



УДК: 577.352 + 615.2

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

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

Досліджено вплив флуренізиду (антибіотик протимікробної, протитуберкульозної, антихламідійної, імуномодулювальної, антиоксидантної, гепатопротекторної, протизапальної, протівірусної дії) на інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів у зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L. на етапі 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 зниження – на стадії 256 бластомерів. Встановлено, що вміст вторинних продуктів ліпопероксидації (ТБК-позитивних продуктів) підвищується за впливу антибіотика у концентраціях 0,01÷1 мМ і знижується за концентрації 15 мМ. З'ясовано, що зародки в'юна є найчутливішими до дії флуренізиду на етапі розвитку 16 бластомерів, коли вміст гідропероксидів є максимальним. Найменш чутливою стадією розвитку зародкових клітин до екзогенних чинників є стадія 8-го поділу (256 бластомерів).

Ключові слова: зародки в'юна, флуренізид, пероксидне окиснення ліпідів, гідропероксиди, ТБК-позитивні продукти.

ВСТУП

Під час розвитку патологічних процесів стрімко зростає інтенсивність ліпопероксидації, що робить її універсальним методом “розпізнавання” пошкодження клітинних мембран. Продукти пероксидного окиснення ліпідів (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. [1, 3]. Актуальність дослідження процесів ПОЛ обумовлена важливою патогенетичною роллю вільнорадикального окиснення як потужного фактора мембранодеструкції.

Первинні продукти ПОЛ (гідропероксиди ліпідів) є речовинами нестійкими, які досить швидко руйнуються з утворенням вторинних продуктів ліпопероксидації. Серед них найвідоміший – малоновий діальдегід (МДА), накопичення якого в орга-

нізмі відбувається у разі формування синдрому інтоксикації при багатьох захворюваннях внутрішніх органів [1]. Отже, одним із несприятливих наслідків пероксидного окиснення ліпідів вважають утворення МДА в результаті обумовленого вільними радикалами розриву карбонового ланцюга поліненасичених жирних кислот [1].

У медичній практиці з 2000 р. використовують новий клас ліків – похідні флуорену (трицикличного ароматичного ядра). До похідних флуорену належать відомі протівірусні препарати флореналь і аміксин [4, 7–9]. Флореналь – бісульфітна сполука 2-флуоренонілглюксалу, що нейтралізує дію *Herpes simplex*, *Herpes zoster* і застосовується в офтальмології для лікування вірусних захворювань очей. Аміксин (син. тилорон, 2,7-біс-[2-діетиламіноетокси]-флуоренону-9 дигідрохлорид) – низькомолекулярний індуктор ендogenous інтерферону, протівірусний засіб та імуномодулятор, ефективний проти всіх збудників гострих респіраторних вірусних інфекцій. Пошук серед флуоренів високоефективних субстанцій широкого спектра дії привів до створення флуоренізиду (N-9-флуореніліден-N'-ізонікотиногідрозиду) (рис. 1) – препарату протимікробної, протитуберкульозної, антихламідійної, імуномодулюючої, антиоксидантної, гепатопротекторної, протизапальної, протівірусної дії [7, 10]. Протівірусна дія флуоренізиду вивчена *in vitro* та *in ovo* щодо вірусу грипу птаці (ВГП) типу Росток/34 (H7N1) та вірусу хвороби Ньюкасла. Найближчим аналогом флуоренізиду за дією та структурою є аміксин, котрий відрізняється своїми фармакологічними властивостями. Показники протівірусної дії флуоренізиду на репродукцію вірусу грипу птахів у системах *in vitro* та *in ovo* перевищують такі для аміксину.

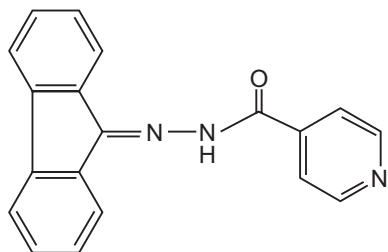


Рис. 1. Структурна формула флуоренізиду

Fig. 1. Structural formula of flurenizyd

Флуоренізд – вітчизняний препарат (реєстраційне посвідчення № P.10.00/02305 від 12.10.2000 р.) – випускається у вигляді порошку, таблеток і супозиторіїв вагінальних [7, 11].

