

**ВМІСТ СІАЛОВИХ КИСЛОТ, АТФ І СУПЕРОКСИДНОГО АНІОН-РАДИКАЛА  
У ЗАРОДКАХ В'ЮНА ЗА ВПЛИВУ ФЛУРЕНІЗИДУ**

**Н. Боднарчук, Н. Гарасим, А. Тріль, Д. Санагурський**

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

Відомо, що флуренізид є новосинтезованим препаратом із вираженими про-тимикробними, імуномодуючими функціями. Проте невідома його дія на функціо-нальні властивості клітин, зокрема, зародкових. Метою цього дослідження було вста-новити наявність сіалових кислот як кінцевих компонентів глікокон'югатів, основної макроергічної сполуки – АТФ, оцінити генерацію  $O_2^-$  у зародках в'юна (*Misgurnus fossilis* L.) за впливу антибіотика флуренізида.

Дослідження проводили на зародках в'юна. Після запліднення зиготи поміща-ли в чашки Петрі з розчинами флуренізида в концентраціях 0,01; 0,05; 0,15; 1,0; 5,0; 15,0 мМ, де залишали розвиватися. На етапах розвитку 2 бластомери, 16 бластомерів, 64 бластомери, 256 бластомерів і 1024 бластомери відбирали проби. Паралельно про-водили контрольні дослідження, де до зразків не додавали флуренізид. У відібраних зразках визначали вміст сіалових кислот, АТФ, супероксидного аніон-радикала.

Нами встановлено, що флуренізид у найнижчій концентрації (0,01 мМ) не зу-мовлює змін у вмісті супероксидного аніон-радикала впродовж раннього ембріогенезу. Антибіотик у максимальній концентрації спричиняє зміни вмісту вільного радикала з етапу розвитку 64 бластомери до 1024 бластомери, причому зі стадії 64 бластомери відбувається підвищення його кількості, а на етапі розвитку 16 бластомерів – зни-ження. Ймовірно, флуренізид у концентрації 15,0 мМ є найбільш реакційноздатним. Відомо, що флуренізид виявляє антиоксидантні властивості, проте у його структурі наявні групи, які мають токсичну дію, котра є найбільш вираженою за впливу висо-ких концентрацій. Загалом, на етапі розвитку 16 бластомерів відбувається зниження кількості  $O_2^-$  за впливу досліджуваного антибіотика. В цей час у контролі вміст цього вільного радикала зростає, порівняно з іншими етапами розвитку. Флуренізид веде до зростання вмісту супероксидного аніон-радикала на етапі розвитку 2, 64 бластомери і особливо виражено - за концентрацій від 0,05 до 15,0 мМ на етапах розвитку 256 і 1024 бластомери. 1024 бластомери є десятим етапом поділу, де відбувається його десинхронізація і знижується мітотичний індекс, що відображається на інтенсивності утворення супероксидного аніон-радикала.

Антибіотик зумовлює підвищення вмісту сіалових кислот на першому етапі дроблення (2 бластомери). На етапі 16 бластомерів флуренізид у низьких концентраці-ях веде до зниження вмісту сіалових кислот. Проте вже на етапі поділу 64 і 256 бласто-мерів досліджувана речовина в усіх концентраціях зумовлює переважаче зниження кількості сіалових кислот. На останньому етапі синхронних дроблень (1024 бласто-мери) флуренізид у максимальній досліджуваній концентрації (15,0 мМ) зумовлює значне зростання вмісту сіалових кислот.

Флуренізид у концентрації 0,15 мМ, 5,0 мМ і 15,0 мМ зумовлює зниження вмісту АТФ у зародках в'юна на етапі розвитку 256 бластомерів на 28, 67 і 38 % від-повідно. Зростання вмісту АТФ на 33 % відбувається за впливу флуренізида в кон-центрації 1,0 мМ. Вміст АТФ також підвищується на етапі розвитку зародків 1024 бластомерів за впливу флуренізида всіх досліджуваних концентрацій.

За допомогою дисперсійного аналізу встановлено, що значний вклад у зростання вмісту АТФ, сіалових кислот і супероксидного аніон-радикала під час раннього ембріогенезу зародків в'юна чинить фактор розвитку зародків, тоді як фактор флуоренізиду має менш слабкий вклад [4].

Отже, у результаті досліджень засвідчено, що флуоренізид зумовлює посилення генерації супероксидного аніон-радикала, зниження вмісту сіалових кислот, а також зміну вмісту АТФ у зародкових клітинах упродовж раннього ембріогенезу.

*Ключові слова:* зародки в'юна; флуоренізид; сіалові кислоти, супероксидний аніон-радикал, АТФ

Флуоренізид – препарат 4 класу токсичності, синтезований в Україні, один із похідних флуорену. Завдяки наявності гідразних груп має певну структурну схожість з ізоніазидом. За даними Національного інституту фтизіатрії і пульмонології імені Ф. Г. Яновського (м. Київ, МОЗ України), мінімальна інгібуюча концентрація флуоренізиду щодо лабораторних і виділених від хворих штамів мікобактерій туберкульозу, чутливих до ізоніазиду, становить 0,04–0,15 мкг/мл на середовищах Проскауера-Бека та 0,08–0,30 мкг/мл на середовищі Левенштейна-Йенсена [12, 13].

Загалом, активність флуоренізиду *in vitro* значна, але поступається удвічі ізоніазиду. Штами, стійкі до інших протитуберкульозних препаратів, залишаються чутливими до флуоренізиду [9, 23]. Проте залишається невідомий вплив флуоренізиду на функціональні параметри клітин-еукаріот.

З'ясовано механізми впливу флуоренізиду на іонтранспортувальні системи зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L. Встановлено, що вплив флуоренізиду на зародки холоднокровних протягом ембріогенезу реалізується на мембранному рівні, а саме через інгібування  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази. Ступінь інгібувального впливу препарату залежить не тільки від концентрації флуоренізиду в середовищі інкубації, а й від стадії розвитку зародків і структури самого флуоренізиду, що визначає його фізико-хімічні властивості [3]. Залишається невивченою дія флуоренізиду на прооксидантні властивості, енергозабезпечення та стан сіалових кислот як кінцевих компонентів глікокон'югатів клітин.

Сіалові кислоти – речовини, наявні в усьому організмі, але переважно у зв'язаному вигляді. Найбільше їх у слині та слизових оболонках, певна кількість є у крові. Завдяки сіаловим кислотам секрет слизових стає більш в'язким, що дає їм змогу виступати як захист від фізичного і хімічного впливу. У сироватці крові сіалові кислоти зв'язуються з її білками і частиною гормонів, забезпечуючи їм можливість циркулювати більш тривалий час. Від сіалових кислот також залежить тривалість циркуляції у крові еритроцитів і лімфоцитів. Встановлено, що процес старіння еритроцитів пов'язаний із тим, що у їхньому глікокаліксі зменшується кількість сіалових кислот [10, 11]. Відомо, що на поверхні плазматичної мембрани клітин містяться рецептори, у структурі яких є сіалові кислоти. Сіалові кислоти створюють негативний поверхневий потенціал, причетний до адгезії клітин [18].

