

**МОРФОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ВПЛИВУ НОВОСИНТЕЗОВАНИХ ПОЛІМЕРІВ НА  
РОЗВИТОК ЗАРОДКІВ ТА ЛИЧИНОК В'ЮНА УПРОДОВЖ РАНЬОГО  
ЕМБРІОГЕНЕЗУ**

**А. Багдай, Ю. Здвіжков, С. Мандзинець, М. Бура**

*Львівський національний університет імені Івана Франка*

*вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна*

*e-mail: Zdvizhkov\_yura@ukr.net*

Досліджено вплив модифікованого поліетиленгліколем полімерного носія у концентрації  $10^{-9}$  та  $10^{-15}$  М на розвиток зародків і личинок в'юна *Missgurnus fossilis* L. упродовж 10 днів. Відмічено сповільнення розвитку на третю добу, що характеризується затримкою вилуплення личинок, за наявності у середовищі полімерного носія у концентрації  $10^{-15}$  М. Однак на 10 добу досліду у личинок в'юна, що піддавались впливу полімерного носія, аномалій і дефектів розвитку не виявлено. Для встановлення токсичності носія проведено аналіз виживання зародків та личинок за наявності дослідного носія в середовищі інкубації упродовж 10 днів, достовірного токсичного впливу не встановлено.

*Ключові слова:* зародки в'юна, личинки, аномалії розвитку, поділ бластомерів, ПЕГ-вмісний полімерний носій.

Плазматична мембрана (ПМ) зародкових клітин є важливим місцем морфогенетичних перебудов у ранньому ембріогенезі, а також забезпечує вибірккову проникність для речовин, що транспортуються у процесі життєдіяльності клітини [5, 6]. Транспорт іонів через мембрани не тільки є основою електрогенезу [1], але є суттєвим процесом регуляції багатьох клітинних функцій, у тому числі включаючи ініціації реплікації нуклеїнових кислот, біосинтезу білка, проліферації та диференціації клітин [5]. Більшість змін електричних параметрів зародкових клітин відбувається внаслідок зміни властивостей іонтранспортних систем [4, 6]. При вивченні механізмів дії чинників різноманітної природи значна увага приділяється особливостям їхньої взаємодії власне з ПМ, котра є найпершою ланкою у сприйнятті зовнішніх сигналів, проведенні та трансформації їх у клітинну відповідь і центром морфологічних перебудов зародків.

Молекулярне конструювання водорозчинних полімерів, які були б універсальними носіями для лікарських засобів різної природи та могли долати природні біологічні бар'єри як на тканинному, так і на клітинному рівнях [15, 18], є актуальним завданням сучасної біології, молекулярної біофізики та медицини [16, 17].

Вивчення ефективності застосування нової нанорозмірної системи доставки ліків, зокрема доксорубіцину, у клітини пухлин, як чутливих, так і резистентних до дії протипухлинних препаратів було описано у роботі Ю. Сеньків [13]. Утворення системи доставки, яка містить стабільний кон'югат, є дуже важливим, адже багато систем доставки ліків непридатні для використання через їхню нестабільність [19]. Також, у роботах А. Рябцевої [12] було показано, що синтезований на основі олігопероксиду з бічними епоксидними групами модифікованого поліетиленгліколем олігомерного носія (ПЕГ-вмісний олігомер), є водорозчинною поверхнево-активною речовиною, що здатна іммобілізувати не розчинний у воді антибіотик левоміцетин та утворювати нанорозмірні водні системи його цільової доставки, які забезпечують підвищену антимікробну активність препарату.

Відомо, що зародки в'юна (*Misgurnus fossilis* L.) у період раннього ембріогенезу є зручною та адекватною тест-системою для дослідження впливу різних фармакологічних [14], фізичних і хімічних [4, 6] чинників на живі організми. Тому, мета роботи полягала у дослідженні характеру змін морфології зародків в'юна після запліднення за дії полімерного носія.

#### Матеріали та методи

Для досліджень використовували модифікований поліетиленгліколем полімерний носій (ПЕГ-вмісний полімерний носій), синтезований на кафедрі органічної хімії Національного університету „Львівська Політехніка” [11].

