшення вмісту продуктів ПОЛ. За впливу амідного похідного ФО-1 вміст ТБК-позитивних продуктів достовірно ($p \geq 0,999$) знижувався на $83,64 \pm 0,01$ % та амідного похідного ФО-2 – на $81,94 \pm 0,01$ %. Отримані результати вказують на зниження процесів вільнорадикального окиснення ліпідів протягом ембріогенезу. Інгібування ПОЛ хіноновими сполуками

узгоджується з даними літератури, проте механізм такої дії ще до кінця не з'ясований (Elingold I. et al., 2009). Ймовірно, таке порушення нормального перебігу окиснювальних процесів може призводити до розвитку морфо-функціональних змін у клітинах зародків в'юна. Крім того, включення гетероциклічних фрагментів у структуру похідних ФО-1 та ФО-2 сприяє більш вираженому зменшенню вмісту ТБК-позитивних продуктів порівняно з 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохіноном.

Дослідження впливу похідних 1,4-нафтохінону на активність супероксиддисмутази. Активність СОД дозозалежно зростала у зародках в'юна на різних етапах розвитку (умови досліду – «*in vivo*»), за впливу досліджуваних похідних 1,4-нафтохінону у концентраціях 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} М. Зокрема, за наявності амідних похідних ФО-1 та ФО-2 в середовищі інкубації зародків на стадії 16 бластомерів, в найменшій досліджуваній концентрації (10^{-7} М), відбувалося зростання активності ензиму у 9,4 та 10,8 рази ($p \geq 0,999$) відповідно. За впливу вихідної сполуки синтезу амідних похідних – 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону активність СОД зростала у 7 разів ($p \geq 0,999$) порівняно з контролем.

Застосувавши кореляційний аналіз, ми підтвердили, що активність супероксиддисмутази перебувала у негативній залежності від вмісту ТБК-позитивних продуктів.

Проведені експерименти *in vitro* виявили подальшу тенденцію до дозозалежного зростання активності супероксиддисмутази, за дії досліджуваних сполук. Так, при внесенні в середовище інкубації хінонових похідних ФО-1 та ФО-2, на останній стадії синхронного поділу (1024 бластомери), у концентрації 10^{-3} М, активність СОД зростала у 81,4 та 82,1 рази ($p \geq 0,999$) відповідно. За дії 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону – активність супероксиддисмутази перевищувала контрольні значення у 67 разів ($p \geq 0,999$). Ці дані узгоджуються з результатами, одержаними в низці робіт, у яких показано, що похідні 1,4-нафтохінону здатні підвищувати активність супероксиддисмутази у тканинах печінки та інших органів шурів (Berghot M.A. et al., 2014).

Дослідження впливу похідних 1,4-нафтохінону на активність каталази. При дослідженні дії похідних 1,4-нафтохінону на зародкові клітини спостерігали зростання каталазної активності впродовж усіх досліджуваних стадій ембріогенезу. Максимальна ферментативна активність каталази за умов «*in vivo*» та за дії 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону відзначена на стадії розвитку зародків 2 бластомерів, де вона перевищувала контрольне значення втричі. Варто зазначити, що за впливу амідних похідних ФО-1 та ФО-2 також виявлено зростання каталазної активності, проте, не так виражено. Похідні ФО-1, ФО-2, у найбільшій досліджуваній концентрації (10^{-5} М), зумовлювали зростання активності КАТ у 1,8 ($p \geq 0,99$) та 1,9 рази ($p \geq 0,999$), відповідно.

За дії досліджуваних похідних 1,4-нафтохінону на каталазу зародків в'юна у дослідженнях *in vitro* також виявлено дозозалежне зростання активності досліджуваного ензиму, зокрема, на етапі 1024 бластомерів. Найбільше підвищення ензиматичної активності виявлено за дії 10^{-3} М 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону у 2,5 рази ($p \geq 0,999$). Амідні похідні ФО-1 та ФО-2 за вказаної концентрації спричиняли достовірне зростання активності каталази у 1,6 ($p \geq 0,999$) та 1,7 ($p \geq 0,99$) рази відповідно. Отримані нами дані підтверджують більш виражений вплив

2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону на активність каталази, порівняно з похідними ФО-1 та ФО-2.

Припускаємо, що внаслідок змін ліпідного складу зародків під впливом похідних 1,4-нафтохінону відбувається порушення рівноваги між продуктами пероксидного окиснення та системою антиоксидантного захисту в бік зменшення вмісту ТБК-позитивних продуктів та зростання активності ферментів системи антиоксидантного захисту (СОД та КАТ).

Вивчення впливу похідних 1,4-нафтохінону на глутатіонпероксидазну активність. За наявності в середовищі інкубації зародків в'юна 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону, амідних похідних ФО-1 та ФО-2, у концентраціях 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} М, виявлено достовірне дозозалежне зниження активності ГПО на всіх досліджуваних етапах розвитку. Проведені дослідження засвідчили, що на останній стадії синхронного поділу бластомерів (10 поділ) зародків в'юна більш виражені інгібувальні властивості проявляють новосинтезовані похідні. Так, за дії ФО-1 та ФО-2 на вказаній стадії ембріогенезу активність ферменту достовірно ($p \geq 0,99$) знижується на $52,13 \pm 7,62$ % та $61,88 \pm 6,23$ % порівняно з контролем. За дії 10^{-5} М 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону виявлено достовірне ($p \geq 0,99$) зниження активності ГПО на $40,82 \pm 8,04$ %.

За впливу досліджуваних похідних 1,4-нафтохінону, в концентраціях 10^{-7} , 10^{-5} , 10^{-3} М, в умовах *in vitro*, активність глутатіонпероксидази також зазнавала дозозалежного зниження. Досліджено, що у зародках в'юна, які перебували на етапі 8 поділу бластомерів, 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінон, ФО-1, ФО-2, у концентрації 10^{-7} М, призводили до зниження ензиматичної активності на $13,10 \pm 9,05$ %; $14,60 \pm 7,00$ % та $19,0 \pm 8,4$ %, порівняно з контролем. Проведені нами експерименти вказують на те, що ГПО характеризується значною чутливістю, як до дії 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону, так і до дії амідних похідних ФО-1 та ФО-2. Крім того, варто відзначити, що на завершальних етапах синхронного поділу бластомерів, більш виражений вплив на активність досліджуваного ензиму мають амідні похідні ФО-1 та ФО-2.

