

БІОЛОГІЧНІ НАУКИ

DOI: <https://doi.org/10.32839/2304-5809/2019-3-67-46>

УДК 577.352

Тарновська А.В., Генег А.Б., Семочко О.М., Яремчук М.М.
Львівський національний університет імені Івана Франка

МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ У ЗАРОДКАХ В'ЮНА *MISGURNUS FOSSILIS* L. ЗА ДІЇ АНТИБІОТИКІВ КЛАСУ ФТОРХІНОЛОНІВ

Анотація. У статті досліджено морфологічні зміни у зародках в'юна *Misgurnus fossilis* L. за впливу антибіотиків класу фторхінолонів бороцину та флюміквілу у концентраціях 0,1%, 0,01%, 0,05% і 0,005% упродовж ембріогенезу. Встановлено, що флюміквіл інтенсивніше інгібує життєздатність зародків, ніж бороцин при дослідженні препаратів у концентраціях 0,01%, 0,05% і 0,005% на початкових стадіях розвитку зародків відхилень не спостерігалось, хоча поділ на 2 бластомери за умови впливу флюміквілу відбувався пізніше, ніж в контролі (1,5-2 години після запліднення). Протягом наступних етапів дроблення поділ бластомерів нормувався. Отримані результати дозволяють припустити, що зародки в'юна на стадії поділу бластомерів є зручною і адекватною тест-системою для вивчення впливу різних фармакологічних, хімічних та біологічно активних чинників на живі об'єкти.

Ключові слова: зародки в'юна, ембріогенез, бластомери, фторхінолони.

Tarnovska Antonina, Heneha Anastasiya, Semochko Olena, Yaremchuk Mariya
Ivan Franko National University of Lviv

MORPHOLOGICAL CHANGES IN LOACH EMBRYO *MISGURNUS FOSSILIS* L. UNDER THE INFLUENCE OF FTORHINOLONS CLASS OF ANTIBIOTICS

Summary. In the article shown morphological changes in embryos of loach *Misgurnus fossilis* L. under the action of antibiotic class fluoroquinolone, borocine and flumiqvil, in different concentrations of 0.1%, 0.01%, 0.05% and 0.005% during embryogenesis. Shown that flumiqvil inhibition of embryos viability was more than borotsyn at drug concentrations of 0.01%, 0.05% and 0.005%. Abnormalities were not observed at the initial stages of embryos, although the division into two blastomeres occurred later than in control (1.5-2 hours after fertilization) under the action of flumiqvil. During the next stages of division, the blastomerization was normalized. Due to some specific features of the blastomeres of loach liver, they cannot be equated to the division of somatic cells. Because in the early stages of embryogenesis of loach there is no synthesis of some components of cell mass. Preparation of cell division here characterized by the synthesis of mainly DNA, RNA, histones, proteins of the mitochondria, compounds rich in energy. Consequently, in the period of synchronous blastomorphism, a number of physicochemical processes are involved, which are related to the formation of trigger and regulatory mechanisms of mitosis. Since many toxic substances inhibit these cellular processes, it attracts the attention of researchers to the use of loach embryos as an object in a toxicological experiment. Dysregulation of the molecular organization of membranes or the destruction of antioxidants, as well as a number of other poorly studied factors, which occur under the influence of toxic substances, can lead to increased reactions of peroxidation and the formation of many pathological processes in the cell. Received results suggest that the embryos of loach *Misgurnus fossilis* L. at the stage of early embryogenesis is a convenient and adequate test-system for studying the influence of various pharmacological, chemical and biologically active factors on living objects.

Keywords: loach embryos, embryogenesis, blastomeres, fluoroquinolones.

Постановка проблеми. Упродовж останніх років збільшився попит на синтетичні хіміотерапевтичні препарати з огляду на ефективне лікування низки інфекційних захворювань. Особливу групу становлять фторхінолони, що пояснюється наявністю в їхніх молекулах атома фтору, внаслідок чого проявляються їх нові властивості. Зокрема, деякі із фторвмісних речовин використовують для лікування захворювань центральної нервової системи, запальних процесів, захворювань ендокринної системи, онкологічних та вірусних захворювань [7]. Однак механізм взаємодії їх з ембріональною клітиною, а також ступінь токсичності до кінця не з'ясовані. Тому в сучасній біології залишається актуальним пошук тест-систем, які б дозволяли адекватно оцінити вплив фармакологічних засобів на організм людини і тварин. Застосування зародкових

