

КЛАСТЕРНИЙ АНАЛІЗ ВПЛИВУ ФЛУРЕНІЗИДУ НА ПОКАЗНИКИ СТАНУ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ЗАРОДКІВ В'ЮНА

Н. Боднарчук, Н. Гарасим, Д. Санагурський

*Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: nataljabodnarchuk@ukr.net*

Експерименти проводили на зародках в'юна *Misgurnus fossilis* L. Після запліднення відмиті зиготи інкубували у фізіологічному розчині Гольтфретера, який містив розчин флуренізиду в концентраціях 0,01; 0,05; 0,15; 1; 5; 15 мМ. Зародки в'юна відбирали через 60, 150, 210 і 330 хв після запліднення яйцеклітин, що відповідали першому (2 бластомери), четвертому (16 бластомерів), шостому (64 бластомери), восьмому (256 бластомерів) і десятому (1024 бластомери) дробленню зиготи. Інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів оцінювали за вмістом первинних – гідропероксидів ліпідів, і вторинних продуктів ліпопероксидації. Стан антиоксидантної системи вивчали за активністю супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази та глутатіон-S-трансферази. Кластерний аналіз проводили для виявлення етапів розвитку, на яких є однакові зміни вмісту гідропероксидів ліпідів, ТБК-позитивних продуктів, активності супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази та глутатіон-S-трансферази. Застосувавши кластерний аналіз, уперше встановили, що до стадії 64-х бластомерів усі експериментальні групи за досліджуваними показниками були розділені на 4 групи подібності. Виявлено, що флуренізид у концентрації 0,05 мМ на етапі 2 бластомерів не чинить значного впливу на показники. Флуренізид у максимальних досліджуваних концентраціях (5 та 15 мМ) зумовлює достовірне зниження (порівняно з контролем) вмісту ТБК-позитивних продуктів, підвищення вмісту гідропероксидів ліпідів та зменшення активності каталази, глутатіонпероксидази і глутатіон-S-трансферази. На етапі розвитку 256 і 1024 бластомерів усі досліджувані групи за показниками розподіляються вже на 5 груп подібності, що свідчить про зміну впливу флуренізиду на цих етапах розвитку зародків в'юна. Зокрема, на етапі розвитку 1024 бластомери флуренізид у концентрації 1 мМ зумовлює більш виражене зростання інтенсивності вільнорадикальних процесів, а також зниження активності супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази та глутатіон-S-трансферази. Відомо, що дана концентрація – добова терапевтична доза для дорослого організму. Ймовірно, вона є шкідливою для зародкових клітин в'юна, адже стимулює процеси пероксидного окиснення ліпідів і пригнічує антиоксидантну систему. Встановлено, що флуренізид у концентраціях 5 і 15 мМ спричиняє зростання вмісту гідропероксидів, зниження активності супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази та глутатіон-S-трансферази. Проте цей вплив є менш виражений, порівняно з дією флуренізиду у концентрації 1 мМ.

Ключові слова: зародки в'юна, флуренізид, пероксидне окиснення ліпідів

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 чи ознак у кластери, виконувати одночасне об'єднання об'єктів дослідження й ознак.

Групування ознак у кластери застосовується на досить однорідній (щодо спостережень або об'єктів дослідження) вибірці з метою пошуку невідомих закономірностей

зв'язку ознак (або груп ознак). Результатом може бути формування кількох груп ознак, у кожній із яких містяться ознаки, що виявили статистично значущі взаємозв'язки [11].

Флуренізид (N-9-флуореніліден-N'-ізонікотиногідрозиду, рис. 1) – є українським препаратом з протимікробною, протитуберкульозною, антихламідійною, імуномодулюючою, антиоксидантною, гепатопротекторною, протизапальною, противірусною дією [10, 15].

