

О. С. Яремкевич, В. І. Лубенець

Національний університет “Львівська політехніка”,
кафедра технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології
olena.s.yaremkevych@lpnu.ua

ВПЛИВ ПОХІДНИХ ТІОСУЛЬФОКИСЛОТ НА МОРФОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ЗАРОДКІВ В'ЮНА НА ПОЧАТКОВИХ СТАДІЯХ РОЗВИТКУ

<https://doi.org/10.23939/ctas2023.01.099>

Морфологічними дослідженнями встановлено, що за дії тіосульфатів різної будови не спостерігається інгібування поділів бластомерів та формування зародкових шарів у в'юна (*Misgurnus fossilis*L.). Проте за дії нітробензентіосульфату калію (НТК) спостерігається затримка в розвитку зародків в'юна приблизно на 13–16 год із подальшою судинною патологією. За дії НТК у зародків в'юна спостерігаються виражені зміни серцево-судинної системи, які проявлялися розширенням кровоносних судин. Отримані результати на тест-модельних об'єктах свідчать про перспективи похідних тіосульфокислот, зокрема НТК, як нових антитромботичних та антиагрегантних засобів із високою ефективністю і низькою токсичністю.

Ключові слова: тіосульфати; бластомери; зародки в'юна *Misgurnus fossilis*L.

Вступ

Цілеспрямований пошук нових біологічно активних сполук із можливістю застосування їх як потенційних лікарських препаратів є актуальним науково-технологічним завданням. Особливе місце належить створенню синтетичних аналогів природних біорегуляторів [1, 2], котрі здатні проявляти більшу чи меншу біологічну дію і, завдяки цьому, регулювати фізіологічну активність клітини, органу або й організму загалом. Одним із таких синтетичних аналогів природних біорегуляторів, зокрема діючої речовини часнику (*Allium sativum*L.), є тіосульфати – сірковмісні біологічно активні сполуки із загальною формулою RSO_2SR' . Високий індекс і широкий спектр антимікробної активності тіосульфоестерів, їх стабільність та низька токсичність дозволили запропонувати ці сполуки як лікарські субстанції [3–6]. Окрім цього, синтетичні тіосульфати є більш стабільні, ніж їх природні аналоги.

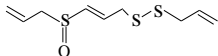
Головною причиною смертності у всьому світі є серцево-судинні захворювання. У етімології серцево-судинних захворювань, а саме: артеріальних тромбозів, зростання агрегації тромбоцитів відіграє суттєву роль, призводячи до

таких захворювань, як інфаркт міокарда, інсульт та ін. [7].

На сучасному етапі відомо багато антиагрегантів, які за механізмом дії поділяються на декілька груп. Деякі з них пов'язані з впливом на метаболізм арахідонової кислоти, інші – з АДФ-залежним шляхом агрегації, решта – з інгібуванням фактора активації тромбоцитів (антагоністів фібриногенових рецепторів) [8]. На агрегацію тромбоцитарних пластинок впливає миттєве збільшення “вільного” кальцію у цитоплазмі Ca^{2+} , генерація тромбоксану A_2 та активація рецепторів фібриногену GPIIb/IIIa. Тромбоксан A_2 , що виробляється тромбоцитами, спричинює агрегацію тромбоцитів та звуження судин, тоді як простагліцин PGI_2 , який утворюється у стінках кровоносних судин клітинами ендотелію та гладких м'язів, навпаки, пригнічує агрегацію тромбоцитів і зумовлює розширення судин. За допомогою тромбоксану A_2 та простагліцину забезпечується локальна агрегація тромбоцитів із подальшим тромбоутворенням. Обидві речовини утворюються за участю циклооксигенази з арахідонової кислоти [9].

Баланс між тромбоксаном А₂ та простацикліном може зсуватися у бік простацикліну у разі введення малих доз аспіриноподібних речовин, а також метаболітів часнику, спричиняючи при цьому незворотнє пригнічення циклооксигенази, ацетилюючи залишок серину в активному центрі ензиму. Оскільки дія нестероїдних протизапальних речовин на тромбоцити є тривалішою, ніж дія на стінки кровоносних судин, тому дані речовини зумовлюють антикоагуляційний ефект, важливий для запобігання міокардіальних ускладнень та інсульту [10]. У роботі [11] був показаний вплив складових часнику на біохімію та фізіологію тромбоцитів, а саме ігнібуючу дію на циклооксигеназну активність та утворення тромбоксану А₂. Фукао та інші у своїй роботі [12] продемонстрували сильні антитромботичні властивості екстрактів часнику, які здатні активувати NO-синтазу, підтримуючи необхідний рівень NO як необхідний фактор для регуляції судинного тонууса, та можуть взаємодіяти безпосередньо з фібриногеновими рецепторами GPIIb/IIIa, зменшуючи при цьому здатність тромбоцитів зв'язуватись із фібриногеном.

Окрім цього, антитромботична дія часникового порошку “без запаху” була продемонстрована у фібринолітичних та коагуляційних системах крові [13]. Показано, що часник не тільки активує фібринолітичну діяльність, прискорюючи t-РА-опосередковану активацію плазміну, але й пригнічує коагуляційну систему зменшеним утворенням тромбіну, синтез та експресію білку фібрилярного колагену I типу [13], тобто може бути використаним для попередження патологічного тромбоутворення в серцево-судинних патологіях. Отже, активні метаболіти часнику множинними механізмами активно ігнібують агрегацію тромбоцитів та відіграють велику роль у попередженні серцево-судинних захворювань.

Аджоен ((E, Z)-4,5,9-тритадека-1,6,11-трієн-9-оксид)  – сполука, виділена зі спиртового екстракту часнику, ігнібувала функціональну дію інтегринів тромбоцитів GPIIb/IIIa, і таким чином запобігала їх агрегації [14].

Ароматичні тіосульфони через пригнічення рецепторів фібриногену GPIIb/IIIa та синтезу тромбоксану А₂ є ефективними ігнібіторами агрегації тромбоцитів та використовуються як

антикоагулянти, що є підґрунтям для створення на їхній основі нових антитромботичних препаратів для запобігання міокардіальних ускладнень та інсульту [15, 16].