Яйцеклітини одержували і запліднювали за методом Нейфаха [10]. Для отримання ікри самкам внутрішньом'язово вводили хоріогонічний гонадотропін (500 од.). Ікру одержували через 36 год після стимуляції. Сім'яники отримували після декапітації та розтину черевної порожнини самців. Ікру запліднювали в чашках Петрі суспензією спермій. Через 5–10 хв після запліднення зиготи відмивали й інкубували при температурі 20–22°C. Зародки та личинки в'юна в умовах контролю інкубували у розчині Гольтфретера для холоднокровних [6]. В експериментальній групі досліджу зародки інкубували у розчині Гольтфретера з додаванням розчину ПЕГ-вмісного полімерного носія у середовище до отримання концентрації носія – 10<sup>-9</sup> та 10<sup>-15</sup> М. Стадії розвитку контролювали візуально під бінокулярним мікроскопом МБС-9 з фотографічною приставкою [3, 7, 9].

Оцінка токсичного впливу проведена на основі аналізу виживання личинок за різних концентрацій полімерного носія. Для встановлення токсичності досліджували виживання зародків та личинок в'юна упродовж 10 діб розвитку після запліднення, відбирали по три чашки Петрі контрольних і тих, що піддавались впливу активної речовини, зразків. Дослід на виживання за наявності в середовищі інкубації полімерного носія тривав 10 діб з щоденним відбором зародків, що загинули. Кількість зародків, що вижили визначали з різницею між загальною кількістю особин та тими, що загинули на кожен день досліджу.

### Результати і їхнє обговорення

У зародків, які розвивалися в середовищі Гольфретера перший поділ відбувався через  $60 \pm 2$  хв, а кожен наступний – через  $30 \pm 2$  хв. Стадії розвитку визначали по таблицях нормального розвитку [2]. Після запліднення у нормі спостерігали відділення жовткової оболонки від поверхні ядра і утворення перивітелінового простору. Паралельно відбувалося формування цитоплазматичного горбика. Після першої години інкубації спостерігався поділ на 2 бластомери (рис. 1), через 1,5 год після запліднення – на 4 бластомери, борозна другого поділу проходить теж меридіально, але перпендикулярно до борозни першого поділу.

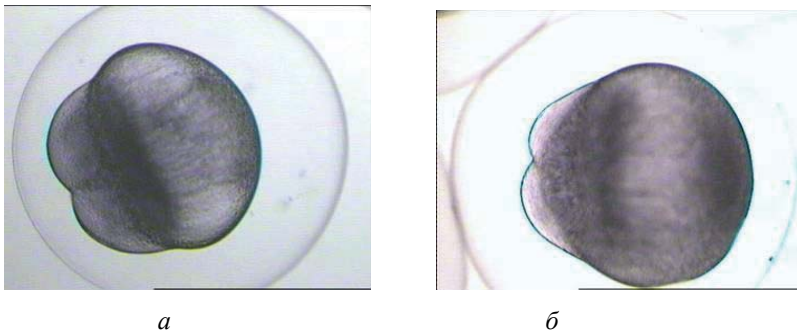


Рис. 1. Розвиток зародків на стадії 2 бластомеріву контролі (а) та за впливу ПЕГ-вмісного полімерного носія у концентрації  $10^{-9}$ М (б).

На стадії 3 поділу з'являються вісім бластомерів, на стадії 4–16 бластомерів. Через 3 год після запліднення зародки представлені 32 бластомерами, але борозни 5-го поділу проходять паралельно екватору жовтка, в результаті чого утворюється "шапочка" на анімальному полюсі, або бластодиск, клітини якого не відділені від жовтка мембраною [2, 9].



Рис. 2. Розвиток зародків на стадії 10 поділу бластомерів у контролі (а) та за впливу ПЕГ-вмісного полімерного носія у концентрації  $10^{-9}$ М (б).

Слід зазначити, що зародки які піддавалися впливу полімерного носія у зазначених концентраціях упродовж трьох годин після запліднення не відставали у розвитку від контрольних зародків. Тобто наступні стадії утворення бластомерів ще відповідали часовим нормам – 2,5 год розвитку – чітко прослідковується утворення 16 бластомерів (4-ий поділ),

хоч деяка незначна частина зародків припиняла свій розвиток, що проявлявся за відсутності або нерівномірного утворення бластомерів.

