

Висновок. Отже, на процес очищення мелясної післяспиртової барди впливає багато чинників: температура, рН, культура мікроорганізмів. Проте актуальною проблемою залишається пошук оптимальних умов для швидкого та глибокого перебігу процесу з мінімальними затратами на попередню обробку барди, що дасть змогу використовувати його у промисловості.

1. Домарецький В., Шиян П. Джерело відновлюваної енергії // Харчова і переробна промисловість. – 2007. – № 6. 2. Колобродов В.Г., Хажмурадов М.А., Карнацевич Л.В. Анаэробная переработка отходов и проблемы утилизации биогаза // Экологический вестник. – Листопад-грудень, 2004. – С. 20–22. 3. Малюжко О., Нікітін Г., Салюк А. Утилізація пивоварних стоків // Харчова і переробна промисловість. – 2001. – № 6. – С.14–15. 4. Калюжний С.В., Пузанков А.Г., Варфоломеев С.Д. Биогаз: проблемы и решения. (Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР). – М., 1988. – Т. 21. – 180 с. 5. Фертман Г.И., Шойхет М.И. Технология спиртового и ликеро-водочного производства. – М.: Пищевая промышленность, 1973. – 280 с.

УДК: 577.35:577.25.5+577.17.02

О. Яремкевич, М. Бура*, С. Мандзинець*, В. Лубенець,
В. Новіков, Д. Санагурський*

Національний університет «Львівська політехніка», кафедра технології
біологічно активних сполук, фармації та біотехнології,

*Львівський національний університет імені Івана Франка, кафедра
біофізики та біоінформатики

ЗМІНИ ДИНАМІКИ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦІАЛУ ЗАРОДКІВ В'ЮНА ПІД ВПЛИВОМ ТІОСУЛЬФОНАТІВ

© Яремкевич О., Бура М., Мандзинець С., Лубенець В., Новіков В., Санагурський Д., 2009

Досліджено вплив новосинтезованих біологічно активних речовин солей тіосульфокислот концентрацією 10^{-3} г/мл на зміни електрофізіологічних параметрів зародків в'юна (*Misgurnus fossilis* L.), а саме на зміни динаміки мембранного потенціалу плазматичних мембран зародків в'юна та активність мембранних ферментів протягом періоду синхронного дроблення бластомерів у ранньому періоді їх розвитку. Проведена оцінка впливу цих речовин і показані часткові порушення іонних транспортних систем, які відіграють важливу роль під час генерації електричних потенціалів у клітині. Це пов'язано з інгібуванням деяких біосинтетичних процесів, що і відобразилося на динаміці ТМП.

The influence of novel biological-active substances on the changes of electrophysiological parameters of embryonic cells in early development of fish (*Misgurnus fossilis* L.), namely, on the changes of membrane potential and enzyme activity of plasmatic membranes of embryos of loach during the period of synchronous division of blastomers in the early period of development was appraised. The evaluation of influence of these matters is conducted and partial violations of ionic transport which play an important role during the generation of electric potentials in a cell. It is related to inhibition of some biosintetic processes, that and represented on the dynamics of TMP.

Аналіз попередніх досліджень і публікацій. Естери тіосульфокислот проявляють різноманітні види біологічної дії. Найбільшої уваги під час дослідження біологічної активності тіосульфонатів приділялись вивченню їх антимікробної дії [1–7] та встановленню механізму цієї дії у біологічних об'єктах [8, 9].

Тіосульфони проявляють високу реакційну здатність, володіють широким спектром біологічної дії та мають вищу антимікробну активність і є стабільнішими, ніж їх близький аналог природний антибіотик аліцин (*Allium sativum L.*). Високий індекс і широкий спектр антимікробної активності тіосульфонів, їх стабільність та низька токсичність дали змогу запропонувати ці сполуки як лікарські субстанції [6, 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]. Протипухлинну дію проявляють амініотіосульфони [16]. Встановлено, що феніловий естер метантіосульфоїкислоти має селективну протипухлинну дію і може конкурувати з іншими протилейкемічними засобами [16, 17].

Подальше дослідження тіосульфонів є актуальним та перспективним і дасть можливість поглибленого розуміння механізмів біологічної дії цих речовин та покращання їхніх лікувальних властивостей, і матиме вагоме значення для фармакології і медицини.

Мета. Мета роботи полягала у з’ясуванні впливу солей тіосульфоїкислот різної структури у концентрації 10^{-3} г/мл, синтезованих на кафедрі ТБСФБ Національного університету “Львівська політехніка”, а саме, метилтіосульфонату, етилтіосульфонату, параамінотіосульфонату калію та натрію, на деякі аспекти реакції мембран зародкових клітин прісноводної кісткової риби в’юна *Misgurnus fossilis L.* в період раннього ембріогенезу, зокрема, на трансмембранний потенціал (ТМП) та активність Na^+ , K^+ -АТФази впродовж перших поділів бластомерів.

