МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА

БОДНАРЧУК НАТАЛІЯ ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 577.352.4:572.7:639.3.034:6.15.27

ЗМІНИ БІОФІЗИЧНИХ ТА МОРФОЛОГІЧНИХ ПАРАМЕТРІВ ЗАРОДКІВ В'ЮНА ЗА ДІЇ ФЛУРЕНІЗИДУ

03.00.02 – біофізика

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Львів – 2018

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана 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
Рибальченко Володимир Корнійович,
Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
завідувач НДС "Мембранології і цитології"

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Данилович Юрій Володимирович,
Інститут біохімії імені О.В. Палладіна НАН України,
провідний науковий співробітник відділу біохімії м'язів

Захист відбудеться "6" липня 2018 р. о 12 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 розісланий "1" червня 2018 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради К 35.051.14
кандидат біологічних наук, доцент М.В. Бура

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Актуальними проблемами біофізики є вивчення фізичних основ функціонування клітин, будови й функцій біологічних мембран (Григор'єва Л.І., 2011). Універсальним механізмом розвитку клітинної патології за дії ушкоджуючих чинників є реакція ланцюгового окиснення ліпідів, які входять до складу мембран (Головчак Н.П., 2008; Бішко О.І., 2016). Зміни структури мембран, відповідно, зумовлюють порушення роботи Na^+, K^+-АТФази, що веде до модифікації трансмембранної різниці потенціалу. Тому дослідження процесів ліпопероксидації, стану антиоксидантної системи (АОС), робота якої спрямована на утилізацію вільних радикалів, активності Na^+, K^+-АТФази мають діагностичне значення, в т. ч. і для оцінки патології клітин.

На даний час постійно ведеться активний синтез нових хімічних сполук, які використовують у медицині та фармації, зокрема, тих, що мають властивості антибіотиків (Михалик О.І., 2003). Серед таких сполук особливе місце посідає флуренізид (N-9-флуореніліден-N'-ізонікотиногідразиду), синтезований у Львівському медичному університеті імені Данила Галицького. Ступінь токсичності й механізм впливу цього препарату на клітину до кінця не з’ясовані. Флуренізид – препарат протимікробної, протитуберкульозної, антихламідійної, імуномодулюючої, антиоксидантної, гепатопротекторної, протизапальної та противірусної дії (Lane D.P., 1992; Курята А.В., 1999). Його противірусний ефект вивчено *in vitro* та *in ovo* щодо вірусу грипу птиці типу Росток/34 (H7N1) та щодо вірусу хвороби Ньюкасла. Показники противірусної дії флуренізиду (щодо вірусу грипу птахів) у системах *in vitro* та *in ovo* є вищими, порівняно з показниками для аміксину (найближчого аналога). У клініці встановлено високу ефективність флуренізиду за різних форм туберкульозу. Дослідження впливу флуренізиду на структурно-функціональні зміни клітин проводили *in vitro*, впливаючи безпосередньо на суспензію клітин або на виділені фосфоліпіди мозку щурів. Хоча препарат вже впроваджено у виробництво, а отже, й у протоколи щодо лікування захворювань, залишається невивченим питання механізму дії флуренізиду на мікроорганізми та на клітини пацієнта, що відображено в інструкції до використання препарату. Немає праць, які стосувалися б вивчення вільнорадикальних, мембранопов’язаних процесів клітин, що перебували під довготривалою дією флуренізиду. Актуальності дослідженням такого роду додає невизначеність впливу флуренізиду на функціональні параметри біологічних об’єктів на ранньому етапі розвитку організму. Тому вивчення дії флуренізиду на прооксидантний стан як на класичний показник патологічних проявів, а також на стан антиоксидантної системи та мембранопов’язаних процесів є, безперечно, необхідним для сучасної біофізики, фармації та медицини. Оскільки показником ушкодження структури та функцій клітин є зміна інтенсивності вільнорадикальних процесів, важливо дослідити дію флуренізиду на вміст продуктів ліпопероксидації та на зміну активності ензимів АОС у зародках в’юна як моделі ізольованої клітини, так і об’єкта раннього розвитку організму (Azzam E.I., 2012). Для виявлення змін за впливу флуренізиду у транспорті основних потенціалгенеруючих іонів Na^+ та K^+ крізь плазматичну мембрану доцільно вивчити активність Na^+, K^+-АТФази, яка є маркерним ензимом мембрани.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано на кафедрі біофізики та біоінформатики біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка згідно з планом науково-дослідної роботи кафедри за темами: "Проксидантно-антиоксидантний гомеостаз та системи мембранного транспорту біооб'єктів за дії фізико-хімічних чинників" (№ державної реєстрації 0116U001633, 2016–2018 рр.), "Стан іонтранспортних та антиоксидантної систем біооб'єктів за дії фізико-хімічних чинників" (№ державної реєстрації 0113U000866, 2013–2015 рр.), "Вивчення дії електромагнітного випромінювання на життєздатність клітин і процеси запліднення та ембріогенезу" (№ державної реєстрації 0113U003062, 2013–2015 рр.), "Комплексна оцінка впливу біологічно активних речовин та електромагнітних полів на морфофункціональні та біофізичні характеристики зародків в'юна впродовж ембріогенезу" (№ державної реєстрації 0107U009404, 2007–2010 рр.), "Еволюція іонтранспортних систем в період раннього розвитку зародків риб" (№ державної реєстрації 0105U002210, 2005–2006 рр.).

Мета і завдання дослідження. Мета роботи полягала у з'ясуванні особливостей впливу флуренізиду на прооксидантно-антиоксидантний стан, функціонування Na^+, K^+-АТФази, ультраструктуру зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L. та виявлення ступеня впливу досліджуваної субстанції на клітини.

Для досягнення поставленої мети визначено такі завдання:

1. Дослідити інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) і активності Na^+, K^+-АТФази за впливу флуренізиду на різних етапах розвитку зародків в'юна.
2. Дослідити активність ензимів АОС упродовж раннього ембріогенезу за впливу флуренізиду.
3. Провести тест на виживання та вивчити морфологічні зміни зародків і личинок в'юна за інкубації в середовищі з флуренізидом різних концентрацій.
4. Виявити ультраструктурні зміни у зародкових клітинах на окремих етапах розвитку за дії досліджуваного чинника.
5. Провести дисперсійний і кластерний аналіз вивчених показників.

Об'єкт дослідження: прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз та іонтранспортна система зародків.

Предмет дослідження: пероксидне окиснення ліпідів, стан антиоксидантної, іонтранспортної систем і ультраструктура зародків в'юна за дії флуренізиду.

Методи дослідження: біофізичні (спектральні, методи електронної мікроскопії), біометричні методи аналізу (порівняльний, дисперсійний і кластерний).

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше встановлено вплив флуренізиду на стан прооксидантно-антиоксидантної системи та функціонування Na^+, K^+-АТФази зародкових клітин в'юна *Misgurnus fossilis* L. Виявлено морфологічні й ультраструктурні зміни зародкових об'єктів на ранніх стадіях ембріогенезу. Уперше засвідчено, що за впливу флуренізиду у високих концентраціях відбувається зниження вмісту вторинних продуктів ліпопероксидації (ТБК-позитивних продуктів) на фоні підвищення кількості первинних продуктів (гідропероксидів; ГП), тоді як за дії нижчих концентрацій (0,01 мМ – 1 мМ) відбувається перетворення первинних продуктів ПОЛ на вторинні. Вплив

флуренізиду призводить до зростання активності супероксиддисмутази (СОД) на фоні зниження активності каталази (КАТ) і глутатіонпероксидази (ГПО) на всіх досліджуваних етапах ембріогенезу в'юна. Виявлено, що цей препарат у високих концентраціях зумовлює переважаюче спадання глутатіон-S-трансферазної (ГТ) активності на етапі розвитку зародків в'юна 256 та 1024 бластомерів. Уперше встановлено здатність флуренізиду пригнічувати активність Na^+, K^+-АТФази зародків в'юна під час ембріогенезу. Показано, що препарат зумовлює структурні порушення у мітохондріях і в ендоплазматичній сітці, викликає зростання кількості лізосом у зародках в'юна, причому ступінь вираженості цих змін є дозозалежним.

Практичне значення одержаних результатів. Результати досліджень мають важливе значення для висвітлення точного механізму біологічної дії флуренізиду і повторного впровадження у медичну практику. Результати досліджень можуть бути використані у формуванні нових нормативних документів, пов'язаних із фармакологією (наприклад, державної фармакопеї України). Експериментальні дані й теоретичні узагальнення дисертаційної роботи будуть впроваджені у навчальний процес на кафедрі біофізики та біоінформатики біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка під час викладання нормативних дисциплін і дисциплін вільного вибору студентів.

Особистий внесок здобувача. Дисертант самостійно провела пошук і аналіз даних наукової літератури за темою кандидатської дисертації, виконала експериментальну частину роботи, провела статистичне опрацювання отриманих результатів досліджень. Аналіз, інтерпретацію й узагальнення результатів роботи, а також формулювання основних положень, які виносяться на захист, і висновків було здійснено за участю наукового керівника – доктора біологічних наук, професора Д.І. Санагурського.

У проведенні електронно-мікроскопічних досліджень брав участь старший науковий співробітник, кандидат біологічних наук О.Р. Кулачковський.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації були представлені на III, XI, XII і XIII Міжнародних наукових конференціях студентів та аспірантів "Молодь і поступ біології" (Львів, 2007, 2015, 2016, 2017), IV з'їзді Українського біофізичного товариства (Донецьк, 2006), VI з'їзді Українського біофізичного товариства (Луцьк – Світязь, 2015), Науково-практичній конференції з міжнародною участю "Теорія та практика сучасної морфології" (Дніпропетровськ, 2016), Міжнародній науково-практичній конференції "Актуальні питання розвитку біології та екології" (Вінниця, 2016), XIV Міжрегіональній науковій конференції з очно-заочною участю "Актуальні питання біології та медицини" (Старобільськ, 2016), а також на наукових семінарах кафедри біофізики та біоінформатики біологічного факультету, щорічних звітних наукових конференціях біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка.

Публікації. Основні положення дисертаційної роботи опубліковано у 6 статтях, 5 із яких – у фахових наукових журналах, включених у перелік, затверджений МОН України, одна – у закордонному журналі, та 9 тез доповідей у матеріалах міжнародних і вітчизняних наукових конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається з таких структурних одиниць: "Анотація", "Вступ", "Огляд літератури", "Матеріали та методи

досліджень”, “Результати досліджень”, “Обговорення результатів досліджень”, “Висновки”, “Список використаних джерел”, а також додатків. Робота викладена на 143 сторінках (із них основна частина займає 101 сторінку), ілюстрована 21 рисунком і 9 таблицями. Список використаних джерел містить 189 найменувань.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. У розділі “Огляд літератури” узагальнено сучасні уявлення про процеси ПОЛ і систему антиоксидантного захисту клітин, висвітлено фізико-хімічні властивості флуренізиду та його біологічну активність (зокрема, його вплив на іонтранспортну систему, прооксидантно-антиоксидантний стан і морфологію) в зародках в’юна.

