

ДІЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОЛОГІЧНІ ОБ'ЄКТИ

Оригінальна стаття

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2022-47-02>

УДК 597.551.2-131+57.044(546.71)

ВПЛИВ ФТОРИДУ НАТРІЮ НА РОЗВИТОК ТА ВИЖИВАННЯ
ЗАРОДКІВ В'ЮНАІ. Р. Грицай, С. М. Мандзинець^{id}, М. В. Бура^{id}

Львівський національний університет імені Івана Франка, вул. Грушевського, 4, м. Львів, Україна, 79005

e-mail: mcelevyich@yahoo.com

Надійшла до редакції 16 липня 2021 р. Переглянута 9 лютого 2022 р.

Прийнята до друку 17 лютого 2022 р.

Актуальність. Дослідження впливу фториду на клітинному рівні, як одного з поширених забруднювачів довколишнього середовища, все ще має суттєве значення для біофізики, медицини та екології, оскільки його вплив на ембріональні об'єкти є маловивченим.

Метою роботи було: 1) дослідження впливу фториду натрію (в мінімальній концентрації для пригнічення росту) на морфологічний розвиток зародків в'юна; 2) з'ясування ступеня виживання зародків за присутності в середовищі інкубації фториду натрію та визначення коефіцієнта виживання K_v .

Матеріали і методи. Овуляцію у самок в'юна (*Misgurnus fossilis* L.) стимулювали внутрішньом'язовим введенням самкам хоріогонічного гонадотропіну (500 од.), ікру одержували через 36 год після стимуляції, запліднювали в чашках Петрі суспензією спермій за Нейфахом А. А. Стадії розвитку контролювали візуально під біокулярним мікроскопом МБС-9 з фотографічною приставкою; експериментальні зародки інкубували у розчині Гольтфретера з додаванням фториду натрію до кінцевої мінімальної концентрації 500 мкмоль/л.

Результати. Фторид натрію гальмував розвиток зародків в'юна та призводив до формування дефектів розвитку. Найбільш помітними вадами розвитку, спричиненими фторидом натрію, є зменшення розмірів голови та хвоста личинок, погана пігментація тіла, зміни діаметру очей та рефлексу дотику зародків. У результаті накопичення фториду в клітинах зародків на третю добу розвитку смертність зародків зросла до 88,9%. Загальна кількість личинок, що вижили впродовж 12 діб за дії фториду натрію, становить близько 2%.

Висновки. На досліджуваній моделі зародків в'юна підтверджено пряму тератогенну дію NaF, яку спостерігали інші дослідники на моделі FETAX. Виникнення дефектів розвитку ембріонів холоднокровних, зумовлених NaF, не виключає можливість прояви тератогенних ефектів у теплокровних тварин, зокрема у людини. Уникнення надмірного потрапляння фтору в організм через обмеження споживання їжі або напоїв з високим вмістом фтору, використання фтору в засобах по догляду за зубами та інше, може потребувати окремої деталізованої оцінки.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: фторид натрію; морфологія; виживання; зародки; в'юн; вади розвитку.

У навколишньому середовищі виявлено лише фторвмісні сполуки (у вільному стані фтор (F) у природі не існує), оскільки фтор має здатність утворювати неорганічні та органічні комплексні сполуки — фториди (вміст цих комплексів в Земній корі становить приблизно 0,06–0,09%) [1, 2]. Фтор як хімічний елемент не піддається

Як цитувати: Грицай ІР, Мандзинець СМ, Бура МВ. Вплив фториду натрію на розвиток та виживання зародків в'юна. Біофізичний вісник. 2022;47:13–26. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2022-47-02>

In cites: Grytsaj IR, Mandzynets SM, Bura MV. Influence of the sodium fluoride on the development and survival of the loach embryos. Biophysical Bulletin. 2022;47:13–26. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2022-47-02> (in Ukrainian)

Open Access. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>

метаболічним перетворенням, однак може або накопичуватися, або лише виводитися з організму. Експерименти з радіоактивним фтором показали, що його внутрішньоклітинна концентрація залежить від градієнту рН цитоплазми клітини та завжди на 10–50% нижче, ніж концентрація у плазмі крові [1]. Фтор визнаний широко розповсюдженим природним забруднювачем, який має сильну токсичну дію на м'які тканини, включаючи, мозок, нирки, яєчка та їх придатки. Максимальне накопичення фтору при тривалому надходженні в організм людини виявлено в нирках [3], через які виводиться в середньому до 50% спожитого фтору. Не виведений фтор з організму у людини розподіляється між органами, зокрема, накопичується в кістках [4], дентині зубів, епіфізі та інших тканинах [3]. Токсичні дози фтору для людини варіюють в широких межах: для дорослих становлять 16–64 мг/кг, а для дітей — 3–16 мг/кг [1, 2].

Проте відомо, що низькі концентрації фтору необхідні для нормального росту і розвитку організму людини. Фтор регулює не тільки ріст і розвиток кісткової тканини (остеобласти і остеокласти), але й контролює метаболізм клітин ендотелію, печінки, нирок, міокарда і нервової системи [1, 5–6]. З плазми крові фтор швидко розподіляється шляхом пасивної дифузії у внутрішньоклітинні і позаклітинні рідини та тканини, проте певні організми сформували в процесі еволюції системи захисту — CLC^F -родина антипортерів F^-/H^+ та $Fluc/FEX$ родина F-каналів [7]. Подальші дослідження бактеріального $stcB$ (пізніше перейменованій на $Fluc$) встановили, що ці протеїни є іонними каналами з високою селективністю (> 10000 разів) щодо фтору, ніж для хлору [7]. Експортери фторидів ідентифіковано виключно у представників одноклітинних організмів (*S. cerevisiae* та *N. crassa*), однак гомологи FEH родини F-каналів виявлено і в представників царства Рослин (кукурудза, рис, виноград, апельсини та огірки); а в представників царства Тварин (три види морських організмів, включаючи, морську губку *Amphimedon queenslandica*) ідентифіковано ORF-протеїни подібні до FEH [8].

Токсичність фтору пов'язана з його високою біологічною активністю на молекулярному та клітинному рівні: інтенсифікація перекисного окиснення ліпідів, пошкодження молекул ДНК, індукція апоптозу та зміни клітинного циклу [9–10]. Jeng J. H. та співатори [11], досліджуючи вплив фториду натрію (NaF) на фібробласти слизової оболонки ротової порожнини людини, встановили, що *in vitro* NaF проявляє токсичність шляхом інгібування синтезу протеїнів, дисфункцією мітохондрій [11] та виснаженням запасів внутрішньоклітинного АТФ [12].

Дослідження впливу фторидів на дорослий організм обумовлені фторуванням питної води, знищенням комах, грибків, гризунів у побуті, видаленням фтористого водню з відпрацьованих газів у промисловості — це індукує виникнення проблем фізичного та репродуктивного здоров'я, як у людей, так і у тварин [13–14]. Зокрема, токсичність фтору викликає серйозне занепокоєння у осіб, які споживають водні організми (прісноводних риб та безхребетних) як харчовий об'єкт [15]. Прісноводні представники родини корошових (*Cyprinus carpio* [16] та *Carassius auratus gibelin*) та хижі риби (північна щука (*Esox lucius*) та окунь європейський (*Perca fluviatilis*)) накопичують фтор найбільше у зябрах, менше у печінці, мозку, нирках, кишківнику та м'язовій тканині залежно від тривалості дії чинника та виду [17].