Отже, за період дроблення бластомерів не виявлено суттєвих відмінностей у розвитку зародків, що піддавалися впливу полімерного носія у концентрації  $10^{-9}$  М порівняно з контрольними зразками.

На першу добу розвитку зародків після запліднення мезодермальні валики починають розпадатися на окремі клітини (рис. 3, *а*) [8, 9], тоді як частини зародків, які піддавалися впливу ПЕГ-вмісного полімерного носія, відбувалася закладка центральної нервової системи, завершувався процес обростання жовтка бластодермою (рис. 3, *б, в*).

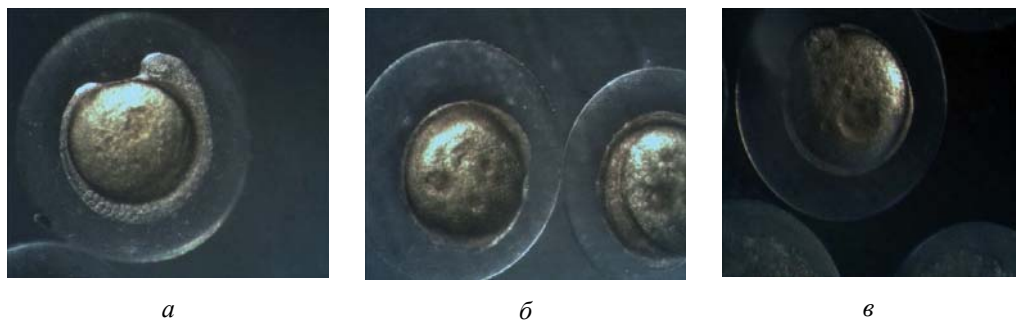


Рис. 3. Розвиток зародків в'юна на першу добу розвитку у контролі (*а*) та за впливу ПЕГ-вмісного полімерного носія у концентрації  $10^{-9}$  (*б*) й  $10^{-15}$  М (*в*).

На 36 стадії розвитку зародків в'юна (48 год 32 хв) у хвостовій мезодермі кількість сомітів рівна 10 (рис. 4, *а*). На цій стадії розвитку відбувається пігментація очей, однак тіло на цей час ще не пігментоване. Зародки починають енергійно рухатися всередині оболонки.

У контролі вилуплення личинок відбувається на третю добу розвитку (через 49–51 год після запліднення) (рис. 4, *а*), після вилуплення спостерігають значну рухливість личинок формування видовження хвостового відділу, збільшення головного відділу і триває розвиток очних ямок.



Рис. 4. Розвиток зародків в'юна на другу добу розвитку у контролі (*а*) та за впливу ПЕГ-вмісного полімерного носія у концентрації  $10^{-9}$  (*б*).

На третю добу практично усі зародки в контролі та за наявності поверхнево-активного носія ( $10^{-9}$  М) звільнились від оболонки та відбувався подальший розвиток (рис. 5, а, б).



Рис. 5. Розвиток зародків в'юна на третю добу розвитку у контролі (а) та за впливу ПЕГ-вмісного полімерного носія у концентрації  $10^{-9}$  (б) й  $10^{-15}$  М (в).

За наявності в середовищі інкубації носія у концентрації  $10^{-15}$  М, розвиток був сповільнений, у більшості зародків вилуплення не відбувалось (рис. 5, в). Лише деякі зародки позбувались перивітелінової оболонки.

На 4 добу розвитку в контролі та за наявності ПЕГ-вмісного полімерного носія у концентрації  $10^{-9}$  М простежувався нормальний розвиток (рис. 6, а, б). За концентрації носія  $10^{-15}$  М простежується зниження рухової активності і відставання у розвитку, що проявлялось у збільшеному розмірі залишків жовтка та набряку головного відділу (рис. 6, в).



Рис. 6. Розвиток личинок в'юна на четверту добу розвитку у контролі (а) та за впливу ПЕГ-вмісного полімерного носія у концентрації  $10^{-9}$  (б) й  $10^{-15}$  М (в).