Відомо, що флуоренізд не має негативного впливу на кількість еритроцитів, рівень гемоглобіну та кількість тромбоцитів периферичної крові, функцію печінки і нирки. Разом з тим залишається недостатньо вивченою його дія на процеси ліпопероксидації у клітинах.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Досліди проводили на зародках в'юна *Misgurnus fossilis* L. Коротка тривалість періоду ембріогенезу, легкість отримання статевих продуктів і відсутність труднощів в утриманні цих риб у лабораторних умовах пояснюють його популярність. Відносно великі розміри яйцеклітини дають змогу спостерігати за періодами розвитку після запліднення і контролювати кожен етап поділу під бінокулярном [8].

Яйцеклітини отримували і запліднювали за методом, описаним Нейфахом [5]. Для отримання ікри самкам внутрішньом'язово вводили хоріогонічний гонадотропін за 24–48 год до проведення експерименту. Доза гормону становила від 250 міжнародних одиниць (лютий–червень) до 500 (з жовтня). Самця декапітували, сім'яники подрібнювали і заливали відстояною водопровідною водою. Усі досліди з в'юнами проводили з дотриманням вимог Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують з експериментальною та науковою метою (Страсбург, 1986). Запліднення ікри проводили в чашках Петрі, додаючи суспензію сперміїв. Для задовільного запліднення ікри контакт зі спермою становив 5–10 хв. Потім запліднену ікру відмивали від сперміїв та інкубували за температури 21–22 °С у розчині Гольфретера. Стадії розвитку контролювали візуально під біокулярним мікроскопом МБС-9. Дослідження проводили на зародках в'юна, які відповідали: першому дробленню зиготи (2 бластомери), четвертому (16 бластомерів), шостому (64 бластомери), восьмому (256 бластомери), десятому (1024 бластомерів). Через 5–10 хв після запліднення відмиті зиготи інкубували у фізіологічному розчині Гольфретера ($t = 20\text{--}22\text{ }^{\circ}\text{C}$), який містив розчин флуренізиду в концентраціях 0,01; 0,05; 0,15; 1; 5 і 15 мМ (використовували субстанцію флуренізиду, синтезовану проф. Л.І. Петрух у Львівському національному медичному університеті імені Данила Галицького). Згідно з рекомендаціями Державної фармакопеї України, флуренізид початково розчиняли диметилсульфоксидом (оскільки він у цій речовині легкорозчинний) у співвідношенні 1:2, після чого доводили H_2O до відповідних концентрацій [7]. У відібраних зразках визначали інтенсивність процесів ліпопероксидації за вмістом первинних продуктів ліпопероксидації (ГП), використовуючи метод В. В. Мирончика [8], та вторинних продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ТБК-позитивних продуктів) [13]. Концентрацію білка в кожному зразку визначали за методом Лоурі [2].

Перевірку нормальності вибірки здійснювали за допомогою критерію Колмогорова–Смірнова з використанням пакета аналізу SPSS (Statistics17). Статистичну обробку результатів досліджень проводили з використанням програми “Excel-2003” для Windows.

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 $P < 0,001$). Результати обробки представлені у вигляді рисунків.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

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, 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. 2, А).

Встановлено, що на етапі розвитку 16 бластомерів за дії флуренізиду в досліджуваних концентраціях відбувається значне підвищення вмісту первинних продуктів

ліпопероксидації (на 265–547 %) (рис. 1, Б). Отже, зародки в'юна на цій стадії розвитку є дуже чутливими до флуоренізиду і в їхніх клітинах зростає інтенсивність прооксидантних процесів, що підтверджується даними літератури [14].