Багаточисельні дослідженнями підтвердили вплив фтору на ріст та розвиток молодих особин риб: виявлено помітне зниження росту у молодих особин осетрових риб родини *Acipenseridae* впродовж 90 днів (10, 25 і 60 мг F⁻/л) [18], зміну довжини та ваги тропічних представників родини корошових *Puntius ticto* [19] й *Cyprinus carpio* [20], а також прісноводних риб *Heteropneustes fossilis* (Bloch) ряду Сомоподібних [21]. Зниження росту, ваги та розмірів молодих особин риб корелює з концентраціями фтору у воді.

Як і у ссавців, так і у прісноводних організмів, фтор діє як потужний інгібітор метаболізму, зокрема, ініціюючи гістопатологічні незворотні зміни у печінці сома *Heteropneustes fossilis* (зміни активності ензимів та зниження вмісту загального білка) [22], у м'язах, зябрах і нирках *Labeo rohita* (зниження загального вмісту білків, глікогену та ліпідів) [17, 23]. Tripathi N. із співробітниками, встановили, що високі концентрації фтору (35 і 70 мг F⁻/л) призводять до вираженого цитоксичного та генотоксичного ефекту у прісноводного сома *Clarias batrachus* [24], а також фтор здатен ініціювати окислювальний стрес у печінці риб *Channa punctatus* [25].

Однак, дослідження впливу фториду чи фторвмісних сполук на ембріони та личинки водних організмів, зокрема риб, та їх розвиток є малочисельними та недостатніми. Fu M. та співавтори [26] продемонстрували, що NaF у низькій та високій дозах (0,2 та 120 мг/л відповідно) епігенетично порушує дозрівання ооцитів мишей та розвиток ембріонів, активуючи апоптоз ембріонів на стадії бластоцисти не залежно від концентрації тератогена. Інтенсивний аналіз літератури показав, що фтор негативно впливає на функції сперми, включаючи морфологію, рухливість, емність та реакцію акросом сперматозоїдів щурів та мишей [27–29], які є ключовим тригером запліднення як *in vitro*, так і *in vivo* [30].

Одним із способів оцінити вплив фториду натрію на ембріональний розвиток є вивчення його впливу на розвиток ембріонів в'юна (*Misgurnus fossilis* L.), які як і FETAX (Frog Embryo Teratogenesis Assay — *Xenopus* (FETAX)), можна використовувати як скринінговий тест для ідентифікації хімічних тератогенів [31, 32]. Неодноразово попередніми дослідженнями підтверджено, що зародки в'юна є адекватною тест-системою для дослідження впливу хімічних [33, 34] та фізичних [35] чинників на живі організми у нашій кліматичній зоні, і, завдяки короткому періоду ембріогенезу, є зручним об'єктом для експериментальних досліджень. Риби реагують на токсичні речовини подібно до вищих хребетних, наприклад, ссавців, тому вони можуть бути використані для виявлення речовин, які викликають токсичний ефект у людини [36], в даному випадку для вивчення ембріотоксичної дії фториду натрію. Враховуючи екологічний стан навколишнього середовища та малочисельні дані щодо впливу фторидів на ембріональний розвиток, **метою роботи** було дослідити вплив фториду натрію на морфологічний розвиток зародків холонокровних у період раннього ембріогенезу в'юна.

МАТЕРІАЛИ Й МЕТОДИ

Дослідження проведені на зародках в'юна (*Misgurnus fossilis* L.) у період від запліднення до стадії 10 поділу (2, 16, 64 бластомерів, 8 (256 бластомери) та 10 поділи бластомерів (1024 бластомери)). Овуляцію стимулювали внутрішньо-м'язовим введенням самкам хоріогонічного гонадотропіну (500 од). Ікру одержували через 36 год після стимуляції та запліднювали в чашках Петрі суспензією спермій за Нейфахом А. А. [33, 37]. Сім'яники отримували після декапітації та розтину черевної порожнини самців. Через 5–10 хв після запліднення зиготи відмивали та інкубували у фізіологічному розчині Гольтфретера [33] при температурі 20–22°C. В експерименті використано 3 самки і 3 самці в'юна (з партії заплідненої ікри відбирали по 100 ікринок в кожную чашку Петрі (для повтору в серії досліду на пару особин ставили 3 чашки (загалом 900 запліднених яйцеклітин)). Під час виконання експериментальних робіт були дотримані міжнародні норми гуманного поводження з лабораторними тваринами та вимоги статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Контрольні зародки та личинки в'юна інкубували у фізіологічному розчині Гольтфретера наступного складу (ммоль/л): CaCl₂ — 1,8, NaCl — 110, KCl — 1,4, Три-

НС1 — 5. Інкубаційне середовище, як у контролі, так і в експерименті, змінювали щоденно. В умовах досліду зародки інкубували у розчині Гольтфретера з додаванням фториду натрію до кінцевої концентрації 500 мкмоль/л (для організації тестування ембріотоксичного впливу NaF використовували методичні рекомендації OECD [38]), оскільки Goh E. H. та Neff A.W. (2003) [39] встановили мінімальну концентрацію NaF для пригнічення росту (MCIG) ембріонів жаб FETAX, яка складає від 0 до 200 ppm (відповідає 500 мкмоль/л).

Спостереження за зародками й личинками, як контрольної, так і експериментальної груп, здійснювали впродовж 12 діб за допомогою біокулярного мікроскопа МБС-9 з фотографічною приставкою в режимі реального часу. Морфологічний розвиток контрольної та експериментальної груп ембріонів оцінювали за таблицями розвитку Белоусова Л. В. [40], а морфологічні деформації вимірювали за допомогою програми *Photoshop (CS 2014v15)*. Рефлекс дотику оцінювали візуально, використовуючи кінчик мікропіпетки.

У дослідженнях використовували реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації х.ч., а також Tris («Sigma», США). Статистичний аналіз даних (вірогідність різниці визначених показників та нормальність розподілу) проводили за допомогою *t-теста* Стьюдента за допомогою програми *SPSS Statistics Base* (<https://www.ibm.com/products/spss-statistics>), а оцінку кривих виживання здійснювали розраховуючи логранговий критерій [41].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

На сьогодні питання про біогенний вплив фтору на клітинному рівні є відкритим та актуальним, оскільки необхідна його фізіологічна кількість знаходиться в діапазоні концентрації, що викликає також й токсичну дію [42].

Ефекти фторидів на фізіологічні функції організму і клітинний метаболізм залежать від типу клітин, концентрації та тривалості дії [1, 43]. Так, наприклад, у кістковій тканині та дентині людини фтор в мікромолярних концентраціях викликає проліферацію та ріст клітин [5, 12], тоді як в мілімолярних — пригнічує проліферацію та індукує апоптоз клітин миші лінії MC3T3-E1 [44]. Молекулярні механізми, що лежать в основі токсичності фтору, відрізняються за своєю природою. Фтор здатен стимулювати мембранні G-білки шляхом активації каналів передачі сигналу низхідного потоку, таких як РКА-, РКС-, PI_3 -кіназа, Ca^{2+} - і MAPK-залежні системи. Поряд з іншими токсичними ефектами встановлено, що фторид викликає окислювальний стрес у ссавців [1, 26], що призводить до надмірного вироблення вільних радикалів, інтенсифікації ПОЛ, зниження співвідношення GSH/GSSH та зміни в функціонуванні антиоксидантних ензимів, а також інгібує гліколіз, викликаючи виснаження клітинного АТФ та порушення метаболізму [29].

Для підтвердження ембріотоксичних властивостей фториду натрію на клітинному рівні та рівні всього організму провели серію досліджень впливу NaF (500 мкмоль/л) на морфологію ембріонів прісноводної риби в'юна *Misgurnus fossilis* L.

У результаті проведеної першої серії досліджень встановлено, що у зародків, які розвивалися в контрольному розчині Гольтфретера для холонокровних перший поділ проходив через 60 ± 2 хв ($M \pm m$, [33, 40]), а кожен наступний — через 30 ± 2 хв.

