

ВПЛИВ ПОХІДНОГО 1,4-НАФТОХІНОНУ СПОЛУКИ Les6400 НА АКТИВНІСТЬ ЕНЗИМІВ АРГІНАЗО-NO-СИНТАЗНОЇ СИСТЕМИ СПЕРМАТОЗОЇДІВ

РЕЗЮМЕ. При проведенні досліджень 11-(фуран-2-іл)-9-гідрокси-3,11-дигідро-2Н-бензо[6,7]тіохромено[2,3-d]тіазол-2,5,10-тріону (Les6400) окреслено ймовірні молекулярно-біологічні шляхи реалізації протипухлинної дії. Проте існує обмаль робіт, які присвячені детальному встановленню механізмів реалізації біологічної активності даного класу сполук.

Мета роботи – вивчення впливу 11-(фуран-2-іл)-9-гідрокси-3,11-дигідро-2Н-бензо[6,7]тіохромено[2,3-d]тіазол-2,5,10-тріону (Les6400) на активність ензимів аргіназо-NO-синтазної системи клітин (сперматозоїдів).

Матеріал і методи. Дослідження охопило 29 зразків сперми чоловіків із нормозооспермією. Визначення активності аргінази сперматозоїдів, пермеабілізованих сапоніном, проводили за утворенням сечовини. Активність окремих ізоформ NO-синтази визначали за концентрацією цитруліну високоспецифічним методом за кольоровою реакцією з антипірином.

Результати. Показано, що в концентраціях 10^{-6} – 10^{-4} М Les6400 достовірно призводить до підвищення аргіназної активності у сперматозоїдах. Однак, найвиразніший її ефект спостерігався при 10^{-5} М концентрації. Активність достовірно зростала в 1,2 раза. При дії Les6400 в концентраціях 10^{-4} М на cNOS, її активність достовірно знижується в 1,21 раза. Активність iNOS сперматозоїдів фертильних чоловіків ідентифікується в незначній мірі, порівняно з активністю cNOS, та становить $0,28 \pm 0,09$ пмоль цитруліну/хв·мг протеїну. При вивченні впливу Les6400 на активність iNOS сперматозоїдів практично здорових чоловіків її активації ми не спостерігали, а інгібувальний ефект неможливо було визначити через низьку активність ензиму. Преінкубація сперматозоїдів із 0,2 мМ H_2O_2 призводила до зростання активності iNOS в 21,2 раза. На фоні активації iNOS гідроґеном пероксидом, Les6400 в концентраціях 10^{-6} – 10^{-4} М призводить до інгібування активності ензиму в 1,3–1,5 раза.

Висновки. Виявлено, що сполука Les6400 призводить до зростання аргіназної активності та інгібування обох ізоформ NO-синтази. Оскільки аргіназа та ізоформи NO-синтази конкурують за фізіологічних умов у клітині за один субстрат – L-арґінін, то, ймовірно, зростання аргіназної активності призводить до зниження NO-синтазної активності.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: 1-(фуран-2-іл)-9-гідрокси-3,11-дигідро-2Н-бензо[6,7]тіохромено[2,3-d]тіазол-2,5,10-тріону 11-(фуран-2-іл)-9-гідрокси-3,11-дигідро-2Н-бензо[6,7]тіохромено[2,3-d]тіазол-2,5,10-тріону (Les6400), сперматозоїди, аргіназа, ізоформи NO-синтази.

Вступ. Відомо, що похідні нафтохінонів – найпоширеніший вид хінонів, вони відіграють роль у життєво важливих біохімічних процесах [1]. Хімічні властивості 1,4 та 1,2 нафтохінонів дозволяють їм взаємодіяти з біологічними мішенями шляхом утворення ковалентних зв'язків, що забезпечує їх участь в окисно-відновних реакціях [2].

Тривалий час нафтохінони були джерелом для синтезу цитотоксичних сполук, які присутні у ряді препаратів, таких як антрацикліни: даунорубіцин, доксорубіцин, мітоксантрон [1]. Показано, що біологічні і фармакологічні ефекти 1,4-нафтохінонів мають виражені антиоксидантні, протизапальні, протипухлинні, протималярійні, протигрибкові і антибактеріальні властивості. Ці ефекти пов'язані з утворенням активних форм кисню (АФК), включаючи оксидативний стрес у клітинах, що спричиняє незворотні зміни у ДНК і білках, і в кінцевому підсумку призводить до апоптозу [3].

Працівниками кафедри фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії ЛНМУ імені Данила Галицького було апробовано використання похідних

1,4-нафтохінону як дієнофілів у синтезі поліциклічних тіопіранотіазолів із біологічною активністю. Так, проведено синтез 11-заміщених-3,5,10,11-тетрагідро-2Н-бензо[6,7]тіохромено[2,3-d][1,3]тіазол-2,5,10-тріонів використовуючи похідні 1,4-нафтохінону [4].