Виконання експерименту. Овуляцію стимулювали внутрішньом’язовим введенням самкам хоріогонічного гонадотропіну (500 од.). Ікру одержували через 36 год після стимуляції та запліднювали в чашках Петрі 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 Гольтфретера при температурі 20–22°C. Стадії розвитку контролювали візуально під бінокулярним мікроскопом МБС-9. Для вимірів електрофізіологічних параметрів клітин зародків протягом перших дроблень і бластуляції при мінімальному пошкодженні морфологічної та функціональної цілісності нами була використана установка для електрофізіологічних досліджень, блок-схема якої наведено на рис. 1.

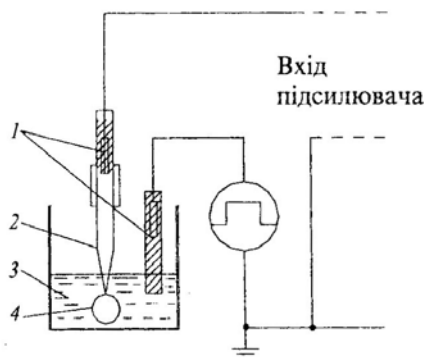


Рис. 1. Блок-схема установки: 1 – сольові містки – 3М розчин КСІ; 2 – скляний пірексівий мікроелектрод; 3 – розчин Гольтфретера; 4 – зародок

Для проведення досліджень зародок в’юна переносили в камеру з оргскла та за допомогою механічних мікроманіпулярів, контролюючи під мікроскопом МБС-9, вводили мікроелектрод, заповнений 3М розчином КСІ та виготовлений зі скла "Пірекс", опір якого не перевищував 10 МОм.

Рівень мембранного потенціалу (МП) реєстрували за допомогою монолітного операційного підсилювача типу ОРА128 (рис. 2), в якому використовується особлива геометрія діелектрично ізольованих польових транзисторів, що забезпечує вищі параметри, ніж в гібридних операційних підсилювачах. Цей підсилювач біопотенціалів вимірює потенціал в діапазоні ± 100 мВ із внутрішнім

опором порядку 100 кОм. Для зменшення впливу вхідного опору підсилювача на результат вимірювання бажано забезпечити його роботу на рівні 10 ГОм. Такий великий вхідний опір можуть забезпечити лише операційні підсилювачі (ОП) з польовими транзисторами на вході.

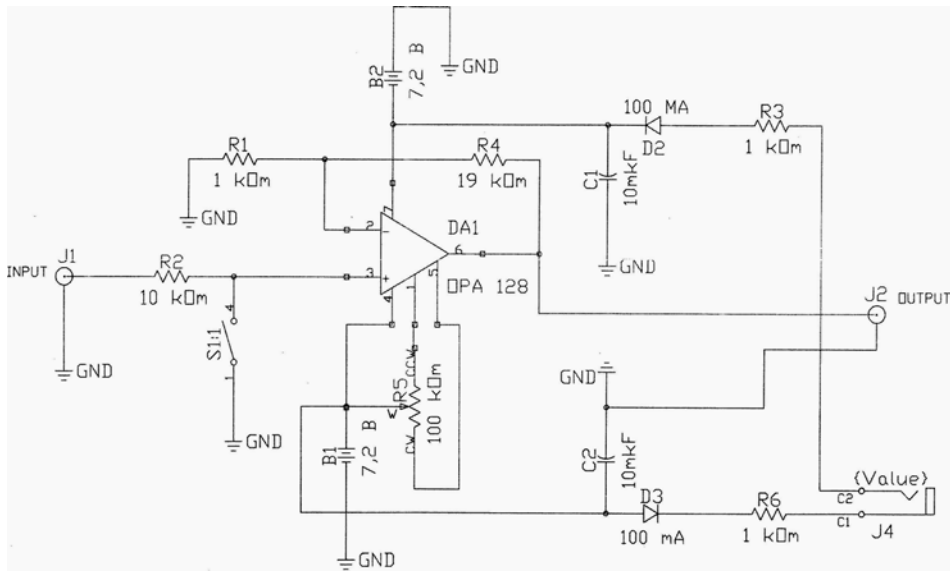


Рис. 2. Схема підсилювача

Сигнал з виходу підсилювача подається на вхід аналого-цифрового перетворювача (АЦП) (рис. 3). У цьому випадку використовується АЦП фірми МАХІМ типу МАХ1243. Це десятирозрядний АЦП, який забезпечує похибку перетворення, не більшу за 0,3% (відносна похибка, диференціальна нелінійність, похибка зміщення, похибка внутрішнього підсилювача). Напруга живлення +5 В. Нам необхідно досліджувати біопотенціали, що змінюються в діапазоні ± 100 мВ. При коефіцієнті підсилення підсилювача біопотенціалів – 20, напруга на вході АЦП змінюватиметься в діапазоні ± 2 В. Цей АЦП може перетворювати вхідну напругу від 0 до + оптимальних U.