Пошук нових антитромботичних та антиагрегантних засобів, що мають високу ефективність і низьку токсичність, є важливим завданням у вирішенні проблем забезпечення способів регулювання фізіологічної активності організму та запобігання виникнення серцево-судинних захворювань.

Метою статті було дослідження впливу похідних тіосульфокислот на морфологічні зміни зародків в'юна *in vivo* впродовж перших поділів бластомерів, як тест-модельних об'єктів для пошуку лікарських засобів.

Матеріали та методи досліджень

Об'єктом досліджень були зародки прісноводної риби в'юна (*Misgurnus fossilis* L.), який належить до родини в'юнових *Cobitidae*, ряду Карпоподібних *Cypriniformes*, надряду кісткових риб *Teleostei*. Відсутність особливих труднощів в утриманні в'юна у лабораторних умовах, відносна легкість отримання ооцитів та сперміїв, коротка тривалість періоду ембріогенезу та деякі інші особливості в'юна пояснюють його зручність для проведення експериментальних робіт *invitro* та *invivo* [17, 18]. Тому в'юн широко використовується у дослідженнях ряду проблем сучасної біотехнології, а також в біофізичних, біохімічних, цитологічних та ембріологічних дослідженнях [19–22].

Отримання зародків в'юна та характеристика ембріонального розвитку. У природних умовах в'юн нереститься в першій половині травня при температурі води 13–14 °C [17, 18]. Відлов особин проводять із жовтня. У лабораторних умовах ікру можна отримати регулярно з жовтня до червня.

Для експерименту використовували яйцеклітини і зародки в'юна *Misgurnus fossilis* L., які отримували і запліднювали за методикою Нейфаха [23]. Для отримання ікри самкам внутрішньом'язово вводили хоріогонічний гонадотропін за 24–36 год до проведення експерименту. Залежно від пори року і розмірів самки, доза гормону складала від 300 (з жовтня до січня) до 500 міжнародних одиниць (з лютого до червня)

[24]. Овуляція наступала через 36–40 год при температурі +19–20 °С. Самця декапітували, сім'яники подрібнювали і заливали фізрозчином для холоднокровних, склад якого наведений у табл. 1.

Запліднення ікри проводили в чашках Петрі, добавляючи суспензію спермійв. Для задовільного

запліднення потрібен контакт ікри із спермою 5–10 хв [23]. Запліднену ікру відмивали від спермійв й інкубували при температурі 21–22 °С у розчині Гольтфретера. Стадії розвитку контролювали візуально під бінокулярним мікроскопом МБС-9. Для контролю зародки інкубували в розчині Гольтфретера (табл. 1).

Таблиця 1

Хімічний склад фізіологічного розчину для холоднокровних (розчин Гольтфретера, рН=7,4)

Складники	Маса (мг) для 0,5 М маточного розчину x 100 мл	Об'єм 0,5 маточного розчину на 1л, мл
CaCl ₂	5,54	3
NaCl	2,92	60
KCl	3,72	2
MgCl ₂ · 6H ₂ O	10,16	0,5
NaHCO ₃	4,20	2
C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ · 2H ₂ O ЕДТА	1,86	5

Після одногодинної інкубації зародків при температурі 21,5 °С появляються перші 2 бластомери, борозна першого поділу проходить меридіально [17]. Згодом вік зародків вимірюється величиною τ_0 – умовних одиниць “Детлаф” [25]. Величина τ_0 – тривалість одного мітотичного циклу в період синхронних поділів бластомерів становить 31 ± 2 хв. Через півтора години після запліднення зародки представлені 4 бластомерами; борозна другого поділу проходить теж меридіально, але перпендикулярно борозні першого поділу; 8 бластомерів з'являються на стадії $4\tau_0$; 16 бластомерів – на стадії $5\tau_0$.

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, тобто бластодиск, клітини якого не відділені від жовтка мембраною. Після цієї стадії клітини нижнього шару дотикаються до жовтка безпосередньо своєю базальною частиною, а верхні оточені зі всіх сторін плазматичною мембраною (ПМ). Вперше проявляються якісні відмінності між бластомерами на стадії $7\tau_0$, коли зародки представлені 64 бластомерами, які розміщені в 2–3 шари, утворюючи “високу шапочку”. На стадії $8\tau_0$ зародки складаються із 128, а на стадії $10\tau_0$ – 256 бластомерів, які утворюють морулу. Після цієї стадії спостерігається

десинхронізація каріокінезу в клітинах. Через 6 год після запліднення розпочинається асинхронний поділ ядер [24].

Морфологія зародків в'юна за нормальних умов упродовж раннього ембріогенезу. У зародків, які розвивалися в контрольному середовищі (розчині Гольтфретера), перший поділ відбувався через 60 хв, а кожен наступний – через 30 ± 2 хв. Стадії розвитку визначали по таблицях нормального розвитку [26]. Після запліднення у нормі спостерігали відділення жовткової оболонки від поверхні ядра і утворення перивітелінового простору (рис. 1, а).

Паралельно відбувалося формування цитоплазматичного горбика. Після години інкубації спостерігався поділ на 2 бластомери (рис. 1, б), через 1,5 год після запліднення – на 4 бластомери, борозна другого поділу проходить теж меридіально, але перпендикулярно борозні першого поділу.

Отже, вісім бластомерів з'являються на стадії 3 поділу, а 16 бластомерів – на стадії 4 поділу (рис. 2, а, б). Через 3 год після запліднення зародки представлені 32 бластомерами і борозни 5-го поділу проходять паралельно екватору жовтка, в результаті чого утворюється “шапочка” на анімальному полюсі, тобто бластодиск, клітини якого не відділені від жовтка мембраною.