Личинки на 6 добу розвитку характеризувалися видовженою формою тіла, добре вираженою пігментацією та розвинутими очними бокалами. Вони були рухливими, з хорошою координацією тіла, зябра личинок розвинуті, добре простежувалась серцева діяльність. Личинки, що розвивались за дії досліджуваного чинника досягали рівня розвитку характерного для личинок, що розвивались у контрольному середовищі (рис. 7, а, б, в).



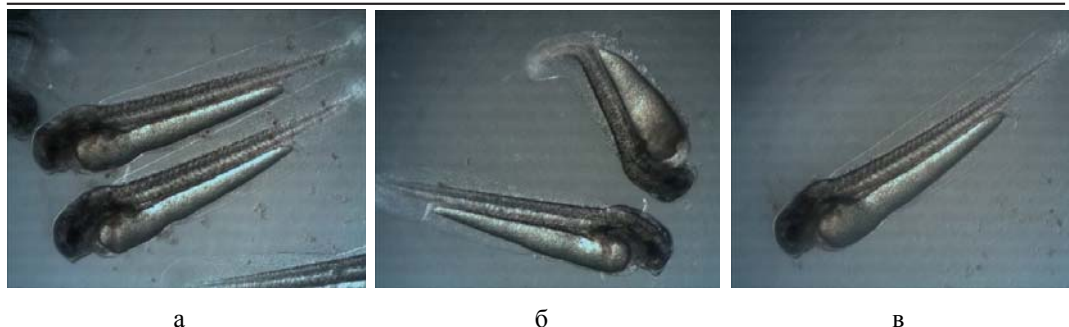


Рис. 7. Розвиток личинок в'юна на шосту добу розвитку у контролі (а) та за впливу ПЕГ-вмісного полімерного носія у концентрації  $10^{-9}$  (б) й  $10^{-15}$  М (в).

Личинки в'юна на 8–10 добу розвитку за впливу досліджуваного полімеру різних концентрацій, не відрізнялися у рості та розвитку в'юнів від контролю (рис. 8, а, б, в) (рис. 9, а, б, в).

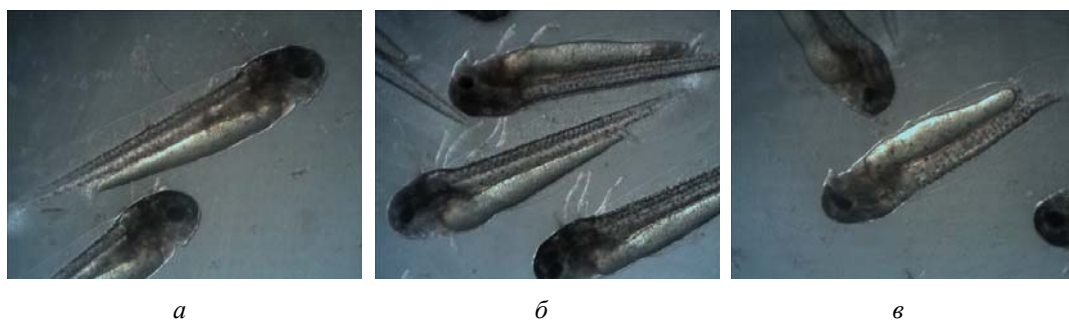


Рис. 8. Розвиток личинок в'юна на восьму добу розвитку у контролі (а) та за впливу ПЕГ-вмісного полімерного носія у концентрації  $10^{-9}$  (б) й  $10^{-15}$  М (в).