Після запліднення у нормі спостерігали відділення жовткової оболонки від поверхні ядра і утворення перивітелінового простору, оцінивши стадії розвитку за таблицями Белоусова Л. В. [40]. Паралельно відбувалося формування цитоплазматичного горбика. Після першої години інкубації спостерігали поділ зиготи на 2 бластомери (рис. 1, а), через 1,5 год після запліднення — 4 бластомери.

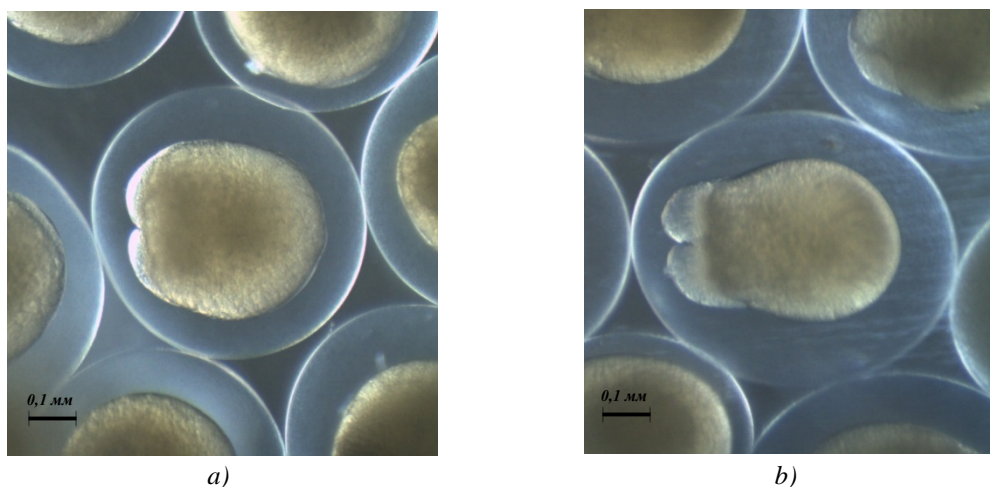


Рис. 1. Розвиток зародків в'юна на стадії першого поділу в контролі (a) та за впливу 500 мкмоль/л NaF (b). Фотографія $\times 7$.

Fig. 1. Development of the loach embryos at the stage of the first division in the control (a) and treated with 500 $\mu\text{mol/L}$ NaF (b). Photograph $\times 7$.

Зародки, які розвивалися в середовищі за присутності фториду не відставали за стадіями розвитку, однак спостерігали набряк бластомерів (до 41% зародків) та деформування клітин (рис. 1, b). Ймовірно, набряк зародкових клітин зумовлений дифузійною аніонів фтору у цитоплазму клітин, оскільки аніони переважно потрапляють у внутрішньоклітинне середовище шляхом дифузії за градієнтом концентрації. Однак водні організми, зокрема, риби та безхребетні [45], можуть зазнати більш негативного впливу забруднення фтором, ніж ті, що живуть у твердих або морських водах, оскільки біодоступність іонів фтору зменшується із збільшенням твердості води.

Згідно з таблицями розвитку Белоусова Л. В. [40] на 3 поділі формуються вісім бластомерів, а на 4 поділі — 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 плазмалею [40]. У зародків, які розвивалися за присутності в середовищі фториду натрію (500 мкмоль/л), упродовж трьох годин після запліднення не виявлено дефектів розвитку порівняно з контрольними зразками, однак незначна частина (16,7%, 151 особини) зародків загинула впродовж першої доби розвитку.

Goh E. H. та Neff A.W. встановили, що найбільша частка морфологічних дефектів проявляється за додавання фториду натрію у середовище інкубації виключно впродовж 9 години після запліднення [39]. Однак зародки стають нечутливими до дії фториду, якщо додавати його в середовище після 15 години розвитку зародків. Також період дії експозиції відіграє важливу роль у виникненні аномалій розвитку та загибелі організму та тяжкості токсичної дії фториду натрію [46]. Тобто зародки в перші години розвитку є найчутливішими до впливу екзогенних чинників щодо появи дефектів, оскільки саме в цей період зародкам необхідні мікроелементи, які вони засвоюють виключно з навколишнього середовища.

На 36 стадії розвитку (48 год) у хвостовій мезодермі зародків розвивається 10 сомітів (рис. 2, a), проходить пігментація очей, однак тіло на цей час ще не

пігментоване. Зародки, всередині оболонок, починають енергійно рухатися. У контролі на початку третьої доби (через 49–51 год після запліднення) (рис. 2, *a*) відбувається вилуплення личинок, які рухливі і активно плавають в середовищі, формується хвостовий відділ і очні ямки, збільшується головний відділ черепа.

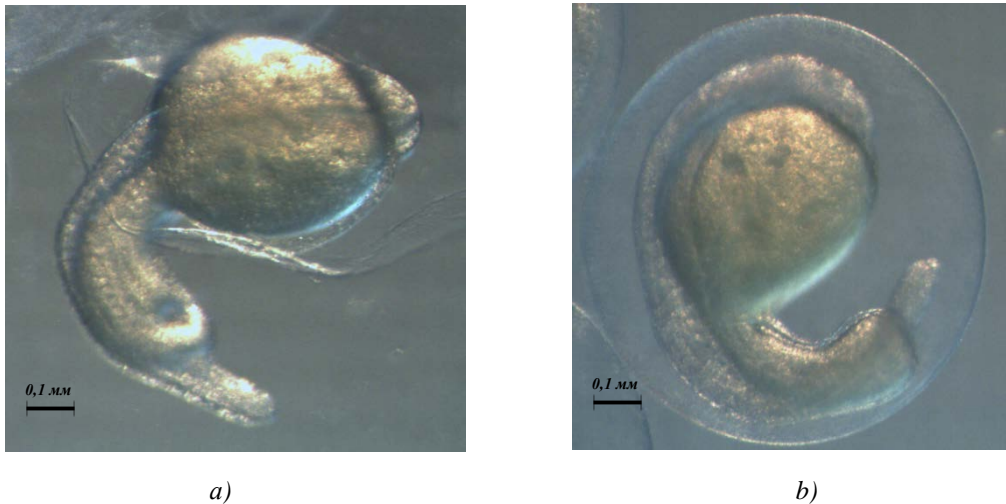


Рис. 2. Розвиток зародків в'юна на 2 добу у контролі (*a* [47]) та за впливу 500 мкмоль/л NaF (*b*). Фотографія $\times 7$.

Fig. 2. Development of the loach embryos on the second day in the control (*a* [47]) and treated with 500 $\mu\text{mol/L}$ NaF (*b*). Photograph $\times 7$.

До 35 % експериментальних зародків (315 особин), які розвивалися в присутності 500 мкмоль/л фториду, не вилупилися з перивітелінової оболонки (рис. 2, *b*), але проявляли значну рухову активність всередині самої оболонки.