Дослідження впливу похідних 1,4-нафтохінону на активність Na^+ , K^+ -АТФази зародків в'юна. У результаті проведених досліджень на зародках *Misgurnus fossilis* L., за дії 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону та амідних похідних ФО-1 та ФО-2, за умов дослідження «*in vivo*» та *in vitro* встановлено, що дані сполуки проявляли дозозалежну інгібувальну дію на активність Na^+ , K^+ -АТФази плазматичної мембрани (рис. 4, 5).

Ці результати узгоджуються з даними літератури, зокрема щодо дозозалежного впливу амінокислотних похідних 1,4-нафтохінону на функціонування транспортних ферментів, а саме Na^+ , K^+ -АТФази плазматичної мембрани зародків в'юна (Генегі А.Б. та ін., 2010), проте проявляють більш виражений інгібувальний ефект. Ми припускаємо, що досліджувані похідні 1,4-нафтохінону окиснюють SH-групи амінокислот та порушують ліпідний склад, а це, в свою чергу, призводить до зміни конформації Na^+ , K^+ -АТФази. Використовуючи кореляційний аналіз ми встановили тісні кореляційні зв'язки між активністю Na^+ , K^+ -АТФази та активністю супероксиддисмутази, що ще раз засвідчує оксидативний вплив хінонових похідних. Слід відзначити, що

новосинтезовані амідні похідні мають значний вплив, оскільки їхня присутність в інкубаційному середовищі, навіть у мікромольних кількостях, призводить до зниження активності Na^+ , K^+ -АТФази мембран зародків.

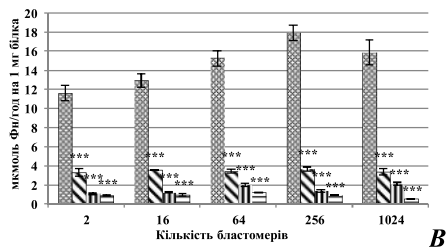
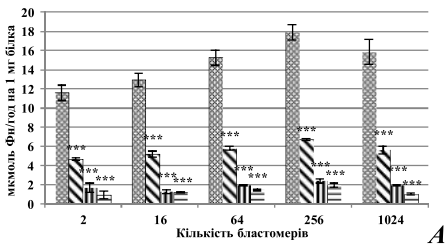
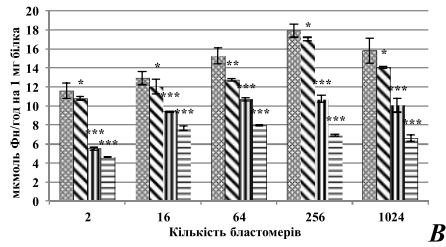
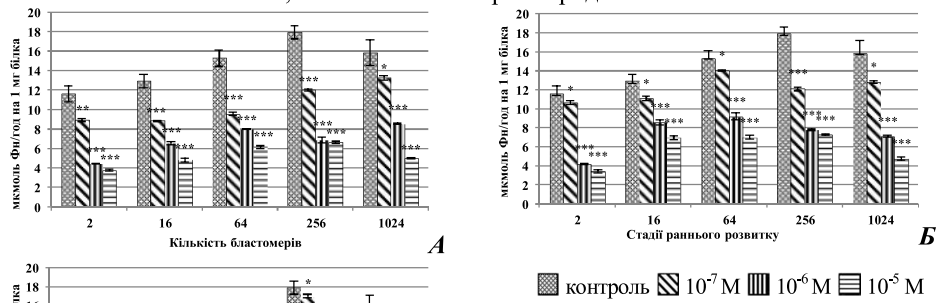


Рис. 4. Зміна активності Na^+ , K^+ -АТФази зародків в'юна на окремих стадіях розвитку, за впливу 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону (А), похідних ФО-1 (Б) та ФО-2 (В) різних концентрацій ($M \pm m$, $n = 10$) у досліді «*in vivo*»

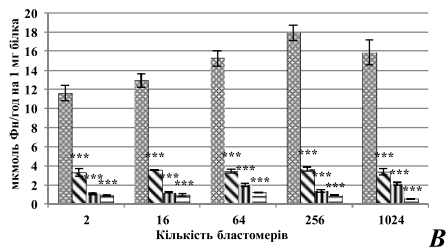
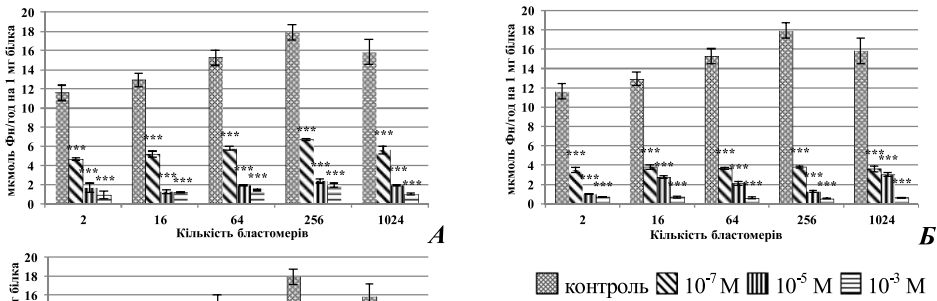
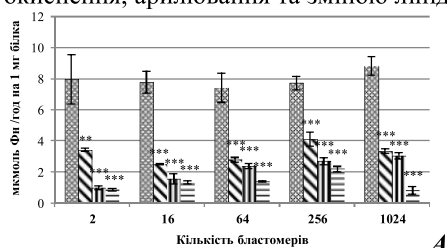


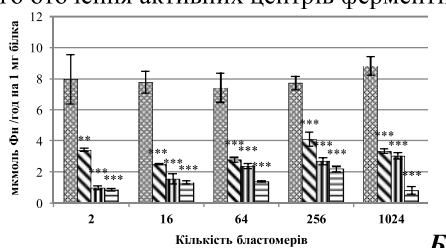
Рис. 5. Зміна активності Na^+ , K^+ -АТФази зародків в'юна на окремих стадіях розвитку, за впливу 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону (А), похідних ФО-1 (Б) та ФО-2 (В) різних концентрацій ($M \pm m$, $n = 10$) у досліді «*in vitro*»

Дослідження впливу похідних 1,4-нафтохінону на сумарну активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежних АТФаз зародків в'юна. При вивченні сумарної активності Ca^{2+} -АТФаз зародків в'юна впродовж раннього ембріогенезу, за дії досліджуваних похідних 1,4-нафтохінону, у діапазоні концентрацій 10^{-7} , 10^{-6} та 10^{-5} М, у експериментах «*in vivo*», спостерігали їхній інгібуючий дозозалежний ефект. У досліді за умов *in vitro* встановлено, що за впливу 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону, ФО-1 та ФО-2, у концентраціях 10^{-7} , 10^{-5} , 10^{-3} М, відбувалося також зниження сумарної активності Mg^{2+} -залежних Ca^{2+} -АТФаз зародків в'юна, впродовж усіх досліджуваних етапів ембріогенезу (рис. 6, 7).

