

УДК 576.35 + 577.25.5

УЛЬТРАСТРУКТУРА БЛАСТОМЕРІВ ЗАРОДКІВ В'ЮНА ЗА УМОВ ВПЛИВУ ІОНІВ ЦИНКУ ТА КАДМІЮ

Н.М. Бойко, М.В. Целевич, О.Р. Кулачковський, В.І. Ковалишин*,
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 вересня 2002 р.

Зареєстровано зміни ультраструктури клітин зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L. на стадії 2-х бластомерів в присутності катіонів цинку та кадмію. Вплив іонів цих важких металів приводить до значних морфологічних змін органел та включень клітин зародків, таких як зниження електронної щільності цитоплазми, дезорганізація комплексу Гольджі і мітохондрій, збільшення кількості поодиноких лізосом, гіпертрофія каналів агранулярного ендоплазматичного ретикулуму, руйнування цитоплазматичної та мітохондріальних мембран. Такі зміни підтверджують ембріотоксичний вплив іонів цинку та кадмію на клітини зародків.

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

До факторів забруднення навколишнього середовища, які небезпечні для нормальної життєздатності організмів і понижують її шляхом не тільки канцерогенного і мутагенного, але і ембріотоксичного впливу [1], належать сполуки важких металів [2]. Функціональна "агресивність" іонів кадмію пов'язана з їх здатністю витіснити життєво необхідні мікроелементи з активних центрів ферментів, індукувати синтез специфічних білків-лігандів – металотіонеїнів [3], зв'язуватись з функціональними групами нуклеїнових кислот [3, 4], а також нагромаджуватися в клітині. Іони цинку належать до розповсюджених металів в організмі людини, оскільки беруть участь в багатьох важливих ензиматичних процесах [5], але при певних умовах можуть інгібувати активність деяких ферментів, впливати на іонотранспортні системи мембран [6]. Плейотропний ефект кадмію і вплив іонів цинку зумовлюють внутрішньоклітинні зміни на ультраструктурному рівні, аналізу яких присвячена дана стаття.

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 [7]. Овуляцію стимулювали внутрішньом'язовим введенням самкам хоріогонічного гонадотропіну (500 од.). Ікру одержували через 36 год після стимуляції. Сім'янки отримували після декапітації та розтину черевної порожнини самців. Ікру запліднювали в чашках Петрі суспензією спермій. Через 5-10 хв після запліднення зиготи відмивали та інкубували при температурі 20-22° С протягом 1-1,5 год у фізіологічному розчині Гольтфретера в присутності іонів Zn^{2+} і Cd^{2+} в концентрації 10^{-4} М. Контрольні зародки інкубували в розчині Гольтфретера.

Зародки в'юна на стадії 2 бластомерів фіксували в 1,5 % розчині глутарового альдегіду в 0,2 М 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 епоксидну смолу епон-812 [8]. Зрізи готували на ультрамікросомі УМТІ-6 алмазним ножем, контрастували 2%-ним розчином ураніацетату протягом 15 хв і додатково цитратом свинцю за Рейнольдсом [9]. Зрізи переглядали і фотографували на електронному трансмісійному мікроскопі ПЕМ-100.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Ультраструктура бластомерів зародків в'юна в нормі

Ультраструктурна організація зародків в'юна на стадії 2 бластомерів, що розвивались в нормальних умовах характеризувалась середньою електронною щільністю цитоплазми, яка складалась з дрібнозернистої гіалоплазми, цитоплазматичних органел та включень.

В цитоплазмі розташовані канали гранулярного та агранулярного ендоплазматичного ретикулуму, скупчення полісом і окремих рибосом, серед яких знаходяться округлої, рідше – овальної форми мітохондрії. Поряд з полями рибосом та полісом виявляються поодинокі лізосоми, автофаголізосоми та дрібні ліпопротеїдні краплі. Мітохондрії мають добре розвинуті зовнішні і внутрішні мітохондріальні мембрани, остання утворює розгалужену систему крист, між якими знаходиться речовина середньої електронної щільності, так званий внутрішньомітохондріальний матрикс. Поруч з мітохондріями розрізняємо обмежені мембранами вакуолі, переважно великих розмірів. Інколи зустрічаються поодинокі мітохондрії, що однією з бокових поверхонь зливаються з вакуолями (рис. 1, а).