Матеріали і методи досліджень. Експерименти проводили на зародках в’юна *Misgurnus fossilis* L., які отримували і запліднювали за методикою Нейфаха (Нейфах А.А., 1977). Стадії розвитку контролювали візуально під бінокулярним мікроскопом МБС-9. Через 5–10 хв після запліднення відмиті зиготи інкубували у фізіологічному розчині Гольфретера (t = 20–22 °С), який містив розчин флуренізиду (використовували новосинтезовану професором Л.І. Петрух у Львівському національному медичному університеті імені Данила Галицького субстанцію) в концентраціях 0,01; 0,05; 0,15; 1; 5; 15 мМ. Флуренізид у концентрації 1 мМ є добовою терапевтичною дозою для організму. Зародки в’юна відбирали через 60, 150, 210 і 330 хв після запліднення яйцеклітин, що відповідали першому (2 бластомери), четвертому (16 бластомерів), шостому (64 бластомери), восьмому (256 бластомерів) і десятому (1024 бластомери) дробленню зиготи. Таку серію дослідів умовно названо *in vivo*. У іншій серії дослідів до гомогенату зразків зародків, які були відібрані на певному етапі розвитку, додавали аліквоту флуренізиду (час інкубації 10 хв). Ці досліди умовно названо *in vitro*.

Виділення бластодерм із зародків та їхню дисоціацію до ізольованих клітин проводили за методикою Бериташвілі (Бериташвили Д.Р. и др., 1974). Із клітин відбирали гетерогенну фракцію плазматичних мембран за методами, описаними Evans і Луциком (Evans W.H., 1980; Луцик М.Д. та ін., 1986). Вміст протеїну у зразках визначали за методом Лоурі (Lowry O.H. et al., 1951).

Інтенсивність процесів ПОЛ оцінювали за вмістом первинних – ГП (Мирончик В.В., 1984) і вторинних продуктів ліпопероксидації (ТБК-позитивних продуктів) (Тимирбулатов Р.А., 1981). Стан АОС вивчали за активністю СОД, КАТ, ГПО та ГТ (Костюк В.А. и др., 1990; Королюк М.А. и др., 1988; Моин В.М., 1986; Habig W.H., 1974). Активність Na^+, K^+-активованої, Mg^{2+}-залежної АТФази визначали у мікросомальній фракції зародків в’юна (Прохорова М.И., 1982).

На першому, шостому та десятому етапах дроблення зародків виконували електронно-мікроскопічні дослідження (Голиченков В.А., 1996). Зразки клітин фіксували в розчині глютарового альдегіду. Отримані ультрарізи переглядали за допомогою електронного трансмісійного мікроскопа ПЕМ-100.

Перевірку нормальності вибірки здійснювали за допомогою критерію Колмогорова-Смірнова з використанням пакета аналізу SPSS (Statistics17). Статистичну обробку результатів досліджень проводили з використанням програми „Excel-2007” для Windows. Обчислення основних статистичних показників

проводили за кількісними даними, отриманими в результаті досліджень (середнє арифметичне значення, стандартна похибка середнього арифметичного).

Для оцінки достовірності різниці між статистичними характеристиками двох альтернативних сукупностей даних обчислювали коефіцієнт Стьюдента. Достовірною вважалася різниця за показника достовірності $p \geq 0,95$. За допомогою двофакторного дисперсійного аналізу розраховували частку впливу флуренізиду, часу розвитку та неврахованих чинників на стан досліджуваних показників у зародках в'юна. Проводили кластерний аналіз для виявлення етапів розвитку, на яких є однакові зміни вмісту ГП, ТБК-позитивних продуктів, активності СОД, КАТ, ГПО та ГТ, використовуючи пакет прикладних програм SPSS (Statistics17). Результати дослідження представлено у вигляді рисунків і таблиць.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

Зміни інтенсивності процесів пероксидного окиснення ліпідів на різних етапах розвитку зародків в'юна за впливу флуренізиду у дослідах *in vitro*. Встановлено, що в дослідах *in vitro* флуренізид зумовлює порушення утворення ТБК-позитивних продуктів. Так, на етапі розвитку 2 бластомери виявлено зниження вмісту вторинних продуктів ліпопероксидації, за дії флуренізиду всіх концентрацій, крім 0,05 мМ. На етапі розвитку 16 бластомерів встановлено протилежний ефект за впливу досліджуваної сполуки у діапазоні концентрацій 0,01÷1 мМ. Флуренізид у концентрації 0,05 мМ веде до підвищення вмісту ТБК-позитивних продуктів на 32 % ($p \geq 0,999$) на етапі розвитку зародкових клітин 64 бластомери, тоді як субстанція у концентрації 5 мМ зумовлює зниження їхнього вмісту на 65 % ($p \geq 0,999$). Як на етапі розвитку 256 бластомерів, так і на етапі 1024 бластомери вміст вторинних продуктів ліпопероксидації підвищується за впливу флуренізиду в концентраціях 0,01 та 1 мМ на 24 і 56 % відповідно ($p \geq 0,95$). Встановлено, що субстанція у концентрації 0,05 мМ на етапі розвитку зародків в'юна 256 бластомерів веде до зниження вмісту ТБК-позитивних продуктів на 13 % ($p \geq 0,95$), порівняно з контролем. Важливо зазначити, що флуренізид у концентрації 15 мМ спричиняє зниження інтенсивності процесів ПОЛ на всіх етапах розвитку зародків в'юна, що свідчить про сповільнення в них обмінних процесів.

Зміни активності Na^+, K^+-АТФази на різних етапах розвитку зародків в'юна за впливу флуренізиду *in vitro*. У результаті проведених досліджень встановлено, що дія флуренізиду в діапазоні концентрацій 0,05÷15 мМ на функціонування Na^+, K^+-АТФази веде до залежних від концентрації препарату змін активності цього ферменту протягом раннього розвитку зародків (рис. 1).

Флуренізид у низьких концентраціях (0,01–0,15 мМ) не спричиняє достовірних змін роботи Na^+, K^+-АТФази на етапах розвитку 2 і 16 бластомерів, в той час як у високих концентраціях (1–15 мМ) веде до зниження активності цього ензиму. Акивність Na^+, K^+-АТФази знижується за дії флуренізиду в усіх досліджуваних концентраціях, крім 0,05 мМ, на етапах розвитку 64, 256 та 1024 бластомери, що свідчить про порушення іонного гомеостазу в зародках (рис. 1).

Найбільш інтенсивне спадання відмічено за концентрації флуренізиду 15 мМ. Зниження активності цього ензиму свідчить про порушення флуренізидом трансмембранного потенціалу зародкових клітин (Целевич М.В., 2008).

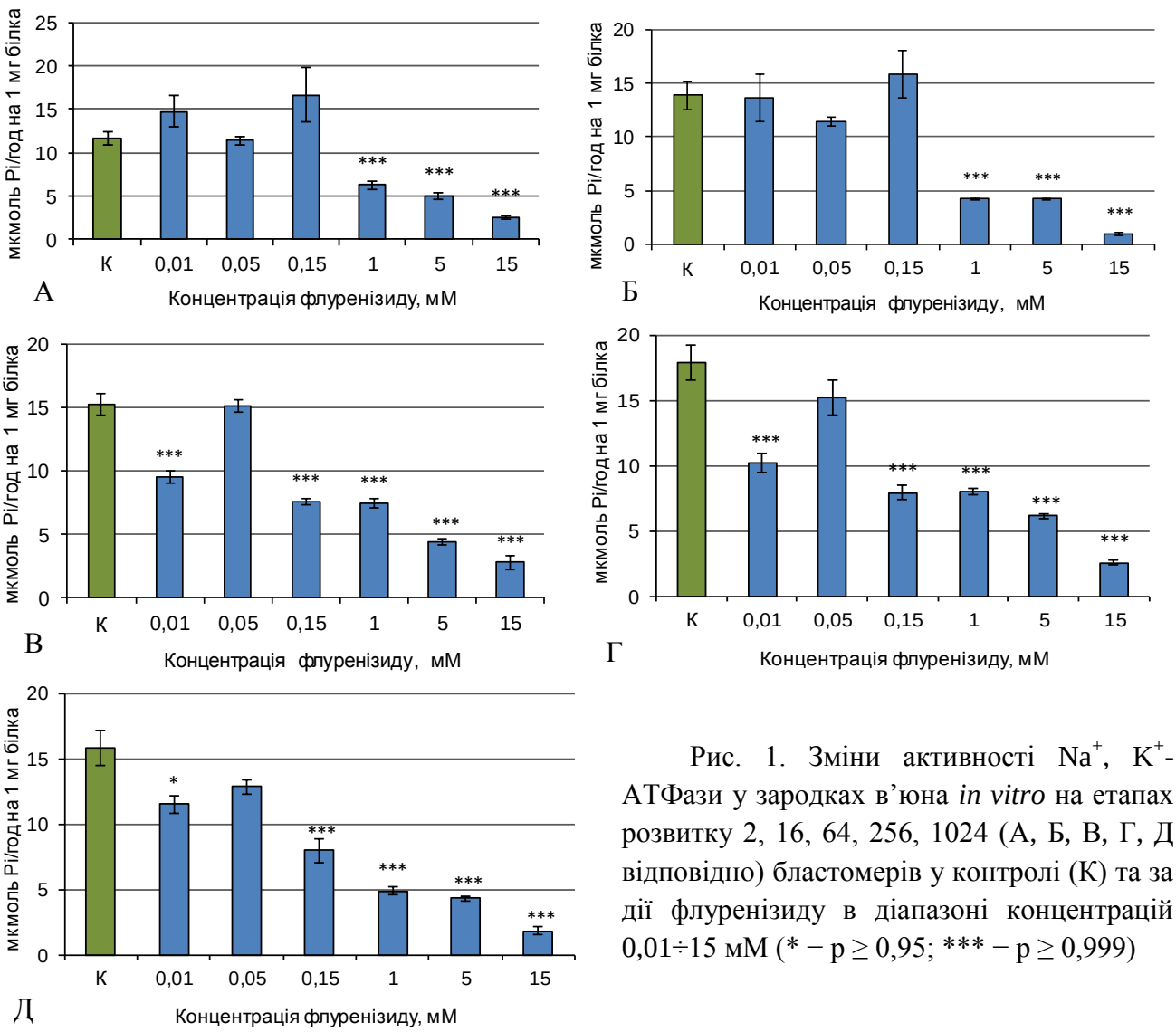


Рис. 1. Зміни активності Na^+, K^+-АТФази у зародках в'юна *in vitro* на етапах розвитку 2, 16, 64, 256, 1024 (А, Б, В, Г, Д відповідно) бластомерів у контролі (К) та за дії флуренізиду в діапазоні концентрацій 0,01÷15 мМ (* – $p \geq 0,95$; *** – $p \geq 0,999$)

Відомо, що зміна ліпідного мікрооточення внаслідок процесів ПОЛ може впливати на активність мембранопов'язаних ферментів (Boldyrev A.A., 1977; Kukreja R.C., 1990; Barteri M., 2005). Відомо, що Na^+, K^+-АТФаза є чутливою до активних форм оксигену й безпосередньо бере участь в оксидативному стресі (Kukreja R.C., 1990). Низкою досліджень встановлено, що ензим характеризується різною чутливістю до окисників: АТФаза є стійкою до дії супероксид-аніона, меншою мірою стійкою до пероксиду гідрогену, але дуже чутливою до гідроксильного радикала (Boldyrev A.A., 1977; Kukreja R.C., 1990). Отже, зниження активності Na^+, K^+-АТФази у зародках в'юна в дослідах *in vitro* пов'язане з порушенням інтенсивності процесів ліпопероксидації за впливу флуренізиду.