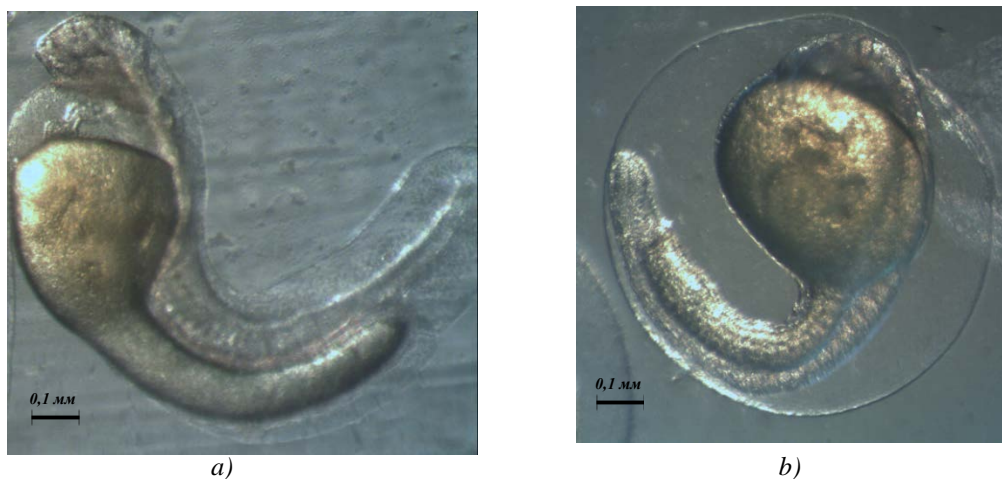


Рис. 3. Розвиток зародків в'юна на третю добу у контролі (*a*) та за впливу 500 мкмоль/л NaF (*b*). Фотографія $\times 7$.

Fig. 3. Development of the loach embryos on the third day in the control (*a*) and treated with 500 $\mu\text{mol/L}$ NaF (*b*). Photograph $\times 7$.

На третю добу розвитку усі контрольні зародки звільнилися від оболонок та активно рухалися (рис. 3, *a, b*). Зародки, які розвивалися за присутності 500 мкмоль/л NaF, не позбулися перивітелінової оболонки.

Виявлено відставання в розвитку (рис. 3, *b*), що підтверджено описаними стадіями розвитку в таблицях Белоусова Л. В. [40]. Саме на третю добу розвитку 90% із зародків, які інкубували з фторидом натрію, гинули. Це пов'язане з тим, на думку багатьох дослідників [46, 49–50], що основна біологічна функція фтору полягає в його участі у процесах росту, розвитку і мінералізації зубної та кісткової тканини в процесах осифікації (побудови) скелета. Як відомо, сполуки фтору в дорослому організмі розподіляються таким чином: кісткова тканина > емаль зубів > дентин > паренхіматозні органи. Тому розвиток аномалій у зародків й пуголовків жаб в дослідженнях [39] та появу аномалій скелета й загибель (власне на третю добу, через неможливість виходу з перивітелінової оболонки) зародків в'юна в наших дослідженнях пов'язані зі здатністю аніонів фтору акумулюватися в кістковій тканині (остеобластах) [49–50], що підтверджується токсичним впливом на хребет прісноводної риби *Channa punctatus* [51].

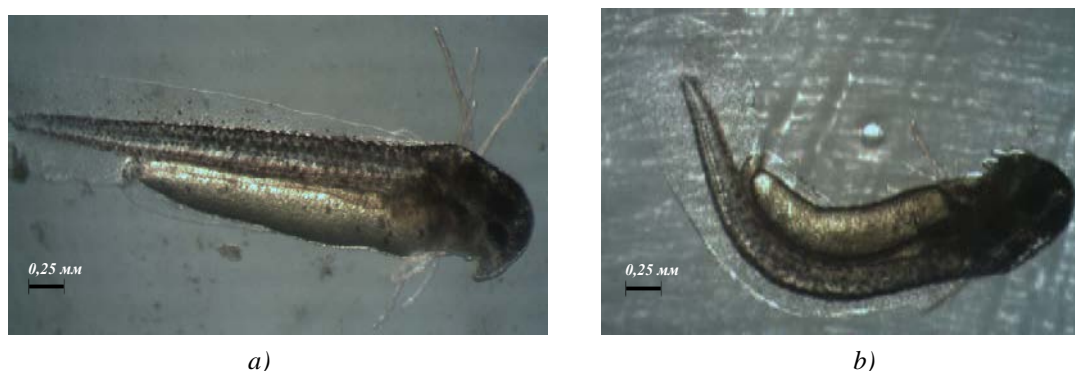


Рис. 4. Розвиток личинок на шосту добу у контролі (*a*) та за впливу 500 мкмоль/л NaF (*b*). Фотографія $\times 4$.

Fig. 4. Development of the loach embryos on the sixth day in the control (*a*) and treated with 500 $\mu\text{mol/L}$ NaF (*b*). Photograph $\times 4$.

Потрапляючи в організм тварин і людини, фтор взаємодіє з іонами металів (залізо, марганець, нікель тощо), утворюючи комплексні сполуки [1, 5]. Іони фтору можуть інгібувати ензими, які під час каталітичного циклу утворюють проміжні продукти (гідроксил або реакційноздатний фосфат), що веде до гальмування більшості проліферативних процесів [52] і відставання у розвитку (підтверджено нашими експериментами). Це призводить до гальмування найважливіших біологічних процесів, включаючи гліколіз, фосфорилування, синтез нуклеотидів та протеїнів, полімеризації біомолекул [1, 52], наслідком чого є поява дефектів розвитку та загибель організму.

На 4 добу розвитку спостерігали нормальний розвиток контрольних зародків [40]. А за впливу фториду натрію виявлено зниження рухової активності, що проявлялося у збільшенні залишків жовтка та набряку головного відділу (рис. 4, *b*).

Личинки на 6 добу розвитку у контролі мали видовжену форму тіла, розвинуті очні бокали та виражену пігментацію тіла (рис. 4, *a*). Личинки, що розвивалися за присутності фториду натрію, не досягали рівня розвитку, характерного для контрольних личинок (рис. 4, *b*) [40].

Личинки в'юна на 8–11 добу розвитку були рухливими та з хорошою координацією тіла, мали чітку серцеву діяльність (рис. 5, *a*).

У личинок на 9 добу експерименту, що розвивалися за присутності фториду натрію, виявили відставання у розвитку (рис. 5, *b*). Найбільш помітними вадами розвитку, спричиненими фторидом натрію, є достовірне зменшення розмірів голови,

хвоста та діаметра очей, погана пігментація тіла, сповільнення серцебиття та затримання рефлексу дотику зародків. Наприклад, при опрацюванні оцифрованих фотографій виміряно розмір голови та хвоста контрольних личинок, які становили $1,35 \pm 0,03$ та $1,48 \pm 0,04$ мм, відповідно. Тоді як внесення в середовище інкубації 500 мкмоль/л фториду натрію призводило до достовірного зниження параметрів тіла досліджуваних личинок: розмір голови — $0,98 \pm 0,03$ мм й хвоста — $0,89 \pm 0,04$ мм, відповідно ($n=15$, *** — $P < 0,001$).

Аналогічні дефекти розвитку ідентифіковані у пуголовків FETAX, що виникають за низької концентрації фториду, і частота їх зростає із збільшенням концентрації фториду натрію у середовищі інкубації [39].

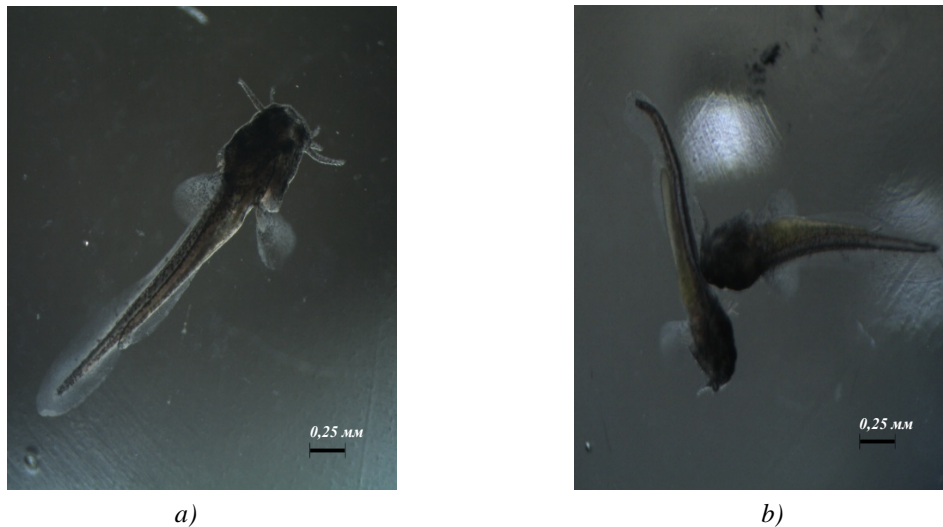


Рис. 5. Розвиток личинок в'юна на одинадцятую добу у контролі (а) за впливу 500 мкмоль/л NaF (b). Фотографія $\times 4$.