об'єктів є перспективним при дослідженні токсичності низки речовин, зокрема, антибіотиків класу фторхінолонів.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. В'юн широко використовується при дослідженні низки проблем в ембріологічних, хімічних, цитологічних та інших дослідженнях. Останнім часом вважається перспективним застосування зародків в'юна і в токсикологічній експертизі. Таку популярність зумовлює відносно коротка тривалість періоду ембріогенезу у цього виду, легкість отримання зародкових об'єктів, відсутність особливих труднощів при утриманні цих риб в лабораторії і висока чутливість їх до зовнішніх впливів [1; 2; 9; 10].

У в'юна, як і в інших кісткових риб, зародки непроникні для більшості речовин, що є серйозною перешкодою для досліджень, пов'язаних з дією інгібіторів, токсинів та інших речовин.

Тому було розроблено метод відділення бласто-дерми від жовтка, з допомогою якого оголюється внутрішня поверхня клітин базального шару, і зародок стає доступним для проникнення всіх тих речовин, які не проникають в інтактний зародок [5]. Це дало можливість використовувати зародки в'юна в цілому ряді досліджень, пов'язаних з необхідністю препаративного отримання ізо-льованих від жовтка зародків. Все це сприяло тому, що в'юн отримав широке застосування як лабораторна тварина. Дослідження найчастіше проводять тоді, коли зародок в'юна знаходиться на сьомій чи восьмій стадії, або так званих відпо-відно стадіях середньої бластули (поверхня рівна, бластомери дрібні) чи пізньої високої бластули (шапочка дрібних бластомерів дещо припіднята над жовтком, і між базальним краєм бластодиску і жовтком є маленька виїмка) [4; 11].

У зв'язку з деякими специфічними особливостями бластомерів у в'юна їх не можна пріврівнювати до поділу соматичних клітин. Це пов'язано з тим, що на ранніх стадіях ембріогенезу в'юна відсутній синтез деяких компонентів клітинної маси [5]. Підготовка клітинного ділення тут характеризується синтезом в основному ДНК, РНК, гістонів, білків мітотичного апарату, сполук, багатих енергією. Отже, в період синхронних поділів бластомерів проходять фізико-хімічні процеси, які призводять до формування пускових і регуляторних механізмів мітозу. Оскільки багато токсичних речовин інгібують саме ці клітинні процеси, то це привертає увагу дослідників до застосування зародків в'юна як об'єкту в токсикологічному експерименті.

Виділення невирішених раніше частин загальної проблеми. Зародкові об'єкти використовують як модельну тест-систему, з допомогою якої можна за короткий термін отримати відповіді на ті чи інші питання, що цікавлять дослідника. Застосування зародкових об'єктів розглядають як перспективний прискорений метод дослідження токсичності речовин, оскільки за умов впливу хімічних сполук змінюються концентрації речовин всередині зародків, швидкість біохімічних процесів та величина потенціалів клітин тощо. Розвиток науки і техніки стимулював широке використання нових антибактерійних засобів. Серед дискусійних і непростих проблем антимікробної хіміотерапії питання про можливість та проти-покази застосування фторхінолонів у лікувальній практиці є одним з найбільш актуальних. Фторхінолони – велика група антимікробних препаратів з класу хінолонів. Це високоєфективні синтетичні хіміотерапевтичні засоби широкого спектру дії, з переважаючою антибактеріальною активністю, загальнорезобтивною дією і фармакокінетикою, що забезпечує високу ступінь біодоступності, добре проникнення в органи, тканини, біологічні рідини. Відомо, що фторхінолони утворюють хелатні комплекси з катіонами кальцію та магнію [7; 11]. Важливими властивостями фторхінолонів є широкий спектр дій, активність по відношенню до мікроорганізмів, стійких до препаратів інших класів та висока клінічна ефективність при відсутності належного терапевтичного ефекта інших антимікробних засобів.

З огляду на це, застосування зародків в'юна, як тест-систем для дослідження впливу фтор-

хінолонів на розвиток та виживання зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L. набуває теоретичного та практичного інтересу.

