МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

БОДНАРЧУК НАТАЛІЯ ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 577.352.4:572.7:639.3.034:615.27

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

03.00.02 – біофізика

подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії
(кандидата біологічних наук)

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

Науковий керівник: **САНАГУРСЬКИЙ Дмитро Іванович,** доктор біологічних наук, професор

Львів – 2018

АНОТАЦІЯ

Боднарчук Н.О. Зміни біофізичних та морфологічних параметрів зародків в'юна за дії флуренізиду. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.02 – біофізика. – Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів, 2017.

Дисертація присвячена дослідженню змін біофізичних та морфологічних параметрів, зокрема, вільнорадикальних реакцій (*in vitro* та *in vivo*) у зародках в'юна за дії флуренізиду – препарату протимікробної, протитуберкульозної, антихламідійної, імуномодулювальної, антиоксидантної, гепатопротекторної, протизапальної, та противірусної дії. Вивчено вплив флуренізиду на функціонування Na^+, K^+-АТФази зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L. на етапах розвитку 2, 16, 64, 256 та 1024 бластомерів. Виявлено, що флуренізид у всіх досліджуваних концентраціях (0,01; 0,05; 0,15; 1; 5; 15 мМ) призводить до значного підвищення вмісту первинних продуктів ліпопероксидації (гідропероксидів) на стадії 16 і 1024 бластомерів і до їх зниження – на стадії 256 бластомерів.

У роботі вперше наведено дані щодо морфологічних і ультраструктурних змін зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L., 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 його 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 дозозалежною.

Досліджено дію флуренізиду на активність ключових ферментів антиоксидантної системи зародкових об'єктів у дослідах *in vivo*. Виявлено, що ця сполука порушує роботу супероксиддисмутази на всіх етапах розвитку зародків в'юна. Флуренізид зумовлює спадання активності цього ензиму на

етапі розвитку 16 бластомерів. Виявлено, що досліджуваний антибіотик у концентраціях 1; 5; 15 мМ, на стадії 10 поділу зародків, зумовлює спадання активності супероксиддисмутази, тоді як флуренізид, у концентраціях 0,01 і 0,05 мМ, веде до зростання активності цього ензиму. Засвідчено, що флуренізид у всіх досліджуваних концентраціях призводить до спадання каталазної активності на етапі розвитку зародків в'юна 64 бластомери. Встановлено, що флуренізид порушує роботу глутатіонпероксидази на всіх етапах розвитку зародків в'юна, зокрема зумовлює зростання її активності на етапі розвитку 2, 16 і 256 бластомерів.

Вперше виявлено, що досліджуваний антибіотик порушує роботу глутатіон-S-трансферази під час раннього ембріогенезу зародків в'юна *Misgurnus fossilis L.*

З'ясовано механізми впливу флуренізиду на іонтранспортні системи зародків в'юна *Misgurnus fossilis L*. Встановлено, що вплив флуренізиду на зародки холоднокровних, протягом ембріогенезу, реалізується на мембранному рівні, а саме через інгібування Na^+, K^+-АТФази. Ступінь інгібувального впливу препарату залежить не тільки від концентрації флуренізиду у середовищі інкубації, а й від стадії розвитку зародків.

Одержані результати розширюють уявлення про механізми впливу флуренізиду на мембранопов'язані процеси зародкових клітин. Ці дані можуть бути використані для оцінки ступеня шкідливості біологічно активних або фармакологічних речовин, а тому мають вагоме значення для медицини та ветеринарії.

За результатами двофакторного дисперсійного аналізу вперше встановлено, що на утворення первинних продуктів ліпопероксидації (гідропероксидів) значний вплив має час розвитку зародків в'юна. Проте вже на утворення вторинних продуктів ліпопероксидації приблизно однаковий вплив чинять і час, і флуренізид, і невраховані фактори.

На супероксиддисмутазну, каталазну, глутатіонпероксидазну та глутатіон-S-трансферазну активність зародків в'юна потужний вплив чинять невраховані

фактори, до яких можуть належати зовнішні чинники при яких відбувається розвиток. Менш виражений вплив на роботу супероксиддисмутази та каталази здійснює флуренізид, що свідчить ймовірно про непряму дію цього чинника на активність цих ферментів. Нами встановлено, що час розвитку більш виражено впливає на каталазну активність. Слід відмітити, що флуренізид чинить потужний вплив (41%) на роботу глутатіон-S-трансферази та Na^+, K^+-АТФази.

Застосувавши кластерний аналіз вперше встановлено, що до стадії 64-х бластомерів всі експериментальні групи за досліджуваними показниками були розділені на 4 групи подібності. Виявлено, що флуренізид у концентрації 0,05 мМ не чинить значного впливу на показники, значення яких були на рівні контролю (на етапі 2 бластомерів). На етапі розвитку 256 та 1024 бластомерів всі досліджувані групи за показниками розподіляються вже на 5 груп подібності, що свідчить про зміну впливу флуренізиду на цих етапах розвитку зародків в'юна.

Результати досліджень мають важливе значення для застосування Флуренізиду у лікуванні вагітних жінок, а також для наступних досліджень щодо його дії на репродуктивну функцію. Висновки, що випливають із результатів досліджень, можуть бути використані у формуванні нових нормативних документів, пов'язаних з фармакологією.

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

Список публікацій здобувача

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.

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.

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.

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.

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.

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, 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, 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, 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, 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, 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, Львів, 25–27 квітня 2017 р. – Львів, 2017. – С. 7–8.

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.

SUMMARY

Bodnarchuk N.O. Changes in biophysical and morphological parameters of loach embryos for actions of flurenizyd. – Qualifying scientific work on the 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, 2017.

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 effect of flurenizide on the activity of key enzymes antioxidant system of embryos *Misgurnus fossilis* L. in experiments *in vivo* was investigated. It is established that this compoud violates the work of superoxiddysmutase on all stages of loach embryos development. Flurenizyd predetermines the slump of activity of this enzyme on the stage of development 16 blastomeres. It is revealed that the investigated antibiotic in concentrations 1; 5; 15 mM on the stage of the 10th division

of bioblasts predetermines the slump of activity of superoxiddysmutase, while in the concentrations of 0,01 and 0,05 mM flurenizide causes the increase of this enzyme activity. It is validified that flurenizide in all investigated concentrations causes the slump of catalase activity on the stage of 64 blastomeres of loach embryos development. It was shown that flurenizyd violates work of glutathioneperoxidase on all stages of development of loach embryos in particular predetermines the increase of their activity on the stage of development of 2, 16 and 256 blastomeres.

For the first time found that the investigated antibiotic violates work of glutathione-S-transferase in the process of early embryogenesis of loach embryos *Misgurnus fossilis L*.

The mechanisms of flurenisid influence on ion transport systems of loach *Misgurnus fossilis L*.embryos were discovered. It was revealed that flurenisid influence on embryos of cold blood animals during embryogenesis is accomplished at membrane level, namely through inhibition of Na^+, K^+-ATPase. The degree of inhibiting effect of the drug depends not only on flurenisid concentration in the incubation medium, but also on the stage of embryo development.

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. Indirect impact on the superoxidedismutase and catalase has flurenizyd, indicating likely indirect effect of this factor on the activity of these enzymes. We found that the development is

more pronounced effect on catalase activity. Note that the work glutathione-S-transferase and Na^+, K^+-ATPase has a powerful effect flurenizyd (41%).

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 0,05 mM 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 flurenizydu 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.

ЗМІСТ ст.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ……... 13

ВСТУП…… 14

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ……. 20

1.1. Вільнорадикальні реакції у біологічних об’єктах за впливу флуренізиду ……. 20

1.2. Na^+, K^+-АТФаза, як система активного транспорту Na^+ та K^+ у мембранах зародків протягом раннього ембріогенезу……. 27

1.3. Фізико-хімічні властивості та вплив флуренізиду на живі організми……... 32

1.4. Взаємозв'язок між структурними і функціоальними властивостями флуренізиду…… 36

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ…….. 46

2.1. Характеристика об’єкту досліджень…….. 46

2.2. Виділення і очищення бластодерм зародків в’юна……... 49

2.3. Методи дослідження вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів……..... 50

2.3.1. Визначення вмісту гідропероксидів ліпідів…… 50

2.3.2. Визначення вмісту ТБК-позитивних продуктів…….. 51

2.4. Методи дослідження активності ензимів антиоксидантної системи зародків в’юна…… 52

2.4.1. Визначення активності супероксиддисмутази……. 52

2.4.2. Визначення активності каталази…… 54

2.4.3. Визначення активності глутатіонпероксидази……. 55

2.4.4. Визначення активності глутатіон-S-трансферази…… 56

2.5. Визначення концентрації протеїну за методом Лоурі…….. 57

2.6. Методика дослідження активності Na^+, K^+-АТФази мембран зародків в'юна…….. 58
2.7. Електронно-мікроскопічне дослідження зародків в'юна……. 59
2.8. Дисперсійний аналіз досліджуваних показників…….. 60
2.9. Кластерний аналіз експериментально отриманих показників……. 62
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ…….. 64
3.1. Зміни інтенсивності процесів пероксидного окиснення ліпідів на різних етапах розвитку зародків в'юна за впливу флуренізиду у дослідах *in vitro*…… 64
3.2. Зміни активності Na^+, K^+-АТФази на різних етапах розвитку зародків в'юна за впливу флуренізиду у дослідах *in vitro*…….. 66
3.3. Морфологічні зміни у зародках в'юна впродовж ембріогенезу за дії флуренізиду ……. 69
3.4. Вплив флуренізиду на інтенсивність процесів ліпопероксидації зародків в'юна впродовж ембріогенезу…… 72
3.5. Вплив флуренізиду на активність ключових ензимів системи антиоксидантного захисту зародків в'юна…….. 76
3.5.1. Активність супероксиддисмутази зародків в'юна протягом раннього ембріогенезу за впливу флуренізиду.. 77
3.5.2. Активність каталази зародків в'юна протягом раннього ембріогенезу за впливу флуренізиду ……. 79
3.5.3. Активність глутатіонпероксидази зародків в'юна протягом раннього ембріогенезу за впливу флуренізиду. 81
3.5.4. Активність глутатіон-S-трансферази зародків в'юна протягом раннього ембріогенезу за впливу флуренізиду.. 83
3.6. АТФ-гідролазна активність зародків в'юна впродовж раннього ембріогенезу за впливу флуренізиду ……. 85
3.7. Ультраструктурні зміни зародкових клітин в'юна на різних

етапах розвитку за дії флуренізиду……..... 86
3.8. Дисперсійний аналіз впливу флуренізиду на мембранопов'язані процеси та показники стану прооксидантно-антиоксидантної системи…….. 93
3.9. Кластерний аналіз впливу флуренізиду на показники стану прооксидантно-антиоксидантної системи…… 96
РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ……. 100
ВИСНОВКИ……... 113
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ…….. 115
ДОДАТОК А…….. 136
ДОДАТОК Б……... 141

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

GSH – відновлений глутатіон

GSSG – окиснений глутатіон

$HO_2^{\bullet}$ – гідропероксил-радикал

P_i – неорганічний фосфор

$OH^{\bullet}$ – гідроксил-радикал

$O_2^{\bullet -}$ – супероксид-аніон радикал

АОЗ – антиоксидантний захист

АОС – антиоксидантна система

АФО – активні форми оксигену

ГП – гідропероксиди ліпідів

ГПО – глутатіонпероксидаза

КАТ – каталаза

МДА – малоновий диальдегід

ПОЛ – пероксидне окиснення ліпідів

ПМ – плазматична мембрана

СОД – супероксиддисмутаза

ТБК – тіобарбітурова кислота

ЕДТА – етилендиамінотетраацетатна кислота

ГТ – глутатіон-S-трансфераза

H_2O_2 – пероксид водню

ВСТУП

Актуальними проблемами біофізики є вивчення фізичних основ функціонування клітини, будови й функцій біологічних мембран (поверхневої плазматичної мембрани та мембран внутрішньоклітинних органоїдів) – проникності, каталітичної активності, електро- та хімозбудливості, енергетичних процесів клітини, її механічних та електричних властивостей, транспорту крізь них речовин та енергії, генерацію і розповсюдження нервового імпульсу, процесів рецепції і перетворення енергії, більшість яких здійснюються на біомембранах [88]. Універсальним механізмом розвитку клітинної патології за дії ушкоджуючих чинників є реакція ланцюгового окиснення ліпідів, які входять до складу мембран [10, 32]. Зміни структури мембран, відповідно, зумовлюють порушення роботи Na^+, K^+-АТФази, що веде до змін трансмембранної різниці потенціалу. Тому дослідження процесів ліпопероксидації, стану антиоксидантної системи, робота якої спрямована на утилізацію вільних радикалів (які сприяють процесу пероксидного окиснення ліпідів), активності Na^+, K^+-АТФази мають діагностичне значення, в т. ч. і для оцінки патології клітин.

Науковою спільнотою постійно ведеться активний синтез нових хімічних сполук, які використовують у медицині та фармації, зокрема тих, що мають властивості антибіотиків [76]. Серед таких сполук особливе місце посідає флуренізид (N-9-флуореніліден-N'-ізонікотиногідразиду), синтезований у Львівському медичному університеті імені Данила Галицького на основі флуоренів. 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 [59, 163]. Противірусний ефект флуренізиду 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 проводилися науковцями *in vitro*, впливаючи безпосередньо на суспензію клітин або на виділені фосфоліпіди мозку щурів. Хоча препарат вже впроваджено у виробництво (термін дії реєстраційного посвідчення закінчився у 2012 р.), а отже, й у протоколи щодо лікування захворювань, залишається не вивченим питання механізму дії флуренізиду на мікроорганізми та на клітини пацієнта, що відображено у інструкції до використання препарату. Немає праць, які стосувалися б вивчення вільнорадикальних, мембранопов'язаних процесів клітин, що перебували під довготривалою дією флуренізиду. Актуальності досліджень 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 зміну активності ензимів антиоксидантної системи у зародках в'юна як моделі ізольованої клітини, так і об'єкта раннього розвитку організму [125]. 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 у мембрані.

Результати дослідження впливу флуренізиду на структурно-функціональні параметри зародків матимуть важливе значення для призначення цього препарату лікарями для лікування вагітних жінок, особливо на ранніх термінах вагітності.

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 субстанції на клітини.

Для досягнення поставленої мети визначено такі завдання:

1. Дослідити інтенсивність процесів 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 досліджень – 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-активних продуктів), на фоні підвищення кількості первинних продуктів (гідропероксидів), тоді як за дії нижчих концентрацій (0,01 мМ–1 мМ) відбувається перетворення первинних продуктів ПОЛ на вторинні. Вплив флуренізиду призводить до зростання активності СОД на фоні зниження активності КАТ і ГПО на всіх досліджуваних етапах ембріогенезу в'юна. Виявлено, що досліджуваний препарат у високих концентраціях зумовлює переважаюче спадання 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 флуренізид 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 та 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.

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

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, які включені в 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.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Вільнорадикальні реакції у біологічних об’єктах за впливу флуренізиду

Одним із основних класів метаболічних реакцій є пероксидне окиснення ліпідів. Процеси ПОЛ – це життєво важлива ланка в регуляції ліпідного складу біомембран і мембрановмісних ферментів, беруть участь у регуляції проникності й транспорту речовин через мембрану, транспорті електронів у ланцюзі дихальних ферментів, синтезі простагландинів і лейкотрієнів, метаболізмі катехоламінів і стероїдних гормонів, деструкції ксенобіотиків в ендоплазматичному ретикулумі. Тканинам з високим рівнем метаболізму притаманний високий рівень інтенсивності вільнорадикального окиснення [50, 94].

Посилення ПОЛ типове для багатьох патологічних процесів і хвороб [50]. Регуляцію інтенсивності процесів ПОЛ і захист від руйнівної дії продуктів ліпопероксидації здійснює антиоксидантна система. Система ПОЛ-АОС добре збалансована і працює за принципом зворотного зв’язку: збільшення рівня антиоксидантів гальмує вільнорадикальне окиснення, а це, в свою чергу, змінює властивості самих ліпідів, внаслідок виникнення легкоокисних фракцій, що прискорює процеси ПОЛ [93]. В результаті цього витрачається багато ендогенних антиоксидантів і система повертається до вихідного рівня. Така динамічна рівновага у системі ПОЛ-АОС є одним із основних показників клітинного гомеостазу [51, 94].

В науковій літературі є відомості, що флуренізид знижує інтенсивність процесів ліпопероксидації, які відбуваються під час інкубації фосфоліпідів мозку щурів [92]. При цьому спостерігається ефект, залежний від дози: із збільшенням концентрації препарату в середовищі інкубації швидкість

накопичення ТБК-активних продуктів у пробах зменшується, тобто відсоток інгібування процесів пероксидного окиснення ліпідів збільшується. Концентрація флуренізиду 0,2 ммоль/л гальмує активність процесів ліпопероксидації на 74%, а 0,5 ммоль/л – на 89% [50, 51, 94].

У разі збільшення вмісту препарату в пробах, інтенсивність реакцій ліпопероксидації ненасичених жирних кислот фосфоліпідів зменшується несуттєво: десятикратне підвищення концентрації (від 0,5 ммоль/л до 5 ммоль/л) веде до зменшення вмісту ТБК-активних продуктів, лише на 5%. Отже, флуренізид *in vitro* здатний суттєво гальмувати інтенсивність реакцій пероксидного окиснення ненасичених жирних кислот фосфоліпідів. Повідомляється, що оптимальна концентрація для антиоксидантної активності становить 0,5–1 ммоль/л. Проте, на основі тільки цих даних неможливо встановити, на якій стадії флуренізид блокує ланцюг ПОЛ [50, 51, 94].

Флуренізиду притаманний сильний антирадикальний ефект. У концентрації 0,25 ммоль/л він пригнічує інтенсивність хемілюмінесценції на 68%, а 0,75 ммоль/л – на 89% [82]. Подальше збільшення його концентрації в системі веде до повільнішого зниження інтенсивності надслабкого світіння, а саме: підвищення вмісту флуренізиду у 8,3 рази (0,75 до 6,25 ммоль/л) зменшує величину спалаху лише на 7% [119]. Таким чином, оптимальна концентрація флуренізиду, з огляду на його антирадикальну активність, є у межах 0,75–1 ммоль/л, що практично повністю узгоджується з результатами, отриманими під час вивчення його антиоксидантних властивостей на моделі фосфоліпідів мозку [82].

Зазначено, що інтенсивність хемілюмінесценції, як і активність процесів ліпопероксидації у фосфоліпідах, залежить також від наявності в середовищі йонів змінної валентності, зокрема заліза. Тому не виключено, що отриманий антиоксидантний ефект флуренізиду може бути наслідком його здатності хелатувати йони металів. Для виключення такої можливості проведено серію експериментів, у якій досліджено вплив флуренізиду на автоокиснення гідрохінону за наявності ЕДТА, який утворює комплекси з йонами металів

[177]. Окиснення гідрохінону в хінон у лужному середовищі практично повністю відбувається за механізмами, опосередкованими супероксидними аніонами [48].

Виявлено помітне гальмування процесу окиснення гідрохінону флуренізидом. Треба зазначити, що антиоксидантний ефект препарату на даній моделі проявився значно меншою мірою, ніж на попередніх. Так, якщо 1 ммоль/л флуренізиду на 91% гальмував швидкість утворення ТБК-активних продуктів, під час окиснення фосфоліпідів, і на 91,5% пригнічував інтенсивність спалаху хемілюмінесценції, індукованого пероксидом водню [2], то така ж концентрація препарату лише на 17% зменшувала ступінь окиснення гідрохінону. Оскільки реакції перетворення гідрохінону в хінон опосередковуються супероксидними аніонами, гідроксильні та інші радикали практично не беруть у них участі (проте відіграють важливу роль у попередніх реакціях) [60]. Звідси можна припустити, що антиоксидантний ефект флуренізиду зумовлений, в основному, його здатністю знешкоджувати такі радикали, як OH^{-}, HO_2^{-} тощо, і лише незначною мірою, радикали $O_2^{\cdot -}$. Виключена також можливість антиоксидантної дії флуренізиду внаслідок зв’язування йонів металів змінної валентності, оскільки антиоксидантний ефект все ж проявлявся, хоч і незначно, в середовищі, де йони металів були попередньо хелатовані ЕДТА [124].

Флуренізид здатний перехоплювати вільні радикали і виводити їх із сфери реакції. Найімовірніший механізм антиоксидантного впливу полягає у здатності препарату перехоплювати вільні радикали [51]. При цьому утворюється малоактивний радикал, що призводить до обриву ланцюга окиснення [50, 51, 94].

Відомо, що для підтримання на певному рівні ПОЛ у клітинах існує система антиоксидантного захисту. З точки зору механізму дії, АОС можна розглядати як систему, яка проявляє специфічну і неспецифічну антиоксидантну активність. Дія специфічної АОС спрямована, безпосередньо, на зниження рівня оксидантів у тканинах, шляхом прямого руйнування і

зв'язування АФО або утворених радикалів, що і призводить до обриву ланцюгів вільнорадикальних реакцій. Залежно від характеру дії виділяють ензиматичні (переважно внутрішньоклітинні) та неензиматичні (внутрішньо- та позаклітинні) компоненти специфічної АОС [135, 138, 149].

До ензиматичних компонентів відносять СОД, КАТ, ГПО, редуктази, ГТ, ряд тіол-специфічних ензимів, метіонінсульфоксидредуктази та тіоредоксинредуктази. Неензиматична АОС включає велику, дуже різноманітну, за своєю хімічною будовою, групу сполук, які безпосередньо нейтралізують АФО або опосередковано запобігають їхньому утворенню. До них належать глутатіон, цистеїн, аскорбат (водорозчинні) та гідрофобні – α-токоферол, вітамін А, каротиноїди, убіхінони, вітаміни групи К [7].

Головним регулятором експресії генів ключових антиоксидантних ензимів (СОД, КАТ, ГПО та ГТ) є ядерний транскрипційний фактор Nrf2 [125, 155].

Супероксиддисмутаза (СОД, супероксид: супероксид-оксидоредуктаза; ЕС 1.15.1.1) бере участь в обриві ланцюгів вільнорадикальних процесів на початку їх зародження, на стадії одноелектронного відновлення кисню, з утворенням супероксид-аніон радикалу. СОД каталізує дисмутацію супероксид-аніон радикалу, де кінцевим продуктом є пероксид гідрогену:

$2O_2^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ [128, 133, 153, 166, 181].

Виділено декілька ізоферментних форм СОД. Мідь/цинкзалежна СОД (Cu/Zn-СОД) є найбільш поширеною і добре вивченою. Вона присутня в еукаріотичних клітинах (ядро, цитоплазматичний матрикс, пероксисоми, міжмембранний просвіт мітохондрій) і чутлива до дії ціанідів [159]. Цей білок є гомодимером з молекулярною масою 32,5 кДа. Манганзалежна СОД (Mn-СОД) є ціанідрезистента форма і локалізується, в основному, в матриксі мітохондрій і хлоропластів еукаріот. Це є тетрамер, який містить іон мангану в ділянці активного центру з молекулярною масою 86–88 кДа. Ця форма СОД дисмутує

$O_2^{\bullet-}$, який утворився в результаті функціонування системи тканинного дихання. Виділяють ще одну ізоформу СОД – ферумзалежний ензим (Fe-СОД), що переважає в цитозолі або хлоропластах [133, 166, 181]. Fe-СОД – це димер з молекулярною масою 41 кДа, в ділянці активного центру якого основне місце займає залізо. У міжклітинному просторі виявлена екстрацелюлярна СОД (ЕС-СОД, 135 кДа), яка складається із 4-х субодиниць. Цей Cu, Zn-вмісний глікопротеїн знайдений в екстрацелюлярних рідинах або в складі мембран ссавців [153]. Порівняння амінокислотної послідовності СОД з клітин різних організмів вказує на високу ступінь консервативності структури. Крім того, СОД є одним з найбільш термостабільних глобулярних білків [153].

Каталаза (гідроген пероксид: гідроген пероксид-оксидоредуктаза; ЕС 1.11.1.6) – тетрамерний гемвмісний протеїн, який каталізує реакцію розщеплення H_2O_2. Розкладання пероксиду гідрогену здійснюється у двох реакціях [64]:

$$\text{Каталаза-}Fe^{3+} + H_2O_2 \rightarrow \text{(окиснена каталаза)},$$
$$\text{(окиснена каталаза)} + H_2O_2 \rightarrow \text{Каталаза-}Fe^{3+} + 2H_2O + O_2.$$

В окисненому стані КАТ може проявляти пероксидазну активність та окиснювати спирти й альдегіди. Цей ензим є хромопротеїном з молекулярною масою 250 кДа, його простетична група представлена окисненим гемом. Каталаза міститься в більшості аеробних клітин та локалізована в пероксисомах (80 %) і цитоплазмі (20 %). Невелика її кількість може бути присутня в лізосомах і мітохондріях [71]. КАТ відноситься до внутрішньоклітинних ензимів та через велику молекулярну масу погано проникає в позаклітинне середовище, де може швидко піддаватися протеолітичному розщепленню [133, 166].

Глутатіонпероксидаза (глутатіон: гідроген пероксид-оксидоредуктаза; ЕС 1.11.1.9) є тетрамерним глікопротеїном з молекулярною масою приблизно 80 кДа. Кожна субодиниця містить 1 атом селену в складі селеноцистеїну [71].

Цей ензим локалізований, в основному, в цитоплазмі в мілімолярних кількостях, також присутній в матриксі мітохондрій [166]. Ідентифіковано вісім ізоформ ГПО в людини. Найбільш поширеним ізозимом є ГПО1, який каталізує перетворення пероксиду гідрогену та локалізований в цитоплазмі. У більшості клітин ссавців експресується ГПО4, що руйнує гідропероксиди ліпідів. До позаклітинних ензимів, що експресуються в кишечнику та плазмі крові, відносять ГПО2 та ГПО3, відповідно [172].

ГПО, використовуючи відновлену форму глутатіону як субстрат, ефективно перетворює не лише пероксид гідрогену, але й органічні гідропероксидні сполуки, включаючи гідропероксиди поліненасичених жирних кислот відповідно до води та гідроксипохідного [58, 181]:

$$2G\text{-}SH + ROOH \rightarrow G\text{-}SS\text{-}G + ROH + 2H_2O,$$
$$2G\text{-}SH + H_2O_2 \rightarrow G\text{-}SS\text{-}G + 2H_2O.$$

За певних умов її роль в знешкодженні пероксиду гідрогену в тканинах значно більша, ніж каталази, оскільки її дія обмежена пероксисомами. ГПО має більшу спорідненість до пероксиду гідрогену, що визначає її провідну роль в метаболізмі H_2O_2 за більш низьких фізіологічних концентрацій каталази, наприклад, в мозку, серці, легенях, де активність КАТ низька [152]. В умовах оксидативного стресу, коли різко зростає концентрація пероксиду гідрогену, ключова роль в його руйнуванні належить каталазі [55].

Активність і стабільність ключових ензимів АОЗ взаємопов’язані. СОД, КАТ, ГПО інактивуються одним із продуктів їх ферментативної реакції [178]. Узгоджена дія цих ензимів є необхідною для захисту від інактивуючого впливу утворених АФО [147]. Так, СОД, руйнуючи $O_2^{\bullet-}$, захищає каталазу від його інактивуючої дії, при цьому знижує ймовірність відновлення Fe^{3+} і можливість утворення $OH^{\bullet}$, який служить прооксидантом ПОЛ [71], оскільки відомо, що продукти ПОЛ є потенційними інгібіторами ГПО [132], а КАТ і ГПО захищають СОД від інактивації, розкладаючи H_2O_2. Таким чином, лише за

умови збереження активності і стабільності всіх компонентів, ферментативна АОС здатна забезпечити ефективний захист організму від токсичної дії АФО [71].

Глутатіонтрансферази відносять до ензимів, які нейтралізують токсичний вплив різних гідрофобних і електрофільних сполук шляхом їх кон’югації з відновленим глутатіоном. Даний ензим локалізований переважно в цитозолі клітин. Основна функція глутатіонтрансферази – захист клітин від ксенобіотиків та продуктів ПОЛ за допомогою їх відновлення, приєднання до субстрату молекули глутатіону або нуклеофільного заміщення гідрофобних груп [7]:

$$ROOH + 2GSH \rightarrow ROH + GSSG + H2O$$

$$R + GSH \rightarrow HRSG$$

$$RX + GSH \rightarrow RSG + HX.$$

ГТ здатна відновлювати гідропероксидні групи окиснених фосфоліпідів безпосередньо в мембранах без їх попереднього фосфоліпідного гідролізу вільними жирними кислотами. Цей ензим кон'югує з глутатіоном токсичні продукти ПОЛ і таким чином сприяють їх виведенню з організму [7]. Саме таким чином, ГТ є важливим компонентом антиоксидантного захисту, особливо від ендогенних метаболітів, що утворюють після окислювального стресу. Глутатіонтрансфераза відіграє важливу роль в ендогенному метаболізмі: вона пов'язує і транспортує жовчеві кислоти, білірубін, захищає організм від окиснювального стресу шляхом відновлення гідропероксидів жирних кислот і нуклеотидів. Глутатіонтрансфераза бере участь в утворенні та метаболізмі гормонів (простагландинів, лейкотрієнів, естрогенів). Розрізняють глутатіонтрансферази, які взаємодіють з катіонами (у печінці, нирках та кишечнику) і аніонами (головний мозок, легені. селезінка, еритроцити, плацента). Залежно від специфічності субстрату також розрізняють глутатіонтрансферазу, яка взаємодіє з алкенами, епоксидами, алкіленами,

арилами, алканами, ентеротоксинами. Максимальна концентрація глутатіонтрансферази виявлена в печінці [7]. В основному глутатіонтрансферази локалізовані в цитозолі і ендоплазматичному ретикулумі, але також виявляються в ядрах і мітохондріях.

На сьогодні залишається невідомою дія флуренізиду – препарату, який вже впроваджений у практику – на зміну активності ензимів АОС. Дослідження, які проводяться нами в цій сфері, розширять уявлення про механізм впливу цієї сполуки на рівні клітини.

1.2. Na^+, K^+–АТФ-аза, як система активного транспорту Na^+ та K^+ у мембранах зародків протягом раннього ембріогенезу

Плазматична мембрана відіграє провідну роль в регулюванні іонного гомеостазу клітини, поділі ембріональних клітин, а також є центром морфогенетичних процесів раннього розвитку, відмінна риса яких – періодичність подій, пов'язаних з іонними потоками і формуванням іонних градієнтів [146]. Рівень електричного потенціалу мембрани має суттєве значення в регулюванні процесів проліферації, а пізніше – і в диференціації клітини [29, 182].

Зміни іонного гомеостазу Na^+ та K^+ спричиняють підвищену проліферацію клітин [36], але також і є тригером апоптозу. Вважають, що іонтранспортні системи (в тому числі і Na^+, K^+-АТФаза) опосередковано беруть участь в регуляції експресії генів, клітинного росту і проліферації [187, 189].

Коливання активності Na^+, K^+-АТФази в клітинних циклах бластомерів, що синхронно дробляться мають суттєвий внесок у рівень трансмембранного потенціалу [29, 69, 102]. Встановлено, що в зародків *Xenopus laevis*, а також у зародків аксолотля відбувається поступове (на 10–20 % протягом клітинного циклу) зменшення концентрації іонів натрію і незначне (на 5–10 %) збільшення концентрації іонів калію [100]. Дещо інші результати одержані під час вивчення зародків риб [6]. З'ясовано, що протягом періоду дроблення бластомерів

концентрація натрію в цитоплазмі стала, а концентрація іонів калію поступово збільшується. У амфібій і риб упродовж ембріогенезу збільшується співвідношення K^+/Na^+ в цитоплазмі, однак механізми реалізації цієї зміни, очевидно, відрізняються [100]. Така зміна співвідношення концентрації одновалентних катіонів на користь калію може визначити гіперполяризацію мембрани в процесі розвитку.

Енергозалежний транспорт іонів Na^+ та K^+ здійснює Na^+, K^+ – активована аденозинтрифосфатаза, або Na^+, K^+ – активована, Mg^{2+}-залежна АТФаза. Це є інтегральний білок плазматичних мембран клітин еукаріот, який виконує, і тим самим забезпечує, підтримання електрохімічного градієнту та осмотичного потенціалу одновалентних іонів у клітині, що є необхідною умовою їх функціонування [31, 87]. У зв'язку з цим, ензим відіграє ключову роль в реалізації багаточисленних клітинних функцій і процесів, які залежать від наявності іонних градієнтів [31].

На відміну від інших АТФаз Р-типу, Na^+, K^+-АТФаза поєднує в одній молекулі, разом з транспортно-гідролітичною і рецепторну функцію, специфічно взаємодіючи з екзогенними інгібіторами – серцевими глікозидами [185, 45]. Кардіоактивний стероїд оуабаїн належить до високоселективного інгібітора Na^+, K^+-АТФази. Оуабаїн зв'язується з ензимом із зовнішнього боку цитоплазматичної мембрани. Вважають, що оуабаїн блокує ензим у конформації P-E_2, гальмуючи в такий спосіб перехід ензиму в інший конформаційний стан P-E_1 [185].

Встановлено, що на активність Na^+, K^+-АТФази та її функціональні властивості впливають як екзогенні, так і ендогенні фактори (pH, температура, концентрація АТФ, катіони Mg^{2+}) [157]. Такі чинники впливають на ензим як на рівні самого каталітичного циклу, так і на організацію АТФази. Іони Mg^{2+} сприяють зв'язуванню оуабаїну та ванадату з молекулою ферменту [112]. Внутрішньоклітинне співвідношення [АТФ]/[АДФ] розглядають як пусковий механізм роботи Na^+, K^+-помпи. Зміни активності Na^+, K^+-АТФази можуть залежати як від внутрішньоклітинної, так і зовнішньоклітинної концентрації

Na^+. Довготривала регуляція, обумовлена збільшенням синтезу α- і β-субодиниць Na^+, K^+-АТФази, спостерігається у деяких видах тканин під дією таких гормонів як альдостерон (ниркові канальці) [142], тироксин (стимулює активність Na^+, K^+-АТФази у багатьох типах тканин) [142, 143]. До регуляторів ферментативної активності Na^+, K^+-АТФази відносять протеїнкіназу С та цАМФ-залежну протеїнкіназу (протеїнкіназа А). Фосфорилювання Na^+, K^+-помпи протеїнкіназою С призводить до інгібування її активності. Фосфорилювання АТФ-гідролази протеїнкіназою А спричиняє, залежно від умов, пригнічення, активування чи відсутність дії цього ферменту [154].

Протягом оогенезу в'юна відбувається зниження АТФазної активності та збільшення вмісту АТФ [86]. Клітинний поділ також супроводжується зміною показників внутрішньоклітинних концентрацій іонів Na^+, K^+, Ca^{2+} [136, 156], відбуваються періодичні коливання електричних параметрів, мембранного потенціалу й опору [23]. Активність Na^+, K^+-АТФази зародків в'юна змінюється протягом клітинного поділу бластомерів. Встановлено, що вона є максимальною в інтерфазі клітинного циклу, а зменшується під час мітозу [31, 69]. Подібні зміни активності Na^+, K^+-АТФази відбуваються протягом раннього розвитку зародків морських їжаків *Strongylocentrotus purpuratus* і *Litechinus pictus* [165].

Дослідження роботи Na^+, K^+-АТФази на зародках морських їжаків [165] показало, що активність цього ферменту для незаплідненої яйцеклітини та при заплідненні залишаються на одному рівні, а швидке збільшення активності Na^+, K^+-АТФази відбувається від стадії бластули до стадії ранньої гаструли. Проте активність оуабаїнчутливої АТФази залишається незмінною до стадії вилуплення. Подібні зміни Na^+, K^+-АТФазної активності до стадії ранньої гаструли описано і для іншого виду морського їжака *Hemicentrotus pulcherrimus* [170].

Встановлено, що зміни активності Na^+, K^+-АТФази жаби *Bufo marinus,* протягом клітинного циклу, пов'язані зі змінами білок/ліпідного складу новоутвореної плазматичної мембрани [61]. Зміни іонного гомеостазу

запускають метаболічні процеси в ядрі та цитоплазмі зигот і зародків [36]. Електрофізіологічні дослідження свідчать про схожість плазматичної мембрани ооцитів і диференційованих клітин, що пояснюється наявністю в них подібних структур і властивостей [167].