Отже, вивчення вмісту сіалових кислот є надзвичайно важливим для розуміння впливу флуоренізиду на нормальний розвиток зародкових клітин [16].

Відомо, що за патологічних станів, зокрема, за дії токсичних речовин, ушкоджуються мітохондрії, а це відображається на синтезі АТФ [21, 24, 28, 29].

Мета роботи – встановити ушкодження глікокон'югатів (за вмістом сіалових кислот), стан основного енергетичного забезпечення (за вмістом АТФ), оцінити генерацію вільних радикалів (за вмістом  $\text{O}_2^-$ ) у зародках в'юна *Misgurnus fossilis* L. за впливу антибіотика флуоренізиду.

### Матеріали та методи

Експерименти проводили на зародках в'юна *Misgurnus fossilis* L., які отримували і запліднювали за методикою Нейфаха (Нейфак А.А., 1977). Стадії розвитку контролювали візуально під бінокулярним мікроскопом МБС-9. Через 5–10 хв після запліднення відмиті зиготи інкубували у фізіологічному розчині Гольфрета (CaCl<sub>2</sub> – 1,8 ммоль/л, NaCl – 110 ммоль/л, KCl – 1,4 ммоль/л, трис-НСІ – 5 ммоль/л, t = 20–22 °С), 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; 1,0; 5,0; 15,0 мМ. Флуренізид у концентрації 1 мМ є добовою терапевтичною дозою для організму (за хламідійного ендоцервіциту, 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. Паралельно проводили контрольні дослідження, де до зразків не додавали флуренізид. Бластомери відбирали на зазначених етапах розвитку і здійснювали їхню гомогенізацію. У відібраних зразках визначали вміст сіалових кислот методом Гесса (використовували безбілковий фільтрат, додаючи до гомогенатів 10 % трихлороцтової кислоти) [10], АТФ (інкубацію проводили за температури 24 °С, оскільки в'юни є холоднокровними) [1], супероксидного аніон-радикала [6] та загального білка за методом Лоурі. Вміст супероксидного аніон-радикала визначали за його реакцією нітросинього тетразолію. Принцип методу визначення вмісту сіалових кислот полягає в тому, що у результаті гідролізу безбілкового фільтрату еритроцитів крові зі складу сіалоглікопротеїнів виділяються сіалові кислоти, які з розчином сульфатної кислоти в льодяній оцтовій кислоті у киплячій водяній бані дають кольорову реакцію. Вміст АТФ визначали за кількістю фосфору неорганічного. Принцип цього методу базується на гідролізі АТФ (який відбувається під час кип'ятіння зразків за наявності НСІ), за результатом чого звільняється залишок фосфорної кислоти (одиниці виміру ммоль Рі/мг білка). Результати досліджень опрацьовували статистично з використанням критерію Стьюдента. Статистичну обробку всіх результатів досліджень здійснювали з використанням програми „Excel-2010” для Windows [14].

### Результати і їхнє обговорення

Нами встановлено, що на етапі розвитку зародків в'юна 2 бластомери вміст супероксидного аніон-радикала підвищується за впливу флуренізиду в концентрації 1,0 і 5,0 мМ (у 3,1 та 1,7 разу відповідно). Причому за вищої концентрації підвищення вмісту радикала є менш інтенсивним (рис. 1). Флуренізид у концентраціях 0,01; 0,05; 0,15; 15,0 мМ не спричиняє змін вмісту супероксидного аніон-радикала на цьому етапі розвитку зародків.

На етапі 16 бластомерів вміст супероксидного аніон-радикала є в межах норми за дії флуренізиду в концентраціях 0,01; 0,15; 5,0 мМ (рис. 2). Найменший його вміст спостерігається за концентрації антибіотика 0,05; 1,0 і 15,0 мМ (зниження у 0,62; 0,59; 0,63 разу відповідно порівняно з контролем). Під час подальшого розвитку зародків (на етапі 64-х бластомерів) у середовищі з флуренізидом встановлено підвищення вмісту O<sub>2</sub><sup>-</sup> лише за концентрації 15,0 мМ (в 1,53 разу). В інших випадках він перебуває на рівні контролю (рис. 3). Проте на етапі розвитку зародків в'юна 256-х бластомерів відбувається підвищення вмісту O<sub>2</sub><sup>-</sup> приблизно на 45–71 % за усіх досліджуваних концентрацій флуренізиду, крім концентрації 0,01 мМ (рис. 4).

Зміна вмісту супероксидного аніон-радикала залишається такою ж і на етапі розвитку зародків 1024 бластомерів. Нами встановлено, що за впливу антибіотика в концентрації 0,05 мМ вміст зростає у 0,8 разу, за концентрації 0,15 мМ і 1,0 мМ – в 1,33 разу, за концентрації 5 мМ – в 1,5 разу, за концентрації 15,0 мМ – в 1,46 разу. Отже, найбільший вміст показника виявлено за концентрації флуренізиду 5,0 мМ (рис. 5).

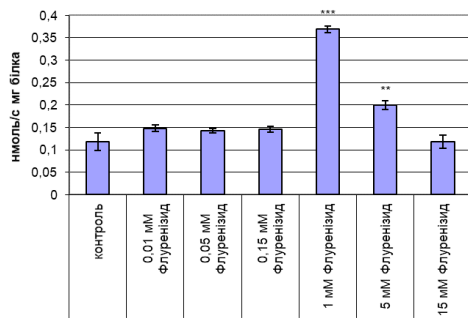


Рис. 1. Вміст супероксидного аніон-радикала на етапі розвитку зародків в'юна 2 бластомери за впливу флуренізиду різних концентрацій (\*\* –  $p \geq 0,99$ ; \*\*\* –  $p \geq 0,999$ )

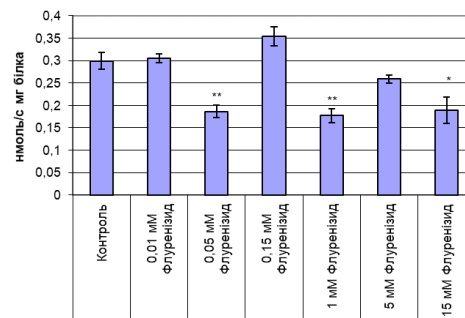


Рис. 2. Вміст супероксидного аніон-радикала на етапі розвитку зародків в'юна 16 бластомерів за впливу флуренізиду різних концентрацій (\* –  $p \geq 0,95$ ; \*\* –  $p \geq 0,99$ )