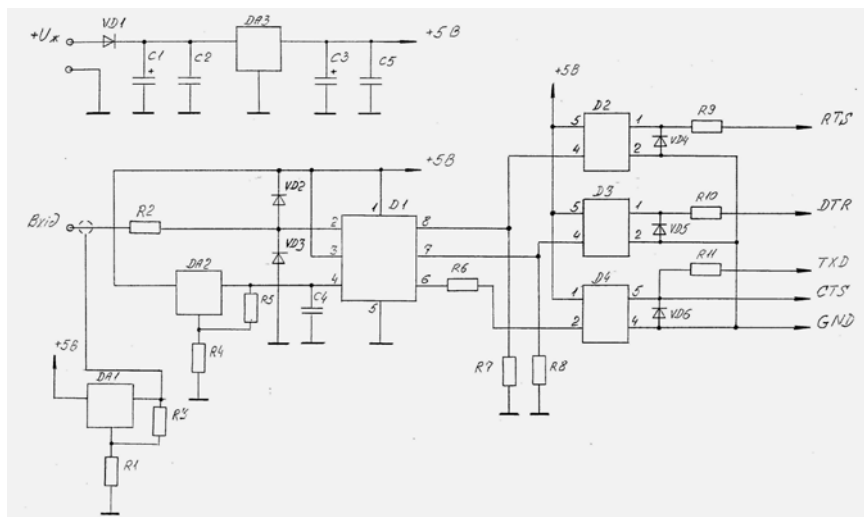


Рис.3. Схема АЦП

Для роботи з вхідним сигналом в діапазоні ± 2 В застосовуємо 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.

При неперервній реєстрації МП у момент раннього розвитку зародків в розчині Гольтфретера спостерігались періодичні зміни його рівня, які були синхронні з циклами клітинного поділу. Гіперполяризація мембрани зародків шпорцевої жаби припадала на інтерфазу клітинного циклу, деполаризація – на мітоз [19]. Максимальних значень МП досягали в прометафазі. У цей час під мікроскопом добре видно початок закладання борозни наступного поділу. Період та амплітуда коливань мембранного потенціалу в контролі протягом в'юна часу дроблення бластомерів є приблизно однаковою величиною і становить 31 хв, що відповідає тривалості клітинного циклу. Зменшення амплітуди та частоти коливань трансмембранного потенціалу супроводжується сповільненням розвитку зародків [20], яке підтверджувалось морфогенетичним аналізом личинок в'юна. Динаміка МП, як вказують автори [21], істотно змінюється внаслідок впливу зовнішніх факторів – фізичних та хімічних – і є чутливим показником гомеостазу клітини, що і спонукало нас розглянути деякі аспекти впливу хімічних факторів, а саме, солей тіосульфокислот на зміни МП.

Як видно з отриманих нами даних, при неперервній реєстрації МП в розчині Гольтфретера (контроль) спостерігались періодичні зміни його рівня – період та амплітуда коливань мембранного потенціалу в контролі протягом в'юна часу дроблення бластомерів є приблизно однаковою величиною і становить 31 хв, що відповідає тривалості клітинного циклу (рис. 1 та 2, криві 3). Гіперполяризація мембрани зародків в'юна припадала на інтерфазу клітинного циклу, деполаризація – на мітоз. Максимального значення МП досягали в прометафазі. У цей час під мікроскопом добре видно початок закладання борозни наступного поділу (за вищезазначеними літературними даними).

Для електрофізіологічних досліджень нами були взяті дві групи тіосульфатів з різними функціональними групами 1) метил- та етилтіосульфат калію; 2) параамінобензолтіосульфат калію та натрію у концентрації 10^{-3} г/мл, структура яких підтверджена елементним аналізом та спектральним методом.