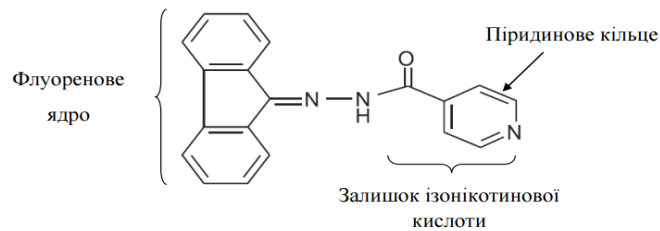


Рис. 1. Структурна формула флуренізиду

Відомо, що він не чинить негативного впливу на рівень еритроцитів, гемоглобіну і тромбоцитів периферичної крові, функцію печінки та нирок. Припускають, що механізм його дії полягає у здатності проникати крізь цитоплазматичну мембрану клітини (оскільки має низьку молекулярну масу) в цитоплазму і зв'язуватися зі специфічним рецептором. Утворений активований комплекс “флуренізид-рецептор” проникає у ядро клітини, зв'язується з ДНК і стимулює експресію генів. У результаті трансляції РНК за дії флуренізиду на рибосомах синтезуються різні регуляторні білки. Найважливішим із них є ліпокортин, який пригнічує фосфоліпазу A2 і, таким чином, пригнічує синтез простагландинів і лейкотрієнів [9]. Останні відіграють вирішальну роль у розвитку запалення. Флуренізид виявляє протизапальну дію в лікарській формі розчину та суспензії. Проте на сьогодні залишається недостатньо вивченою його дія на вільнорадикальні процеси клітин [10, 15]. 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 і як моделі ізольованої клітини, і як об'єкта раннього розвитку організму [13].

Мета нашої роботи – за допомогою кластерного аналізу виявити особливості впливу флуренізиду на показники вільнорадикальних процесів у зародках в'юна.

Матеріали та методи

Експерименти проводили на зародках в'юна *Misgurnus fossilis* L., які отримували і запліднювали за методикою Нейфаха [8]. Стадії розвитку контролювали візуально під бінокулярним мікроскопом МБС-9. Через 5–10 хв після запліднення відмиті зиготи інкубували у фізіологічному розчині Гольтфретера (CaCl_2 – 1,8 ммоль/л, NaCl – 110 ммоль/л, KCl – 1,4 ммоль/л, трис- HCl – 5 ммоль/л, $t=20\text{--}22$ °C), який містив розчин флуренізиду (використовували новосинтезовану професором Л.І. Петрух у Львівському національному медичному університеті імені Данила Галицького речовину) в концентраціях 0,01; 0,05; 0,15; 1; 5; 15 мМ. Флуренізид у концентрації 1 мМ є добовою терапевтичною дозою для організму (за хламідійного ендocerвітиту, уретриту, ендометриту). Зародки в'юна відбирали через 60, 150, 210 і 330 хв після запліднення яйцеклітин, що відповідали першому (2 бластомери), четвертому (16 бластомерів), шостому (64 бластомери), восьмому (256 бластомерів) і десятому (1024 бластомери) дробленню зиготи.

Інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) оцінювали за вмістом первинних – гідропероксидів ліпідів (ГП) [1] і вторинних продуктів ліпопероксидації

(ТБК-позитивних продуктів) [12]. Стан антиоксидантної системи (АОС) вивчали за активністю супероксиддисмутази (СОД) [6], каталази (КАТ) [5], глутатіонпероксидази (ГПО) [7] та глутатіон-S-трансферази (ГТ) [14].

Кластерний аналіз проводили для виявлення етапів розвитку, на яких є однакові зміни вмісту ГП, ТБК-позитивних продуктів, активності СОД, КАТ, ГПО та ГТ, використовуючи пакет прикладних програм SPSS (Statistics17). У кожному кластері обчислювали M (середнє арифметичне), m (похибка середнього арифметичного) відповідно до кожної досліджуваної ознаки. Результати дослідження перевіряли на достовірність, застосовуючи коефіцієнт Стьюдента.

У ході виконання кластерного аналізу проводять п'ять кроків: 1) відбір вибірки для кластеризації; 2) визначення множини ознак, за якими будуть оцінювати об'єкти у вибірці, та способу їхньої стандартизації; 3) обчислення 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'єкта. На першому кроці два сусідні кластери об'єднуються в один; цей процес може тривати до тих пір, поки не залишаться тільки два кластери. Відстань між кластерами є середнім значенням усіх 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. Оптимальною є кількість кластерів, що дорівнює різниці кількості спостережень і кількості кроків, після якої коефіцієнт збільшується стрибкоподібно [11].