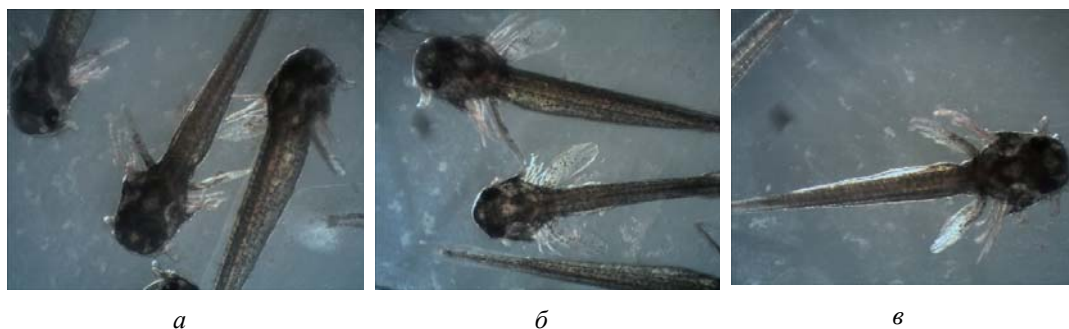


Рис. 9. Розвиток личинок в'юна на десяту добу розвитку у контролі (а) та за впливу ПЕГ-вмісного полімерного носія у концентрації  $10^{-9}$  (б) й  $10^{-15}$  М (в).

На першу добу розвитку виживання зародків у контролі знижується на 19%, на другу добу – на 2,7%. У середньому із кожною подальшою добою розвитку гинуло від 1 до 5

зародків. Загальна кількість личинок, що вижили становить 69,7%, що становить приблизно 70% контролю (рис 10).

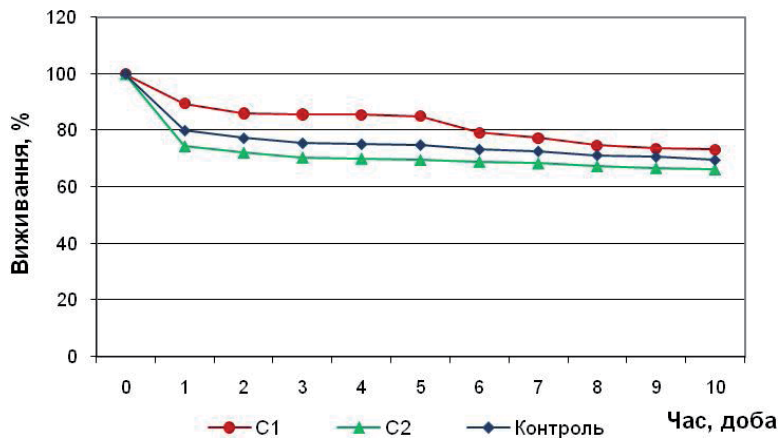


Рис. 10. Смертність зародків в'юна за наявності у середовищі ПЕГ-вмісного полімерного носія у концентрації  $10^{-9}$  М і  $10^{-15}$  М упродовж 10 днів: C1 та C2 – концентрація носія  $10^{-9}$  та  $10^{-15}$  М відповідно.

Встановлено, що за дії досліджуваного полімерного носія у концентрації  $10^{-9}$  М на першу добу після запліднення вижило 89,6% зародків, на другу – їх кількість знизилась на 3,4%. Протягом 3–5 діб відсоток виживання знаходиться в межах одного рівня й практично не змінюється, та становить 85,7÷85,1% відповідно. На 6 добу розвитку спостерігається незначне зниження рівня виживання на 6%, який поступово зменшується на 1,9% (7 доба), 2,5% (8 доба), 1% (9 доба) та 0,4% (10 доба розвитку личинок після запліднення). На 10 добу досліджу відсоток виживання становив 73,3% (рис. 10).

За умов впливу  $10^{-15}$  М полімерного носія на першу добу розвитку їх кількість значно зменшилась на 25,5%. На 2–3 добу після запліднення, відсоток виживання знижується лише на 4%. Загибель личинок протягом 4–10 доби розвитку в середньому становить 2–4 особини за день. На 10 добу згідно розрахунків, загальна кількість живих в'юнів дорівнює 66,3% (рис. 10).

Великий відсоток смертності на 1 добу після запліднення спричинений загибеллю незапліднених яйцеклітин та зародків з генетичними дефектами несумісними з життям. На першу добу розвитку відсоток смертності зародків має найменше значення за впливу полімерного носія у концентрації  $10^{-9}$  М (10,5%), найбільший рівень смертності за впливу  $10^{-15}$  М ПЕГ-вмісного полімерного носія (25,5%), у контролі – 19%. Наприкінці досліджу найменший відсоток смертності особин простежується за наявності носія у концентрації  $10^{-9}$  М – 27%,  $10^{-15}$  М – 34%, у контрольних зразків – 30%. Провівши порівняльний аналіз не встановлено статистично достовірної різниці у виживанні зародків порівняно з контролем.