При проведенні досліджень 11-(фуран-2-іл)-9-гідрокси-3,11-дигідро-2Н-бензо[6,7]тіохромено[2,3-d]тіазол-2,5,10-тріону окреслено ймовірні молекулярно-біологічні шляхи реалізації протипухлинної дії, зокрема інгібування β -трансформуючого фактора росту пухлин (TGF- β) [5, 6].

Використання методу проточної цитометрії дозволило встановити високу апоптичну здатність сполук, синтезованих на основі 1,4-нафтохінону, яка реалізується шляхом активації каспаз 3/7, 8 та 9 та зміною мітохондріального потенціалу в клітинах раку молочної залози лінії MDA-MB-231 [7]. Установлено високу здатність похідних на основі 1,4-нафтохінону до взаємодії з ДНК, що підтверджено високим рівнем конкурентного витіснення метилового зеленого з його комплек-

су з ДНК в межах 42,5–66,4 %, а також здатністю до зміни величини чистої зміни абсорбції (NetAbs) в реакції окиснення KMnO_4 піримідинових основ в областях пошкодження ДНК. Доведено здатність двох сполук із даного класу до зниження рівня відновленого глутатіону шляхом утворення ковалентних GS-6 адуктів, що підтверджує їх високі антиоксидантні властивості. Вивчення *in vivo* гострої токсичності 11-(фуран-2-іл)-9-гідрокси-3,11-дигідро-2Н-бензо[6,7]тіохромено[2,3-*d*]тіазол-2,5,10-тріону показало суттєво нижчий токсичний ефект на мишей лінії C57BL/6, ніж препарат порівняння доксорубіцин [7].

Проте існує обмаль робіт, які присвячені детальному встановленню механізмів реалізації біологічної активності даного класу сполук. Однією з основних причин пошкодження і загибелі клітини внаслідок дії АФК на сьогодні вважається пероксидне окиснення ліпідів [3].

Цим шляхом окиснюються ненасичені жирні кислоти, що може бути причиною порушення цілісності та властивостей біологічних мембран [4]. Це призводить до змін активності аргіназо-NO-синтазної та іон-транспортувальних систем і, відповідно до зміни концентрації та Ca^{2+} в клітині, які є внутрішньоклітинними месенджерами і, прямо чи опосередковано, регулюють більшість клітинних функцій [8].

Враховуючи те, що основним завданням сучасної медичної хімії є пошук та ідентифікація сполук-лідерів, як основи для створення нових лікарських засобів, ідентифікації лише агентів із певним видом активності навіть високих значень явно є не достатнім. Це зумовлено тим, що високоактивні сполуки в подальшому підлягають набагато глибшим дослідженням, які охоплюють доклінічні, клінічні випробування, встановлення токсичності, які лише на фінальній стадії можуть дати розуміння, чи буде мати сполука можливість на впровадження у медичну і фармацевтичну практику. Відповідно, дані дослідження присвячені впливу синтезованої сполуки на активність ензимів аргіназо-NO-синтазної системи, використовуючи в якості моделі для досліджень сперматозоїди чоловіків.

Мета дослідження – вивчення впливу 11-(фуран-2-іл)-9-гідрокси-3,11-дигідро-2Н-бензо[6,7]тіохромено[2,3-*d*]тіазол-2,5,10-тріону (Les6400) на активність ензимів аргіназо-NO-синтазної системи клітин (сперматозоїдів).

Матеріал і методи дослідження. Матеріалом для дослідження були зразки сперми, яку отримували у центральній клінічній лабораторії Львівської обласної клінічної лікарні (згідно з угодою про співпрацю між Львівським національним медичним університетом імені Данила Галицького та Львівською обласною клінічною лікарнею).

Отримання сперми у фертильних пацієнтів проводили після попереднього завершення їхнього клінічного обстеження, як правило з приводу захворювань, не пов'язаних із фертильністю. У дослідженнях використовували сперматозоїди чоловіків у віці 20–44 років.

Члени комісії з питань етики наукових досліджень, експериментальних розробок і наукових творів Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького порушень морально-етичних норм при виконанні дисертаційної роботи не виявили. Надані для експертизи матеріали визнали науково обґрунтованими, а також у листі інформування для пацієнтів усі положення чітко викладеними, з якими були ознайомлені пацієнти. Були передбачені заходи із забезпечення безпеки здоров'я пацієнта, дотримання його прав, людської гідності та морально-етичних норм відповідно до принципів Гельсінської декларації прав людини, Конвенції Ради Європи про права людини і біомедицину та відповідних Законів України.