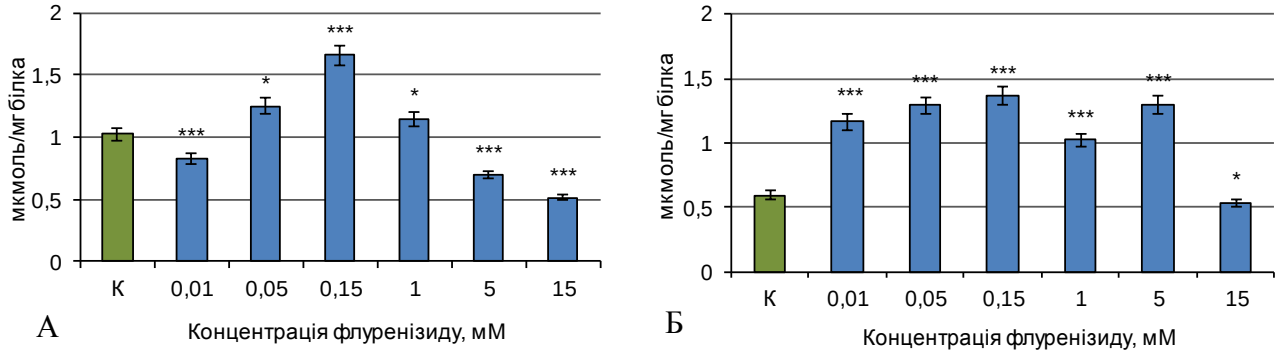
Морфологічні зміни у зародках в'юна впродовж ембріогенезу за дії флуренізиду. Провівши тест на виживання зародків в'юна за інкубації у середовищі з флуренізидом, встановили дозозалежне зниження їхньої життєздатності, порівняно з контролем. Виявлено, що на першу добу розвитку відсоток виживання зародків в'юна знижується приблизно у 2 рази за впливу низьких концентрацій флуренізиду (табл. 1). Високі концентрації субстанції спричиняють значну смертність зародків в'юна вже на першу добу її дії, що свідчить про шкідливий вплив на зародкові клітини. Відомо, що флуренізид здатний діяти на ДНК (Петрух Л.І., 2008), а це пояснює його негативну дозозалежну дію на життєздатність зародків.

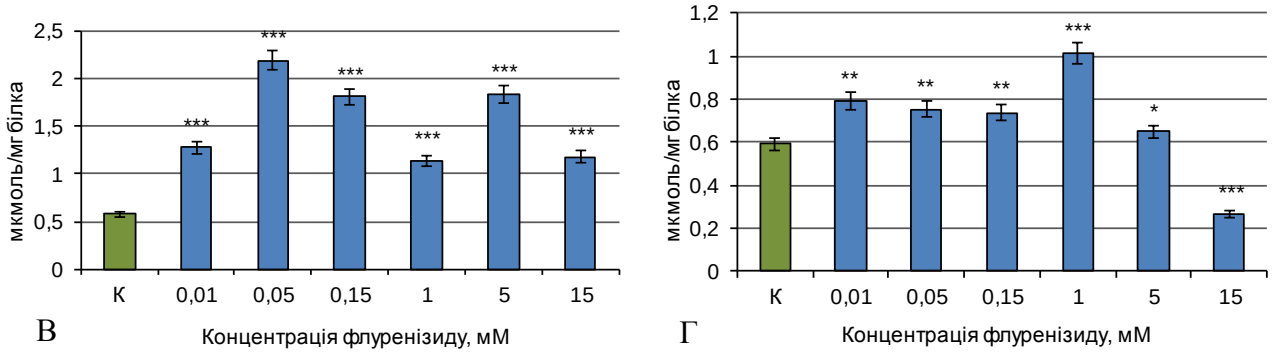
Таблиця 1

Вплив розчину флуренізиду на виживання зародків в'юна

Доба	Живі зародки, %						
	контроль	0,01 мМ	0,05 мМ	0,15 мМ	1 мМ	5 мМ	15 мМ
Перша	75	38	46	35	6	0	0
Друга	62	21	20	12	1	0	0
Третя	62	10	5	10	0	0	0
Четверта	48	3	0	0	0	0	0

Вплив флуренізиду на інтенсивність процесів ліпопероксидації зародків в'юна впродовж ембріогенезу. Досліджуючи інтенсивність процесів ПОЛ, встановили, що на стадії 2 бластомери знижується вміст ГП за дії флуренізиду в концентраціях 0,01; 0,05; 0,15 та 1мМ на 44, 43, 57 і 83 % відповідно ($p \geq 0,999$). Проте флуренізид у концентраціях 5 і 15 мМ спричиняє підвищення вмісту ГП у зародках в'юна на 57 і 32 % відповідно ($p \geq 0,999$), що свідчить про зростання вільнорадикальних процесів (Головчак Н.П., 2008).





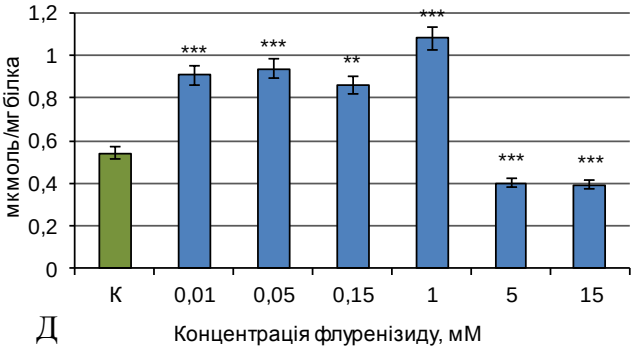


Рис. 2. Вміст ТБК-позитивних продуктів у зародках в'юна на етапах розвитку 2, 16, 64, 256 та 1024 (А, Б, В, Г, Д відповідно) бластомерів у контролі (К) та за дії флуренізиду в діапазоні концентрацій 0,01–15 мМ (* – $p \geq 0,95$; ** – $p \geq 0,99$; *** – $p \geq 0,999$)

За подальшого перебування зародків у середовищі з флуренізидом усіх досліджуваних концентрацій встановлено, що на етапі розвитку 16 бластомерів відбувається значне підвищення вмісту первинних і вторинних продуктів ліпопероксидації. Це свідчить про те, що зародки в'юна на цій стадії розвитку є

дуже чутливими до флуренізиду. Відомо, що етап розвитку 16 бластомерів є початком стадії морули. У цей час інтенсифікується мембраногенез, що зумовлює метаболічні зміни в зародках в'юна. Тому значну прооксидантну дію флуренізиду виявлено саме на етапі розвитку 16 бластомерів (рис. 2).

За вивчення ТБК-позитивних продуктів встановлено переважаюче їхнє зростання на етапах розвитку 16, 64, 256 та 1024 бластомери за впливу флуренізиду. Проте слід відмітити, що субстанція у найвищій концентрації спричиняє зниження вмісту ТБК-позитивних продуктів у зародкових об'єктах на всіх досліджуваних стадіях, окрім стадії 64 бластомери. Отже, високі концентрації флуренізиду зумовлюють зниження вмісту вторинних продуктів ліпопероксидації у зародках на фоні підвищення вмісту первинних продуктів, тоді як за дії нижчих концентрацій відбувається перетворення більшою мірою первинних продуктів ліпопероксидації (гідропероксидів) на вторинні (рис. 2).

Вплив флуренізиду на активність ключових ензимів системи антиоксидантного захисту зародків в'юна. Встановлено, що флуренізид у концентрації 0,01 мМ зумовлює значне зростання супероксиддисмутазної активності на етапі розвитку зародків в'юна 2 бластомери.