Отримані нами результати узгоджуються з роботами ряду дослідників, проведеними на ізольованих гепатоцитах шурів (Nicotera P. et al., 1985), мембранних везикулах саркоплазматичного ретикулуму (Floreani M. et al., 1995; Nakamura M. et al., 2003), в яких різні за складом хінонові похідні інгібують активність Ca^{2+} -АТФаз. Ці дані свідчать про те, що інгібування хінонами сумарної активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежних АТФаз відбувається через виражене зниження білкових титрів шляхом окиснення, арилювання та зміною ліпідного оточення активних центрів ферментів.



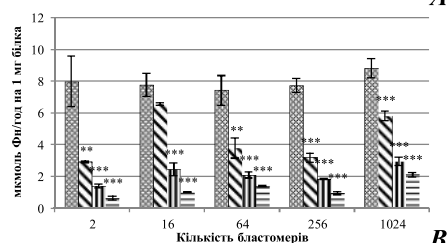
A



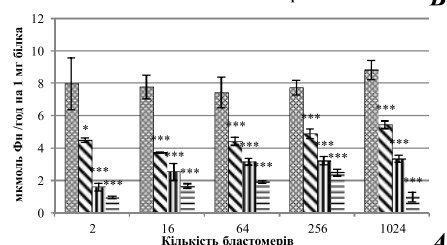
B

■ контроль ▨ 10^{-7} М ▩ 10^{-6} М ▪ 10^{-5} М

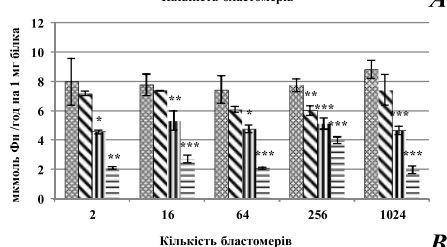
Рис. 6. Зміна сумарної Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазної активності зародків в'юна на окремих стадіях розвитку, за впливу 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону (А), похідних ФО-1 (Б) та ФО-2 (В) різних концентрацій ($M \pm m$, $n = 10$) у досліді «*in vivo*»



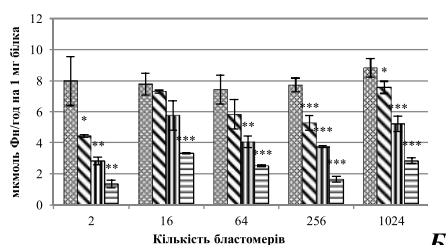
B



A



B



B

■ контроль ▨ 10^{-7} М ▩ 10^{-5} М ▪ 10^{-3} М

Рис. 7. Зміна сумарної Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазної активності зародків в'юна на окремих стадіях розвитку, за впливу 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону (А), похідних ФО-1 (Б) та ФО-2 (В) різних концентрацій ($M \pm m$, $n = 10$) у досліді *in vitro*

Зміни ультраструктури зародків в'юна за дії похідних 1,4-нафтохінону.

Ультраструктура зародків в'юна, які перебували у середовищі з похідними 1,4-нафтохінону, у концентрації 10^{-5} М, протягом першої години розвитку (2 бластомери), характеризувалася зміною електронної щільності гіалоплазми та дезорганізацією органел, порівняно з контролем, проте плазматична мембрана

бластомерів залишалася суцільною (рис. 8 Б, В, Г). Цитоплазма клітин зародків в'юна, на стадії 2-х бластомерів, була негомogeneous з підвищеною електронною щільністю гіалоплазми. Органели втрачали свої обриси, що свідчить про часткове руйнування цілісності їхніх мембран. Більшість мітохондрій, за умов впливу 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону та амідних похідних ФО-1 та ФО-2 у зазначеній концентрації, змінювали свою форму та перебували у стані набряку, а їхній матрикс заповнений речовиною низької електронної щільності, на відміну від зародків, що розвивалися за нормальних умов (рис. 8 А). У клітині збільшувалася кількість первинних та вторинних лізосом, була наявна значна кількість травних вакуоль, що свідчить про початковий етап лізису клітин.