Отже, за умов впливу полімерного носія у різних концентраціях встановлено рівень виживання зародків в'юна протягом 10 діб розвитку. Найменший відсоток смертності у

зародків у контролі та за наявності в середовищі інкубації  $10^{-9}$  М БАР становить 30,3 й 26,7% відповідно. Найбільший показник смертності зафіксовано за дії полімерного носія у концентрації  $10^{-15}$  М, а саме – 34%, що ймовірно пов'язано із особливістю дії досліджуваного носія. Зокрема, встановлено, що ПЕГ-вмісний полімерний носій у концентрації  $10^{-15}$  М підвищує активність Na,K-АТФази зародків в'юна на стадіях 2 та 16 бластомерів та інгібує на інших стадіях розвитку (неопубліковані дані). Однак кращий ефект на виживання зародків і личинок в'юна простежується за дії полімеру вищої концентрації –  $10^{-9}$  М. Також, полімер у вказаній концентрації здійснює кращий вплив на виживання у порівнянні з контролем, що свідчить про толерантність носія до процесів життєдіяльності зародків, тому концентрацію полімеру  $10^{-9}$  М можна вважати такою, що не змінює процеси розвитку зародків та личинок.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Антонов В. Ф. Мембранный транспорт // Сорос. обр. журнал. Биология. 1997. № 4. С. 2–9.
2. Астауров Б. А. Объекты биологии развития. М.: Наука, 1975. 579 с.
3. Белоусов Л. В., Дабяган Н. В., Чунаева М. З. Пособие к большому практикуму по эмбриологии. М.: Изд-во МГУ, 1990. Ч. 1. 104 с.
4. Бура М. В., Мандзинець С. М. Исследование действия лазерного излучения на ферментативную активность  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -насоса зародышей в'юна // Ломоносов-2009: Материалы докладов XVI междунар. науч. конф. студентов, аспирантов и молодых учёных, М., Россия, 14–17 апреля 2009. [Электронный ресурс]. М.: Изд-во МГУ; СП“МЫСЛЬ”, 2009. С. 8–9.
5. Веренинов А. А., Марохова И. И. Транспорт ионов у клеток в культуре. Л.: Наука, 1986. 292 с.
6. Гойда О. А. Биофизические аспекты раннего онтогенеза животных. К.: Наук. думка, 1993. 224 с.
7. Голиченков В. А. Методы эмбриологических исследований: учеб. пособие. М.: Изд-во МГУ, 1996. 177 с.
8. Детлаф Т. А., Детлаф А. А. О безразмерных характеристиках продолжительности развития в эмбриологии // Докл. АН СССР. 1960. Т. 134. № 1. С. 199–202.
9. Костомарова А. А. Вьюн *Misgurnus fossilis*. В кн.: Объекты биологии развития. М.: Наука, 1975. С. 308–323.
10. Нейфах А. А. Молекулярная биология процессов развития. М.: Наука. 1977. 311 с.
11. Рябцева А., Мітіна Н., Гаврилюк Д. та ін. Нанорозмірні системи доставки протиракових препаратів, іммобілізованих на поліетиленглікольвмісному полімерному носії // Вісн. нац. ун-ту "Львівська політехніка". Хімія, технологія речовин та їх застосування. 2012.



№ 726. С. 377–383.