У результаті проведених досліджень виявлено, що під час неперервної реєстрації ТМП у момент раннього розвитку зародків в'юна як в контрольному розчині, так і в досліджуваних речовинах спостерігались періодичні зміни його рівня, які були синхронні з циклами клітинного поділу зі збереженням ритму коливань (рис. 5, 6), що свідчить про неагресивну дію даних речовин на електрогенез клітинних мембран. Це підтверджується морфогенетичними дослідженнями зародків в'юна після дії відповідних тіосульфатів протягом двох діб розвитку (рис. 4), у яких не спостерігається затримки поділів бластомерів та змін у формуванні зародкових шарів зародків.

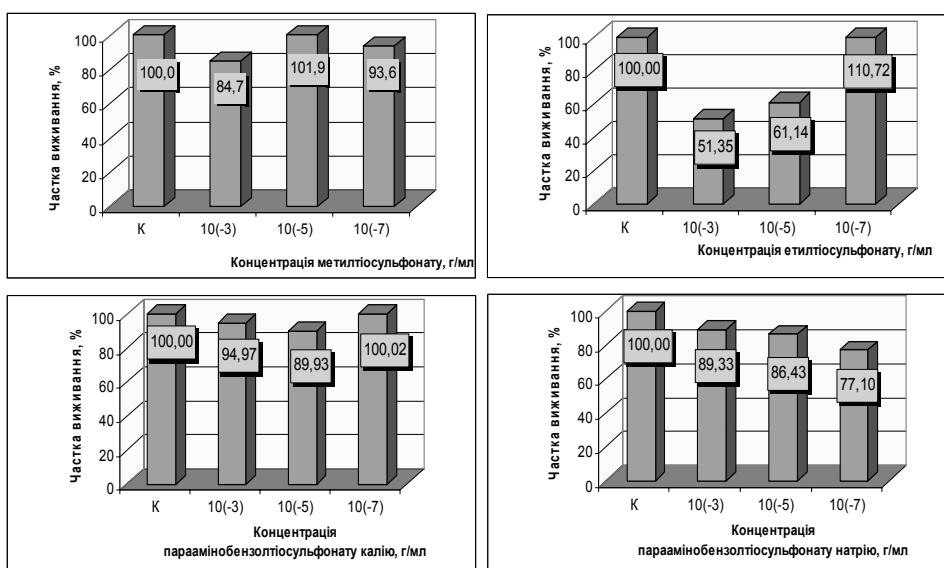


Рис. 4. Виживання зародків під впливом тіосульфатів

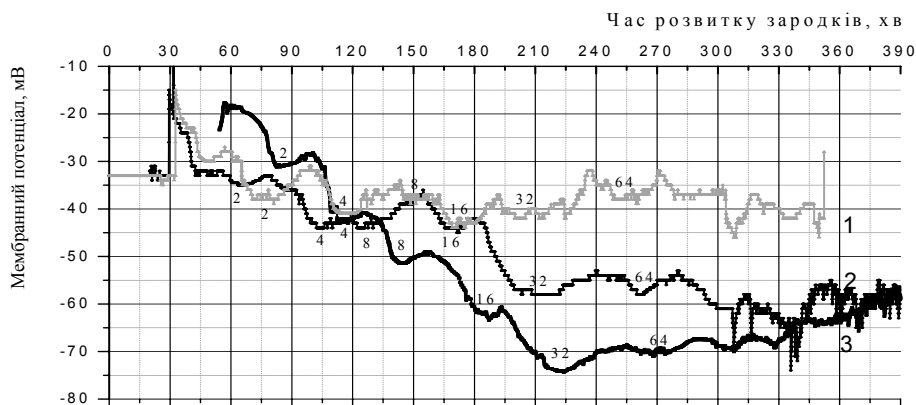


Рис. 5. Вплив метил- (1) та етилтіосульфонату калію (2) концентрацією 10^{-3} г/мл на ТМП в ранньому розвитку зародків в'юна (3- контроль)

Однак, у всіх досліджуваних речовинах (рис. 5 та 6, криві 1, 2) значення періоду та амплітуди коливань мембранного потенціалу зберігались як і у контрольних, тільки протягом перших двох поділів (2–4 бластомери), а у наступних (від 8 бластомерів) спостерігалось зменшення амплітуди та помітне зниження абсолютних величин досліджуваного показника з порушенням суворой періодичності коливань ТМП.