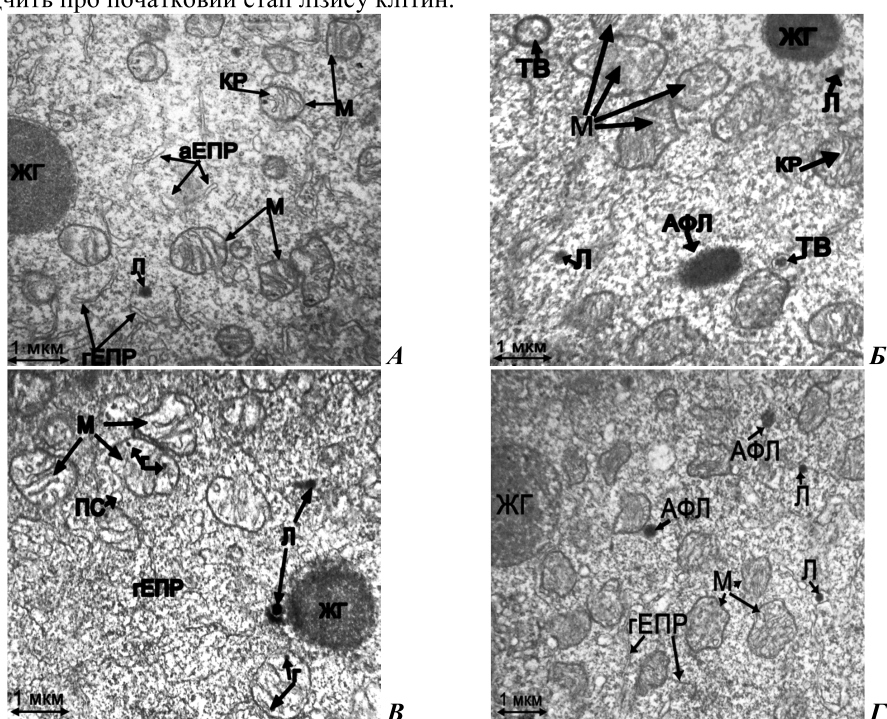


Рис. 8. Ультраструктура зародків в'юна на етапі розвитку 2 бластомерів. Контроль (А) та за умов впливу 2-гідрокси-3-хлоро-1,4-нафтохінону (Б), ФО-1 (В), ФО-2 (Г), у концентрації 10^{-5} М. Збільшення 1:10 000. АФЛ – автофаголізосома; Г – гранула; аЕПР – агранулярний ендоплазматичний ретикулум; гЕПР – гранулярний ендоплазматичний ретикулум; ЖГ – жовткова гранула; КР – кристи; Л – лізосома; М – мітохондрія; ПС – пероксисома; ТВ – травна вакуоля.

Перебування зародків у середовищі інкубації з похідними 1,4-нафтохінону, в концентрації 10^{-5} М, на шосту годину розвитку, зумовлювало більш виражені зміни, порівняно з початковим етапом розвитку (рис. 9 Б, В, Г). Сполука 2-гідрокси-3-хлоро-1,4-нафтохінон, у зазначеній вище концентрації (етап 10 поділу), спричиняла значний негативний вплив на клітини, що виявлялося руйнуванням плазматичної мембрани, значним зростанням кількості мітохондрій із пошкодженою зовнішньою

мембраною, збільшенням кількості лізосом (рис. 9 Б). Ймовірно, такі зміни є незворотними. Міжклітинний простір був відсутній. Цитоплазма бластомерів, що прилягала до мембрани клітини, збагачена органелами. Ними насичені і глибокі шари дрібнозернистої гіалоплазми. Як у глибоких, так і в кортикальних шарах цитоплазми виявлено велику кількість набряклих мітохондрій. Більша частина таких мітохондрій із непошкодженою зовнішньою мембраною. Проте їхні кристи лізовані.

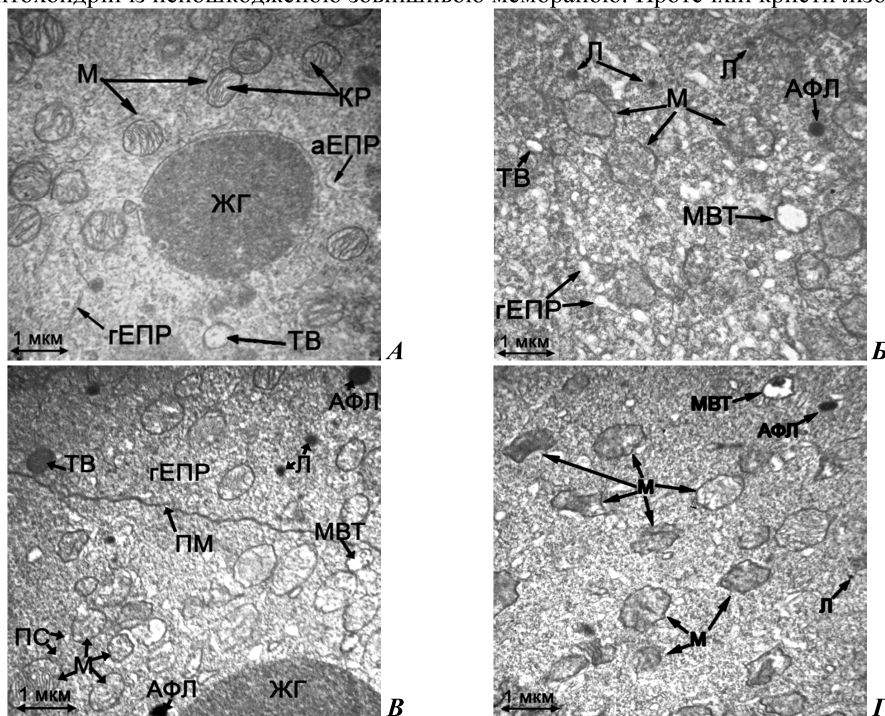
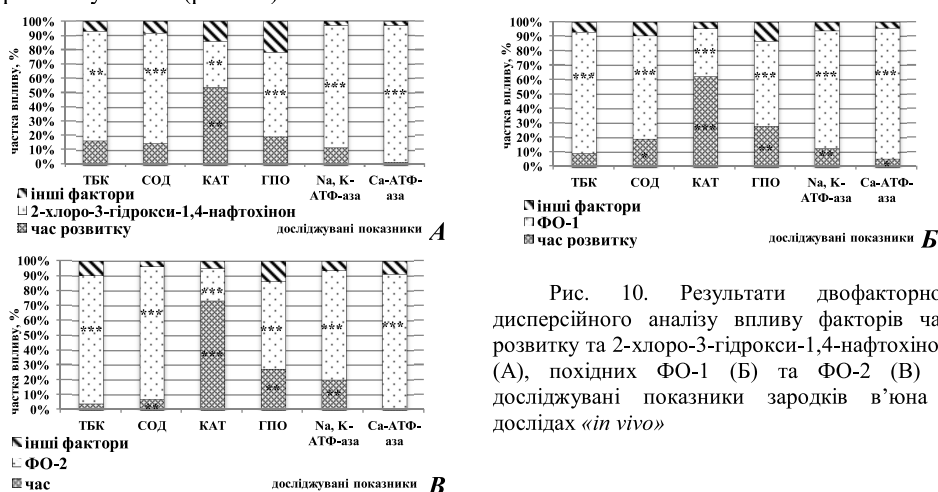


Рис. 9. Ультраструктура зародків в'юна на етапі розвитку 1024 бластомери. Контроль (А) та за умов впливу 2-гідрокси-3-хлоро-1,4-нафтохінону (Б), ФО-1 (В), ФО-2 (Г), у концентрації 10^{-5} М. Збільшення 1:10 000. МФЛ – автофаголізосома; аЕПР – агранулярний ендоплазматичний ретикулум; гЕПР – гранулярний ендоплазматичний ретикулум; ЖГ – жовткова гранула; КР – кристи; Л – лізосома; М – мітохондрія; МВТ – мультивезикулярне тілце; ПМ – плазматична мембрана; ПС – пероксисома; ТВ – травна вакуоля.

