

УДК 576.35 + 577.25.5

БІОФІЗИКА КЛІТИНИ

ВПЛИВ КАТІОНІВ НІКЕЛЮ ТА МАРГАНЦЮ НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ БЛАСТОМЕРІВ ЗАРОДКІВ В'ЮНА

Н.М. Бойко, О.Р. Кулачковський, В.І. Ковалишин*, М.В. Целевич,
Д.І. Санагурський

Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Грушевського 4, 79005, Львів, Україна
e-mail: biolog@franko.lviv.ua

* Львівський державний медичний університет імені Данила Галицького
вул. Пекарська 69, 79010, Львів, Україна
Надійшла до редакції 10 червня 2002 р.

Досліджено ультраструктуру клітин зародків в'юна *Misgurnus fossilis L.* на стадії 2-х бластомерів в нормі та після інкубації в присутності катіонів нікелю та марганцю. Показано, що вплив цих важких металів приводить до значних ультраструктурних змін органел та включень клітин зародків, таких як розрідження цитоплазми, дезорганізація мітохондріальних мембран та крист та руйнування мітохондрій, зменшення кількості рибосом та полісом, збільшення кількості лізосом і розпушення та пошкодження цитоплазматичної мембрани. Такі зміни підтверджують токсичний вплив іонів нікелю та марганцю на клітини зародків.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ультраструктура, дроблення бластомерів, зародки в'юна, іони важких металів

Певні мікроелементи є необхідними для нормального перебігу метаболічних реакцій та фізіологічних функцій. До таких біогенних мікроелементів належать нікель, який здатний стабілізувати структуру ДНК і РНК [1], підтримувати цілісність рибосом при термічній денатурації [2], входить в активний центр металоферментів [3], і марганець, котрий відіграє важливу роль в розвитку скелета, в кровотворенні, активації ферментативних систем [4, 5]. В той же час ці елементи відносять до промислових отрут з чітко вираженими токсичними властивостями, які при певних біогеохімічних умовах і концентраціях починають виявляти негативний вплив на живі організми. При цьому велику чутливість до дії цих факторів проявляють зародки тварин в період раннього ембріонального розвитку. Тому є важливим дослідити характер впливу іонів цих металів на ультраструктурному рівні.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Об'єктом досліджень були зародки в'юна (*Misgurnus fossilis L.*) у період від запліднення до стадії 2 бластомерів. Яйцеклітини одержували і запліднювали за Нейфахом [6]. Овуляцію стимулювали внутрішньом'язовим введенням самкам хоріогонічного гонадотропіну (500 од.). Ікру одержували через 36 год після стимуляції. Сім'яники отримували після декапітації та розтину черевної порожнини самців. Ікру запліднювали в чашках Петрі суспензією сперміїв. Через 5-10 хв після запліднення зиготи відмивали та інкубували при температурі 20-22° С протягом 1-1,5 год. у розчині Гольтфретера в присутності іонів Ni^{2+} і Mn^{2+} в концентрації $10^{-4}M$. Контрольні зародки інкубували в фізіологічному розчині.

Зародки в'юна на стадії 2 бластомерів фіксували в 1,5 % розчині глютарового альдегіда в 0,2 M какодилатному буфері (рН 7,2) при $t^{\circ} = 4^{\circ}C$, на протязі 1 год. Промивали зразки в какодилатному буфері і додатково фіксували в 2 %-му розчині чотирьохокису осмію в тому ж буфері на протязі 1 год ($t^{\circ} = 4^{\circ}C$). Потім відмивали від фіксаторів і обезводнювали в зростаючих концентраціях етилового спирту (50%, 70%, 90% і абсолютному – 100%). Додатково обезводнювали в 2-х змінах окису пропілену і поміщали в апоксидну смолу епон-812 [7]. Зрізи готували на ультрамікротомі УМТП-6 алмазним ножом, контрастували 2%-ним розчином уранілацетату протягом 15 хв і додатково цитратом свинцю по Рейнольдсу [8]. Зрізи переглядали і фотографували на електронному трансмісійному мікроскопі ПЕМ-100.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Ультраструктура бластомерів зародків в'юна в нормі

В результаті електронно-мікроскопічного дослідження ультратонких зрізів зародків в'юна на стадії 2 бластомерів в нормальних умовах встановлено, що їх цитоплазма складається в основному з середньої електронної щільності дрібнозернистої гіалоплазми, цитоплазматичних органел та включень.