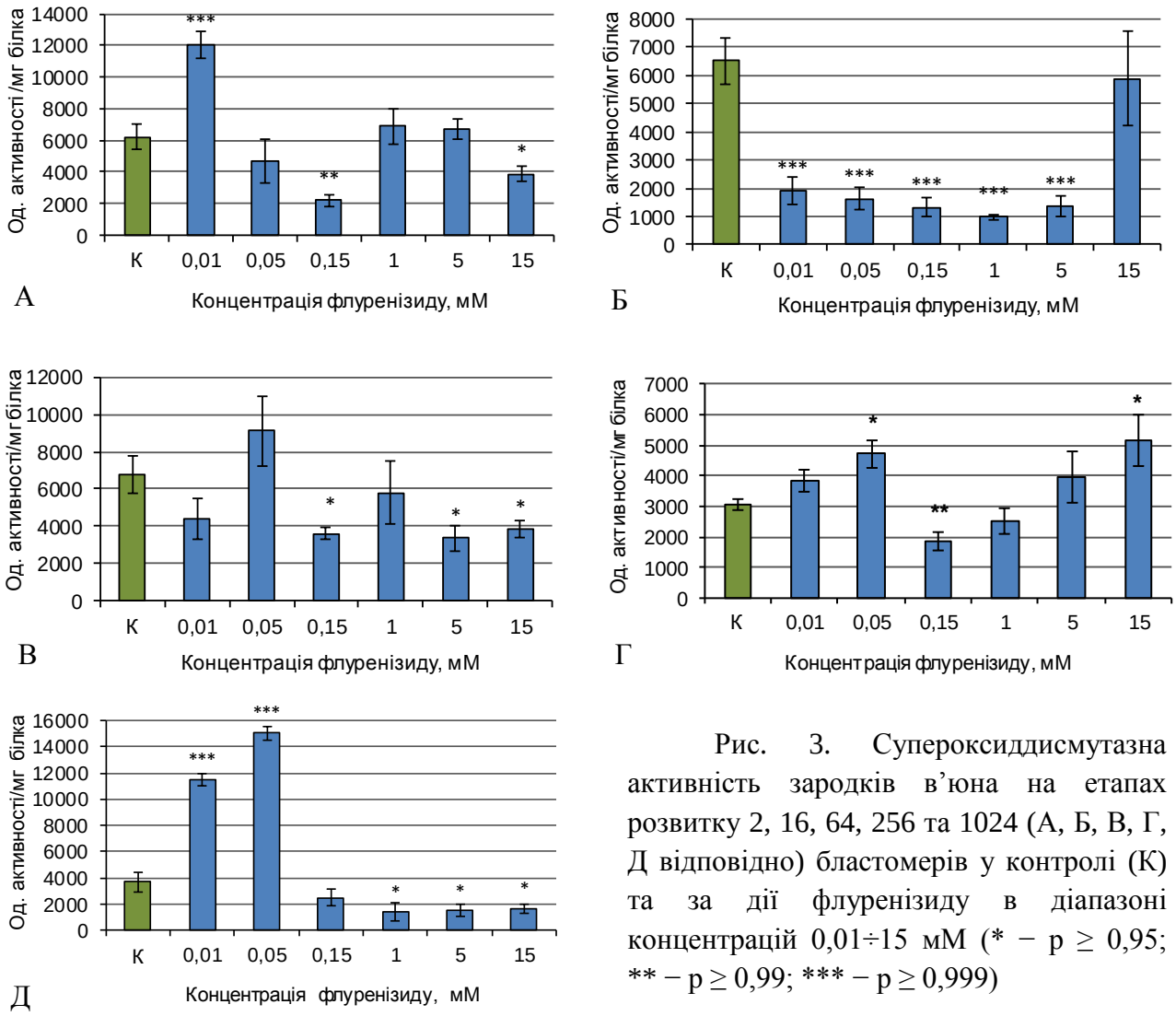


Рис. 3. Супероксиддисмутазна активність зародків в'юна на етапах розвитку 2, 16, 64, 256 та 1024 (А, Б, В, Г, Д відповідно) бластомерів у контролі (К) та за дії флуренізиду в діапазоні концентрацій 0,01÷15 мМ (* – $p \geq 0,95$; ** – $p \geq 0,99$; *** – $p \geq 0,999$)

На цьому етапі розвитку СОД активність достовірно спадає за дії флуренізиду в концентраціях 0,15 та 15 мМ. Із даних літератури відомо, що ця сполука здатна знешкоджувати $O_2^{\cdot -}$, чим і можна пояснити зниження СОД активності (рис. 3). Відмічено, що флуренізид у всіх досліджуваних концентраціях веде до значного спадання активності СОД на стадії розвитку 16 бластомерів на фоні підвищення вмісту продуктів ліпопероксидації. Отже, як уже зазначалося, цей етап розвитку є найбільш чутливим до дії досліджуваного антибіотика.

Подальший розвиток зародків у середовищі з флуренізидом зумовлює достовірне спадання СОД активності на етапі 64 бластомери. Варто підкреслити, що цей антибіотик у високих досліджуваних концентраціях на стадії 10 поділу зародкових клітин зумовлює спадання активності СОД у середньому на 60 %, тоді як низькі концентрації ведуть до її зростання. Відомо, що на етапі 10 поділу зародок починає асинхронно ділитися, чим пояснюються значні зміни активності СОД (рис. 3).

Встановлено, що на стадії 2 бластомери флуренізид у вищих концентраціях зумовлює достовірне спадання каталазної активності на фоні нормальної роботи ГПО, що свідчить про незначний вміст H_2O_2 у зародку (рис. 4).

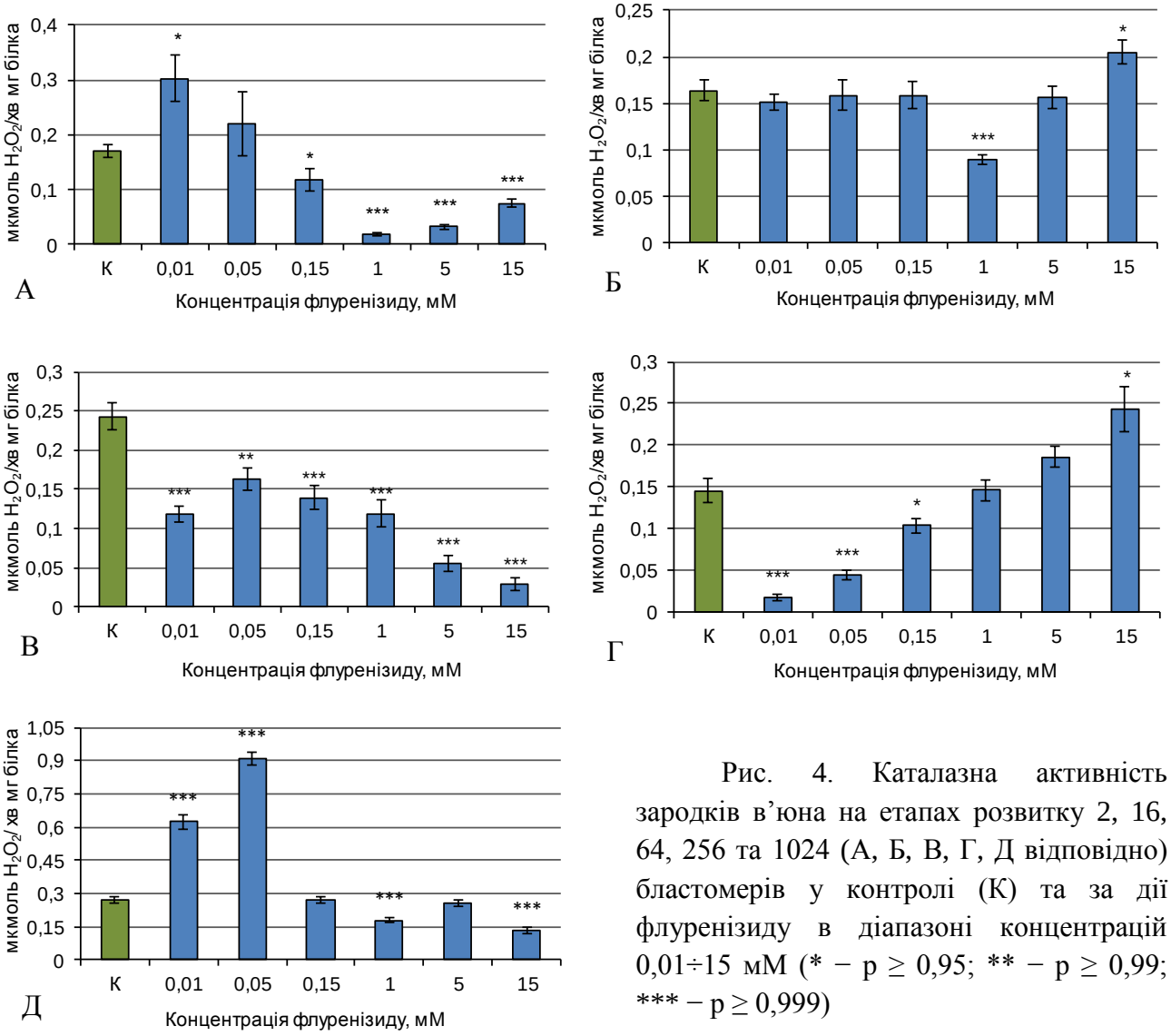


Рис. 4. Каталазна активність зародків в'юна на етапах розвитку 2, 16, 64, 256 та 1024 (А, Б, В, Г, Д відповідно) бластомерів у контролі (К) та за дії флуренізиду в діапазоні концентрацій 0,01÷15 мМ (* – $p \geq 0,95$; ** – $p \geq 0,99$; *** – $p \geq 0,999$)

Виявлено спадання активності цього ферменту на етапі розвитку 64 бластомери за всіх досліджуваних концентрацій антибіотика. Зниження роботи КАТ свідчить про ймовірне зниження вмісту в клітинах пероксиду водню, який є субстратом для КАТ, оскільки активність СОД на цих етапах розвитку зародків в'юна знижена. Слід відзначити, що на цій стадії розвитку виявлено також тенденцію до спадання активності ГПО, а це підтверджує зниження вмісту H_2O_2.

У ході досліджень виявлено, що флуренізид у низьких концентраціях 0,01; 0,05 мМ, а також у максимальній досліджуваній концентрації (15 мМ), зумовлює значне зростання ГПО активності (на 435; 169 та 151 % відповідно; $p \geq 0,95$) на етапі розвитку зародків в'юна 2 бластомери. На стадії 16 бластомерів відмічено зростання активності цього ензиму за впливу флуренізиду в концентрації 0,15 мМ на 129 % ($p \geq 0,95$). Варто підкреслити, що за дії антибіотика в інших досліджуваних концентраціях у зародках в'юна на цій стадії розвитку виявлено тенденцію до зростання ГПО активності, порівняно з контролем.