Результати і їхнє обговорення

Застосувавши кластерний аналіз, встановили, що до стадії 64-х бластомерів усі експериментальні групи за досліджуваними показниками (ГП ліпідів, ТБК-позитивні продукти, СОД, КАТ, ГПО, ГТ) 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 контрольних (на стадії 2 бластомерів). Експериментальна група клітин зародків на стадії розвитку 2 бластомери за дії флуренізиду у концентрації 0,05 мМ належить до першої градації подібності, як і контрольна група [2].

На етапі розвитку 256 і 1024 бластомерів за допомогою кластерного аналізу виявлено, що всі досліджувані групи за показниками розподіляються на 5 градацій подібності (кластерів), а це свідчить про певну зміну впливу флуренізиду на зародки в'юна. Зокрема, такий «особливий» вплив притаманний флуренізиду в концентраціях 5 і 15 мМ на етапі розвитку 1024 бластомери, який виявляється підвищенням вмісту ГП ліпідів, зростанням активності СОД і зниженням активності ГПО та ГТ (табл. 1).

Виконавши кластерний аналіз, підтвердили, що на етапі розвитку 2 бластомерів флуренізид у максимальних досліджуваних концентраціях (5 та 15 мМ) зумовлює достовірне зниження (порівняно з першим кластером – контролем) вмісту ТБК-позитивних продуктів, підвищення вмісту ГП ліпідів і зменшення активності КАТ, ГПО, ГТ (четвертий кластер; табл. 2).

Таблиця 1

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
Розподіл експериментальних груп по кластерах					
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

Виявлено особливий вплив флуренізиду в концентрації 0,01 мМ на етапі розвитку 2 бластомери (показники досліджень формують другий кластер), за якої 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 ферменти ГПО і ГТ, а також знижує вміст супероксид-аніон радикала, про що свідчить зниження активності СОД. Даний ефект впливу сполуки на прооксидантно-антиоксидантний стан зародків є позитивним явищем. Флуренізид у найнижчій концентрації виявляє антиоксидантні властивості (табл. 2).

Таблиця 2

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

Кластери	ТБК-позитивні продукти, мкмоль/мг білка	ГП ліпідів, ум.од/мг білка	СОД, од.активності/мг білка	КАТ, мкмоль H ₂ O ₂ /хв мг білка	ГПО, мкмоль G-SH/хв мг білка	ГТ, мкмоль 1-хлор-2,4-динітробензол/хв мг білка
1	M±m 1,14±0,11*	5,47±1,52	5460,00±770,00*	0,19±0,02*	145,90±66,90	4,10±1,40
n	2	2	2	2	2	2
2	M±m 0,83	3,88	12100,00	0,30	422,80	11,70
n	1	1	1	1	1	1
3	M±m 1,41±0,25	2,10±0,89	4560,00±2340,00	0,07±0,05	94,50±8,50*	2,70±0,40*
n	2	2	2	2	2	2
4	M±m 0,61±0,09*	10,12±0,86*	5320,00±1430,00	0,05±0,02	136,50±61,80	2,50±0,60
n	2	2	2	2	2	2

На етапі розвитку 16 бластомерів виявлено однотипні зміни показників вільнорадикальних процесів за впливу флуренізиду в більшості досліджуваних концентрацій (0,01; 0,05; 0,15; 5 мМ), а саме підвищення вмісту ТБК-позитивних продуктів, ГП, зростання активності ГПО, інгібування СОД і ГТ. Досліджувані показники за впливу флуренізиду в зазначених концентраціях об'єднані у другий кластер (табл. 3).

Речовина у концентраціях 0,05 та 0,15 мМ на етапі розвитку 64 бластомери здійснює відмінний вплив на показники, порівняно з іншими концентраціями, значення яких об'єднуються у третій і четвертий кластери, відповідно. На фоні збільшення вмісту продуктів ліпопероксидації флуренізид у концентрації 0,05 мМ зумовлює зростання активності СОД, ГТ і зниження активності ГПО, тоді як досліджувана речовина у концентрації 0,15 мМ зумовлює зниження активності СОД і зростання активності ГПО. Отже, флурені-

зид у концентрації 0,15 мМ знижує рівень супероксид-аніон радикала та пероксиду гідрогену. Досліджувана субстанція в концентраціях 0,05 і 0,15 мМ веде до незначного зростання вмісту первинних і вторинних продуктів ліпопероксидації, порівняно з впливом інших концентрацій (табл. 4).