В цитоплазмі розрізняємо канали гранулярного та гранулярного ендоплазматичного ретикулуму, скупчення полісом та окремі рибосоми.

Серед скупчень рибосом і полісом знаходяться округлої, рідше – овальної форми мітохондрії, які мають добре розвинуті зовнішні і внутрішні мітохондріальні мембрани. Внутрішня мітохондріальна мембрана утворює розгалужену систему крист, між якими знаходиться речовина середньої електронної

щільності, так званий внутрішньомітохондріальний матрикс. Поруч з мітохондріями також знаходяться значних розмірів, обмежені мембранами травні вакуолі. Інколи зустрічаються поодинокі мітохондрії, що однією з бокових поверхонь зливається з травною вакуолею (рис. 1, а). Між травними вакуолями серед полів рибосом та полісом виявляються поодинокі лізосоми, автофаголізосоми та дрібні ліпопротеїдні краплі.

Нами також зареєстровано, що в глибоких шарах цитоплазми бластомерів частіше зустрічаються кулеподібної форми, різної електронної щільності та неоднакового діаметру гранули жовтка (рис. 1, б). Жовткові гранули оточені по периферії мембраною, яка в багатьох місцях продовжується у трубкоподібних виростах гранулярного ЕПР. Невеликого діаметру гранули жовтка часто прилягають до травних вакуоль і зливаються з ними (рис. 1, в). По мірі наближення до кортикального шару бластомерів частота виявлення гранул зменшується, зменшуються також розміри травних вакуоль, а цитоплазма заповнюється розширеними каналами гранулярного ЕПР, цистернами комплексу Гольджі (рис. 1, г).

Поверхня бластомерів покрита суцільною чітко контрастованою плазматичною мембраною, яка має хвилясту форму з невеликою амплітудою.

Ультраструктура бластомерів зародків в'юна при впливі іонів нікелю

Ультраструктурна організація бластомерів, що були інкубовані протягом 1 год. в присутності катіонів нікелю в концентрації 10^{-4} М, характеризувалась низькою електронною щільністю цитоплазми та дезорганізацією органел.

Відмічено, що гранули жовтка були великих розмірів та мали велику електронну щільність гомогенного вмісту. Поверхнева мембрана, що оточує гранули, була розпушеною і мала поодинокі вирости, які продовжувались в мікротрубочках ЕПР (рис. 2, а).

Цитоплазма, що прилягала до жовткових гранул, була насичена лізосомами, малою кількістю рибосом та полісом.

Мітохондрії зустрічалися великих розмірів та перебували у стані набряку, як і вся цитоплазма. Зовнішні та внутрішні мітохондріальні мембрани а також кристи були розпушеними та в окремих місцях утворювали преципітати та коагуляти (рис. 2, а, б). Зареєстровано також мітохондрії, що зливались із травними вакуолями, які не мали обмежувачих мембран (рис. 2, в). Окремі ділянки крист мітохондрій та оточуючого їх мітохондріального середовища зберігали цілісність, однак і тут спостерігались локальні ушкодження у вигляді розривів.

Травні вакуолі, що не мали обмежувачих мембран, а їх вміст зливався із вмістом гіалоплазми, знаходились переважно в ділянках гіпертрофованого комплексу Гольджі (рис. 2, в). Відмічено також, що значна кількість мітохондріальних мембран, а також обмежувачих мембран травних вакуоль утворювали суцільні ліпопротеїдні поля.