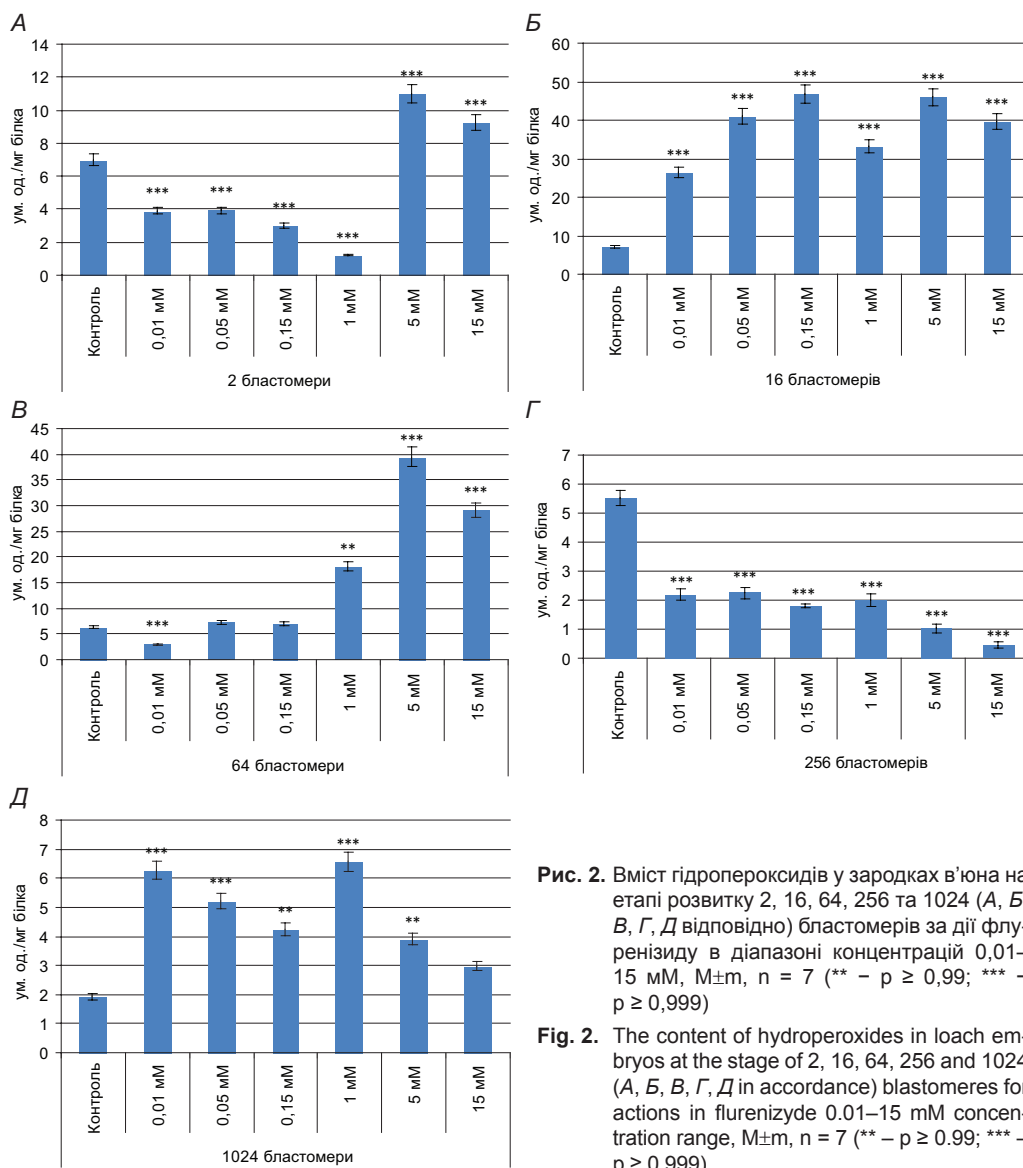


Рис. 2. Вміст гідропероксидів у зародках в'юна на етапі розвитку 2, 16, 64, 256 та 1024 (А, Б, В, Г, Д відповідно) бластомерів за дії флуоренізиду в діапазоні концентрацій 0,01–15 мМ, $M \pm m$, $n = 7$ (** – $p \geq 0,99$; *** – $p \geq 0,999$)