Таблиця 3

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

Кластери	ТБК- позитивні продукти, мкмоль/мг білка	ГП ліпідів, ум.од/мг білка	СОД, од.активності/ мг білка	КАТ, мкмоль H ₂ O ₂ /хв мг білка	ГПО, мкмоль G-SH/хв мг білка	ГТ, мкмоль 1-хлор-2,4- динітробензол/ хв мг білка
1 M	0,60	7,23	6500,00	0,16	41,90	3,70
n	1	1	1	1	1	1
2 M± m	1,28±0,04***	40,10±4,70**	1500,00±140**	0,15±0,01***	76,30±8,90**	3,15±0,39**
n	4	4	4	4	4	4
3 M	1,02	33,20	988,30	0,09	48,10	2,10
n	1	1	1	1	1	1
4 M	0,54	39,60	5900,00	0,20	81,80	2,40
n	1	1	1	1	1	1

Таблиця 4

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

Кластери	ТБК- позитивні продукти, мкмоль/мг білка	ГП ліпідів, ум.од/мг білка	СОД, од.активності/мг білка	КАТ, мкмоль H ₂ O ₂ /хв мг білка	ГПО, мкмоль G-SH/хв мг білка	ГТ, мкмоль 1-хлор-2,4- динітробензол/ хв мг білка
1 M	0,60	6,30	6700,00	0,24	210,60	3,90
n	1	1	1	1	1	1
2 M± m	1,36± 0,16**	22,40±7,80	4300,00±534,00**	0,08±0,02*	127,60±13,90**	3,86±0,46**
n	4	4	4	4	4	4
3 M	2,20	7,30	9120,00	0,16	165,20	6,40
n	1	1	1	1	1	1
4 M	1,80	7,01	3600,00	0,14	261,50	4,60
n	1	1	1	1	1	1

На етапі розвитку 256 бластомерів увагу привертають показники за впливу флуренізиду різних концентрацій у другому і п'ятому кластерах. Так, до другого кластеру ввійшли показники за впливу флуренізиду в 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, зниження ГП ліпідів, тоді як у п'ятому – значне зниження кількості як первинних, так і вторинних продуктів ліпопероксидації, а також значне зростання активності ГПО (табл. 5). Це свідчить про негативний вплив флуренізиду в максимальній досліджуваній концентрації, оскільки відомо, що процеси ліпопероксидації, які перебувають на рівні контролю, потрібні для нормального функціонування клітин, зокрема, для роботи мембранопов'язаних ензимів. Зниження інтенсивності процесів ліпопероксидації змінює жорсткість мембрани, що відобразатиметься на її функціонуванні.

Таблиця 5

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

Кластери	ТБК- позитивні продукти, мкмоль/мг білка	ГП ліпідів, ум.од/мг білка	СОД, од.активності/мг білка	КАТ, мкмоль H ₂ O ₂ /хв мг білка	ГПО, мкмоль G-SH/хв мг білка	ГТ, мкмоль 1-хлор-2,4- динітробензол/ хв мг білка
1 М	0,59	5,53	3100,00	0,15	54,10	6,20
n	1	1	1	1	1	1
2 M± m	0,77±0,02**	2,21±0,03**	4300,00±440,00*	0,03±0,01	76,20±14,90	4,80±0,40*
n	2	2	2	2	2	2
3 М	0,74	1,80	1850	0,10	60,90	3,91
n	1	1	1	1	1	1
4 M± m	0,83±0,18	1,50±0,50	32500,00±7200,00	0,20±0,02*	119,00±5,50**	3,60±0,20**
n	2	2	2	2	2	2
5 М	0,30	0,44	5200,00	0,24	138,20	4,30
n	1	1	1	1	1	1