Кортикальна цитоплазма бластомерів в умовах впливу іонів нікелю на близькій віддалі від плазматичних мембран була електронно щільною, а сама плазматична мембрана, хоча і контурована, однак в ділянках інвагінацій була перервною, в ряді місць розпушеною (рис. 2, г). Контур плазматичної мембрани зберігав хвилясту форму, хоча амплітуда була дуже малою.

Ультраструктура бластомерів зародків в'юна при впливі іонів марганцю

1-годинне інкубування зародків в'юна на стадії 2-х бластомерів в середовищі з додаванням іонів марганцю приводило до ультраструктурних змін органел та включень.

Зареєстровано, що серед полів частково дезорганізованих рибосом виявляються невеликих розмірів травні вакуолі, мультивезикулярні тільця, первинні лізосоми великих розмірів, розширені канали агранулярного ЕПР.

Жовткові гранули мають дещо понижено електронну щільність та знаходяться в більш глибоких шарах цитоплазми. Поверхневі частини окремих гранул жовтка оточені мембраною, яка утворює пористі структури у вигляді сот, деякі з яких мають куполоподібні випинання в цитоплазму і продовжуються в каналах ЕПР. Окремі ділянки ретикулуму містять рибосоми.

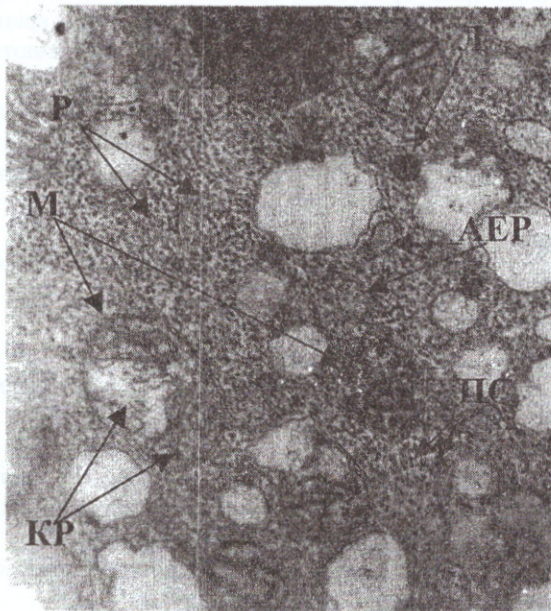
Прилегла до таких жовткових гранул цитоплазма містить значну кількість розпливчастої форми рибосом і полісом, мітохондрій, що мають дезорганізований матрикс та частково розпушені кристи (рис. 3, а).

Виявлені також жовткові гранули великих розмірів, в яких між електронно щільним вмістом та обмежуючою їх оболонкою, яка в свою чергу складається з зовнішньої та внутрішньої мембран, знаходяться обширні поля гранулярного матеріалу.

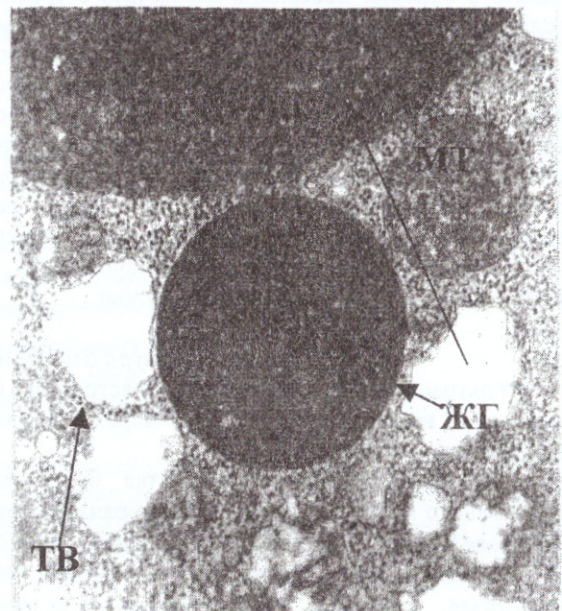
Як правило, цитоплазма, що прилягає до описаних гранул, насичена великою кількістю розширених каналів гранулярного ЕПР, набряклими мітохондріями, мультивезикулярними тільцями, первинними лізосомами, поодинокими травними вакуолями, що обмежені оболонкою (рис. 3, б).