Плазматична мембрана бластомерів, за впливу амідних похідних, переважно була нечіткою, у стані «натягу», що свідчить про набрякання клітини (рис. 9 Б, В). Виявлено збільшення розмірів вторинних лізосом з електронно-темним вмістом, а також і мультивезикулярних тілець із вакуолями усередині, що може свідчити про процеси руйнування у клітині. Варто відзначити, що найменш виражені зміни є в ультраструктурі зародків, за впливу амідного похідного ФО-1 (рис. 9 В). Отже, на основі наведених результатів можна зробити висновок, що за дії 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону та похідних ФО-1 і ФО-2, у концентрації 10^{-5} М, зародки в'юна є чутливими як на першому (2 бластомери), так і на завершальному етапі синхронного розвитку (1024 бластомери).

Дисперсійний аналіз показників зародків в'юна за впливу похідних 1,4-нафтохінону. Проведений двофакторний дисперсійний аналіз впливу часу розвитку та похідних 1,4-нафтохінону на показники інтенсивності процесів ПОЛ, активності ферментів АОС, Na^+ , K^+ - та сумарної Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежних АТФаз впродовж ембріогенезу зародків в'юна. Встановлено, що більшою мірою на активність АТФаз, вміст ТБК-позитивних продуктів та ферментів системи антиоксидантного захисту, за виключенням каталази, впливали досліджувані похідні 1,4-нафтохінону у різних концентраціях, порівняно із впливом фактора часу розвитку в'юна (рис. 10).



У результаті отриманих даних можна стверджувати, що досліджувані сполуки, в умовах *in vitro*, безпосередньо впливають на утворення ТБК-позитивних продуктів та активність СОД. Варто зазначити, що проведений нами двофакторний дисперсійний аналіз впливу часу розвитку та досліджуваних похідних 1,4-нафтохінону на активність каталази в умовах *in vitro* підтверджує, що переважаючу дію має час розвитку зародків, хоча частка впливу хінонових похідних (29,5 %; 31,2 % та 29,6 %) є статистично достовірною, проте незначною (рис. 11).

Узагальнюючи отримані нами дані та дані наукової літератури, запропоновано гіпотетичну схему механізму впливу похідних 1,4-нафтохінону (2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону, ФО-1 і ФО-2) на зародки в'юна. Згідно зі схемою (рис. 12), у результаті внесення розчинів похідних 1,4-нафтохінону в інкубаційне середовище зародків останні проникають у внутрішньоклітинне середовище (ймовірно, шляхом дифузії), де призводять до зміни ліпідного профілю та інтенсифікації вільнорадикальних процесів, що відображається на активності іонтранспортувальних ферментів. Досліджувані похідні 1,4-нафтохінону (2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінон, ФО-1, ФО-2) при проникненні у внутрішньоклітинне середовище є донорами АФО, легко вступають в окисно-відновні реакції. Крім того, внаслідок змін ліпідного складу зародків під впливом похідних 1,4-нафтохінону, спостерігається порушення рівноваги між продуктами пероксидного окиснення та

системою антиоксидантного захисту в бік зменшення вмісту ТБК-позитивних продуктів та зростання активності антиоксидантної системи (СОД та КАТ). Однак хінонові сполуки спричиняють порушення функціонування іншого ензиму системи антиоксидантного захисту, що відображається у змінах його активності. Зокрема відбувається дозозалежне зниження активності глутатіонпероксидази.

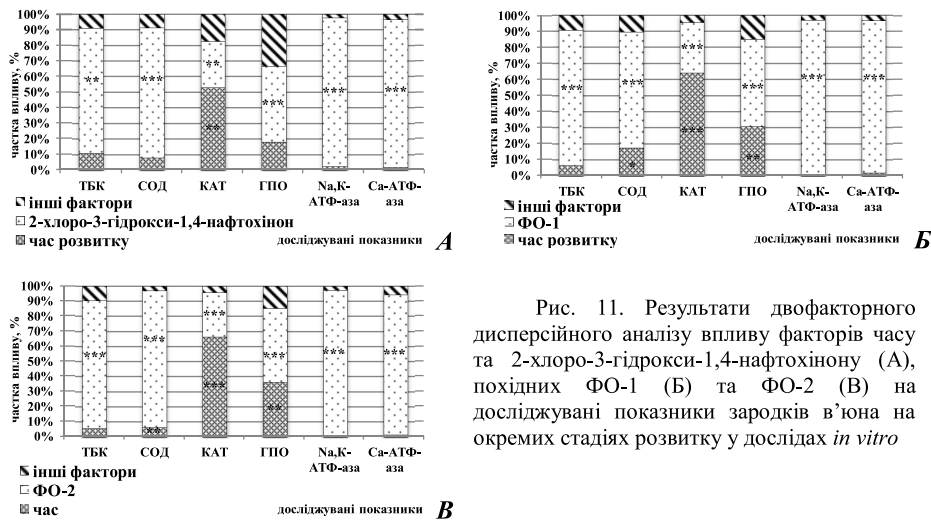
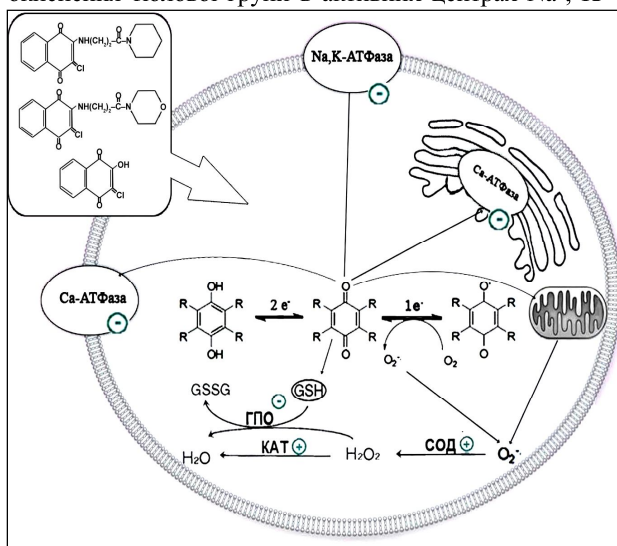


Рис. 11. Результати двофакторного дисперсійного аналізу впливу факторів часу та 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону (А), похідних ФО-1 (Б) та ФО-2 (В) на досліджувані показники зародків в'юна на окремих стадіях розвитку у досліді *in vitro*

За дії 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону, ФО-1 та ФО-2 відбувається пошкодження мембран мітохондрій і ендоплазматичного ретикулуму. Порушення структури мітохондрій призводить до підвищеного «витоку» супероксиданіон радикалу, який долучається до вже наявних вільнорадикальних процесів. Ймовірно за впливу 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону та амідних похідних ФО-1 та ФО-2 відбувається окиснення тіолової групи в активних центрах Na^+ , K^+ -АТФази та Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежних



АТФаз мембран зародкових клітин в'юна за рахунок збільшення кількості супероксиданіон радикалу, який генерується під час окисно-відновної реакції з утворенням цистеїн сульфонату, і, в кінцевому результаті, дисульфіду, що призводить до зниження активності цих ферментних систем.