Мета роботи. Мета роботи полягала у з'ясуванні впливу антибіотиків фторхінолонового ряду на розвиток та виживання зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L. Для досягнення цієї мети у роботі вирішували наступні завдання: з'ясувати вплив бороцину та флюміквілу на розвиток та виживання зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L. у концентраціях 0,1%, 0,01%, 0,05% і 0,005%.

Виклад основного матеріалу. Об'єктом наших досліджень були зародки прісноводної риби в'юна *Misgurnus fossilis* L. В'юн широко використовується у дослідженнях ряду проблем сучасної біології розвитку, в тому числі в ембріологічних, біохімічних, цитологічних та інших дослідженнях [3; 4; 8]. Відносно коротка тривалість періоду ембріогенезу в цього виду, легкість одержання статевих клітин і відсутність особливих труднощів в утриманні цих риб у лабораторії пояснюють його популярність [3].

Для проведення експерименту використовувались яйцеклітини і зародки в'юна *Misgurnus fossilis* L., які отримували за методикою Нейфаха А. [6]. У лабораторних умовах риб утримували в холодильнику при температурі +4+5°C. Для отримання ікри самкам внутрішньом'язово вводили 500 міжнародних одиниць хоріогонічного гонадотропіну. Овуляція наступала через 36 годин при температурі +19+20°C.

Ікру в'юна запліднювали в штучних умовах в чашках Петрі при температурі 20-21°C. У чашки розкладали по 30 ікринок. Досліди на виживання проводили із антибіотиками фторхінолонового типу бороцин і флюміквіл у концентраціях 0,1%, 0,01%, 0,05% і 0,005%, протягом 5 діб від дня запліднення до 10 діб після вилуплення. Середовище інкубації змінювали кожного дня.

У зародків в'юна, що розвивались у середовищі Гольцфретера, через годину розвитку відбувався поділ на два бластомери. Стадії розвитку визначали по таблицях нормального розвитку в'юна [5]. Через кілька секунд після запліднення у контролі жовткова оболонка відділялась від поверхні ядра з утворенням перивітелінового простору. Паралельно формувался цитоплазматичний горбик. Після 1 години інкубації спостерігався поділ на 2 бластомери (рис. 1), через 1,5 години – на 4 бластомери і т.д.

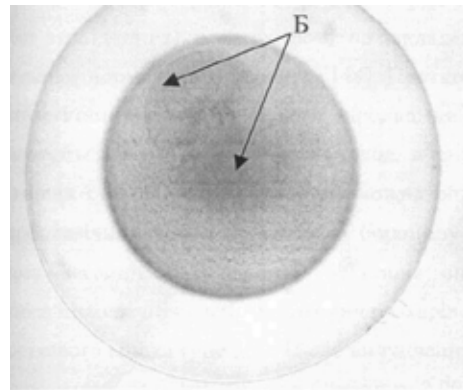


Рис. 1. Морфологічний розвиток зародків (Б – бластомери)



Рис. 2. 36 стадія – стадія перед вилупленням (48 година 32 хвилини розвитку)



Рис. 3. 39 стадія розвитку (99 година після запліднення)

Через 5 годин після запліднення наставала стадія морули, а ще через годину починалося формування бластули зародків в'юна. Через 10 годин після запліднення відбувався процес гастрюляції. На 22 стадії (через 22 години 42 хвилини після запліднення) спостерігалась поява третьої пари сомітів тулуба (в цей час мезодермальні валики починають розпадатися на окремі клітини). На 36 стадії розвитку (через 48 годин 32 хвилини) формується орган приклеювання (рис. 2), в хвостовій мезодермі більше 10 сомітів. На цій стадії починається пігментація очей, але тіло ще не пігментоване. Зародки енергійно рухаються всередині оболонки.

На 39 стадії (2 доби після вилуплення) спостерігається поява зачатків вусиків (рис. 3). В тілі на цей час починають утворюватися пігментовані клітини, а очі вже помітно пігментовані. Через 49-51 години після запліднення настає стадія вилуплення, і ще не сформовані личинки прикріплюються з допомогою органу приклеювання до поверхні чашки. Через добу після вилуплення у в'юнів збільшувалась довжина тіла, встановлювався еритроцитарний кровообіг, починалася закладка зовнішніх язбер. Передличинкова стадія завершувалась через 10 годин після вилуплення.