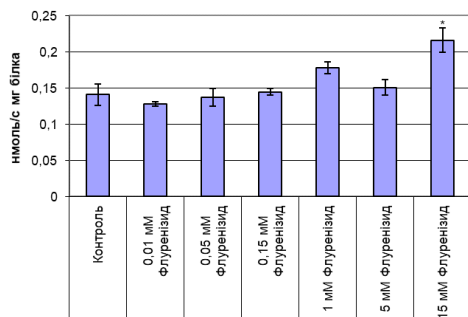


Рис. 3. Вміст супероксидного аніон-радикала на етапі розвитку зародків в'юна 64 бластомери за впливу флуренізиду різних концентрацій (\* –  $p \geq 0,95$ )

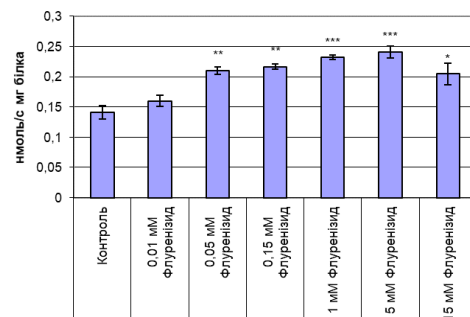


Рис. 4. Вміст супероксидного аніон-радикала на етапі розвитку зародків в'юна 256 бластомерів за впливу флуренізиду різних концентрацій (\* –  $p \geq 0,95$ ; \*\* –  $p \geq 0,99$ ; \*\*\* –  $p \geq 0,999$ )

У контролі нами зафіксовано, що вміст супероксидного аніон-радикала підвищується на етапах 16 і 1024 бластомерів, тоді як на інших стадіях розвитку його кількість є приблизно однаковою (рис. 6).

Отже, флуренізид у найнижчій концентрації 0,01 мМ не зумовлює змін у вмісті супероксидного аніон-радикала упродовж раннього ембріогенезу. Антибіотик у максимальній концентрації зумовлює зміни у вмісті вільного радикала з етапу розвитку 16 бластомерів до 1024 бластомерів, причому зі стадії 64 бластомерів відбувається підвищення його кількості. Ймовірно, флуренізид у концентрації 15 мМ є найбільш реакційноздатним. Відомо, що флуренізид має антиоксидантні властивості (забезпечується флуореновим ядром, який бере участь у електрофільному заміщенні), проте у його структурі є групи, які

мають токсичну дію (залишок ізонікотинової кислоти виявляє токсичні властивості), яка найбільш виражена за впливу високих концентрацій [5].

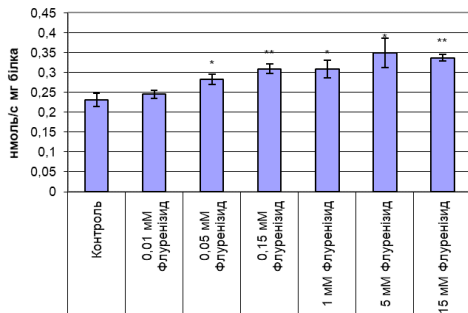


Рис. 5. Вміст супероксидного аніон-радикала на етапі розвитку зародків в'юна 1024 бластомери за впливу флуоренізіду різних концентрацій (\* –  $p \geq 0,95$ ; \*\* –  $p \geq 0,99$ )

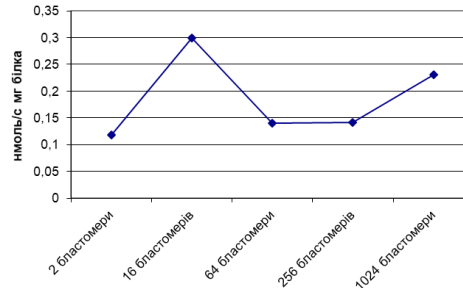


Рис. 6. Вміст супероксидного аніон-радикала на етапах розвитку зародків в'юна 2, 16, 64, 256 і 1024 бластомери в контролі

Тільки на етапі розвитку 16 бластомерів відбувається зниження кількості  $O_2^-$  за впливу досліджуваного антибіотика. У цей час у контролі вміст цього вільного радикала зростає, порівняно з іншими етапами розвитку. Порівнюючи ці дані з попередніми нашими результатами, встановили, що на етапі розвитку 16 бластомерів значно інтенсифікуються процеси ліпопероксидації, ймовірно, саме через вступання в реакцію  $O_2^-$  з ліпідами, тому його вміст знижується [5].

Флуоренізид веде до зростання вмісту супероксидного аніон-радикала на етапі розвитку 2, 64 бластомери і особливо виражено - за концентрацій від 0,05 до 15,0 мМ на етапах розвитку 256 і 1024 бластомери. 1024 бластомери є десятим етапом поділу. Супероксидний аніон-радикал утворюється як побічний продукт під час роботи дихального ланцюга мітохондрій [2, 17, 19]. Також може утворюватися під час роботи інших ферментів (НАДН-дегідрогенази, ксантинооксидази) [20, 25, 27].

Нами встановлено, що на етапі розвитку зародків в'юна 2 бластомери вміст сіалових кислот достовірно підвищується за впливу флуоренізіду всіх досліджуваних концентрацій (рис. 7). Нами виявлено найінтенсивніше зростання кількості сіалових кислот за дії досліджуваної речовини у концентрації 5,0 і 15,0 мМ (на 216 і 131 % відповідно).

На етапі 16 бластомерів флуоренізид у найнижчій досліджуваній концентрації (0,01 мМ) не зумовлює достовірних змін щодо вмісту сіалових кислот. Досліджувана речовина у концентрації 0,05; 0,15 мМ спричиняє зниження кількості сіалових кислот на 29 і 37 % відповідно (рис. 8). Високі концентрації флуоренізіду (1,0; 5,0 15,0 мМ) ведуть до інтенсифікації зростання вмісту досліджуваної речовини. Найбільша кількість сіалових кислот виявлена у зародках в'юна за найвищої концентрації антибіотика (15,0 мМ; зростання на 200 %).

Під час подальшого розвитку зародків на етапі 64 бластомерів у середовищі з флуоренізідом встановлено зниження вмісту сіалових кислот. Найменший їхній вміст спостерігається за концентрації антибіотика 1,0; 5,0 і 15,0 мМ (зниження на 53, 64, 57 % відповідно) (рис. 9).

Проте на етапі розвитку зародків в'юна 256 бластомерів за впливу флуоренізіду відбувається зниження вмісту сіалових кислот за усіх досліджуваних концентрацій флуоренізіду, окрім концентрацій 0,01 мМ і 15,0 мМ (рис. 10).