Рис. 12. Гіпотетична схема впливу 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону, ФО-1 та ФО-2 на зародкові клітини в'юна

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі, відповідно до поставленої мети та завдань, досліджено вплив 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону та амідних похідних ФО-1, ФО-2 на інтенсивність процесів ПОЛ, стан АОС, ліпідний склад та на функціонування транспортних ферментів зародків в'юна впродовж раннього ембріогенезу.

1. Проведені програмні розрахунки прогнозованої біологічної активності досліджуваних похідних 1,4-нафтохінону за програмою PASS показали перспективність подальшого дослідження цих сполук, зокрема, як протипухлинних препаратів.

2. Ліпідний профіль яйцеклітин та інтактних зародків в'юна характеризується високим рівнем фосфатидилхоліну, холестеролу, моноацилгіцеролу та диацилгіцеролу. За впливу 10^{-5} М 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону й амідних похідних ФО-1, ФО-2 на зародки в'юна протягом раннього ембріогенезу ліпідний склад зазнає змін, зокрема зменшується вміст основних ліпідних компонентів, що може призвести до загибелі зародків та личинок.

3. Хінонові похідні – 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінон; 2-хлоро-3-(3-оксо-3-(піперидин-1-іл)пропіламіно)-1,4-нафтохінон та 2-хлоро-3-(3-(морфолін-4-іл)-3-оксопропіламіно)-1,4-нафтохінон призводять до розбалансування прооксидантно-антиоксидантної системи зародків в'юна. На фоні зміни активності ферментів АОС захисту організму відбувається зниження вмісту ТБК-позитивних продуктів. Спостерігається зростання активності СОД, КАТ та зменшення активності ГПО. Ступінь впливу цих сполук на активність досліджуваних ферментів є неоднаковим. Найбільш чутливою є СОД, а найменш чутливою – ГПО.

4. Досліджувані сполуки як у низьких, так і у високих концентраціях викликають значне дозозалежне зниження активності Na^+ , K^+ -АТФази та сумарної Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежних АТФаз зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L. Включення в структуру хіноїдної сполуки морфолінового та піперидинілового фрагментів сприяє більш вираженим інгібувальним властивостям похідних ФО-1 і ФО-2, порівняно з 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохіноном, який є вихідною сполукою їхнього синтезу.

5. Інкубування зародків в'юна у середовищі, що містить розчини 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінон та амідні похідні ФО-1 і ФО-2 у концентраціях 10^{-3} та 10^{-4} М призводить до зупинки поділу бластомерів на початкових етапах раннього розвитку. Зменшення концентрації досліджуваних хінонових сполук у середовищі інкубації зародків до 10^{-5} – 10^{-6} М не веде до 100%-ї загибелі личинок. Аналіз ультраструктури зародків свідчить про те, що всі досліджувані сполуки у концентрації 10^{-5} М справляють негативну дію на структуру клітин зародків, що проявляється в порушенні цілісності мембран, пошкодженні мітохондрій, втраті ними крист, підвищеній кількості лізосом.

6. За допомогою двофакторного дисперсійного аналізу встановлено, що досліджувані сполуки мають прямий безпосередній вплив на вміст ТБК-позитивних продуктів, активність СОД, ГПО, Na^+ , K^+ -АТФази та Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежних АТФаз впродовж раннього ембріогенезу в'юна, проте на активність КАТ переважаючий вплив має фактор часу розвитку зародків.

СПИСОК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Bezkorovaynyj A.O.** Loach embryos prooxidant-antioxidant status under the influence of amide derivatives of 1,4-naphthoquinone / A.O. Bezkorovaynyj, A.R. Zyn, N.M. Narasym, J.T. Len, O.M. Figurka, D.I. Sanagursky // Ukr. Biochem. J. – 2016. – Vol. 88, N 3. – P. 46–53. (*Дисертант самостійно виконав усю експериментальну частину досліджень, статистично опрацював отримані дані, взяв активну участь в аналізі результатів досліджень, написанні та оформленні статті*).

2. **Безкоровайний А.О.** Активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази мембран зародків в'юна впродовж раннього ембріогенезу за дії амідних похідних нафтохінону / А.О. Безкоровайний, А.Р. Зинь, Н.П. Гарасим, Д.І. Санагурський // Вісник Львів. ун-ту. Сер. біологічна. – 2016. – Випуск 73. – С. 22–28. (*Дисертанту належить опрацювання робочої схеми експерименту, отримання й аналіз експериментальних і літературних даних, участь у написанні та оформленні статті*).

3. **Безкоровайний А.О.** Ультраструктура зародків в'юна за впливу новосинтезованих амідних похідних 1,4-нафтохінону / А.О. Безкоровайний, А.Р. Зинь, Ю.Т. Лень, Н.П. Гарасим, Д.І. Санагурський // Науковий вісник Східноєвропейського національного ун-ту ім. Лесі Українки. Серія біологічні науки. – 2016. – № 12 (337). – С. 149–156. (*Дисертант проаналізував обсяг експериментального матеріалу та написав статтю*).

4. **Безкоровайний А.О.** Ліпідний профіль яйцеклітини в'юна *Misgurnus fossilis* L. / А.О. Безкоровайний, А.Р. Зинь, Н.П. Гарасим, Д.І. Санагурський // Експериментальна і клінічна біохімія. – 2015. – Випуск 16 (№ 3). – С. 70–72. (*Дисертанту належить ідея, покладена в основу статті, опрацювання літературних даних та власних результатів, написання статті*).