Fig. 2. The content of hydroperoxides in loach embryos at the stage of 2, 16, 64, 256 and 1024 (A, B, V, G, D in accordance) blastomeres for actions in flurenizyde 0.01–15 mM concentration range, $M \pm m$, $n = 7$ (** – $p \geq 0.99$; *** – $p \geq 0.999$)

На етапі розвитку 64 бластомерів флуоренізид 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. 2, В). На етапі розвитку 256 бластомерів зародкових клітин нами встановлено статистично достовірне зниження вмісту первинних продуктів ліпопероксидації за дії флуоренізиду всіх досліджуваних концентрацій із макси-

мальним зниженням на 92 % за концентрації 15 мМ (рис. 2, Г). Проте вже на стадії 1024 бластомерів нами встановлено протилежний ефект дії флуренізиду на вміст ГП (їхній вміст підвищується) (рис. 2, Д).

Етап розвитку зародків в'юна 256 бластомерів є чутливим до дії флуренізиду, де вміст ГП знижується за дії усіх досліджуваних концентрацій (значне пригнічення ПОЛ).

Визначення 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 тлі коливання вмісту гідропероксидів (рис. 3).

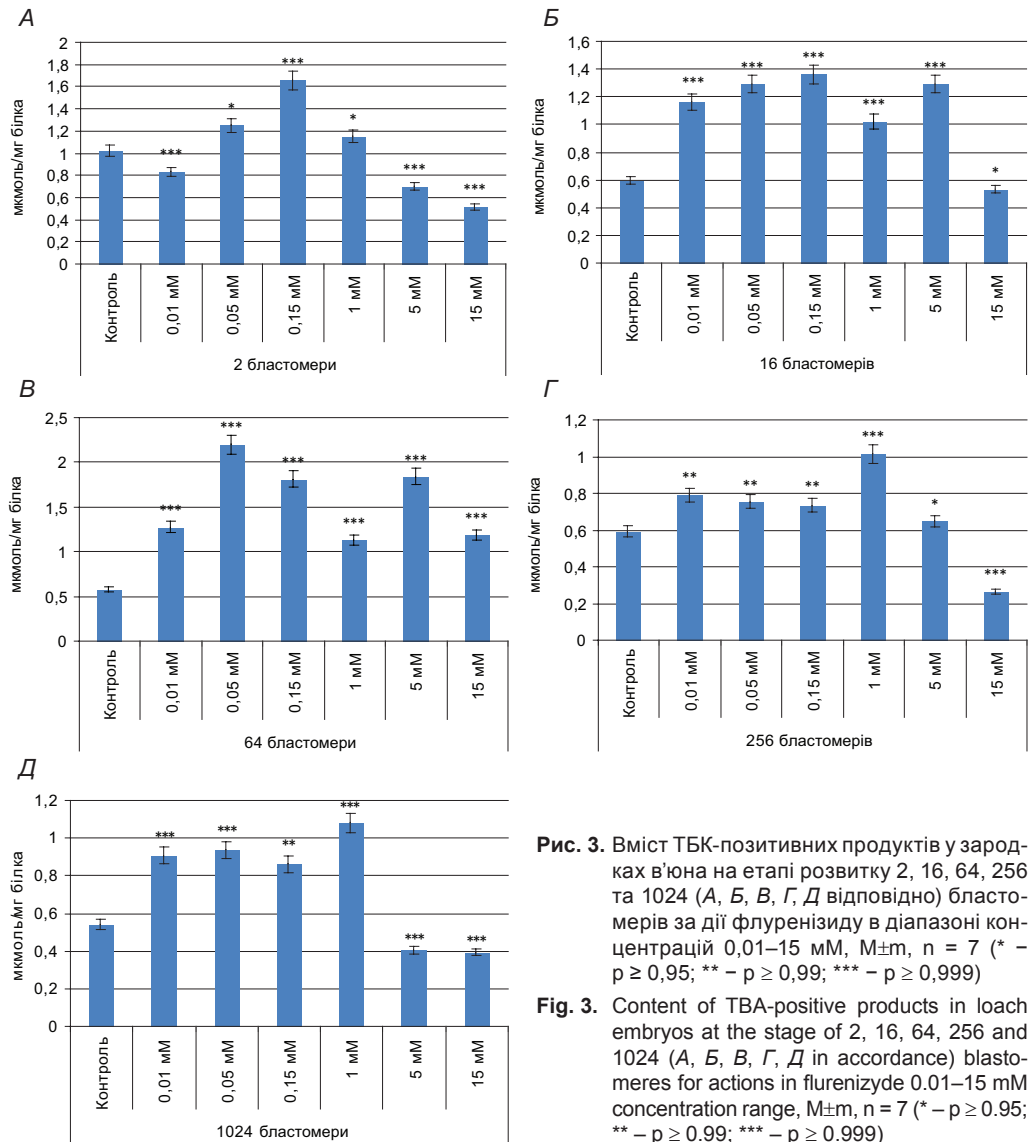


Рис. 3. Вміст ТБК-позитивних продуктів у зародках в'юна на етапі розвитку 2, 16, 64, 256 та 1024 (А, Б, В, Г, Д відповідно) бластомерів за дії флуренізиду в діапазоні концентрацій 0,01–15 мМ, $M \pm m$, $n = 7$ (* – $p \geq 0,95$; ** – $p \geq 0,99$; *** – $p \geq 0,999$)

Fig. 3. Content of TBA-positive products in loach embryos at the stage of 2, 16, 64, 256 and 1024 (A, B, V, Г, Д in accordance) blastomeres for actions in flurenizyde 0.01–15 mM concentration range, $M \pm m$, $n = 7$ (* – $p \geq 0,95$; ** – $p \geq 0,99$; *** – $p \geq 0,999$)

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 ліпидовмісні 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 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). Отже, високі концентрації флуренізиду зумовлюють зниження вмісту вторинних продуктів ліпопероксидації у зародках на тлі підвищення кількості первинних продуктів ліпопероксидації, 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*). 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 % [7].

Флуренізид здатний нейтралізувати такі радикали як OH^\cdot і HO_2^- тощо і лише незначною мірою – радикали O_2^- (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 [7]. Отже, проявляє прооксидантні властивості щодо інкубації клітин залежно від стадії ембріонального розвитку та концентрації препарату.

ВИСНОВКИ