Сперматозоїди чоловіків відмивали від плазми еякуляту 3-разовим центрифугуванням при 3000 об/хв протягом 10 хв у середовищі відмивання, яке містило (мМ): 120 NaCl, 30 KCl, 30 Hepes (pH 7,4). Для пермеабілізації мембран сперматозоїдів і розкриття латентної активності ензимів до їх суспензії додавали 0,5 % детергент сапонін [9].

Визначення активності аргінази сперматозоїдів, пермеабілізованих сапоніном, проводили за утворенням сечовини, вміст якої оцінювали за допомогою діагностичного набору відповідно до інструкції фірми-виробника (Сімко, Україна).

Визначення NO-синтазної ензиматичної активності сапонін-перфорованих сперматозоїдів проводили у відповідності з методом, описаним [10]. Для визначення iNOS використовували методику, аналогічну попередній, однак для визначення активності Ca^{2+} -незалежної NOS в інкубаційну суміш замість CaCl_2 додавали 2 мМ ЕДТА. Активність cNOS у сперматозоїдах вираховували як різницю між активністю загальної NOS та активністю iNOS. Активність Ca^{2+} -залежної ізоформи, що відповідає конститутивній ізоформі NOS (cNOS), розраховували як різницю між загальною активністю NOS і активністю Ca^{2+} -незалежної ізоформи NOS. Активність NO-синтази виражали в пмольх утвореного цитруліну/хв·мг протеїну.

Визначення ензиматичної активності аргінази сперматозоїдів проводили за утворенням сечовини, вміст якої визначали за допомогою діагностичного набору відповідно до інструкції фірми-виробника (Сімко, Україна). Ензиматичну реакцію ініціювали внесенням аліквоти (150 мкл) пермеабілізованих сапоніном сперматозоїдів в інкубаційне середовище наступного складу (мМ): 20 трисHCl

(рН = 9,5), 100 L-аргінін, 2,0 MnCl₂, об'ємом 500 мкл. Концентрація протеїну у пробі була у межах 50 мкг/мл. Інкубацію здійснювали 90 хв при температурі 37 °С при легкому кількаразовому струшуванні інкубаційного середовища. Ензиматичну реакцію зупиняли внесенням в інкубаційне середовище 40 мкл «стоп-розчину» 50 %-ї трихлороцтової кислоти, центрифугували і в одержаному супернатанті визначали вміст сечовини.

Усі зразки спектрофотометрували проти контрольної проби при $\lambda=520$ нм, реєструючи процес утворення сечовини. Кількість продукту реакції, що утворився у процесі ензиматичної реакції, визначали у відповідності з інструкцією і виражали у нмолях сечовини/хв·мг загального протеїну у пробі.

Варіаційно-статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням програмного пакета для персональних комп'ютерів Microsoft Excel. Визначали такі статистичні показники, як середнє арифметичне значення (М) і стандартну похибку (m). Достовірність змін встановлювали за t-критерієм Стьюдента. Для оцінки зв'язків між показниками проводили кореляційний аналіз за критерієм Пірсона.

Результати й обговорення. Аргіназа (ЕС 3.5.3.1) – металоензим циклу сечовини, який каталізує гідроліз L-аргініну до сечовини та орнітину, конкуруючи за спільний субстрат із NO-синтазами та впливаючи на її активність.

Оскільки субстратом для NOS є L-аргінін, його локальна біодоступність може впливати на активність NOS. Відомо, що аргінін виступає не тільки субстратом для NOS, а також сприяє димеризації ізоформ ензиму, що відіграє важливу роль у регуляції їх каталітичної активності [11]. З огляду на це, зміни концентрації L-аргініну в інкубаційному середовищі впливають, вірогідно, на швидкість реакції, що каталізується NOS.

З'ясовано, що підвищення концентрації L-аргініну в середовищі інкубації в діапазоні концентрацій від 5 до 150 мМ (за сталої концентрації CaCl₂ – 2 мМ та NADPH – 1 мМ) призводить до поступового зростання ензиматичної активності cNOS з виходом на плато при 100 мМ концентрації (рис. 1).

Виходячи з цього, в наступних експериментах в інкубаційному середовищі використовували 100 мМ L-аргінін.

Щодо вивчення впливу сполуки Les6400, то показано, що в концентраціях 10⁻⁶– 10⁻⁴М вона достовірно призводить до підвищення аргіназної активності у сперматозоїдах (табл. 1). Однак, найвиразніший її ефект спостерігався при 10⁻⁵ М концентрації. Активність зростає з (69,2±3,6) до (83,2±5,1) нмоль сечовини/хв·мг протеїну, тобто в 1,2 раза (р<0,05).