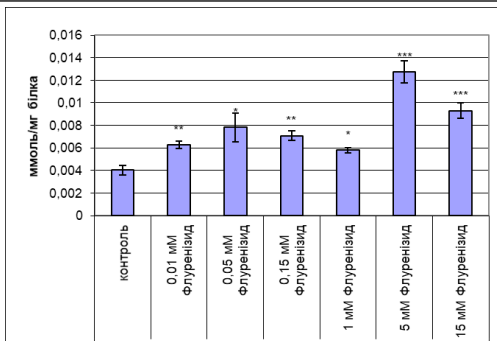


Рис. 7. Вміст сіалових кислот на етапі розвитку зародків в'юна 2 бластомери за впливу флуоренізіду різних концентрацій (\* –  $p \geq 0,95$ ; \*\* –  $p \geq 0,99$ ; \*\*\* –  $p \geq 0,999$ )

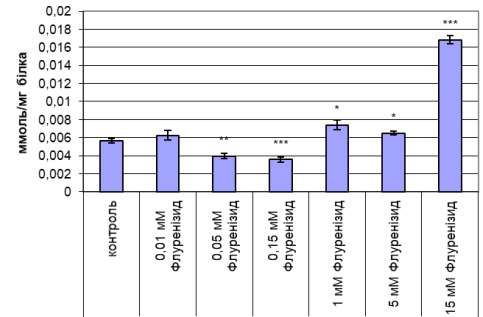


Рис. 8. Вміст сіалових кислот на етапі розвитку зародків в'юна 16 бластомерів за впливу флуоренізіду різних концентрацій (\* –  $p \geq 0,95$ ; \*\* –  $p \geq 0,99$ ; \*\*\* –  $p \geq 0,999$ )

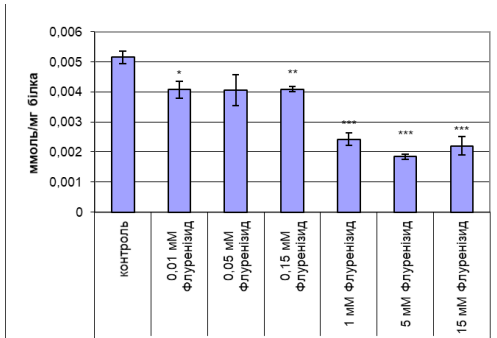


Рис. 9. Вміст сіалових кислот на етапі розвитку зародків в'юна 64 бластомери за впливу флуоренізіду різних концентрацій (\* –  $p \geq 0,95$ ; \*\* –  $p \geq 0,99$ ; \*\*\* –  $p \geq 0,999$ )

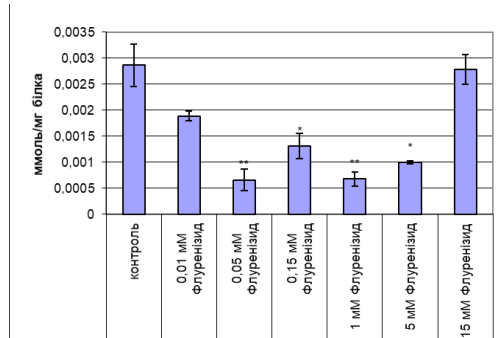


Рис. 10. Вміст сіалових кислот на етапі розвитку зародків в'юна 256 бластомерів за впливу флуоренізіду різних концентрацій (\* –  $p \geq 0,95$ ; \*\* –  $p \geq 0,99$ )

Вміст сіалових кислот підвищується на етапі розвитку зародків 1024 бластомерів порівняно з етапом розвитку 256 бластомерів. Нами встановлено, що за впливу антибіотика у концентрації 0,05 і 1,0 мМ вміст сіалових кислот зменшується на 68 і 45 % відповідно щодо контролю, а за концентрації 15,0 мМ – збільшується на 58 % (рис. 11).

У контролі нами зафіксовано, що вміст сіалових кислот зростає на етапі розвитку зародків в'юна 16 бластомерів на 39 % і значно знижується (на 29 %) порівняно з етапом 2 бластомери (рис. 12).

Отже, антибіотик зумовлює підвищення вмісту сіалових кислот на першому етапі дроблення (2 бластомери). На наступному етапі (16 бластомерів) флуоренізид у низьких концентраціях веде до зниження вмісту сіалових кислот. Проте вже на етапі поділу 64 і 256 бластомерів досліджувана речовина в усіх концентраціях зумовлює переважаче зниження кількості сіалових кислот. На останньому етапі синхронних дроблень (1024 бластомери) флуоренізид у максимальній досліджуваній концентрації (15 мМ) зумовлює значне зростання вмісту сіалових кислот.

Відомо, що на поверхні кожної клітини живого організму міститься шар гліканів, його глікокалікс, який забезпечує її зв'язок із навколишнім середовищем. У еукаріотів глікокалікс складається з глікокон'югатів: глікопротеїнів, гліколіпідів, протеогліканів,

більшість вуглеводних компонентів яких містять кінцеві сіалові кислоти, які в основному представлені N-ацетилнейраміною кислотою. Сіалові кислоти у складі гліканів впливають на процеси адгезії, розпізнавання речовин, визначають тривалість циркуляції у крові деяких гормонів та білків, беруть участь у гормонрецепторній взаємодії [11, 22]. Вуглеводна частина здебільшого стабілізує структуру молекули глікопротеїну, обмежуючи неспецифічні білок-білкові взаємодії та захищає від дії пептидогідролаз. Разом з тим, зміна структури глікану та положення окремих вуглеводних залишків визначає фізіологічну активність протеїнів, впливає на адгезію клітин, їхню диференціацію та проліферацію. Глікопротеїновим комплексам належить як провідна роль у зв'язуванні й виведенні ксенобіотиків, так і імуномодульвальна й антиоксидантна активність, а також здатність інгібувати протеїнази [8, 26]. Враховуючи значення глікопротеїнів, до складу яких входять сіалові кислоти, у функції розмноження, диференціації, проліферації й адгезії, зміни вмісту сіалових кислот за дії флуореніду будуть відображатися на зазначених процесах розвитку зародків в'юна.

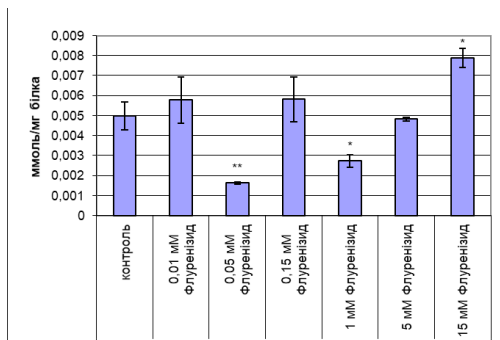


Рис. 11. Вміст сіалових кислот на етапі розвитку зародків в'юна 1024 бластомери за впливу флуореніду різних концентрацій (\* –  $p \geq 0,95$ ; \*\* –  $p \geq 0,99$ )

Провівши дослідження, ми встановили, що на етапі розвитку зародків в'юна 2 бластомери флуоренід у найнижчій досліджуваній концентрації (0,01 мМ) не зумовлює змін вмісту АТФ. Проте флуоренід у концентрації 0,05; 0,15; 1,0 та 5,0 мМ веде до підвищення вмісту АТФ у зародках в'юна на 67, 30, 61 і 188 % відповідно (рис. 13). Потрібно відмітити, що антибіотик у найвищій досліджуваній концентрації (15,0 мМ) спричиняє зниження утворення АТФ на 22 %.