5. **Безкоровайний А.О.** Морфологічні зміни зародків та личинок в'юна за впливу амідних похідних 1,4-нафтохінону / А.О. Безкоровайний, А.Р. Зинь, Н.П. Гарасим, Ю.Т. Лень, О.М. Фігурка, Д.І. Санагурський // Біол. студії / Stud. Biologica. – 2015. – Том 9 (3). – С. 79–89. (*Дисертант опрацював дані літератури та власні результати, йому належить участь в експериментальній роботі та написанні статті*).

6. **Безкоровайний А.О.** Перспективи застосування мас-спектрометрії для визначення ліпідного профілю зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L. / А.О. Безкоровайний, А.Р. Зинь, Н.П. Гарасим, Д.І. Санагурський // Молодь і поступ біології: зб. тез X Міжн. наук. конф. студ. та асп., 8–11 квітня 2014 р. – Львів, 2014. – С. 9.

7. **Безкоровайний А.О.** Ліпідний профіль в'юна *Misgurnus fossilis* L. в період запліднення та раннього ембріогенезу / А.О. Безкоровайний, А.Р. Зинь, Н.П. Гарасим, Д.І. Санагурський // Збірник наукових праць за матеріалами I Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю “Сучасні проблеми викладання та наукових досліджень біології у ВНЗ України”, 8–9 жовтня 2014 р. – Дніпропетровськ, 2014. – С. 14–15.

8. **Безкоровайний А.О.** Вплив амідних похідних 1,4-нафтохінону на морфологічні зміни зародків та личинок в'юна / А.О. Безкоровайний, А.Р. Зинь, Н.П. Гарасим, Ю.Т. Лень, Д.І. Санагурський // Біологічні дослідження – 2016: зб. наукових праць VII всеукраїнська науково-практична конференція для молодих учених і студентів, 10–11 березня 2016 р. – Житомир, 2016. – С. 22–28.

9. **Безкоровайний А.О.** Вплив амідних похідних 1,4-нафтохінону на прооксидантно - антиоксидантний гомеостаз зародків в'юна / А.О. Безкоровайний, А.Р. Зинь, Н.П. Гарасим, Д.І. Санагурський // Молодь і поступ біології: зб. тез XII Міжн. наук. конф. студ. та асп., 9–21 квітня 2016 р. – Львів, 2016. – С. 5–6.

10. **Безкоровайний А.О.** Дослідження активності глутатіонпероксидази зародків в'юна впродовж раннього ембріогенезу за впливу похідних 1,4-нафтохінону / А.О. Безкоровайний, А.Р. Зинь, Н.П. Головчак, Д.І. Санагурський // Збірник наукових праць за матеріалами Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю “Тернопільські біологічні читання – Ternopil Bioscience – 2017” присвяченої 20-річчю заснування наукового фахового видання України “Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка”, 20–22 квітня 2017 р. – Тернопіль, 2017. – С. 306–309.

11. **Безкоровайний А.О.** Сумарна активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази мембран зародків в'юна за впливу амідних похідних 1,4-нафтохінону / Безкоровайний А.О., Зинь А.Р., Гарасим Н.П., Санагурський Д.І. // Молодь і поступ біології: зб. тез XIII Міжн. наук. конф. студ. та асп., 25–27 квітня 2017 р. – Львів, 2017. – С. 19–20.

12. **Безкоровайний А.О.** Дослідження активності Na^+ , K^+ -АТФази мембран зародків в'юна впродовж раннього ембріогенезу за впливу похідних 1,4-нафтохінону / А.О. Безкоровайний, А.Р. Зинь, Н.П. Гарасим, Д.І. Санагурський // Біологічні дослідження – 2017: зб. наукових праць VIII всеукраїнської науково-практичної конференції для молодих учених і студентів, 14–16 березня 2017 р. – Житомир, 2017. – С. 250–252.

13. **Безкоровайний А.О.** Кореляційний аналіз показників інтенсивності процесів ліпопероксидації та активності антиоксидантної системи зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L. за впливу 2-хлоро-3-(3-(морфолін-4-іл)-3-оксопропіламіно)-1,4-нафтохінону / А.О. Безкоровайний, А.Р. Зинь, Н.П. Гарасим, Д.І. Санагурський // Збірник наукових праць за матеріалами IV міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні питання сучасної науки», 03–04 червня 2016 р. – Одеса, 2016. – С. 29–32.

14. **Безкоровайний А.О.** Вплив амідних похідних 1,4-нафтохінону на ліпідний профіль зародків в'юна / Безкоровайний А.О., Зинь А.Р., Гарасим Н.П., Санагурський Д.І. // Молодь і поступ біології: зб. тез XIV Міжн. наук. конф. студ. та асп., 10–12 квітня 2018 р. – Львів, 2018. – С. 44–45.

АНОТАЦІЯ

Безкоровайний А.О. Ліпідний профіль, вільнорадикальні та транспортні процеси зародків в'юна за впливу похідних 1,4-нафтохінону. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.02 – біофізика. – Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів, 2018.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню впливу 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінону та новосинтезованих амідних похідних ФО-1 та ФО-2 на ліпідний профіль, прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз та функціонування іонтранспортних ферментних систем мембран: Na^+ , K^+ -АТФази та сумарної Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежних АТФаз зародкових клітин в'юна протягом раннього ембріогенезу.

Встановлено, що 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінон, похідні ФО-1 та ФО-2 впливають на ліпідний профіль зародків та призводять до зниження вмісту ліпідів на всіх досліджуваних стадіях розвитку. Проведені дослідження на зародках *Misgurnus fossilis* L. за дії похідних 1,4-нафтохінону, за умов дослідження *in vivo* та *in vitro* вказують на те, що ці сполуки проявляють дозозалежну інгібувальну дію на активність Na^+ , K^+ -АТФази та сумарної активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежних АТФаз мембран зародкових клітин, впливають на вміст ТБК-позитивних продуктів та

приводять до розбалансування активності ензимів антиоксидантної системи. На фоні зростання активності супероксиддисмутази та каталази зафіксоване зниження активності глутатіонпероксидази.

За результатами двофакторного дисперсійного аналізу вперше встановлено, що 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінон та амідні похідні ФО-1 та ФО-2 чинять значний вплив на вміст ТБК-позитивних продуктів, активність ензимів АОС (супероксиддисмутази, каталази та глутатіонпероксидази), Na^+ , K^+ - та сумарну Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазні активності.