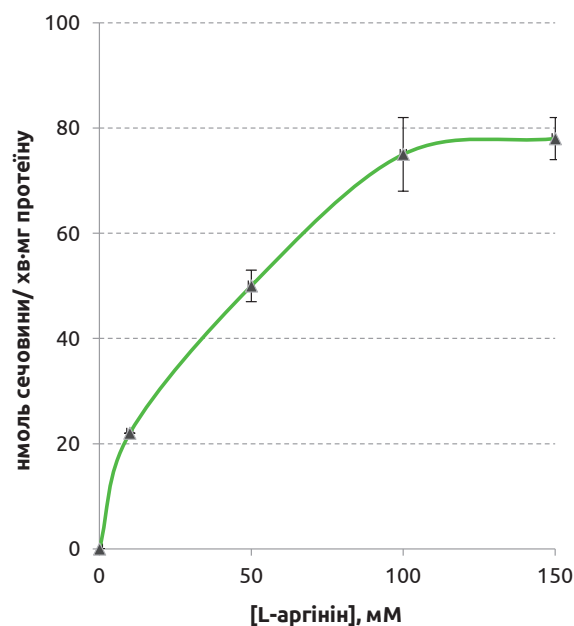


Рис. 1. Концентраційна залежність впливу зовнішньоклітинного L-аргініну на активність аргінази в сперматозоїдах фертильних чоловіків (М±m, n=12).

Таблиця 1. Аргіназна активність сперматозоїдів у пацієнтів із нормозооспермією при дії сполуки Les6400 (n=17, М±m)

Активність аргінази	Контроль	10 ⁻⁶ М	10 ⁻⁵ М	10 ⁻⁴ М
нмоль сечовини/хв·мг протеїну	69,2±3,6	74,5±4,8	83,2±5,1*	78,4±4,4*

Примітка. р<0,05 – зміни статистично вірогідні стосовно контрольних показників.

У регуляції практично всіх внутрішньоклітинних процесів бере участь вторинний месенджер – Нітрогену оксид (NO). Відомо, що фізіологічні ефекти NO в організмі (клітині) є протилежними залежно від його концентрації. За нормальних фізіологічних умов концентрація NO є низькою. NO відіграє важливу роль у підтриманні рухливості сперматозоїдів, нейтралізації вільних радикалів, і тим самим запобігає зниженню рухливості, зумовленої АФК. Натомість, високі концентрації NO при патологічному та стресовому стані згубно і цитотоксично впливають на сперматозоїди, що підтверджується вірогідним негативним кореляційним зв'язком між його концентрацією та рухливістю сперматозоїдів [12, 13].

Однак роль NO та ензиму його синтезу NO-синтази (NOS) в сперматозоїдах чоловіків із різними формами чоловічого непліддя залишається до кінця не з'ясованою. Також іде пошук сполук, які б покращували показники спермограми. Показано, що стан NO-синтазної системи в сперматозоїдах фертильних чоловіків характеризувався перева-

жанням активності її конститутивної ізоформи (сNOS). Її активність становить $(4,0 \pm 0,5)$ пмоль цитруліну/хв на мг протеїну (табл. 2). При дії сполуки

Les6400 у концентраціях 10^{-5} М і 10^{-4} М її активність достовірно знижується до $(3,5 \pm 0,35)$ та $(3,29 \pm 0,23)$ пмоль цитруліну/хв·мг протеїну відповідно.

Таблиця 2. Зміни активності ендотеліальної та індукційної ізоформ NO-синтази за дії сполуки Les6400 ($n=17$, $M \pm m$)

Концентрація препарату	Контроль	10^{-6} М	10^{-5} М	10^{-4} М
Активність eNOS				
пмоль цитруліну/хв·мг протеїну	$4,0 \pm 0,5$	$3,82 \pm 0,54$	$3,5 \pm 0,35^*$	$3,29 \pm 0,23^*$
Активність iNOS				
пмоль цитруліну/хв·мг протеїну	$0,28 \pm 0,09$	–	–	–

Вважається, що NOS-залежний синтез “базального” NO реалізується сNOS, тоді як iNOS забезпечує додаткові кількості NO в клітинах при різних патологічних станах [14, 15].

Зниження конститутивної ізоформи ензиму супроводжується зростанням активності індукційної ізоформи NOS. iNOS, на відміну від сNOS, не експресується постійно (конститутивно).

Встановлено, що активність iNOS сперматозоїдів фертильних чоловіків ідентифікується в незначній мірі, порівняно з активністю сNOS, та становить $(0,28 \pm 0,09)$ пмоль цитруліну/хв·мг протеїну. Відомо, що зростання активності iNOS призводить до

гіперпродукції NO, накопичення токсичного пероксинітриту та розвитку нітразивного стресу [16, 17].