Fig. 5. Development of the loach embryos on the eleventh day in the control (a) and treated with 500 $\mu\text{mol/L}$ NaF (b). Photograph $\times 4$.

Пігментація та зменшення діаметра очей пов'язані з дефектами розвитку нервової системи [53], тоді як втрата сенсорного рефлексу може бути спричинена недостатньою рухливістю та змінами в координації личинок. На 11–12 доби розвитку у всіх личинок в'юна (1,1%), які вижили, проявлялися порушення функції нервово-м'язової системи (неспроможність до прямолінійного руху) та аномальні рухи (обертання навколо власного тіла). Відомо також про розвиток вад нервової та м'язової систем у самок щурів лінії Sprague-Dawley під час пізньої вагітності, під час відлучення молодих особин або у дорослих 3-місячних особин [54], появу негативних змін сомато-моторних рефлексів у нащадків щурів лінії Wistar [55] та у дорослих особин самців щурів Long-Evans [56], які отримували фтор у питній воді. Takahashi К. довів, що аніон фториду є не лише однією з причин розвитку вад та порушень функціонування нервово-м'язової системи у дітей із синдромом Дауна [57], а при щоденному вживанні фторидів з питною водою чи їжею є внутрішнім чинником активації процесів старіння у жінок літнього віку.

Прямим доказом впливу фториду натрію безпосередньо на нервову систему є інгібування Na^+ , K^+ -АТФази головного мозку теляти [58], а також плазматичних мембран зародків в'юна (власні дані не представлено) упродовж раннього ембріогенезу. Як відомо ензиматична активність Na^+ , K^+ -АТФази відіграє життєво важливу роль у нормальному розвитку зародків та роботі мозку [59], а інгібування

ензиматичної активності АТФази веде до появи нервово-розвивальних, нервово-психічних та нейродегенеративних розладів, а також до підвищеного ризику розвитку онкологічних, метаболічних, легеневих та серцево-судинних захворювань. Кравцовим О. В. та дослідниками [58] встановлено, що АТФ-гідролізна активність ензиму є більш стійкою щодо інгібування фторидом натрію, ніж його активність K^+ -pNPPase. Інактивація Na^+ , K^+ -АТФази фторидом натрію прямо залежить від впливу фізіологічних лігандів та модифікаторів, а також від цілісності мембранної структури. Таким чином, інактивація Na^+ , K^+ -АТФази веде до виснаження рівня АТФ [58] і порушення мембранного потенціалу клітини, що спричиняє загибель цих клітин.

Спостереження дослідників [39] разом із представленими даними свідчать про те, що NaF є тератогеном і може спричинити дефіцити розвитку нервово-м'язової системи як у холоднокровних, так і у теплокровних тварин. Отже, щоб уникнути надмірного потрапляння фтору до живих організмів через їжу, напої, засоби догляду за зубами, а також з оточуючого середовища, необхідні деталізовані оцінки.

Отримані результати дозволяють припустити, що фтор може спричинити вади розвитку, безпосередньо проникаючи в ембріональні тканини та взаємодіючи з їхніми структурними елементами.

Цей висновок базується на спостереженнях, що: 1) зародки, які розвивалися в середовищі за присутності фториду натрію, мали вади розвитку у порівнянні з контрольними; 2) зародки, оброблені фторидом натрію, були більш деформованими, ніж ті, що отримували хлорид натрію, і 3) наслідки впливу фториду натрію у зародків та личинок в'юна відповідали критеріям, характерним для тератогену, як і у FETAX.

Оскільки FETAX має достовірний відсоток (92%) прогнозу тератогенного впливу хімічних речовин у теплокровних тварин, зокрема, у ссавців [30], як і досліджуваний модельний зародковий об'єкт [33, 34], то існує велика ймовірність прямої тератогенної дії фториду натрію у ссавців, включаючи людей.

Відомо, що плацента у ссавців не є достатнім бар'єром для транспорту фторид іонів і транспорт фтору через плаценту змінюється залежно від стадій розвитку плода. Позитивна кореляція між рівнем фтору в сечі, навколоплідних водах, а також вмістом фтору в стегновій кістці плода і патологічними змінами стегнової кістки визначена Shi J. та співавторами [42].

Вчені стверджують, що фтор легко проникає крізь плаценту і безпосередньо впливає на розвиток ембріонів людини. Однак тератогенний ефект фториду підтверджено виключно при пероральній дозі 40 мг/кг/добу підвищеною частотою появою скелетних та вісцеральних аномалій [60]. Ці спостереження вказують на концентраційну залежність тератогенної дії NaF у ссавців. При тривалому надходженні в організм сполуки фтору здійснюють токсичний вплив на серцево-судинну і центральну нервову систему, а також на роботу печінки, нирок, щитовидної залози.

Значний вплив на приріст популяції тварин мають процеси смертності [61]. Смертність у популяції можна оцінити за інтегральним показником, що виражають як кількість особин, які загинули, відносно загальної кількості особин, народжених/отриманих впродовж певного періоду (наприклад, року чи сезону). Коефіцієнт виживання розраховують як кількість особин, які пережили певний момент часу, відносно загальної кількості особин (K_v , %).

Друга серія експериментів з вивчення впливу фториду натрію на розвиток зародків в'юна включала дослідження на виживання впродовж 12 діб після запліднення (така тривалість дослідження обумовлена потребою штучного годування личинок після 14 доби розвитку, оскільки вичерпуються резерви зародкового мішка на цей період розвитку). Для ілюстрації динаміки смертності використовують криві виживання

(рис. 6), які графічно відображають частку особин групи, що вижили. Якщо ж в популяції спостерігається висока смертність на ранніх стадіях (як і в наших дослідженнях), тоді крива стає сильно увігнутою (рис. 6, крива N). Подібним прикладом також є водні безхребетні (наприклад, беззубка), у яких висока смертність спостерігається на стадії вільноплаваючої личинки.

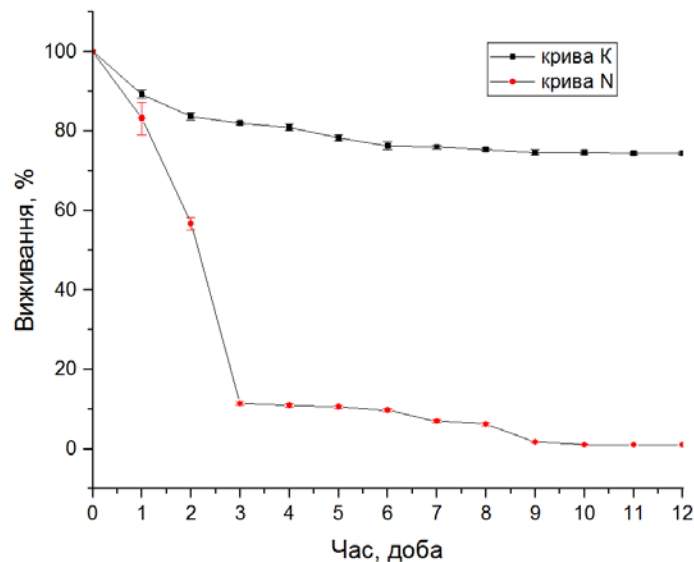


Рис. 6. Криві виживання личинок в'юна впродовж 12 діб розвитку: крива K — виживання личинок в контролі; крива N — виживання личинок за присутності в середовищі інкубації 500 мкмоль/л NaF ($n=3$; $\chi^2 = 189$, $P < 0,001$ — зміни статистично достовірні).