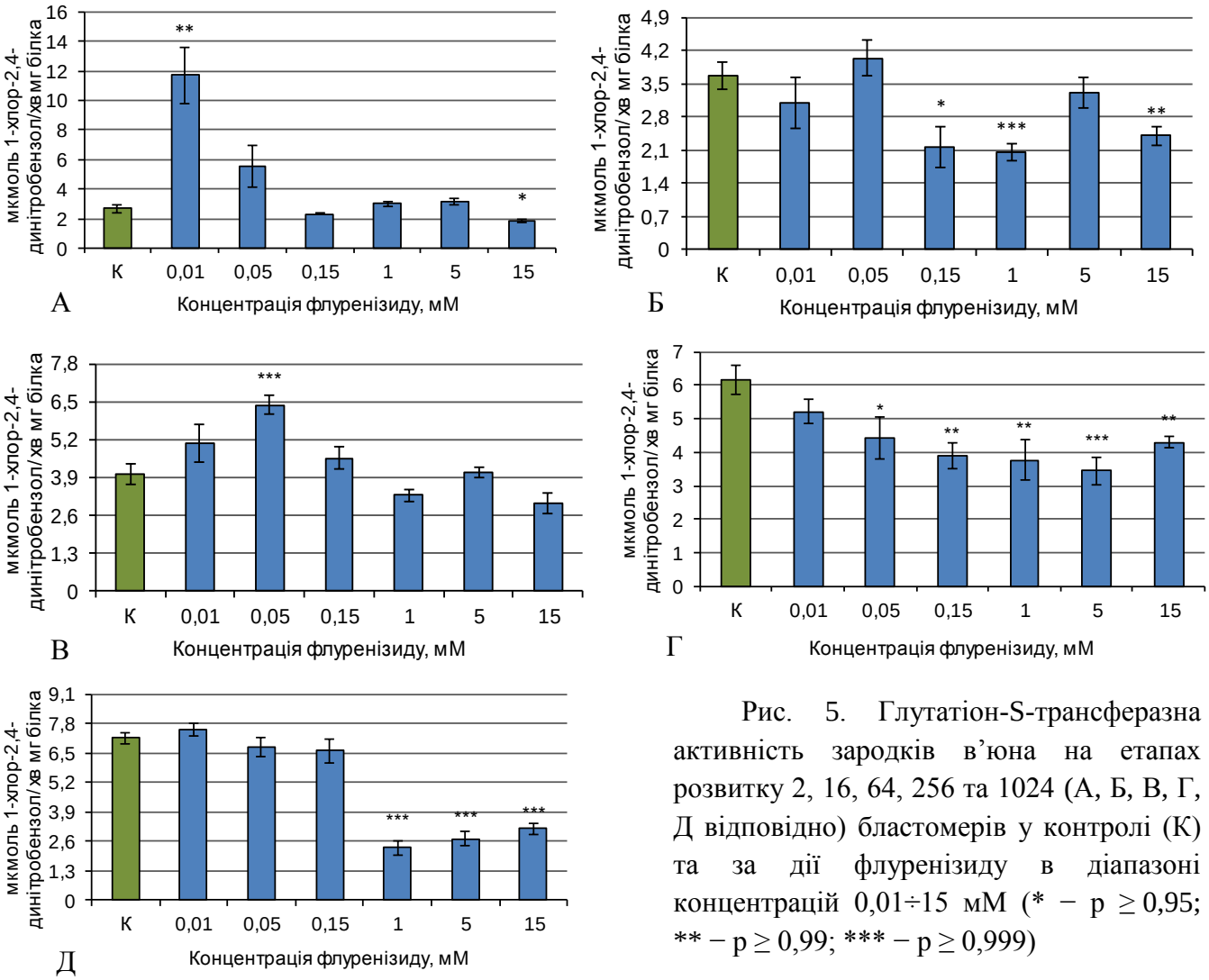


Рис. 5. Глутатіон-S-трансферазна активність зародків в'юна на етапах розвитку 2, 16, 64, 256 та 1024 (А, Б, В, Г, Д відповідно) бластомерів у контролі (К) та за дії флуренізиду в діапазоні концентрацій 0,01÷15 мМ (* – $p \geq 0,95$; ** – $p \geq 0,99$; *** – $p \geq 0,999$)

На етапі розвитку 64 бластомери встановлено переважаюче зниження ГПО активності, проте ці зміни є недостовірними. Значне зростання ГПО активності на 155 % ($p \geq 0,95$) виявлено на стадії 256 бластомерів за дії флуренізиду в концентрації 15 мМ. Зростання ГПО активності пов'язане з реакцією знешкодження

пероксиду водню, детоксикацією інших пероксидів, насамперед ліпідних, що входять до складу біомембран. Подальший розвиток зародків у середовищі з флуренізидом зумовлює спадання глутатіонпероксидазної активності на етапі розвитку 1024 бластомерів за концентрацій антибіотика 0,15; 1; 5 та 15 мМ, порівняно з контролем.

Флуренізид незначно порушує роботу ГТ у період раннього ембріогенезу зародків на всіх етапах розвитку. Цей антибіотик у високих концентраціях зумовлює переважаюче спадання ГТ активності на етапах розвитку зародків 8 та 10 поділу. Флуренізид у максимальній концентрації призводить до зниження ензиматичної активності впродовж досліду, що свідчить про слабку інактивацію досліджуваного антибіотика цим ензимом. Відомо, що ГТ забезпечує реакції кон'югації у процесі знешкодження лікарських речовин, тому спадання її активності розглядається як негативний процес (рис. 5).

Ультраструктурні зміни зародкових клітин в'юна на різних етапах розвитку за дії флуренізиду. Аналіз контрольних електронограм показав, що у зародках в'юна на етапі двох бластомерів переважають неправильної форми різного розміру мітохондрії з добре помітними паралельно розташованими кристами, електроннощільним матриксом, і це узгоджується з даними літератури (Зинь А., 2014). На цьому етапі розвитку в гіалоплазмі клітин переважає гладка ендоплазматична сітка (гЕПС), що свідчить про низький рівень біосинтетичних процесів. Виявлено лізосоми, жовткові гранули, пероксисоми з чітко окресленими мембранами. Матрикс пероксисом має електроннощільний вміст. Слід зазначити, що на етапі 2 бластомерів у клітинах трапляються поодинокі пероксисоми. В гіалоплазмі зародкових клітин більшою мірою представлені первинні лізосоми (дрібні мембранні пухирці, заповнені безструктурною речовиною, що містить активну кислу фосфатазу) та меншою – вторинні (рис. 6, А).

Встановлено, що флуренізид у концентрації 0,05 мМ на етапі 2 бластомерів зумовлює набрякання мітохондрій, руйнування їхніх крист. Матрикс мітохондрій стає оптично світлим, що свідчить про зміну вмісту його компонентів, а також про порушення енергетичних процесів у клітині. Як і в контролі, переважає гЕПС. У гіалоплазмі збільшується вміст вільних полірибосом. Уже на цьому етапі розвитку 0,05 мМ флуренізиду подекуди веде до порушення структури мембрани навколо жовткових гранул (рис. 6, Б).

За інкубації зародків в умовах наявності флуренізиду концентрацією 0,15 мМ виявлено більш виражені порушення структури мітохондрій на етапі розвитку 2 бластомерів (рис. 6, В). Значна частина мітохондрій має зруйновані кристи. Їхньому матриксу властиве зниження електронної щільності, внаслідок чого утворюються прозорі зони. В окремих мітохондріях виявлено ділянки з «розпушенням» зовнішньої мембрани. Такі зміни ведуть до руйнування мітохондрій. Жовткові гранули втрачають чіткість меж, що свідчить про порушення структури біліпідного шару. Ендоплазматична сітка бластомерів не проглядається, тому що вона зруйнована. У гіалоплазмі зростає кількість лізосом, що свідчить про підвищену протеолітичну активність клітин.

Флуренізид у концентрації 5 мМ спричиняє значну вакуолізацію, тобто гідропічну дегенерацію цистерн ендоплазматичної сітки (рис. 6, Г). У гіалоплазмі,

таким чином, переважає гЕПС, що свідчить про слабкі біосинтетичні процеси клітин. Електронна щільність матриксу мітохондрій знижена, проте внутрішня (кристи) і зовнішня мембрани мітохондрій добре проглядаються.

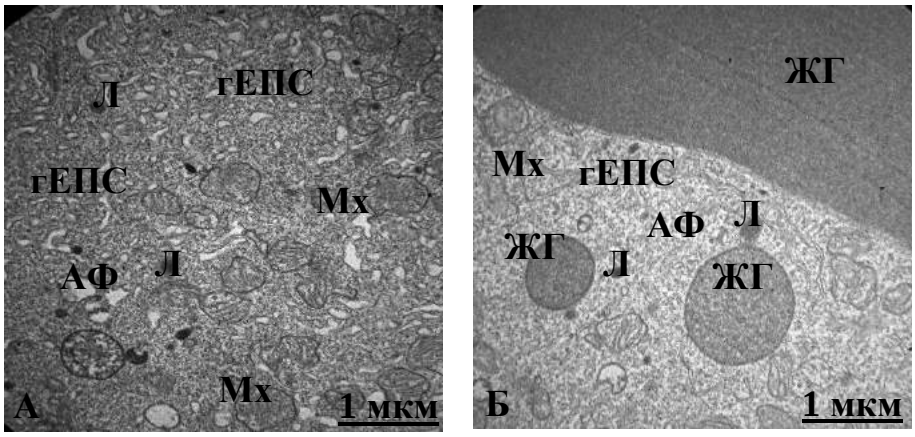
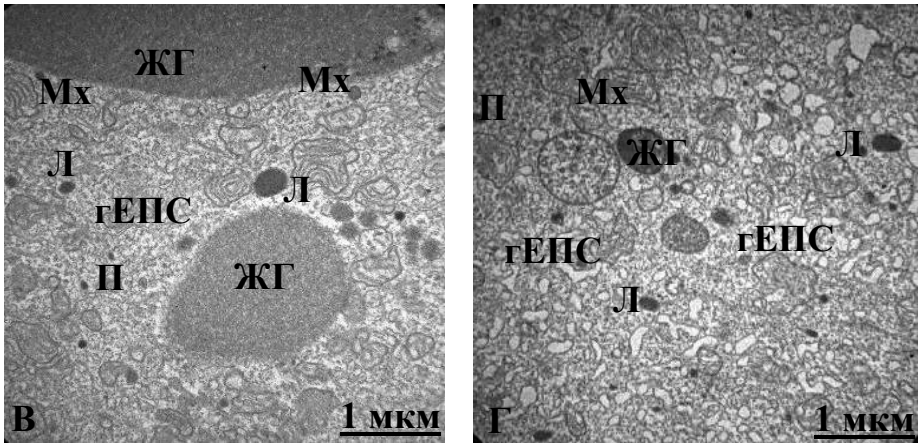


Рис. 6. Ультраструктура зародків в'юна на етапі розвитку 2 бластомери у контролі (А); за впливу флуренізиду в концентрації 0,05 мМ (Б); 0,15 мМ (В); 5 мМ (Г): Мх – мітохондрія; гЕПС – гладка ендоплазматична сітка; Л – лізосома; П – пероксисома; АФ – автофагосома; ЖГ – жовткова гранула.
Збільшення 1 × 10 000



Є також велика кількість мітохондрій із підвищеною електронною щільністю і втраченими кристами. На електронограмах виявлено травні вакуолі та підвищену кількість лізосом. Трапляються ділянки з незворотними дегенеративними змінами гіалоплазми. Наявні пероксисоми. З літератури відомо, що вакуолізація зародкових клітин, яка є пізнім результатом некротичного типу смерті клітини, − це наслідок порушення входження Na^+, K^+ та молекул води в цитоплазму, виходу іонів Ca^{2+} та блокування його транспорту в клітинні депо бластомерів.