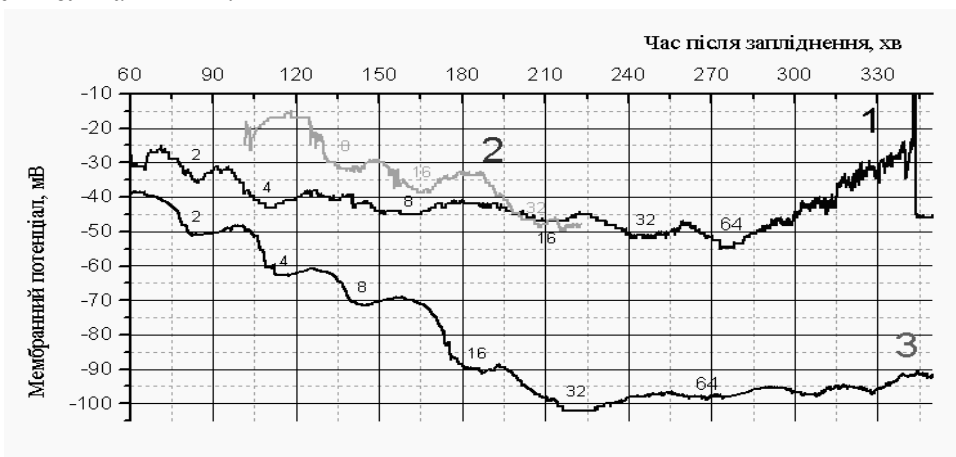
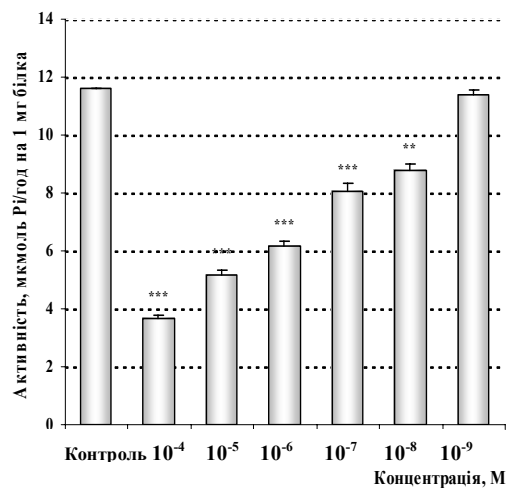
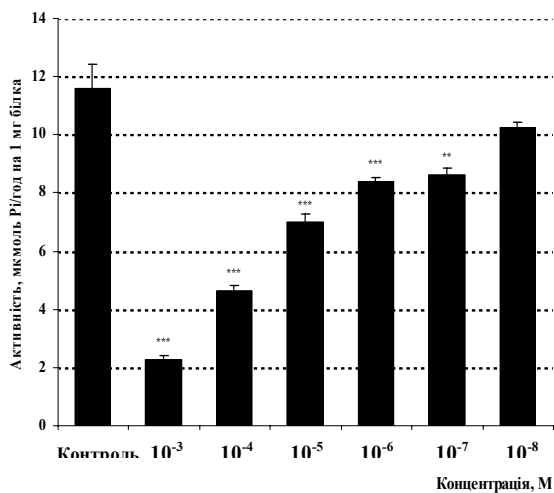


Рис. 6. Вплив параамінобензолтіосульфонату натрію (1) та калію (2) концентрацією 10^{-3} г/мл на ТМП в ранньому розвитку зародків в'юна (3- контроль)

Очевидний зсув у наростанні максимальних значень рівня ТМП спостерігався при дослідженні метилтіосульфонату (рис. 5, крива 1) та параамінобензолтіосульфонату натрію (рис. 6, крива 1), що свідчить про часткові порушення іонних транспортних систем у мембранах, які відіграють важливу роль під час генерації електричних потенціалів у клітині. Можливо, це пов'язано з інгібуванням деяких біосинтетичних процесів, що і відображається на динаміці ТМП.