Рис. 1. Розвиток зародків в'юна перед першим поділом (а – 43 хв) та на стадії першого поділу в контролі (б – 60 хв – $2\tau_0$) (збільшення $\times 56$)

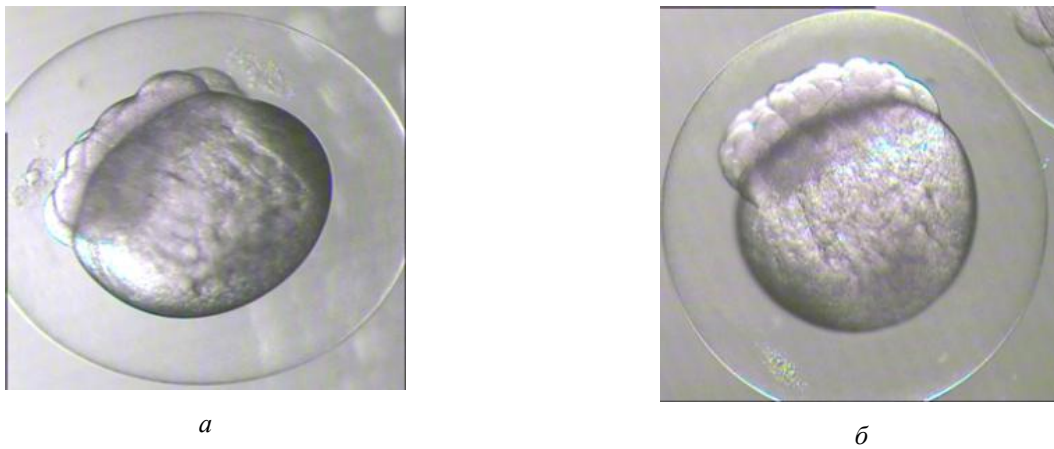


Рис. 2. Розвиток зародків на стадіях 3 (а – 8 бластомерів) та 4 (б – 16 бластомерів) поділів бластомерів (збільшення $\times 28$)

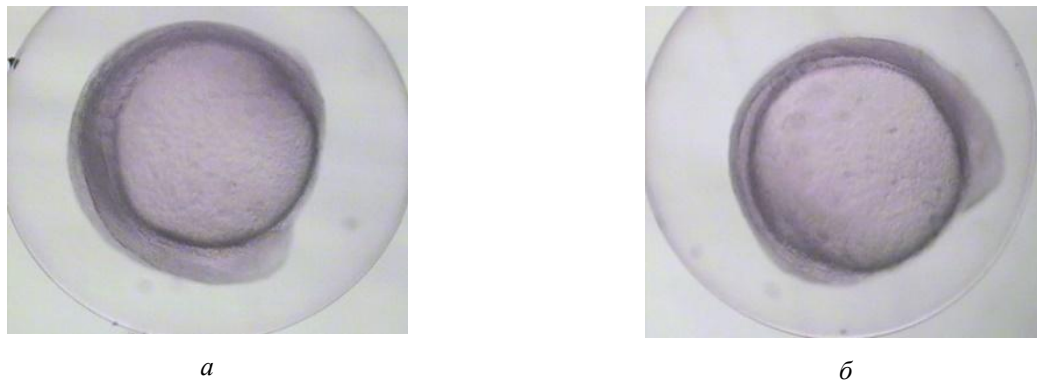


Рис. 3. Розвиток зародків в'юна на 22 стадії розвитку (збільшення $\times 28$)

Стадія морули наступала через 5 год після запліднення, а через 6 год починалося формування бластули зародків в'юна. На 10-ту год розвитку наступав процес гастрюляції. На 22 стадії розвитку (через 22 год 42 хв після запліднення) спостерігалася поява 3-х пар сомітів тубула; в цей час мезодермальні валики починають розпадатися на окремі клітини (рис. 3).

Згодом, на 36-й стадії розвитку (48 год 32 хв), утворюється орган приклеювання, в хвостовій мезодермі більше 10 сомітів. На цій стадії розвитку проходить пігментація очей, однак тіло на цей час ще не пігментоване. Зародки починають енергійно рухатися всередині оболонки. На 39-й стадії (49 год, 2 доба після вилуплення) спостерігається поява зачатків вусиків та добре видно зачатки

очних бокалів. На цей час вже починають утворюватися пігментні клітини, очі також вже пігментовані.

Через 49–51 год після запліднення наступає стадія вилуплення, і ще не сформовані личинки прикріплюються за допомогою органу приклеювання до поверхні чашки. Через добу після вилуплення у личинок в'юнів збільшувалась довжина тіла, встановлювався еритроцитарний кровообіг, починалася закладка зовнішніх зябер. Передличинкова стадія завершувалася через 10 год після вилуплення.

На 6–7 добу розвитку зародків, які розвивались у нормальних умовах, характеризувалися подовгастою формою тіла та слабо вираженою пігментацією. Грудні та хвостовий плавці округлої форми, добре розвинені та частково пігментовані. Жовтковий міхур у личинок на цій стадії ще зберігався вздовж всього тіла (рис. 4).

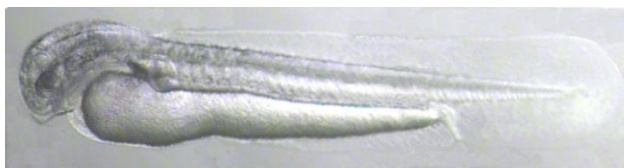


Рис. 4. Розвиток личинок в'юна на 6–7 добу розвитку (збільшення $\times 28$)

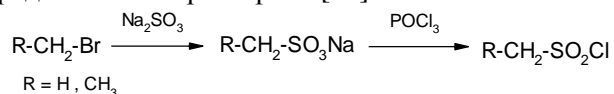
Личинки, які розвивалися протягом 9–10 доби, характеризувалися також подовгастою формою тіла, добре вираженою пігментацією та серцевою діяльністю. Вони були рухливими, з доброю координацією тіла, зябра личинок були добре розвинені, грудні та хвостовий плавник також були округлої форми і добре розвинуті. Жовтковий міхур на цій стадії в нормі був відсутній (рис. 5).