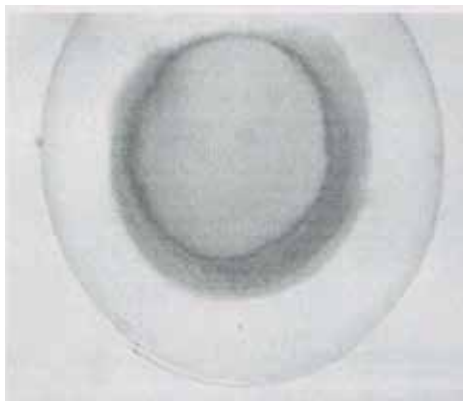
Присутність в інкубаційному середовищі бороцину 0,001% викликала порушення нормального розвитку зародків, хоча збільшення періоду синхронних дроблень не спостерігалось. На рис. 4, А зображено зародок на стадії 2 бластомерів (че-

рез 1 годину 17 хв після запліднення), а також помітна закладання борозни наступного поділу, що відповідає таблицям нормального розвитку [19]. Протягом наступних поділів також непомітно патологічних змін в морфології зародка: на 23 стадії (через 23 години після запліднення) з'являються 5 і 6 пари сомітів тулуба, а також помітні зачатки очей (рис. 4 Б). Але вже на пізніших стадіях, коли в зародка можна розрізнити частини тіла (36-37 стадії), помітний. Морфологічний вплив присутності бороцину 0,001% в інкубаційному середовищі. Зокрема, через 48 годин 50 хв розвитку (37 стадія) спостерігалися такі порушення, як деформація і слабка пігментація очей, зменшення розмірів голови (рис. 5, А), викривлення хребта в області жовткового мішка (рис. 5, Б).

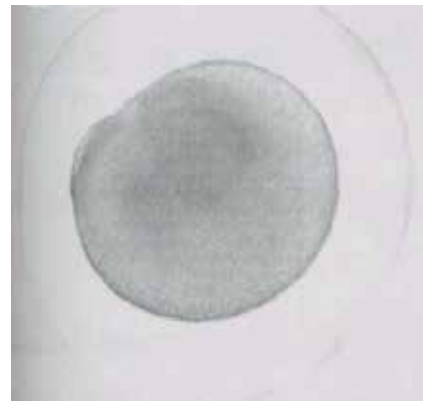
Після вилуплення (через 99 годин 28 хв) на 39 стадії у зародків, що розвивалися в присутності бороцину 0,001%, більш виражена деформація поверхні тіла, голови, очей (рис. 6).

У присутності фторхінолону флюміквілу в концентрації 0,01% морфологічні зміни більш виражені, причому препарат починає помітно впливати вже з самого початку розвитку зародків.

Так, присутність флюміквілу в середовищі спричинювала збільшення періоду синхронних дроблень (рис. 7, А): через 1 годину 23 хвилини, коли в нормальних умовах триває другий поділ, ці зародки все ще знаходилися на стадії двох бластомерів. Але на пізніших стадіях період дроблення



А



Б

Рис. 4. Розвиток зародка на стадії в присутності бороцину 0,001% (А) 2-х бластомерів; (Б) на 23 стадії (через 23 години після запліднення)

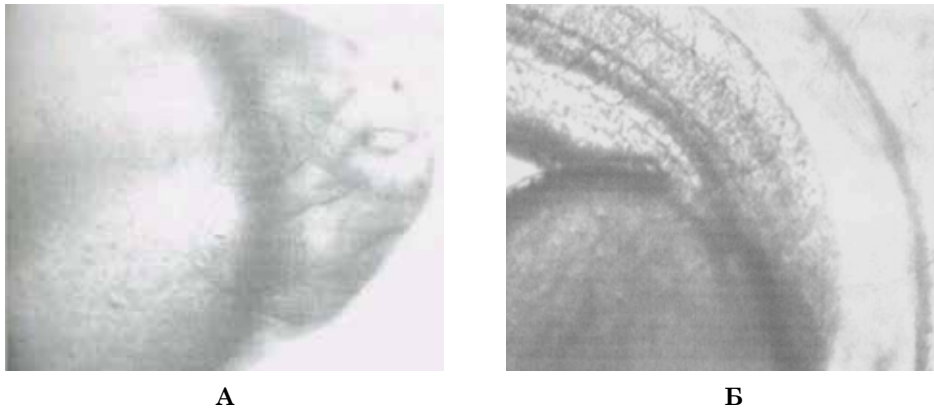


Рис. 5. Зародок під впливом бороцину 0,001% (А) на 37 стадії розвитку; (Б) викривлення хребта у жовтковій області

нормується на 23 стадії. Не спостерігають морфологічних порушень (рис. 7, Б). Але, як і у випадку з бороцином, найкраще помітні зміни, коли зародок знаходиться на пізніших стадіях розвитку.