Зміна ліпідного мікрооточення внаслідок процесів пероксидного окиснення ліпідів може бути причиною зміни активності мембранозв'язаних ферментів [127, 130, 161]. Встановлено, що Na^+, K^+-АТФаза є чутливою до АФО і безпосередньо бере участь в оксидативному стресі [123, 161]. Низкою досліджень з'ясовано, що фермент характеризується різною чутливістю до окисників: АТФ-аза є стійкою до дії супероксид-аніона, відносно стійкою до пероксиду гідрогену, але дуже чутливою до гідроксильного радикала [123, 130, 161], а в результаті дії вільних радикалів, Na^+, K^+-АТФаза уповільнює активний транспорт іонів і втрачає гідролітичну активність [154].

Припускають, що зміни білок-ліпідного складу плазматичної мембрани спричиняють коливання активності Na^+, K^+-АТФази протягом клітинного циклу [186, 116]. Процеси вільнорадикального окиснення зумовлюють виникнення в клітині оксидативного стресу, що стимулює продукування АФО та вільних радикалів, які мають властивість пошкоджувати мембранні ліпіди і білки. Зміни властивостей мембранних білків та ліпідів, котрі здатні обумовлювати зниження деформаційних можливостей клітини, зменшення мікров'язкості мембран, зумовлюють підвищення активності фермента Na^+, K^+-АТФази. Зниження його активності поєднується з підсиленням взаємозв'язку цитоскелет–мембрана, збільшенням фрагмента інтегрального білка [59].

Наведені вище факти підтверджують те, що зміни Na^+, K^+-АТФазної активності мембран характеризуються періодичністю і тісно пов'язані з метаболічними процесами, які відбуваються в клітинах. При патологічних станах організму, що спричинені зміною інтенсивності процесів пероксидного окиснення, відбувається пошкодження структури та функціонування Na^+, K^+-АТФази [142].

Отже, процеси, що відбуваються в клітині протягом ембріогенезу, у свою чергу є результатом взаємопов'язаних змін концентраційних іонних градієнтів, канальної провідності, активного та спряженого іонного транспорту, процесів пероксидного окиснення ліпідів і функціонування ферментів антиоксидантної системи [154].

На мікросомальних фракціях мембран зародків в'юна встановлено закономірні зміни активності Na^+, K^+-АТФази [46]. Ця активність є низькою або відсутня в незаплідненій яйцеклітині, а після запліднення різко збільшується та залишається на тому ж рівні до стадії ранньої бластули. Відмічено зростання активності Na^+, K^+-АТФази, протягом 5 годин розвитку зародків, на стадії 8 поділу бластомерів показник досягає максимального значення, а на стадії 10 поділу, активність Na^+, K^+-АТФази дещо знижується [112, 113]. Крім того показано, що протягом кожного клітинного циклу дроблення бластомерів активність Na^+, K^+-АТФази періодично змінюється: вона максимальна в інтерфазі, а під час мітозу спадає [29, 31, 69].

В ооцитів шпорцевої жаби встановлено потенціалозалежність Na^+, K^+-АТФази [183]. Однак відомі й інші фактори регуляції активності помпи, пов'язані зі змінами функціонального стану плазматичної мембрани зародків, зокрема, співвідношення ліпід/протеїн [79, 115], яке змінюється протягом клітинного циклу дроблення.

Було вивчено вплив авермектинів на функціонування мембранних систем активного транспорту Na^+, K^+ та Ca^{2+} у зародкових клітинах в'юна *Misgurnus fossilis* L. та механізми їхнього впливу упродовж ембріогенезу. Встановлено, що авермектин та івермектин у діапазоні концентрацій (0,001–10 мкг/мл), за умов проведення досліджень *in vitro,* та (0,01–1 мкг/мл) *in vivo,* дозозалежно інгібують оуабаїнчутливу АТФазу зародкових мембран у порівнянні з контролем [65]. Зміни Na^+, K^+-АТФазної активності пов'язані з різним ступенем чутливості даної АТФази до дії авермектинів та умовами проведення досліджень. Авермектини у концентрації 0,1 та 1 мкг/мл інгібують сумарну Ca^{2+}, Mg^{2+}-АТФазну активність. Найбільш чутливою до дії препаратів є остання стадія

синхронних поділів, за умов проведення дослідження *in vivo*. За дії авермектинів у зародків виявлено такі аномалії: відставання у розвитку; деформацію кісток скелету; затримку та аномалії у закладанні серцево-судинної системи; недорозвинення зябер та плавців [65]. Електронно-мікроскопічне дослідження ультраструктури бластомерів зародків на першій годині розвитку, при дії авермектинів, виявлено суттєві пошкодження мембранних органел зародкових клітин. На першу годину розвитку відмічено ознаки некрозу клітин, значну вакуоляризацію клітинного вмісту при наявності препаратів в інкубаційному середовищі у концентрації 1 мкг/мл. На шостій годині розвитку зафіксовано протеоліз та ділянки некрозу за дії івермектину у концентрації 0,1 мкг/мл. Дія авермектинів на зародки в'юна *Misgurnus fossilis* L. здійснюється через дестабілізацію структур і функцій мембран та інгібування ферментативної активності системи активного транспорту іонів (Na^+, K^+, Ca^{2+}), які у свою чергу запускають механізми некротичної загибелі клітин [65].

1.3. Фізико-хімічні властивості та вплив флуренізиду на живі організми

Флуорени – група низькомолекулярних синтетичних речовин, у структурі яких міститься флуоренове ядро [177, 49, 75, 92, 93, 94]. З 2000 р. у медичній практиці використовують новий клас ліків (похідні флуорену – трициклічного ароматичного ядра), до якого належать відомі противірусні препарати флореналь і аміксин [75, 92, 93, 94]. Флореналь – бісульфітна сполука 2-флуоренонілгліоксалю, що нейтралізує дію *Herpes simplex*, *Herpes zoster* і застосовується в офтальмології для лікування вірусних захворювань очей. Аміксин є низькомолекулярним індуктором ендогенного інтерферону, противірусним засобом та імуномодулятором. Він є ефективний проти всіх збудників гострих респіраторних вірусних інфекцій. Пошук серед флуоренів високоефективних субстанцій широкого спектру дії привів до створення флуренізиду (N-9-флуореніліден-N'-ізонікотиногідразиду, рис. 1.1) – препарату

протимікробної, протитуберкульозної, антихламідійної, імуномодулюючої, антиоксидантної, гепатопротекторної, протизапальної, противірусної дії [177, 94]. Противірусна дія флуренізиду вивчена in vitro та in ovo щодо вірусу грипу птиці (ВГП) типу Росток/34 (H7N1) та вірусу хвороби Ньюкасла. Найближчим аналогом флуренізиду, за дією та структурою, є аміксин, котрий відрізняється фармакологічними властивостями. Показники противірусної дії флуренізиду на репродукцію вірусу грипу птахів у системах in vitro та in ovo перевищують такі для аміксину [75].

Рис. 1.1. Структурна формула флуренізиду.

Флуренізид – український препарат (реєстраційне посвідчення № Р.10.00/02305 від 12.10.2000 р.) – випускається у вигляді порошку, таблеток і супозиторіїв вагінальних [177, 94]. Відомо, що він не чинить негативного впливу на рівень еритроцитів, гемоглобіну і тромбоцитів периферійної крові, функцію печінки та нирок. Припускають, що механізм його дії полягає у здатності проникати крізь цитоплазматичну мембрану клітини в цитоплазму і зв'язуватися зі специфічним рецептором. Утворений активований комплекс "флуренізид-рецептор" проникає у ядро клітини, з'єднується з ДНК і стимулює утворення інформаційної РНК. У результаті трансляції РНК на рибосомах синтезуються різні регуляторні білки. Найважливішим із них є ліпокортин, який пригнічує фосфоліпазу A_2 і, таким чином, пригнічує синтез

простагландинів і лейкотрієнів [84]. Останні відіграють вирішальну роль у розвитку запалення. Флуренізид виявляє протизапальну дію у лікарській формі розчину та суспензії. Проте на сьогодні залишається недостатньо вивченою його дія на процеси ліпопероксидації клітин [177, 94].

Флуренізид, завдяки наявності гідразидних груп, має певну структурну схожість з ізоніазидом. За даними Інституту фтизіатрії і пульмонології, мінімальна інгібуюча концентрація флуренізиду, щодо лабораторних і виділених від хворих штамів мікобактерій туберкульозу чутливих до ізоніазиду, становить 0,04–0,15 мкг/мл, на середовищах Проскауера-Бека і кров'яному та 0,08–0,3 мкг/мл на середовищі Левенштейна-Йенсена. В цілому активність флуренізиду in vitro значна, але поступається в 2 рази ізоніазиду [94]. Між цими препаратами має місце повна перехресна резистентність мікобактерій туберкульозу. Штами, стійкі до інших протитуберкульозних препаратів, залишаються чутливими до флуренізиду.

Після прийому флуренізиду в дозах 0,6–0,9 г у хворих протягом 9 годин створюються в крові значні або помірні його концентрації, які в період піків (через 3 години) перевищують мінімальну інгібуючу дозу флуренізиду в 20–36 разів. До 12–24 годин його рівень падає до мінімального.

В хіміотерапії деструктивного туберкульозу легень флуренізид може застосовуватись, в першу чергу, у хворих з вперше діагностованим туберкульозом, а також за рецидивів і загостреннях процесу, рідше – за раніше неефективно лікованому і хронічному туберкульозі, у всіх випадках при збереженні чутливості мікобактерій туберкульозу до ізоніазиду [51].

Флуренізид застосовується в таблетках в один прийом, до або після їжі в добовій дозі із розрахунку 10–15 мг на 1 кг маси, тобто у дорослих в дозах 0,6–0,75–0,9 г, переважно щоденно [50]. Його комбінують з 2–4 іншими препаратами (крім ізоніазиду), в першу чергу з рифампіцином, піразинамідом, етамбутолом, стрептоміцином. Строки застосування флуренізиду при його ефективності і добрій переносимості у осіб з деструктивним туберкульозом – переважно 4–7 місяців [49].

Хіміотерапія із 4–5 препаратів, включаючи флуренізид, приводить у хворих, з вперше виявленим або мало лікованим деструктивним туберкульозом, до припинення бактеріовиділення в 84–87 % випадках, і до загоєння порожнин – у 75–80 %. Ці результати близькі до таких при режимах хіміотерапії, що включають ізоніазид. Але переносимість флуренізиду значно краща, ніж ізоніазиду. Лише у поодиноких осіб (4–6 %) Флуренізид викликає незначні неврологічні реакції (головний біль, запаморочення). Саме застосування флуренізиду у хворих, з непереносимістю ізоніазиду або при протипоказаннях для його призначення, приводить до підвищення ефективності їхнього лікування [49, 50, 51, 94,].

Флуренізид – це дрібнокристалічний порошок, з кристалами голчастої форми або пластинчастої структури, жовтого або зеленувато-жовтого кольору, без запаху і смаку, леткий. Розчинний в льодяній оцтовій кислоті, помірно розчинний в хлороформі, малорозчинний в 96 % спирті, практично не розчинний у воді. Легко розчинний у диметилсульфоксиді. Температура плавлення – від 214,0 до 218,5^{0}С [49].

Вивчення гострої токсичності флуренізиду проводили на білих мишах за перорального введення. При цьому використані здорові дорослі тварини обох статей, яких утримували групами по 10 особин. Одноразове введення внутрішньо субстанції флуренізиду у вигляді колоїдної системи в крохмальному клейстері, в дозах від 500 мг/кг до 6300 мг/кг, не призводило до загибелі піддослідних тварин. Флуренізид у дозах понад 3160 мг/кг зумовлює лише деяку загальмованість тварин, зниження потреби у їжі та воді, незначне зниження температури тіла (до 0,4ºС). Ці симптоми вже зникали через 8–10 годин. Отримані дані дозволили віднести субстанцію флуренізиду до класу практично нетоксичних речовин [48].

Введення білим щурам колоїду флуренізиду в крохмальному клейстері, в дозі 150 мґ/кґ (що більш ніж у 100 разів перевищує максимальну добову дозу препарату, рекомендовану для медичної практики), не зумовлює змін вмісту і кількості шлункового соку, його кислотності. Препарат не провокує утворення

еритем, петехій і ерозій стінки шлунка щурів. Отже, флуренізид не виявляє місцево-подразнювальних властивостей, в умовах 30-ти добового введення в зазначеній дозі, флуренізид не спричиняє загибелі піддослідних тварин, не впливає на нормальний приріст маси тварин і температуру тіла, не має негативної дії на ЦНС, серцево-судинну систему, частоту дихання, функцію нирок (добовий діурез, відносна маса), функцію печінки (активність ферментів, детоксикаційна функція), систему крові (гемоглобін, зсідання крові, кількість еритроцитів і лейкоцитів, лейкоцитарна формула), не впливає на масові коефіцієнти внутрішніх органів. Отже, за тривалого застосування флуренізид не впливає негативно на життєдіяльність організму [94].

Для вивчення алерґізуючих властивостей флуренізиду був проведений дослід на білих щурах. Шлях введення флуренізиду відповідав способу вживання його людиною, тобто внутрішньо, а доза препарату в 10 разів перевищувала рекомендовану для практики. Встановлено, що достовірних відмінностей між дослідними тваринами і тваринами з групи негативного контролю за розміром діаметра забарвленої плями на місці ін'єкції дози флуренізиду, не виявлено. Будь-яких індивідуальних проявів дії флуренізиду на організм тварин під час експерименту не було виявлено. Отже, флуренізид не виявляє алерґізуючих властивостей [51].

1.4. Взаємозв'язок між структурними і функціоальними властивостями флуренізиду

Флуренізид – важлива біомолекула з властивостями, які є оптимальними для виконання усієї сукупності фармакологічної дії – протимікробної (протитуберкульозної, антихламідійної), імуномодулювальної, антиоксидантної, антирадикальної, гепатопротекторної, протизапальної та ін.

Структурні фрагменти у єдиній біомолекулі (флуоренове ядро, гідразидне угрупування, піридиновий цикл) визначають різносторонні фармакоґенетичні та фармакологічні властивості й оригінальність специфічних фізіологічних

ефектів флуренізиду у регуляції життєво важливих процесів в організмі [94]. У відкритому ланцюзі молекули флуренізиду містять гідразидне угрупування з двома структурно різними атомами азоту. Один із них з'єднаний подвійним зв'язком (=C=N-) з флуореновим ядром, а другий (-NH-) – із залишком ізонікотинової кислоти, що здатні взаємодіяти з різними біоструктурами та змінювати їхню специфічну дію [93].

Відомо, що мікроорганізми, *Arthrobacter sp. F101, Pseudomonas sp. NCIB 9816-4, Pseudomonas cepacia F297, Staphylococcus auriculans DBF63, Sphingomonas sp. LB 126, Terrabacter sp. штам DBF63,* використовують флуорен як єдине джерело вуглецю та енергії. Метаболізм флуорену у мікроорганізмах багатостадійний, супроводжується реакціями ферментативної оксидації і утворенням нетоксичних продуктів.

Флуренізид – фотохімічно активна молекула. УФ-спектри 0,001% спиртового розчину флуренізиду характерні наявністю плеча при довжині хвилі 250±2 нм і максимумами поглинання за 260±2 нм та 344±2 нм [85, 92]. Флуренізид є носієм енергії в енергетично збіднілій клітині і діє на біоенергетичному рівні.

Для молекули флуренізиду характерне явище тавтомерії – рухомої рівноваги між кетонною та енольною формами (рис. 1.2). У лужних розчинах наявна тавтомерна суміш цих форм. Встановлено, що флуренізид виявляє фармакологічну дію в кетонній і в енольній формах [177].

Від pH середовища залежить дифузна рівновага, зв'язок з внутрішньоклітинними елементами, розподіл у жировій тканині. За результатами досліджень встановлено, що 0,001% водний розчин флуренізиду змінює слабокисле pH води, очищеної в сторону нейтрального значення з 5,42 до 6,99 (різниця на 1,57 одиниці зумовлена взаємодією молекули флуренізиду з протонами води). У вищій концентрації (0,005% флуренізиду у воді очищеній) початкові значення pH води очищеної зміщуються в кислу сторону на 0,19 одиниць. Під час розчинення флуренізиду в 0,1M HCl початкове значення pH 0,1M HC1 змінюється на 0,12 одиниць (0,001% флуренізиду в 0,1M HCl) і на

0,30 одиниці у разі зростання концентрації у 10 разів (0,01% флуренізиду в 0,1М HCl). Під час розчинення флуренізиду в 0,1М NaOH початкове значення pH 12,87 зміщується на 0,11 одиниць до 12,76 (0,001% флуренізиду в 0,1М NaOH) і не змінюється у разі зростання концентрації у 10 разів (0,01% флуренізиду в 0,1М NaOH).

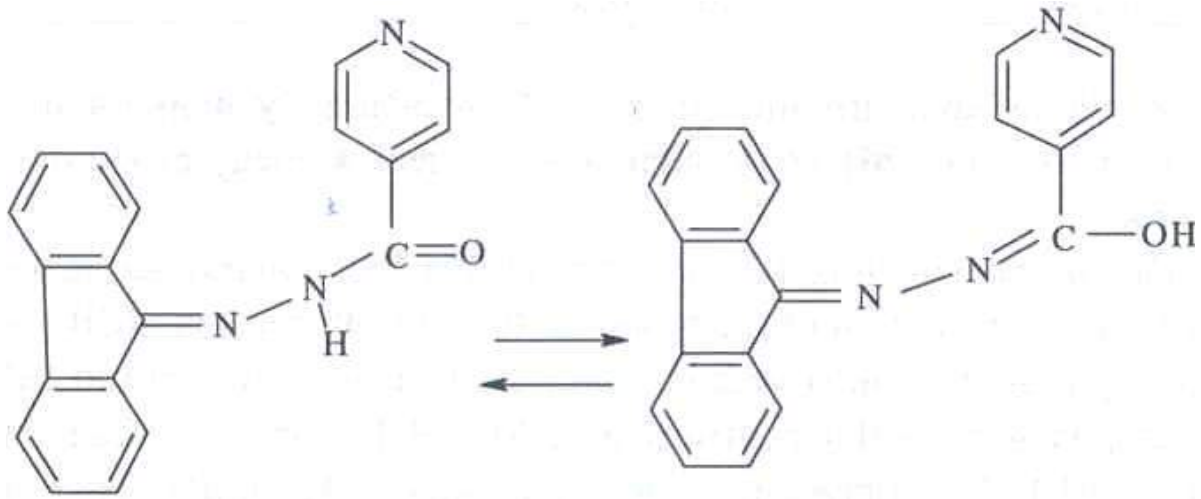


Рис. 1.2. Кето- та енольна форми флуренізиду.

Під час введення *per os* флуренізид проходить через ділянки з дуже різними значеннями pH. Науковими дослідженнями встановлено, що у вигляді таблеток флуренізид є ефективним в кето-формі (pH середовища шлунка, що дорівнює приблизно 1,0), і в енольній формі (pH середовища кишок, приблизно 6,8 – у верхніх і близько 7,6 – у нижніх відділах тонкої кишки). В інших органах і тканинах організму pH практично має постійне значення 7,4. У сечі pH змінюється від 4,6 до 8,2, що створює можливість для регуляції пасивної дифузії і реабсорбції флуренізиду в тубулярній системі нирок [9].

У молекулі флуренізиду атом водню, при електронегативному атомі кисню у гідразидній групі, здатний легко заміщуватися на атом натрію. Ймовірно, першим можливим метаболітом флуренізиду є його натрієва сіль – фармакологічний засіб високої протимікробної дії [2].

За допомогою методу мас-спектрометрії визначено ступінь деструкції

молекули флуренізиду під дією електронного удару. Встановлено, що розпад молекули флуренізиду відбувається за розриву зв'язку –NH–CO– після приєднання протону до молекулярного іону, що може бути підтвердженням процесів його метаболізму в організмі [9].

Розрахунки конформації та електронної будови лікарського засобу флуренізиду проведені з використанням квантово-хемічних методів MINDO/3, MNDO, AMI, PM3 за програмами MOP AC: VERSION 7,00, Hyperchem™ Release 5 [8, 25]. Просторова модель молекули показує ван-дер-ваальсовий контур загалом і окремих груп зокрема. Перевага просторової моделі полягає в тому, що вона відображає молекулу саме такою, якою її “бачить” клітина або, наприклад, певний фермент, який “розрізняє” окремі ділянки молекули і знаки їх електричних зарядів, а також точну віддаль між ними. Фермент розрізняє положення незаряджених полярних груп (–OH; –CO–NH–; >C=0), які здатні до утворення водневих зв'язків. Фермент “бачить” розміри і форму неполярних вуглеводневих груп на поверхні біомолекули, які можуть бути важливими контактними ділянками під час гідрофобних взаємодій.

Точність комплементарної відповідності флуренізиду (як субстрату) і активної ділянки ферменту обумовлює високу вибірковість ферментативного каталізу без утворення побічних продуктів [39].

Розрахунки конформації і електронної будови проведено для флуренізиду у кетонній та енольній формах. Зазначено, що молекула флуренізиду в цих формах характеризується однаково високою поляризованістю, молярна рефракція дорівнює 89,92±0,50 $см^3$/г/моль. Для флуренізиду молярні об'єми кетонної та енольної форм збігаються. У кето-формі молярний об'єм флуренізиду в 2,14 разів перевищує молярний об'єм Ізоніазиду; в енольній формі молярний об'єм флуренізиду в 2,27 разів більший від молярного об'єму ізоніазиду [8].

Парахор – емпірична функція, яка відображає зв'язок між молекулярною масою, густиною і поверхневим натягом неасоційованої індивідуальної речовини [9]. Парахори кетонних та енольних форм флуренізиду рівні за

величиною і вдвічі перевищують такі для ізоніазиду. Розраховані індекси рефракції, поверхневий натяг і питома маса субстанцій ізоніазиду, ізопропіазиду і флуренізиду важливі для досліджень фармако-технологічних властивостей [104].

Поляризованість молекули характеризує здатність електронної оболонки до деформації під дією зовнішнього електричного поля. Особливості електронної будови, висока поляризованість молекули забезпечують легку проникність флуренізиду крізь міжклітинні мембрани організму. Величини поляризованості гідразиду ізонікотинової кислоти і флуренізиду відповідно становлять $14{,}47 \cdot 10^{-24}$см^3 і $35{,}65 \cdot 10^{-24}$см^3 ($P \pm 0{,}5 \cdot 10^{-24}$см^3). Флуренізид у 2,5 рази краще, ніж ізоніазид, всмоктується і розподіляється в органах і тканинах організму. Порівняння поляризованості для енольних форм показало зростання цієї величини у ряді ізоніазид → ізопропіазид → флуренізид [$(P \pm 0{,}5) \cdot 10^{24}$ см^3]; 14,47→ 20,26→35,65.

Для флуренізиду спостережено зниження величини дипольного моменту для енольної форми (1,891D) порівняно з кетонною (2,511D).

На підставі порівняння величин дипольних моментів протитуберкульозних засобів у працях Петрух Л.І. зроблено висновки про асиметрію молекул, розподіл електронної густини й розміщення активних фармакофорів. За значенням дипольних моментів кето-форм флуренізиду та ізоніазиду очевидним є вплив трициклічного ароматичного флуоренового ядра в молекулі флуренізиду на зміщення електронної густини [40]. Величина дипольного моменту є кількісним критерієм гідрофільно-гідрофобного балансу молекули. Полярність і ліпофільність визначають проникність, дифузію, взаємодію біомолекули з білками плазми і ступінь ефективності.

Для досягнення бажаного клінічного ефекту велике значення має біокінетика діючої речовини. Поглинання і розподіл діючої речовини в організмі – взаємнозв'язані процеси, що залежать від здатності молекули діючої речовини долати різні бар'єри – фосфоліпідні мембрани.

Лікарський засіб проходить крізь фосфоліпідні мембрани шляхом

пасивної дифузії за участю переносчиків, шляхом фільтрації і активного транспорту. Нейонізовані, розчинні в ліпідах сполуки легко долають фосфоліпідні мембрани, в той час як йонізовані, розчинні у воді, часто затримуються. У випадку доброго розчинення, у ліпідах мембран відбувається дальший пасивний транспорт молекул у напрямі градієнта концентрацій.

Припускають, що оптимальне значення ліпофільності речовин залежить від місця дії (поверхня стінки ядра, стінка ядра, мембрана цитоплазми і ін.). Кількісною величиною ліпофільності є коефіцієнт розподілу октанол-вода (log P). Для флуренізиду log P дорівнює 2,51, що є в межах оптимальних величин для лікарських засобів [48, 60].

Під час біотрансформації молекула лікарського засобу метаболізує з утворенням розчинних сполук, які легше виділяються з організму.

Важливі такі фармакокінетичні параметри лікарських засобів:

1) максимум концентрації препарату в крові;

2) час досягнення максимальної концентрації препарату в крові;

3) площа під кривою зміни концентрації лікарського засобу в плазмі крові або сироватці за одиницю часу [67].

Порівняльну оцінку фармакокінетичних параметрів рифампіцину, ізоніазиду, флуренізиду й інших похідних флуорену, які виявляють високу протитуберкульозну дію, здійснено упродовж 1986–1990 р.р. під керівництвом дослідників Каркищенка М.М., Калмикової Г.М., Маклякова Ю.С. [76, 80].

Характер розподілу флуренізиду в організмі та його елімінації вивчено на двокамерній моделі фармакокінетики [84]. Встановлено, що максимальні концентрації флуренізиду після одно- і багаторазового внутрішньоочеревинного введення дози 20 мґ/кґ, визначаються в плазмі крові через 20 хв, а в органах – через 40 хв. Встановлено, що найвищі періоди всмоктування, розподілу і виведення флуренізиду є у печінці, де їх значення відповідно дорівнювали 0,382; 1,344; 27,707 год (аналогічно для ізоніазиду 0,137; 0,452; 7,012 годин). Для інших органів ці константи нижчі, але відрізняються між собою незначно, що свідчить про порівняно однорідний

розподіл флуренізиду в організмі щурів.

Експериментальні дані зробили можливим прогнозування доз флуренізиду для людини і попередній опис фармакокінетики [85, 103, 108,]. Фармакокінетичні параметри лікарських засобів можуть змінюватися залежно від способів введення.

Фармакокінетичні параметри флуренізиду і рифампіцину (препарат порівняння) досліджені в дозі 20 мг/кг під час одно- і багаторазового, а також одночасного введення білим безпородним щурам протягом 14 днів [104, 109, 110]. Кількісний вміст у плазмі й органах визначено спектрофотометрично. Максимальні концентрації флуренізиду після одно- й багаторазового внутрішньоочеревинного введення визначаються у плазмі крові через 20 хв, а в органах – через 40 хв. Флуренізид під час одно- й багаторазового, а також одночасного введення легко проникає і розподіляється в органах у високих концентраціях (табл. 1.1).

Таблиця 1.1.

Динаміка змін максимальних концентрацій препаратів

Препарати	Плазма, мкг/мл	Мозок, мкг/г	Легені, мкг/г	Печінка, мкг/г	Нирки, мкг/г
Ізоніазид, одноразово	11,58± 1,16	5,19± 0,59	8,31+0,86	8,57±0,84	6,49±0,54
Ізоніазид, багаторазово	20,43±0,95	7,54±0,76	10,73± 1,96	10,89±1,82	7,92+0,71
Рифампіцин, одноразово	16,95±1,29	7,01+0,73	11,05±1,16	12,70±1,23	9,83+0,93
Рифампіцин, багаторазово	22,83±2,20	9,38±0,98	15,19±1,58	16,40± 1,60	12,14±1,23
Флуренізид, одноразово	12,44±1,27	32,39±3,23	85,35±8,54	94,38+9,47	55,53+5,53
Флуренізид, багаторазово	91,73±9,17	60,74±6,67	94,18+9,47	123,67± 12,37	103,65±10,35
Флуренізид + Рифампіцин, одноразово	13,11 ±1,22	40,49±4,25	88,29±8,84	110,65± 11,87	118,46±11,84
Флуренізид + Рифампіцин, багаторазово	104,84± 10,45	80,99+8,21	105,95±10,52	123,67+12,31	118,46±11,87

Вміст флуренізиду в органах експериментальних тварин значно вищий, ніж у плазмі крові. Найвищі концентрації флуренізиду визначені у печінці, найнижчі – у мозку. Отже, мозок найбільш захищений від дії препарату. Флуренізид проникає в нього найповільніше.

Після багаторазового введення флуренізиду всі його фармакокінетичні параметри зростають. Це вказує на здатність флуренізиду накопичуватися у крові й органах і тривало там зберігатися.

Рифампіцин не впливає на фармакокінетику флуренізиду. Одночасне введення флуренізиду та рифампіцину є ефективним і безпечним.

Період напіввиведення лікарського засобу з організму ($T^{1/2}$) характеризує швидкість зниження його вмісту в досліджуваних рідинах і тканинах організму. Період напіввиведення флуренізиду перевищує $T^{1/2}$ рифампіцину при одно- й багаторазовому, а також одночасному введенні.

Флуренізид, під час одно- й багаторазового, а також окремого та одночасного введення, (флуренізид+рифампіцин) довше затримується в органах, значно повільніше виводиться (під час одно- і багаторазового введення в 1,8 рази довше в плазмі крові, ніж рифампіцин). Це свідчить про здатність флуренізиду створювати бактеріостатичну концентрацію в організмі протягом тривалішого часу, ніж рифампіцину, що має велике значення у хеміотерапії інфекційних захворювань.

В літературі вказано, що для флуренізиду характерна висока біологічна доступність (відображає кількість лікарського засобу, яка надійшла в кров після одноразового введення), його ступінь і швидкість всмоктування під час вживання *per os* забезпечують швидке досягнення терапевтичних концентрацій [111].

Флуренізид розглядається як сигнальна молекула для рецепторних систем, яка «правильно» під'єднується до сусідніх субодиниць і стає частиною термодинамічно стійкої олігомерної системи. Наявність у молекулі флуренізиду гідразидного угрупування і здатність до енолізації визначають взаємодію зі

специфічними рецепторами, утворення тривких ковалентних або лабільних водневих зв'язків, участь в обміні речовин, вияв специфічних протимікробних, імуномодулюючих, гепатопротекторних та інших фармакологічних ефектів [94].

Флуренізид легко утворює комплексні сполуки під час взаємодії з металами [124]. Гіпотетично препарат може утворювати комплекси і з білками, що містять метали. Значною є роль комплексоутворення у молекулярних механізмах дії лікарського засобу з ендогенними металами та участь комплексів, що при цьому утворюються, у ферментних реакціях, розвитку патологічного процесу і наслідках перебігу хвороби. Здатність флуренізиду утворювати комплекси впливає і на виявлення протитуберкульозних властивостей препарату.

Клінічні спостереження хворих на туберкульоз з супутньою патологією, зокрема цукровим діабетом, підтвердили гіпоглікемічний ефект флуренізиду. Препарат може потенціювати дію інсуліну шляхом підвищення чутливості периферичних тканин, а також взаємодії з ядерними рецепторами. Таким чином, він належить до нових пероральних препаратів – ґлітазонів, які взаємодіють з місцями, де зв'язується інсулін [80].

Флуренізид впливає на функцію печінки, сприяє детоксикації ксенобіотиків. Гепатопротекторна дія обумовлена здатністю флуренізиду проникати в мембрани гепатоцитів, стабілізувати їх структуру і захищати від уражень [85].

Флуренізид відновлює імунологічний стан організму. Вперше встановлені імуномодулювальні властивості флуренізиду і обгрунтовано можливість специфічного лікування за його допомогою експериментального алергійного енцефаломієліту. Під впливом флуренізиду у хворих на розсіяний склероз відбуваються позитивні зміни в імунній системі [108].

Встановлено значний антиоксидантний, виражений імунотропний та клінічний ефекти флуренізиду. Препарат сприяє відновленню функціонального стану імунної системи на загальному й місцевому рівнях [82].

Отже, зростання інтенсивності процесів ліпопероксидації є типовим для патологічних процесів в організмі. За повернення до норми процесів ПОЛ відповідає антиоксидантна система захисту. Вважають, що флуренізид здатний вступати в реакцію з OH^{-}, HO_2^{-} та $O_2^{\cdot -}$, радикалами які зумовлюють інтенсифікацію вільнорадикальних реакцій. У дослідах *in vitro* на зразках мозку щурів показано, що флуренізид знижує інтенсивність процесів ПОЛ. Маркерним ферментом плазматичної мембрани є Na^{+}, K^{+}-АТФаза, активність якої знижується за впливу шкідливих сполук, зокрема антибіотиків авермектинового класу. У вітчизняній та закордонній науковій літературі немає інформації про дію флуренізиду на інтенсивність процесів ліпопероксидації, зміну активності ключових ензимів антиоксидантної системи за умов перебування зародкових клітин у середовищі з цією субстанцією. Не досліджено також вплив флуренізиду на мембранопов'язані процеси клітин, зокрема Na^{+}, K^{+}-АТФазу. На сьогодні залишається не вивченим стан ензимів, які відповідають за знешкодження лікарських препаратів у клітинах. Відомо, що до них належить глутатіон-S-трансфераза. Для проведення таких експериментів важливо обрати адекватний об'єкт дослідження. З цією метою були використані зародки в'юна *Misgurnus fossilis* L., за розвитком яких можна без перешкод спостерігати та проводити відбір проб (на певних етапах розвитку). Застосування в експерименті зародків в'юна дають можливість вивчити дію препарату на структурні й функціональні параметри клітин в часі.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Характеристика об’єкту досліджень

У дослідах використовували зародки прісноводної риби в’юна *Misgurnus fossilis* L. Відомо, що зародки в’юна у період ембріогенезу є адекватною тест-системою для дослідження впливу різноманітних фізико-хімічних чинників на живі організми. В’юн використовується при вивченні ряду проблем сучасної біології розвитку, в тому числі в ембріологічних, біохімічних, біофізичних, цитологічних та інших дослідженнях [145, 54].

Для цього об’єкту характерна відносно коротка тривалість періоду ембріогенезу, легкість отримання статевих продуктів і відсутність труднощів в утриманні в лабораторних умовах [145, 5].

Запліднення у в’юна зовнішнє, моноспермне. У перші секунди після запліднення жовткова оболонка відділяється від поверхні яйця і утворює перивітеліновий простір. Одночасно розпочинається стягування цитоплазми до анімального полюса яйця й утворення цитоплазматичного горбика. Шар цитоплазми оточує жовток, а тонкі її тяжі пронизують жовток та утворюють всередині нього сітку [145]. Після відділення оболонки і утворення перивітелінового простору, діаметр запліднeного яйця дорівнює 1,69 мм [141], а діаметр власне яйця (без оболонки) 1,1–1,3 мм. Висота бластодиска становить 0,35–0,45 мм [145].

Яйцеклітини і зародки в’юна для експерименту виділяли і запліднювали за методом Нейфаха [83]. У лабораторних умовах риб утримували в холодильнику при температурі +4–+5 °С. Для отримання ікри самкам внутрішньом’язово вводили хоріонічний гонадотропін (500 міжнародних одиниць) за 36 годин до проведення експерименту [30, 118]. Овуляція відбувалася через 36–40 годин при температурі +19–+20 °С. Самця

декапітували, сім'яники подрібнювали і заливали відстояною водопровідною водою. Запліднення ікри проводили в чашках Петрі, додаючи суспензію сперміїв [23]. Потім запліднену ікру через 5–10 хв відмивали від сперміїв та інкубували за температури +21–+22 °С у розчині Гольтфретера – фізіологічному розчині для холоднокровних тварин [29]. Стадії розвитку контролювали візуально під бінокулярним мікроскопом МБС–9.

Перші 2 бластомери утворюються після одногодинної інкубації зародків за температури 21,5 °С, а борозна першого поділу проходить меридіально [145]. У подальшому вік зародків вимірюється величиною τ_o (умовні одиниці «Детлаф») [22]. Величина τ_o – тривалість одного мітотичного циклу в період синхронних поділів бластомерів, що становить 31±2 хв. Через півтори години після запліднення зародки представлені 4 бластомерами, борозна другого поділу проходить теж меридіально, але перпендикулярно борозні першого. Через 2 години зародки мають 8 бластомерів, а через 2,5 годин – 16, ці борозни проходять меридіально і перпендикулярно попереднім. Через 3 години зародки представлені 32 бластомерами, але борозна п'ятого поділу проходить паралельно екватору жовтка. На анімальному полюсі утворюється «шапочка» (бластодиск), клітини якої ще не відділені від жовтка мембранами [145, 171].