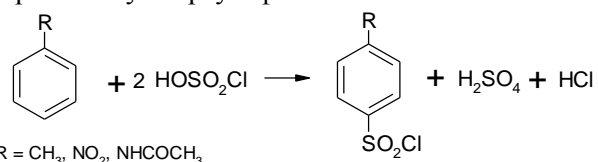
Рис. 5. Розвиток личинок в'юна на 9–10 добу розвитку (збільшення $\times 28$)

Властивості солей тіосульфокислот. Відповідними сполуками для синтезу солей тіосуль-

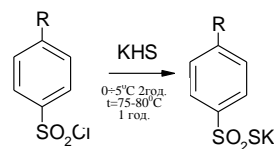
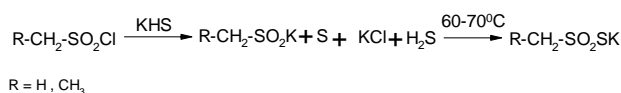
фокислот використовували відповідні сульфохлориди. Алкансульфохлориди були одержані рядом таких перетворень [27]:



Сульфохлориди ароматичних похідних одержували сульфохлоруванням толуолу, ацетаніліду та нітробензолу хлорсульфоновою кислотою:

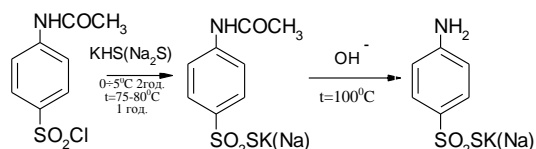


Окисно-відновною взаємодією сульфохлоридів із гідросульфідом калію були отримані відповідні калієві солі алкан- та ароматичних тіосульфокислот:



$\text{R} = \text{CH}_3, \text{NO}_2$

4-Амінобензентіосульфони калію та натрію були синтезовані за схемою перетворень.



Будова та індивідуальність даних речовин підтверджена методами тонкошарової хроматографії, даними інфрачервоної спектроскопії (ІЧ), протонного ядерного магнітного резонансу та даними елементного аналізу.

Для досліджень морфологічних змін та виживання зародків в'юна були синтезовані натрієві та калієві солі тіосульфокислот, структурні формули яких представлені у табл. 2.

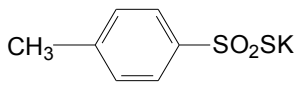
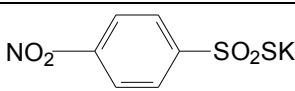
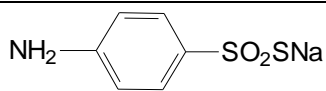
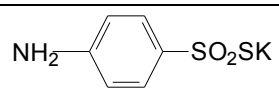
Для визначення оптимальних концентрацій досліджуваних речовин та морфологічних змін зародків за дії похідних тіосульфокислот, запліднену в штучних умовах (у чашках Петрі) ікру в'юна інкубували у досліджуваних розчинах – метилтіосульфату калію (ТМК), толуентіосульфату калію (ТТК), етилтіосульфату калію (ЕТК), нітробензентіосульфату калію (НТК), параамінобензентіосульфату натрію (АТNa) та калію (АТК) у концентрації $4 \cdot 10^{-3}$ моль/л від

моменту запліднення протягом двох діб методом світлової мікроскопії. Для аналізу даних виживання зародків протягом двох тижнів розвитку були

обрані концентрації – $4 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $4 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $4 \cdot 10^{-7}$ моль/л. Контрольні зародки інкубували у розчині Гольтфрета для холонокровних (табл. 1).

Таблиця 2

Структурні формули досліджених тіосульфатів

№	Структура	Назва
1	$\text{CH}_3\text{SO}_2\text{SK}$	Метилтіосульфат калію
2		Толуентіосульфат калію
3	$\text{C}_2\text{H}_5\text{SO}_2\text{SK}$	Етилтіосульфат калію
4		4-Нітробензентіосульфат калію
5		4-Амінобензентіосульфат натрію
6		4-Амінобензентіосульфат калію

Статистичне опрацювання результатів.

Дані досліджень обробляли статистично, з вираховуванням середніх арифметичних величин M , середньої квадратичної похибки σ та стандартних похибок середнього арифметичного у вигляді $(M \pm m)$ при $n = 5$. Статистичну обробку експериментальних даних проводили з використанням програми *Microsoft Excel* для Windows. Оцінку достовірності різниці між статистичними характеристиками двох порівнювальних сукупностей даних визначали за допомогою тесту Тьюкі однофакторного аналізу (ANOVA), де відмінності вважали достовірними при $p \leq 0,05$ [28]. Результати обробки представлені у вигляді діаграм.

Результати досліджень та їх обговорення

У зародків, які розвивалися у досліджуваних речовинах, як і у контрольних дослідах, спостерігали відділення жовткової оболонки від поверхні бластомера, утворення перивітелінового простору і формування цитоплазматичного горбика. Перший поділ відбувався через 60 хв (2 бластомери) (рис. 6), хоча для параамінобензентіосульфату натрію та калію розміри бластомерів спостерігались зменшеними (рис. 6, д, е).

Кожний наступний поділ відбувався через (30 ± 2) хв, і відповідав визначеним стадіям за таблицями нормального розвитку Костомарова

[22]. Наступні стадії утворення бластомерів також відповідали часовим нормам – 2 год розвитку – чітко прослідковується утворення 8-ми бластомерів (3 поділ). Через 3 год після запліднення зародки, як і в контролі, представлені 32-ма бластомерами, де борозни 5-го поділу проходять паралельно екватору жовтка, в результаті чого утворювалась “шапочка”. Стадія морули у контролі та у всіх досліджуваних зразках наступала через 5 год після запліднення. Подальша інкубація зародків в’юна в середовищі тіосульфатів через добу після запліднення не спричиняла суттєвих морфологічних змін, оскільки спостерігали появу 7-ї та 8-ї пари тулубових сомітів на всіх зразках, як і в контролі, що відповідає 24-й стадії розвитку.