Часто зустрічаються скупчення великої кількості гроноподібних полісом, які по периферії обмежені оболонкою, що складається з однієї або двох нечітко контурованих мембран.

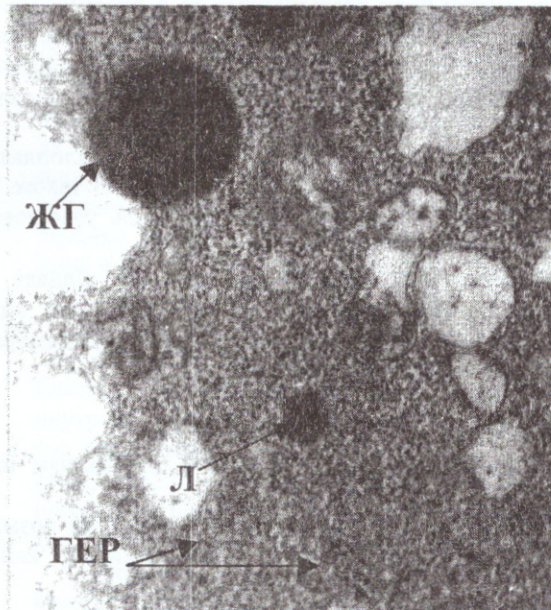
Ділянки цитоплазми, що містять великі скупчення полісом і первинних лізосом, також містять велику кількість мітохондрій. Останні, як правило, знаходяться на різних етапах дезорганізації крист та сформованих преципітатів, коагулятів, гомогенних ліпопротеїдних комплексів (рис. 3, в).



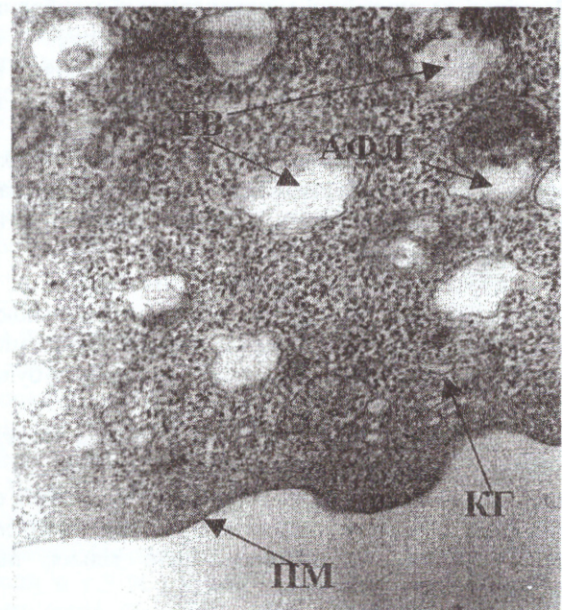
а



б



в



г

Рис. 1. Ультраструктура цитоплазми зародка в'юна на стадії 2-х еластомерів в нормі (зб. $\times 10\ 000$): АЕР – гранулярний ендоплазматичний ретикулум; АФЛ – автофаголізосоми; ГЕР – гранулярний ЕПР; ЖГ – жовткові гранули; КГ – комплекс Гольджі; КР – кристи мітохондрій; Л – лізосоми; М – мітохондрії; МТ – мультівезикулярні тільця; ПМ – плазматична мембрана; ПС – полісоми; Р – рибосоми; ТВ – травні вакуолі.