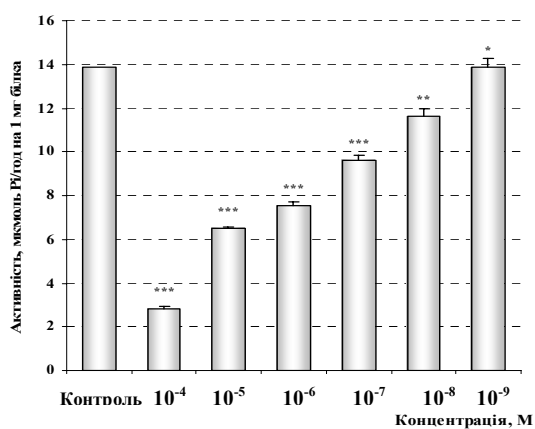
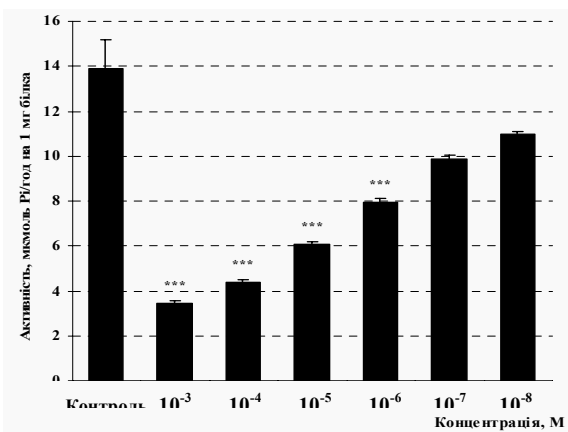
Це підтверджується результатами біохімічного аналізу, а саме дослідження активності Na^+ , K^+ -АТФази зародків за умов впливу метилтіосульфонату калію та параамінобензолтіосульфонату калію при відповідних концентраціях упродовж 6 годин розвитку (рис. 7-10). Активність Na^+ , K^+ -активованої, Mg^{2+} -залежної аденозинтри- фосфатази визначали на мембранних фракціях методом диференційного центрифугування гомогенату зародкових клітин в'юна за різницею активностей у відсутності оубаїну та при його додаванні. Кількість білка визначали за методом Лоурі на спектрофотометрі при довжині хвилі 700 нм. За калібрувальною кривою через величину екстинції визначали вміст неорганічного фосфору (Рн) в пробі та за формулою розраховували Na^+ , K^+ -АТФазну активність мембран зародків (у мкмольх Рн/мг білка за год).



А

Б

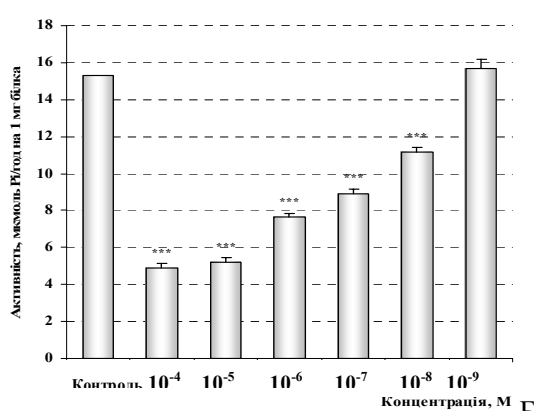
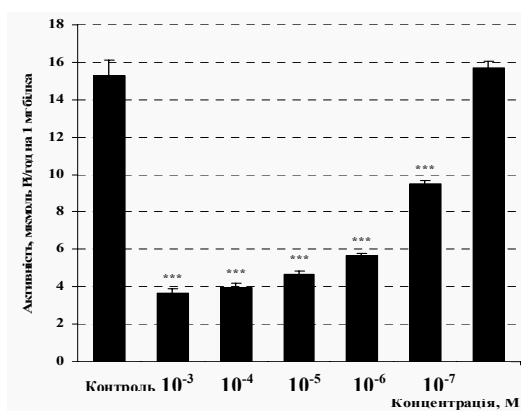
Рис. 7. Зміни активності Na^+ , K^+ -АТФази зародків за умов впливу тіосульфонатів (А – метилтіосульфонат калію, Б – параамінобензолтіосульфонату калію) на стадії розвитку 2 бластомерів. Тут і далі вірогідні зміни порівняно із контролем: * $-p < 0,05$; ** $-p < 0,01$; *** $-p < 0,001$



А

Б

Рис. 8. Зміни активності Na^+ , K^+ -АТФази зародків за умов впливу тіосульфонатів (А – метилтіосульфонат калію, Б – параамінобензолтіосульфонату калію) на стадії розвитку 16 бластомерів



А

Б

Рис. 9. Зміни активності Na^+ , K^+ -АТФази зародків за умов впливу тіосульфонатів (А – метилтіосульфонат калію, Б – параамінобензолтіосульфонату калію) на стадії розвитку 64 бластомерів

Як видно з рисунків, дія досліджуваних тіосульфонатів у високих концентраціях призводить до зниження активності Na^+ , K^+ -АТФази зародків на всіх стадіях розвитку (2, 16, 64 та 8 поділі бластомерів) порівняно з контролем в межах від 60% до 80%, тобто характеризуються інгібуювальною дією. Поступове зниження концентрації досліджуваних тіосульфонатів у середовищі інкубації призводило до вираженого зростання активності ферменту порівняно з активністю АТФази за дії інгібуючих (високих) концентрацій тіосульфонатів, а порівняно з контролем в деяких випадках спостерігається незначне зниження (2 і 16 бластомери), а в деяких до зростання (однак, в обох випадках недостовірне) активності ферменту (64 та 8 поділ бластомерів), тобто значення Na^+ , K^+ -АТФазної активності за таких умов не відрізнялося від контролю.