Через дві години після вилуплення (99 годин 28 хв після запліднення; 39 стадія) спостерігається деформація очей, поверхні тіла, викривлення кінчика хвоста (рис. 8).

Морфологічні відхилення проявлялися також на стадії вилуплення. Деякі зародки на цій стадії не могли вилупитись, і навіть через 2-3 доби після вилуплення зародків в спостерігалися серцебиття, рухи тіла.

Личинки в'юна, які розвивалися за нормальних умов, були рухливими, з подовгастою формою тіла,



Рис. 6. Розвиток зародків в'юна на 39 стадії, за впливу бороцину 0,001%

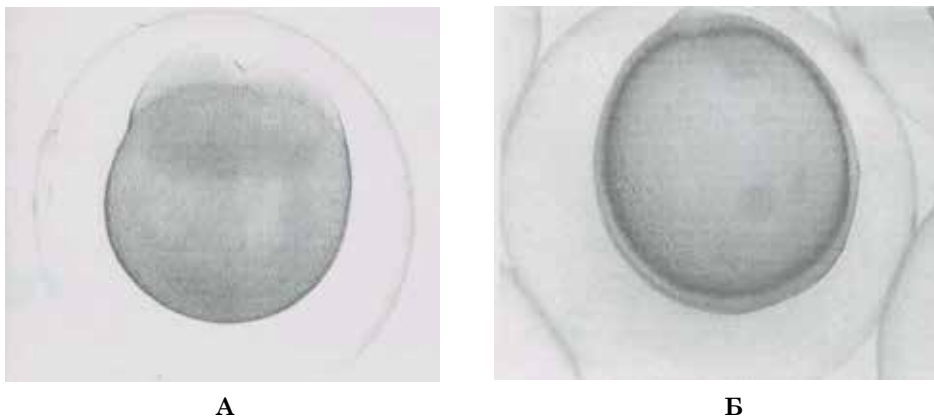


Рис. 7. Розвиток зародка під впливом флюміквілу 0,01% (А) на стадії 2-х бластомерів через 1 год 23 хв після запліднення (Б) через 22 год 52 хв після запліднення (23 стадія)

розвиненими плавцями та зябрами, вираженою пігментацією. Жовтковий міхур на цій стадії був в нормі відсутній. Личинки, які розвивалися у присутності в інкубаційному середовищі досліджуваних фторхінолонів, мали аномалії розвитку (рис. 9–12).

У більшості мутантів через 1-2 доби після вилуплення спостерігалися викривлення хребта чи хвостового відділу, деформація кісток черепа та збільшення розмірів голови, значний набряк черевної порожнини, недорозвинені плавці, зябра, вусики. Личинки були малорухливими, в деяких порушувалась координація рухів. У деяких особин були відсутні зачатки очних бокалів. Через 4-5 діб після вилуплення (на 40 стадії) в деяких з них були відсутні зачатки зовнішніх зябер або з'являлися вони лише на одному боці тіла.



Рис. 8. Пошкодження кінчика хвоста за впливу флюміквілу (0,01%) на 39 стадії розвитку

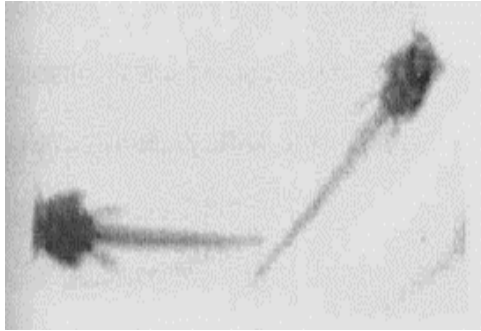


Рис. 9. Розвиток зародків в'юна в контролі

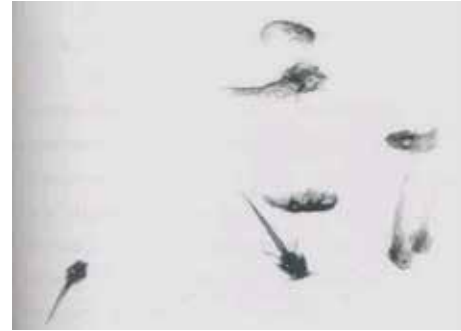


Рис. 10. Розвиток зародків за впливу бороцину (0,01%)