При вивченні впливу сполуки Les6400 на активність iNOS сперматозоїдів практично здорових чоловіків, її активації ми не спостерігали, а інгібувальний ефект неможливо було визначити через низьку активність ензиму (табл. 2). Для індукування активності iNOS в сперматозоїдах використовували оксидативний стрес, преінкубуючи їх із H_2O_2 . Преінкубація сперматозоїдів із 0,2 мМ H_2O_2 призводила до зростання активності iNOS в 21,2 раза, з $(0,28 \pm 0,09)$ до $(5,9 \pm 0,6)$ пмоль цитруліну/хв на 1 мг протеїну (рис. 2).

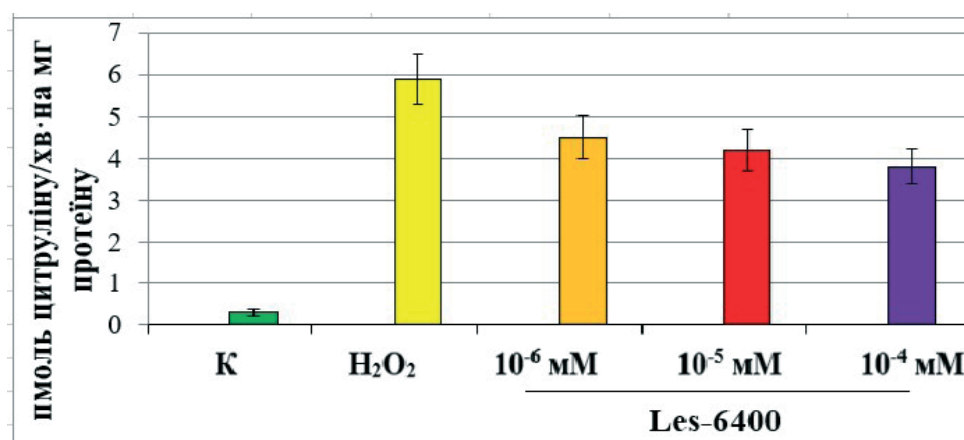


Рис. 2. Вплив сполуки Les6400 на активність індукційної ізоформи NO-синтази ($n=12$, $M \pm m$).

На фоні активації iNOS гідроген пероксидом, сполука А в концентраціях 10^{-6} – 10^{-4} М призводить до інгібування активності ензиму в 1,3–1,5 раза ($p < 0,05$).

Таким чином, за отриманими даними, на сперматозоїдах чоловіків виявлено, що сполука А призводить до зростання аргіназної активності та інгібування обох ізоформ NO-синтази. Оскільки аргіназа та ізоформи NO-синтази конкурують у фізіологічних умовах в клітині за один субстрат – L-аргінін, то, ймовірно, зростання аргіназної активності призводить до зниження NO-синтазної активності.

Відомо, що аргіназа пригнічує продукування NO за допомогою кількох потенційних механізмів, включаючи конкуренцію з NO-синтазою (NOS) за субстрат L-аргінін, роз'єднання NOS, що призводить до взаємодії NO і супероксиду та утворення пероксинітриту, пригнічення трансляції та стабільності індукційного протеїну NOS, інгібування активності індукційної NOS шляхом утворення сечовини та сенсibiliзації NOS до його ендогенного інгібітора, асиметричного диметил-L-аргініну. Зростання активності аргінази пригнічує ендотеліальний NOS-опосередкований синтез NO і може сприяти ендотеліальній

дисфункції при гіпертензії, старінні, ішемії-реперфузії та цукровому діабеті [18, 19].

Висновки. 1. Сполука Les6400 призводить до зростання аргіназної активності та інгібування обох ізоформ NO-синтази. Оскільки аргіназа та ізоформи NO-синтази конкурують у фізіологічних умовах в клітині за один субстрат – L-аргінін, то, ймовірно, зростання аргіназної активності призводить до зниження NO-синтазної активності.

2. Сполука Les6400 впливає на регуляторну систему клітини, зокрема, порушує активності ензимів аргіназо-NO-синтазної системи сперматозоїдів, що призводить до дисбалансу регуляторних систем.