Подібні результати спостерігали і через дві доби розвитку, де бачимо у всіх зародків чітко сформований орган приклеювання, початок пульсації серця та початок пігментації очей, і більше 10 сомітів у хвостовій мезодермі, що відповідає 36-й стадії розвитку – стадії перед вилупленням (рис. 7, В, I-III, V). Однак дещо інакшу ситуацію спостерігали із зародками, інкубованими у розчині нітробензентіосульфату калію, де відзначено затримку розвитку зародків приблизно на 13–16 год, що відповідало 30–33-й стадії (рис. 7, IV), хоча розвиток спостерігався до стадії личинки.

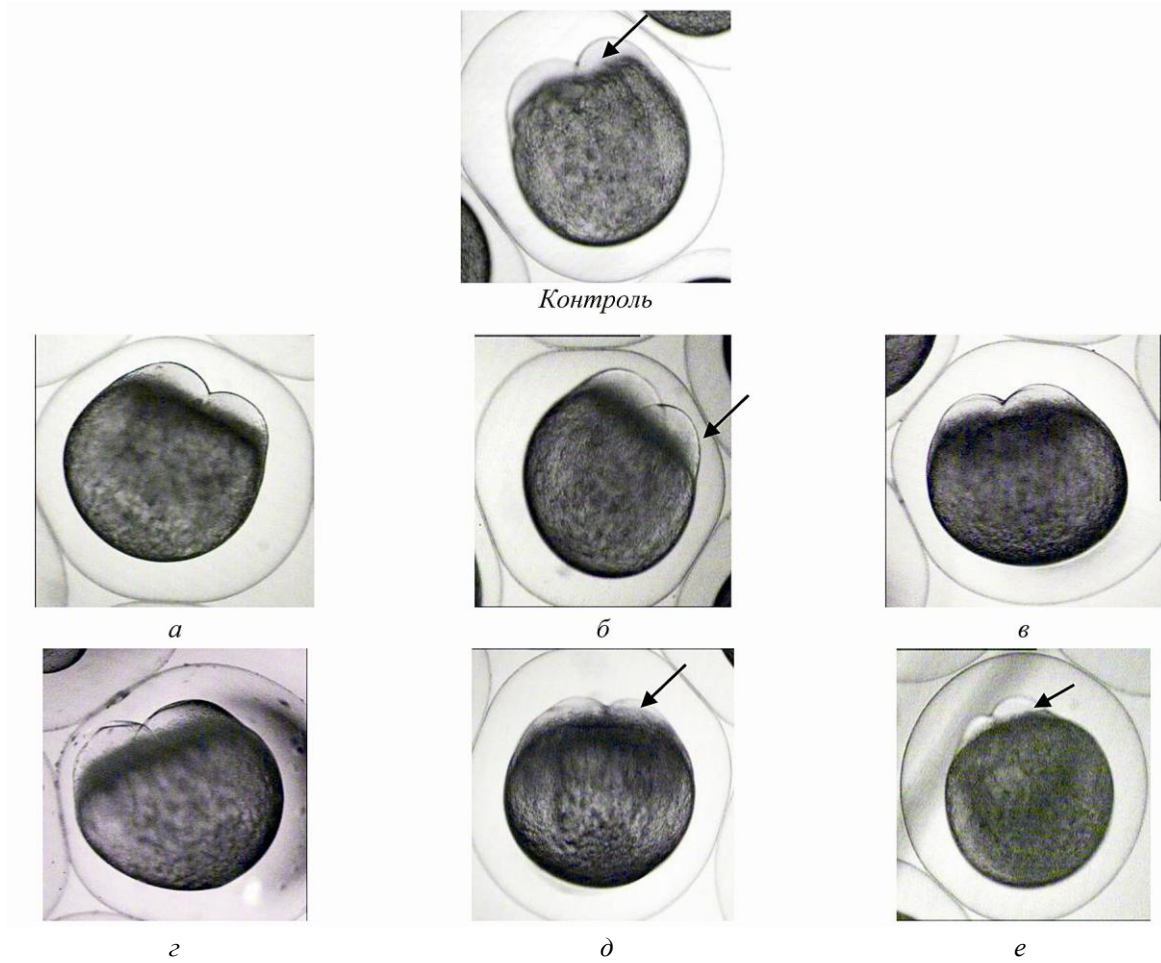


Рис. 6. Розвиток зародків в'юна на стадії 2 бластомерів за дії похідних тіосульфокислот у концентрації $4 \cdot 10^{-3}$ моль/л: а – метилтіосульфонату калію (МТК); б – толуентіосульфонату калію (ТТК); в – етилтіосульфонату калію (ЕТК); г – нітробензентіосульфонату калію НТК; д – параамінобензен тіосульфонату натрію АТNa; е – параамінобензентіосульфонату калію АТК (збільшення $\times 28$).
Стрілкою позначені бластомери

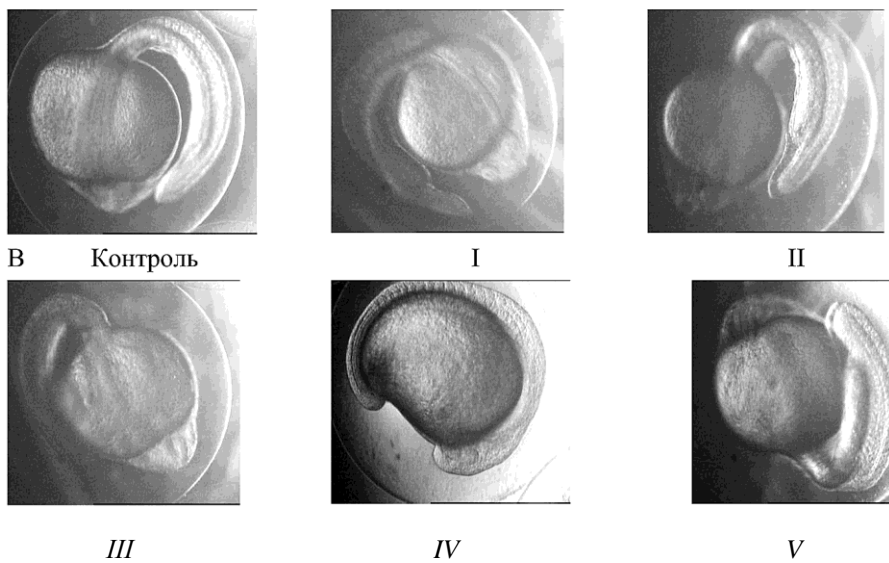


Рис. 7. Розвиток зародків в'юна на 36-тій стадії за дії біологічно активних речовин: I – МТК; II – ТТК; III – ЕТК; IV – НТК; V – АТNa (збільшення $\times 28$)