Через 3 год після запліднення клітини нижнього шару торкаються жовтка безпосередньо своєю базальною частиною, а верхні – оточені з усіх боків плазматичними мембранами. Вперше з'являються якісні відмінності між бластомерами [118]. На наступній стадії дроблення зародок має 64 бластомери, які розташовані 2–3 шарами. Через 4 год після запліднення зародки мають 128 бластомерів, через 5 год – 512 бластомерів, що утворюють морулу. Після цієї стадії поділу відбувається десинхронізація каріокінезу в різних клітинах. Через 6 годин після запліднення починається асинхронний поділ ядер, падає мітотичний індекс, починається інтенсивний синтез РНК та морфогенетична функція ядер [145, 171]. Саме ця стадія розвитку (1024 бластомери) була останньою в наших дослідженнях.

Отже, дослідження проводили на зародках в'юна, які відповідали: першому поділу зиготи (2 бластомери); четвертому (16 бластомерів); шостому (64 бластомери); восьмому (256 бластомерів); десятому (1024 бластомери). Через 5–10 хв після запліднення відмиті зиготи інкубували у фізіологічному розчині Гольфретера (t = 20–22 °C), який містив розчин флуренізиду (використовували синтезовану 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. Таку серію дослідів нами умовно названо *in vivo*. Згідно Державної фармакопеї України флуренізид першопочатково розчиняли диметилсульфоксидом, (оскільки він в цій речовині легкорозчинний) у співвідношенні 1:2, після чого доводили розчином Гольтфретера до відповідних концентрацій [187]. У іншій серії дослідів до гомогенату зразків зародків, які були відібрані на певному етапі розвитку, додавали аліквоту флуренізиду (час інкубації 10 хв). Ці досліди ми умовно назвали *in vitro*.

У дисертаційній роботі використовували такі концентрації флуренізиду: 0,01; 0,05; 0,15; 1; 5; 15 мМ. Флуренізид у концентрації 1 мМ відповідає добовій терапевтичній дозі препарату для організму. Важливо було дослідити дію флуренізиду у вищих дозах – 5 і 15 мМ. Оскільки зародки є чутливими до препаратів, тому застосовували флуренізид також у концентраціях нижчих у 100 разів від 1; 5; 15 мМ.

У відібраних зразках визначали інтенсивність процесів ліпопероксидації за вмістом первинних (ГП) та вторинних (ТБК-активних) продуктів ПОЛ [6, 107], активність ензимів антиоксидантного захисту: СОД [53], КАТ [52], ГПО [77] та ГТ [151]. Вивчали активність Na^+, K^+-АТФази у мікросомальній фракції проб [72]. Концентрацію білка в кожному зразку визначали за методом Лоурі [168]. Впродовж розвитку зародків в'юна виявляли морфологічні зміни та проводили тест на виживання за впливу флуренізиду. На першому, шостому та десятому етапах дроблення зародків виконували електронномікроскопічні дослідження [73].

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 – M; стандартна похибка середнього арифметичного – m; середнє квадратичне відхилення – σ).

Для оцінки достовірності різниці між статистичними характеристиками двох альтернативних сукупностей даних обчислювали коефіцієнт Стьюдента. Достовірною вважалася різниця при показнику достовірності $p \geq 0,95$ (або рівні значимості $P < 0,05$), $p \geq 0,99$ (або рівні значимості $P < 0,01$), $p \geq 0,999$ (або рівні значимості $P < 0,001$). 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 зародків, на яких відбуваються однакові зміни досліджуваних показників. Результати дослідження представлені у вигляді рисунків.

2.2. Виділення і очищення бластодерм зародків в’юна

Виділення бластодерм із зародків та їх дисоціацію до ізольованих клітин проводили за методикою Бериташвили Д. Р. [6]. Ікру без оболонок попередньо відмивали декілька разів безкальцієвим розчином Стейнберга (5 мМ буфер трис-HCI (pH 7,4), 120 мМ NaCl, 1,3 мМ KCI, 2 мМ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$). Потім проби поміщали в центрифужні пробірки, в яких, попередньо, за допомогою нашарування, створювали градієнт сахарози: нижній шар має концентрацію 0,5 М, верхній – 1 М. У градієнті сахарози ікра занурюється на межі між шарами і в такому стані центрифугували 2–3 хв при 6500 g. Такої швидкості достатньо для того, щоб бластодерми відділилися від жовтка. Ізольовані бластодерми переміщуються у верхній шар сахарози, а жовток осаджується на дно пробірки.

Ізоляти забирали із сахарози кінчиком піпетки, відмивали безкальцієвим розчином Стейнберга (у співвідношенні 1:10), залишали відстоювати 5 хв і потім повторювали процедуру 2 рази [70]. Виділення гетерогенної фракції плазматичної мембрани із клітин зародків в'юна здійснювали при 0–4 °С [70]. Клітини, зібрані центрифугуванням при 1 0 0 g протягом 2 хв, суспендували в десятикратному об'ємі безкальцієвого розчину Стейнберга. Гомогенізацію проводили за допомогою гомогенізатора Поттера-Ельвенгейма в розчині, котрий містив 10 мМ трис-HCI (pH 7,4), 5 мМ $MgCI_2$, 130 мМ KCI (далі позначається як ТМК) до руйнування не менше 95 % клітин. До ТМК додавали сахарозу до кінцевої концентрації 40 % (густина 1,18) після чого суміш центрифугували 20 хв при 10 000 g. Надосадову рідину, в якій знаходилась гетерогенна фракція плазматичних мембран відбирали, а осад, котрий містив ядра та інші субклітинні компоненти з густиною вище 1,18 відкидали [70, 102].

Слід зазначити, що на вихід плазматичних мембран суттєвий вплив здійснював спосіб зберігання клітин зародків в'юна і режим їх обробки. Оптимальним є збереження ізольованих клітин не більше 12–14 годин у безкальцієвому розчині Стейнберга в холодильнику [63]. Після їх гомогенізації процес очищення мембран необхідно завершити в один день. Збереження клітин, гомогенату чи продуктів на проміжних етапах очищення суттєво понижує «вихід мембран», який визначається за кількостю білка. Очищені плазматичні мембрани можна зберігати при -20 – -70 °С тривалий час [145].

2.3. Методи дослідження вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів

2.3.1. Визначення вмісту гідропероксидів ліпідів

Вміст гідропероксидів ліпідів у гомогенаті зародків в'юна визначали за методом, принцип якого полягає в осадженні протеїну трихлороцтовою кислотою (ТХО) з наступним внесенням у середовище тіоціанату амонію [2].

Реактиви:

- 96º Етанол;
- 50% ТХО;
- HCI (концентрована);
- 1% розчин солі Мора приготований на 3%-му розчині HCI;
- 20% розчин тіоціанату амонію.

До 0,2 мл гомогенату тканини додавали 2,8 мл етанолу та 0,05 мл 50 %-го розчину ТХО і струшували протягом 5 хв. Відбирали 1,5 мл супернатанту і до нього додавали 1,2 мл етанолу, 0,02 мл концентрованої HCl, 0,03 мл 1 %-го розчину солі Мора в 3 %-му розчині HCl, струшували і через 30 с додавали 0,2 мл 20 %-го розчину тіоціанату амонію. Абсорбцію вимірювали при λ=480 нм. Вміст гідропероксидів ліпідів визначали за різницею між дослідним зразком і контролем, в який замість гомогенату зародків додавали відповідну кількість дистильованої води. Концентрацію гідропероксидів ліпідів виражали в умовних одиницях на 1 мг білка (ум. од./мг білка).

2.3.2. Визначення вмісту ТБК-позитивних продуктів

Принцип методу ґрунтується на активуванні ПОЛ іонами двовалентного заліза до рівня, який можливо зареєструвати спектрофотометрично. При високій температурі в кислому середовищі МДА реагує з ТБК, утворюючи забарвлений триметиновий комплекс з максимумом поглинання при 532 нм [81].

Реактиви:

- 10 мМ К-Na фосфатний буфер, приготований на 125 мМ KCl (pH = 7,4) та 0,5 мл 1мМ $KMnO_4$;
- 10 мМ $FeSO_4$;
- 20 % ТХО;
- 1 н HCl;
- 0,7мМ ТБК;

- Бутанол.

До 0,1 мл гомогенату зародків додавали 3 мл 10 мМ К, Na-фосфатного буфера, приготованого на 125 мМ KCl (pH 7,4) та 0,5 мл 1 мМ $KMnO_4$. У цій пробі індукували ПОЛ внесенням 0,5 мл 10 мМ $FeSO_4$ двічі з інтервалом 10 хв. Через 5 хв зупиняли реакцію додаванням 1 мл 20 % ТХО та центрифугували. До 2 мл супернатанту додавали 0,5 мл 1н HCl та 1 мл 0,7 мМ тіобарбітурової кислоти (ТБК) та інкубували на водяній бані при температурі 100 °С протягом 20 хвилин. Опісля пробу охолоджували та вносили 3 мл бутанолу, ретельно перемішували та центрифугували 10 хв при 1500 об./хв.

Абсорбцію проби вимірювали при λ=532 нм [107] у верхньому бутаноловому шарі, вміст ТБК-позитивних продуктів розраховували за наступною формулою:

$$ТБК-ПП = \frac{E \cdot V_1 \cdot V_2}{\varepsilon \cdot V_3 \cdot C},$$

де Е – екстинкція проби; V_1 – об'єм бутанолу; V_2 – об'єм проби; V_3 – об'єм отриманого супернатанту; ε – мілімолярний коефіцієнт екстинкції комплексу малонового диальдегіду з ТБК (156 $см^2$/мкмоль); С – концентрація білка, мг/мл.

Отримані результати виражали в мкмоль на 1 мг білка.

2.4. Методи дослідження активності ензимів антиоксидантної системи зародків в'юна

2.4.1. Визначення активності супероксиддисмутази

Принцип методу ґрунтується на утворенні $O_2^{\cdot -}$, який взаємодіє з кверцетином (відбувається його окиснення). При наявності СОД в середовищі, фермент перехоплює $O_2^{\cdot -}$ і не проходить окисненя кверцетину [81].

Реактиви:

- ЕДТА 0,08 мМ (85 мг – 10мл H2O; 425 мг – 50 мл H2O).
- ТЕМЕД.
- 0,1 М фосфатний буфер pH 7,8 (0,2 М Na2PO4; 0,2 М NaH2PO4).
- Кверцитин 1,4 мкМ розводять диметилсульфоксидом у розрахунку 45,4 мг кверцитину на 10 мл диметилсульфоксиду або диметилформаміду.

Активність СОД [95] вимірювали, додаючи в дослідну пробу 1 мл реактиву С, який містив рівні об'єми 0,08 мМ ЕДТА та 0,1 М фосфатного буферу (pH 7,8), доведеного до pH≥10 ТЕМЕДом; 2,3 мл дистильованої H_2O; 0,1 мл гомогенату (розведеного 1:100) та 0,1 мл 1,4 мкМ кверцетину, приготованого на диметилсульфоксиді та розведеного в гарячій дистильованій воді у відношенні 1:10. Контрольна проба містила 1 мл реактиву С, 2,4 мл дистильованої H_2O, 0,1 мл кверцетину [53]. Вимірювання проводили на спектрофотометрі при λ=406 нм відразу після додавання кверцетину та через 20 хв.

Розрахунок здійснювали за формулою:

$$A_{СОД} = [(\frac{D' - D''}{D'}) \cdot 100] \cdot 29{,}49 \quad ,$$

де $A_{СОД}$ – активність супероксиддисмутази;

D'= $E_{к\ вих.}$ «0» момент – $E_{дослід}$ 20 хв; D'' = $E_{досл}$ «0» – $E_{досл}$ 20 хв; D' – значення оптичної густини;

29,49 – коефіцієнт перерахунку відсотка інгібування окиснення кверцетину супероксиддисмутазою (при якому утворюється $O_2^{\cdot -}$), який визначений за графіком калібрувальної кривої, побудованого для чистого кристалічного препарату супероксиддисмутази.

Активність супероксиддисмутази виражали в од. акт./ хв мг білка.

2.4.2. Визначення активності каталази

Принцип методу ґрунтується на здатності H_2O_2 утворювати з солями молібдену стійкий забарвлений комплекс. Інтенсивність забарвлення пероксидних сполук молібдену залежить від кількості H_2O_2 в розчині. Каталаза, розкладаючи пероксид водню, зменшує інтенсивність забарвлення в пробі [81].

Реактиви:

- 0,03 % розчин H_2O_2;
- 4 % розчин молібдату амонію;
- 0,5 н H_2SO_4 та 0,25 н H_2SO_4.

Активність КАТ [52] визначали після додавання до 100 мкл гомогенату 2 мл 0,03 % розчину H_2O_2. Через 10 хв реакцію зупиняли внесенням 1 мл 0,25 н H_2SO_4 та 1 мл розчину молібдату амонію. Готували також пусту пробу, яка містила 2 мл H_2O_2 та 1 мл розчину 4 % молібдату амонію, приготованого на 0,025 н H_2SO_4. Через 10 хв у цю пробу вносили 1 мл 0,25 н H_2SO_4 та 100 мкл гомогенату.

Проби осаджували центрифугуванням упродовж 10 хв при 10 000 об./хв. Інтенсивність забарвлення проб, основою якого є кількість утвореного комплексу H_2O_2 з молібдатом амонію, визначали спектрофотометрично за довжини хвилі 410 нм.

Активність каталази розраховували за формулою:

$$A_{KAT} = \frac{\Delta E \cdot V \cdot n}{\varepsilon \cdot C \cdot t \cdot \alpha \cdot l},$$

де A_{KAT} – активність каталази; ΔE – різниця екстинкції холостої та дослідної проб; V –об’єм реакційної суміші в кюветі; n – розведення вихідного екстракту; ε – молярний коефіцієнт екстинкції комплексу H_2O_2 з молібдатом амонію рівний 22200 $M^{-1} \cdot см^{-1}$, в розрахунках використовували значення

мілімолярного коєфіцієнта екстинкції 22,2 $см^2$/мкмоль; С – концентрація білка, мг/мл; t – час реакції (10 хв); α – об'єм зразка, мл; *l* – довжина оптичного шляху.

Отримані результати виражали в нмоль H_2O_2/хв · мг білка.

2.4.3. Визначення активності глутатіонпероксидази

Мірою активності ферменту глутатіонпероксидази є швидкість окиснення глутатіону за наявності гідропероксиду третинного бутилу. Концентрацію відновленого глутатіону до і після інкубації визначають колориметрично. В основі розвитку кольорової реакції лежить взаємодія SH-груп із ДТНБК (5,5'-дитіобіс-2-нітробензойної кислота) та утворення забарвленого продукту – тіонітрофенільного аніона. Його кількість прямо пропорційна кількості SH-груп, які прореагували з ДТНБК [81].

Реактиви:

- Трис-HCl буфер 0,1 М (pH 8,5).
- Трис-HCl буфер 0,1 М (pH 8,5), який містить 6 мМ ЕДТА та 12 мМ азид натрію. Безпосередньо перед аналізом на цьому буфері готують 4,8 мМ розчину відновленого глутатіону.
- Гідропероксид третинного бутилу 20 мМ (готують перед аналізом, розводячи вихідний реактив у 500 разів).
- ТХО (20 %).
- Реактив Елмана – 0,01 М (3,96 $г·л^{-1}$) ДТНБК на метанолі.

Для визначення активності ГПО 100 мкл гомогенату інкубували при 37 °С протягом 10 хвилин з 830 мкл 0,1 М буферу трис-HCl (pH 8,5), який містив 6 мМ ЕДТА, 12 мМ азиду натрію (NaN_3) і 4,8 мМ G–SH. Після цього до проб додавали 70 мкл 20 мМ гідропероксиду трет-бутилу та інкубували протягом 5 хв. Реакцію зупиняли внесенням 20 % розчину ТХО. Проби центрифугували при 8 000 об./хв. До 100 мкл супернатанту додавали аналогічний об'єм реактиву Елмана та 2 мл 0,1 М буферу трис-HCl (pH 8,5), все

інкубували 5 хв, після чого вимірювали світлопропускання при λ=412 нм [77].

Контрольну пробу отримували шляхом додаванням всіх компонентів, але депротеїнізацію проводили без преінкубації гомогенату з трис-HCl буфером.

Із урахуванням розведення біологічного матеріалу в даній методиці і коефіцієнта молярної екстинції тіонітрофенольного аніону при 412 нм – 11400, розраховували активність ГПО в мкМ використаного в реакції субстрату за формулою [77]:

$$A_{ГПО} = \frac{\Delta E \cdot a \cdot b}{\varepsilon \cdot V_{\text{гомогенату}} \cdot \mathrm{V}_{\text{super}} \cdot C \cdot t \cdot l},$$

де $A_{ГПО}$ – активність глутатіонпероксидази; ΔE – різниця екстинції за час реакції; α – об'єм трис-HCl буфера, гідропероксид трет-бутилу, розчину ТХО; b – об'єм супернатанту, трис-HCl буфера та реактиву Елмана; ε – молярний коефіцієнт екстинкції тіонінтрофенільного аніона, дорівнює 11400 $М^{-1}\cdot см^{-1}$, у розрахунках використовували мілімолярний коефіцієнт екстинкції, виражений як 11,4 $см^2$/мкмоль; $V_{гомогенату}$ – об'єм зразка (100 мкл); V_{super} – об'єм супернатанту (20 мкл); C – концентрація білка, мг/мл; t – час реакції; l – довжина оптичного шляху (1 см).

Отримані результати виражали в мкмоль G–SH/хв·мг білка.

2.4.4. Визначення активності глутатіон-S-трансферази

Активність ГТ визначали за швидкістю утворення глутатіон-S-кон'югатів між відновленим глутатіоном і 1-хлор-2,4-динітробензолом (ХДНБ) [151]. Кількість білка у кожній пробі визначали за методом Лоурі [168].

Реактиви:

- 0,1 М К, Na-фосфатний буфер, pH=6,5;
- 5 % NaOH;

- 0,015 М розчин GSH;
- 0,015 М розчин ХДНБ.

Для визначення активності ГТ до 0,1 мл гомогенату додавали 2,5 мл 0,1М калій-фосфатного буферу та 0,2 мл 0,015М розчину відновленого глутатіону. Реакцію ініціювали внесенням в спектрофотометричну кювету 0,2 мл 0,015М розчину ХДНБ. Контрольна проба містила 2,5 мл 0,1М калій-фосфатного буферу та 0,2 мл 0,015М розчину відновленого глутатіону.

Збільшення концентрації кон'югатів в ході реакції реєстрували спектрофотометрично за довжини хвилі 340 нм (максимум поглинання глутатіон-S- ХДНБ) при t=25°C щосекундно на протязі 1,5 хв.

Активність ферменту виражали в ммоль утворених глутатіон-S-кон'югатів в хвилину на мг білка. Активність ГТ розраховували за формулою:

$$A_{ГST} = \frac{\Delta D / T \cdot V_{р.с.} \cdot X}{\varepsilon \cdot V_{проби} \cdot C \cdot l}$$ [ммоль·хв$^{-1}$ / мг білка],

де $A_{ГST}$ – активність глутатіонтрансферази; ε – молярний коефіцієнт екстинкції для глутатіон-S- ХДНБ при довжині хвилі 340 нм рівний 9,6 мМ$^{-1}$ • см$^{-1}$, у розрахунках використовували мілімолярний коефіцієнт екстинкції, виражений як 9,6 см^2/мкмоль; $V_{р.с.}$ – об'єм реакційної суміші в кюветі (3 мл); $V_{проби}$ – об'єм проби, що використовували для визначення активності ГТ; T – час реакції (1,5 хв); C – концентрація білка, мг/мл; l – довжина оптичного шляху (1 см); X – розведення гомогенату, який використовували в реакційній суміші; ΔD – зміна оптичної густини (різниця оптичної густини в початковий і кінцевий момент часу).

2.5. Визначення концентрації протеїну за методом Лоурі

Концентрацію білка визначали згідно зі загальноприйнятим методом

Лоурі, що ґрунтується на визначенні інтенсивності забарвлення, яке дає розчин білка в кольорових реакціях – біуретовій і реакції Фоліна [168]. Результат виражали у мкг протеїну на 1 мкл.

2.6. Методика дослідження активності Na^+, K^+-АТФази мембран зародків в'юна

Активність Na^+, K^+-активованої, Mg^{2+}-залежної АТФази зародкових мембран в'юна визначали за різницею активностей у пробах за відсутності оубаїна та при його додаванні.

Реактиви:

- 3 мМ розчин АТФ – Na_2 на 50 мМ буфері трис-HCI (pH 7,4);
- 0,1 мМ розчин оубаїну на 50 мМ буфері трис-HCI (pH 7,4);
- 10 % ТХО;
- ацетатний буфер (pH 4,5) – 1 М CH_3COONa + CH_3COOH;
- 2 %-ий $(NH_4)_2MoO_4$ в 0,05 н H_2SO_4 і 0,001 н $CuSO_4$;
- 2 % аскорбінова кислота;
- стандартний розчин KH_2PO_4 (20 мкг P_i в 1 мл).

Зародки в'юна на різних стадіях розвитку гомогенізували за допомогою гомогенізатора Поттера-Ельвенгейма. Для відділення залишків зародкового жовтка, одержаний гомогенат центрифугували 15 хв при 1600 g. Одержані зразки розводили так, щоб в 0,1 мл проби вміст білка не перевищував 100–250 мкг. Перед початком експерименту аліквоти суспензії мембранного препарату переносили в стандартне середовище інкубації наступного складу (мМ): NaCl – 50,0; KCl –100,0; $MgCl_2$ – 3,0; ЕГТА – 1,0; трис-HCl – 50,0 (pH 7,4; t=23°C). У пробірку вносили по 0,1 мл однієї і тієї ж проби, АТФ-гідролазну реакцію ініціювали додаванням 0,1 мл 3 мМ АТФ і доводили до 1 мл інкубаційним середовищем. В одну з контрольних пробірок додавали 0,1 мл 0,1 мМ розчину оуабаїну.

Для визначення Na^+, K^+-АТФазної активності супернатант інкубували при 23 °С 15 хв. Для припинення гідролізу й осадження білка в пробірки додавали 10 % ТХО (у співвідношенні 1:1). Для нейтралізації ТХО (pH 3,9–4,0) вносили 1,5 мл ацетатного буфера; потім додавали 0,2 мл 2 % молібдату амонію і 0,2 мл 2 % свіжоприготовленої аскорбінової кислоти. Проби перемішували і залишали за кімнатної температури на 20 хв до утворення забарвлення. Величину екстинкції визначали на спектрофотометрі за довжини хвилі 700 нм. Вміст неорганічного фосфору (P_i) в зразку визначали по калібрувальній кривій за величиною екстинкції. Питому активність АТФази мембран зародкових клітин виражали в мкмоль P_i у перерахунку за год на 1 мг білка, розраховували за формулою [72]:

$$A = \frac{6P_i}{aM},$$

де P_i – вміст фосфору в пробі, знайдений по кривій; α – вміст білка в пробі; М – молекулярна маса фосфору.

2.7. Електронно-мікроскопічне дослідження зародків в'юна

Реактиви:

- 1,5 % розчином глютарового альдегід;
- 0,2 М какодилатний буфер (pH 7,2);
- 2 %-ий розчин чотирьохокису осмію;
- 50º, 70º, 90º і 100 º етиловий спирт;
- окис пропілену;
- епоксидна смола епон-812;
- 2%-ий розчин ураніл ацетату;
- цитрат свинцю.

Зародки в'юна на стадіях 2 бластомерів, 64 бластомерів і 10 поділу (1024 бластомери) фіксували 1,5 % розчином глютарового альдегіду в 0,2 М какодилатному буфері (pH 7,2) при t = 4°C, протягом 1 год. Зразки промивали какодилатним буфером і додатково фіксували 2 %-м розчином чотирьохокису осмію в тому ж буфері протягом 1 год (t = 4°C). Препарати відмивали від фіксаторів і обезводнювали в зростаючих концентраціях етилового спирту (50 %, 70 %, 90 % і 100 %). Додатково обезводнювали в 2-х змінах окису пропілену і поміщали в епоксидну смолу епон-812 [27].

Зрізи отримували за допомогою ультрамікротома УМТП-6, використовуючи алмазний ніж, контрастували 2%-ним розчином уранілацетату протягом 15 хв і додатково цитратом свинцю за Рейнольдсом [73].

Зрізи переглядали і фотографували за допомогою електронного трансмісійного мікроскопа ПЕМ-100.

2.8. Дисперсійний аналіз досліджуваних показників

Дисперсійний аналіз дозволяє оцінити відмінності між вибірковими середніми для довільної кількості вибірок.

Суть методу полягає у розкладі дисперсій однієї або кількох змінних на складові, та оцінювання за допомогою F-критерія внеску цих складових до загальної варіації даних. Будь який вплив, що вивчається у дисперсійному аналізі є фактором. Якщо таких факторів два, то застосовують двофакторний дисперсійний аналіз. В основу дисперсійного аналізу покладено лінійну модель, відповідно до якої значення кожного елемента вибірки складається з вибіркового середнього (математично очікуваного), відхилення від вибіркового середнього для даної градації фактора та «похибки» лінійної моделі, тобто внеску унікальності конкретного елемента: $X_{ij} = M_{виб} + (M_j - M_{виб}) + e_{ij}$. $M_{виб}$ – математичне очікування генеральної сукупності (його оцінкою є вибіркове середнє), M_j – середнє у групі, що відповідає j-тій градації фактора, e_{ij} – «похибка» лінійної моделі, тобто внесок окремого елемента вибірки.

Основна гіпотеза дисперсійного аналізу стверджує, що всі вибірки сформовано з однієї генеральної сукупності, тобто їхні середні однакові.

Дисперсійний аналіз базується на припущеннях про те, що: 1) значення ознак, що відповідають кожному рівню контрольованого фактора, нормально розподілені навколо свого середнього; 2) дисперсії вибіркових розподілів, що відповідають кожному рівню контрольованого фактора, однорідні; 3) отримані спостереження незалежні. Проте дослідження показали, що дисперсійний аналіз мало чутливий до порушення нормальності та при великих обсягах вибірок майже однакового розміру є також стійким до неоднорідності дисперсій.

Для двофакторної моделі формується три пари гіпотез: про вплив першого фактора, другого фактора та їхню взаємодію. Розрахункові формули компонентів дисперсії для двофакторної моделі подано у таблиці (табл. 2.1).

Таблиця 2.1.

Розрахункові формули компонентів дисперсії для двофакторної моделі

Компоненти дисперсії	Суми квадратів	Степені вільності	Дисперсії	F
По рядках (фактор А)	$Q_a = b \cdot n \cdot \sum_{i=1}^{a} (\overline{X}_{i**} - \overline{X})^2$	a–1	$S_a^2 = \frac{Q_a}{a-1}$	$\frac{S_a^2}{S_z^2}$
По стовпцях (фактор В)	$Q_b = a \cdot n \cdot \sum_{j=1}^{b} (\overline{X}_{*j*} - \overline{X})^2$	b–1	$S_b^2 = \frac{Q_b}{b-1}$	$\frac{S_b^2}{S_z^2}$
Взаємодія	$Q_{ab} = n \cdot \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b} (\overline{X}_{ij*} - \overline{X}_{i**} - \overline{X}_{*j*} + \overline{X})^2$	(a–1)·(b–1)	$S_{ab}^2 = \frac{Q_{ab}}{(a-1)(b-1)}$	$\frac{S_{ab}^2}{S_z^2}$
Залишкова	$Q_z = \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b}\sum_{k=1}^{n} (X_{ijk} - \overline{X}_{ij*})^2$	a·b·(n–1)	$S_z^2 = \frac{Q_z}{a \cdot b \cdot (n-1)}$	
Загальна (Total)	$Q_{total} = \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b}\sum_{k=1}^{n} (X_{ijk} - \overline{X})^2$	a·b·n–1	$S_{total}^2 = \frac{Q_{total}}{a \cdot b \cdot n - 1}$	

Лінійна модель двофакторного аналізу є розширенням однофакторної моделі:

$$X_{ijg} = M_{виб} + (M_j - M_{виб}) + (M_g - M_{виб}) + a_{jg} + e_{ijg}.$$

$M_{виб}$ – математичне очікування генеральної сукупності (або його оцінка – вибіркове середнє), M_j – середнє у групі, що відповідає j-тій градації першого фактора, M_g – середнє у групі, що відповідає g-тій градації другого фактора, a_{jg} – вплив міжфакторної взаємодії, e_{ijg} – «похибка» лінійної моделі, тобто внесок окремого елемента вибірки [62].

Двофакторний дисперсійний аналіз виконували засобами Microsoft Excel-2007, обравши, з пакету аналізу, функцію Anova: Two-Factor Without Replication.

2.9. Кластерний аналіз експериментально отриманих показників

Кластерний аналіз є методом пошуку закономірностей групування як об’єктів дослідження, так і ознак в окремі локальні підмножини (кластери). За допомогою кластерного аналізу можна проводити групування об’єктів дослідження в кластери, групування ознак в кластери, виконувати одночасне групування об’єктів дослідження і ознак.

Групування ознак в кластери застосовується на досить однорідній (відносно спостережень, або об’єктів дослідження) вибірці з метою пошуку невідомих закономірностей зв’язку ознак (або груп ознак). Результатом може бути формування декількох груп ознак, в кожній із яких містяться ознаки, які виявили статистично значимі взаємозв’язки.

У кластерному аналізі потрібно провести п’ять таких кроків: 1) відбір вибірки для кластеризації; 2) визначення множини ознак, за якими будуть оцінюватися об’єкти у вибірці, і способу їх стандартизації; 3) обрахунок значень тої чи іншої міри подібності між об’єктами; 4) застосування методу кластерного аналізу для створення груп подібних об’єктів; 5) перевірка достовірності результатів кластерного аналізу.

Алгоритмом кластеризації є ієрархічна кластеризація при якій кожне спостереження утворює спочатку свій окремий кластер, який складається з одного об’єкту. На першому кроці два сусідні кластери об’єднуються в один; цей процес може продовжуватися до тих пір, поки не залишаться тільки два кластери. Відстань між кластерами є середнім значенням всіх відстаней між усіма можливими парами точок із обох кластерів.

Для визначення оптимальної кількості кластерів вирішальне значення має відстань між двома кластерами, визначене на основі вибраної дистанційної міри з урахуванням передбачуваного перетворення значень. Для метричних (біологічних) даних це квадрат відстані Евкліда, визначений з використанням стандартизованих значень. На етапі, коли міра відстані між двома кластерами збільшується стрибкоподібно, процес об’єднання в нові кластери необхідно зупинити. Оптимальним є кількість кластерів, яке дорівнює різниці кількості спостережень і кількості кроків, після якого коефіцієнт збільшується стрибкоподібно [74].

Кластерний аналіз проводили, використовуючи пакет прикладних програм SPSS (Statistics17). Об'єднували у кластери досліджувані групи за ознаками (ГП, ТБК-активні продукти, СОД, КАТ, ГПО, ГТ). В кожному кластері обчислювали M, m відповідно до кожної досліджуваної ознаки.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

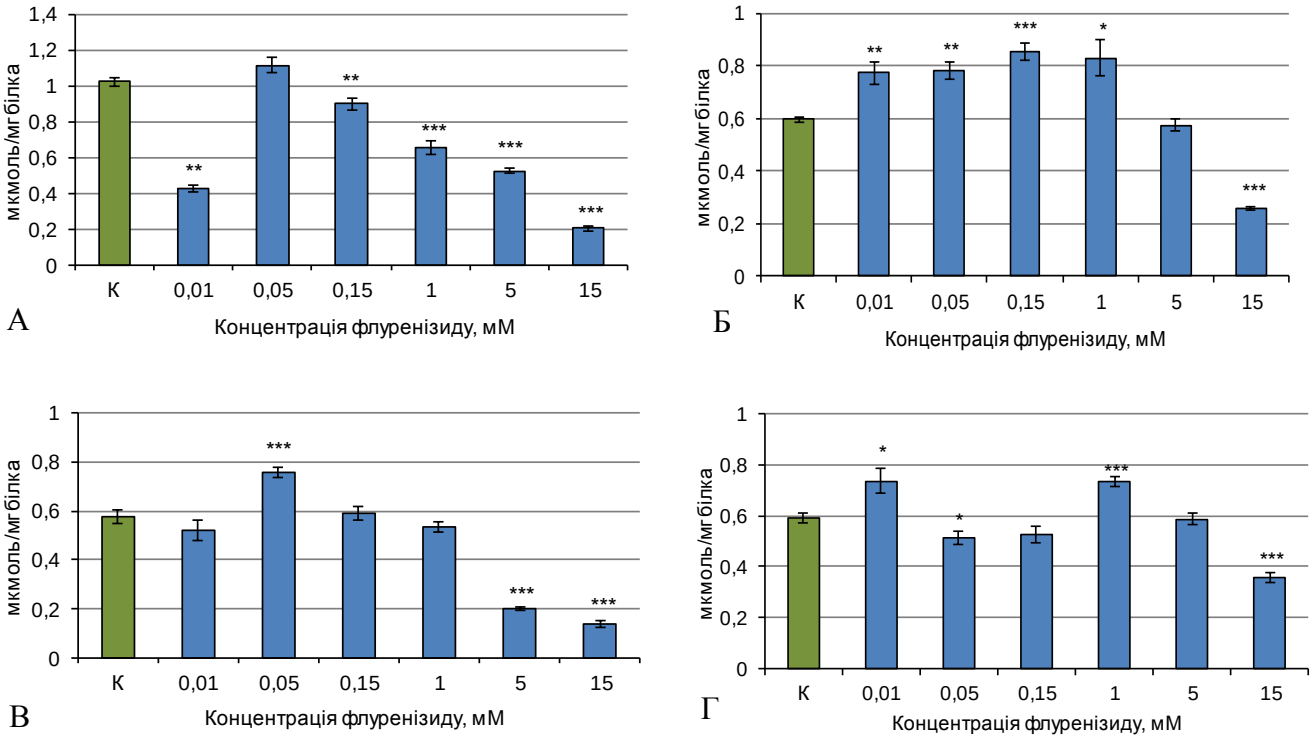
3.1. Зміни інтенсивності процесів пероксидного окиснення ліпідів на різних етапах розвитку зародків в'юна за впливу флуренізиду *in vitro*

Рівновага окисно-відновних процесів є основою нормального функціонування клітини. Вільнорадикальні процеси, зокрема ПОЛ, є одним із універсальних механізмів пошкодження біологічних мембран як в нормі, так і за умов будь-якої патології [122, 57]. Ці процеси виступають фактором, що змінює структурну модифікацію та функції ліпідів, їхні властивості та транспорт речовин [33].

Відомо, що через 1,5 години після запліднення яйцеклітин в'юна зростають вільнорадикальні процеси, що відображається у збільшенні вмісту МДА [29, 105]. Вважають, що це пов'язано з інтенсивним поділом бластомерів і мембраногенезом. Наступний пік зростання інтенсивності процесів ліпопероксидації припадає на 6-ту годину розвитку (1024 бластомери), що пов'язано з десинхронізацією поділів зародкових клітин в'юна [29, 105].

Важливим є визначення інтенсивності пероксидного окиснення як показника стану ліпідів, який впливає на активність мембранозв'язаних ферментів, швидкість проліферації клітин і транспортні властивості мембран [127, 71]. Активацію процесів вільнорадикального окиснення ліпідів можна вважати однією з ключових ланок між стресовим впливом і реалізацією захисних реакцій організму [29].

Дослідження вмісту продуктів ПОЛ, за впливу флуренізиду, розширить уявлення про динамічний перебіг вільнорадикальних процесів у зародкових клітинах, протягом раннього розвитку. Тому вивчення процесів ліпопероксидації зародків в'юна, за впливу флуренізиду, було одним з етапів нашого дослідження.