ЛІТЕРАТУРА

1. The diverse mechanisms and anticancer potential of naphthoquinones / C. E. Pereyra et al. *Cancer Cell International*. 2019. Vol. 19, No. 1. P. 1–20. URL: <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0925-8>
2. Tandon V. K., Kumar S. Recent development on naphthoquinone derivatives and their therapeutic applications as anticancer agents. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2013. Vol. 23, No. 9. P. 1087–1108. URL: <https://doi.org/10.1517/13543776.2013.798303>
3. Naphthoquinones as a Promising Class of Compounds for Facing the Challenge of Parkinson's Disease / T. B. Santos et al. *Pharmaceuticals*. 2023. Vol. 16, No. 11. P. 1577. URL: <https://doi.org/10.3390/ph16111577>
4. 1,4-Naphthoquinone Motif in the Synthesis of New Thiopyrano[2,3-d]thiazoles as Potential Biologically Active Compounds / A. Lozynskyi et al. *Molecules*. 2022. Vol. 27, No. 21. P. 7575. URL: <https://doi.org/10.3390/molecules27217575>
5. Lozynskyi A. V. In silico дослідження лікоподібності, параметрів токсичності та механізму протипухлинної активності 11-(фуран-2-іл)-9-гідрокси-3,11-дигідро-2H-бензо[6,7]тіохромено[2,3-d]тіазол-2,5,10-тріону (les-6400). *Фармацевтичний часопис*. 2023. № 2. С. 5–10. URL: <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2023.2.14051>
6. Molecular design, synthesis and anticancer activity of new thiopyrano[2,3-d]thiazoles based on 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone (juglone) / I. Ivasechko et al. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2023. P. 115304. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115304>
7. Thiopyrano[2,3-d]thiazole structures as promising scaffold with anticancer potential / N. Finiuk et al. *Chemico-Biological Interactions*. 2022. Vol. 368. P. 110246. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.110246>
8. Alterations in Arginase-NO-Synthase System of Spermatozoa in Human Subjects with Different Fertility Potential / R. V. Fafula et al. *Journal of Medical Biochemistry*. 2018. Vol. 37, No. 2. P. 134–140. URL: <https://doi.org/10.1515/jomb-2017-0049>
9. Воробець Д. З., Кочешкова Н. С. Неплідність та еректильна дисфункція чоловіків: біохімічні та клінічні аспекти. *Тернопіль: Укрмедкнига*. 2008. 204 с.
10. Раваєва М. Ю., Чужан О. М. Зміна активності системи синтезу оксиду азоту під дією низькоінтенсивного

Перспективи подальших досліджень. У майбутньому планується вивчити вплив сполуки Les6400 на активність Ca^{2+} -транспортувальних систем клітин і роль іонізованого Ca^{2+} в механізмі дії цього препарату.

Джерела фінансування. Власні кошти автора.

Внесок автора:

О. П. Сень – розробка ідеї, дизайну та концепції дослідження, виконання дослідження, аналіз та інтерпретація результатів, написання тексту статті.

Конфлікт інтересів. Автор заявляє про відсутність конфлікту інтересів.

міліметрового випромінювання. *Вчені записки Таврійського національного університету ім. В. І. Вернадського. Серія «Біологія, хімія»*. 2011. 24 (63). С. 201–210

11. The kinetic properties of arginase in sperm cells of infertile men / R. V. Fafula et al. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2018. Vol. 9, No. 1. P. 80–84. URL: <https://doi.org/10.15421/021811>

12. Indicators of oxidative-nitrosative stress in men with idiopathic infertility and infertility associated with rheumatoid arthritis / R. V. Fafula et al. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2024. Vol. 15, No. 4. P. 802–807. URL: <https://doi.org/10.15421/0224115>

13. Features of spermogram indicators in idiopathic infertility in men / O. V. Melnyk et al. *Bulletin of Problems Biology and Medicine*. 2023. Vol. 1, No. 4. P. 187. URL: <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2022-4-167-187-192>

14. Патогенетичні особливості функціонування аргіназо-NO-синтазної системи в сім'яній плазмі чоловіків з ідіопатичним непліддям / О. В. Мельник та ін. *Medical and Clinical Chemistry*. 2022. № 3. С. 5–12. URL: <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681x.2022.i3.13357>

15. The Peculiarities of Arginase Pathway of L-Arginine Metabolism in Spermatozoa of Men with Different Forms of Pathospermia / R. V. Fafula et al. *International Journal of Physiology and Pathophysiology*. 2017. Vol. 8, № 4. P. 309–318. URL: <https://doi.org/10.1615/intjphyspathophys.v8.i4.30>

16. Chakraborty S., Ain R. Nitric-oxide synthase trafficking inducer is a pleiotropic regulator of endothelial cell function and signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 2017. Vol. 292, No. 16. P. 6600–6620. URL: <https://doi.org/10.1074/jbc.m116.742627>

17. Forstermann U., Sessa W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*. 2011. Vol. 33, No. 7. P. 829–837. URL: <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>

18. COVID-19 Sepsis and Microcirculation Dysfunction / A. Colantuoni et al. *Frontiers in Physiology*. 2020. Vol. 11. URL: <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00747>