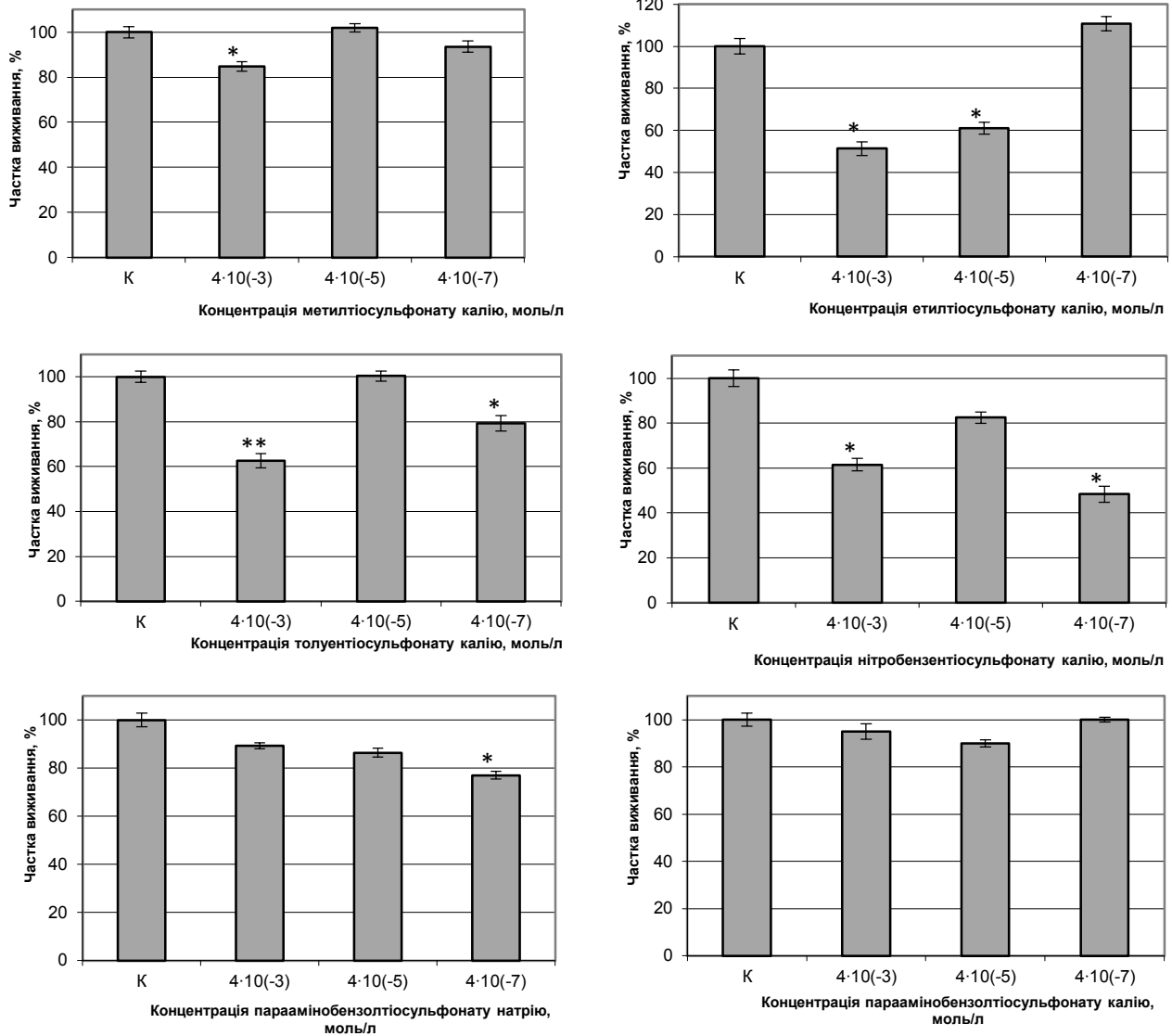


Рис. 8. Показники виживання зародків на 14-ту добу їх інкубації у досліджуваних розчинах.

Рівень достовірності: * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$

Результати дослідження виживання зародків в'юна, інкубованих у досліджуваних розчинах різних концентрацій ($4 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $4 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $4 \cdot 10^{-7}$ моль/л) через два тижні їх розвитку, представлені на рис. 8.

На діаграмах відмічено високий рівень виживання зародків за дії похідних тіосульфокислот у високих концентраціях, що свідчить про відсутність шкідливої дії досліджуваних речовин, котрі, метаболізуючись, не тільки не викликали ембріотоксичності, але і підвищували рівень виживання зародків, порівняно з контролем, окрім етилтіосульфонату калію, де спостерігаємо достовірне зменшення виживання зародків за його дії у високих концентраціях ($4 \cdot 10^{-3}$, $4 \cdot 10^{-5}$ моль/л) на 51 % та 61 %, відповідно.

Як видно з рис. 8, найвищі показники виживання зародків спостерігали за дії параамінобензентіосульфонату калію та метилтіосульфонату калію. За їх дії у високих концентраціях $4 \cdot 10^{-3}$ моль/л спостерігали найбільш наближені до контрольних значень виживання, які становлять 95 % та 85 %, відповідно. У концентрації $4 \cdot 10^{-5}$ моль/л – 90 % та 102 % відносно контролю та 100 % та 94 % – за дії у концентрації $4 \cdot 10^{-7}$ моль/л. Найбільш ембріотоксичною виявилась речовина нітробензентіосульфат калію, де спостерігали найнижчі показники виживання зародків (48 %) навіть за дії низької концентрації $4 \cdot 10^{-7}$ моль/л.