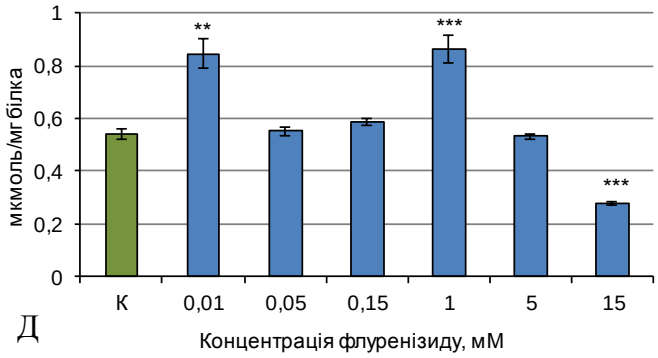


Рис. 3.1. Вміст ТБК-позитивних продуктів у зародках в'юна *in vitro* на етапах розвитку 2, 16, 64, 256, 1024 (А, Б, В, Г, Д, відповідно) бластомерів в контролі (К) та за дії флуренізиду в діапазоні концентрацій 0,01÷15 мМ (* – $p \geq 0,95$; ** – $p \geq 0,99$; *** – $p \geq 0,999$)

Встановлено, що в дослідах *in vitro* флуренізид зумовлює порушення утворення ТБК-позитивних продуктів. Так, на етапі розвитку 2 бластомерів виявлено зниження вмісту вторинних продуктів ліпопероксидації, за дії флуренізиду всіх концентрацій, крім 0,05 мМ (рис. 3.1). На етапі розвитку 16 бластомерів встановлено протилежний ефект за впливу досліджуваної сполуки у діапазоні концентрацій 0,01÷1 мМ [16]. Флуренізид у концентрації 0,05 мМ веде до підвищення вмісту ТБК-позитивних продуктів на 32% на етапі розвитку зародкових клітин 64 бластомери, тоді як субстанція у концентрації 5 мМ зумовлює зниження їхнього вмісту на 65%. Як на етапі розвитку 256 бластомерів, так і на етапі 1024 бластомери, вміст вторинних продуктів

ліпопероксидації зростає за впливу флуренізиду у концентраціях 0,01 та 1 мМ на 24% і 56%, відповідно. Нами встановлено, що субстанція у концентрації 0,05 мМ на етапі розвитку зародків в'юна 256 бластомерів веде до достовірного зниження вмісту ТБК-позитивних продуктів на 13% порівняно з контролем.

Важливо зазначити, що флуренізид у концентрації 15 мМ, спричиняє пониження інтенсивності процесів ПОЛ, на всіх етапах розвитку зародків в'юна, що свідчить про сповільнення обмінних процесів у них (рис. 3.1).

3.2. Зміни активності Na^+, K^+-АТФази на різних етапах розвитку зародків в'юна за впливу флуренізиду *in vitro*

Згідно з даними літератури, для Na^+, K^+-помпи характерний складний механізм регуляції її ферментативної активності, який в більшості випадків *in vivo* відбувається на рівні біосинтезу, тобто підвищення інтенсивності експресії молекул ферменту з пропорційним їх вмонтуванням у плазматичну мембрану (ПМ) клітин. Показано, що Na^+, K^+-АТФазна активність базолатеральних клітин нирок щурів [69] та проксимальних канальців людини [102] інгібується аміноглікозидними антибіотиками, полієнові антибіотики інактивують Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}-АТФази ПМ еритроцитів [29, 87] та мікросомальної фракції нирок собак [146], антибіотики фторхінолонового ряду інгібують Na^+, K^+-АТФазу зародків в'юна протягом раннього ембріогенезу [182, 185, 29, 69,], природні токсини та полі міксин В інгібують Na^+, K^+-АТФазу мембран синаптосом [185]. Проте вплив антибіотиків майже не досліджувався з використанням зародкових об'єктів, що може бути прогностичним показником для подальшого використання препаратів. Враховуючи це, для з'ясування механізмів впливу флуренізиду на еукаріотичні клітини, доцільно провести дослідження впливу фторхінолонів на функціонування Na^+, K^+-помпи зародків в'юна на різних стадіях раннього розвитку.

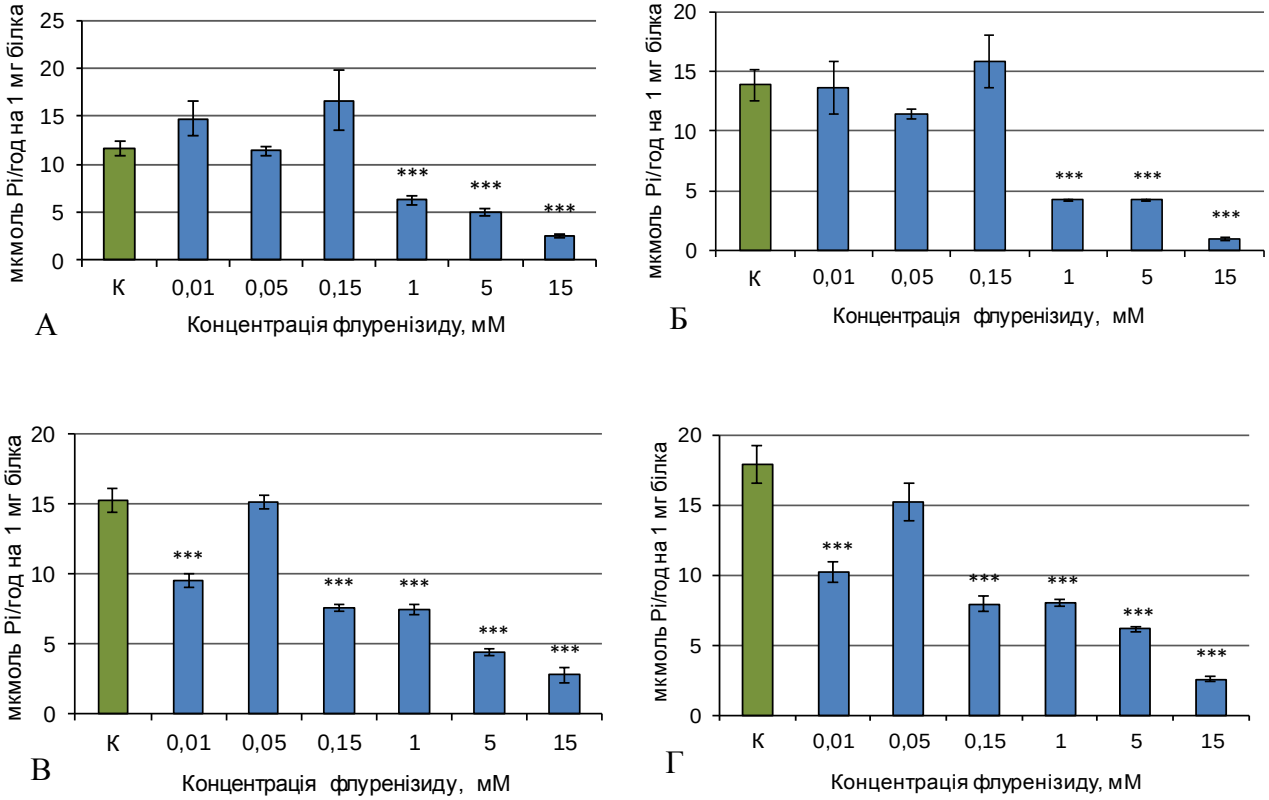
Результати вивчення роботи Na^+, K^+-активованої, Mg^{2+}-залежної АТФази, за впливу флуренізиду та в контролі представлені у вигляді діаграм (рис. 3.2.),

які відображають значення її активності (у мкмоль P_i/год на 1 мг білка) на різних стадіях розвитку зародків протягом періоду дроблення бластомерів в'юна.

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 [20].

На стадії першого поділу (2 бластомери, 60 хв, рис. 3.2) оуабаїнчутлива АТФазна активність мембран зародків в'юна, за дії флуренізиду у концентраціях 0,01÷0,15 мМ, змінюється недостовірно. При збільшенні концентрації антибіотика у середовищі інкубації в діапазоні концентрацій 1÷15 мМ спостерігається дозозалежне пригнічення активності Na^+,K^+-АТФази. Максимальне пригнічення АТФазної активності зародків спостерігається за дії 15 мМ флуренізиду. У цьому випадку значення активності ферменту становить 2,49±0,19 мкмоль P_i/год на 1 мг білка, що відповідає зниженню активності ферменту на 78,52±6,02 %, порівняно з контролем.

При вивченні активності Na^+, K^+-АТФази нами встановлено, що 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 флуренізид у високих концентраціях (1÷15 мМ) веде до спадання активності цього ензиму. Акивність Na^+, K^+-АТФази спадає за дії флуренізиду в усіх досліджуваних концентраціях, крім 0,05 мМ, на етапах розвитку 64, 256 та 1024 бластомерів, що свідчить про порушення іонного гомеостазу в зародках. Найбільш інтенсивне спадання відмічено за концентрації флуренізиду 15 мМ [15].



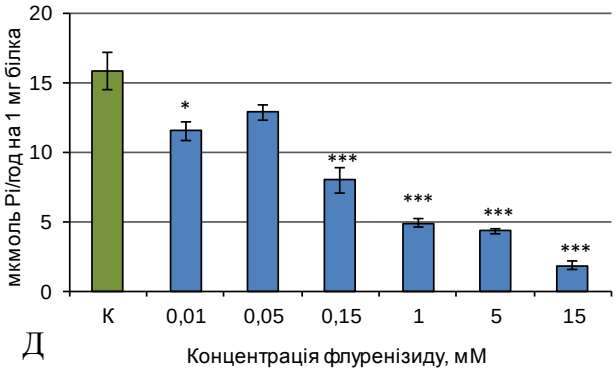


Рис. 3.2. Зміни активності Na^+, K^+-АТФази у зародках в'юна *in vitro* на етапах розвитку 2, 16, 64, 256, 1024 (А, Б, В, Г, Д, відповідно) бластомерів у контролі (К) та за дії флуренізиду в діапазоні концентрацій 0,01÷15 мМ (* – $p \geq 0,95$; *** – $p \geq 0,999$)

Спостерігається цікавий факт зниження активності Na^+, K^+-АТФази на стадіях 64, 256, 1024 бластомери за дії флуренізиду у найнижчій концентрації (0,01 мМ). В той час, як за дії флуренізиду у концентрації 0,05 мМ достовірних змін активності Na^+, K^+-АТФази не виявлено. Це може бути пов'язано із зміною інтенсивності процесів ліпопероксидації у мембранах зародків, що узгоджується з попередніми нашими дослідженнями (рис. 3.1; 3.2).

Відомо, що зміна ліпідного мікрооточення, внаслідок процесів пероксидного окиснення ліпідів, може впливати на активність мембранозв'язаних ферментів [127, 130, 161]. Відомо, що Na^+, K^+-АТФаза є

чутливою до АФО і безпосередньо бере участь в оксидативному стресі [161]. Низкою досліджень встановлено, що фермент характеризується різною чутливістю до окисників: АТФаза є стійкою до дії супероксид-аніона, відносно стійкою до пероксиду гідрогену, але дуже чутливою до гідроксильного радикала [130, 161]. Отже, зниження активності Na^+, K^+-АТФази у зародках в'юна, у дослідах *in vitro*, пов'язана із порушенням інтенсивності процесів ліпопероксидації за впливу флуренізиду.

3.3. Морфологічні зміни у зародках в'юна впродовж ембріогенезу за дії флуренізиду

Дослідження впливу різноманітних хімічних сполук на живі організми, зокрема на розвиток зародків, є важливим, оскільки відомо, що ультраструктурні зміни, впродовж раннього ембріогенезу та морфофункціональні відхилення у розвитку личинок, призводять до порушення функціонування дорослого організму, а це дає змогу виявити ступінь шкідливості даної речовини.

Незважаючи на досягнуті успіхи щодо застосування флуренізиду, з терапевтичною метою, залишається невідомою його дія на здорові клітини. Отже, дослідження впливу флуренізиду на морфофункціональний стан зародкових клітин в'юна є важливим питанням.

Проведений нами тест на виживання зародків в'юна за інкубації у середовищі з флуренізидом дозволив встановити дозозалежне пониження їхньої життєздатності порівняно з контролем (табл. 3.1). Виявлено, що на першу добу розвитку відсоток виживання зародків в'юна знижується приблизно в два рази, за впливу флуренізиду в концентраціях 0,01; 0,05; 0,15 мМ (табл. 3.1). Пониження виживання зародкових об'єктів в'юна за впливу досліджуваного чинника, виявлена на другу добу досліду (0,01 та 0,05 мМ – в 3 рази, 0,15 мМ – в 5 разів, порівняно з контролем). За впливу флуренізиду, у низьких концентраціях відсоток передличинок, що вижили знижується на третю добу

його дії в 6 разів (в концентраціях 0,01 і 0,15 мМ) та в 12 разів – за дії антибіотика в концентрації 0,05 мМ [13]. Відсоток виживання передличинок спадає в 16 разів, за дії антибіотика у найнижчій досліджуваній концентрації (0,01 мМ) на 4 добу, а вже до 5 доби передличинки в'юнів гинуть. Досліджувані зародки, в середовищі з флуренізидом, у концентраціях 0,05 та 0,15 мМ, вже після третьої доби розвитку помирають. Потрібно відмітити, що антибіотик у концентрації 1 мМ, на першу добу розвитку, веде до пониження відсотка живих особин в 13 разів, тоді як на 2 добу – в 62 рази. Після другої доби живих особин не було виявлено за впливу флуренізиду в концентрації 1 мМ. Слід наголосити, що зародки в'юна не доживають і до завершення першої доби за дії антибіотика у концентраціях 5 та 15 мМ. Тест на виживання в контрольній групі зародків узгоджується з даними літератури [41]. Потрібно зазначити, що у контролі личинки доживали до 10 доби розвитку.

Отже, за тестом на виживання можна зробити висновок, що флуренізид у концентраціях 1; 5; 15 мМ зумовлює високу смертність зародків в'юна вже на першу добу його дії, що свідчить про значний його шкідливий вплив. Відомо, що флуренізид здатний проникати через клітинні мембрани, проходити в ядро і діяти на процеси життєдіяльності клітин через вплив на ДНК [94], що пояснює негативну дозозалежну дію цього антибіотика на життєздатність зародкових об'єктів.

Таблиця 3.1.

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

Морфологічний аналіз засвідчив, що флуренізид, у концентраціях 0,01; 0,05 та 0,15 мМ, веде до сповільнення розвитку зародкових клітин. Виявлено нечіткі контури бластомерів на 10 поділі розвитку зародків, що свідчить про порушення структури клітинних мембран (рис. 3.3). Флуренізид в концентрації 0,15 мМ у поодиноких випадках зумовлює надмірний поділ клітин, який виявлений на етапі десятого поділу (рис. 3.3). Це підтверджує здатність досліджуваного антибіотика впливати на ДНК у зародках. Відомо, що на етапі 10 поділу бластомерів падає мітотичний індекс і зростає морфогенетична активність ядер, а також відбувається десинхронізація поділу зародкових клітин [41].

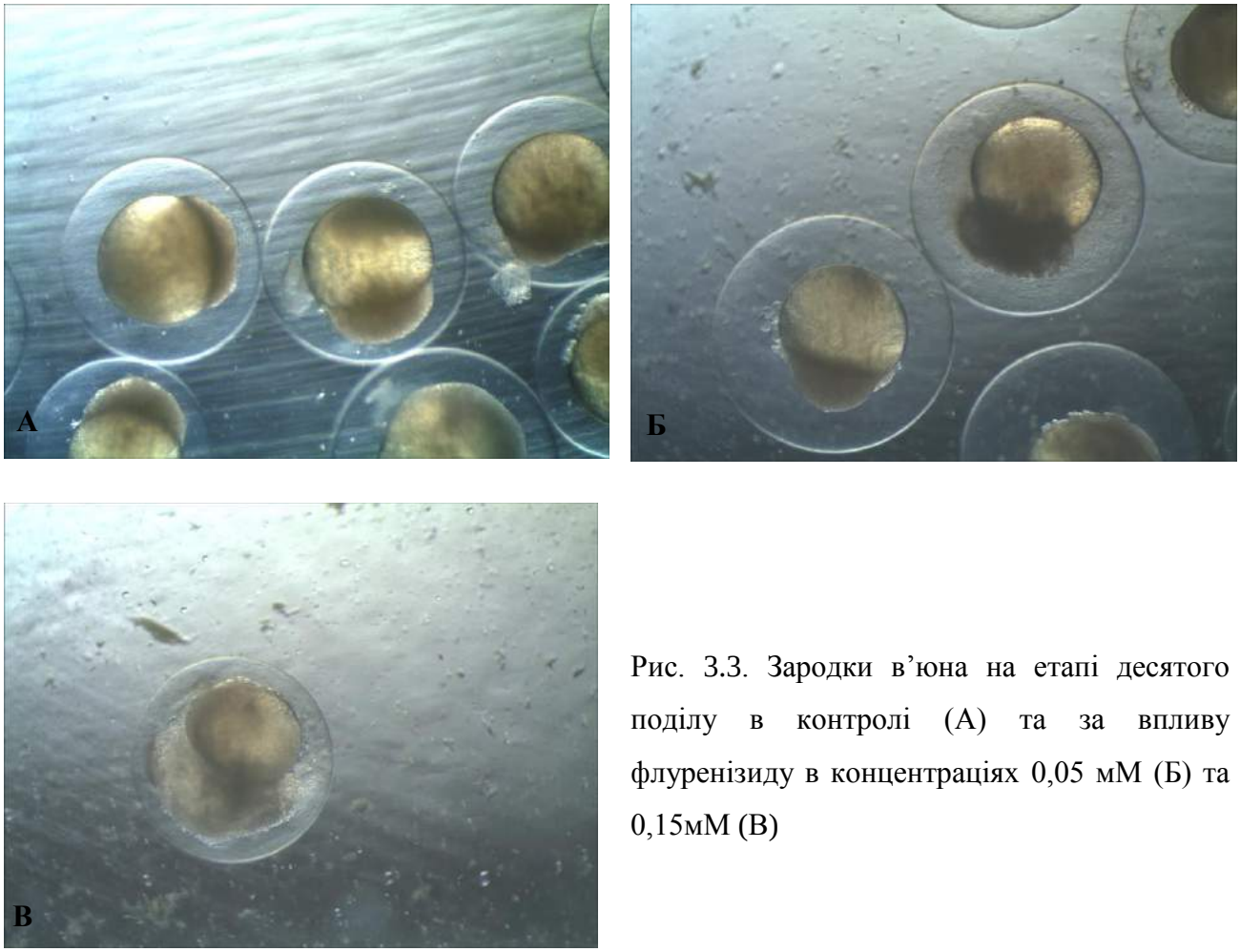


Рис. 3.3. Зародки в'юна на етапі десятого поділу в контролі (А) та за впливу флуренізиду в концентраціях 0,05 мМ (Б) та 0,15мМ (В)

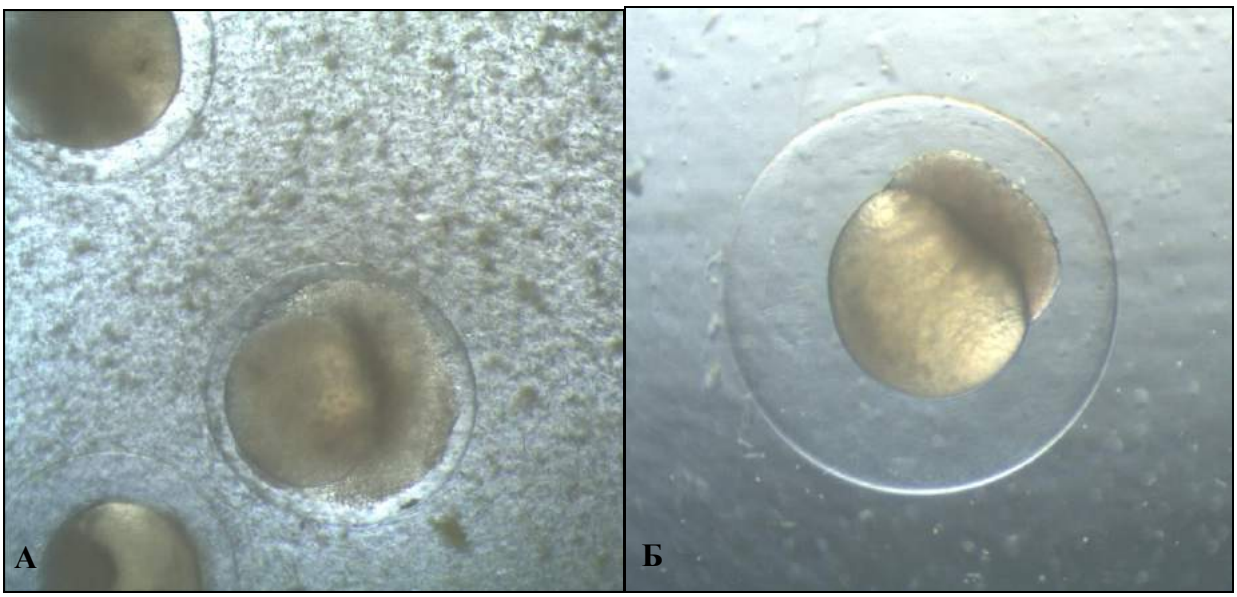


Рис. 3.4. Зародки в'юна на етапі восьмого поділу за впливу флуренізиду в концентрації 5 мМ (А) та в контролі (Б)

Необмежене збільшення кількості клітин нами встановлено і за дії флуренізиду в концентраціях 5 та 15 мМ, вже на етапі восьмого поділу (рис. 3.4). Потрібно зазначити, що флуренізид у концентраціях 1; 5; 15 мМ призводить до більш вираженого сповільнення процесів розвитку зародків, порівняно з антибіотиком у нижчих досліджуваних концентраціях.

3.4. Вплив флуренізиду на інтенсивність процесів ліпопероксидації зародків в'юна впродовж ембріогенезу

Вміст гідропероксидів ліпідів та ТБК-позитивних продуктів є важливим показником інтенсивності процесів ліпопероксидації. Кількість цих сполук свідчить про ступінь впливу різних факторів на організм та його адаптаційну здатність [95, 96, 98].

У результаті досліджень встановлено, що за дії флуренізиду в зародках в'юна порушується вміст продуктів ліпопероксидації. Так, на стадії 2 бластомерів відбувається зниження кількості ГП, за дії флуренізиду в концентраціях 0,01; 0,05; 0,15 та 1 мМ на 44, 43, 57 та 83 %, відповідно. Проте

Флуренізид у концентраціях 5 і 15 мМ спричиняє підвищення вмісту ГП у зародках в'юна на досліджуваній стадії на 57 і 32 %, відповідно, що свідчить про зростання вільнорадикальних процесів (рис. 3.5).

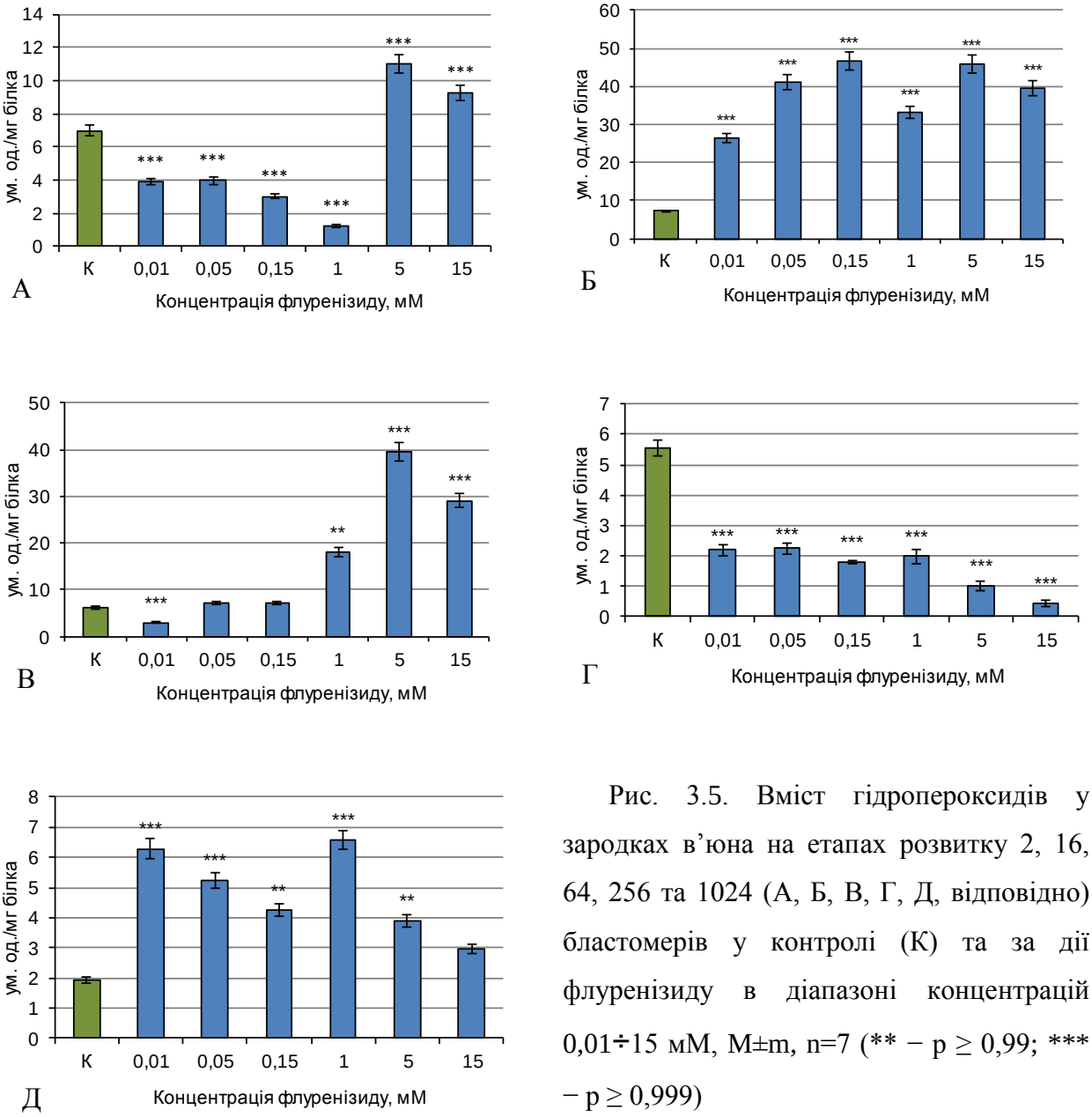


Рис. 3.5. Вміст гідропероксидів у зародках в'юна на етапах розвитку 2, 16, 64, 256 та 1024 (А, Б, В, Г, Д, відповідно) бластомерів у контролі (К) та за дії флуренізиду в діапазоні концентрацій 0,01÷15 мМ, M±m, n=7 (** – $p \geq 0,99$; *** – $p \geq 0,999$)

Встановлено, що на етапі розвитку 16 бластомерів, за дії флуренізиду в досліджуваних концентраціях, відбувається значне підвищення вмісту первинних продуктів ліпопероксидації (на 265–547 %) (рис. 3.5). Отже, зародки

в'юна на цій стадії розвитку є дуже чутливими до флуренізиду і в їхніх клітинах зростає інтенсивність прооксидантних процесів, що підтверджується даними літератури [40].

На етапі розвитку 64 бластомерів флуренізид, у концентрації 0,01 мМ, зумовлює зниження вмісту ГП на 53 %, у зародках в'юна, тоді як досліджуваний антибіотик у концентраціях 1; 5 і 15 мМ веде до підвищення вмісту ГП на 187, 527 і 363 %, відповідно (рис. 3.5). На етапі розвитку 256 бластомерів зародкових клітин, нами встановлено статистично достовірне зниження вмісту первинних продуктів ліпопероксидації за дії флуренізиду всіх досліджуваних концентрацій із максимальним зниженням на 92 % за концентрації 15 мМ, проте вже на стадії 1024 бластомерів нами встановлено протилежний ефект дії флуренізиду на вміст ГП (їхній вміст підвищується) (рис. 3.5) [12].

Визначення вмісту вторинних продуктів ліпопероксидації дало змогу встановити зростання кількості ТБК-позитивних продуктів у зародках в'юна на всіх досліджуваних етапах розвитку, за впливу флуренізиду в концентраціях 0,05; 0,15 і 1 мМ, на фоні коливання вмісту гідропероксидів (рис. 3.6).

ТБК-позитивні продукти мають вагоме діагностичне значення, оскільки вони є стабільними продуктами процесів ліпопероксидації. Тому можна стверджувати, що флуренізид у концентраціях 0,05; 0,15; 1 мМ спричиняє більш виражений ушкоджувальний ефект на ліпідовмісні структури зародків в'юна.

Підвищення вмісту вторинних продуктів ліпопероксидації нами відмічено у зразках зародків в'юна за впливу флуренізиду в концентрації 0,01 мМ. Антибіотик у концентрації 5 мМ у зародкових клітинах зумовлює зниження вмісту ТБК-позитивних продуктів на першій стадії розвитку, а також на останній досліджуваній стадії розвитку, тоді як на етапі розвитку 16 бластомерів, 64 бластомери і 256 бластомерів вміст вторинних продуктів ліпопероксидації підвищується. Флуренізид у найвищій досліджуваній концентрації (15 мМ) спричиняє зниження вмісту ТБК-позитивних продуктів у

зародкових об’єктах, на всіх досліджуваних стадіях, окрім стадії 64 бластомерів (рис. 3.6).

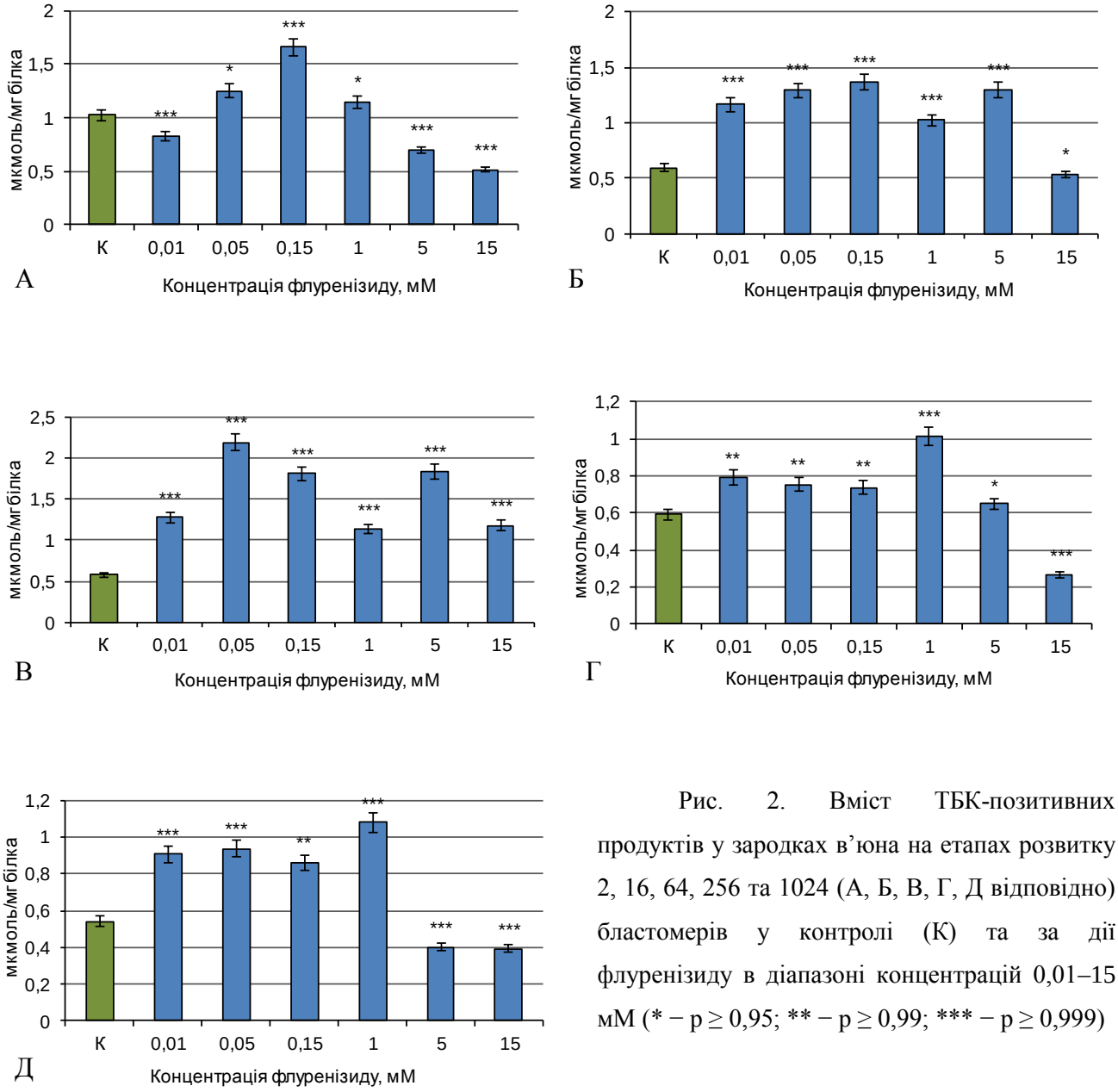


Рис. 2. Вміст ТБК-позитивних продуктів у зародках в’юна на етапах розвитку 2, 16, 64, 256 та 1024 (А, Б, В, Г, Д відповідно) бластомерів у контролі (К) та за дії флуренізиду в діапазоні концентрацій 0,01–15 мМ (* – $p \geq 0,95$; ** – $p \geq 0,99$; *** – $p \geq 0,999$)

Отже, флуренізид в усіх досліджуваних концентраціях (0,01; 0,05; 0,15; 1; 5; 15 мМ) призводить до підвищення вмісту первинних продуктів ліпопероксидації (гідропероксидів), на стадії 16 бластомерів та пониження – на стадії 256 бластомерів. Вміст вторинних продуктів ліпопероксидації (ТБК-

позитивних продуктів) підвищується за впливу антибіотика у концентраціях 0,01÷1 мМ та зменшується при концентрації 15 мМ [11].

3.5. Вплив флуренізиду на активність ключових ензимів системи антиоксидантного захисту зародків в'юна

Відомо, що в організмі на будь-які впливи екзогенного та ендогенного походження реагує система антиоксидантного захисту [80]. За дії різноманітних чинників в клітинах відбуваються зміни, що супроводжуються активацією або пригніченням активності ензимів АОС, що пов'язано із збільшенням концентрації токсичних метаболітів. Накопичення цих сполук призводить до розвитку оксидативного стресу, внаслідок порушення балансу між про-/антиоксидантною системами [80]. За інтенсифікації процесів вільнорадикального окиснення ліпідів відбуваються деструктивні зміни клітинних мембран, а саме: значне збільшення їхньої проникності для різного типу молекул та іонів; зростання в'язкості ліпідного бішару і поява на поверхні мембран надлишку негативно заряджених хімічних груп. Вони спричиняють розлади у функціонуванні багатьох мембранних ензимів, роботі потенціалчутливих іонних каналів та зміщення іонної рівноваги [26, 34, 106]. Важливу роль у захисті організму від ушкоджень, унаслідок ПОЛ, відіграє спеціалізована АОС, яка захищає клітину від активних кисневих метаболітів та інактивує окремі продукти вільнорадикального окиснення [179, 188, 47, 117]. В організмі функціонування АОС забезпечує «стійкість окисного гомеостазу», шляхом регулювання швидкості утворення і елімінації радикальних форм кисню, які генеруються мітохондріями, а також цитохромом Р-450 [7, 24, 97]. Активність системи антиоксидантного захисту може значно лімітувати адаптаційну здатність організму [153]. Відомо, що АОС умовно поділяється на ферментативну і неферментативну ланки. До першої відносять усі антиоксидантні ензими, серед яких СОД, КАТ, ГПО та ГТ [1, 7, 68, 106].