На етапі розвитку зародків в'юна 16 бластомерів за впливу флуореніду в концентрації 0,01 мМ і 0,05 мМ відбувається підвищення вмісту АТФ на 59 і 123 %. Відмічено, що флуоренід у концентрації 0,15 мМ веде до зниження вмісту АТФ на 77 %. Нами відмічено, що за дії антибіотика у високих концентраціях (1,0; 5,0; 15,0 мМ) вміст АТФ перебуває на рівні контрольних значень (рис. 14).

Під час подальшого розвитку зародків на етапі 64 бластомерів у середовищі з флуоренідом встановлено зниження вмісту АТФ. Зокрема, за концентрації флуореніду 0,05; 0,15; 5,0 і 15,0 мМ вміст досліджуваного показника знижується на 29; 27; 54 та 26 % відповідно. Не зумовлює змін вмісту АТФ флуоренід у концентрації 0,01 і 1,0 мМ (рис. 15).

Нами виявлено, що флуоренід у концентрації 0,15; 5,0; 15,0 мМ зумовлює зниження вмісту АТФ у зародках в'юна на етапі розвитку 256 бластомерів на 28; 67 та 38 % від-

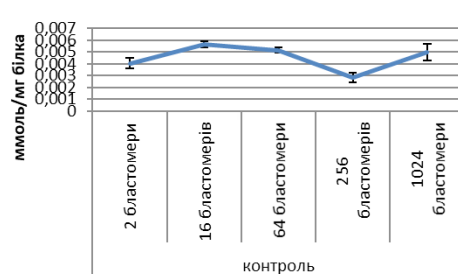


Рис. 12. Вміст сіалових кислот на різних етапах раннього розвитку зародків в'юна у контролі

повідно (рис. 16). Зростання вмісту АТФ на 33 % відбувається за впливу флуренізиду в концентрації 1,0 мМ. Мінімальні концентрації антибіотика не спричинюють зміни вмісту АТФ у зародках.

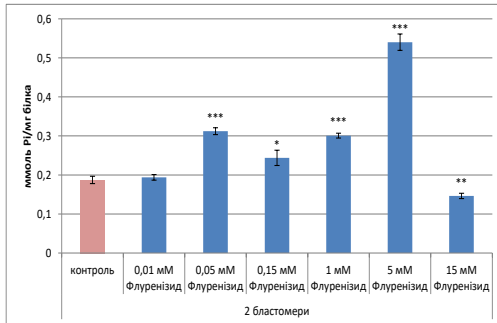


Рис. 13. Вміст АТФ у зародках в'юна на етапі розвитку 2 бластомери за впливу флуренізиду різних концентрацій (\* –  $p \geq 0,95$ ; \*\* –  $p \geq 0,99$ ; \*\*\* –  $p \geq 0,999$ )

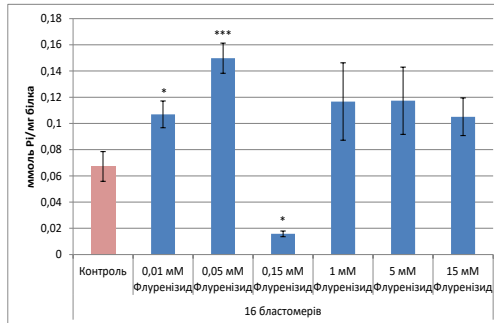


Рис. 14. Вміст АТФ у зародках в'юна на етапі розвитку 16 бластомерів за впливу флуренізиду різних концентрацій (\* –  $p \geq 0,95$ ; \*\*\* –  $p \geq 0,999$ )

Вміст АТФ підвищується на етапі розвитку зародків 1024 бластомери за впливу флуренізиду всіх досліджуваних концентрацій (рис. 17). Так, кількість АТФ зростає на 25 % за концентрації 0,01 мМ, на 51 % за концентрації 0,05 мМ, на 50 % за концентрації 0,15 мМ, на 61 % за концентрації 1,0 мМ, на 164 % за концентрації 5,0 мМ, на 53 % за концентрації 15,0 мМ. Отже, найбільш інтенсивно утворюється АТФ у зародках в'юна за впливу флуренізиду в концентрації 5,0 мМ. Потрібно відмітити, що у контролі вміст АТФ на етапі розвитку 16 бластомерів є найнижчим порівняно з іншими етапами розвитку, тоді як на етапі розвитку 64 бластомери – найвищим (рис. 18).

Отже, узагальнюючи наші результати, можна зробити висновок, що антибіотик у переважній більшості концентрацій зумовлює підвищення вмісту АТФ на першому етапі дроблення. На етапі поділу 64 та 256 бластомерів досліджувана речовина зумовлює зниження кількості АТФ. Проте вже на останньому етапі синхронних дроблень флуренізид у всіх досліджуваних концентраціях зумовлює значне зростання вмісту АТФ. Ймовірно, під час першого поділу відбувається зниження використання АТФ клітинами. Проте вже на подальших етапах розвитку відбувається ушкодження мітохондрій і синтез АТФ уповільнюється [3].

Флуренізид у найнижчій концентрації (0,01 мМ) чинить мінімальний негативний вплив на зростання вмісту АТФ упродовж раннього ембріогенезу зародків в'юна. За цієї концентрації флуренізиду вміст АТФ зростає на етапі розвитку 16 і 1024 бластомери. На інших етапах розвитку вміст показника перебуває в межах контролю. Незначний вплив також чинить флуренізид у концентрації 1,0 мМ. За впливу цієї концентрації вміст АТФ зростає на етапі розвитку 2, 256 і 1024 бластомери.

Значний негативний вплив чинить флуренізид у концентрації 0,15 мМ. Так, на етапі розвитку 2 бластомери вміст АТФ зростає, проте вже на наступних етапах розвитку включно до 256 бластомерів вміст показника знижується. На етапі розвитку 1024 бластомери кількість АТФ знову підвищується порівняно з контролем. Потужний вплив флуренізиду зафіксований і за дії його у концентрації 15,0 мМ, де відбувається зниження вмісту АТФ уже на першому етапі поділу зародків в'юна. Зменшення вмісту АТФ відбувається і на ета-



пі розвитку 64 і 256 бластомерів. Проте вже на етапі розвитку 1024 бластомери вміст АТФ підвищується порівняно з контролем. Негативний вплив низьких і високих концентрацій флуренізиду був засвідчений на зародках в'юна попередніми дослідженнями. Зокрема, було встановлено, що флуренізид у концентраціях 5,0 і 15,0 мМ підвищує вміст гідропероксидів ліпідів упродовж розвитку зародків. Антибіотик у концентраціях 0,01; 0,05; 0,15 і 1,0 мМ веде до підвищення кількості ТБК-позитивних продуктів [5].