Окрім цього, у результаті досліджень личинкових стадій розвитку в'юна (на п'ятнадцяту

добу після запліднення), інкубовані у контрольному розчині личинки характеризувалися видовженою формою тіла з добре вираженою пігментацією та ритмічною серцевою діяльністю (рис. 9, а).

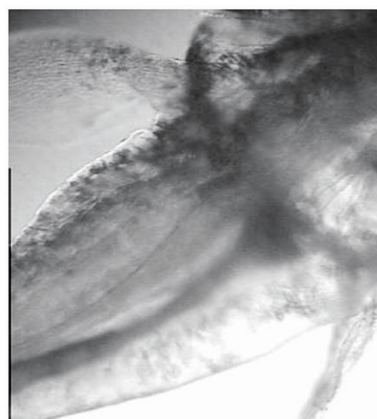
За дії нітробензентіосульфонату калію спостерігаються виражені зміни серцево-судинної системи, які проявлялися розширенням кровеносних судин та капілярів (рис. 9, б) і, як наслідок, набряку тканин тіла.

Нітробензентіосульфонат калію, очевидно, завдяки присутності у структурі вільної нітрогрупи, здатний впливати на стінки кровеносних судин та регулювати судинний тонус, можливо, за рахунок активації NO-синтази. Адже відомо, що оксид азоту (NO) бере участь у міжклітинній комунікації в центральній та периферичній нервовій системі, регулює агрегацію тромбоцитів та адгезію нейтрофілів до ендотелію, приймає участь

у нейромедіаторних процесах шляхом активації гуанілатциклази та є необхідним для цитотоксичної активності макрофагів. Оксид азоту збільшує утворення циклічного ГМФ у гладеньких м'яцях судин через активацію розчинної гуанілатциклази, яка своєю чергою активує Ca^{2+} АТФазу, що сприяє зниженню вмісту внутрішньоклітинного Ca^{2+} , забезпечує релаксацію гладеньких м'яців та діє як ендотеліальний фактор розширення судин. Отже, NO є регулятором внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca^{2+} та, відповідно, активності ряду Ca^{2+} -залежних ферментів. Тому, ймовірно, що нітробензентіосульфонат калію здатен активувати фібринолітичну активність, інгібуючи агрегацію тромбоцитів, тобто зумовлює антикоагуляційний ефект, що є важливим для запобігання міокардальних ускладнень та інсульту.



а



б

Рис. 9. Черевна частина личинки в'юна (15 доба розвитку): а – у контролі; б – за дії нітробензентіосульфонату калію концентрації $4 \cdot 10^{-3}$ моль/л (збільшення $\times 56$)

Висновки

Отже, в результаті проведених досліджень встановлено, що вплив розчинів досліджених тіосульфонатів у концентрації $4 \cdot 10^{-3}$ моль/л не призводить до затримки поділів бластомерів та формування зародкових шарів. Натомість, за дії нітробензентіосульфонату калію, на стадії перед вилупленням (друга доба розвитку), яка відповідає за початок встановлення еритроцитарного кровообігу, закладку зовнішніх зябер та появу пігментації, спостерігається затримка в розвитку зародків в'юна приблизно на 13–16 годин із подальшою судинною патологією.

Отримані результати свідчать про перспективи похідних тіосульфокислот як нових антитромботичних та антиагрегаційних засобів із високою ефективністю і низькою токсичністю, що є однією з найважливіших задач біоорганічної та медичної хімії.

Робота виконана за підтримки Державного фонду фундаментальних досліджень (Проект № Ф 25.5/075, № держреєстрації 0107U009404, 2007-2010 рр.): “Канальні властивості аналогів антибіотиків та амінокислот на мембранах зародкових об'єктів при електромагнітних впливах”.

Автори вдячні за допомогу у виконанні проекту: Д. І. Санагурському, М. В. Бурій, О. Р. Кулачковському.