Виконавши кластерний аналіз, ми встановили, що у четвертій градації подібності є більш виражене зростання інтенсивності вільнорадикальних процесів, а також зниження активності СОД, КАТ, ГПО та ГТ, порівняно з іншими градаціями, на етапі розвитку 1024 бластомери (табл. 6). До цього кластеру залучають зародки в'юна за впливу флуренізиду в концентрації 1 мМ. Відомо, що дана концентрація є добовою терапевтичною дозою. Ймовірно, вона шкідлива для зародкових клітин в'юна, адже стимулює ПОЛ і пригнічує антиоксидантну систему [3, 4]. Ми також виявили, що флуренізид у концентраціях 5 і 15 мМ (об'єднані у п'ятий кластер) спричиняють зростання вмісту ГП, зниження активності СОД, ГПО і ГТ. Проте цей вплив менш виражений, порівняно з дією флуренізиду в концентрації 1 мМ (четвертий кластер). Ймовірно, субстанція у вищих дозах виявляє більш виражені антиоксидантні властивості на етапі розвитку 1024 бластомери (табл. 6). Відомо, що флуренізид здатний перехоплювати супероксид-аніон радикал, з чим і пов'язане зниження активності СОД [10].

Таблиця 6

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

Кластери	ТБК- позитивні продукти, мкмоль/мг білка	ГП ліпідів, ум.од/мг білка	СОД, од.активності/мг білка	КАТ, мкмоль H ₂ O ₂ /хв мг білка	ГПО, мкмоль G-SH/хв мг білка	ГТ, мкмоль 1-хлор-2,4- динітробензол/ хв мг білка
1 М	0,54	1,93	3670,00	0,27	146,60	7,15
n	1	1	1	1	1	1
2 M± m	0,92±0,01***	5,76±0,53**	13300,00±1780,00*	0,77±0,14	188,82±28,10*	7,17±0,40**
n	2	2	2	2	2	2
3 М	0,86	4,23	2500,00	0,27	92,09	6,59
n	1	1	1	1	1	1
4 М	1,08	6,58	1390,00	0,18	72,63	2,32
n	1	1	1	1	1	1
5 M± m	0,40±0,01***	3,44±0,46*	1570,00±72,90**	0,19±0,06	90,86±4,49**	2,94±0,22**
n	2	2	2	2	2	2

Отже, підсумовуючи результати досліджень щодо впливу флуренізиду на зародки в'юна, ми засвідчили негативний вплив цієї речовини на вільнорадикальні процеси. Вплив флуренізиду на досліджувані показники залежить від стадії розвитку зародка, а також від концентрацій цієї речовини.

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

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. А.с. № 1084681, МКИ G № 33/48. Способ определения гидроперекисей липидов в биологических тканях / Мирончик В. В. № 3468369/28-13; заявл. 08.07.82 ; опубл. 07.04.84, Бюл. № 13.
2. Боднарчук Н. О., Мандзинець С. М., Петрух Л. І., Санагурський Д. І. Вміст первинних і вторинних продуктів ліпопероксидації у зародках в'юна за дії флуренізиду // Біол. Студії / *Studia Biologica*. 2016. Т. 10. № 1. С. 53–60.
3. Боднарчук Н. О., Гарасим Н. П., Петрух Л. І., Санагурський Д. І. Порівняльний та дисперсійний аналіз активності глутатіонзалежних ферментів у зародках в'юна *Misgurnus fossilis* L. за впливу флуренізиду // Біофіз. вісн. 2015. Вип. 34 (2). С. 43–51.
4. Боднарчук Н. О., Мандзинець С. М., Петрух Л. І., Санагурський Д. І. Стан системи антиоксидантного захисту зародків в'юна за впливу флуренізиду // Біологія тварин. 2016. Т. 18. № 2. С. 9–17.
5. Королюк М. А., Иванова И. Г., Майорова И. Г. и др. Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. 1988. № 1. С. 16–18.
6. Костюк В. А., Потапович А. И., Ковалева Ж. М. Простой и чувствительной метод определения СОД, основанный на реакции окисления кверцетина // Вопросы мед. химии. 1990. Т. 36. № 2. С. 88–91.
7. Моин В. М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лабораторное дело. 1986. № 2. С. 724–727.
8. Нейфах А. А. Молекулярная биология процессов развития. М.: Наука, 1977. С. 311.
9. Нізельський Ю., Козак Н. Флуренізид. Електронна будова, таутомерія та його властивості // Праці Наук. тов-ва ім. Шевченка. Хемія і біохемія. Зб. на пошану Євгена Гладисевського. Львів, 2005. Т. XV. С. 41–50.
10. Петрух Л. І. Фруорени як туберкулостатики. Флуренізид: мікробіологічні, фармакологічні і клінічні аспекти. Львів: Львівська політехніка, 2008. С. 138–140.
11. Ромакін В. В. Комп'ютерний аналіз даних. К.: МДГУ ім. Петра Могили, 2006. 150 с.
12. Тимирбулатов Р. А., Селезнев Е. И. Метод повышения интенсивности свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение // Лабораторное дело. 1981. № 4. С. 209–211.
13. Azzam E., Gerin J., Pain D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury // *Cancer Lett*. 2012. Vol. 327. P. 48–60.