Етап розвитку 16 бластомерів виявився найменш чутливим до дії флуренізиду, де вміст АТФ переважно перебуває на рівні контролю. Етап розвитку 64 бластомери є найбільш чутливим, де вміст АТФ переважно знижується. На останньому етапі синхронних поділів виявлено відмінний вплив флуренізиду, а саме зростання концентрації АТФ у бластомерах.

Варто відмітити, що у контролі вміст АТФ на етапі розвитку 16 бластомерів є найнижчим порівняно з іншими етапами розвитку, тоді як на етапі розвитку 64 бластомери – найвищим.

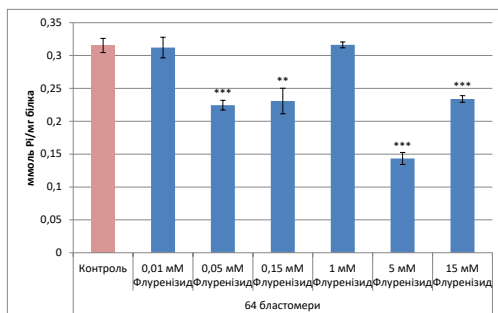


Рис. 15. Вміст АТФ у зародках в'юна на етапі розвитку 64 бластомери за впливу флуренізиду різних концентрацій (\*\* –  $p \geq 0,99$ ; \*\*\* –  $p \geq 0,999$ )

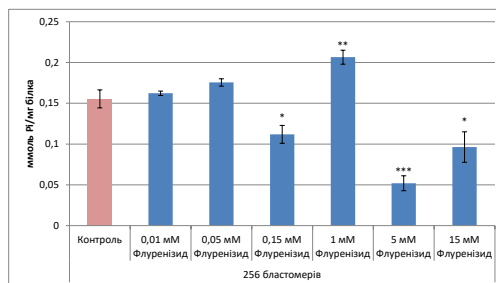


Рис. 16. Вміст АТФ у зародках в'юна на етапі розвитку 256 бластомерів за впливу флуренізиду різних концентрацій (\* –  $p \geq 0,95$ ; \*\* –  $p \geq 0,99$ ; \*\*\* –  $p \geq 0,999$ )

Відомо, що зміна співвідношення набухлих і компактних мітохондрій, що ростуть, відображає певний функціональний стан мітохондрій. При вивченні популяції мітохондрій зародків ранніх стадій шпорцевої жаби було показано, що набухлий і компактний (стиснутий) тип мітохондрій представлені у рівних кількостях [7]. У яйцях в'юна немає суттєвої зміни вмісту мітохондріальних білків за час розвитку від запліднення до вилуплення з оболонки, що збігається зі спостереженнями про сталість вмісту цитохромів а, b та с і активності цитохромоксидази. Проте показано, що в зародках від стадії 9 год (пізня бластула) до стадії 30 год (стадія 17 пар сомітів) за 21,5 °С концентрація мітохондріальних білків значно зменшується [7]. Отже, результати досліджень щодо мітохондрій і мітохондріальних білків є неоднозначними. За нашими результатами, можна твердити, що впродовж раннього ембріогенезу відбувається зміна синтезу АТФ.

Вивчаючи дію флуренізиду на зростання вмісту АТФ,  $O_2^-$  та сіалових кислот у зародках в'юна (*Misgurnus fossilis* L.), за результатами дисперсійного аналізу встановлено, що такий фактор, як розвиток зародка, має провідний вплив на ці сполуки. Так, частка впливу фактора розвитку становить 56 % на вміст АТФ, 46 % – на вміст сіалових кислот, 47 % – на вміст супероксидного аніон-радикала (рис. 19).

Флуренізид чинить незначний вплив на зростання вмісту АТФ, сіалових кислот і супероксидного аніон-радикала впродовж раннього ембріогенезу зародків в'юна за дії флуренізиду, частка впливу якого становить 9, 15 і 11 % (рис. 19).

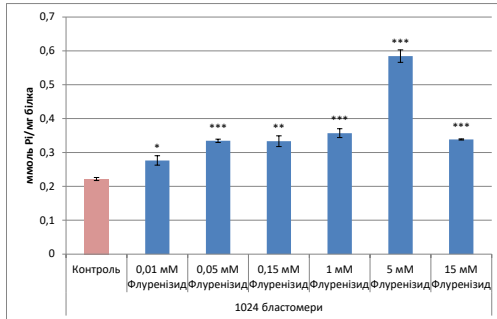


Рис. 17. Вміст АТФ у зародках в'юна на етапі розвитку 1024 бластомери за впливу флуоренізиду різних концентрацій (\* –  $p \geq 0,95$ ; \*\* –  $p \geq 0,99$ ; \*\*\* –  $p \geq 0,999$ )

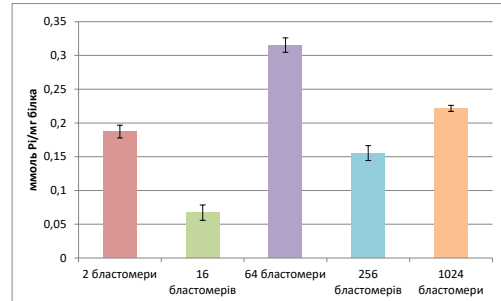


Рис. 18. Вміст АТФ в інтактних зародках в'юна на етапі розвитку 2, 16, 64, 256 та 1024 бластомери

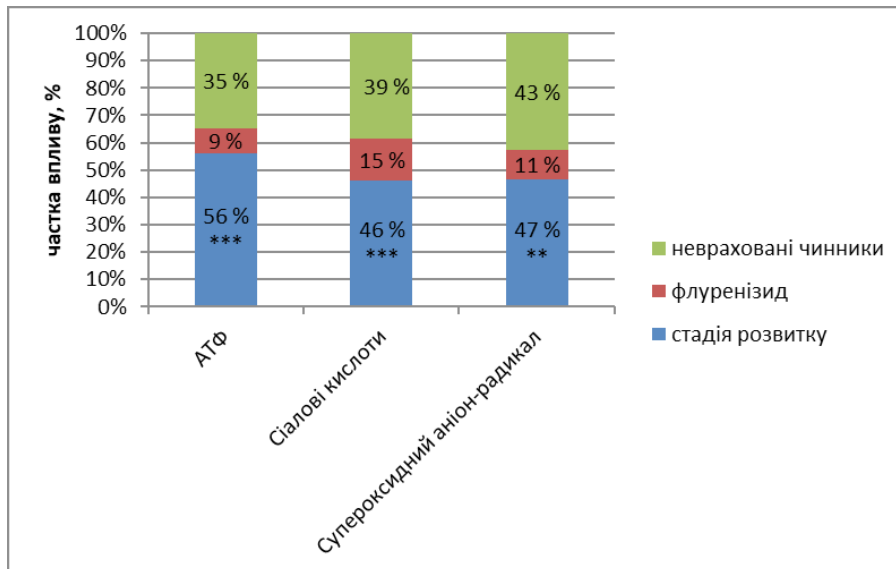


Рис. 19. Результати двофакторного дисперсійного аналізу впливу флуоренізиду на зростання вмісту АТФ,  $O_2^-$ , сіалових кислот у зародках в'юна

Потрібно зазначити, що на частку впливу неврахованих чинників припадає 35 % (щодо АТФ), 39 % (щодо сіалових кислот), 43 % (щодо супероксидного аніон-радикала) (рис. 19).