Ключові слова: ліпідний профіль, прооксидантно-антиоксидантна рівновага, 2-хлоро-3-гідрокси-1,4-нафтохінон, амідні похідні 1,4-нафтохінону, Na^+ , K^+ -АТФаза, сумарна Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежна АТФаза.

АННОТАЦИЯ

Безкорвайный А.О. Липидный профиль, свободнорадикальные и транспортные процессы зародышей вьюна при действии производных 1,4-нафтохинона. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук (доктора философии) по специальности 03.00.02 – биофизика. – Львовский национальный университет имени Ивана Франко, Львов, 2018.

Диссертационная работа посвящена исследованию влияния 2-хлор-3-гидрокси-1,4-нафтохинона и новосинтезированных амидных производных ФО-1 ФО-2 на липидный профиль, прооксидантно-антиоксидантный гомеостаз и функционирования ионтранспортных ферментных систем мембран: Na^+ , K^+ -АТФазы и суммарной активности Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимых АТФаз зародышевых клеток вьюна в течении раннего эмбриогенеза.

Установлено, что 2-хлор-3-гидрокси-1,4-нафтохинон, производные ФО-1 и ФО-2 влияют на липидный профиль зародышей и приводят к снижению содержания липидов на всех исследуемых стадиях развития. Проведенные исследования на зародышах *Misgurnus fossilis* L. при действии производных 1,4-нафтохинона, в условиях исследования «*in vivo*» и *in vitro* указывают на то, что данные соединения проявляют дозозависимое ингибирующее действие на активность Na^+ , K^+ -АТФазы и суммарной активности Ca^{2+} -АТФазы мембран зародышевых клеток, влияют на содержание ТБК-положительных продуктов и приводят к разбалансировке активности энзимов антиоксидантной системы. На фоне роста активности супероксиддисмутазы и каталазы зафиксировано снижение активности глутатіонпероксидазы.

По результатам двухфакторного дисперсионного анализа впервые установлено, что 2-хлор-3-гидрокси-1,4-нафтохинон и амидные производные ФО-1 и ФО-2 оказывают значительное влияние на содержание ТБК-ПП, активность энзимов АОС (супероксиддисмутаза, каталаза и глутатіонпероксидаза), Na^+ , K^+ -АТФаза и суммарной активности Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаз.

Ключевые слова: липидный профиль, прооксидантно-антиоксидантное равновесие, 2-хлор-3-гидрокси-1,4-нафтохинон, амидные производные 1,4-нафтохинона, Na^+ , K^+ -АТФаза, суммарная активность Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимых АТФаз.

SUMMARY

Bezkorovaynyj A.O. Lipid profile, free radical and transport processes in loach embryos under the influence of 1,4-naphthoquinone derivatives. – Manuscript.

Thesis on obtaining a scientific degree of Ph.D. in biological sciences, speciality of 03.00.02 – biophysics. – Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, 2018.

The thesis is devoted to research the impact of 2-chloro-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone and newly synthesized amide derivatives – 2-chloro-3-(3-oxo-3-(piperidine-1-yl)propylamine)-1,4-naphthoquinone (FO-1), 2-chloro-3-(3-(morpholine-4-yl)-3-oxopropylamine)-1,4-naphthoquinone (FO-2) on the lipid profile, prooxidant-antioxidant homeostasis and functioning of ion-transporting enzyme systems: Na^+ , K^+ - and summary Ca^{2+} , Mg^{2+} -dependent ATPases of embryonic cells during early embryogenesis.

It was established that all investigated compounds at concentrations of 10^{-3} - 10^{-5} M exhibit embryotoxic effect causing delay and abnormalities of embryos and larvae development that indicate an ability of the studied naphthoquinone derivatives to penetrate perivitelline space and blastomeres plasma membrane. Quinone derivatives cause damage to integrity of the cytoplasm membrane, the release of intracellular components into incubation medium and, ultimately, embryos death.

The ultrastructure of loach embryos which were incubated in medium with derivatives of 1,4-naphthoquinone at concentration of 10^{-5} M during the first hour of development (2 blastomeres) and at sixth hour of development (1024 blastomeres) was characterized by a change in the electron density of the hyaloplasm and by the disorganization of organelles, occurs damage of mitochondria and endoplasmic reticulum membranes. It should be noted that all investigated compounds at concentrations of 10^{-5} M cause destruction of the embryo cells structure, which shows itself as a violation of the integrity of the membranes, damage to the mitochondria, loss of cristae, and an increase in the number of lysosomes.

The results of studies on the *Misgurnus fossilis* L. embryos which developed in the presence of 2-chloro-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone and amide derivatives FO-1 and FO-2 in the medium of incubation showed that these compounds influenced on the lipid profile of the embryos and lead to a decrease in lipid content at all stages of development. Conducted «*in vivo*» and *in vitro* studies of the action of 2-chloro-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone and the amide derivatives of FO-1 and FO-2 on the *Misgurnus fossilis* L. embryos indicate that these compounds exhibit dose-dependent inhibitory effect on the activity Na^+ , K^+ -ATPase and summary Ca^{2+} -ATPase of embryos cell membranes, influence on the TBARS content and lead to imbalance of antioxidant defense system. The activities of superoxide dismutase and catalase increase in a dose-dependent manner while the activity of glutathione peroxidase decrease occurs.

According to the results of a two-factor ANOVA, it was first established that 2-chloro-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone and amide derivatives of FO-1 and FO-2 have a significant impact on the content of TBARS, the activity of antioxidant system enzymes (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase), Na^+ , K^+ and total Ca^{2+} , Mg^{2+} -dependent ATPase.

Key words: lipid profile, prooxidant-antioxidant balance, 2-chloro-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone, amide derivatives of 1,4-naphthoquinone, Na^+ , K^+ -ATPase, total Ca^{2+} , Mg^{2+} -dependent ATPases.

Підписано до друку 29.05.18
Формат 60x84/16. Папір офсетний.
Друк на різнографі. Зам. №29/05-1
Ум. друк. арк. 0,9
Наклад 100 прим.

Видавництво “Галич-Прес”
Видавець ФОП Король І.В.
м. Львів, вул. Гнатюка, 17
Ел. пошта: lvivprint@ukr.net. Тел. 096-59-88-924
Свідоцтво ДК №5353 від 24.05.2017 р.