1. Флуренізид у концентраціях 5 і 15 мМ зумовлює переважаюче підвищення вмісту ГП упродовж розвитку зародків в'юна, тоді як антибіотик у нижчих досліджуваних концентраціях (0,01; 0,05; 0,15 і 1 мМ) зумовлює підвищення кількості ТБК-позитивних продуктів.
2. Етап розвитку зародків в'юна 16 бластомерів є чутливим до дії флуренізиду і вміст ГП тут зростає за впливу всіх досліджуваних концентрацій.
3. 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.

-
1. 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. (In Russian).
 2. Lowry O. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, 1951; 193(1): 404–415. (In Russian).

3. *Menshchikova E. Oxidative stress. Prooxidants and antioxidants.* Moscow: Word, 2006. 556 p. (In Russian).
4. *Mihalik O. Modern drugs for chemotherapy of viral infections: a guide.* Lviv, 2013. 180 p. (In Ukrainian).
5. *Neyfah A., Timofeeva M. Problems in molecular biology regulation development.* Moscow: Nauka, 1978. 336 p. (In Russian).
6. *Oleksjuk N., Janovych V.* Activity of pro- and antioxidant systems in the liver of freshwater fishes in different seasons. **The Ukrainian Biochemical Journal**, 2010; 82(3): 41–48. (In Ukrainian).
7. *Petrukh L.* Fluorene as tuberculostatik. **Flurenizyd: microbiological pharmacological and clinical aspects.** Lviv, 2008; 464–469. (In Ukrainian).
8. *Petrukh L.* Flurenizyd veterinary practice: **Coll. materials of international scientific-practical conference “Modern problems of veterinary medicine, zooengineering animal products and technologies”.** Lviv, 1997. P. 216–217. (In Ukrainian).
9. *Petrukh L.* Pharmaceutical education and language. **The achievements of pharmaceutical research.** Lviv, 2011. 152 p. (In Ukrainian).
10. *Petrukh L.* The urgency of the creation and implementation of industrial production of new medicines. **Collection descriptions of inventions.** Lviv, 2003. 198 p. (In Ukrainian).
11. *Petrukh L.* Urgency creation and implementation in the industrial production of new drugs. **Collection of descriptions of inventions.** Lviv, 2003; 196 p. (In Ukrainian).
12. *Sanagurskiy D.I. Biophysics objects.* Lviv: Publishing House of Ivan Franko LNU, 2008. 522 p. (In Ukrainian).
13. *Timirbulatov R., Seleznev E.* Method of increase intensity of free-radical oxidization of lipid components of blood and his diagnostic value. **Laboratory Business**, 1981; 4: 209–211. (In Russian).
14. *Zyn A., Golovchak N., Tamovska A., Galan M., Sanagurski D.* Effect of sodium hypochlorite on prooxidant-antioxidant homeostasis loach embryos during early embryogenesis. **Studia Biologica**, 2012; 6(1): 67–76. (In Ukrainian).