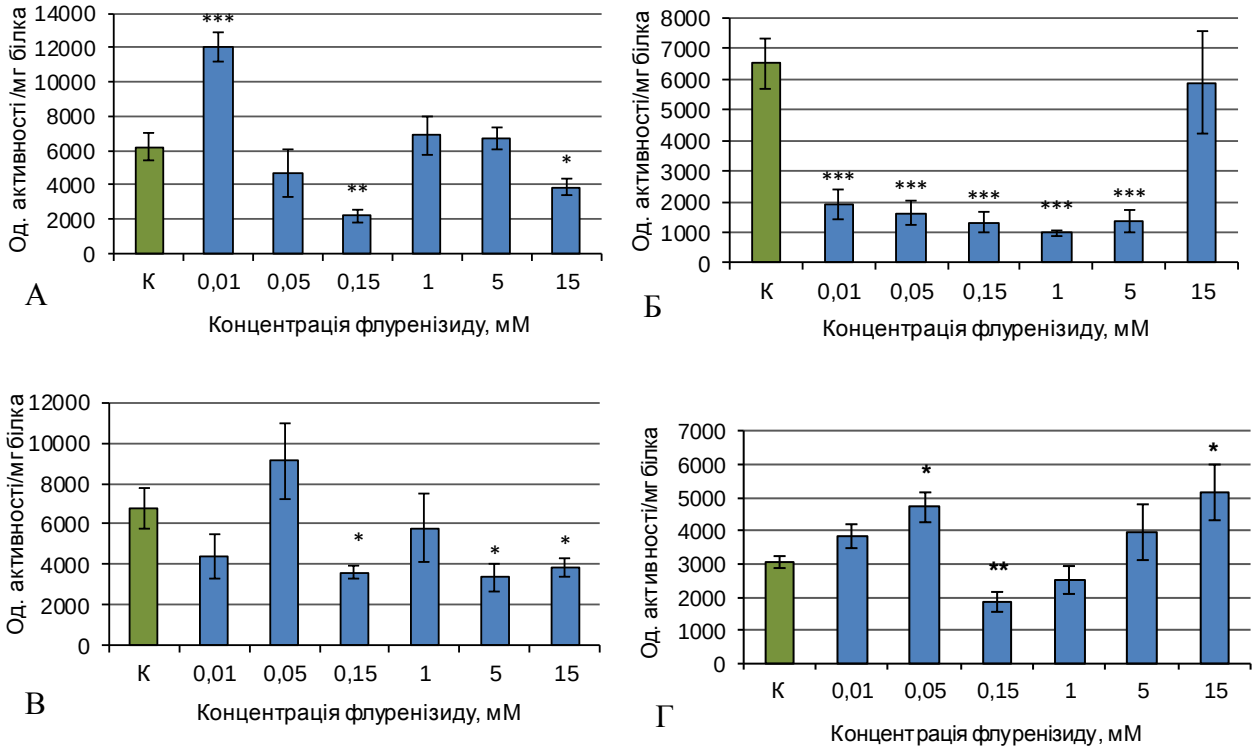
3.5.1. Активність супероксиддисмутази зародків в'юна протягом раннього ембріогенезу, за впливу флуренізиду

Супероксиддисмутаза є ключовим ензимом антирадикального захисту, який забезпечує обривання ланцюгів кисневозалежних вільнорадикальних реакцій, шляхом рекомбінації супероксидних аніон-радикалів кисню ($O_2^{\cdot-}$) [162, 163, 95].

Нами встановлено, що флуренізид, у нижчій досліджуваній концентрації (0,01мМ), зумовлює значне зростання супероксиддисмутазної активності (на 94%), на етапі розвитку зародків в'юна 2 бластомерів. На цьому ж етапі розвитку супероксиддисмутазна активність достовірно спадає, за дії флуренізиду в концентраціях 0,15 та 15мМ (рис. 3.7). На стадії 16 бластомерів активність цього ензиму спадає на 71% за впливу флуренізиду в концентрації 0,01 мМ, проте вже на 10 поділі зародкових клітин відбувається повторне підвищення активності СОД на 212% (рис. 3.7). Зростання активності СОД свідчить про підвищення вмісту супероксид-аніон радикалу, а також про утворення (у результаті дії самого ензиму) пероксиду водню, який повинен знешкоджуватися каталазою або глутатіонпероксидазою. Відомо, що супероксид-аніон радикал «витікає», як побічний продукт, під час роботи мітохондрій та цитохромів ендоплазматичної сітки, функціонування яких, ймовірно, порушує флуренізид [19]. Повторне зростання активності СОД за впливу флуренізиду у концентрації 0,01 мМ може бути пов'язаним із відновленням роботи після її виснаження.

Відмічено, що флуренізид у всіх досліджуваних концентраціях (0,01÷15мМ) веде до значного спадання активності СОД на стадії розвитку зародків в'юна 16 бластомерів (рис. 3.7). Відомо, що етап розвитку 16 бластомерів є початком стадії морули, ймовірно, найбільш чутливим етапом розвитку до дії досліджуваного антибіотика [42]. Дане зниження активності СОД пояснюється зменшенням вмісту субстрату (супероксид-аніон радикалу). З даних літератури відомо, що флуренізид не зв'язує іони металів змінної

валентності, проте здатний знешкоджувати такі радикали як OH^{-}, HO_2^{-} тощо і незначною мірою O_2^{-}, чим і можна пояснити спадання СОД активності за впливу флуренізиду [94].



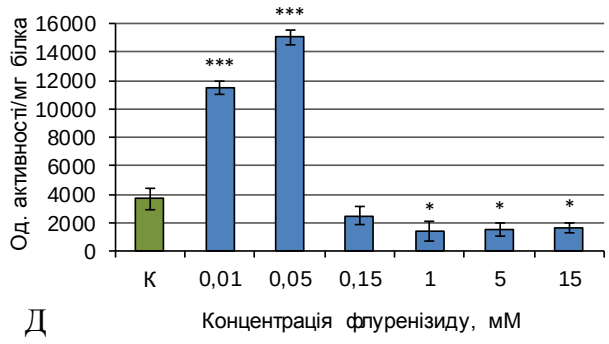


Рис. 3.7. Супероксиддисмутазна активність зародків в'юна на етапах розвитку 2, 16, 64, 256 та 1024 (А, Б, В, Г, Д відповідно) бластомерів у контролі (К) та за дії флуренізиду в діапазоні концентрацій 0,01÷15 мМ (* – $p \geq 0,95$; ** – $p \geq 0,99$; *** – $p \geq 0,999$)

Подальший розвиток зародків у середовищі з флуренізидом зумовлює достовірне зниження супероксиддисмутазної активності, на етапі 64 бластомерів, за концентрацій антибіотика 0,15; 5 та 15 мМ (рис. 3.7). Потрібно відмітити, що цей антибіотик у високих досліджуваних концентраціях (1÷15мМ), на стадії 10 поділу зародкових клітин, зумовлює спадання активності СОД в середньому на 60%, порівняно з контролем, тоді як низькі

концентрації (0,01 і 0,05 мМ) ведуть до зростання активності ензиму. Відомо, що на етапі 10 поділу зародок починає асинхронно ділитися, чим пояснюються значні зміни активності СОД (рис. 3.7) [14, 44, 101,].

3.5.2. Активність каталази зародків в'юна протягом раннього ембріогенезу за впливу флуренізиду

У результаті проведених досліджень нами встановлено, що активність каталази зростає на 77%, на стадії розвитку зародків в'юна 2-ох бластомерів, за концентрації флуренізиду 0,01 мМ (рис. 3.8). У вищих концентраціях (0,15; 1; 5; 15 мМ) цей антибіотик зумовлює достовірне спадання каталазної активності (на 31%, 90%, 81% та 56%, відповідно). На стадії 16 бластомерів нами виявлено спадання активності цього ензиму на 45%, за впливу флуренізиду в концентрації 1мМ, та незначне зростання (на 25%) – в концентрації 15 мМ (рис. 3.8). Подальший розвиток зародків, у середовищі з флуренізидом зумовлює достовірне спадання каталазної активності, на етапі розвитку 64 бластомерів, за всіх досліджуваних концентрацій антибіотика (0,01мМ÷15 мМ) (рис. 3.8). Спадання КАТ активності свідчить про ймовірне зниження вмісту в клітинах пероксиду водню, який є субстратом для цього ензиму, оскільки активність СОД на цих етапах розвитку зародків в'юна є пониженою [14, 19]. Треба відмітити, що флуренізид у низьких досліджуваних концентраціях (0,01; 0,05 мМ), на стадії 8 поділу зародкових клітин, веде до значного спадання активності каталази (88% та 70% відповідно) (рис. 3.8). Незначне спадання ферментативної активності (на 28%) нами зафіксовано, за інкубації зародків у середовищі з флуренізидом за концентрації 0,15 мМ. Спадання активності КАТ на фоні зростання активності СОД, може свідчити про включення в роботу глутатіонпероксидази, для інактивації H_2O_2, або про зниження синтезу КАТ. Необхідно зазначити, що антибіотик, у концентрації 15 мМ, зумовлює достовірне зростання КАТ активності на 67 %.

Флуренізид у низьких концентраціях (0,01 та 0,05 мМ), на стадії 10 поділу зародків, зумовлює значне достовірне зростання каталазної активності (на 128% та 232% відповідно), на відміну від 8 поділу, що свідчить про значне утворення пероксиду водню, який знешкоджується цим ензимом (рис. 3.8). Досліджуваний антибіотик у вищих концентраціях (1 та 15 мМ) веде до спадання активності ензиму на 35% та 51% відповідно (рис. 3.8).

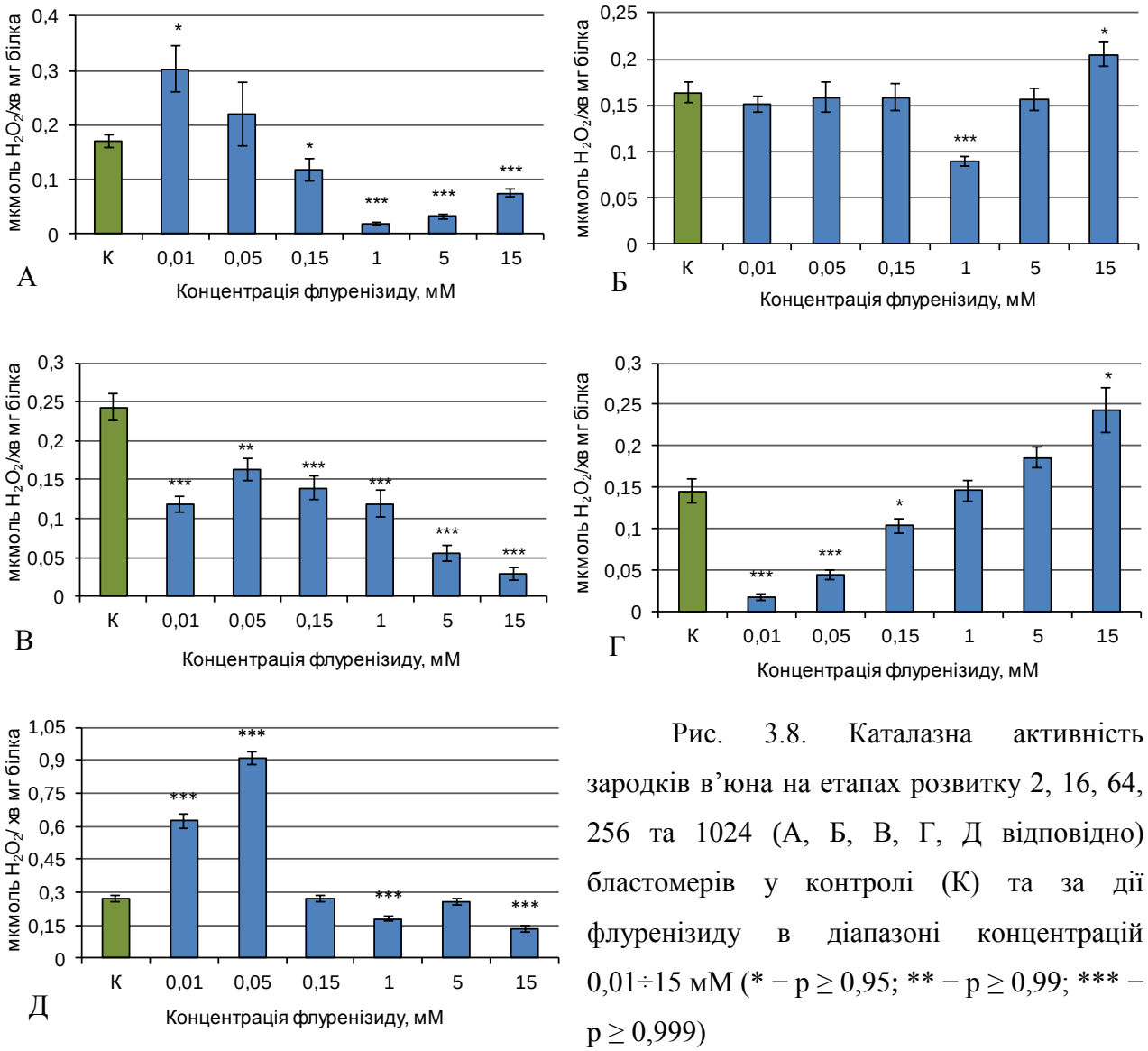


Рис. 3.8. Каталазна активність зародків в'юна на етапах розвитку 2, 16, 64, 256 та 1024 (А, Б, В, Г, Д відповідно) бластомерів у контролі (К) та за дії флуренізиду в діапазоні концентрацій 0,01÷15 мМ (* – $p \geq 0,95$; ** – $p \geq 0,99$; *** – $p \geq 0,999$)

Отже, флуренізид порушує роботу КАТ у процесі раннього ембріогенезу зародків в'юна *Misgurnus fossilis L.*, на всіх досліжуваних етапах розвитку, та спричиняє спадання її активності на етапі 64 бластомерів [19].

3.5.3. Активність глутатіонпероксидази зародків в'юна протягом раннього ембріогенезу за впливу флуренізиду

У формуванні антиоксидантного ефекту важливу ланку займає глутатіонова система антиоксидантного захисту організму, до якої належить глутатіон, ГПО. Глутатіон є основним компонентом цієї системи, який неферментативним шляхом інактивує H_2O_2 та інші активні форми кисню [80]. В організмі він бере участь у метаболізмі ксенобіотиків, регулює проліферацію клітин, впливає на синтез нуклеїнових кислот і білків, а також впливає на активність ферментів. Дефіцит глутатіону в клітинах призводить до активації процесів ліпопероксидації [121, 36]. Глутатіонзалежні ферменти, а саме ГПО, під час своєї роботи, перетворюють відновлену форму глутатіону в окиснену. Для того, щоб у клітинах був необхідний рівень відновленого глутатіону, глутатіонредуктаза (локалізується у мітохондріальному матриксі та цитозолі) перетворює окиснену його форму у відновлену [36].

Після проведених досліджень нами встановлено, що флуренізид у низьких концентраціях 0,01; 0,05 мМ, а також в максимальній досліджуваній концентрації (15 мМ), зумовлює значне зростання ГПО активності (на 435%, 169% та 151%, відповідно) на етапі розвитку зародків в'юна 2 бластомерів. На стадії 16 бластомерів відмічено зростання активності цього ензиму за впливу флуренізиду у концентрації 0,15 мМ на 129 %. Потрібно зазначити, що за дії флуренізиду у інших досліджуваних концентраціях у зародках в'юна на цій стадії розвитку виявлено тенденцію до зростання ГПО активності, порівняно з контролем (рис. 3.9). На етапі розвитку 64 бластомерів виявлено переважаюче пониження ГПО активності, проте ці зміни є недостовірними (рис. 3.9). Значуще зростання ГПО активності на 155% виявлено на стадії 256 бластомерів

за дії флуренізиду в концентрації 15 мМ (рис. 3.9). Зростання ГПО активності пов'язане з реакцією знешкодження пероксиду водню, детоксикацією інших пероксидів, насамперед ліпідних, що входять до складу біомембран [40]. Подальший розвиток зародків, у середовищі з флуренізидом, зумовлює спадання глутатіонпероксидазної активності, на етапі розвитку1024 бластомерів, за концентрацій антибіотика 0,15; 1; 5 та 15 мМ, порівняно з контролем (рис. 3.9).

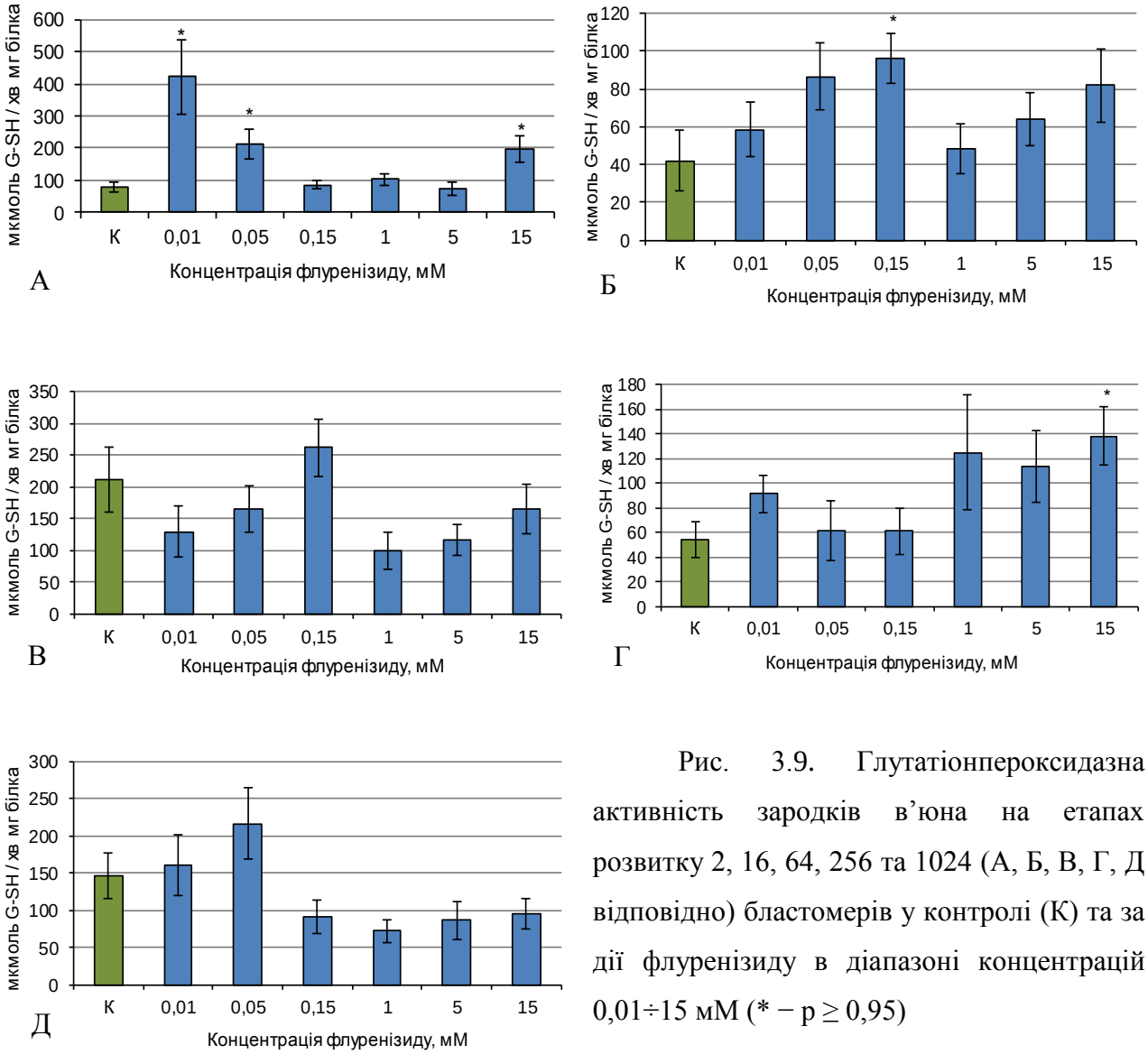


Рис. 3.9. Глутатіонпероксидазна активність зародків в'юна на етапах розвитку 2, 16, 64, 256 та 1024 (А, Б, В, Г, Д відповідно) бластомерів у контролі (К) та за дії флуренізиду в діапазоні концентрацій 0,01÷15 мМ (* – $p \geq 0,95$)

Отже, за впливу флуренізиду спостерігається тенденція до зростання ГПО активності, на етапі розвитку зародків в'юна 2, 16, 256 бластомерів, тоді як на

стадії розвитку 64 і 1024 бластомери – до спадання цієї активності. Пониження роботи ГПО достовірно не підтверджене, що дає змогу твердити, що флуренізид не зумовлює його ушкодження [18].

Відомо, що ГПО може відновлювати гідропероксиди вільних жирних кислот, гідропероксиди фосфоліпідів, естерифікованих жирних кислот окисненням глутатіону, який відновлюється НАДФН-залежним ферментом глутатіонредуктазою. В усіх клітинах міститься глутатіон, який є найпоширенішою сульфгідрильною сполукою. За допомогою відновленого глутатіону здійснюється детоксикація H_2O_2 і гідропероксидів, які утворюються у ході реакції активних радикалів кисню з ненасиченими жирними кислотами мембран [94]. Незакономірні зміни роботи ГПО, за впливу флуренізиду у різних концентраціях, можуть свідчити про недостатній вміст вільного глутатіону в зародкових клітинах на певних етапах розвитку.

3.5.4. Активність глутатіон-S-трансферази зародків в'юна протягом раннього ембріогенезу за впливу флуренізиду

Враховуючи те, що ГТ знешкоджує лікарські речовини, а також входить до глутатіонової системи антиоксидантного захисту важливо вивчити її активність у зародках в'юна за дії Флуренізиду [151]. Активність ГТ зростає на 341 % на стадії розвитку зародків в'юна 2-ох бластомерів за низької досліджуваної концентрації флуренізиду (0,01 мМ) (рис. 3.10), проте у високій концентрації (15 мМ) цей антибіотик зумовлює пониження роботи ензиму (на 30%).

На стадії 16 бластомерів нами виявлено достовірне спадання ГТ активності, за впливу флуренізиду у концентраціях 0,15; 1; 15 мМ на 41%, 44%, 35%, відповідно, порівняно з контролем (рис. 3.10). Треба відмітити, що флуренізид у низьких досліджуваних концентраціях (0,01; 0,05 мМ), на стадії 64 бластомерів, веде до зростання ГТ активності (на 60%), тоді як за вищих концентрацій (1; 15мМ) виявлено тенденцію до зниження активності цього

ферменту, порівняно з контролем (рис. 3.10) [18]. Важливо зазначити, що на стадії 8 поділу зародкових клітин відбувається спадання ГТ активності, в середньому, на 32% (рис. 3.10). Значне достовірне зниження активності цього ферменту виявлено також на стадії 10 поділу зародків за дії флуренізиду у концентраціях 1; 5; 15мМ (на 67%, 62% та 56% відповідно) (рис. 3.10).

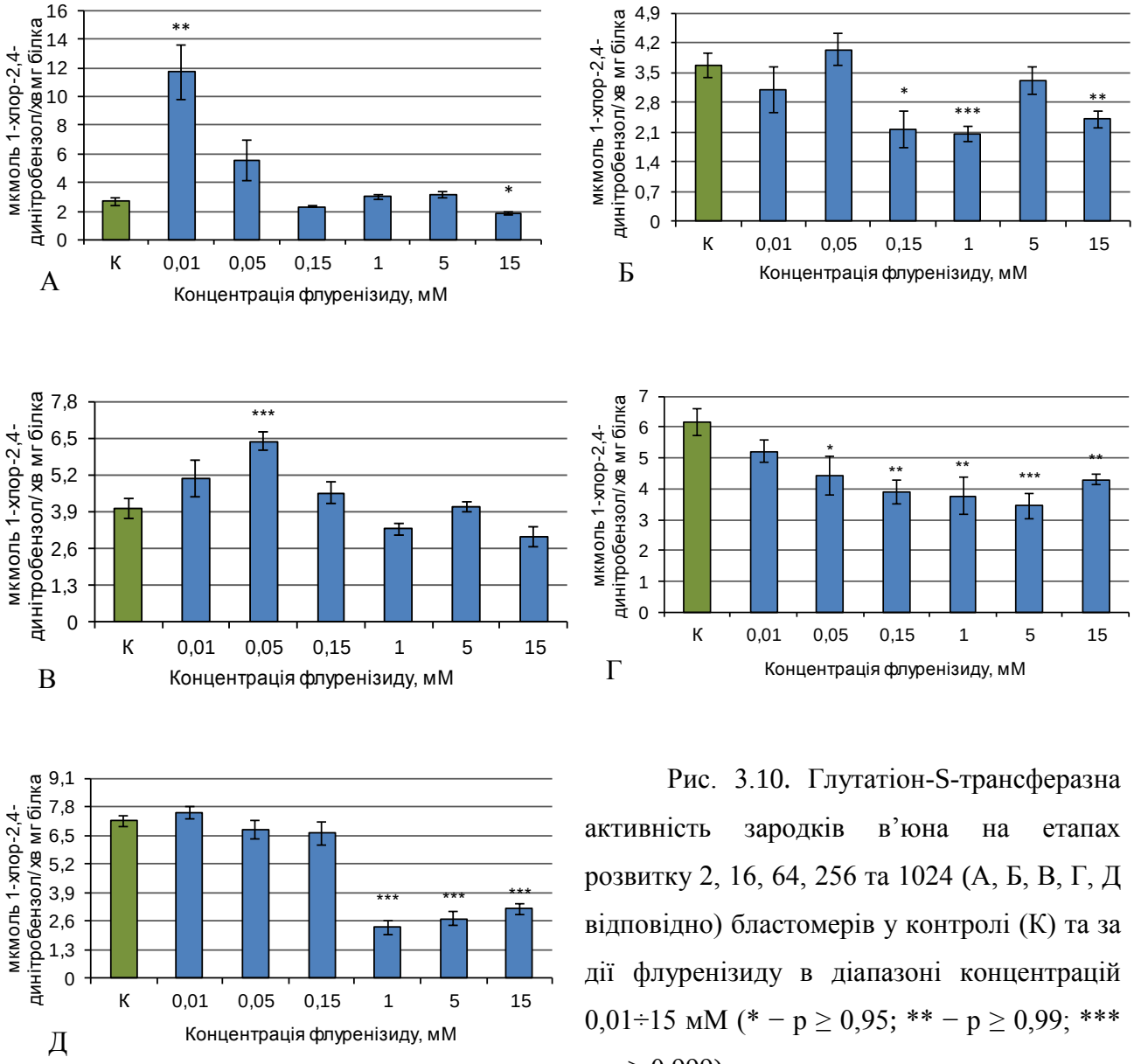


Рис. 3.10. Глутатіон-S-трансферазна активність зародків в'юна на етапах розвитку 2, 16, 64, 256 та 1024 (А, Б, В, Г, Д відповідно) бластомерів у контролі (К) та за дії флуренізиду в діапазоні концентрацій 0,01÷15 мМ (* – $p \geq 0,95$; ** – $p \geq 0,99$; *** – $p \geq 0,999$)

Зниження активності ГТ свідчить про ушкоджуючи дію флуренізиду на цей фермент.

3.6. АТФ-гідролазна активність зародків в'юна впродовж раннього ембріогенезу за впливу флуренізиду досліджуваних концентрацій

Вивчення активності Na^+, K^+-АТФази зародкових клітин прісноводної риби в'юна, як системи енергозалежного транспортування іонів Na^+, K^+ у регуляції функціональної відповіді клітини, у дослідах *in vivo*, дасть можливість поглибленого розуміння механізмів біологічної дії флуренізиду.

У цій серії дослідів ми використали флуренізид тільки у концентрації 15 мМ, щоб підтвердити однаковий вплив цього антибіотика на активність Na^+, K^+-АТФази зародків в'юна у експериментах *in vitro* та *in vivo* [89, 90].

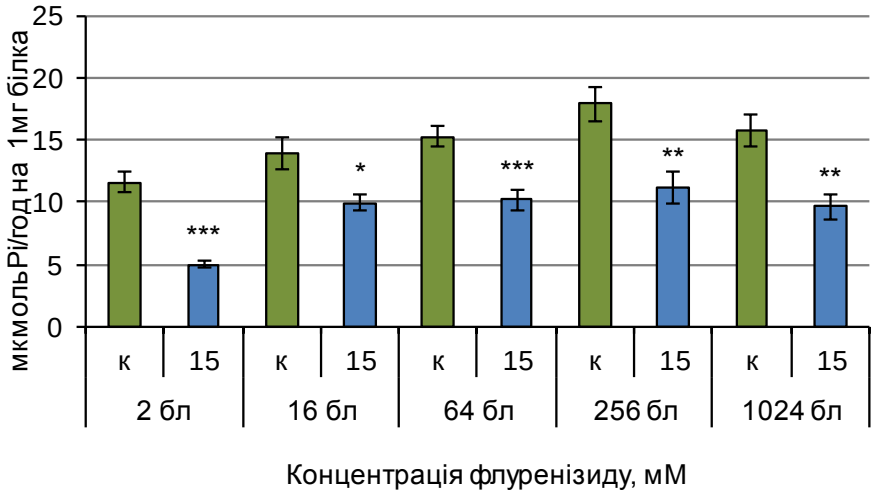


Рис. 3.11. Зміни активності Na^+, K^+-АТФази у зародках в'юна на етапах розвитку 2, 16, 64, 256, 1024 бластомерів у контролі (К) та за дії флуренізиду в концентрації 15 мМ (* − $p \geq 0,95$; ** − $p \geq 0,99$; *** − $p \geq 0,999$).

Нами встановлено, що флуренізид у концентрації 15 мМ веде до спадання активності Na^+, K^+-АТФази, впродовж досліду, з максимальним зниженням на

етапі 2 бластомерів. Спадання активності цього ферменту свідчить про порушення флуренізидом асиметричного розподілу іонів у зародкових клітинах (рис. 3.11), а це в свою чергу може відобразитись на величині потенціалу спокою [113].

3.7. Ультраструктурні зміни зародкових клітин в'юна на різних етапах розвитку за дії флуренізиду

При аналізі контрольних електронограм, нами виявлено, що на етапі двох бластомерів у зародках в'юна переважають неправильної форми різного розміру мітохондрії, з добре помітними, паралельно розташованими кристами, що узгоджується з даними літератури [41]. Матрикс електронно щільний. На цьому етапі розвитку у гіалоплазмі клітин переважає гладка ендоплазматична сітка (гЕПС), що свідчить про низький рівень біосинтетичних процесів. Виявлені лізосоми, жовткові гранули, пероксисоми з чітко окресленими мембранами. Матрикс пероксисом має електронно щільний вміст. Потрібно зазначити, що на етапі 2 бластомерів у клітинах зустрічаються поодинокі пероксисоми. В гіалоплазмі зародкових клітин, більшою мірою, зустрічаються первинні лізосоми (дрібні мембранні пухирці заповнені безструктурною речовиною, що містить активну кислу фосфатазу) та меншою – вторинні (рис. 3.12) [129].

Нами встановлено, що флуренізид в концентрації 0,05 мМ на етапі 2 бластомерів зумовлює набрякання мітохондрій, руйнування їхніх крист (рис. 3.12). Матрикс мітохондрій стає оптично світлим, що свідчить про зміну вмісту його компонентів, а також про порушення енергетичних процесів у клітині. Як і в нормі, переважає гЕПС, а в гіалоплазмі збільшується вміст вільних полірибосом. Вже на цьому етапі розвитку флуренізид, у концентрації 0,05 мМ, подекуди веде до порушення структури мембрани навколо жовткових гранул.

За інкубації зародків в умовах наявності флуренізиду, концентрацією 0,15 мМ, нами виявлено більш виражені порушення структури мітохондрій, на

етапі розвитку 2 бластомерів (рис. 3.12). Значна частина мітохондрій має зруйновані кристи. Їхньому матриксу характерне пониження електронної щільності, внаслідок чого утворюються прозорі зони. У 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 внаслідок її руйнування [21]. 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. 3.12). У гіалоплазмі, таким чином, переважає гЕПС, що свідчить про слабкі біосинтетичні процеси клітин. Електронна щільність матриксу мітохондрій понижена, проте внутрішня (кристи) та зовнішня мембрана мітохондрій добре проглядаються. Є також велика кількість мітохондрій із підвищеною електронною щільністю та з втраченими кристами. На електронограмах виявлені травні вакуолі та підвищена кількість лізосом. Трапляються ділянки із незворотними дегенеративними змінами гіалоплазми. Наявні пероксисоми. З літератури відомо, що вакуолізація зародкових клітин, що являє собою пізній результат некротичного типу смерті клітини, є наслідком порушення входження Na^+, K^+ та молекул води в цитоплазму, виходом іонів Ca^{2+} та блокуванням його транспорту в клітинні депо бластомерів [66].

Отже, флуренізид зумовлює структурні порушення мітохондрій та ендоплазматичної сітки, викликає зростання кількості лізосом у зародків в’юна на етапі розвитку 2 бластомерів, причому ступінь вираженості цих змін є дозозалежною. Кількість порушень структури органел корелює із 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-го поділу мітохондрії набувають овальної форми з чітко вираженими паралельно розташованими кристами, що

узгоджується з даними літератури [41]. Мембрана, що оточує жовткові гранули, правильних обрисів. Наявні травні вакуолі, пероксисоми. Переважає гЕПС (рис. 3.13).

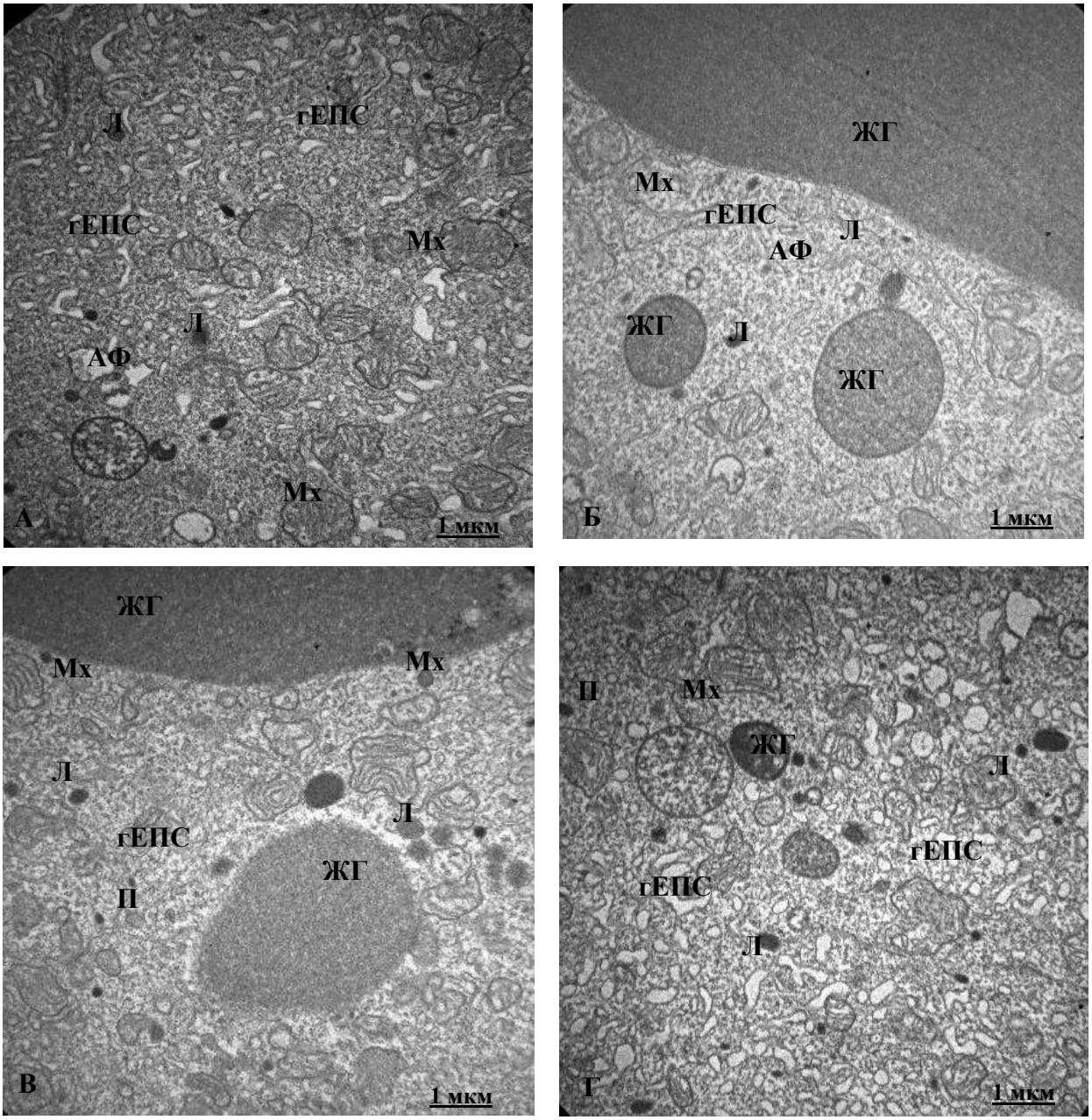


Рис. 3.12. Ультраструктура зародків в'юна, на етапі розвитку 2 бластомерів в контролі (А), за впливу флуренізиду в концентрації 0,05 мМ (Б), 0,15 мМ (В), 5 мМ (Г). Збільшення 1: 10 000: Мх – мітохондрія; гЕПС – гладка ендоплазматична сітка, Л – лізосома, П – пероксисома, АФ – аутофагосома, ЖГ – жовткова гранула.