В глибоких шарах цитоплазми бластомерів виявлено 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 трубочкоподібних виростах гранулярного ЕПР. Зареєстровано, що невеликого діаметру гранули жовтка часто прилягають до вакуоль і зливаються з ними (рис. 1, в). При наближенні до кортикального шару бластомерів зменшується як кількість гранул, так і розміри вакуоль, в цитоплазмі розрізняють розширені канали агранулярного ЕПР, комплекс Гольджі (рис. 1, г).

Плазматична мембрана є суцільною та характеризується хвилястою формою (рис. 1, г).

Ультраструктура бластомерів зародків в'юна за умов впливу іонів цинку

Інкубування зародків в'юна на стадії 2-х бластомерів в середовищі з додаванням іонів цинку приводило до ультраструктурних змін органел та включень.

За умов інкубації зародків в'юна в присутності іонів цинку в концентрації 10^{-4} М цитоплазма бластомерів збіднена на жовткові гранули. Жовткові гранули невеликих розмірів і часто не обмежені лімітуючою оболонкою.

На близьких віддалях від жовткових гранул виявлені поодинокі первинні лізосоми та мультівезикулярні тільця великих розмірів.

Гіалоплазма, що оточує жовткові гранули та мультівезикулярні тільця перебуває в стані набряку, а поодинокі канали агранулярного ендоплазматичного ретикулуму – в стані лізису.

Переважно до лізованих і гіпертрофованих каналів ендоплазматичного ретикулуму прилягає комплекс Гольджі. Гіпертрофовані канали та мікроміхурці комплексу Гольджі наповнені речовиною значної електронної щільності. Мітохондрії, що знаходяться між комплексом Гольджі та каналами агранулярного ендоплазматичного ретикулуму мають оптимально розвинені зовнішні та внутрішні мембрани та кристи (рис. 2, а).

Виявлено також ділянки цитоплазми, що містять дезорганізований комплекс Гольджі, канали і мікроміхурці якого є електронно-світлим, а лімітуючі їх мембрани розпушені (рис. 2, б). Мітохондрії, які знаходяться поруч з таким комплексом Гольджі є дезорганізованими, перебувають в стані набряку. Зовнішні та внутрішні мітохондріальні мембрани, а також мембрани крист розпушені (рис. 2, в). Мітохондріальний матрикс таких мітохондрій вміщує преципітати та коагуляти. Переважно описані форми мітохондрій знаходяться в кортикальному шарі бластомерів (рис. 2, г).

Плазматична мембрана бластомерів частково розпушена і має менш виражену хвилястість, ніж в контролі.

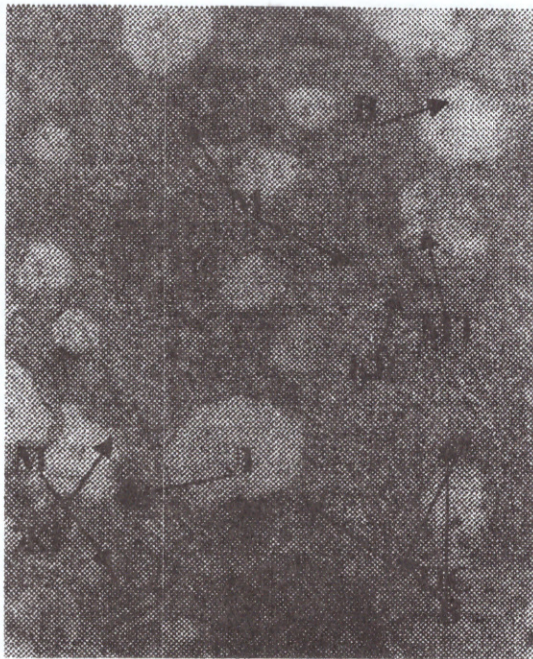
Ультраструктура бластомерів зародків в'юна за умов впливу іонів кадмію