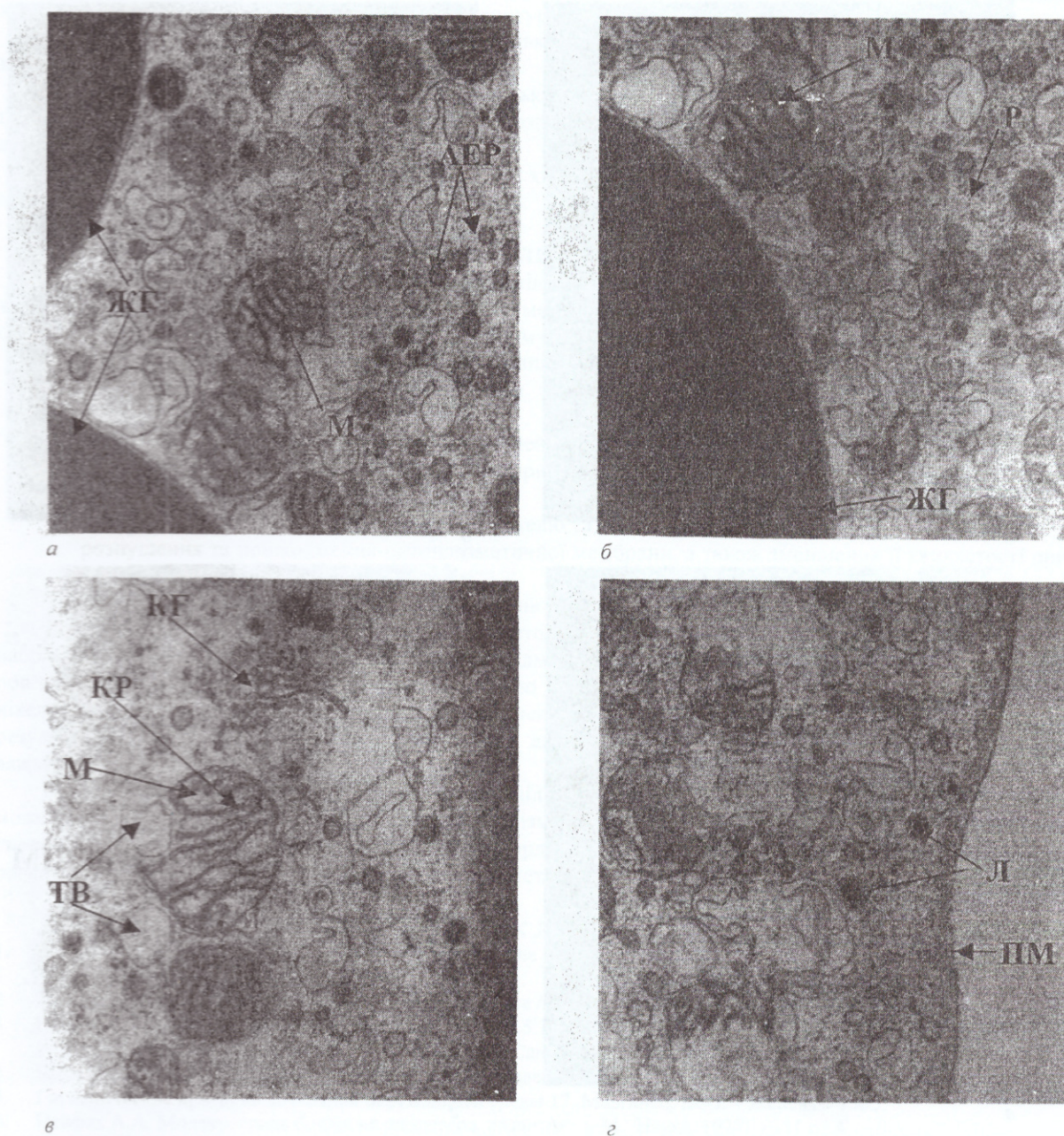
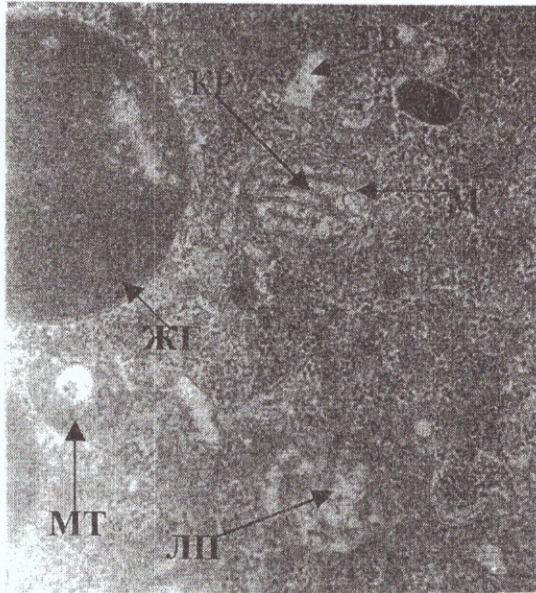