12. *Рябцева А., Остапчук Ю., Міміна Н.* та ін. Поліетиленглікольвмісні олігомерні носії та нанорозмірні системи доставки антимікробних речовин на їх основі. Хімія, технологія речовин та їх застосування // Вісн. нац. ун-ту "Львівська політехніка". 2011. № 700. С. 367–373.
13. *Сеньків Ю., Рябцева А., Хеффетер. П.* та ін. Імобілізація доксорубіцину на олігоелектролітному полімерному носії ВЕП-ГМА-ПЕГ підвищує швидкість надходження цього протипухлинного препарату в ракові клітини та ефективність його цитотоксичної дії // Біологічні Студії / Studia Biologica. 2012. Т. 6. № 2. С. 5–16.
14. *Целевич М. В., Мандзинець С. М., Санагурський Д. І.*  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азна активність мембран зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L. при дії антибіотиків // Фізіол. журнал. 2004. Т. 50. № 5. С. 64–68.
15. *Caruthers S. D., Wickline S. A., Lanza G. M.* Nanotechnological applications in medicine // Curr. Opin. Biotechnol. 2007. Vol. 18. N 1. P. 26–30.
16. *Cho K., Wang X., Nie S.* et al. The rapеutic nanoparticles for drug delivery in cancer // Clin. Cancer Res. 2008. Vol. 14. N 5. P. 1310–1316.
17. *Ebbesen M., Jensen T. G.* Nanomedicine: techniques, potentials, and ethical implications // J. Biomed. Biotechnol. 2006. Vol. 5. P. 1–11.
18. *Euliss L. E., DuPont J. A., Gratton S.* et al. Imparting size, shape, and composition control of materials for nanomedicine // Chem. Soc. Rev. 2006. Vol. 35. N 11. P. 1095–1104.
19. *Jones M. C., Leroux J. C.* Polymeric micelles – a new generation of colloidal drug carriers // Eur. J. Pharm. Biopharm. 1999. N 48. P. 101–111.

Стаття: надійшла до редакції 03.06.14

доопрацьована 02.10.14

прийнята до друку 03.10.14

**MORPHOLOGICAL ASPECTS OF INFLUENCE OF NEWLYSYNTHESIZED  
POLYMERSON THEDEVELOPMENTOFLOACH EMBRYOSANDLARVAE DURING  
EARLYEMBRYOGENESIS**

**A. Bagday, Y. Zdvizhkov, S. Mandzynets, M. Bura**

*Ivan Franko National Unisversity of Lviv  
4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: Zdvizhkov\_yura@ukr.net*

The effect of polyethylene glycol modified polymeric carrier in concentration of  $10^{-9}$  and  $10^{-15}$  M on the development of loach *Missgurnus fossilis* L. embryos and larvae during 10 days has been investigated. It was found that 3-days exposure by  $10^{-15}$  M polymer carrier slowed developing, which is characterized by delayed hatching larvae. However, the 10 day experiment in loach larvae exposed to polymeric carrier, anomalies and defects of development have not been identified. To establish the toxicity of the media analyzed survival of embryos and larvae in the presence of researched carrier in the incubation medium for 10 days, significant toxic effect have not been showed.

*Keywords:* loach embryos, larvae, developmental abnormalities, division of blastomers, PEG-contained polymeric carrier.

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВЛИЯНИЯ НОВОСИНТЕЗИРОВАННЫХ  
ПОЛИМЕРОВ НА РАЗВИТИЕ ЗАРОДЫШЕЙ И ЛИЧИНОК ВЬЮНА НА  
ПРОТЯЖЕНИИ РАННЕГО ЭМБРИОГЕНЕЗА  
А. Багдай, Ю. Здвижков, С. Мандзинець, М. Бура**

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина  
e-mail: Zdvizhkov\_yura@ukr.net*

Исследовано влияние модифицированного полиэтилен гликолем полимерного носителя в концентрации  $10^{-9}$  и  $10^{-15}$  М на развитие зародышей и личинок вьюна *Missgurnus fossilis* L. на протяжении 10 суток. Отмечено замедление развития личинок на третьи сутки, что характеризуется задержкой вылупления личинок при наличии в среде полимерного носителя в концентрации  $10^{-15}$  М. Однако на 10 сутки эксперимента у личинок вьюна, которые подвергались воздействию полимерного носителя, аномалий и пороков развития не обнаружено. Для установления токсичности носителя проведен анализ выживания зародышей и личинок при наличии исследуемого в среде инкубации на протяжении 10 дней, достоверного токсического влияния не установлено.

*Ключевые слова:* зародыши вьюна, личинки, аномалии развития, деление бластомеров, ПЭГ-содержащий полимерный носитель.