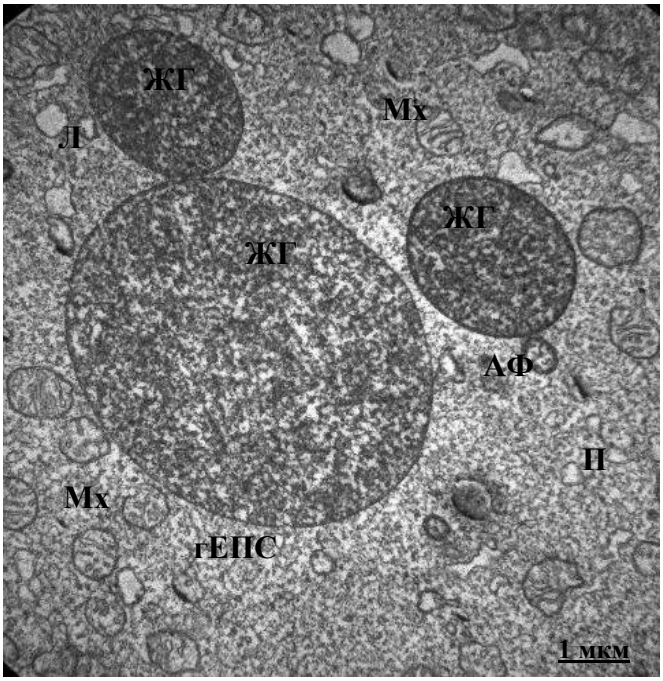


Рис. 3.13. Ультраструктура зародка в'юна, на етапі 1024 бластомери. Контроль. Збільшення 1: 10 000: Мх – мітохондрія; гЕПС – гладка ендоплазматична сітка, Л – лізосома, П – пероксисома, АФ – аутофагосома, ЖГ – жовткова гранула.

На етапі розвитку 64 бластомерів, флуренізид у концентрації 0,05 мМ, спричиняє порушення структури мембран жовткових гранул, які є джерелом живлення для зародка (рис. 3.14). У гіалоплазмі зростає кількість травних вакуоль, лізосом, пероксисом. Вміст вакуоль має низьку електронну щільність, що свідчить про активний процес лізису [66]. Порушується структура ЕПС, що виражається через дифузний вигляд гіалоплазми. Мітохондрії, за дії такої низької концентрації антибіотика, набувають кулястої форми, що свідчить про їхнє значне набрякання. Спостерігається втрата паралельного розташування крист, а подекуди навіть і їхнє зникнення. Набрякання мітохондрій свідчить, в свою чергу, про порушення водно-сольового обміну, енергетичних процесів у клітинах. Поряд з такими клітинами є бластомери, зовнішня мембрана мітохондрій яких утворює інвагінації, подекуди має нечіткі обриси, їхній

матрикс оптично прозорий, що вказує на структурно-функціональні зміни. Цистерни гЕПС розширюються. У полі зору переважає гЕПС та вільні полірибосоми [129, 21].

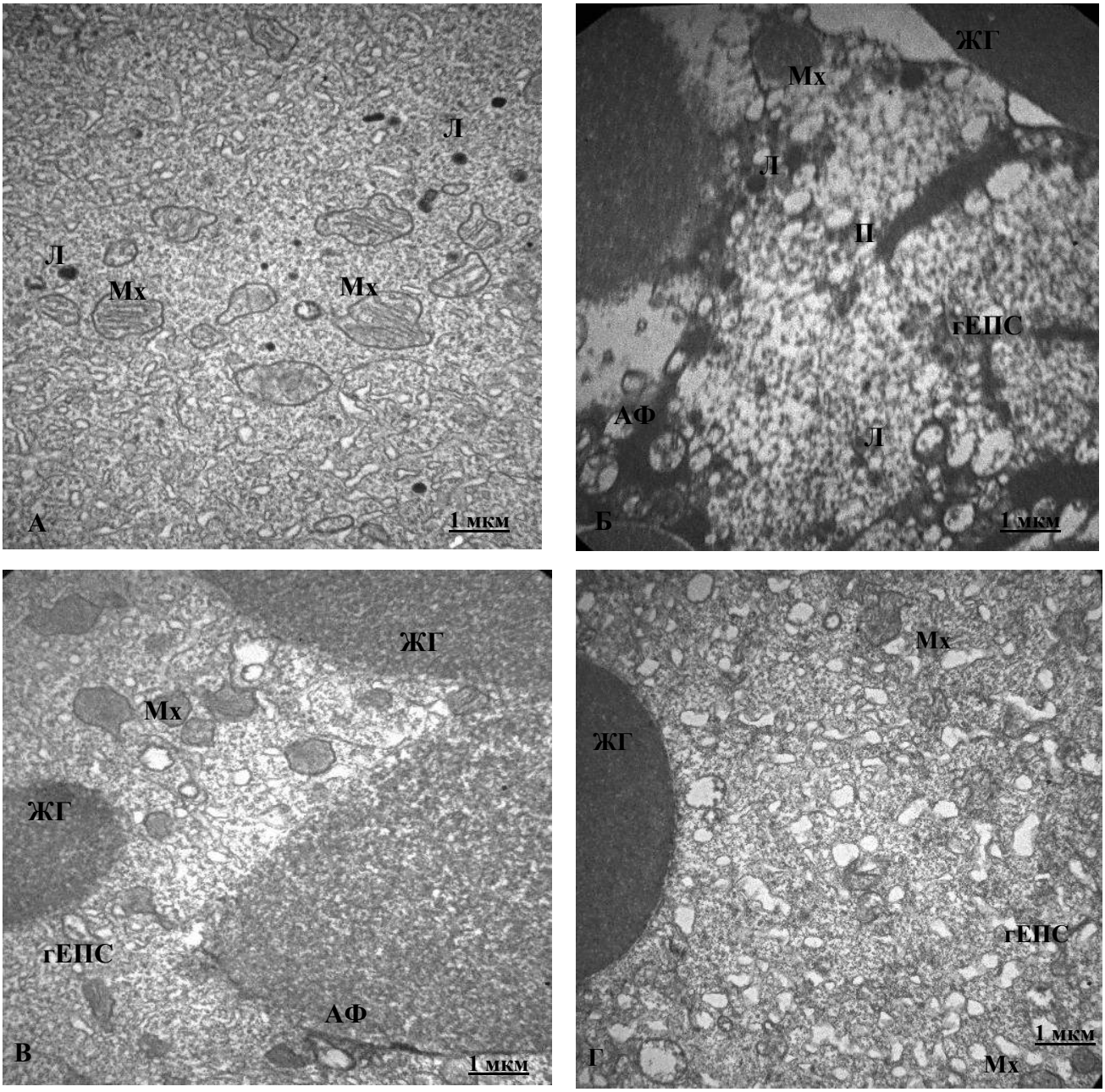


Рис. 3.14. Ультраструктура зародка в'юна, на етапі 64 бластомерів в контролі (А) та за впливу флуренізиду в концетраціях 0,05 мМ (Б), 0,15 мМ (В), 5 мМ (Г). Збільшення 1: 10 000: Мх – мітохондрія; гЕПС – гладка ендоплазматична сітка, Л – лізосома, П – пероксисома, АФ – аутофагосома, ЖГ – жовткова гранула.

На етапі шостого поділу зиготи (64 бластомери) у середовищі з флуренізидом вищої досліджуваної концентрації (0,15 мМ) мембрани навколо жовткових гранул клітин розпушуються, мітохондрії набувають кутчастої форми в яких погано проглядаються кристи (рис. 3.14). Матрикс оптично щільний. Зустрічаються набряклі мітохондрії зі світлим матриксом. Структура ЕПС залишається порушеною.

Флуренізид у концентрації 5 мМ веде до аналогічних структурних змін як і флуренізид у концентрації 0,15 мМ, проте в цьому випадку з'являється значна вакуолізація цитоплазми і руйнування мембран клітинних органел, на етапі розвитку 64 бластомерів, що свідчить про важкі дегенеративні зміни (рис. 3.14).

До десятого поділу флуренізид у концентрації 0,05 мМ зумовлює ушкодження мітохондій, матрикс яких оптично непрозорий (мутний), кристи дезорганізовані. Подекуди зустрічаються 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) веде до значних ушкоджень усіх компонентів клітини (рис. 3.15). З'являються великі травні вакуолі, руйнуються жовткові гранули, мітохондрії важко виявляються, ЕПС і апарат Гольджі не структуровані.

Відомо, що зміни внутрішньоклітинних органел з дуже високою електронною щільністю можуть свідчити про процеси денатурації внутрішньоклітинних білків та ущільнення колоїдів, які виходять за межі фізіологічної норми [160].

Потрібно відмітити, що за концентрації флуренізиду 5 мМ, ультраструктурні зміни бластомерів є менш вираженими, на етапі 10 поділу (рис. 3.15). Гіалоплазма клітин містить гЕПС із дещо розширеними цистернами. Мітохондрії овальної форми, проте їхня зовнішня мембрана деформована, хоча має добре виражену оконтурованість. Трапляються набряклі мітохондрії з прозорим вмістом. Є поодинокі лізосоми та 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 ведуть 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 понижувався відносно контролю, порівняно з дією флуренізиду в концентраціях 0,05 та 0,15 мМ, за впливу яких вміст вторинних продуктів ліпопероксидації зростав, порівняно з контролем [12].

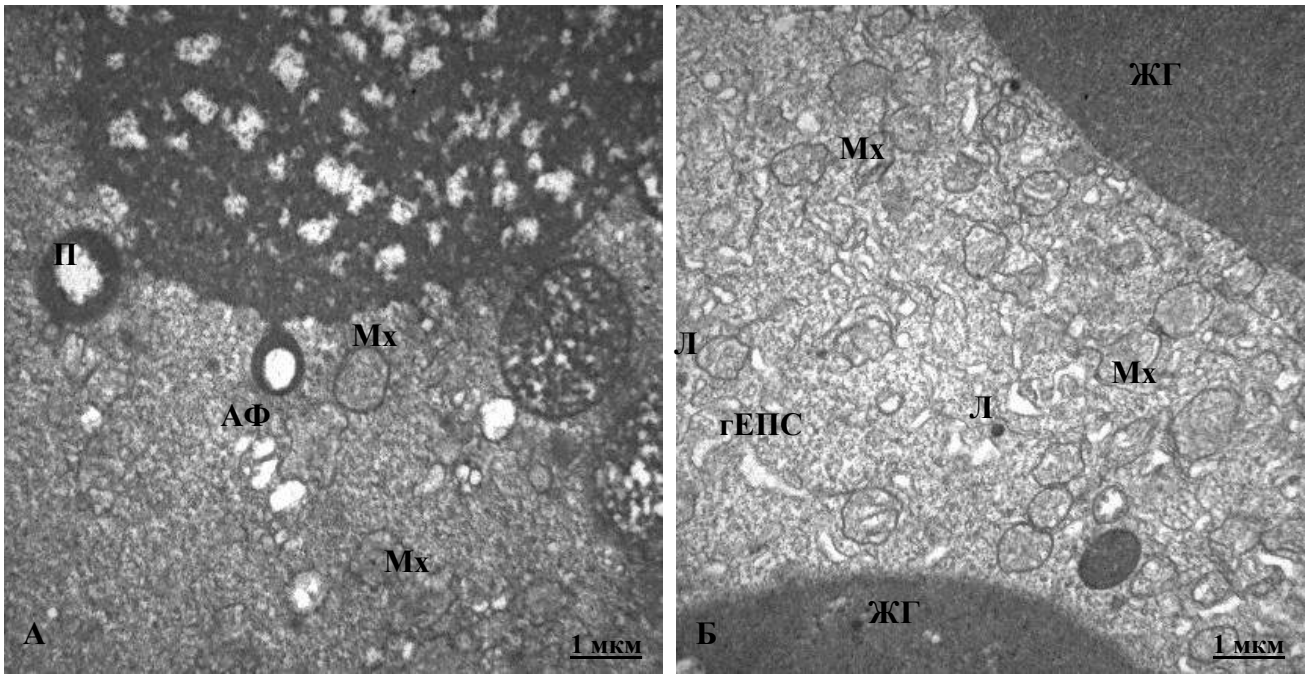


Рис. 3.15. Ультраструктура зародка, в'юна на етапі 1024 бластомери, за впливу флуренізиду в концетрації 0,15 мМ (А), 5 мМ (Б). Збільшення 1: 10 000: Мх – мітохондрія; гЕПС – гладка ендоплазматична сітка, Л – лізосома, П – пероксисома, АФ – аутофагосома, ЖГ – жовткова гранула.

Отже, флуренізид досліджуваних концентрацій, на етапі розвитку 64 бластомерів, веде до дистрофічних змін. Антибіотик у концентраціях 0,05 та 0,15 мМ спричиняє некротичні зміни, порівняно з флуренізидом максимальної

досліджуваної концентрації, за впливу якого структурні зміни бластомерів є менш вираженими.

3.8. Дисперсійний аналіз впливу флуренізиду на мембранопов'язані процеси та показники стану прооксидантно-антиоксидантної системи

Провівши двофакторний дисперсійний аналіз встановлено, що на утворення ГП значний вплив має час розвитку зародків в'юна (частка впливу 67%). Флуренізид незначно, проте достовірно діє також на вміст ГП (частка впливу 10%). Проте вже за утворення вторинних продуктів ліпопероксидації приблизно однаковий вплив чинять і час (38%), і флуренізид (34%), і невраховані фактори (28%) (рис. 3.16). Отже, флуренізид зумовлює порушення вмісту первинних та вторинних продуктів ПОЛ [18].

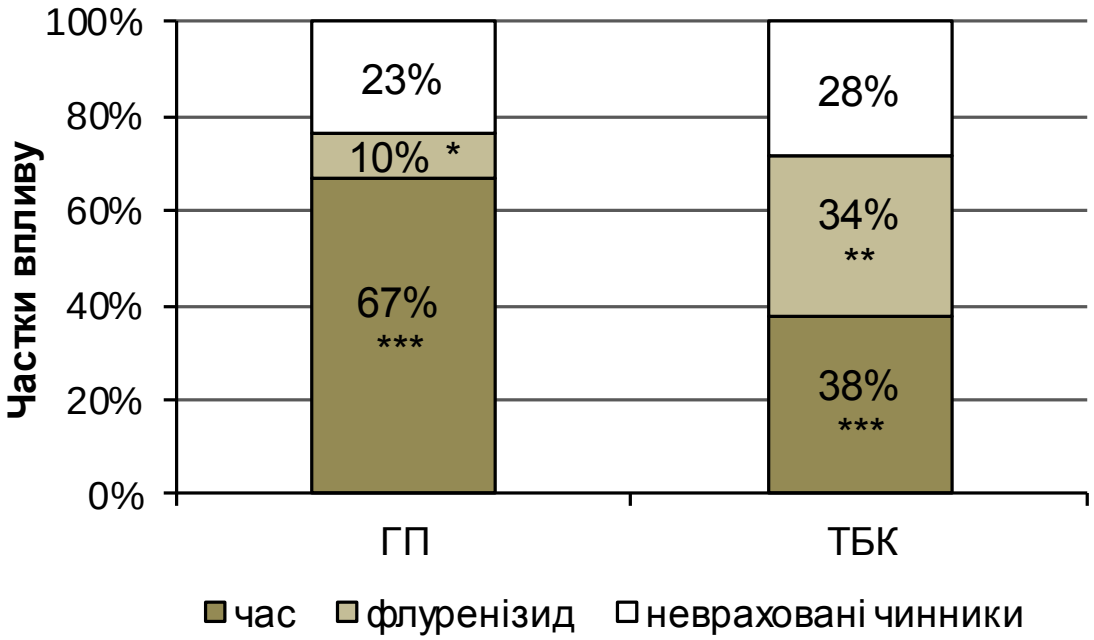


Рис. 3.16. Результати двофакторного дисперсійного аналізу впливу часу розвитку, флуренізиду та неврахованих чинників на вміст гідропероксидів і ТБК-позитивних продуктів в зародкових клітинах в'юна впродовж ембріогенезу (* – $p \geq 0,95$; ** – $p \geq 0,99$; *** – $p \geq 0,999$).

На супероксиддисмутазну, каталазну, глутатіонпероксидазну та глутатіонтрансферазну активність зародків в'юна потужну дію чинять невраховані фактори, частки впливу яких становлять 59%, 50%, 58% та 46%, відповідно (рис. 3.17, 3.18). До неврахованих чинників можуть належати атмосферний тиск та інші зовнішні чинники, за яких відбувається розвиток. Посередній вплив на роботу СОД (частка впливу 26%), КАТ (частка впливу 14%) та ГПО (частка впливу 15%) здійснює флуренізид, що свідчить, ймовірно, про непряму дію цього чинника на активність досліджуваних ферментів.

Нами встановлено, що час розвитку більш виражено впливає на каталазну активність, частка впливу якого становить 35% (рис. 3.18). Потрібно відмітити, що час розвитку незначно діє і на роботу СОД, ГПО та ГТ.

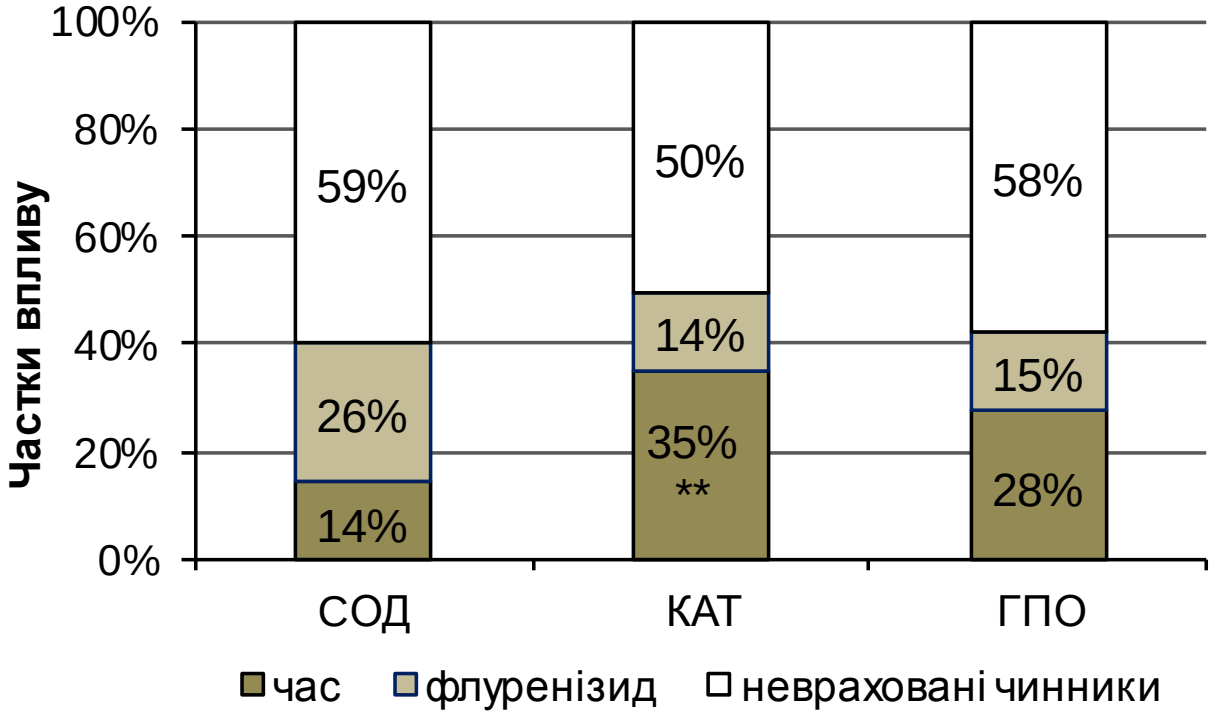


Рис. 3.17. Результати двофакторного дисперсійного аналізу впливу часу розвитку, флуренізиду та неврахованих чинників на активність супероксиддисмутази, каталази та глутатіонпероксидази в зародкових клітинах в'юна впродовж ембріогенезу (** – $p \geq 0,99$).

До неврахованих чинників, які мають значний вплив на роботу ферментів

антиоксидантної системи, можуть належати біосинтетичні процеси, на які впливає флуренізид та час розвитку зародків в'юна.

Виявлено, що на активність ГТ – ферменту, якому притаманна знешкоджуюча дія лікарських препаратів – сильну дію чинить флуренізид (41%). Цей вплив має негативне значення, оскільки активність ферменту знижується у досліді, порівняно з контролем (рис. 3.18).

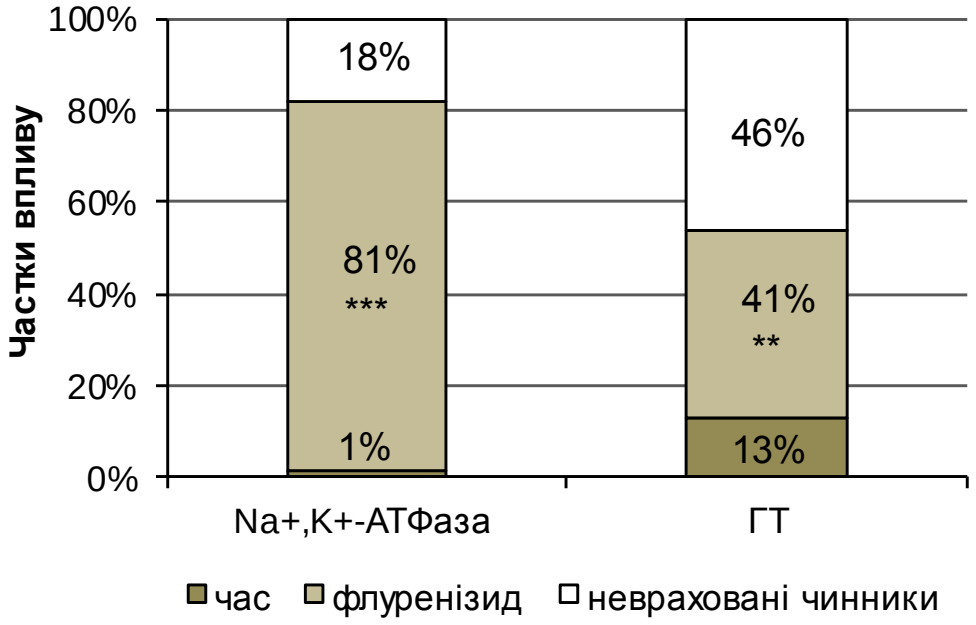


Рис. 3.18. Результати двофакторного дисперсійного аналізу впливу часу розвитку, флуренізиду та неврахованих чинників на активність Na^+, K^+-АТФази та глутатіон-S-трансферази в зародкових клітинах в'юна впродовж ембріогенезу (** – $p \geq 0{,}99$; *** – $p \geq 0{,}999$).

Застосувавши двофакторний дисперсійний аналіз встановлено, що на активність Na^+, K^+-АТФази потужний вплив чинить флуренізид (81%), (рис. 3.18), тоді як на час розвитку припадає 1%. Це свідчить про пряму дію досліджуваної субстанції на структуру і функцію Na^+, K^+-АТФази. Відомо, що флуренізиду притаманні токсичні властивості через наявність у його структурі залишку ізонікотинової кислоти.

Отже, флуренізид значно впливає на вміст ТБК-позитивних продуктів та активність Na^+, K^+-АТФази і ГТ.

3.9. Кластерний аналіз впливу флуренізиду на показники стану прооксидантно-антиоксидантної системи

Застосувавши кластерний аналіз, встановлено, що до стадії 64-х бластомерів всі експериментальні групи за досліджуваними показниками були розділені на 4 градації подібності (кластери). Варто відмітити, що флуренізид у концентрації 0,05 мМ не чинить значного впливу на показники, які були на рівні контролю (на етапі 2 бластомерів). Експериментальна група зародкових клітин на стадії розвитку 2 бластомери за дії флуренізиду у концентрації 0,05 мМ належить до першої градації подібності, як і контрольна група. Це підтверджується дослідами *in vitro*.

На етапі розвитку 256 та 1024 бластомерів за допомогою кластерного аналізу виявлено, що всі досліджувані групи за показниками розподіляються на 5 градацій подібності (кластерів), що свідчить про деяку зміну впливу флуренізиду на зародки в'юна. Зокрема такий «особливий» вплив притаманний флуренізиду в концентраціях 5 та 15 мМ (табл. 3.2).

Виконавши кластерний аналіз підтверджено, що на етапі розвитку 2 бластомерів флуренізид у максимальних досліджуваних концентраціях (5 та 15 мМ) зумовлює достовірне пониження вмісту ТБК-позитивних продуктів, підвищення вмісту ГП та спадання активності КАТ, ГПО, ГТ. Досліджувані показники вільнорадикальних процесів за дії флуренізиду у концентраціях 5 і 15 мМ увійшли до четвертого кластеру (табл. А.1).

Виявлений особливий вплив флуренізиду у концентрації 0,01 мМ на цьому етапі розвитку (2 бластомери), де показники досліджень формують другий кластер. Тут відбувається зниження ТБК-позитивних продуктів, ГП, активності СОД, а також значне зростання активності ГПО і ГТ. Отже, флуренізид у найнижчій концентрації чинить стимулюючу дію на роботу ферментів ГПО і ГТ, а також знижує вміст супероксид-аніон радикалу, про що

свідчить спадання активності СОД. Даний ефект впливу субстанції на прооксидантно-антиоксидантний стан зародків є позитивним явищем. Флуренізид у найнижчій концентрації проявляє антиоксидантні властивості (табл. А.1).

Таблиця 3.2.

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 16 бластомерів виявлені однотипні зміни показників вільнорадикальних процесів за впливу флуренізиду у більшості досліджуваних концентрацій (0,01; 0,05; 0,15; 5 мМ), а саме підвищення вмісту ТБК-позитивних продуктів, ГП, зростання активності ГПО, спадання СОД та ГТ. Досліджувані показники за впливу флуренізиду у зазначених концентраціях об'єднаний у другий кластер (табл. А.2).

Субстанція у концентраціях 0,05 та 0,15 мМ на етапі розвитку 64 бластомери здійснює відмінний вплив на показники, порівняно з іншими

концентраціями, які об'єднуються у третьому та четвертому кластерах, відповідно. На фоні збільшення вмісту продуктів ліпопероксидації флуренізид у концентрації 0,05 мМ веде до зростання активності СОД, ГТ і до спадання активності ГПО, тоді як досліджувана субстанція у концентрації 0,15 мМ зумовлює спадання активності СОД та зростання активності ГПО. Отже, флуренізид у концентрації 0,15 мМ знижує рівень супероксид-аніон радикалу та пероксиду водню. Досліджувана субстанція у концентраціях 0,05 і 0,15 мМ веде до незначного зростання вмісту первинних та вторинних продуктів ліпопероксидації, порівняно з впливом інших концентрацій (табл. А.3).

На етапі розвитку 256 бластомерів увагу привертають об'єднання показників за впливу флуренізиду різних концентрацій у другому і п'ятому кластерах. Так, до другого кластеру ввійшли показники за впливу флуренізиду у концентраціях 0,01 та 0,05 мМ, тоді як до п'ятого – флуренізид у концентрації 15 мМ. Важливо зазначити, що у другому кластері виявлено підвищення вмісту ТБК-позитивних продуктів, пониження ГП, тоді як у п'ятому – значне пониження кількості як первинних, так і вторинних продуктів ліпопероксидації, а також значне зростання активності ГПО. Це свідчить про негативний вплив флуренізиду у максимальній досліджуваній концентрації (табл. А.4).

Виконавши кластерний аналіз, нами встановлено, що у четвертій градації подібності виявлено більш виражене зростання інтенсивності вільнорадикальних процесів, а також пониження активності СОД, КАТ, ГПО та ГТ, порівняно з іншими градаціями, на етапі розвитку 1024 бластомери (табл. А.5). До цього кластеру відносяться зародки в'юна за впливу флуренізиду у концентрації 1 мМ. Відомо, що дана концентрація належить до добової терапевтичної дози. Ймовірно вона є шкідливою для зародкових клітин в'юна, стимулюючи ПОЛ і пригнічуючи антиоксидантну систему. Нами також встановлено, що флуренізид у концентраціях 5 і 15 мМ (об'єднані у п'ятий кластер) чинять зростання вмісту ГП, зниження активності СОД, ГПО і ГТ. Проте цей вплив є менш виражений, порівняно з дією флуренізиду у концентрації 1 мМ (четвертий кластер). Ймовірно субстанція у вищих дозах

виявляє більш виражені антиоксидантні властивості на етапі розвитку 1024 бластомери (табл. А.5).

Отже, підсумовуючи результати досліджень щодо впливу флуренізиду на зародки в'юна, засвідчено негативний вплив цієї речовини на прооксидантно-антиоксидантний стан, роботу Na^+, K^+-АТФази, активність якої спадає. Відбувається порушення поділу зародкових клітин, а також знижується їхній відсоток виживання. Змінюється структура мітохондрій та ендоплазматичної сітки. Вплив флуренізиду на досліджувані показники залежить від стадії розвитку зародкових клітин, а також від його концентрації.

РОЗДІЛ 4

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Оскільки плазматична мембрана є першим бар'єром між клітиною та позаклітинним середовищем, то саме її компоненти розглядають як мішені дії флуренізиду. Дія флуренізиду призводить до підвищення активності пероксидного окиснення ліпідів мембран [134, 158, 173]. Процес ініціації та розгалуження ланцюгових реакцій ПОЛ досить швидкий, тому утворення продуктів ліпопероксидації можливе відразу після дії флуренізиду, як стресового чинника, що призводить до інтенсифікації вільнорадикальних процесів у зародкових клітинах в'юна.

Під час розвитку патологічних процесів стрімко зростає інтенсивність ліпопероксидації, що робить її універсальним методом "розпізнавання" пошкодження клітинних мембран. Продукти ПОЛ порушують структурну цілісність мембран клітини, їхню осмотичну резистентність і електричний потенціал, окиснюють тіолові сполуки і SH-групи білків, ушкоджують структуру білків, амінокислот і т. п. [140, 71]. Відповідно до першого нашого завдання, встановлено, що в дослідах *in vitro* флуренізид зумовлює порушення утворення ТБК-позитивних продуктів. Так, на етапі розвитку 2 бластомерів виявлено тенденцію до зниження вмісту вторинних продуктів ліпопероксидації, а на етапі розвитку 16 бластомерів – до підвищення вмісту цих продуктів.

Важливо зазначити, що флуренізид, у концентрації 15 мМ, спричиняє зменшення інтенсивності процесів ПОЛ, на всіх етапах розвитку зародків в'юна, що свідчить про сповільнення обмінних процесів у цих об'єктах.

При вивченні активності Na^+, K^+-АТФази нами встановлено, що флуренізид у низьких концентраціях не спричиняє достовірних змін роботи Na^+, K^+-АТФази, на етапах розвитку 2 і 16 бластомерів. В той час як флуренізид у високих концентраціях веде до пониження активності цього ензиму впродовж досліду. Акивність Na^+, K^+-АТФази спадає за дії флуренізиду в усіх

досліджуваних концентраціях, крім 0,05 мМ, на етапах розвитку 64, 256 та 1024 бластомерів, що свідчить про порушення іонного гомеостазу в зародках. Найбільш інтенсивне спадання відмічено при концентрації 15 мМ, що ймовірно пов'язано із значним перехопленням активних кисневих метаболітів антибіотиком максимальної досліджуваної концентрації. Це, в свою чергу, зумовлює підвищення жорсткості плазматичної мембрани і пониження роботи АТФаз.

Слід відмітити, що личинки в'юна, які розвивалися за нормальних умов, були рухливими, з подовгастою формою тіла, розвиненими плавниками та зябрами, вираженою пігментацією. За впливу флуренізиду спостерігали пригнічення життєздатності зародків, відставання в розвитку, поділи бластомерів відбувалися із запізненням, порівняно з контрольними зародками.

Провівши тест на виживання зародків в'юна за інкубації у середовищі з флуренізидом, нами встановлено дозозалежне пониження їхньої життєздатності, порівняно з контролем. Високі концентрації флуренізиду зумовлюють високу смертність зародків в'юна вже на першу добу його дії, що свідчить про значний шкідливий вплив на зародкові клітини. Відомо, що флуренізид здатний діяти на ДНК, що пояснює негативну дозозалежну дію цього антибіотика на життєздатність зародків.

Для вивчення механізму дії флуренізиду на процес розвитку зародків, нами було проведено досліди *in vivo*.

З даних літератури відомо, що флуренізид володіє високою поляризованістю, що сприяє легкому проникненню крізь клітинні мембрани (підтверджено фармакокінетикою), а наявність флуоренілідeнового фармакофору обумовлює зниження токсичності [48].

Інкубація зародків в'юна у середовищі з флуренізидом високих концентрацій зумовлює зниження вмісту вторинних продуктів ліпопероксидації на тлі підвищення кількості первинних продуктів ПОЛ, тоді як за дії нижчих концентрацій (0,01÷1 мМ) відбувається перетворення більшою мірою

первинних продуктів ліпопероксидації (гідропероксидів) у вторинні (малоновий діальдегід, маркером якого є ТБК-позитивні продукти).

Відомо, що флуренізид знижує інтенсивність процесів ПОЛ, які відбуваються у мозку щурів *in vitro* [51] У цьому разі відбувається дозозалежний ефект: зі збільшенням концентрації препарату в середовищі інкубації швидкість накопичення ТБК-позитивних продуктів у пробах зменшується. Так, флуренізид, у концентрації 0,2 ммоль/л, гальмує інтенсивність процесів ліпопероксидації на 74 %, 0,5 ммоль/л – на 89 % [94].

Флуренізид здатний нейтралізувати такі радикали як $OH^{\cdot}$ і HO_2^{-} тощо і лише незначною мірою – супероксид аніон-радикал. Виключена можливість антиоксидантної дії флуренізиду внаслідок зв'язування іонів металів змінної валентності, оскільки антиоксидантний ефект все ж проявлявся в середовищі, де йони металів були попередньо хелатовані ЕДТА [94]. Результати наших досліджень дозволяють зробити висновок, що флуренізид, все ж таки, проявляє прооксидантні властивості при його наявності в середовищі розвитку клітин. Зародки в'юна є найбільш чутливими до дії флуренізиду на етапі розвитку 16 бластомерів, коли вміст гідропероксидів є максимальним та найменш чутливими на етапі 256 бластомерів.[42, 43].

Слід зазначити, що ліпіди є одними з основних мішеней оксидативного пошкодження АФО, оскільки виникає дисбаланс між утворенням та знешкодженням вільнорадикальних сполук [150]. Отже, посилення вільнорадикального окиснення ліпідів, за впливу флуренізиду, ймовірно, призводить до порушення окисно-відновного балансу, протягом синхронних поділів бластомерів.

Зростання АФО в живих клітинах є першим кроком пошкодження тканин та відповіддю клітини на вплив флуренізиду [134]. СОД, КАТ та ГПО знешкоджують АФО [175]. Порушення окисно-відновного балансу, інтенсифікація вільнорадикальних процесів, зміна вмісту АФО і пригнічення активності ензимів АОС свідчить про метаболічні зміни в клітині [134].

Супероксиддисмутаза має визначальну роль в запобіганні розвитку оксидативного стресу, оскільки посилюється генерація супероксид-аніону в різних тканинах організму [4]. Відомо, що СОД обриває ланцюг кисеньзалежних вільнорадикальних реакцій в клітинах організмів [95].