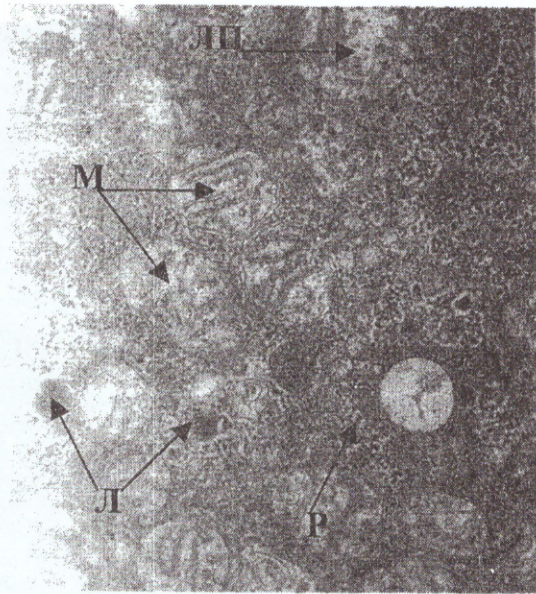
Рис. 2. Ультраструктура цитоплазми зародка в'юна на стадії 2-х бластомерів після інкубації в присутності катіонів Ni^{2+} (конц. 10^{-4} М) протягом 1 год (зб. $\times 10\,000$). Позначення – як в рис. 1.



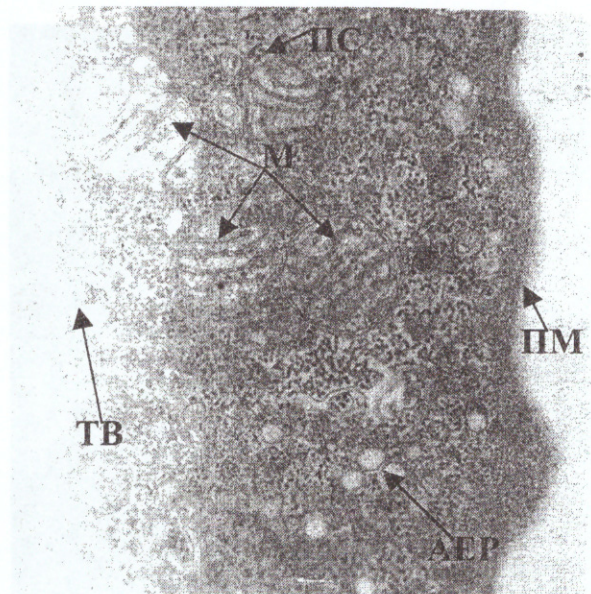
а



б



в



г

Рис. 3. Ультраструктура цитоплазми зародка в'юна на стадії 2-х бластомерів після інкубації в присутності катіонів Mn^{2+} (конц. 10^{-4} М) протягом 1 год (зб. $\times 10\ 000$). Позначення – як в рис. 1.

Кортикальні шари цитоплазми бластомерів за умов впливу катіонів марганцю, насичені великою кількістю рибосом і полісом, що мають нечіткі контури.

Мітохондрії, хоч і виявляються в значній кількості, однак є дезорганізованими, мають розпушені кристи, часто їх матрикс перебуває в стані набряку.

Поруч із мітохондріями виявлено значну кількість розширених каналів агранулярного ЕПР. Шар цитоплазми, що безпосередньо прилягає до розпушеної плазматичної мембрани, має підвищену електронну щільність та є гомогенним.