Отже, значний вклад у зростання вмісту АТФ, сіалових кислот і супероксидного аніон-радикала чинить фактор розвитку зародків в'юна. Тому під час інтерпретації результатів дослідження потрібно приділяти більшу увагу змінам на молекулярному і клітинному рівні, які відбуваються у зародкових об'єктах. Однією з таких особливостей є те, що зародки на ранньому етапі не містять цитохрому р-450 на ендоплазматичній сітці, який відповідає за безпосереднє знешкодження шкідливих сполук, ксенобіотиків, лікарських препаратів. Таку функцію виконує в зародкових клітинах лише глутатіон-S-трансфераза.

Відповідно до поставленої мети і завдань, досліджено вплив флуоренізиду на вміст  $O_2^-$ , АТФ і сіалових кислот у зародках в'юна впродовж раннього ембріогенезу.

Проаналізовано результати дисперсійного аналізу. Флуренізид у концентраціях 0,05; 0,15; 1,0; 5,0; 15,0 мМ зумовлює зростання вмісту супероксидного аніон-радикала у зародках в'юна на етапах розвитку 2, 64, 256 та 1024 бластомери. Найінтенсивніше зростання його кількості виявлене на етапі розвитку 256 і 1024 бластомери, найменш інтенсивне – на етапі 64 бластомери. Флуренізид зумовлює підвищення вмісту сіалових кислот на першому етапі дроблення зиготи, тоді як на етапах 16, 64 і 256 бластомерів досліджувана речовина призводить до переважаючого зниження показника. На останньому етапі синхронних дроблень флуренізид у концентрації 15,0 мМ зумовлює значне зростання вмісту сіалових кислот. Флуренізид підвищує вміст АТФ на етапах 2 і 1024 бластомери та знижує його вміст на етапах поділу 64 та 256 бластомерів. Етап розвитку 16 бластомерів є найменш чутливим до дії флуренізиду, де вміст АТФ переважно перебуває на рівні контролю. Етап розвитку 64 бластомери є найбільш чутливим, де вміст АТФ переважно знижується.

За допомогою дисперсійного аналізу встановлено, що значний вклад у зростання вмісту АТФ, сіалових кислот і супероксидного аніон-радикала під час раннього ембріогенезу зародків в'юна чинить фактор розвитку зародків, тоді як фактор флуренізиду робить слабший внесок.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Алейникова Т. Л., Рубцова Г. В.* Руководство к практическим занятиям по биологической химии. М.: Высшая школа, 1988. 239 с.
2. *Бішко О. І., Гарасим Н. П., Санагурський Д. І.* Стан системи антиоксидантного захисту в плазмі крові та серцевому м'язі щура за дії гістаміну та гіпохлориту натрію // *Укр. біохім. журнал.* 2014. Вип. 86. № 6. С. 56–65.
3. *Боднарчук Н. О., Бура М. В., Санагурський Д. І.* Транспортні властивості мембран за дії флуренізиду та його похідних // *Біологія тварин.* 2011. Т. 13. № 1–2. С. 48–59.
4. *Боднарчук Н., Гарасим Н., Санагурський Д.* Кластерний аналіз впливу флуренізиду на показники стану прооксидантно-антиоксидантної системи зародків в'юна // *Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол.* 2019. Вип. 80. С. 44–51.
5. *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 // *Біологічні Студії / Studia Biologica.* 2016. Т. 10. № 1. С. 53–60.
6. *Денисенко С. В., Костенко В. А.* Изменения продукции активных форм кислорода в семенниках белых крыс в условиях хронической интоксикации нитратом натрия // *Сучасні проблеми токсикології.* 2005. № 4. С. 44–46.
7. *Джатдоева А. А., Проскурнина Е. В., Нестерова А. М.* и др. Митохондрии как источники супероксидного анион-радикала в тромбоцитах // *Биологические мембраны,* 2017. Т. 34. № 6. С. 116–123.
8. *Долайчук О. П., Федорук Р. С., Ковальчук І. І.* Вплив компонентів натуральної та генетично модифікованої сої на показники імунної і репродуктивної систем у самиць щурів // *Фізіол. журнал.* 2013. Т. 59. № 2. С. 65–70.
9. *Михалик О., Коваленко М.* Ефективність лікарських форм з флуренізидом для профілактики і лікування небезпечних та керованих інфекційних захворювань // *Праці НТШ. Медичні науки.* 2019. Т. 57. С. 50–58.
10. *Морозенко Д. В., Леонтєва Ф. С.* Методи дослідження маркерів метаболізму сполучної тканини у сучасній клініці та експериментальній медицині // *Молодий вчений.* 2016. № 2 (29). С. 168–172.