Отримані нами дані свідчать про зростання активності СОД у зародків в'юна на етапі розвитку 2 бластомерів, за впливу флуренізиду у нижчій досліджуваній концентрації, що є наслідком збільшення кількості субстрату – супероксид-аніону. Встановлено, що флуренізид пригнічує роботу СОД, на етапі розвитку 16 та 64 бластомери, що, ймовірно, свідчить про сповільнення метаболічних процесів на цих етапах розвитку зародків в'юна. На етапі розвитку 1024 бластомери антибіотик у низьких концентраціях зумовлює зростання активності СОД, тоді як у високих – спадання активності цього ензиму, що свідчить про перехоплення субстрату СОД флуренізидом високих концентрацій. Відомо, що флуоренове ядро флуренізиду вступає в реакції електрофільного заміщення і при цьому заміщується атом водню переважно в положеннях 2 і 7, а потім в положенні 4, в результаті чого реалізується його антиоксидантна дія (антиоксиданти віддають водень на знешкодження радикалів).

Причиною зростання активності СОД у окремих випадках упродовж ембріогенезу (рис. 3.6–3.8) є, ймовірно, збільшення вмісту продуктів ПОЛ у клітинах зародків в'юна. Відтак, збільшення активності СОД може бути спричинене по-перше, зростанням у середовищі субстрату – супероксид-аніон радикалу, який виробляється у більшій кількості в процесі окисно-відновних реакцій, а по-друге, зменшенням концентрації продукту реакції – пероксиду гідрогену, оскільки за таких умов активуються ензими, які його розщеплюють. Оскільки в наших дослідженнях продемонстровано зростання активності СОД, пригнічення активності КАТ та ГПО, ймовірно, можливий перший механізм пояснення перебігу реакції. Також зростання активності СОД вище рівня контролю може бути спричинене активацією його латентних форм або синтезом нових молекул ферменту.

Зростання активності СОД веде до утворення великої кількості H_2O_2, який може знешкоджуватися або каталазою, або глутатіонпероксидазою. Синергістом супероксиддисмутази в клітині є каталаза. Вона запобігає накопиченню продукту супероксидисмутазної реакції інгібітора СОД – пероксиду гідрогену [71].

Флуренізид у всіх досліджуваних концентраціях (0,01; 0,05; 0,15; 1; 5; 15 мМ) призводить до спадання активності каталази, на етапі розвитку зародків в'юна 64 бластомери – ензиму, який каталізує знешкодження пероксиду гідрогену. Для каталази властиве субстратне інгібування ферменту за високих концентрацій H_2O_2 [35]. Зниження її активності за впливу флуренізиду може бути наслідком підвищеної продукції пероксиду гідрогену СОД, активність якої в зародків в'юна істотно збільшується.

Надлишок пероксиду гідрогену (продукту детоксикації супероксидного радикалу за каталізу СОД) взаємодіє з СОД, продукуючи при цьому вільні радикали за схемою [71]:

$$\text{СОД-}Cu^{2+} + H_2O_2 \rightarrow \text{СОД-}Cu^{+} + O_2^{\cdot -} + 2H^{+}$$
$$\text{СОД-}Cu^{+} + H_2O_2 \rightarrow \text{СОД-}Cu^{2+} + OH^{\cdot} + OH^{-}$$

Деякі метали змінної валентності (Fe^{2+}, Cu^{2+}) можуть руйнувати H_2O_2 з утворенням реакційного гідроксил радикалу (реакція Фентона) [71]:

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\bullet} + OH^{-}$$
$$Fe^{3+} + O_2^{\bullet -} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$$

На стадії 10 поділу зародків в'юна *Misgurnus fossilis L.* флуренізид, у концентраціях 0,01 та 0,05 мМ, зумовлює значне зростання каталазної активності, у вищих концентраціях, 1мМ та 15мМ, веде до спадання активності досліджуваного ензиму. Отже, відбувається відновлення узгодженого функціонування СОД та КАТ, що спостерігається в нормі. Такі зміни

активності СОД та КАТ на стадії 10 поділу бластомерів можуть бути зумовлені також і особливостями енергозабезпечення зародків в'юна. Відомо, що від другої години після запліднення яйцеклітини швидкість гліколізу поступово зростає, а до десятої години розвитку – збільшується у два рази. Гойда О.А. зі співробітниками встановили, що швидкість поглинання кисню зародків від першого поділу дроблення до початку бластуляції зростає в межах від 0,8 до 1,6 нл O_2 [29].

Показане нами підвищення активності каталази, на стадії 10 поділу бластомерів, також можна розглядати як реакцію на автономізацію метаболічних процесів (синтез іРНК, інтенсифікація дихання). Разом з тим, у процесі каталітичної реакції розпад H_2O_2 каталазою забезпечує додаткову кількість кисню для ефективного функціонування ланцюга дихання мітохондрій і окисного фосфорилювання [184].

Із результатів наших досліджень випливає, що в зародків в'юна за впливу флуренізиду низьких концентрацій відбувається підвищення ензимної активності СОД та КАТ. Це може бути захисною реакцією на інтенсифікацію процесів утворення АФО, зумовлену впливом флуренізиду. Однак за вищих концентрацій (1 та 15мМ), функціональна активність захисної системи клітин може порушуватися внаслідок виснаження вмісту неензимних антиоксидантів, інактивації антиоксидантних ензимів під впливом АФО і продуктів ПОЛ. Такий ефект може зумовлювати дисбаланс у процесах утворення та руйнування H_2O_2 – продукту супероксиддисмутазної реакції.

Знешкодження підвищеного, за дії флуренізиду, рівня пероксиду гідрогену здійснює і ГПО, спорідненість якої до H_2O_2 значно вища, ніж у КАТ. ГПО, каталізуючи відновлення H_2O_2, не лише інактивує цей метаболіт, але й попереджує нагромадження гідроксил-аніону, запобігаючи утворенню органічних гідропероксидів. Відновлення ензимом ГПО органічних гідропероксидів, особливо ліпідів мембран, знижує пероксидацію та появу вторинних токсичних метаболітів [166].

Флуренізид зумовлює, більшою мірою, зростання ГПО активності на етапі розвитку зародків в'юна 2, 16, 256 бластомерів, тоді як на етапі розвитку 64 і 1024 бластомери – спадання активності. Проте сповільнення роботи ГПО достовірно не підтверджене, що дає змогу твердити, що флуренізид не зумовлює його ушкодження.

Оскільки в структурі активного центру ГПО є амінокислотні залишки та вільні SH-групи, які першими зазнають пероксидної дії [58], це може пригнічувати його активність. Причиною зниження, ймовірно, є участь тіолового компонента ГПО – глутатіону в процесах захисту клітини від АФО, відновлення пероксидних сполук та знешкодження вторинних продуктів окиснення. При цьому, накопичення окисненого глутатіону знижує антиоксидантний захист і відмічено пошкодження фосфоліпідів мембран [148]. Зниження потужності глутатіонової системи, у свою чергу, може призводити до порушення процесів життєдіяльності клітини: змін проникності клітинних мембран, активності ферментів, інтенсивності метаболізму та інших процесів.

Флуренізид порушує роботу ГТ у процесі раннього ембріогенезу зародків в'юна *Misgurnus fossilis L.* на всіх досліжуваних етапах розвитку. Цей антибіотик у високих концентраціях зумовлює переважаюче спадання ГТ активності, у більшій мірі, на етапі розвитку зародків 256 та 1024 бластомерів (рис 3.13, 3.14). Флуренізид у максимальній концентрації (15 мМ) призводить до спадання ензиматичної активності, починаючи з початкових етапів розвитку зародків в'юна, що свідчить про слабку інактивацію досліджуваного антибіотика цим ензимом. Відомо, що другу фазу знешкодження шкідливих речових (в тому числі і лікарських) забезпечують реакції кон'югації, в процесі яких відбувається приєднання до функціональних груп, що утворилися на першому етапі (при мікросомальному окисненні), інших молекул чи груп ендогенного походження, які збільшують гідрофільність і зменшують токсичність ксенобіотиків [71]. ГТ, власне, забезпечує реакції кон'югації, тому спадання її активності розглядається як негативний процес. У науковій літературі є відомості, що ГТ інгібується продуктами фосфоліпазного гідролізу,

зокрема, вільними жирними кислотами, тоді як ГПО, навпаки, є повністю резистентною до їхньої дії [71]. Ймовірно, флуренізид зумовлює утворення вільних жирних кислот, що й спричиняє порушення роботи, більшою мірою, ГТ.

Таким чином, результати проведених досліджень свідчать про те, що флуренізид впливає на вміст продуктів ПОЛ і стан показників АОС у зародкових клітинах в'юна. Внаслідок цього зазнає істотних змін баланс між прооксидантами та компонентами системи АОЗ саме за інтенсифікації ПОЛ упродовж ембріогенезу. На стадії 10 поділу бластомерів (6-та година розвитку) зародків в'юна падає мітотичний індекс і зростає морфогенетична активність ядер, що можливо впливає на інтенсивність процесів ПОЛ та на активність антиоксидантних ензимів.

Інтенсифікація вільнорадикальних реакцій, за впливу флуренізиду, викликає модифікацію макромолекул і, як наслідок, відбувається реструктуризація біомембран, порушення діяльності ензимних систем [174, 180]. Очевидно такі зміни також впливають на активність Na^+, K^+-АТФази зародкових клітин протягом ембріогенезу.

Нами встановлено, що флуренізид у концентрації 15 мМ веде до спадання активності Na^+, K^+-АТФази, впродовж досліду з максимальним зниженням на етапі 2 бластомерів. Спадання активності цього ферменту свідчить про порушення флуренізидом іонного транспорту мембран зародкових клітин.

Зниження активності ферменту транспортування іонів Na^+ та K^+, за дії флуренізиду, може реалізуватись двома шляхами. По-перше, Na^+, K^+-АТФаза може бути мішенню, яка взаємодіє з флуренізидом, наслідком чого є конформаційні зміни у білковій молекулі, що може викликати зниження активності ферменту. З іншого боку, не виключений механізм опосередкованого впливу на активність цього ферменту через інтенсифікацію процесів окиснення ліпідів зародкових мембран під дією даного препарату. Зміна ліпідного мікрооточення, внаслідок процесів ПОЛ, може бути причиною зміни активності мембранозв'язаних ферментів [130, 161]. Встановлено, що

Na^+, K^+-АТФаза є чутливою до високореактивних форм кисню і безпосередньо бере участь в оксидативному стресі [161]. Низкою досліджень показано, що фермент характеризується різною чутливістю до окисників: АТФаза є стійкою до дії супероксид-аніона, відносно стійкою до пероксиду гідрогену, але дуже чутливою до гідроксильного радикала [130, 161]. Слід відмітити, що при порушенні окиснювального обміну тканин відбувається інгібування Na^+, K^+-АТФази і роз'єднання процесів гідролізу АТФ з активним транспортом іонів [131].

Флуренізид зумовлює структурні порушення мітохондрій та ендоплазматичної сітки, викликає підвищення кількості лізосом у зародків в'юна, причому ступінь вираженості цих змін є дозозалежною. Так, у мітохондріях, матрикс яких оптично не прозорий, кристи дезорганізовані, є ознаки набряку, мембрани "розпушені", що свідчить про порушення процесів ПОЛ. Це твердження узгоджується з попередніми нашими дослідженнями [12]. З'являються травні вакуолі. Відомо, що зміни внутрішньоклітинних органел з дуже високою електронною щільністю можуть свідчити про процеси денатурації внутрішньоклітинних білків та ущільнення колоїдів, які виходять за межі фізіологічної норми.

За результатами двофакторного дисперсійного аналізу можна стверджувати, що на утворення ГП значний вплив має час розвитку зародків в'юна. Проте вже при утворенні вторинних продуктів ліпопероксидації, приблизно однаковий вплив чинять і час, і флуренізид, і невраховані фактори. Отже, флуренізид значною мірою впливає на утворення вторинних продуктів ПОЛ.

На супероксиддисмутазну, каталазну, глутатіонпероксидазну та глутатіонтрансферазну активність зародків в'юна сильний вплив чинять невраховані фактори, до яких можуть належати тиск та інші зовнішні чинники при яких відбувається розвиток. Менш виражений вплив на роботу СОД та КАТ здійснює флуренізид, що свідчить ймовірно про непряму дію цього чинника на активність досліджуваних ферментів. Виявлено, що час розвитку

більш виражено впливає на каталазну активність. Потрібно відмітити, що на роботу ГТ та Na^+, K^+-АТФази чинить потужний вплив флуренізид (41%).

За допомогою кластерного аналізу встановлено, що до стадії 64-х бластомерів всі експериментальні групи за досліджуваними показниками були розділені на 4 групи подібності. Варто відмітити, що флуренізид у концентрації 0,05 мМ не чинить значного впливу на показники, які були на рівні контролю (на етапі 2 бластомерів) (табл. А.1, 2, 3). Це підтверджується дослідами *in vitro*.

На етапі розвитку 256 та 1024 бластомерів за допомогою кластерного аналізу всі досліджувані групи за показниками розподіляються на 5 груп подібності, що свідчить про деяку зміну впливу флуренізиду на зародки в'юна. Зокрема такий особливий вплив притаманний флуренізиду в концентрації 5 та 15 мМ (табл. А.4, 5).

На основі одержаних результатів та аналізу наукової літератури ми пропонуємо узагальнюючу схему, на якій представлено гіпотетичний механізм впливу флуренізиду на ембріогенез в'юна (рис. 4.1).

Нами сформульовано гіпотезу, що виникнення оксидативного стресу впродовж ембріогенезу є одним з визначальних моментів розвитку порушень за впливу флуренізиду. Процес виникнення та розвитку оксидативного стресу є складним та багатокомпонентним. Після дії флуренізиду на клітини проявляються його прямі та опосередковані ефекти на біомолекули. Абсорбція препарату клітинами призводить до порушення структури біомолекул, а опосередковані ефекти реалізуються через утворення АФО. У відповідь на ці процеси в клітинах активується ендогенна система антиоксидантного захисту, ключовими ензимами якої є СОД, КАТ, ГПО і ГТ. Однак флуренізид спричиняє порушення функціонування ензимів системи антиоксидантного захисту, що відображається у різнонапрямлених змінах їхніх активностей.

Згідно схеми (рис. 4.1) в результаті впливу флуренізиду на зародки, в першу чергу, 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^+–АТФ-ази. 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.

Ліпідна пероксидація характеризується збільшенням вмісту ГП та 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 [137]. Цей ензим продукує супероксид-аніон радикал, який започатковує ланцюгові реакції утворення інших АФО [144, 169]. У результаті вільнорадикальних реакцій, утворені продукти ліпопероксидації здатні пошкоджувати білкові молекули всередині клітини.

У відповідь на зростання інтенсивності ПОЛ спостерігається активація СОД та інгібування КАТ та ГПО. Оскільки за патологічних умов відбувається нагромадження пероксиду гідрогену і не активуються системи, що його розкладають, можлива зворотня реакція взаємодії H_2O_2 з СОД, результатом цього є утворення гідроксильного та супероксид-аніон радикалів. На відміну від супероксиду, який знешкоджує СОД, не виявлено ферменту, який би інактивував гідроксильний радикал, через занадто коротку тривалість напівжиття.

З даних літератури відомо, що $OH^{\bullet}$, який уворюється в результаті окисно-відновних процесів у клітині є сильним окисником і основним фактором окисної модифікації клітинних структур. У нуклеїнових кислотах $OH^{\bullet}$ руйнує містки між нуклеотидами, розриває ланцюги ДНК і РНК, внаслідок цього відбувається мутація та загибель клітин [139]. Усередині ліпідного бішару $OH^{\bullet}$ ініціює реакції ПОЛ, що призводить до пошкодження мембран та порушення їхніх функцій [56].

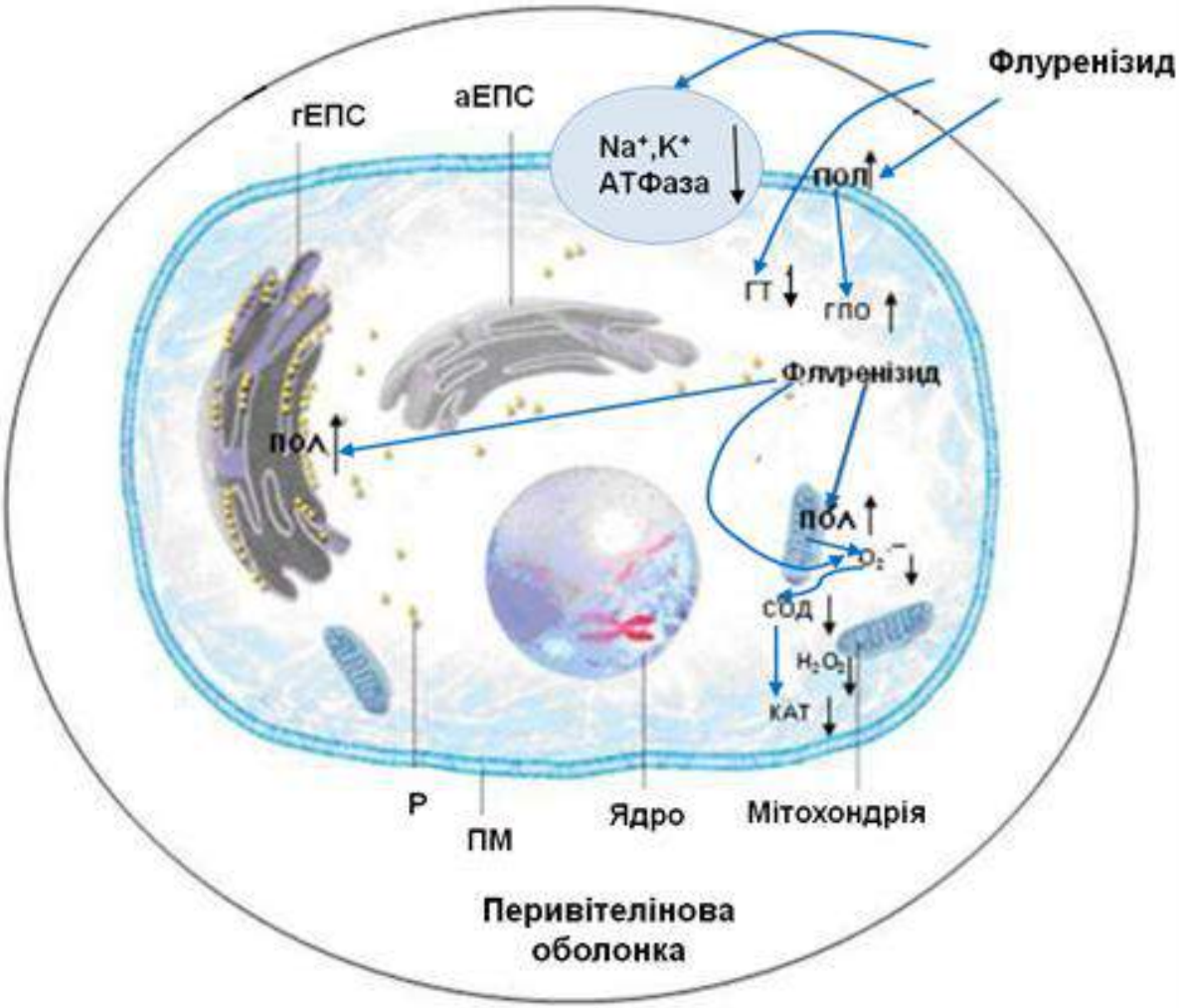


Рис. 4.1. Гіпотетична схема впливу флуренізиду на мембранопов'язані процеси впродовж ембріогенезу в'юна. ПОЛ – пероксидне окиснення ліпідів, аЕПС – агранулярна ендоплазматична сітка, гЕПС – гранулярна ендоплазматична сітка, ГST – глутатіон-S-трансфераза, ГПО – глутатіонпероксидаза, СОД – супероксиддисмутаза, КАТ – каталаза, ПМ – плазматична мембрана, Р – рибосома. Стрілкою «↑» позначено підвищення інтенсивності процесів пероксидного окиснення ліпідів та активності ферментів, стрілкою «↓» – пониження.

Гідроксильний радикал належить до АФО і є найбільш активним компонентом оксидативного стресу. Він здатний забирати атом водню від органічних сполук з утворенням органічного вільного радикалу ($RH+OH\cdot \rightarrow R\cdot + H_2O$) [114]. Час напівжиття $t_{½}$ гідроксильного радикалу *in vivo* – дуже короткий – близько 10^{-9} с, що в сукупності з його високою реакційною здатністю

призводить до того, що він є одним з найбільш небезпечних агентів, які утворюються в організмі [176].

Враховуючи результати досліджень, можна припустити, що за впливу флуренізиду відбувається модифікація ліпідних компонентів мембран, що є основою порушення мембранної проникності, пригнічення чи активації різних ферментних систем. Розбалансоване функціонування антиоксидантних ензимів може бути початковою стадією метаболічних змін, які в подальшому призводять до дестабілізації структури плазматичної мембрани, порушення синтезу білків, пошкодження молекул ДНК, апоптозу клітин та пригнічення життєздатності зародків [164]. Відомо, що в структуру флуренізиду входить залишок ізонікотинової кислоти, який проявляє токсичні властивості, а також те, що досліджуваний антибіотик, подібно до аміноглікозидів, діє на 30S субодиницю рибосом та, ймовірно, інгібує синтез білка [94].

Отже, нами встановлено, що флуренізид негативно впливає на зародкові клітини: призводить до інтенсифікації процесів ПОЛ, а також викликає зміни у функціонуванні ферментів системи антиоксидантного захисту організму. Порушення прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу може бути першопричиною зміни функціонування мембранозв’язаних транспортних ферментів.

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 морфологічні та структурні параметри зародкових клітин.

1. Флуренізид за умов *in vitro* у 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 та 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 з 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 і 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 розвитку1024 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 спадання 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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Абрагамович О.О. Процеси ліпідної пероксидації при хронічних ураженнях печінки / О.О. Абрагамович, О.І. Грабовська, О.І. Терлецька // Медична хімія. – 2000. – Т. 2, № 1. – С. 5–8.

2. Анисимова Н.Б. Сравнительная оценка фармакокинетических параметров риф- ампицина, изониазида и новых соединений, обладающих противотуберкулезной активностью: Автореф. дис. ... канд. биолог, наук: 14.00.25. – Ленинград, 1990. – 18 с.

3. А.с.№ 1084681 ссср, МКИ G № 33/48. Способ определения гидроперекисей липидов в биологических тканях / Мирончик В. В. (СССР). – № 3468369/28-13; заявл. 08.07.82 ; опубл. 07.04.84, Бюл. № 13.

4. Барабой В. А. Биоантиоксиданты / В. А. Барабой. – К.: Книга плюс, 2006. – 462 с.

5. Белоусов Л. В. Пособие к большому практикуму по эмбриологии / Л. В. Белоусов, Н. В. Дабяган, М. З. Чунаева. – М.: Изд-во МГУ, 1990. – Ч. 1. – 104 с.

6. Бериташвили Д. Р. Измерение содержания калия и натрия в зародышах костистых рыб и амфибий на ранних стадиях развития / Д. Р. Бериташвили, К. А. Кафиани, Н. Н. Ротт, И. Ш. Квавилашвили // Механизмы контроля раннего ембрионального развития. – М.: Наука, 1974. – С. 15–17.

7. Бєленічев І. Ф. Антиоксидантна система захисту організму (огляд) / І. Ф. Бєленічев, Є. Л. Левицький, Ю. І. Губський [та ін.] // Суч. пробл. токсикол. – 2002. – № 3. – С. 24–31.

8. Биохимическая фармакология: Учебн. пособие для вузов / колл, авторов под ред. П.В.Сергеева. – М.: Высш. Школа, 1982. – 343 с.

9. Біологічна доступність флуренізиду / Л.1. Петрух, О.І. Михалик, О.В. Проток, Н.1. Михайлюк // Тези доп. ЇХ Конгресу СФУЛТ. – Луганськ, 19–22.08.2002. – С. 467–468.

10. Бішко О.І. Вільнорадикальні процеси за введення щурам гістаміну та гіпохлориту натрію // Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук. – Львів–2016. 20 с.

11. 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, 2015р. – Луцьк: СНУ імені Лесі Українки, 28–30 травня, 2015 р. – С. 14.

12. 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 // Біол. Студії / Stud. Biologica.– 2016. – Т.10, №1. – С. 53–60.

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

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: зб. тез XIII Міжн. наук. конф. студ. і асп., Львів, 25-27 квітня 2017 р. – Львів, 2017. – С. 7–8.

15. 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: зб. тез XII Міжн. наук. конф. студ. та асп., Львів, 19–21 квітня 2016 р. – Львів, 2016. – С. 8–9.

16. 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: зб. тез XI Міжн. наук. конф. студ. та асп., Львів, 20–23 квітня 2015 р. – Львів, 2015. – С. 21–22.

17. Боднарчук Н.О. Морфологічні зміни зародків в'юна за дії флуренізиду / **Н.О. Боднарчук,** Л.І. Петрух, Д.І. Санагурський // Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Теорія та практика

сучасної морфології», м.Дніпро, 5–7 жовтня 2016 року. – С. 24.

18. 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.

19. 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.

20. 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.

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

22. Божкова В. П. Некоторые электрофизиологические характеристики дробящегося яйца аксолотля / В. П. Божкова, И. Ш. Квавилашвили, Л. М. Чайлахян // Цитология. – 1974. – Т. 16. – С. 590–596.

23. Божкова В. П. Специфическая роль ионов в предзародышевом развитии / В. П. Божкова, Л. М. Чайлахян // Внешняя среда и развивающийся организм. – М.: Наука, 1977. – С. 210–256.

24. Бурлака А. Р., Сидорик Е. П., Дружина Н. А. Кінетичні закономірності активності ферментативних антиоксидантних систем в органах при хімічному канцерогенезі молочних залоз і печінки. Доп. НАН України. – 1998. – № 11. – С. 177–181.

25. Васильева М.Ф. Хромотерапия // Мед. Картотека. – 2002. – № 2 (54). – С. 10–15.

26. Гелетій Є.М. Вплив препарату дистинол на стан ферментативної системи антиоксидантного захисту організму фазанів // Наук. вісник Львів. нац.

акад. ветеринар. медиц. ім. С. З. Гжицького. – 2006. – Т. 8, № 2 (29). – ч. 2, С. 27–31.

27. Гинзбург А.С. Оплодотворение у рыб и проблема полиспермии / А.С. Гінзбург.– М.: Наука, 1968. – 368 с.

28. Гложик І., Снітинський В., Іскра Р. Активність антиоксидантної системи в жуйних тварин залежно від фізіологічного стану // Вісник Львів. ун-ту. Сер. біологічна. – 2002. – Вип. 31. – С. 256–260.

29. Гойда Е. А. Биофизические аспекты раннего онтогенеза животных / Е. А. Гойда. – К.: Наук. думка, 1993. – 224 с.

30. Гойда Е. А. Новый подход к оценке взаимосвязи различных параметров влияющих на динамику трансмембранного потенциала у развивающихся зародышей вьюна / Е. А. Гойда, В. В. Ощаповский, Д. И. Санагурский // Биофизика. – 1996. – Т. 41, Вып. 2. – С. 393–399.

31. Гойда Е. А. Роль активности Na^+, K^+-АТФ-азы и уровня pH в регуляции ионной проводимости мембран эмбриональных клеток / Е. А. Гойда, И. Р. Медына, В. В. Чабан, Р. В. Тызьо // Цитология. – 1990. – Т. 32, № 9. – С. 924–925.

32. Головчак Н.П. Вплив гіпохлориту натрію на перекисне окиснення ліпідів і системи антиоксидантного захисту головного мозку тварин за експериментального Т-2 токсикозу // Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук. – Львів–2008. 24 с.

33. Голубій Є. М. Окисна модифікація білків як критерій глибини оксидативного стресу / Є. М. Голубій, І. Я. Коцюмбас, Г. І. Коцюмбас // Наук.-техніч. бюлетень. – 2006. – Вип. 7, № 8. – С. 308–323.

34. Грищенко В.А. Інтенсивність ліпопероксидації і стан антиоксидантної системи захисту в телят, перехворівших на диспепсію // Укр. біохім. ж-л. – 2004. – Т. 76, № 5. – С. 102–106.

35. Гудкова О. О. Каталаза печінки щурів за умов штучного гіпобіозу / О. О. Гудкова, Н. В. Латишко, Л. В. Гудкова, В. О. Михайловський // Укр. біохім. журн. – 2005. – Т. 21, № 1. – С. 28–34.

36. Данко И. М. Роль одновалентных катионов натрия и калия в регуляции клеточной профилерации и биосинтеза макромолекул / И. М. Данко, С. Д. Казьмин, Е. В. Колосов // Успехи современной биологии. – 1984. – Т. 97, Вып. 3. – С. 366–377

37. Данчук В.В. Пероксидне окиснення у сільськогосподарських тварин і птиці / В.В. Данчук. — Кам’янець-Подільський: Абетка, 2006. — 192 с. / Danchuk V.V. Peroksidne okisnennja u sil's'kogospodars'kih tvarin i ptici. / V.V. Danchuk. — Kam’janec'-Podil's'kij: Abetka, 2006. — 192 s.

38. Демура Т. А. Накопичення ТБК-активних продуктів в листках проростків кукурудзи за комплексного впливу кадмію та нікелю / Т. А. Демура // V Міжнар. наук. конф. «Промислова ботаніка: стан та перспективи розвитку». – 2007. – С. 143–146.

39. Драпак І.В., Зіменковський Б.С., Огурцов В.В. Квантово-хімічний аналіз будови протитуберкульозних засобів – похідних ізоніазиду // Фармацевтичний журн. – 2006. – №. – С.62–67.

40. Електронна будова і конформація похідних гідразиду ізонікотинової кислоти/ Нізельський Ю., Притикін Л., Петрух Л., Козак Н. // Матер. V Національного з'їзду фармацевтів України “Досягнення сучасної фармації та перспективи її роз-витку у новому тисячолітті”. – Харків, 1999. – С. 435–436.

41. Зинь А., Безкоровайний А., Гарасим Н., Кулачковський О., Санагурський Д. Морфологічні та ультраструктурні зміни у зародках в’юна впродовж ембріогенезу та за дії гіпохлориту натрію // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2014. – Випуск 67. – С. 18–28.

42. Зинь А., Головчак Н., Санагурський Д. Окисна модифікація білків у зародках в’юна *Misgurnus fossilis L.* упродовж ембріогенезу за дії гіпохлориту натрію. Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2013. Випуск 61. С. 11-19.

43. Зинь А.Р., Головчак Н.П., Тарновська А.В., Галан М.Б., Санагурський Д.І. Вплив гіпохлориту натрію на прооксидантно-

антиоксидантний гомеостаз зародків в'юна протягом раннього ембріогенезу // Біологічні студії/Studia Biologica. – 2012. – Т.6, №1. – С. 67–76.

44. Зинь А. Р., Мандзинець С. М., Головчак Н. П., Бура М. В., Санагурський Д. І. Активність Na^+, K^+-АТФ-ази мембран зародків в'юна впродовж раннього ембріогенезу за дії гіпохлориту натрію // Біологічні Студії. – 2011. – Т. 5, №3. – С. 59–66.

45. Капля А. А. Активность Na^+, K^+-АТФ-азы в колоректальной карциноме человека / А. А. Капля, А. Г. Кудрявцева, В. Ф. Горчев [и др.] // Укр. Биохим. Журнал. – 2006. – Т. 78, № 2. – С. 142–148.

46. Квавилашвили И. Ш. Исследование электрических свойств клеточных мембран в раннем эмбриогенезе вьюна: автореф. дис. на соискание ученой степени канд. биол. наук. / И. Ш. Квавилашвили. – Москва, 1971. – 25 с.

47. Клевета Г, Чайка Я, Старикович Л, Виговська Т. Дослідження окремих ферментів антиоксидантної системи ентероцитів тонкого кишківника щурів за умов низькоінтенсивного рентгенівського опромінення // Вісн Львів. Ун-ту. Серія біологічна. – 2002. – Вип. 29 – С. 39–45.

48. Коваленко М.М. Проблеми промислового виробництва та стандартизації субстанції флуренізиду. - Автореф. дис...канд. фармацевтичних, наук. – Харків, 2001. – 19 с.

49. Комитет по медицинской и микробиологической промышленности Украины. Фармакопейный комитет. Временная Фармакопейная Статья. 30.12.1999 г.

50. Корда М. М. Антирадикальна й антиоксидна активність N-(9-флуореніліден)-N'-ізонікотиногідразиду (флуренізиду) / М. М. Корда, Л. І. Петрух, І. В. Корда та ін. // Медична хімія. – 2000. – Т. 2, № 2. – С. 15–18.

51. Корда М. М. Вивчення антиоксидних властивостей флуренізиду / М. М. Корда, Л. І. Петрух, І. В. Корда // Здобутки клінічної та експериментальної медицини. – Вип. 5. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2000. – С. 502–505.

52. Королюк М. А. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, И. Г. Иванова, И. Г. Майорова [и др.] // Лабораторное дело. – 1988. – № 1. – С. 16–18.

53. Костюк В. А. Простой и чувствительной метод определения СОД, основанный на реакции окисления кверцитина / В. А. Костюк, А. И. Потапович, Ж. М. Ковалева // Вопросы мед. химии. – 1990. – Т. 36, № 2. – С. 88–91.

54. Костюк П. Г. Исследование физических и химических основ биологических процессов / П. Г. Костюк. – К.: Наук. думка, 1978. – С. 20–26.

55. Кубашко А. В. Антиоксидантні ензими в механізмах радіоіндукованого окисного стресу (ранній та віддалений періоди після опромінення) / А. В. Кубашко, Л. М. Овсяннікова, А. А. Чумак [та ін.] // Лабораторна діагностика. – 2011. – Т. 4, № 58. – С. 64–71.

56. Кузнецова Н. А. Фотокаталитическая генерация активних форм кислорода в биологических средах в методе фотодинамической терапии / Н. А. Кузнецова, О. Л. Калия // РХЖ. – 1998. – № 5. – С. 37–49.

57. Кукоба Т. В. Вплив ω-3 поліненасичених жирних кислот на перекисне окиснення ліпідів / Т. В. Кукоба, А. М. Шиш, О. О. Мойбенко // Фізіол. журн. – 2005. – Т. 51, № 1. – С. 26–31.

58. Кулинский В. И. Структура, свойства, биологическая роль и регуляция глутатионпероксидазы / В. И. Кулинский, Л. С. Колесниченко // Успехи современной биологии. – 1993. – Т. 113, № 1. – С. 107–122.

59. Курята А. В. Полипептидный и липидный состав мембран эритроцитов у пациентов с гипертонической болезнью с различной активностью Na^+, K^+ АТФазы / А. В. Курята, В. С. Недзвецкий // Укр. мед. часопис. – 1999. – № 3. – С. 138–141.

60. Ленинджер А. Биохимия. Молекулярные основы структуры и функций клетки - М.: изд-во “Мир”, 1974. – 957 с.

61. Лопина О. Д. Na^+, K^+–АТФаза: структура, механизм и регуляция активности / О. Д. Лопина // Биолог. Мембраны. – 1999. – Т. 16, № 6. – С. 584–603.

62. Лупан І.В., Авраменко О.В. Комп’ютерні статистичні пакети. – Кіровоград, 2010. – 218 с.

63. Луцик М. Д. Очистка и частичная характеристика плазматических мембран клеток зародышей вьюна / М. Д. Луцик, С. И. Кусень, А. В. Лук’яненко // Онтогенез. – 1986. – Т. 17, № 3. – С. 314–321.

64. Лущак В. И. Окислительный стресс и механизмы защиты от него у бактерий // Биохимия. – 2001. – Т. 66, № 5. – С. 592–609.

65. Мандзинець С.М. Вплив івермектину та його аналогів на функціональні властивості мембран зародків в’юна: автореф. дис. … канд. біол. наук: 03.00.02 / Мандзинець Світлана Михайлівна; Львівс. нац. ун-т ім. Івана Франка. – Л., 2009. – 20 с.

66. Мандзинець С. М., Кулачковський О. Р., Бура М. В. Зміни ультраструктурної організації клітин зародків в’юна за умов впливу авермектину // Цитологія і генетика. – 2011. – № 5. – С. 58–64.