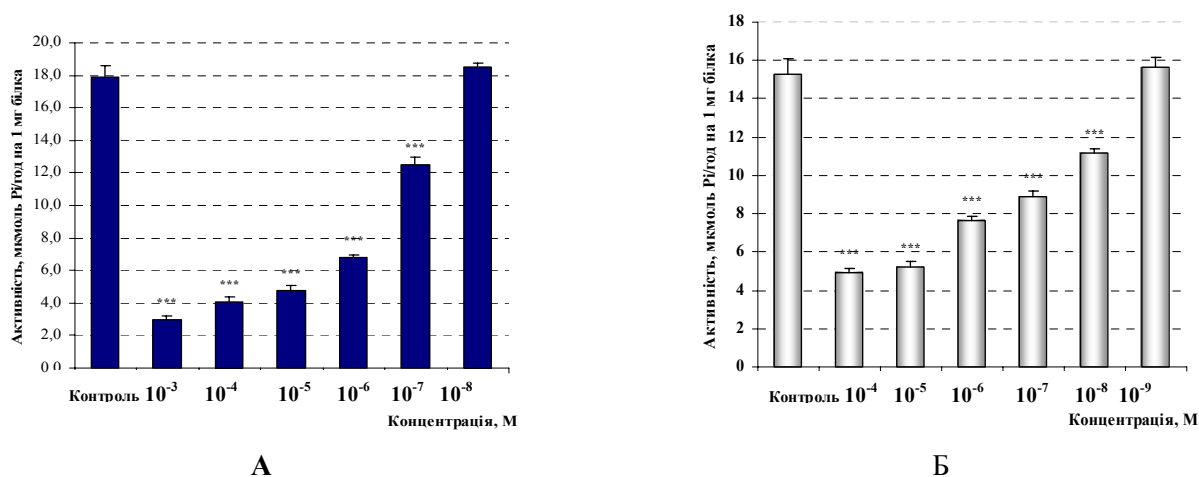


Рис. 10. Зміни активності Na^+ , K^+ -АТФази зародків за умов впливу тіосульфонатів (А – метилтіосульфонат калію, Б – параамінобензолтіосульфонату калію) на 8 стадії поділу бластомерів

Висновки. У результаті проведених досліджень можна сказати, що дія тіосульфонатів веде до достовірних дозозалежних змін активності мембранозв'язаного ферменту зародків: найбільш інгібуювальний вплив виявлено за наявності в середовищі інкубації біологічно активних речовин у концентраціях 10^{-3} – 10^{-5} М, тоді як додавання до середовища тіосульфонатів у малих концентраціях (порядок 10^{-8} та 10^{-9} М) веде до підвищення активності Na^+ , K^+ -АТФази зародків порівняно з контролем.

При дослідженні ТМП зародкових клітин під впливом метилтіосульфонату та параамінобензолтіосульфонату натрію концентрацією 10^{-3} г/мл прослідковуються зміни в амплітуді, періоді коливань порівняно з контролем та спостерігається очевидний зсув у наростанні максимальних значень рівня ТМП, що свідчить про часткові 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 деяких біосинтетичних процесів, а саме, білкових структур, при дії досліджуваних речовин у великих концентраціях, що і призводить до зниження активності мембранного ферменту (Na^+ , K^+ -АТФази). Однак, у низьких концентраціях біологічно активні тіосульфонати або їхні первинні метаболіти, котрі здатні включатися у метаболічні процеси зародків, призводять до підвищення інтенсивності процесів обміну зародків, які в цей момент інтенсивно розвиваються та ростуть. Саме цим можна пояснити часткове відновлення активності Na^+ , K^+ -АТФази у наших дослідженнях.

Водорозчинні антиоксиданти порівняно із ліпофільними аналогами характеризуються високою біологічною активністю і швидкістю транспорту в організмі, що робить їх незамінними в екстрених випадках вільнорадикальних патологій. Оскільки тіосульфонати ефективніші, ніж сульфонати й враховуючи отримані результати, можна зробити висновок, що тіосульфонати є перспективними речовинами як біоантиоксиданти, антиатерогенні і протизапальні препарати.