Fig. 6. Curves of survival of the larvae during 12 days of development: curve K — survival of the larvae in the control; curve N — survival of the larvae treated with 500 $\mu\text{mol/L}$ NaF ($n=3$; $\chi^2 = 189$, $P < 0.001$ — changes are statistically significant).

На основі кривих виживаності та застосуванню до них лонгрангового критерію [31] можна стверджувати, що відмінності між кривими K та N є статистично достовірними ($\chi^2 = 189$, $P < 0,001$).

На третю добу розвитку смертність зародків стрімко зросла до 89% ($K_b=11\%$). Після третьої доби розвитку за присутності фториду натрію у середовищі інкубації в середньому за добу гине 36% особин. Починаючи з 6 доби розвитку $K_b=9,8\%$ і зменшувався впродовж досліджуваного періоду. Загальна кількість личинок, що вижили впродовж 12 діб за дії фториду натрію, становить близько 1,1% (10 личинок).

Відомо, що фторид натрію є інгібітором ензимів і взаємодіє з хромосомами, запускаючи генотоксичні ефекти [62]. Найвідомішим механізмом дії фтору на системи ензимів є активація G-білка, який, у свою чергу, ініціює ланцюг подій, що призводять до гальмування роботи іонних каналів, експресії генів та інших метаболічних процесів через систему вторинних месенджерів [44]. Питання щодо участі системи вторинних месенджерів у гальмуванні росту зародків та рухливості личинок, інкубованих з фторидом натрію, потребує подальших досліджень.

ВИСНОВКИ

За результатами проведених досліджень впливу фториду натрію на розвиток та виживання зародків в'юна впродовж періоду раннього розвитку встановлено, що фторид натрію здатен проникати у клітини зародків (враховуючи його біодоступність

[1, 45]), що призводить до порушення функції нервово-м'язової системи й появи дефектів розвитку. Найбільш помітними вадами розвитку, спричиненими фторидом натрію, є достовірне зменшення розмірів голови та хвоста личинок, погана пігментація тіла, зміни діаметру очей та рефлексу дотику зародків. Порушення функції нервово-м'язової системи личинок в'юна власне й проявлялося у зміні координації тіла (неспроможність до прямолінійного руху) та аномальних рухах (обертання навколо осі власного тіла).

Отримані результати підтверджують здатність NaF безпосередньо взаємодіяти з ембріонами, викликаючи появу дефектів розвитку.

Таким чином, на досліджуваній моделі зародків холоднокровних, як і на моделі FETAX [39], продемонстрована пряма тератогенна дія NaF, реалізація якої цілком можлива і в ембріонах людини.

КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ

Автори повідомляють, що фінансових або інших конфліктів інтересів, які могли вплинути на результати, інтерпретацію та висновки дослідження, не існує.

Authors' ORCID ID

S. M. Mandzynets  <https://orcid.org/0000-0003-3053-628X>

M. V. Bura  <https://orcid.org/0000-0001-7259-204X>

REFERENCES

1. Barbier O, Arreola-Mendoza L, Del Razo LM. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chem Biol Interact.* 2010;188(2): 319–33. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.07.011>
2. Sharma D, Singh A, Verma K, Paliwal S, Sharma S, Dwivedi J. Fluoride: A review of pre-clinical and clinical studies. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2017;56:297–313. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.10.008>
3. Whitford GM. Intake and metabolism of fluoride. *Adv Dent Res.* 1994;8(1):5–14. <https://doi.org/10.1177/08959374940080011001>
4. Palczewska-Komsa M, Kalisińska E, Stogiera A, Szmidi M. Fluorides in the human bones – selected issues. *Pomeranian J Life Sci.* 2016;62(1):53–9. (in Polish)
5. Chouhan S, Lomash V, Flora SJS. Fluoride-induced changes in haem biosynthesis pathway, neurological variables and tissue histopathology of rats. *J Appl Toxicol.* 2010;30(1):63–73. <https://doi.org/10.1002/jat.1474>
6. Cicek E, Aydin G, Akdogan M, Okutan H. Effects of chronic ingestion of sodium fluoride on myocardium in a second generation of rats. *Hum Exp Toxicol.* 2005;24(2):79–87. <https://doi.org/10.1191%2F0960327105ht505oa>
7. McIlwain BC, Ruprecht MT, Stockbridge RB. Membrane Exporters of Fluoride Ion. *Annu Rev Biochem.* 2021;90:559–79. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-071520-112507>
8. Berbasova T, Nallur S, Sells T, Smith KD, Gordon PB, Tausta SL, et al. Fluoride export (FEX) proteins from fungi, plants and animals are 'single barreled' channels containing one functional and one vestigial ion pore. *PLoS ONE.* 2017;12(5):e0177096. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177096>
9. Wang AG, Xia T, Chu QL, Zhang M, Liu F, Chen XM, et al. Effects of fluoride on lipid peroxidation, DNA damage and apoptosis in human embryo hepatocytes. *Biomed Environ Sci.* 2004;17(2):217–22.
10. Ha J, Chu Q, Wang A, Xia T, Yang K. Effects on DNA damage and apoptosis and p53 protein expression induced by fluoride in human embryo hepatocytes. *Wei Sheng Yan Jiu.* 2004;33(4):400–2. (in Chinese)
11. Jeng JH, Hsieh CC, Lan WH, Chang MC, Lin SK, Hahn LJ, et al. Cytotoxicity of sodium fluoride on human oral mucosal fibroblasts and its mechanisms. *Cell Biol Toxicol.* 1998;14:383–9. <https://doi.org/10.1023/a:1007591426267>
12. Agalakova NI, Gusev GP. Molecular Mechanisms of Cytotoxicity and Apoptosis Induced by Inorganic Fluoride. *International Scholarly Research Notices.* 2012:403835. <https://doi.org/10.5402/2012/403835>
13. Toft G, Rignell-Hydbom A, Tyrkiel E, Shvets M, Giwercman A, Lindh CH, et al. Semen quality and exposure to persistent organochlorine pollutants. *Epidemiology.* 2006;17(4):450–8. <https://doi.org/10.1097/01.ede.0000221769.41028.d2>
14. Hansen C, Luben TJ, Sacks JD, Olshan A, Jeffay S, Strader L, et al. The effect of ambient air pollution on sperm quality. *Environ Health Perspect.* 2010;118(2):203–9. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901022>