Отже, флуренізид зумовлює структурні порушення мітохондрій і ендоплазматичної сітки, викликає зростання кількості лізосом у зародків в'юна на етапі розвитку 2 бластомерів, причому ступінь вираженості цих змін є дозозалежним. Кількість порушень структури органел корелює з тестом на виживання, за яким встановлено, що флуренізид у концентрації 5 мМ вже на першу добу розвитку спричиняє 100 %-ву загибель зародків в'юна.

У контрольних бластомерах до 10 поділу мітохондрії набувають овальної форми з чітко вираженими паралельно розташованими кристами, що узгоджується з даними літератури (Зинь А., 2014). Мембрана, яка оточує жовткові гранули, має правильні обриси. Наявні травні вакуолі, пероксисоми. Переважає гЕПС (рис. 7, А).

До десятого поділу флуренізид у концентрації 0,05 мМ зумовлює ушкодження мітохондій, матрикс яких оптично непрозорий (мутний), кристи дезорганізовані. Подекуди трапляються мітохондрії з ознаками набряку. Мембрани органел розпушені, що свідчить про порушення процесів ліпопероксидації у клітинах. На цьому етапі розвитку антибіотик вищої

досліджуваної концентрації (0,15 мМ) призводить до значних ушкоджень усіх компонентів клітини (рис. 7, Б). З'являються великі травні вакуолі, руйнуються жовткові гранули, мітохондрії важко виявити, ЕПС і апарат Ґольджі неструктуровані.

Відомо, що зміни внутрішньоклітинних органел із дуже високою електронною щільністю можуть свідчити про процеси денатурації внутрішньоклітинних білків та ущільнення колоїдів, які виходять за межі фізіологічної норми.

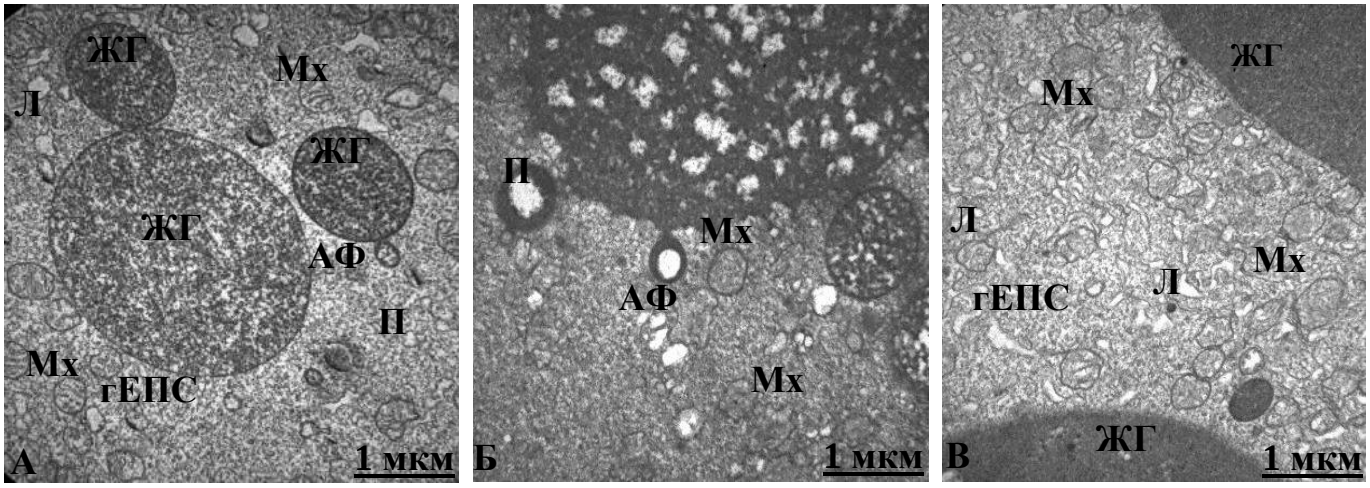


Рис. 7. Ультраструктура зародків в'юна на етапі 10 поділу в контролі (А); за впливу флуренізиду в концентрації 0,15 (Б) та 5 мМ (В): Мх – мітохондрія; гЕПС – гладка ендоплазматична сітка; Л – лізосома; П – пероксисома; АФ – автофагосома; ЖГ – жовткова гранула. Збільшення 1 × 10 000

Слід відзначити, що за концентрації флуренізиду 5 мМ ультраструктурні зміни бластомерів є менш вираженими на етапі 10 поділу (рис. 7, В). Гіалоплазма клітин містить гЕПС із трохи розширеними цистернами. Мітохондрії мають овальну форму, проте їхня зовнішня мембрана деформована, хоча має добре виражену оконтурованість. Трапляються набряклі мітохондрії з прозорим вмістом. Є поодинокі лізосоми і травні вакуолі. Відомо, що, починаючи з дев'ятого поділу, відбувається десинхронізація поділу ядра, падає мітотичний індекс, інтенсивно синтезується РНК і активується морфогенетична функція ядер. Ймовірно, на цьому етапі розвитку зародків в'юна флуренізид у високій концентрації активує захисні процеси клітин, тоді як низькі призводять до їхнього пригнічення. Ці результати корелюють з інтенсивністю процесів ліпопероксидації, де нами було показано, що за впливу флуренізиду в концентрації 5 мМ вміст ТБК-позитивних продуктів знижувався щодо контролю, порівняно з дією флуренізиду в концентрації 0,05 мМ та 0,15 мМ, за впливу яких вміст вторинних продуктів ліпопероксидації зростав, порівняно з контролем.

Дисперсійний аналіз впливу флуренізиду на мембранопов'язані процеси та показники стану прооксидантно-антиоксидантної системи. Провівши двофакторний дисперсійний аналіз, встановили, що на утворення ГП значно впливає фактор часу розвитку зародків в'юна. Проте вже за утворення вторинних продуктів ліпопероксидації приблизно однаковий вплив чинять і час, і флуренізид, і невраховані фактори (рис. 8, А). Отже, флуренізид значною мірою впливає на утворення вторинних продуктів ПОЛ.

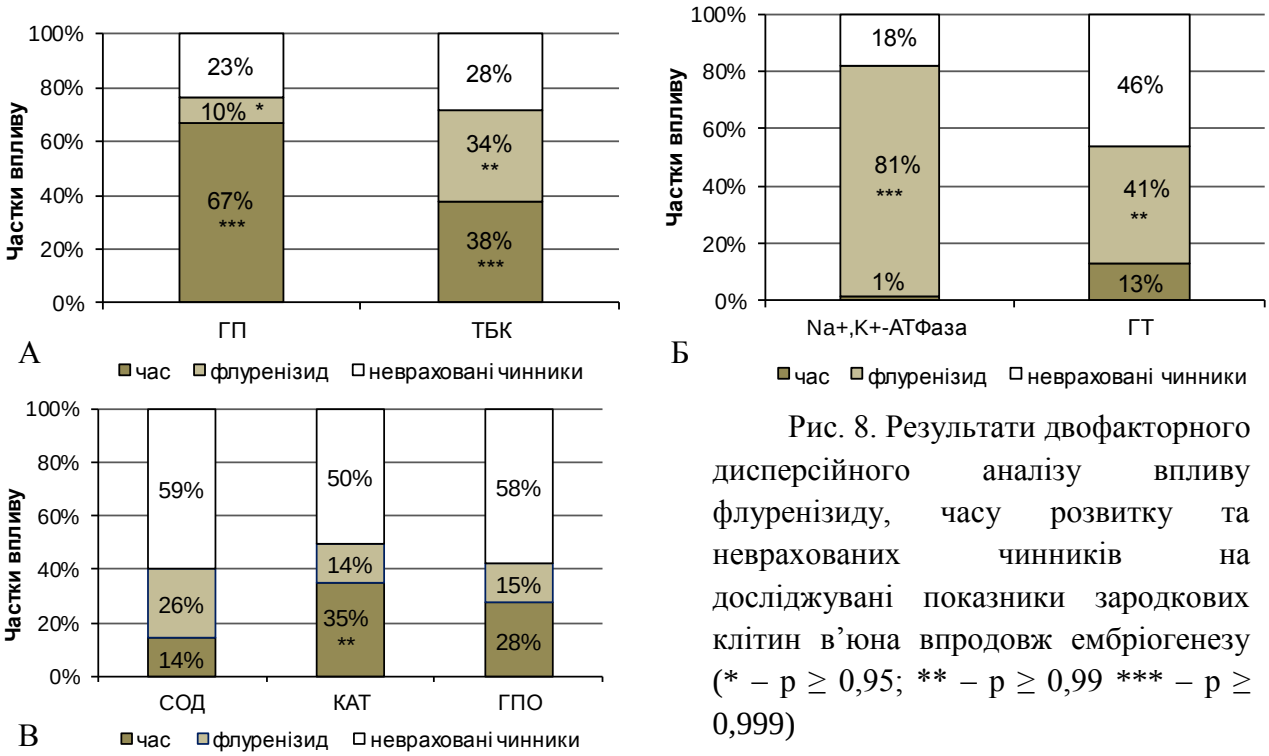


Рис. 8. Результати двофакторного дисперсійного аналізу впливу флуренізиду, часу розвитку та неврахованих чинників на досліджувані показники зародкових клітин в'юна впродовж ембріогенезу (* – p ≥ 0,95; ** – p ≥ 0,99 *** – p ≥ 0,999)

На супероксиддисмутазну, каталазну, глутатіонпероксидазну та глутатіонтрансферазну активність зародків в'юна потужний вплив чинять невраховані фактори, до яких можуть належати атмосферний тиск та інші зовнішні чинники, за яких відбувається розвиток (рис. 8, Б, В). Опосередкований вплив на роботу СОД і КАТ здійснює флуренізид, що свідчить, ймовірно, про непряму дію цього чинника на активність ферментів. Нами встановлено, що час розвитку більш виражено впливає на каталазну активність. Слід підкреслити, що на роботу ГТ і Na^+, K^+-АТФази потужний вплив чинить флуренізид (41 %) (рис. 8, Б).

Кластерний аналіз впливу флуренізиду на показники стану прооксидантно-антиоксидантної системи. Застосувавши кластерний аналіз, встановили, що до стадії 64 бластомери усі експериментальні групи за досліджуваними показниками були розділені на 4 градації подібності. Варто відзначити, що флуренізид у концентрації 0,05 мМ не чинить значного впливу на показники, які були на рівні контролю (на етапі 2 бластомери). Це підтверджується дослідами *in vitro*.