Поверхня цитоплазми бластомерів, хоч і має хвилеподібну форму, однак її амплітуда і частота є неоднаковими на всьому протязі поверхні (рис. 3, з).

ЗАКЛЮЧЕННЯ

Таким чином, дослідження бластомерів зародків в'юна на ультраструктурному рівні дає можливість зробити висновок, що вплив іонів таких важких металів, як нікель та марганець, приводить до змін організації внутрішньоклітинного вмісту, в основному таких як:

- значне розрідження цитоплазми у випадку впливу іонів нікелю;
- дезорганізація мітохондріальних мембран та крист та руйнування мітохондрій при впливі обидвох металів;
- значне зменшення кількості травних вакуолей у випадку впливу іонів марганцю;
- зменшення кількості рибосом та полісом при впливі іонів нікелю та поява рибосом з нечіткими контурами при впливі іонів марганцю;
- збільшення кількості лізосом при впливі нікелю та, в меншій степені, марганцю;
- розпушення та пошкодження цитоплазматичної мембрани, а також зменшення її хвилястості при впливі досліджуваних важких металів.

Такі зміни підтверджують токсичний вплив іонів нікелю та марганцю на клітини зародків.

Розрідження цитоплазми та зменшення хвилястості мембрани при впливі іонів нікелю свідчить про набряк клітини, який може бути викликаний надмірним входженням молекул води у клітину. Це пов'язано зі збільшенням концентрації іонів натрію в клітині, очевидно, внаслідок інгібування іонами нікелю Na^+ , K^+ –АТФ-ази і, таким чином, зменшення активного виходу натрію з клітини. Отже, ці результати підтверджують одержані нами раніше дані про інгібування Na^+ , K^+ –АТФ-ази катіонами важких металів [9].

Зменшення кількості травних вакуолей та ущільнення цитоплазми при впливі катіонів марганцю може свідчити про гальмування процесів метаболізму внаслідок дії іонів цього металу, що вказує на сповільнення розвитку зародків в цілому. Це підтверджується одержаними нами даними про відставання розвитку зародків в'юна під впливом іонів важких металів в порівнянні з контролем [10].

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Eichorn G. Metals ions as stabilizers or destabilizers of the deoxyribonucleic acid structure // *Nature*. – 1962. – 194, № 4. – P. 474–475.
2. Tal M. On the role of Zn^{2+} and Ni^{2+} in ribosome structure // *Biochem. et biophys. acta*. – 1968. – 169, № 4. – P. 564–565.
3. Dixon N., Blakely a., Zerner B. Jack bean urease (EC 3.5.1.5) 3. The involvement of active-site nickel ion in inhibition by β -mercaptoethanol, phosphoramidate and fluoride // *Can. J. Biochem.* – 1980. – 58, № 4. – P. 481–488.
4. Бабенко Г. А., Решеткина Л.П. // Применение микроэлементов в медицине. – Киев, 1971.
5. Гигиенические критерии состояния окружающей среды 17. Марганец. ВОЗ. – Женева – 1985.
6. Нейфах А.А. Молекулярная биология процессов развития. – М.: Наука, 1977. – 311 с. 4
7. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих – М.: Мир. – 1975. – 325 с.
8. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy // *Journal of Cell Biology*. – 1963. – V. 17. – P.208-212.
9. Бойко Н.М., Целевич М.В., Санагурський Д.И. Зміна активності Na^+ , K^+ –АТФ-ази мембран зародків в'юна під впливом катіонів важких металів // *Зб. наук. Праць: Проблеми екологічної та медичної генетики і клітинної імунології, Київ-Луганськ-Харків*. – 2002. – Вип. 2 (41). – С. 17-23.
10. Бойко Н.М., Санагурський Д.І. Вплив іонів важких металів на динаміку трансмембранного потенціалу зародків риб // *Вісник Харківського університету. Серія Біофізичний вісник*. – 2000. – Вип. 2 (7). – С. 42-46.