19. Obesity and COVID-19: Molecular Mechanisms Linking Both Pandemics / A. Ritter et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. Vol. 21, No. 16. P. 5793. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms21165793>

REFERENCES

1. Pereyra CE, Dantas RF, Ferreira SB, Gomes LP, Silva-Jr FP. The diverse mechanisms and anticancer potential of naphthoquinones. *Cancer Cell Int.* 2019;19:1–20. DOI:10.1186/s12935-019-0925-8
2. Tandon VK, Kumar S. Recent development on naphthoquinone derivatives and their therapeutic applications as anticancer agents. *Expert Opin Ther Pat.* 2013; 23(9):1087–1108. DOI:10.1517/13543776.2013.798303
3. Santos TB, deMoraes LGC, Pacheco PAF, dosSantos DG, et al. Naphthoquinones as a promising class of compounds for facing the challenge of Parkinson's disease. *Pharmaceuticals.* 2023;16:1577. DOI:10.3390/ph16111577
4. Lozynskiy A, Senkiv J, Ivasechko I, Finiuk N, Klyuchivska O, et al. 1,4-Naphthoquinone Motif in the Synthesis of New Thiopyrano[2,3-d]thiazoles as Potential Biologically Active Compounds. *Molecules.* 2022;27(21):7575 DOI: 10.3390/molecules27217575
5. Lozynskiy AV. In silico doslidzhennya likopodibnosti, parametriv toksychnosti ta mekhanizmu protypukhlynnoyi aktyvnosti 11-(furan-2-il)-9-hidroksy-3,11-dihydro-2N-benzo[6,7]tiokhromeno[2,3-d]tiazol-2,5,10-trionu (Les6400). [In silico study of drug similarity, toxicity parameters and mechanism of antitumor activity of 11-(furan-2-yl)-9-hydroxy-3,11-dihydro-2H-benzo[6,7]thiochromeno[2,3-d]thiazole-2,5,10-trione (Les6400)]. *Farmatsevtichnyy chasopys.* 2023;2:5-10. Ukrainian
6. Ivasechko I, Lozynskiy A, Senkiv J, Roszczenko P, Kozak Y, et al. Molecular design, synthesis and anticancer activity of new thiopyrano[2,3-d]thiazoles based on 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone (juglone). *European Journal of Medicinal Chemistry.* 2023;115304.
7. Finiuk N, Zelisko N, Klyuchivska O, Yushyn I, Lozynskiy A, et al. Thiopyrano[2,3-d]thiazole structures as promising scaffold with anticancer potential. *Chemico-Biological Interactions.* 2022;368:110246.
8. Fafula RV, Iefremova UP, Onufrovych OK, Maksymyuk HV, Besedina AS, et al. Alterations in Arginase-NO-synthase System of Spermatozoa in Human Subjects with Different Fertility Potential. *J Med Biochem.* 2018;37(2):134-140. DOI: 10.1515/jomb-2017-0049.
9. Vorobets ZD., Kocheshkova NS. Neplidnist' ta erektyl'na dysfunktsiya cholovikiv: biokhimichni i klinichni aspekty [Infertility and erectile dysfunction in men: biochemical and clinical aspects]. Ternopil: Ukrmedknyga; 2008. Ukrainian.
10. Ravaieva MYu, Chuyan OM. Zmina aktyvnosti systemy syntezu oksydu azotu pid diyeyu nyz'kointensyvnoho milimetrovoho vyprominyuvannya [Change in the activity of the nitric oxide synthesis system under the influence of low-intensity millimeter radiation]. *Vcheni zap Tavr nats un-tu im VI Vernads'koho. Seriya: Biolohiya, khimiya.* 2011;24(63):201–210. Ukrainian.
11. Fafula RV, Iefremova UP, Onufrovych OK, Maksymyuk HV, Vorobets DZ, Vorobets ZD. The kinetic properties of arginase in sperm cells of infertile men. *Regulatory Mechanisms in Biosystems.* 2018;9(1):80-84.
12. Fafula RV, Vorobets MZ, Melnyk OV, Onufrovych OK, Besedina AS, Vorobets DZ, Vorobets ZD. Indicators of oxidative-nitrosative stress in men with idiopathic infertility and infertility associated with rheumatoid arthritis. *Regulatory Mechanisms in Biosystems.* 2024;15(4):802-807. URL: <https://doi.org/10.15421/0224115>.
13. Melnyk OV, Vorobets MZ, Fafula RV, Onufrovych OK, & Vorobets ZD. Features of spermogram indicators in idiopathic infertility in men. *Bulletin of Problems in Biology and Medicine.* 2022;167:187–192.
14. Melnyk OV, Vorobets MZ, Fafula RV, Kovalenko IV, Vorobets ZD. Patohenetychni osoblyvosti funktsionuvannya arhinaza/NO-syntaznoyi systemy v sim'yanii plazmi cholovikiv z idiopatychnym neplidnyam [Pathogenetic features of the functioning of the arginase/NO-synthase system in the seminal plasma of men with idiopathic infertility]. *Medychna ta klinichna khimiya.* 2022;24(3):5-12. DOI: 10.11603/mcch.2410-681X.2022.i3.13357. Ukrainian.
15. Fafula RV, Onufrovych OK, Iefremova UP, Vorobets DZ, Melnyk OV, Vorobets ZD. The peculiarities of arginase pathway of L-arginine metabolism in spermatozoa of men with different forms of pathospermia. *International Journal of Physiology and Pathophysiology.* 2017;8(4):309-318. DOI: 10.1615/IntJPhysPathophys.v8.i4.30.
16. Chakraborty S, Ains R. Nitric-oxide synthase trafficking inducer is a pleiotropic regulator of endothelial cell function and signaling. *J Biol Chem.* 2017;292(16):6600-6620.
17. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthase: regulation and function. *EurHeart J.* 2012;33(7):829-837.
18. Colantuoni A, Martini R, Caprari P et al. COVID-19. Sepsis and Microcirculation Dysfunction. *Frontiers in Physiology.* 2020;11:747. DOI: 10.3389/fphys.2020.00747.
19. Ritter A, Kreis NN, Louwen F, Yuan J. Obesity and Covid-19: Molecular mechanisms linking both pandemics. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(16):1–28. DOI: 10.3390/ijms21165793.