67. Маслова Л. И. Синтез и превращения производных флуорена, обладающих биологической активностью: Автореф. дис. ... докт. фармацевтических наук - Харьков, 1990. - 39 с.

68. Мацьопа І. В., Григор’єва Н. П., Мещишин І. Ф. Адаптація антиоксидантної системи нирок щурів до різних світлових режимів за інтоксикації тетрахлорметаном та дії мелатоніну // Укр. біохім. ж-л. – 2010. – Т. 82, № 2. – С. 75–84.

69. Медына И. Р. Механочувствительные калиевые каналы – один из факторов колебаний потенциала покоя в раннем эмбриогенезе вьюна / И. Р. Медына, Е. А. Гойда, П. Д. Брежестовский // Биологические мембраны. – 1988. – Т. 5, № 9. – С. 960–969.

70. Мельник В. П. Мембранні електричні потенціали незапліднених і запліднених яйцеклітин коропа / В. П. Мельник // Фізіол. Журн. – 1971. – Т. 13, № 5. – С. 622–626.

71. Меньщикова Е. Б. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / Е. Б. Меньщикова, В. З. Ланкин, Н. К. Зенков [и др.]. – М.: Фирма «Слово», 2006. – 556 с.

72. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен): учеб. пособие / [под ред. М. И. Прохоровой]. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. – 272 с.

73. Методы эмбриологических исследований: учеб. пособие / [под ред. В.А. Голиченкова]. – М.: Изд-во МГУ, 1996. – 177 с.

74. Методы статистической обработки медицинских данных: Методические рекомендации для ординаторов и аспирантов медицинских учебных заведений, научных работников / сост.: А.Г. Кочетов, О.В. Лянг., В.П. Масенко, И.В.Жиров, С.Н.Наконечников, С.Н.Терещенко – М.: РКНПК, 2012. – 42 с.; Ромакін В.В. Комп'терний аналіз даних. – Миколаїв: Видавництво МДГУ ім. Петра Могили, 2006. – 150 с.

75. Михалик О. Сучасні лікарські засоби для хеміотерапії вірусних інфекцій. / О. Михалик – Львів, 2013. 180 с.

76. Михалик О.І. Розробка, дослідження і стандартизація твердої лікарської форми флуренізиду. - Автореф. дис...канд. фармацевтичних, наук. – Харків, 2003. – 19 с.

77. Моин В. М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в еритроцитах / В. М. Моин // Лабораторное дело. – 1986. – № 2. – С. 724–727.

78. Мохорт Н.А. Отчет о безвредности и специфической активности флуренизида - субстанции, ресинтезированной Киевским витаминным заводом. - Киев, 1999. – 35 с.

79. Мукалов И. О. Влияние ионов Ca^{2+} на термолюминесценцию, сопровождающую перекисное окисление липидов / И. О. Мукалов, Е. А. Гойда, С. И. Кусень [и др.] // Биофизика. – 1984. – Т. 29, № 1. – С. 60–64.

80. Мусил Я., Новакова О., Кунц К. Современная биохимия в схемах. – М.: изд-во "Мир", 1984. – 215 с.

81. Н. П. Головчак, А. В. Тарновська, Г. І. Коцюмбас, Д. І. Санагурський / Процеси перекисного окиснення ліпідів у живих організмах : монографія /.– Львів : ЛНУ імені Івана Франка, 2012. – 250 с.

82. Настасюк О.В., Андрусик І.Я. Використання хемілюмінесцентного методу у діагностиці ракової та туберкульозної патології // Пульсар (наук.-практ.журн.). – 1999. – №11. – С. 35–38.

83. Нейфах А. А. Молекулярная биология процессов развития / А. А. Нейфах. – М.: Наука, 1977. – 311 с.

84. Нізельський Ю., Козак Н. Флуренізид. Електронна будова, таутомерія та його властивості. – Праці Наукового товариства ім. Шевченка. Хемія і біохемія. Збірник на пошану Євгена Гладишевського. – Львів, 2005. – Т. XV. – С. 41–50.

85. О свойствах нового противомикробного препарата флуренизида/ Л.И. Петрух, Ю.Н. Низельский, О.И. Мыхалык, А.В. Пронюк // Тезы докладов IX Российского национального конгресса “Человек и лекарство”. – Москва, 8–12 апреля 2002. – С. 677.

86. Озернюк Н. Д. Изменения АТФ-азной активности в период оогенеза вьюна / Н. Д. Озернюк // Онтогенез. – 1971. – Т. 2, № 4. – С. 431–434.

87. Окань А. М. Оптимізація роботи Na^+, K^+-АТРази / А. М. Окань, Д. І. Санагурський // Харківський біофізичний вісник. – 2008. – Вип. 1, № 20. – С. 65–72.

88. Основи біофізики і біомеханіки: навч. посіб. / Л. І. Григор'єва, Ю. А. Томілін // Чорномор. держ. ун-т ім. Петра Могили. – Миколаїв / Вид-во ЧДУ ім. Петра Могили, 2011. – 297 с. – Бібліогр.: С.194-198.

89. 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: зб. тез III Міжн. наук. конф. студ. та асп., Львів, 23–27 квітня 2007 р. – Львів, 2007. – С. 20–21.

90. 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, Донецьк, 19–21 грудня, 2006 р. – Донецьк, 2006. – С.85–86.

91. 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.

92. Петрух Л. І. Фармацевтична освіта і мова. Здобутки наукової фармацевтичної діяльності / Л. І. Петрух. – Львів, 2011. – 152 с.

93. Петрух Л.І. Флуренізид для ветеринарної практики / Л.І. Петрух // Сучасні проблеми ветеринарної медицини, продукції тварин і технології : зб. матеріалів міжнародної науково-практичної конференції, 1997. – 216–217 с.

94. Петрух Л.І. Фруорени як туберкулостатики. Флуренізид: мікробіологічні, фармакологічні і клінічні аспекти / Л.І. Петрух ; Нац. ун-т «Львів. політехніка». – Львів : Вид-во Нац. ун-ту «Львів. політехніка», 2008. – 138–140 с.

95. Поберезкина Н. Б. Биологическая роль супероксиддисмутазы / Н. Б. Поберезкина, Л. Ф. Осинская // Украинский биохимический журнал. – 1989. – Т. 61, № 2. – С. 14–27.

96. Покатаєва М. І. Прооксидантна-антиоксидантна рівновага вегетативних органів трав'янистих рослин в умовах промислового Придніпров'я / М. І. Покатаєва, Г. С. Россихіна, Ю. В. Лихолат // Таврійський науковий вісник. – 2010. – Вип. 71, Ч. 3. – С. 140–145.

97. Ратич І. Б., Мартинюк У. А. Видові та органно-тканинні особливості антиоксидантного статусу у птахів // Наук. вісник Львів. нац. акад. ветерин. медиц. ім. С.З. Ґжицького. – 2006. – Т. 8, № 2(29). ч. 2. – С. 125–130.

98. Россихіна Г. С. Динаміка пероксидного окиснення ліпідів та активність антиоксидантних ферментів в рослинах гібридної кукурудзи за гербіцидної дії / Россихіна Г. С. // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2009. – Вип. 51. – С. 243–251.

99. Россихіна Г. С. Інтенсивність утворення прооксидантних компонентів в рослинах кукурудзи різної стійкості до дефіциту вологи та

гербіцидів / Г. С. Россихіна, О. М. Вінниченко, Ю. В. Лихолат // Науковий вісник Ужгородського університету. Серія біологія. – 2010. – Вип. 27. – С. 96–103.

100. Ротт Н. Н. Клеточные циклы в раннем эмбриональном развитии / Н. Н. Ротт. – М.: Наука, 1987. – 207 с.

101. Санагурський Д. І. Об’єкти біофізики. Львів. Видавничий центр ЛНУ ім. І. Франка, 2008, 522 с.

102. Санагурский Д. И. Трансмембранный потенциал в раннем эмбриогенезе вьюна (*Misgurnus fossilis* L.) при гормональных воздействиях: автореф. дис. На соискание ученой степени канд. биол. наук: спец. 03.00.02 «Биофизика» / Д. И. Санагурский – Киев, 1983. – 23 с.

103. Санагурський Д.І., Целевич М.В., Панич Н.О. Вивчення властивостей флуренізиду та вплив його на транспортні системи мембран (рукопис). – Львів, 2006. – 83 с.

104. Структура і електронна будова комплексів флуренізиду з металами / Нізельський Ю., Притикін Л., Петрух Л., Козак Н. // Матер. V Національного з'їзду фармацевтів України “Досягнення' сучасної фармації та перспективи її розвитку у новому тисячолітті”. – Харків, 1999. – С. 434–435.

105. Тарновська А. В. Перекисне окиснення ліпідів та антиоксидантний статус у зародків в’юна за умов впливу фторхінолонів / А. В. Тарновська, М. В. Дика, Д. І. Санагурський // Наук. вісн. Львів. акад. вет. медицини ім. С. З. Гжицького. – 2004. – Т. 6, № 1. – С. 260–266.

106. Тарновська А. В., Отчич В. П., Санагурський Д. І. Супероксиддисмутазна та каталазна активність у зародках в’юна за впливу флюміквілу // Експеримент. та клінічна фізіол. і біохім. – 2006. – № 4(36). – С. 7–10.

107. Тимирбулатов Р. А. Метод повышения интенсивности свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение / Р. А. Тимирбулатов, Е. И. Селезнев // Лабораторное дело. – 1981. – № 4. – С. 209–211.

108. Український протимікробний засіб / Л.1. Петрух, О.І. Михалик, О.В. Пронюк, М.М. Коваленко // Тези доп. IX Конгресу СФУЛТ. – Луганськ, 19–22.08.2002. – С. 467.

109. Фармакокинетика изониазида и рифампицина в эксперименте и клинике / Хоронько В.В., Васильєв С.И., Анисимова Н.Б., Чубарян В.Т. // Антибиотики и химиотерапияю. – 1988. – № 10. – С. 785–789.

110. Фещенко ЮЛ., Мельник В.М. Сучасні методи діагностики, лікування і профілактики туберкульозу. – К.: Здоров'я, 2002. – 904 с.

111. Хоронько В.В., Васильєв С.И., Анисимова Н.Б. Фармакокинетическое моделирование адаптационных систем организма при изучении распределения флурени-зида в организме // Механизмы интеграции биологических систем. Проблемы адаптации. Ростов на Дону. – 1988. – С. 69–72.

112. Целевич М. В. Ідентифікація Ca^{2+}-Активованої, Mg^{2+}-Залежної АТР-гідролазної ферментативної активності мікросомної фракції мембран зародків в'юна (*Misgurnus fossilis* L.) / М. В. Целевич, Р. В. Фафула, М. Б. Галан, Д. І. Санагурський // Укр. біохім. журн. – 2007. – Т. 79, № 1. – С. 53–57.

113. Целевич М. В. Кінетичні характеристики Na^{+}, K^{+}-АТФази клітин зародків в'юна / М. В. Целевич, С. М. Мандзинець, Д. І. Санагурський // Вісник Харківського університету ім. В. Н. Каразіна. – 2008. – Т. 1, № 20. – С. 29–36.

114. Шаповал Г. С. Механизмы антиоксидантной защиты организма при действии активных форм кислорода / Г. С. Шаповал, В. Ф. Громовая // Укр. біохім. журн. – 2003. – Т. 75, № 2. – С. 5–13.

115. Юровицкий Ю. Г. Динамика содержания липидов в эмбриональном и личиночном развитии лосося / Ю. Г. Юровицкий, З. А. Нефедова, В. С. Сидоров // Онтогенез. – 1996. – Т. 27, № 2. – С. 89–94.

116. Юшина О. Перекисне окиснення ліпідів і мембранний транспорт у зародках холоднокровних / О. Юшина // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2009. – Вип. 49. – С. 3–12.

117. Яблонська С. В., Філінська О. М., Островська Г. В. Оцінка гепатотоксичності нового похідного малеіміду з цитостатичною активністю і його вплив на пероксидне окислення та антиоксидантну систему печінки // Укр. біохім. ж-л. – 2009. – Т. 81, № 5. – С. 83–92.

118. Яремкевич О. Зміни динаміки мембранного потенціалу зародків в'юна під впливом тіосульфанатів / О. Яремкевич, М. Бура, С. Мандзинець [та ін.] // Вісн. національного ун-ту «Львівська політехніка»: Хімія, технологія речовин та їх застосування. – 2009. – № 644. – С. 78–85.

119. Яшина Л.А. Оценка эффективности и переносимости препарата Флуренизид таблетки по 0,15 г производства АО "Киевский витаминный завод" в лечении инфильтративного туберкулеза легких в фазе распада (Протокол клинического испытания по ограниченной программе). – Киев, 2000. – 22 с.

120. Яшина Л.А., Туманов А.М. Оцінка ефективності та переносимості флуренізиду в комплексній терапії у хворих на туберкульоз легень. Звіт про проведення обмежених клінічних випробувань препарату Флуренизид (таблетки по 0,15 г) виробництва АТ "Київський вітамінний завод". – Киев, 2000. – 17 с.

121. Activities of Superoxide Dismutase and Catalase in Erythrocytes and Plasma Transaminases of Goldfish (Carassius auratus gibelio Bloch.) Exposed to Cadmium / R.V. Zicic, A.S. Stajn, S.Z. Pavlovic, et al. // Physiol. Res. – 2001. – Vol. 50. – P. 105–111.

122. Agarwal A. Role of oxidative stress in female reproduction / A. Agarwal, S. Gupta, R. Sharma // Reprod. Biol. Endocrinol. – 2005. – Vol. 3. – P. 28.

123. Arkhipenko Yu. V. Mode of lipid peroxidation-induced inhibition of Na, K-ATPase / Yu. V. Arkhipenko, F. Z. Meerson, T. G. Sazontova, V. E. Kagan // Acta Physiol. Pharmacol. Bulg. – 1985. – Vol. 11, № 1. – P. 70–78.

124. Avers, Charlotte J. Molecular cell biology. – 1985. – 811 p.

125. Azzam E. I. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury / E. I. Azzam, J-P. Jay-Gerin, D. Pain // Cancer Lett. – 2012. – Vol. 327. – P. 48–60.

126. Balci M. Effects of mobile phones on oxidant/antioxidant balance in cornea and lens of rats / M. Balci, E. Devrim, I. Durak // Curr. Eye Res. – 2007. – Vol. 32, № 1. – P. 21–25.

127. Barteri M. Structural and kinetic effects of mobile phone microwaves on acetylcholinesterase activity / M. Barteri, A. Pala, S. Rotella // J. Biophys. Chem. – 2005. – Vol. 113, № 3. – P. 245–253.

128. Berg R. M. G. Neuro-oxidative-nitrosative stress in sepsis / R. M. G. Berg, K. Moller, D. M. Bailey // J. of Cerebral Blood Flow & Metabol. – 2011. – Vol. 31. – P. 1532–1544.

129. 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.

130. Boldyrev A. A. Na, K-ATPase the role of lipids and Mg ions in the activity regulation / A. A. Boldyrev, E. K. Rouge, I. N. Smirnova, M. Tabak // FEBS Letters. – 1977. – Vol. 80, № 2. – P. 303–307.

131. Boldyrev A. Effect of hydrogen peroxide and hypochlorite on the activity of brain Na, K-ATPase / A. Boldyrev, E. Bulygina, E. Volynskaya [et al.] // Biochemistry. – 1995. – Vol. 60. – P. 1810–1819.

132. Bosch-Morell F. 4-Hydroxynonenal inhibits glutathione peroxidase: protection by glutathione / F. Bosch-Morell, L. Flobe, N. Marin, F. J. Romero // Free Radic. Biol. Med. – 1990. – Vol. 26, № 11–12. – P. 1383–1387.

133. Brieger K. Reactive oxygen species: from health to disease / K. Brieger, S. Schiavone, F. J. Miller, K. H. Krause // Swiss. Med. Wkly. – 2012. – Vol. 142. – P. w13659.

134. Burlaka A. Overproduction of free radical species in embryonal cells exposed to low intensity radiofrequency radiation / A. Burlaka, O. Tsybulin, E. Sidorik [et al.] // Exp. Oncology. – 2013. – Vol. 35. – P. 219–225.

135. Chapple I. L. C. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction / I. L. C. Chapple, J. B. Matthews // Periodontology 2000. – Vol. 43. – P. 160–232.

136. Cheung P. H. Ca^{2+}-ATPase from rat parotid gland plasma membranes has the characteristics of an ecto-ATPase / P. H. Cheung, F. J. Dowd, J. E. Porter, L. S. A. Li // Cell Signal. – 1992. – Vol. 4, № 1. – P. 25–35.

137. Desai N. R. Pathophysiology of cell phone radiation: oxidative stress and carcinogenesis with focus on male reproductive system / N. R. Desai, K. K.Kesari, A. Agarwal // Reprod. Biol. Endocrinol. – 2009. – Vol. 7, № 1. – P.114–122.

138. Devine P. J. Roles of Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Ovarian Toxicity / P. J. Devine, S. D. Perreault, U. Luderer // Biol. Reproduction. – 2012. – Vol. 86, № 2. – P. 1–10.

139. Dizdaroglu M. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement / M. Dizdaroglu, P. Jaruga, M. Birincioglu, H. Rodriguez // Free Rad. Biol. Med. – 2002. – Vol. 32. – P. 1102–1115.

140. Dubinina E.E. Role of reactive oxygen species as signaling molecules in the metabolism tissues in a state of oxidative stress. Problems of Medical Chemistry, 2001; 76(6): 136– 141.

141. Evans W. H. Preparation and characterization of mammalian plasma membranes / W. H. Evans. – North-Holland Publ. Comp., Amsterdam, New York, 1978. – 266 p.

142. Ewart H. S. Hormonal regulation of the $Na(^{+})$-$K(^{+})$-ATPase:mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity / H. S. Ewart, A.Klip // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. – 1995. – Vol. 269. – P. 295–311.

143. Feng J. Identification of a functional thyroid hormone response element in the upstream flanking region of the human Na, K-ATPase beta 1 gene / J. Feng, J. Orlowski // Nucl. Acid. Res. – 1993. – Vol. 21, № 11. – P. 2619–2626.

144. Friedman J. Mechanism of short-term ERK activation by electromagnetic fields at mobile phone frequencies / J. Friedman, S. Kraus, Y. Hauptman [et al.] // Biochem. J. – 2007. – Vol. 405, № 3. – P. 559–568.

145. Fujimoto T. Developmental stages and germ cell lineage of the Loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) / T. Fujimoto, T. Kataoka, Sakao S. [et al.] // Zoological Science. – 2006. – Vol. 23. – P. 977–989.

146. Gamaley I. A. Cell-cycle-dependendent changes in membrane potential of L=929 cells caused by the effect of hydrogen peroxide / I. A. Gamaley, K. M. Kirpichnikova, I. V. Artzybasheva, I. V. Klyubin // Eur. J. Physiol. – 1999. – Vol. 438. – P. 113–115.

147. Ghiselli A. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data / A. Ghiselli, M. Serafini, F. Natella, C. Scaccini // Free Radic. Biol. Med. – 2000. – Vol. 29, № 11. – P. 1106–1114.

148. Griveau J. F. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defense systems in human spermatozoa / J. F. Griveau, E. Dumont, B. Renard [et al.] // J. Reprod. Fertil. – 1995. – Vol. 103. – P. 17–26.

149. Grune T. Oxidative Stress and Protein Oxidation / T. Grune, B. Catalgol, T. Jung // Protein Oxidation and Aging, First Ed. – John Wiley & Sons, Inc. – 2013. – 214 p.

150. Güler G. The effect of radiofrequency radiation on DNA and lipid damage in female and male infant rabbits / G. Güler, A. Tomruk, E. Ozgur [et al.] // Int. J. Radiat. Biol. – 2012. – Vol. 88, № 4. – P. 367–373.

151. Habig W.H. Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturie acid formation / W.H. Habig, M.J. Parst, W.B. Jakobv // Journal of Biological Chemistry. – 1974. – Vol. 249 (22). – P. 7130–7139.

152. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. In: free radical in the brain. Aging, neurological and mental disorders // B. Halliwell, L. Packer, L. Philipko, Y. Christen // Eds. Springer-Verlag, Berlin, N. Y., London. – 1992. – P. 21–40.

153. Huang T. T. Oxidative stress and adult neurogenesis – effects of radiation and superoxide dismutase deficiency / T. T. Huang, Y. Zou, R. Corniola // Semin. Cell. Dev. Biol. – 2012. – Vol. 23, № 7. – P. 738–744.

154. Huang W. H. Different sensitivities of the Na^+/K^+-ATPase isoforms to oxidants / W. H. Huang, Y. Wang, A. Askari [et al.] // Biochim. Biophys. Acta, Biomembranes. – 1994. – Vol. 1190, № 1. – P. 108–114.

155. Hybertson B. M. Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation / B. M. Hybertson, B. Gao, S. K. Bose, J. M. McCord // Molecular Aspects of Medicine. – 2011. – Vol. 32, № 4–6. – P. 234–246.

156. Jaffe L. F. Calcium explosions as triggers of development / L. F. Jaffe // Ann. N. G. Acad. Sci. – 1980. – Vol. 339. – P. 86–101.

157. Jorgensen P. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions / P. Jorgensen, K. Hakansson, S. Karlish // Annu. Rev. Physiol. – 2003. – Vol. 65. – P. 817–849.

158. Kesari K. K. Cell phone radiation exposure on brain and associated biological systems / K. K. Kesari, M. H. Siddiqui, R. Meena [et al.] // Indian J. Exp. Biol. – 2013. – Vol. 51, № 3. – P. 187–200.

159. Kobayashi T. Ultrastructural localization of superoxide dismutase in human skin / T. Kobayashi, N. Saito, N. Takemori [et al.] // Acta Derm. Venerol. – 1993. – Vol. 73. – P. 41–45.

160. Kovalyschyn V.I., Fedevych S.V., Brahinets O.G., Kozak L.P., Melnyk O.I., Konyk U.V., Nektegayev I.O. Development of trombino- and plazmino-dependent of coagulative dystrophy ultrastructures of kidney bark at the terms of experiment // Exp., clin. physiol. and biochem. – 2007. – № 3. – P. 45–58.

161. Kukreja R. C. Sarcolemmal Na, K-ATPase: Inactivation by neutrophilderived free radicals and oxidants / R. C. Kukreja, A. B. Weaver, M. L. Hess // Am. J. of Physiol. – 1990. – Vol. 259. – P. 1330–1336.

162. Lai C.C., Huand W., Askari A. Differential regulation of superoxide dismutase in copper deficient rat organs // Free Radic. Biol. and Med. – 1994. – Vol. 16. – P. 613–620.

163. Lane D.P. Guardian of the genom // Nature. – 1992. – Vol. 358, № 141. – P. 15–16.

164. Lee J. C. Oxidative stress and metal carcinogenesis / J. C. Lee, Y. O. Son, P. Pratheeshkumar, X. Shi // Free Radic. Biol. Med. – 2012. – Vol. 53. – P. 742–757.

165. Leong P. K. Metabolic importance of Na^+/K^+-ATPase activity during sea urchin development / P. K. Leong, D. Manahan // J. Exp. Biol. – 1997. – Vol. 200, № 15. – P. 2881–2892.

166. Limon-Pacheco J. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress / J. Limon-Pacheco, M. E. Gonsebatt // Mutation Research. – 2009. – Vol. 674. – P. 137–147.

167. Loewenstein W. R. Junctional intercellular communication and the control of growth / W. R. Loewenstein // Biochim. Biophys. Acta. – 1979. – Vol. 560, № 1. – P. 1–65.

168. Lowry O.H., Rosenbrough N.G., Farr A.L., Randall R.C. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193. – P. 265–275.

169. Marino D. A burst of plant NADPH oxidases / D. Marino, C. Dunand, A. Puppo, N. Pauly // Trends Plant. Sci. – 2012. – Vol. 17, № 1. – P. 9–15.

170. Mitsunaga-Nakatsubo K. Change in the activity of Na^+, K^+-ATPase in embryos on the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*, during early development / K. Mitsunaga-Nakatsubo, A. Fujiwara, L. Yasumasu // Dev. Growth. Differ. – 1992. – Vol. 34, № 4. – P. 379–385.

171. Mollah M. F. A. Embryonic and larval development of critically endangered riverine catfish *Rita rita* / M. F. A. Mollah, K. Taslima, H. Rashid [et al.] // EurAsian Journal of Biosci. – 2011. – Vol. 5. – P. 110–118.

172. Muller F. L. Trends in oxidative aging theories / F. L. Muller, M. S. Lustgerten, Y. Jang [et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 2007. – Vol. 43, № 4. – P. 477–503.

173. Naziroğlu M. Role of melatonin on electromagnetic radiation-induced oxidative stress and Ca^{2+} signaling molecular pathways in breast cancer /

M. Naziroğlu, S. Tokat, S. Demirci // J Recept Signal Transduct Res. – 2012. – Vol. 32. – P. 290–297.

174. Naziroglu M. Recent reports of Wi-Fi and mobile phone induced radiation on oxidative stress and reproductive signaling pathways in females and males / M. Naziroglu, M. Yuksel, S. A. Kose, M. O. Ozkaya // Journal of Membrane Biology. – 2013. – Vol. 246. – P. 869–875.

175. Oktem F. Oxidative damage in the kidney induced by 900-MHz-emitted mobile phone: protection by melatonin / F. Oktem, F. Ozguner, H. Mollaoglu [et al.] // Arch Med Res. – 2005. – Vol. 36, № 4. – P. 350–355.

176. Pastor N. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP–DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding / N. Pastor, H. Weinstein, E. Jamison, M. Brenowitz // Mol. Biol. – 2000. – Vol. 304. – P. 55–68.

177. Petruch L.I. The urgency of the creation and implementation of industrial production of new medicines / L.I. Petruch // Collection descriptions of inventions. – 2003. – № 2. – 198 p.

178. Pigeolet E. Glutatione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals / E. Pigeolet, P. Corbisier, A. Houbion [et al.] // Mech. Ageing Dev. – 1990. – Vol. 51, № 3. – P. 283–297.

179. Pshechenko N.V., Bondarenko V.A., Mareshina T.A. Correction of the antioxidation system preparation of липосом as method of treatment of infectious diseases // *Biolog. Announcer*. – 2001. – Vol. 5, № 1–2. – P. 64–67.

180. Shahin S. 2.45 GHz microwave irradiation-induced oxidative stress affects implantation or pregnancy in mice, Mus musculus / S. Shahin, V. P. Singh, R. K Shukla [et al.] // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2013. – Vol. 169, № 5. – P. 1727–1751.

181. Siomek A. NF- κβ signaling pathway and free radical impact / A. Siomek // Acta Biochimica Polonica. – 2012. – Vol. 59, № 3. – P. 323–331.

182. Spitzer N. C. Outside and in: development of neuronal excitability / N. C. Spitzer, P. A. Kingston, T. J. Manning, M. W. Conklin // Curr. Opin. Neurobiol. – 2002. – Vol. 12. – P. 315–323.

183. Toyoshima C. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution / C. Toyoshima, M. Nakasako, H. Nomura [et al.] // Nature. – 2000. – Vol. 405. – P. 647–655.

184. Turrens J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species / J. F. Turrens // J. Physiol. – 2003. – Vol. 552. – P. 335–344.

185. Valente R. C. Mechanism of ouabain toxicity / R. C. Valente, L. S. Capella, R. Q. Monteiro // Faseb. J. 2003. – Vol. 17, № 12. – P. 1700–1702.

186. Wu B. J. Molecular activiti of Na^+, K^+ ATPase from different sources is related to the packing of membrane lipids / B. J. Wu, P. L. Else, L. H. Storlien [et al.] // J. Exp. Biol. – 2001. – Vol. 204. – P. 4271–4280.

187. Xie Z. Na^+ /K^+ -ATPase as a signal transducer / Z. Xie, A. Askari // Eur. J. Biochem. – 2002. – Vol. 269, № 10. – P. 2434–2439

188. Yablonska S., Filinska O., Lynchak O., Ostrovska G. Liver's damage and glutathione antioxidant system after treatment with the colon carcinogen 1,2-dimethylhydrazine and novel cytostatic maleimide derivative // *The Ukr. Biochem. J.* VII Parnas Conference. – 2009. – Vol. 81, № 4. – P. 275.

189. Yu S. P. Na^+, K^+-ATPase: the new face of an old player in pathogenesis and apoptotic/hybrid cell death / S. P. Yu // Biochem Pharmacol. – 2003. – Vol. 66, № 8. – P. 1601–1609

Додаток А

Таблиця 1.

Кластерний аналіз досліджуваних показників на етапі розвитку зародків в'юна 2 бластомери за впливу флуренізиду (усереднені значення експериментальних даних, згрупованих в кластери)

Кластери		ТВК	GP	SOD	КАТ	GPO	GST
1	M	1,14	5,47	$5,46*10^3$	0,19	145,9	4,1
	n	2	2	2	2	2	2
	m	0,11	1,52	$7,7*10^2$	0,02	66,9	1,4
	t	*		*	*		
2	M	0,83	3,88	$1,21*10^4$	0,3	422,8	11,7
	n	1	1	1	1	1	1
	m						
	t						
3	M	1,41	2,1	$4,56*10^3$	0,07	94,5	2,7
	n	2	2	2	2	2	2
	m	0,25	0,89	$2,34*10^3$	0,05	8,5	0,4
	t					*	*
4	M	0,61	10,12	$5,32*10^3$	0,05	136,5	2,5
	n	2	2	2	2	2	2
	m	0,09	0,86	$1,43*10^3$	0,02	61,8	0,6
	t	*	*				
Серед-нє за усіма кластерами	M	1,02	5,61	$6,11*10^3$	0,13	168,1	4,3
	n	7	7	7	7	7	7
	m	0,14	1,34	$1,18*10^3$	0,04	47,7	1,3

Таблиця 2.

Кластерний аналіз досліджуваних показників на етапі розвитку зародків в'юна 16 бластомерів за впливу флуренізиду (усереднені значення експериментальних даних, згрупованих в кластери)

Кластери		TBK	GP	SOD	KAT	GPO	GST
1	M	0,6	7,23	$6,5*10^3$	0,16	41,9	3,7
	n	1	1	1	1	1	1
	m						
	t						
2	M	1,28	40,1	$1,5*10^3$	0,15	76,3	3,15
	n	4	4	4	4	4	4
	m	0,04	4,7	$1,4*10^2$	0,002	8,9	0,39
	t	***	**	**	***	**	**
3	M	1,02	33,2	988,3	0,09	48,1	2,1
	n	1	1	1	1	1	1
	m						
	t						
4	M	0,54	39,6	$5,9*10^3$	0,2	81,8	2,4
	n	1	1	1	1	1	1
	m						
	t						
Середнє за усіма кластерами	M	1,04	34,3	$6,11*10^3$	0,15	68,1	2,96
	n	7	7	7	7	7	7
	m	0,13	5,26	$1,18*10^3$	0,013	7,7	0,3

Таблиця 3.

Кластерний аналіз досліджуваних показників на етапі розвитку зародків в'юна 64 бластомери за впливу флуренізиду (усереднені значення експериментальних даних, згрупованих в кластери)

Кластери		TBK	GP	SOD	KAT	GPO	GST
1	M	0,6	6,3	$6,7*10^3$	0,24	210,6	3,9
	n	1	1	1	1	1	1
	m						
	t						
2	M	1,36	22,4	$4,3*10^3$	0,08	127,6	3,86
	n	4	4	4	4	4	4
	m	0,16	7,8	$5,34*10^2$	0,02	13,9	0,46
	t	**		**	*	**	**
3	M	2,2	7,3	$9,12*10^3$	0,16	165,2	6,4
	n	1	1	1	1	1	1
	m						
	t						
4	M	1,8	7,01	$3,6*10^3$	0,14	261,5	4,6
	n	1	1	1	1	1	1
	m						
	t						
Серед-нє за усіма кластерами	M	1,4	15,7	$5,27*10^3$	0,12	163,9	4,34
	n	7	7	7	7	7	7
	m	0,21	5,2	$7,94*10^2$	0,03	21,4	0,4

Таблиця 4.

Кластерний аналіз досліджуваних показників на етапі розвитку зародків в'юна 256 бластомерів за впливу флуренізиду (усереднені значення експериментальних даних, згрупованих в кластери)

Кластери		TBK	GP	SOD	KAT	GPO	GST
1	M	0,59	5,53	$3,1*10^3$	0,15	54,1	6,2
	n	1	1	1	1	1	1
	m						
	t						
2	M	0,77	2,21	$4,3*10^3$	0,03	76,2	4,8
	n	2	2	2	2	2	2
	m	0,02	0,03	$4,4*10^2$	0,013	14,9	0,4
	t	**	**	*			*
3	M	0,74	1,8	$1,85*10^3$	0,1	60,9	3,91
	n	1	1	1	1	1	1
	m						
	t						
4	M	0,83	1,5	$3,25*10^3$	0,2	119	3,6
	n	2	2	2	2	2	2
	m	0,18	0,5	$7,2*10^2$	0,02	5,5	0,2
	t				*	**	**
5	M	0,3	0,44	$5,2*10^3$	0,24	138,2	4,3
	n	1	1	1	1	1	1
	m						
	t						
Серед-нє за усіма кластерами	M	0,7	2,2	$3,6*10^3$	0,13	92	4,5
	n	7	7	7	7	7	7
	m	0,09	0,61	$4,5*10^2$	0,03	13	0,4

Таблиця 5.

Кластерний аналіз досліджуваних показників на етапі розвитку зародків в'юна 1024 бластомери за впливу флуренізиду (усереднені значення експериментальних даних, згрупованих в кластери)

Кластери		ТВК	GP	SOD	KAT	GPO	GST
1	M	0,54	1,93	$3,67*10^3$	0,27	146,6	7,15
	n	1	1	1	1	1	1
	m						
	t						
2	M	0,92	5,76	$1,33*10^4$	0,77	188,82	7,17
	n	2	2	2	2	2	2
	m	0,01	0,53	$1,78*10^3$	0,14	28,1	0,4
	t	***	**	*		*	**
3	M	0,86	4,23	$2,5*10^3$	0,27	92,09	6,59
	n	1	1	1	1	1	1
	m						
	t						
4	M	1,08	6,58	$1,39*10^3$	0,18	72,63	2,32
	n	1	1	1	1	1	1
	m						
	t						
5	M	0,4	3,44	$1,57*10^3$	0,19	90,86	2,94
	n	2	2	2	2	2	2
	m	0,004	0,46	72,99	0,06	4,49	0,22
	t	***	*	**		**	**
Середнє за усіма кластерами	M	0,73	4,45	$5,32*10^3$	0,38	124,38	5,18
	n	7	7	7	7	7	7
	m	0,11	0,64	$2,11*10^3$	0,11	19,75	0,88

Додаток Б

Список публікацій здобувача

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.

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.

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.

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 // Біол. Студії / Stud. Biologica.– 2016. – Т.10, №1. – С. 53–60.

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.

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, Донецьк, 19–21 грудня, 2006 р. – Донецьк, 2006. – С.85–86, форма участі заочна.

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: зб. тез III Міжн. наук. конф. студ. та асп., Львів, 23–27 квітня 2007 р. – Львів, 2007. – С. 20–21, форма доповіді стендова.

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: зб. тез XI Міжн. наук. конф. студ. та асп., Львів, 20–23 квітня 2015 р. – Львів, 2015. – С. 21–22, форма доповіді стендова.

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, 2015р. – Луцьк: СНУ імені Лесі Українки, 28–30 травня, 2015 р. – С. 14, форма участі заочна.

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: зб. тез XII Міжн. наук. конф. студ. та асп., Львів, 19–21 квітня 2016 р. – Львів, 2016. – С. 8–9, форма доповіді усна.

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

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

13. Боднарчук Н.О. Ультраструктурні зміни зародків в'юна за дії флуренізиду / **Н.О. Боднарчук,** О.Р. Кулачковський, С.М. Мандзинець, Д.І. Санагурський // Збірник наукових праць за матеріалами XIV міжрегіональної наукової конференції "Актуальні питання біології та медицини", м. Старобільськ, 22–23 грудня 2016 року. – С. 18–20, форма участі заочна.

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: зб. тез XIII Міжн. наук. конф. студ. і асп., Львів, 25-27 квітня 2017 р. – Львів, 2017. – С. 7–8, форма доповіді усна.

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.