Таблиця 2

Результати кластерного аналізу впливу флуренізиду на досліджувані показники зародкових клітин в'юна впродовж раннього ембріогенезу

Досліджувані групи	2 бластомери	16 бластомерів	64 бластомери	256 бластомерів	1024 бластомери
Контроль	1	1	1	1	1
0,01 мМ	2	2	2	2	2
0,05 мМ	1	2	3	2	2
0,15 мМ	3	2	4	3	3
1 мМ	3	3	2	4	4
5 мМ	4	2	2	4	5
15 мМ	4	4	2	5	5

На етапі розвитку 256 та 1024 бластомери за допомогою кластерного аналізу всі досліджувані групи за показниками розподіляються на 5 градацій подібності, що свідчить про певну зміну впливу флуренізиду на зародки в'юна. Зокрема, такий «особливий» вплив притаманний флуренізиду в концентрації 5 і 15 мМ (табл. 2).

Узагальнення

На основі одержаних результатів і аналізу даних літератури запропоновано узагальнювальну схему, на якій представлено гіпотетичний механізм впливу флуренізиду на ембріогенез в'юна. Згідно зі схемою (рис. 9), в результаті впливу флуренізиду на зародки насамперед його дії піддається клітинний бар'єр – плазматична мембрана, що, у свою чергу, призводить до інтенсифікації процесів пероксидного окиснення ліпідів і до інгібування активності Na^+, K^+-АТФази. Ймовірно, що механізм впливу флуренізиду на АТФ-гідролазну активність натрій-калієвої помпи реалізується через зміни ліпідного оточення під дією даного чинника, оскільки зміни в активності мембранних ферментів можуть бути наслідком підвищення інтенсивності процесів ПОЛ.

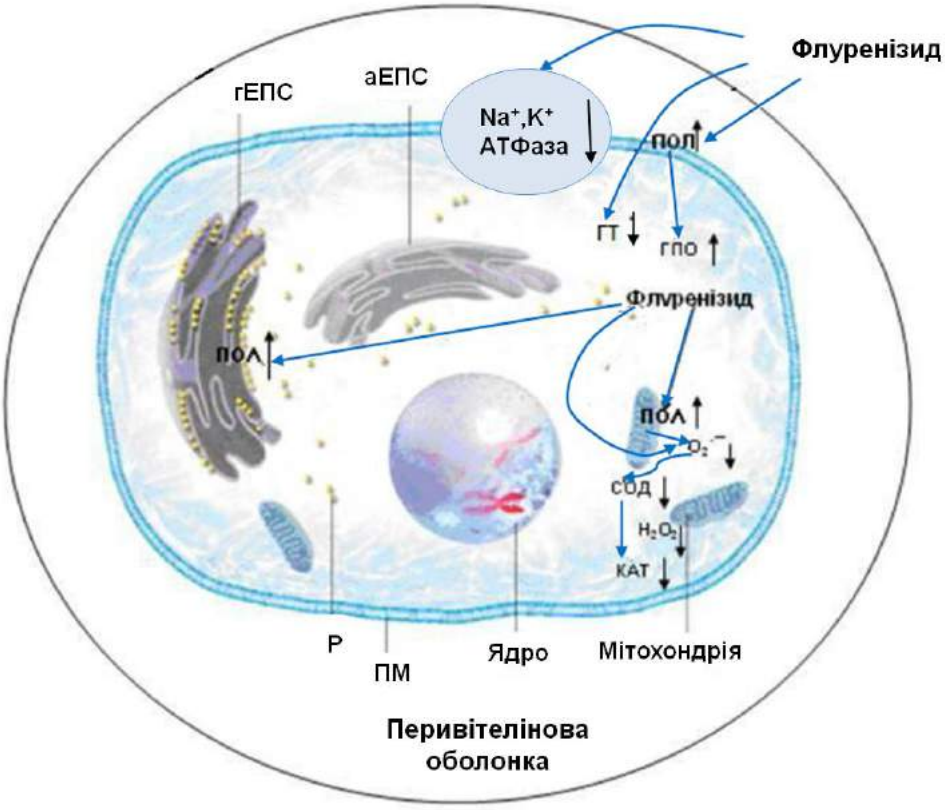


Рис. 9. Гіпотетична схема впливу флуренізиду на мембранопов'язані процеси впродовж ембріогенезу в'юна. ПОЛ – пероксидне окиснення ліпідів; аЕПС – агранулярна ендоплазматична сітка; гЕПС – гранулярна ендоплазматична сітка; ГТ – глутатіон-S-трансфераза; ГПО – глутатіонпероксидаза; СОД – супероксиддисмутаза; КАТ – каталаза; ПМ – плазматична мембрана; Р – рибосома. Стрілкою «↑» позначено підвищення інтенсивності процесів пероксидного окиснення ліпідів і активності ферментів, стрілкою «↓» – зниження

Ліпідна пероксидація характеризується збільшенням вмісту ГП і ТБК-позитивних продуктів, що проявляють мембранотоксичний ефект і знижують життєздатність зародків в'юна. Аналізуючи наукову літературу, необхідно зазначити, що вплив флуренізиду може спричинювати прооксидантну дію, активуючи НАДФН-залежну оксидазу, локалізовану в клітинних мембранах. Цей ензим продукує супероксид-аніон радикал, який започатковує ланцюгові реакції утворення інших активних форм оксигену. У результаті вільнорадикальних реакцій утворені продукти ліпопероксидації здатні пошкоджувати білкові молекули всередині клітини.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі відповідно до поставленої мети і завдань досліджено вплив флуренізиду на мембранопов'язані процеси й інтенсивність процесів ПОЛ і стан АОС зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L. упродовж раннього ембріогенезу. Вивчено дію флуренізиду на морфологію та ультраструктуру зародкових клітин.

1. Флуренізид за умов *in vitro* в концентраціях 0,01; 0,05; 0,15; 1; 5 і 15 мМ знижує активність Na^+, K^+-АТФази та порушує інтенсивність процесів ліпопероксидації. Максимальне пригнічення роботи мембранопов'язаного ферменту й інтенсивності процесів ПОЛ спостерігається за дії флуренізиду в концентрації 15 мМ на всіх етапах розвитку зародків.
2. Флуренізид у концентрації 1 мМ і вищих зумовлює високу смертність зародків в'юна вже на першу добу його впливу, порівняно з дією антибіотика у концентраціях 0,01; 0,05; 0,15 мМ. Флуренізид у концентраціях 0,15–15 мМ веде до надмірного поділу клітин на перших етапах розвитку зародків із подальшим сповільненням.
3. Флуренізид у концентраціях 5 і 15 мМ зумовлює переважаюче підвищення вмісту ГП упродовж розвитку зародків в'юна, тоді як антибіотик у нижчих досліджуваних концентраціях зумовлює підвищення кількості ТБК-позитивних продуктів. Етап розвитку зародків в'юна 16 бластомерів є чутливим до дії флуренізиду, вміст ГП зростає за впливу всіх досліджуваних концентрацій. Розвиток зародків на етапі 256 бластомерів є найменш чутливим до дії досліджуваного антибіотика, оскільки вміст ГП знижується щодо контролю за впливу флуренізиду в усіх концентраціях.
4. Встановлено, що флуренізид пригнічує роботу СОД на етапі розвитку 16 та 64 бластомери з одночасним зниженням активності КАТ (етап розвитку 64 бластомери), що, ймовірно, свідчить про сповільнення метаболічних процесів на цих етапах розвитку зародків в'юна. На етапі розвитку 1024 бластомери низькі концентрації антибіотика зумовлюють зростання активності СОД і КАТ, тоді як високі – спадання активності цих ензимів. Зміни роботи ГПО більшою мірою не підтверджені достовірно, і це дає змогу стверджувати, що флуренізид не зумовлює його ушкодження. Досліджуваний антибіотик порушує роботу ГТ у процесі раннього ембріогенезу зародків в'юна. У високих концентраціях він зумовлює переважаюче спадання ГТ активності на етапі розвитку 256 і 1024 бластомери. Флуренізид у концентрації 15 мМ веде до спадання ГТ активності впродовж досліду.
5. Флуренізид зумовлює зниження активності Na^+, K^+-АТФази у зародках в'юна (*in vivo*) на всіх етапах його розвитку.
6. Антибіотик викликає структурні порушення мітохондрій і ЕПС, підвищення кількості лізосом у зародках в'юна на етапі розвитку 2 та 64 бластомери, і ступінь вираженості цих змін є дозозалежним. Флуренізид на етапі розвитку 1024 бластомери зумовлює некротичні зміни у клітинах зародків в'юна.
7. Значний вплив на вміст ГП й активність СОД, КАТ у зародках в'юна чинять невраховані чинники, тоді як на фактор часу і флуренізиду припадає менш виражений вплив. На утворення ТБК-позитивних продуктів однаковий вплив має фактор часу, флуренізиду та невраховані чинники. На роботу ГТ і Na^+, K^+-АТФази

потужний вплив чинить флуренізид.

8. За допомогою кластерного аналізу встановлено, що на етапі розвитку зародків в'юна 2, 16, 64 бластомери вплив флуренізиду в концентраціях 0,01; 0,05; 0,15; 1; 5; 15 мМ можна розділити за показниками (ТБК-позитивні продукти, ГП, СОД, КАТ, ГПО, ГТ) на 4 групи подібності, тоді як на етапі розвитку 256 та 1024 бластомери – на 5 груп подібності, що свідчить про зміну впливу антибіотика на зародки в'юна на пізніх етапах розвитку раннього ембріогенезу.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Bodnarchuk N.O. Structural changes of loach embryos during embryogenesis under the influence of flurenizyd / **Nataliya Oleksandrivna Bodnarchuk,** Oleksandr Romanovych Kulachkovsky, Svitlana Mykhaylivna Mandzynets, Dmytro Ivanovych Sanagurskiy // Annales UMCS, sectio ee zootechnica. – 2016. – Vol. XXXIV (4). – P. 19–30. *(Здобувач самостійно виконала всю експериментальну частину досліджень, статистично опрацювала отримані дані, взяла активну участь в аналізі результатів досліджень, написанні й оформленні статті).*

2. Боднарчук Н.О. Порівняльний та дисперсійний аналіз активності глутатіонзалежних ферментів у зародках в'юна *Misgurnus fossilis L.* за впливу флуренізиду / **Н.О. Боднарчук,** Н.П. Гарасим, Л.І. Петрух, Д.І. Санагурський // Біофізичний вісник. – 2015. – Вип. 34(2). – С. 43–51. *(Здобувач особисто провела експериментальні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення результатів, підготувала матеріали до друку).*

3. Боднарчук Н.О. Транспортні властивості мембран за дії флуренізиду та його похідних / **Н.О. Боднарчук,** М.В. Бура, Д.І. Санагурський // Біологія тварин. – 2011. – Т. 13, № 1–2. – С. 48–59. *(Здобувач самостійно виконала всю експериментальну частину досліджень, проаналізувала обсяг матеріалу та написала статтю).*

4. Боднарчук Н.О. Вміст первинних і вторинних продуктів ліпопероксидації у зародках в'юна за дії флуренізиду / **Н.О. Боднарчук,** С.М. Мандзинець, Л.І. Петрух, Д.І. Санагурський // Біологічні Студії / Studia Biologica. – 2016. – Т.10, №1. – С. 53–60. (*Здобувач особисто провела експериментальні дослідження, проаналізувала літературні дані, взяла участь у написанні й оформленні статті).*

5. Боднарчук Н.О. Стан системи антиоксидантного захисту зародків в'юна за впливу флуренізиду / **Н.О. Боднарчук,** С.М. Мандзинець, Л.І. Петрух, Д.І. Санагурський // Біологія тварин. – 2016. – Т. 18, №2. – С. 9–17. *(Здобувачу належить ідея, покладена в основу статті, опрацювання літературних даних і власних результатів, участь у їхньому аналізі й написанні статті).*

6. Панич Н.О. (**Боднарчук Н.О.**) Вплив флуренізиду на функціонування Na^+, K^+-АТФази зародків в'юна / **Н.О. Панич,** М.В. Целевич, Д.І. Санагурський // IV З'їзд Українського біофізичного товариства, м. Донецьк, 19–21 грудня, 2006 р. – Донецьк, 2006. – С.85–86.