11. *Нетроніна О. В.* Вільні та зв'язані форми сіалових кислот у плазмі крові хворих на хронічний лімфолейкоз // *Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Med.* 2015. 6(2). С. 108–112.
12. *Нізельський Ю., Козак Н.* Флуоренізид. Електронна будова, таутомерія та його властивості: Праці НТШ. Хемія і біохемія. Зб. на пошану Євгена Гладішевського. Львів. 2005. Т. XV. С. 41–50.
13. *Петрух Л. І.* Флуорени як туберкулостатики. Флуоренізид: мікробіологічні, фармакологічні і клінічні аспекти Львів: Львівська політехніка, 2008. 138–140 с.
14. *Ромакін В. В.* Комп'ютерний аналіз даних. К.: МДГУ ім. Петра Могили, 2006. 150 с.
15. *Сенюк І. В.* Біохімія с упражнениями и задачами: учебник для вузов / под ред. чл.-кор. РАН, проф. Е.С. Северина. М., 2010. С. 125–128.
16. *Anke P., Lingbo S., Morten A. et al.* Activity of N-acylneuraminase-9-phosphatase (NANP) is not essential for de novo sialic acid biosynthesis // *Biochim. Biophys. Acta Gen Subj.* 2019. Vol. 1863 (10). P. 1471–1479. doi: 10.1016/j.bbagen.2019.05.011.
17. *Azzam E., Gerin J., Pain D.* Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury // *Cancer Lett.* 2012. Vol. 327. P. 48–60.
18. *Ken H., Noriko S., Shunji N.* Structures and developmental alterations of N-glycans of zebrafish embryos // *Glycobiology.* 2017. Vol. 4. N 27 (3). P. 228–245. doi: 10.1093/glycob/cww124.
19. *Leonardo M., Annia G.* The other side of the superoxide radical anion: its ability to chemically repair DNA oxidized sites // *Chem Commun (Camb).* 2018. Vol. 4. N 54 (97). P. 13710–13713. doi: 10.1039/c8cc07834c.
20. *Lozan T., Maria T., Luciano S., Irena K.* In Vitro Interaction of 5-Aminoorotic Acid and Its Gallium(III) Complex with Superoxide Radical, Generated by Two Model Systems // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 23. N 21 (22). P. 8862. doi: 10.3390/ijms21228862.
21. *Michael H. Hayes, Elizabeth H. Peuchen, Norman J. Dovichi, Daniel L. Weeks.* Dual roles for ATP in the regulation of phase separated protein aggregates in *Xenopus* oocyte nucleoli // *Elife.* 2018. Vol. 17 (7). P. 35224. doi: 10.7554/eLife.35224.
22. *Paul R Wratil, Rüdiger Horstkorte* Metabolic Glycoengineering of Sialic Acid Using N-acyl-modified Mannosamines // *J. Vis. Exp.* 2017. Vol. 25 (129). P. 55746. doi: 10.3791/55746.
23. *Petruch L.* The urgency of the creation and implementation of industrial production of new medicines // *Collection descriptions of inventions.* 2003. Vol. 2. P. 198.
24. *Prashant M., David C.* Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014. Vol. 15 (10). P. 634–646. doi: 10.1038/nrm3877.
25. *Renan C., Marisa F., Zerlotti M., Eduarda F.* Superoxide Anion Radical: Generation and Detection in Cellular and Non-Cellular Systems // *Curr. Med. Chem.* 2015. Vol. 22 (37). P. 4234–4256. doi: 10.2174/0929867322666151029104311.
26. *Sam J., Gosse J., Max Tgm. Derks, Thomas J., Christian Büll.* Sialic acid glycoengineering using N-acetylmannosamine and sialic acid analogs // *Glycobiology.* 2019. Vol. 29 (6). P. 433–445. doi: 10.1093/glycob/cwz026.
27. *Scheinok S., Leveque Ph., Sonveaux P. et al.* Comparison of different methods for measuring the superoxide radical by EPR spectroscopy in buffer, cell lysates and cells // *Free Radic. Res.* 2018. Vol. 52 (10). P. 1182–1196. doi: 10.1080/10715762.2018.1541321.
28. *Waleska K. Martins, Nayra Fernandes Santos, Cleidiane de Sousa Rocha et al.* Parallel damage in mitochondria and lysosomes is an efficient way to photoinduce cell death // *Autophagy.* 2019. Vol. 15 (2). P. 259–279. doi: 10.1080/15548627.2018.1515609.

29. *Ying Wang, Robyn Branicky, Alycia Noë, Siegfried Hekimi.* Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling // *J. Cell Biol.* 2018. Vol. 4. N 217 (6). P. 1915–1928. doi: 10.1083/jcb.201708007.

*Стаття надійшла до редакції 26.02.21*

*доопрацьована 26.05.21*

*прийнята до друку 01.06.21*

## CONTENT OF SIALIC ACIDS, ATP AND SUPEROXIDE ANION-RADICAL IN LOACH EMBRYOS UNDER THE INFLUENCE OF FLURENIZYD

**N. Bodnarchuk, N. Harasym, A. Tril, D. Sanagurskiy**

*Ivan Franko National University of Lviv*

*4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine*

*e-mail: nataljabodnarchyk@ukr.net*

It is known that flurenizide is a newly synthesized drug with pronounced antimicrobial, immunomodulatory functions. However, its effect on the functional properties of cells, in particular germ cells, is unknown. The aim of this study was to determine the presence of sialic acids as the final components of glycoconjugates, the main macroergic compound - ATP, to evaluate the generation of  $O_2^-$  in embryos of lobster (*Misgurnus fossilis* L.) under the influence of the antibiotic flurenizide.

Studies have been performed on embryos of *Misgurnus fossilis* L. After fertilization, the zygotes were placed in Petri dishes with solutions of flurenizide in concentrations of 0.01; 0.05; 0.15; 1.0; 5.0; 15.0 mM, where allowed to develop. At the development stages, 2 blastomeres, 16 blastomeres, 64 blastomeres, VIII (256 blastomeres) and X divisions (1024 blastomeres) were sampled. In parallel, control studies were performed, where flurenizide was not added to the samples. The content of sialic acids, ATP, superoxide anion radical was determined in the selected samples. We found that flurenizide at the lowest concentration of 0.01 mM does not cause changes in the content of superoxide anion radical during early embryogenesis. The antibiotic in the maximum concentration causes changes in the content of free radical from the stage of development of 16 blastomeres to 1024 blastomeres, and from the stage of 64 blastomeres there is an increase in its number. Probably flurenizide at a concentration of 15.0 mM is the most reactive. It is known that flurenizide has antioxidant properties, but in its structure there are groups that have a toxic effect, which is most pronounced when exposed to high concentrations. In general, at the stage of development of 16 blastomeres there is a decrease in the amount of  $O_2^-$  under the influence of the studied antibiotic. At this time, the content of this free radical in the control increases, compared with other stages of development. Flurenizide leads to an increase in the content of superoxide anion radical at development stage 2, 64 blastomeres and is particularly pronounced at concentrations from 0.05 to 15.0 mM at development stages 256 and 1024 blastomeres. 1024 blastomeres are the 10th stage of separation, where desynchronization occurs and the mitotic index decreases. Probably, the changes that take place at this stage of development are related to this. The antibiotic causes an increase in the content of sialic acids in the first stage of crushing (2 blastomeres). In step 16 of the blastomere, flurenizide in low concentrations leads to a decrease in the content of sialic acids. However, already at the stage of separation of 64 and 256 blastomeres, the test substance in all concentrations causes a predominant decrease in the amount of sialic acids. At the last stage of synchronous crushing (1024 blastomeres) flurenizide in the maximum investigated concentration (15.0 mM) causes a significant accumulation of sialic acid content.

Flurenizide at concentrations of 0.15, 5.0 and 15.0 mM causes a decrease in ATP

content in loach embryos at the stage of development of 256 blastomeres by 28, 67 and 38 %, respectively. An increase in ATP content by 33 % occurs under the influence of flurenizide at a concentration of 1.0 mM. The ATP content also increases at the stage of development of embryos of 1024 blastomeres under the influence of flurenizide of all studied concentrations.

Analysis of variance has shown that a significant contribution to the growth of ATP, sialic acid and superoxide anion radical, during the early embryogenesis of lobster embryos, is made by the factor of embryo development, while the factor of flureniside has a smaller contribution.

Therefore, studies have shown that flurenizide causes increased generation of superoxide anion radical, decreased sialic acid content, as well as changes in ATP content in embryonic cells during early embryogenesis.

*Keywords:* loach embryos, flurenizyd; sialic acid, superoxide anion-radical, ATP