O. P. Sen

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

EFFECT OF THE 1,4-NAPHTHOQUINONE DERIVATIVE LES6400 ON THE ACTIVITY OF ENZYMES OF THE ARGINASE-NO-SYNTHASE SYSTEM OF SPERMATOZOA

SUMMARY. In the course of research on 11-(furan-2-yl)-9-hydroxy-3,11-dihydro-2H-benzo[6,7]thiochromeno[2,3-d]thiazole-2,5,10-trione (Les6400), probable molecular biological pathways for the implementation of antitumor action have been outlined. However, there are few works devoted to the detailed establishment of the mechanisms of implementation of the biological activity of this class of compounds.

The aim – to study the effect of 11-(furan-2-yl)-9-hydroxy-3,11-dihydro-2H-benzo[6,7]thiochromeno[2,3-d]thiazole-2,5,10-trione (Les6400) on the activity of enzymes of the arginase-NO synthase system of cells (sperm cells).

Material and Methods. The study included 29 semen samples from men with normozoospermia. Determination of arginase activity of spermatozoa permeabilized with saponin was carried out by urea formation. The activity of individual NO synthase isoforms was determined by the concentration of citrulline by a highly specific method using a color reaction with antipyrine.

Results. It was shown that at concentrations of 10^{-6} – 10^{-4} M Les6400 significantly increases arginase activity in spermatozoa. However, its most pronounced effect was observed at 10^{-5} M concentration. The activity significantly increased by 1.2 times. When Les6400 was applied to cNOS at concentrations of 10^{-4} M, its activity significantly decreased by 1.21 times. The iNOS activity of spermatozoa of fertile men was quantified being less than cNOS activity and was calculated as 0.28 ± 0.09 pmol citrulline/min·mg protein. When studying the effect of Les6400 on the iNOS activity of spermatozoa of practically healthy men, we did not observe its activation, and the inhibitory effect could not be determined due to the low activity of the enzyme. Preincubation of spermatozoa with 0.2 mM H_2O_2 led to an increase in iNOS activity by 21.2 times. Against the background of iNOS activation by hydrogen peroxide, Les6400 at concentrations of 10^{-6} – 10^{-4} M leads to inhibition of enzyme activity by 1.3–1.5 times.

Conclusions. It was found that the compound Les6400 leads to an increase in arginase activity and inhibition of both isoforms of NO synthase. Since arginase and NO synthase isoforms compete under physiological conditions in the cell for one substrate – L-arginine, it is likely that an increase in arginase activity leads to a decrease in NO synthase activity.

KEYWORDS: 11-(furan-2-yl)-9-hydroxy-3,11-dihydro-2H-benzo[6,7]thiochromeno[2,3-d]thiazole-2,5,10-trione; 11-(furan-2-yl)-9-hydroxy-3,11-dihydro-2H-benzo[6,7]thiochromeno[2,3-d]thiazole-2,5,10-trione (Les6400); spermatozoa; arginase; NO synthase isoforms.

Отримано 22.04.2025

Електронна адреса для листування: o.sverdan@gmail.com