CONTENT OF PRIMARY AND SECONDARY PRODUCTS OF LIPID PEROXIDATION IN LOACH EMBRYOS UNDER THE EFFECT OF FLURENIZYD

N. O. Bodnarchuk, S. M. Mandzynets, L. I. Petrukh, D. I. Sanagurski
Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: nataljabodnarchyk@ukr.net

The effect of flurenizide (antibiotic of antimicrobial, antituberculosis, antichlamydia, immunomodulator, antioxidant, hepatoprotective, antiinflammatory, antiviral action) on the intensity of lipid peroxidation processes of embryos *Misgurnus fossilis* L. at the stage of 2, 16, 64, 256 and 1024 blastomeres was investigated. 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 content of secondary products of lipid peroxidation (TBA-positive products) increased during the development of embryos under the effect of antibiotic in concentration of 0.01÷1 mM, and decreased at the concentration 15 mM. It was found that loach embryos were the most sensitive to flurenizide at the stage of 16 blastomeres when the content of hydroperoxides is the maximum. The less sensitive stage of development of germ cells to the exogenous factors was 256 blastomeres.

Keywords: loach embryos, flurenizide, lipid peroxidation, hydroperoxides, TBA-positive products.

СОДЕРЖИМОЕ ПЕРВИЧНЫХ И ВТОРИЧНЫХ ПРОДУКТОВ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ В ЗАРОДЫШАХ ВЬЮНА ПРИ ДЕЙСТВИИ ФЛУРЕНИЗИДА

Н. О. Боднарчук, С. М. Мандзинець, Л. І. Петрух, Д. І. Санагурський

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

Исследовано влияние флуренизида (антибиотика противомикробного, противотуберкулезного, антихламидиозного, иммуномодулирующего, антиоксидантного, гепатопротекторного, противовоспалительного, противовирусного действия) на интенсивность процессов липопероксидации зародышей вьюна *Misgurnus fossilis* L. на этапе развития 2, 16, 64, 256 и 1024 бластомеров. Флуренизид при всех исследуемых концентрациях (0,01; 0,05; 0,15; 1; 5; 15 мМ) приводит к повышению содержания первичных продуктов липопероксидации (гидропероксидов) на этапе развития 16 бластомеров и снижению – на стадии 256 бластомеров. Выявлено преобладание повышенного содержания вторичных продуктов перекисного окисления липидов (ТБК-позитивных продуктов) во время развития клеток зародышей при влиянии антибиотика в концентрации 0,01÷1 мМ и снижение при концентрации 15 мМ. Выяснено, что зародыши вьюна на этапе развития 16 бластомеров являются наиболее чувствительными к действию флуренизида, когда содержание гидропероксидов является максимальным. Наименее чувствительной стадией развития зародышевых клеток к экзогенным факторам оказалась стадия 256 бластомеров.

Ключевые слова: зародыши вьюна, флуренизид, перекисное окисление липидов, гидроперекиси, ТБК-позитивные продукты.

Одержано: 13.10.2015