15. Ghosh S, Ghosh D. Impact of fluoride toxicity on fresh water fishes: A mini review. *Int J Adv Innov Res.* 2019;6(2(II)):13–8. Available from: <https://iaraedu.com/pdf/ijair-volume-6-issue-2-ii-april-june-2019.pdf>
16. Cao J, Chen J, Wang J, Wu X, Li Y, Xie L. Tissue distributions of fluoride and its toxicity in the gills of a freshwater teleost, *Cyprinus carpio*. *Aquat Toxicol.* 2012;130–131:68–76. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.11.022>
17. Bhatnagar C, Bhatnagar M, Regar BC. Fluoride-induced histopathological changes in gill, kidney, and intestine of fresh water teleost, *Labeo rohita*. *Fluoride.* 2007;40(1):55–61.
18. Shi X, Zhuang P, Zhang L, Feng G, Chen L, Liu J, et al. Growth inhibition of Siberian Sturgeon (*Acipenser Baerii*) from dietary and waterborne fluoride. *Fluoride.* 2009;42(2):137–41. Available from: https://www.fluorideresearch.org/422/files/FJ2009_v42_n2_p137-141.pdf
19. Vishal R, Gaur R. Impact of high sodium fluoride concentration on length-weight relationship and condition factor in *Puntius ticto* of lake Nainital, India. *Journal of Global Biosciences.* 2015;4(1):1180–5. Available from: <https://www.mutagens.co.in/jgb/vol.04/1/09.pdf>
20. Chen S, Boling L, Lin S, Huang Y, et al. Change of urinary fluoride and bone metabolism indicators in the endemic fluorosis areas of southern china after supplying low fluoride public water. *BMC Public Health.* 2013;13:156. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2458/13/156>
21. Bajpai S, Tripathi M. Retardation of growth after fluoride exposure in catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). In: *Bioresources Rural Livelihood. Vol-I Genetics, Biochemistry and Toxicology.* 2010. Bio-Green Books. P. 67–173.
22. Yadav SS, Kumar R, Tripathi M. Effects of fluoride exposure on some enzymatic and histopathological changes in the liver of *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Int J Fauna Biol Stud.* 2014;1(5):80–4. Available from: <https://www.faunajournal.com/archives/2014/vol1issue5/PartB/16.1-632.pdf>
23. Kale MD, Muley DV. Biochemical Alteration In Fresh Water Fish *Labeo Rohita* Exposed To The Sodium Fluoride (NAF). *IOSR J Environ Sci Toxicol Food Technol.* 2015;9:48–52. <https://doi.org/10.9790/2402-09134852>
24. Tripathi N, Bajpai S, Tripathi M. Genotoxic alterations induced by Fluoride in Asian catfish, *Clarias batrachus* (Linn.). *Fluoride.* 2009;42(4):292–6. Available from: https://fluorideresearch.org/424/424/files/FJ2009_v42_n4_p292-296.pdf
25. Ghosh S, Pal S, Ghosh D, Saha K, Syamal AK. Hepatotoxic effects of Sodium Fluoride on *Channapunctatus*. *Int J Sci Res Rev.* 2018;7(3):1458–69. Available from: https://www.ijr.org/down_1316.php
26. Fu M, Wu X, He J, Zhang Y, Hua S. Natrium Fluoride Influences Methylation Modifications and Induces Apoptosis in Mouse Early Embryos. *Environ Sci Technol.* 2014;48(17):10398–405. <https://doi.org/10.1021/es503026e>
27. Izquierdo-Vega JA, Sanchez-Gutierrez M, Del Razo LM. Decreased *in vitro* fertility in male rats exposed to fluoride-induced oxidative stress damage and mitochondrial transmembrane potential loss. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008;230(3):352–7. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.03.008>
28. Spittle B. Halting the inertia of indifference: fluoride and fertility revisited. *Fluoride.* 2009;42(3):159–61. Available from: https://www.fluorideresearch.org/423/files/FJ2009_v42_n3_p159-161.pdf
29. Sun Z, Niu R, Su K, Wang B, Wang J, Zhang J, et al. Effects of sodium fluoride on hyperactivation and Ca²⁺ signaling pathway in sperm from mice: an *in vivo* study. *Arch Toxicol.* 2010;84:353–61 <https://doi.org/10.1007/s00204-009-0508-x>
30. Kwon WS, Rahman MS, Pang MG. Diagnosis and prognosis of male infertility in mammal: the focusing of tyrosine phosphorylation and phosphotyrosine proteins. *J Proteome Res.* 2014;13(11):4505–17. <https://doi.org/10.1021/pr500524p>
31. Bantle JA, Finch RA, Fort DJ, Stover EL, Hull M, Kumsher-King M, et al. Phase III interlaboratory study of FETAX part 3. FETAX validation using 12 compounds with and without an exogenous metabolic activation system. *J. Appl. Toxicol.* 1999;19(6):447–72. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1099-1263\(199911/12\)19:6%3C447::aid-jat601%3E3.0.co;2-4](https://doi.org/10.1002/(sici)1099-1263(199911/12)19:6%3C447::aid-jat601%3E3.0.co;2-4)
32. Fort DJ, Stover EL, Farmer DR, Lemen JK. Assessing the predictive validity of frog embryo teratogenesis assay – *Xenopus* (FETAX). *Teratog Carcinog Mutagen.* 2000;20(2):87–98. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6866\(2000\)20:2%3C87::AID-TCM4%3E3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6866(2000)20:2%3C87::AID-TCM4%3E3.0.CO;2-6)
33. Goyda OA. Biofizicheskiye aspekty rannego ontogeneza zhivotnykh. [Biophysical aspects of animal early ontogenesis] Kiev: Naukova dumka; 1993. 224 p. (In Russian).
34. Boiko N, Celevycz M, Sanagurski D. The heavy metal ion influence on the Na⁺, K⁺-ATPase activity and the dynamic of transmembrane potential of loach embryos. *Visnyk of Lviv University. Biological series.* 2002;29:25–31. (In Ukrainian).
35. Semochko O, Bura M, Mandzynets S, Ferensovich Y, Bilyj O, Sanagurski D. Morphological changes loach embryos and larvae *Misgurnus fossilis* L. for action with led blue type light. *Biophysical bulletin.*