1. Противомикробная и физиологическая активность эфиров тиосульфокислот и возможные пути их практического использования в различных областях народного хозяйства / Б. Г. Болдырев, Т. К. Билозор, Р. И. Влязю [и др.] // Биоповреждения в промышленности. – Горький: ГГУ. – 1983. – С. 44-52.
2. Синтез та біологічна активність S-алкіл(8-хінолін)тіосульфонатів / Н.Є. Стадницька, В. І. Лубенець, В. П. Новіков [та ін.] // Фізіологічно активні речовини. – 2000. – Т. 30, № 2. – С. 27–29.
3. Синтез і біологічна активність S-алкілбензолтіосульфонатів / Д. Б. Баранович, О. З. Комаровська, В. І. Лубенець, В. П. Новіков // Фізіологічно активні речовини. – 2001. – № 2 (30). – С. 33–36.
4. О противомикробной активности эфиров тиосульфокислот производных циклопентана и циклогексана / Б. Е. Айзенман, Т. И. Скоробагатько, Б. Г. Болдырев, Л. Н. Аристархова // В сб.: Физиологически активные вещества. – К.: Наукова думка, 1975. – Вып. 7. – С. 113–115.
5. Фунгібактеріальна активність деяких тіосульфоестерів / О. З. Комаровська, Н. Є. Стадницька, Д. Б. Баранович [та ін.] // Вісник Нац. ун-ту "Львівська політехніка" "Хімія, технологія речовин та їх застосування". – 2001. – № 426. – С. 137–140.
6. Хімія і застосування ефірів тіосульфокислот / В. І. Лубенець, В. П. Новіков, О. В. Лужецька-Швед [та ін.] // Вісник Держ. ун-ту "Львівська політехніка" "Хімія, технологія речовин та їх застосування". – 1997. – № 332. – С. 215–219.
7. Защитные свойства тиолсульфонатов / Н. Г. Сопрунюк, Л. В. Яницкая, В. И. Лубенец, О. В. Швед // Защита металлов. – 1996. – Т. 32, № 5. – С. 534-536.
8. Block S. S. Sulfur disinfectants: antimicrobial activity of thiosulfonates / S. S. Block, J. P. Weidner, A. Walsh // J. Org. Chem. – 1964. – No 3. – P. 117–121.
9. «Химерные антибиотики» – даунорубицин и его аналоги N-ацелированные брунеомицином (стрептонигрином) / В. В. Толстиков, Н. В. Козлова, И. В. Ярцева, М. Н. Приображенская // 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. Эсулан – новое средство для лечения эпидермофитии стоп / Б.Г. Болдырев, Л.Е. Колмакова, Г.М. Першин [и др.] // Хим. фарм. журн. – 1968. – Т. 2, № 4. – С.12–16.
12. Патент 2 573 077 Франція, МКИ С 07 D 235/28; А 61 К 31/47. Nouveaux derives thiosulfonates, leur procede de preparation ainsi que les compositions pharmaceutiques les contenant / Sebille Bernard, Beuzard Yves, Demarne Henri (Франція). – № 8417286; Заявлен. 13.11.84; Опубл. 16.05.86 // РЖХ. 90138П.
13. О противоопухолевой активности некоторых эфиров тиосульфокислот, в том числе – тиоаналогов и гомологов милерана / Н. А. Водолазская, Б. И. Хомченковский, Б. Г. Болдырев, Т. К. Билозор // ДАН СССР. – 1966. – Т. 170, № 5. – С. 1081–1083.
14. Хомченковский Е. И. О противолейкозной активности, токсичности и действии на кроветворение эфиров тиосульфокислот – тиоаналогов милерана / Е. И. Хомченковский, Б. Г. Болдырев, Т. К. Билозор // ДАН СССР. – 1960. – Т. 170, № 6. – С. 1453-1455.
15. Maher J. The Physiological Functions of Phytonutrients, Part III / J. Maher // Dynamic Chiropractic. – 2003. – V. 21. – Issue 26.
16. Markley L. Aminothiosulfonates / L. Markley, J. Dunbar // J. Org. Chem. – 1972. – V. 37, № 15. – P. 2512–2514.
17. The antitumor properties Thiosulfonates / S. Hayashi, M. Furukawa, J. Yamamoto, K. Hamamura // Chem. Pharm. Bull. – 1967. – V. 15. – P. 1310–1315.
18. Нейфах А.А. Молекулярная биология процессов развития. – М.: Наука, 1977. 311с.
19. Гойда О.А. Биофизические аспекты раннего онтогенеза животных. – К.: Наук. думка, 1993. – 224 с.
20. Санагурський Д.І. Трансмембранний біоелектрогенез: модифікуючі впливи на нього, структурно-функціональний аналіз і моделі: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук: К., 2003. – 39 с.
21. Санагурський Д.І. Трансмембранний потенціал в ранньому ембріогенезі вьюна (*Misgurnus fossilis* L.) при гормональних впливах: Автореф. дис. ... канд. біол. наук: К., 1983. – 23 с.