References

- Hromova, V.P., Omelianchuk, L., & Brazhko, O. (2005). Doslidzhennia antyoksydantnoi aktyvnosti ti-opokhidnykh khinolinu. *Ukrainskyi biokhimichnyi zhurnal*, 77(3), 87-95..
- Smith, M., Hunter, R., Stellenboom, N., Kusza, D. A., Parker, M. I., Hammouda, A. N. H., Jackson, G., Kaschula, C. H. (2016). The cytotoxicity of garlic-related disulphides and thiosulfonates in WHCO1 oesophageal cancer cells is dependent on S-thiolation and not production of ROS. *Biochimica et Biophysica Acta* 1860, 1439–1449. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.03.032>.
- Mampuy, P., McElroy, C. R., Clark, J. H., Orru, R. V. A., Maes, B. U. W. (2019). Thiosulfonates as Emerging Reactants: Synthesis and Applications. *Adv. Synth. Catal.*, 362, 1–59. <https://doi.org/10.1002/adsc.201900864>.
- Martín-García, A. I., García-Pareja, M. P., Alcaide, E. M. (2011). Effects of garlic compounds on the *in vitro* ruminal fermentation promoted by diets based on alfalfa hay. *Options Méditerranéennes*, 99, 115–119.
- Wu, X., Santos, R. R., Fink-Gremmels, J. (2015). Analyzing the antibacterial effects of food ingredients: Model experiments with allicin and garlic extracts on biofilm formation and viability of *Staphylococcus epidermidis*. *Food science and nutrition*, 3, 158–168. DOI: 10.1002/fsn3.199.
- Loi, V. V., Huyen, N. T. T., Busche, T., Tung, Q. N., Gruhlke, M. C. H., Kalinowski, J., Bernhardt, J., Slusarenko, A. J., Antelmann, H. (2019). *Staphylococcus aureus* responds to allicin by global S-thioallylation-Role of the Brx/BSH/YpdA pathway and the disulfide reductase MerA to overcome allicin stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 139, 55-69. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.018.
- Maino, A., Siegerink, B., Algra, A., Peyvandi, F., Rosendaal, F. R. (2016). Recurrence and Mortality in Young Women With Myocardial Infarction or Ischemic Stroke. *JAMA Internal Medicine*, 176(1), 134–136. doi:10.1001/jamainternmed.2015.6523.
- Babak, O. Ya., Bilovol, O. M., Yakovleva, O. O. (2010). Klinichna farmakologiya: pidruchnyk dlya medychnykh VNZ III-IV rivniv akredytatsiyi. Kyiv: Medytsyna, 776.
- Martin, S. A., Brash, A. R., Murphy, R. C. (2016). Murphy Thematic Review Series: Living History of Lipids: The discovery and early structural studies of arachidonic acid. *J. Lipid Res.*, 57(7), 1126–1132.
- Pettersen, A. A., Arnesen, H., Seljeflot, I. (2015). A brief review on high on-aspirin residual platelet reactivity. *Vascul Pharmacol.*, 67(69), 6–9. doi: 10.1016/j.vph.2015.03.018. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.03.018>.
- Rahman, K. (2007). Effects of garlic on platelet biochemistry and physiology. *Mol. Nutr Food*, 51(11), 1335–1344. DOI: 10.1002/mnfr.200700058.
- Fukao, H., Yoshida, H., Tazawa, Y. (2007). Antithrombotic effects of odorless garlic powder both in vitro and in vivo. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 71(1), 84–90. DOI: 10.1271/bbb.60380.
- Zhang, H. X., Shi, Z. X., Jia, H. Z. (2007). Effects of garlicin on NIH3T3 cell proliferation and collagen synthesis. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.*, 27(5), 431–434.
- Romano, E. L., Montañó, R. F., Brito, B., Apitz, R., Alonso, J., Romano, M., Gebrán, S., Soyano, A. (1997). Effects of Ajoene on lymphocyte and macrophage membrane-dependent functions. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 19(1), 15–36. DOI: 10.3109/08923979709038531.
- Prasad, V. N. V. (2000). Synthesis of Heterocyclic Thiosulfonates. *J. Org. Lett.* 2(8), 1069–1072. <https://doi.org/10.1021/ol0056170>
- Allison, G. L., Lowe, G. M., Rahman, K. (2012). Aged garlic extract inhibits platelet activation by increasing intracellular cAMP and reducing the interaction of GPIIb/IIIa receptor with fibrinogen. *National Library of Medicine*, 91(25-26), 127–580. DOI: 10.1016/j.lfs.2012.09.019.
- Kryzhanovskiy, S. G. (1949). Ekologomorfologicheskiye zakonomernosti razvitiya karpovykh, vyunovykh i somovykh ryb (Cyprinoidei i Suluroidei). *Trudy In-ta morf. zhivotnykh. AN SSSR*, 1, 186–195.
- Drozd, B., Kouril, J., Blaha, M., Hamackova, J. (2009). Effect of temperature on early life history in weatherfish, *Misgurnus fossilis* (L. 1758). *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 392, 4. <http://www.kmae-journal.org> doi: 10.1051/kmae/2009010.
- Bodnarchuk, N., Kulachkovsky, O., Mandzynets, S., Sanagurskiy, D. (2016). Structural changes of loach embryos during embryogenesis under the influence of Fluorenizyd. *Annales umcs*, 34(4), 16–30.
- Tselevych, M. V. (2008). Osoblyvosti ultrastruktury embrioniv vyuna pid vplyvom norfloksozynu. *Tsytol. Zhene.*, 42, 96–100. <https://doi.org/10.1007/s11956-008-2005-1>.
- Kopeika, J. (2021). Effect of Cryopreservation on the Genome of Sperm in Animals and Humans. *Springer Nature Switzerland AG*, 151–173. https://doi.org/10.1007/978-3-030-66292-9_22.
- Neyfakh, A. A. (1977). Molekulyarnaya byolohyya protsessov razvytyya. Mosva: Nauka, 311.
- Sanahurkyy, D. I. (2008). Obyekty biofizyky. Monohrafiya. Lviv: Vydavnychyy tsentr LNU im. Iv. Franka, 522.
- Detlaf, T. A., Detlaf, A. A. (1960). O bezrazmernykh kharakterystykh prodolzhytelnosti razvytyya v émbryolohyy. *Dokl. AN SSSR*, 134(1), 199–202.
- Kostomarov, A. A. (1975). Vyun Misgurnus fossilis. Obekty byolohyy razvytyya. Mosva: Nauka, 308–323.
- Lubenets, V. I. (2003). Tiosulfonaty: syntez i vlastyvoli. *Ukr. khim. zhurn.*, 69(8), 114–121.
- Morgan, G. A., Leech, N. L., Gloeckner, G. W., Barrett, K. C. (2012). *IBM SPSS for Introductory Statistics. In: Use and Interpretation. Fourth Edition. Routledge Taylor & amp. Francis Group.* New-York, 256.

O. S. Yaremkevych, V. I. Lubenets

Lviv Polytechnic National University,
Department of Technology of Biologically Active Substances, Pharmacy and Biotechnology

**THE INFLUENCE OF THIOSULFIC ACID DERIVATIVES
ON THE MORPHOLOGICAL PROPERTIES OF LOACH
EMBRYOS AT THE INITIAL STAGES OF DEVELOPMENT**

By means of morphological studies, it was established that the influence of thiosulfonate solutions of different structure doesn't show an inhibition of blastomere division and germ layer formation of the freshwater bony fish, namely weatherfish (*Misgurnus fossilis*L). However, under the effect of potassium nitrobenzenethiosulfonate (NTK), at the pre-hatching stage (36th development stage), that is responsible for the establishment of erythrocyte circulation, external gills predevelopment and the appearance of pigmentation, we observed a delay for approximately 13–16 hours with the imminent vascular pathology. The pronounced changes of cardio-vascular system, which manifested itself in vasodilation, were spotted later on after the NTK influence. The results showed evidence of thiosulfate acid's derivatives, namely NTK, being promising, highly efficient, non-toxic antithrombotic and antiplatelet remedies.

Key words: thiosulfonates; blastomeres; loach embryos of *Misgurnus fossilis*L.