- 2010;24:103–10. (In Ukrainian). Available from: <https://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk/article/view/3998/3557>
36. Verholyas MR, Honcharuk VV. Vykorystannya tsytolohichnykh biomarkeriv na rybakh dlya otsinky antropohennoho zahryaznennya mors'kykh ta prisnykh vod [переклад англійською]. In: Kunakha VA, et al, editors. Faktory eksperymental'noyi evolyutsiyi orhanizmiv: zb. nauk. prats' [переклад англійською]. 2008;4:48–50 (In Ukrainian).
 37. Neifakh AA, Timofeeva MYa. Problemy regulyatsii v molekulyarnoy biologii razvitiya. [Molecular Biology of Development: Problems of regulation]. M.: Nauka; 1978. 336 p. (In Russian).
 38. OECD. Test No. 212: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. Paris: OECD Publishing, 1998. 20 p. <https://doi.org/10.1787/9789264070141-en>
 39. Goh EH, Neff AW. Effects of fluoride on *Xenopus* embryo development. Food Chem Toxicol. 2003;41(11):1501–8. [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(03\)00166-2](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(03)00166-2)
 40. Belousov LV, Dabyagan NV, Chunaeva MZ. Posobiye k bol'shomu praktikumu po embriologii [The manual for a large workshop on the embryology]. M.: MSU Publishing House, 1990; P.1. 104 p. (In Russian).
 41. Glants S. Mediko-biologicheskaya statistika [Medical and biological statistics]. M.: Praktika, 1998. 459 p. (In Russian).
 42. Shi J, Dai G, Zhang Z. Relationship between bone fluoride content, pathological change in bone of aborted fetuses and maternal fluoride level. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi. 1995;29(2):103–5. (in Chinese)
 43. Zhukova AG, Ulanova EV, Shcherbakova DA, Yadykina TK. Dynamics of compensatory mechanisms at early stages of fluorine intoxications. Technologies of living systems. 2011;8(1):10–7. (in Russian)
 44. Yang S, Wang Z, Farquharson C, Alkadir R, Zahra M, Ren G, et al. Sodium fluoride induces apoptosis and alters bcl-2 family protein expression in MC3T3-E1 osteoblastic cells. Biochem Biophys Res Commun. 2011;410(4):910–5. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.06.094>
 45. Camargo JA. Fluoride toxicity to aquatic organisms: a review. Chemosphere. 2003;50(3):251–64. [https://doi.org/10.1016/s0045-6535\(02\)00498-8](https://doi.org/10.1016/s0045-6535(02)00498-8)
 46. DenBesten P, Li W. Chronic Fluoride Toxicity: Dental Fluorosis. Monogr Oral Sci. 2011;22:81–96. <https://doi.org/10.1159/000327028>
 47. Bagday A, Zdvizhkov Y, Mandzynets S, Bura M. Morphological aspects of influence of newly synthesized polymers on the development of loach embryos and larvae during early embryogenesis. Visnyk of Lviv University. Biological series. 2014;68:69–78. (In Ukrainian). Available from: <http://publications.lnu.edu.ua/bulletins/index.php/biology/article/view/4503/4541>
 48. Chowdhury C, Khijmatgar S, Kumari DP, Chowdhury A, Grootveld M, Hegde C, et al. Fluoride in fish flesh, fish bone and regular diet in south-coastal area of Karnataka state of India. Indian J Dent Res. 2018;29(4):414–7. https://doi.org/10.4103/ijdr.IJDR_653_16
 49. Pak CY, Zerwekh JE, Antich P. Anabolic effects of fluoride on bone. Trends Endocrinol Metab. 1995;6(7):229–34. [https://doi.org/10.1016/1043-2760\(95\)00111-t](https://doi.org/10.1016/1043-2760(95)00111-t)
 50. Lau KHW, Baylink DJ. Molecular Mechanism of Action of Fluoride on Bone Cells. J Bone Miner Res. 1998;13(11):1660–7. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1998.13.11.1660>
 51. Tripathi A, Tripathi N, Kumar A, Tripathi M. Effect of fluoride on vertebral column of a freshwater fish *Channa punctatus*. J Appl Biosci, 2006;32(2):164–7.
 52. Strunecka A, Patocka J, Blaylock RL, Chinoy NJ. Fluoride interactions: From molecules to disease. Current Signal Transduction Therapy. 2007;2(3):190–213. <https://doi.org/10.2174/157436207781745300>
 53. Dumont JN, Schultz TW, Buchanan MV, Kao GL. Frog embryo teratogenesis assay: *Xenopus* (FETAX)-A short-term assay applicable to complex environmental mixtures. In: Waters MD, Sandhu SS, Lewtas J, Claxton L, Chernoff N, Nesnow S. (eds) Short-Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures III. Environmental Science Research, vol 27:393-405. Springer, Boston, MA. 1983. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-3611-2_27
 54. Mullenix PJ, Denbesten PK, Schunior A, Kernan WJ. Neurotoxicity of sodium fluoride in rats. Neurotoxicol Teratol. 1995;17(2):169-77. [https://doi.org/10.1016/0892-0362\(94\)00070-t](https://doi.org/10.1016/0892-0362(94)00070-t)
 55. Bartos M, Gumilar F, Bras C, Gallegos CE, Giannuzzi L, Cancela LM, et al. Neurobehavioural effects of exposure to fluoride in the earliest stages of rat development. Physiol Behav. 2015;147:205-12. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.04.044>
 56. Varner JA, Jensen KF, Horvath W, Isaacson RL. Chronic administration of aluminum-fluoride or sodium-fluoride to rats in drinking water: alteration in neuronal and cerebrovascular integrity. Brain Res. 1998;784(1–2):284–98. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(97\)01336-x](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(97)01336-x)
 57. Takahashi K. Fluoride-linked Down syndrome births and their estimated occurrence due to water fluoridation. Fluoride 1998;31(2):61–73. Available from: <https://fluoridealert.org/wp-content/uploads/takahashi-1998.pdf>

58. Kravtsova VV, Kravtsov OV. Inactivation of Na⁺,K⁺-ATPase from cattle brain by sodium fluoride. Ukr Biokhem J. 2004;76(1):39–47. (In Ukrainian). Available from: <http://ubj.biochemistry.org.ua/index.php/en/journal-archive/2004/n-1-january-february-79760/592-inactivation-of-n-ase-from-cattle-brain-by-sodium-fluoride-kravtsova-vv-kravtsov-av>
59. Waugh DT. Fluoride exposure induces inhibition of sodium-and potassium-activated adenosine triphosphatase (Na⁺, K⁺-ATPase) enzyme activity: Molecular mechanisms and implications for public health. Int J Environ Res Public Health. 2019;16(8):1427. <https://doi.org/10.3390/ijerph16081427>
60. Guna Sherlin DM, Verma RJ. Vitamin D ameliorates fluoride-induced embryotoxicity in pregnant rats. Neurotoxicol Teratol. 2001;23(2):197–201. [https://doi.org/10.1016/s0892-0362\(00\)00123-9](https://doi.org/10.1016/s0892-0362(00)00123-9)
61. Blakely TA, Woodward AJ. Ecological effects in multi-level studies. J Epidemiol Community Health. 2000;54(5):367–374. <https://doi.org/10.1136/jech.54.5.367>
62. Zeiger E, Shelby MD, Witt KL. Genetic toxicity of fluoride. Environ Mol Mutagen. 1993;21(4):309–18. <https://doi.org/10.1002/em.2850210402>

INFLUENCE OF THE SODIUM FLUORIDE ON THE DEVELOPMENT AND SURVIVAL OF THE LOACH EMBRYOS

I. R. Grytsaj, S. M. Mandzynets^{id}, M. V. Bura^{id}

Ivan Franko National University of Lviv, 4 Hrushevskoho st., Lviv, Ukraine, 79005

Submitted July 16, 2021; Revised February 9, 2022;

Accepted February 17, 2022

Background: The study of fluoride effects at the cellular level is still essential for biophysics, medicine, and ecology as one of the most common environmental pollutants. Its impact on embryonic objects is poorly understood.

Objectives: The aim of the work was: 1) to study the effect of sodium fluoride (in the minimum concentration to inhibit growth) on the morphological development of loach embryos; 2) evaluation of the degree of survival of embryos in the presence of sodium fluoride in the incubation medium and determination of the coefficient K_s .

Materials and methods: Ovulation in loach females (*Misgurnus fossilis* L.) was stimulated by intramuscular injection of female chorionic gonadotropin (500 units), eggs were obtained by 36 h after stimulation, fertilized in Petri dishes with a suspension of sperm according to Neifach A. A. The stages of development were observed visually used a binocular microscope MBS-9 with a photo camera. The experimental embryos were incubated in Goltfreter's solution with the addition of sodium fluoride to a final minimum concentration to inhibit growth of 500 $\mu\text{mol/l}$.

Results: Sodium fluoride inhibits the development of loach embryos and leads to developmental defects. The noticeable developmental defects caused by sodium fluoride were a reduction in the size of the larvae's head and tail, low body pigmentation, changes in the eye diameter, and embryonic touch reflex. As a result of the accumulation of fluoride in embryonic cells, on the third day of development, embryonic mortality increased to 88,9%. On 12 days under the action of sodium fluoride, the total number of larvae was about 2%.

Conclusions: The ability of NaF to act as a direct teratogen was tested on the cold-blooded embryo model, the same effect was found by other investigators on the FETAX model. The possibility that sodium fluoride may cause toxic and/or neuromuscular developmental defects in human embryos also should be considered. Avoiding excessive getting of fluoride in the body by limiting the consumption of foods or beverages high in fluoride, the use of fluoride in dental care products, etc. requires detailed assessment.

KEYWORDS: sodium fluoride; morphology; survival; embryos; loach; developmental defects.