Інкубація зародків в'юна на стадії 2-х бластомерів в середовищі з додаванням іонів кадмію приводить до ультраструктурних змін, що характеризуються низькою електронною щільністю цитоплазми, яка перебуває в стані набряку, та дезорганізацією органел. У жовткових гранул відсутня лімітуюча їх оболонка, а поверхня є розпушеною. Шар цитоплазми, що прилягає до гранул жовтка, вміщує в основному гіалоплазму, невелику кількість вакуоль, мікроміхурці, поодинокі лізосоми, агранулярний ендоплазматичний ретикулум, що розпадається (рис. 3, а).

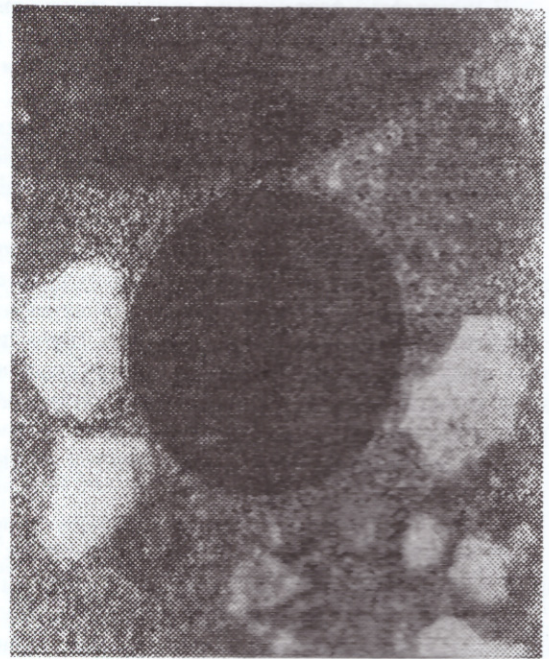
У віддалених від жовткових гранул ділянках цитоплазми знаходяться поодинокі великі мітохондрії. Мітохондрії, хоча і зберігають свої форми, однак їх мембрани є розпушеними, при цьому інколи зовнішня мітохондріальна мембрана формує вирости, які заходять глибоко в цитоплазму та є поєднаними з вакуолями (рис. 3, б).

Серед таких мітохондрій та дрібніших за розмірами гранул жовтка виявляються поодинокі кортикальні гранули.

Частина великих за розмірами мітохондрій вміщує значну долю крист, трансформованих в скупчення ліпопротеїдних мас.