14. Habig W. H., Parst M. J., Jakobv W. B. Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation // J. Biol. Chem. 1974. Vol. 249 (22). P. 7130–7139.
15. Petruch L. The urgency of the creation and implementation of industrial production of new medicines // Collection Descriptions of Inventions. 2003. N 2. P. 198.

Стаття: надійшла до редакції 15.01.19

доопрацьована 02.05.19

прийнята до друку 06.05.19

CLUSTER ANALYSIS OF THE EFFECT OF FLURENIZYD ON INDICATORS OF PROOXIDANT-ANTIOXIDANT SYSTEM STATUS OF LOACH EMBRYOS

N. Bodnarchuk, N. Harasym, D. Sanagurskiy

Ivan Franko National University of Lviv

4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine

e-mail: nataljabodnarchyk@ukr.net

Experiments were carried out on embryos of *Misgurnus fossilis* L. After washing zygotes were incubated in physiological Golferre solution, containing a solution of flurenizide in concentrations of 0.01; 0.05; 0.15; 1; 5; 15 mM. The embryos were harvested for 60, 150, 210, and 330 minutes after fertilization of the 1st (2 blastomeres), 4th (16 blastomeres), 6th (64 blastomeres), 8th (256 blastomeres) and 10th (1024 blastomeres) crushing egg zygotes. The intensity of lipids peroxide oxidation processes was evaluated by measuring of the content of lipid hydroperoxides and TBA-reactive substances. The state of antioxidant system was studied with the activity of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione-S-transferase. Cluster analysis was conducted to identify stages of development that have the same changes of the content of lipid hydroperoxides, TBA-reactive substances, activity of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione-S-transferase. Applying a cluster analysis it was found that before the stage of 64 blastomeres, all experimental groups were divided into 4 groups of similarity according to the studied indicators. Flurenizide in concentration of 0.05 mM in stage of 2 blastomeres was found to have no significant effect on values whose were at the control level. Flurenizide in concentrations of 5 and 15 mM results in a significant decrease (compared with control) in the content of TBA-reactive substances, increasing of content of lipid hydroperoxides and decreasing of activity of catalase, glutathione peroxidase and glutathione-S-transferase. At the stage of development of 256 and 1024 blastomeres, all groups are divided into 5 groups of similarity, indicating change in the effect of flurenizyd on these stages of loach embryos development. In particular, at the development stage of 1024 blastomeres, flurenizide in a concentration of 1 mM leads to more pronounced increase in intensity of free radical processes, as well as the decrease in activity of superoxide dimitase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione-S-transferase. It is known that this concentration is a daily therapeutic dose for an adult. It is likely that it is harmful to the germinal cells of liver, since it stimulates lipid peroxidation and suppresses antioxidant system enzymes. It has been established that with the action of flurenizide in concentrations of 5 and 15 mM, the content of hydroperoxides increases, the activity of superoxide dimitase, glutathione peroxidase and glutathione-S-transferase decreases. However, this effect is less pronounced compared with action of flurenizide in concentration of 1 mM.

Keywords: loach embryos, flurenizyd, peroxidation of lipids