Рис. 11. Розвиток зародків в'юна в присутності бороцину (0,05%)

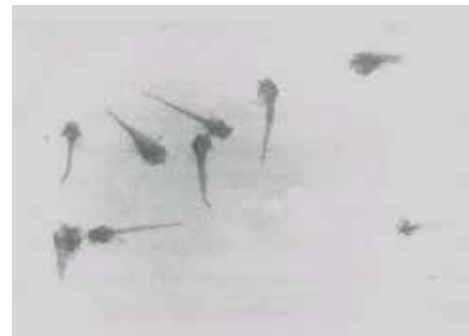


Рис. 12. Розвиток зародків в'юна в присутності бороцину (0,001%)

Такі аномалії спостерігалися приблизно в 20% зародків при 0,01% концентрації препарату, у 15% – при 0,05% концентрації і близько 35% – при 0,005% концентрації бороцину. Решта тварин, в яких не спостерігалися виражені аномалії розвитку, також були малорухливими, їх шкіра була слабше пігментована в порівнянні з контролем (5%, 10% і 0% відповідно до концентрації).

Важливо відмітити, що при нижчій концентрації препарату 0,005% спостерігалася більша кількість ембріонів із затримкою розвитку (25%) в порівнянні з вищою концентрацією препарату 0,01% (10%). Це можна пояснити тим, що при нижчій концентрації препарату виживає більша кількість ембріонів, незалежно від стану розвитку.

Висновки та перспективи дослідження.

У результаті наших досліджень ми зробили висновки, що флюміквіл інтенсивніше інгібує життєздатність зародків в'юна, ніж бороцин. При дослідженні препаратів у концентраціях 0,01%, 0,05% і 0,005% на початкових стадіях розвитку зародків відхилень не спостерігалось, хоча поділ на 2 бластомери за умови впливу флюміквілу відбувався пізніше, ніж в контролі (1,5-2 години після запліднення). Протягом наступних етапів дроблення поділ бластомерів нормувався.

У зв'язку з деякими специфічними особливостями бластомерів у в'юна їх не можна прирівнювати до поділу соматичних клітин. Це пов'язано

з тим, що на ранніх стадіях ембріогенезу в'юна відсутній синтез деяких компонентів клітинної маси. Підготовка клітинного ділення тут характеризується синтезом в основному ДНК, РНК, гістонів, білків мітотичного апарату, сполук, багатих енергією. Отже, в період синхронних дроблень бластомерів проходить ряд фізико-хімічних процесів, які стосуються формування пускових і регуляторних механізмів мітозу. Оскільки багато токсичних речовин інгібують саме ці клітинні процеси, то це привертає увагу дослідників до застосування зародків в'юна як об'єкту в токсикологічному експерименті. Порушення молекулярної організації мембран чи руйнування антиоксидантів, як і ряд інших маловивчених факторів, що відбувається під впливом токсичних речовин, можуть призвести до посилення реакцій перекисного окиснення і формування багатьох патологічних процесів в клітині.

Зародки в'юна *Misgurnus fossilis* L. виявились досить чутливими до сторонніх впливів, зокрема впливу антибіотиків фторхінолонового ряду бороцину та флюміквілу у концентраціях 0,1%, 0,01%, 0,05% і 0,005%. Виходячи з цього, можна вважати, що зародки в'юна на стадіях поділу бластомерів є зручною і адекватною тест-системою для вивчення впливу різних фармакологічних, хімічних та біологічно активних чинників на живі об'єкти.

Список літератури:

1. Генєга А. Електричні характеристики мембран зародків риб за дії хімічних чинників. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*. 2009. Вип. 49. С. 13–22.
2. Генєга А.Б. Динаміка трансмембранного потенціалу зародків за дії амінокислотних похідних 1,4-нафтохінону. Актуальні питання теоретичної та клінічної медицини : збірник тез доповідей Міжнародної науково-практичної конференції студентів та молодих вчених, м. Суми, 10-12 квітня 2013 р. Суми : СумДУ, 2013. С. 96.