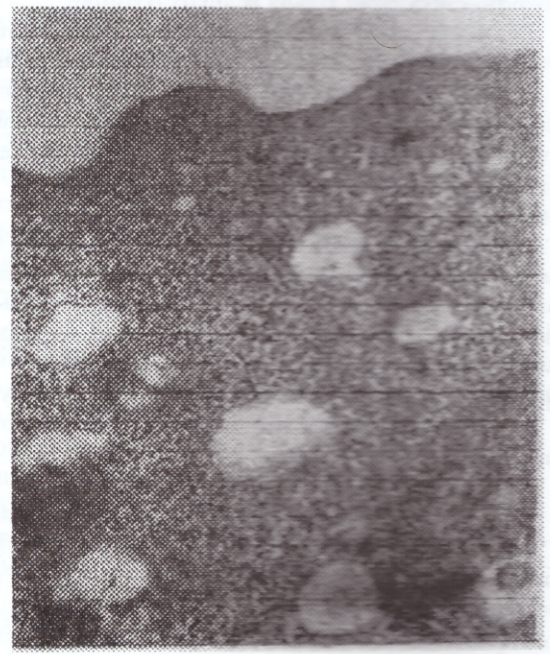
а



б

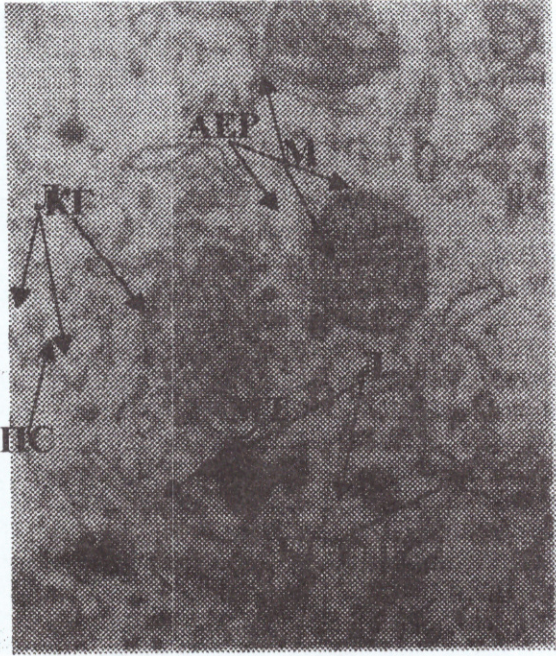


в

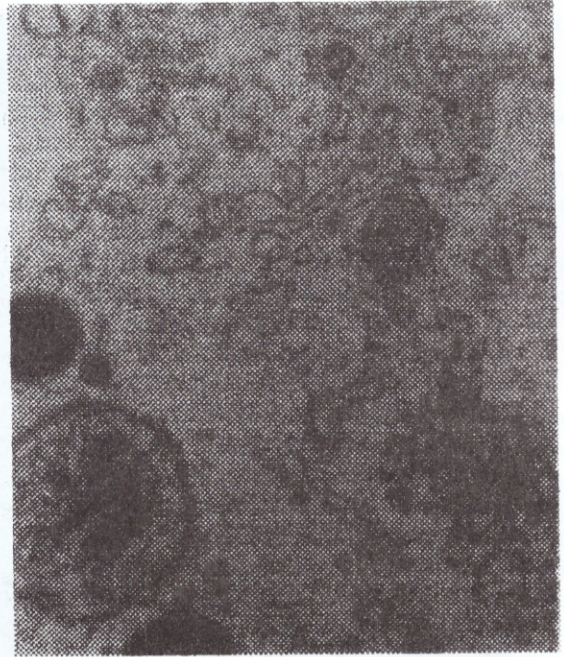


г

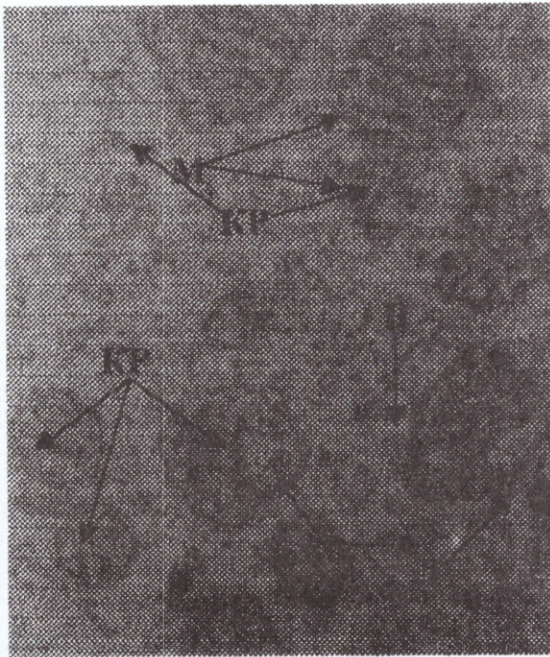
Рис. 1. Ультраструктура цитоплазми зародка в'юна на стадії 2-х бластомерів в нормі (зб. $\times 10\ 000$): АЕР – гранулярний ендоплазматичний ретикулум; АФЛ – автофаголізосоми; ГЕР – гранулярний ЕІР; ЖГ – жовткі гранули; КГ – комплекс Гольджі; КР – кристи мітохондрій; Л – лізосоми; М – мітохондрій; МГ – мультівезикулярні тілця; ПМ – плазматична мембрана; ПС – полісоми; Р – рибосоми; В – вакуолі.