7. Панич Н.О. (**Боднарчук Н.О.**) Аналіз змін Na^+, K^+-АТФазної активності зародків в'юна внаслідок впливу флуренізиду / **Н.О. Панич,** М.В. Целевич, Д.І. Санагурський // Молодь і поступ біології: збірник тез III Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів, м. Львів, 23–27 квітня 2007 р. – Львів, 2007. – С. 20–21.

8. Боднарчук Н.О. Інтенсивність процесів ліпопероксидації у зародках в'юна за дії флуренізиду / **Н.О. Боднарчук,** С.М. Мандзинець, Д.І. Санагурський // Молодь і поступ біології: збірник тез XI Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів, м. Львів, 20–23 квітня 2015 р. – Львів, 2015. – С. 21–22.

9. Боднарчук Н.О. Вільнорадикальні процеси у зародках в'юна за дії флуренізиду / **Н.О. Боднарчук,** С.М. Мандзинець, М.В. Бура, Д.І. Санагурський // Матеріали VI З'їзду Українського біофізичного товариства, Луцьк–Світязь 28–30 травня 2015 р. – Луцьк: СНУ імені Лесі Українки, 2015. – С. 14.

10. Боднарчук Н.О. Зміни Na^+, K^+-АТФазної активності мембран зародків в'юна за дії флуренізиду / **Н.О. Боднарчук,** С.М. Мандзинець, Д.І. Санагурський // Молодь і поступ біології: збірник тез XII Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів, м. Львів, 19–21 квітня 2016 р. – Львів, 2016. – С. 8–9.

11. Боднарчук Н.О. Вплив розчину флуренізиду на виживання зародків в'юна / **Н.О. Боднарчук,** О.Р. Кулачковський, Д.І. Санагурський // Актуальні питання розвитку біології та екології: матеріали міжнародної науково-практичної конференції, м. Вінниця, 3–7 жовтня 2016 р. – Вінниця, 2016. – С. 328–329.

12. Боднарчук Н.О. Морфологічні зміни зародків в'юна за дії флуренізиду / **Н.О. Боднарчук,** Л.І. Петрух, Д.І. Санагурський // Теорія та практика сучасної морфології: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, м. Дніпро, 5–7 жовтня 2016 р. – Дніпро, 2016. – С. 24.

13. Боднарчук Н.О. Ультраструктурні зміни зародків в'юна за дії флуренізиду / **Н.О. Боднарчук,** О.Р. Кулачковський, С.М. Мандзинець, Д.І. Санагурський // Актуальні питання біології та медицини: збірник наукових праць за матеріалами XIV Міжрегіональної наукової конференції, м. Старобільськ, 22–23 грудня 2016 р. – Луганськ, 2016. – С. 18–20.

14. Боднарчук Н.О. Зміни активності ензимів антиоксидантної системи зародків в'юна впродовж раннього ембріогенезу за дії флуренізиду / **Н.О. Боднарчук,** Д.І. Санагурський // Молодь і поступ біології: збірник тез XIII Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів, м. Львів, 25–27 квітня 2017 р. – Львів, 2017. – С. 7–8. *(Здобувачу належить опрацювання робочої схеми експерименту, аналіз літературних даних і власних результатів, участь у написанні й оформленні тез).*

15. Панич Н.О. (**Боднарчук Н.О.**) Дослідження впливу флуренізиду на транспортні системи мембран / Д.І. Санагурський, М.В. Целевич, **Н.О. Панич** [В кн.: Петрух Л.І. Флуорени як туберкулостатики]. – Львів, 2008. – С.102–115. *(Здобувачем особисто проведено дослідження, узагальнено результати, підготовано матеріали до друку).*

АНОТАЦІЯ

Боднарчук Н.О. Зміни біофізичних та морфологічних параметрів зародків в'юна за дії флуренізиду. – 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.

Дисертація присвячена дослідженню змін біофізичних і морфологічних параметрів, зокрема, вільнорадикальних реакцій (*in vitro* та *in vivo*) у зародках в'юна за дії флуренізиду – препарату протимікробної, протитуберкульозної, антихламідійної, імуномодулюючої, антиоксидантної, гепатопротекторної, протизапальної та противірусної дії. Вивчено вплив флуренізиду на функціонування Na^+, K^+-АТФази зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L. У роботі вперше наведено дані щодо морфологічних і ультраструктурних змін зародків в'юна, які розвивалися в

інкубаційному середовищі з флуренізидом. Показано, що ця субстанція у концентраціях 1; 5; 15 мМ зумовлює високу смертність зародків в'юна вже на першу добу її впливу. Встановлено, що флуренізид призводить до структурних порушень мітохондрій та ендоплазматичної сітки, зумовлює зростання кількості лізосом у зародків в'юна на етапі розвитку 2 бластомерів. Ступінь вираженості цих змін є дозозалежним.

Ключові слова: зародки в'юна, флуренізид, ембріогенез, бластомери, пероксидне окиснення ліпідів, ферменти антиоксидантної системи, плазматична мембрана, Na^+, K^+-АТФаза.

АННОТАЦИЯ

Боднарчук Н.А. Изменения биофизических и морфологических параметров зародышей вьюна при действии флуренизида. – 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.

Диссертация посвящена исследованию изменений биофизических и морфологических параметров, в частности, свободнорадикальных реакций (*in vitro* и *in vivo*) в зародышах вьюна при действии флуренизида – препарата противомикробного, противотуберкулезного, антихламидийного, иммуномодулирующего, антиоксидантного, гепатопротекторного, противовоспалительного и противовирусного действия. Изучено влияние флуренизида на функционирование Na^+, K^+-АТФазы зародышей вьюна *Misgurnus fossilis* L. В работе впервые приведены данные морфологических и ультраструктурных изменений зародышей вьюна, которые развивались в инкубационной среде с флуренизидом. Показано, что эта субстанция в концентрациях 1, 5, 15 мМ влечет за собой высокую смертность зародышей вьюна уже в первые сутки ее влияния. Установлено, что флуренизид приводит к структурным нарушениям митохондрий и эндоплазматической сети, вызывает рост количества лизосом в зародышах вьюна на этапе развития 2 бластомеров. Степень выраженности этих изменений является дозозависимой.

Ключевые слова: зародыши вьюна, флуренизид, эмбриогенез, бластомеры, перекисное окисление липидов, ферменты антиоксидантной системы, плазматическая мембрана, Na^+, K^+-АТФаза.

SUMMARY

Bodnarchuk N.O. Changes in biophysical and morphological parameters of loach embryos for actions of flurenizyd. – Manuscript.

The thesis of the Ph D degree (Ph D) with specialization 03.00.02. in biophysics. – Ivan Franko National University of Lviv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Lviv, 2018.

Dissertation is dedicated to the research of the free-radical reactions (*in vitro and in vivo*) of loach embryos for actions of flurenizyd – preparation of antimicrobial, antituberculousis, antichlamydia, immunomodulator, antioxidant, hepatoprotective, antiinflammatory, antiviral action. Influence of flurenizyd is studied on functioning of

Na^+, K^+-ATPase of loach embryos *Misgurnus fossilis L.* on the stages of development 2, 16, 64, 256 and 1024 blastomeres. Flurenizide in all studied concentrations (0.01; 0.05; 0.15; 1; 5; 15 mM) caused increase in content of lipid peroxidation primary products (hydroperoxides) during development of embryos but decrease on stage 256 blastomeres.

The article contains data on ultrastructural and morphological changes of embryos of loach *Misgurnus fossilis* L., what developed in incubation environment, which contain flurenizyd. It is shown that an antibiotic is in the concentrations of 1; 5; 15 mM predetermines the high death rate of embryos of loach already on the first time of his action. It is set that flurenizyd causes structural violations of mitohondria and cytoplasmic net, causes the increase of amount of lysosomes at the embryos of loach on the stage of development of 2 blastomeres. A degree of expressed of these changes is dosedependent.

The obtained results extend understanding of the mechanisms of flurenisid action on membrane processes of embryonic cells. These data can be used for toxicological evaluation of bioactive or pharmacological substances, and therefore have value for human and veterinary medicine.

After a two-factor analysis of variance for the first time found that the formation of primary products of lipid peroxidation (hydroperoxides) has a significant effect of loach embryos. However, the formation of secondary products of lipid peroxidation approximately the same effect commit time and flurenizyd and unmeasured factors.

At superoxidedismutase, catalase, glutathioneperoxidase and glutathione-S-transferase activity of loach embryos exert a powerful influence unmeasured factors, which may include external factors in which development occurs. We found that the development is more pronounced effect on catalase activity.

Applying cluster analysis was first found to be under 64 blastomeres for all experimental groups studied parameters were divided into 4 groups of similarity. Revealed that the concentration of flurenizyd 0,05mM not have a significant impact on performance, the value of which was at the level of control (at 2 blastomeres). At the stage of 256 and 1024 all blastomeres study group on indicators are divided into 5 groups of similarity that indicates a change flurenizyd impact on those stages of loach embryos.

The research results are important for flurenizyd use in the treatment of pregnant women as well as for further research on its effects on reproductive function. The conclusions arising from the research results can be used in the formation of new regulations related to pharmacology.

Keywords: loach embryos, flurenizyd, embryogenesis, blastomeres, lipid peroxidation, antioxidant enzymes system, plasma membrane, Na^+, K^+-ATPase.

Підписано до друку 29.05.2018
Формат паперу 60×84/16. Папір офсетний.
Умовн. друк. арк. 0,9. Замовл. № 40
Тираж 100 прим.