3. Гойда О.А. Биофизические аспекты раннего онтогенеза животных. Київ : Наукова думка, 1993. 224 с.
4. Жулинский В.Н., Билько В.П. Влияние экзогенных аминокислот на жизнеспособность рыб в раннем онтогенезе. *Гидробиологический журнал*. 1997. Т. 33. № 5. С. 64–68.
5. Костомарова А.А. Вьюн *Misgurnus fossilis*. В кн. : Объекты биологии развития. Москва : Наука, 1975. С. 308–323.
6. Нейфах А.А. Молекулярная биология процессов развития. Москва : Наука, 1977. 311 с.
7. Падейская Е.Н., Яковлев В.П. Антимикробные препараты группы фторхинолонов в клинической практике. Москва : Лагота, 1998. 351 с.
8. Головчак Н.П., Тарновська А.В., Коцкомбас Г.І., Санагуський Д.І. Процеси перекисного окиснення ліпідів у живих організмах : монографія. Львів : ЛНУ імені Івана Франка, 2012. 252 с.
9. Семочко О.М. Глутатіонпероксидазна активність зародків в'юна за впливу електромагнітного випромінювання зеленого діапазону. Актуальні питання теоретичної та клінічної медицини : збірник тез доповідей Міжнародної науково-практичної конференції студентів та молодих вчених, м. Суми, 10-12 квітня 2013 р. Суми : СумДУ, 2013. С. 95–96.
10. Тарновська А.В., Генеха А.Б., Семочко О.М., Яремчук М.М. Перекисне окиснення ліпідів у зародках в'юна протягом раннього ембріогенезу за впливу антибіотику фторхінолонового ряду бороцину. *Молодий вчений*. 2018. № 9(61). С. 290–293.
11. Яцків О., Тарновська А. Інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів у зародках в'юна за впливу катіонів кальцію та магнію. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*. 2014. Вип. 68. С. 101–108.

References:

1. Heneha A. (2009). Influence of chemical substances on the fish embryo electric properties. *Visnyk of the Lviv University. Series Biology*, issue 49, pp. 13–22.
2. Heneha A. (2013). Dynamics of transmembrane potential of embryo under the action of amino acid derivatives of 1,4-naphthoquinone. Topical issues of clinical and theoreticl medicine. Sumy : SumDU, 10-12 april, p. 96.
3. Hoida O.A. (1993). Biophysical aspects of early ontogenesis of animals. Kyiv : Naukova dumka, 224 p.
4. Zhulinskij V.N., Bilko V.P. (1997). The effect of exogenous amino acids on the viability of fish in early ontogenesis. *Hydrobiolog. Journal*, Т. 33, № 5, pp. 64–68.
5. Kostomarova A.A. (1975). Developmental biology objects. Moskva : Nauka, pp. 308–323.
6. Neyfah A.E. Molecular biology of developmentprocesses. Moskva : Nauka, 19776. 311 p.
7. Padeiska E.N., Yakovlev V.P. (1998). Antimicrobial fluoroquinolones in clinical practice. Moskva : Lahota, 351 p.
8. Holovchak N.P., Tarnovska A.V., Kotsumbas G.I., Sanagursky D.I. (2012). Processes of peroxide oxidation of lipids in living organisms : monograph. Lviv : Ivan Franko LNU, 252 p.
9. Semochko O.M. (2013). Glutathione peroxidase activity of loach embryos due to exposure to green-field electromagnetic radiation. Topical issues of clinical and theoreticl medicine. Sumy, SumDU, 10-12 april, pp. 95–96.
10. Tarnovska A.V., Heneha A.B., Semochko O.M., Yaremchuk M.M. (2018). Lipid peroxidation in loach embryos during early embryogenesis under influence of fluoroquinolone antibiotic borocine. *Young Scientist*, issue 61(9), pp. 290–293.
11. Yatskiv O., Tarnovska A. (2014). Lipid peroxidation in loach embryos (*Misgurnus fossilis* L.) under influence of cations calcium and magnesium. *Visnyk of the Lviv University. Series Biology*, issue 68, pp. 101–108.