а



б

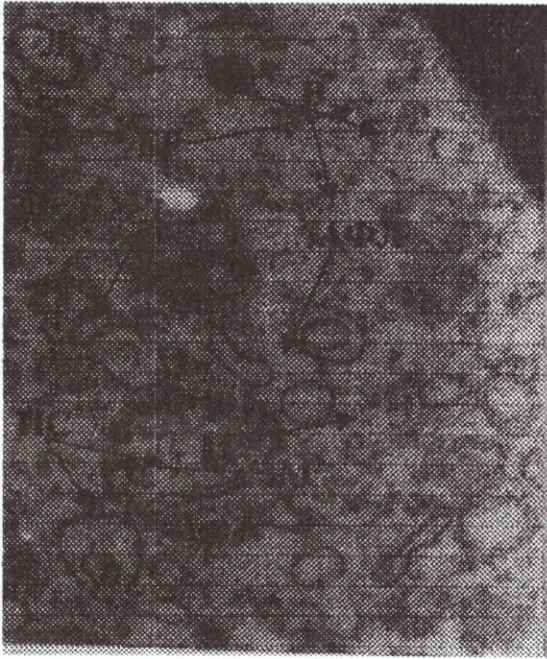


в

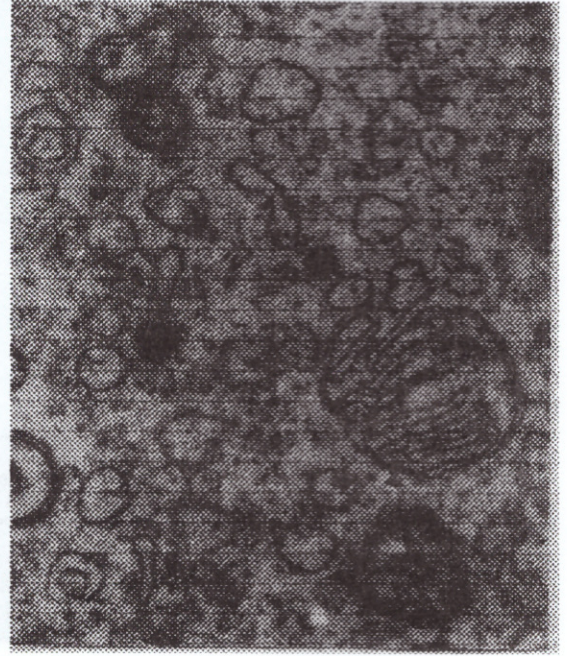


г

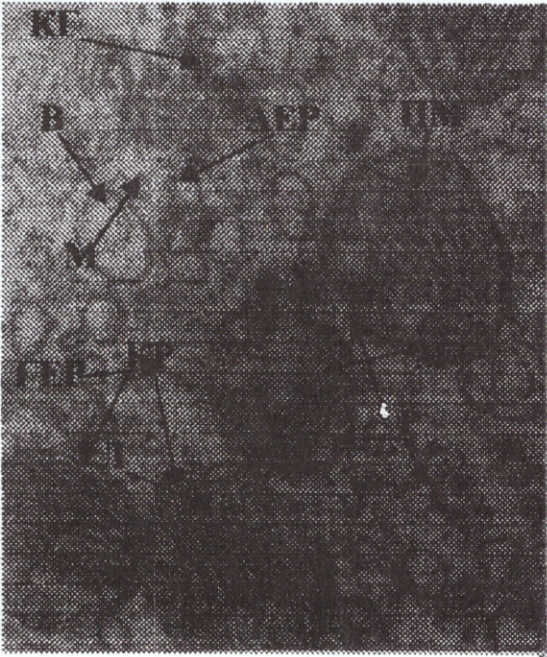
Рис. 2. Ультраструктура цитоплазми зародка в'юна на стадії 2-х бластомерів після інкубації в присутності катіонів Zn^{2+} (конц. 10^{-4} М) протягом 1 год (зб. $\times 10\ 000$). Позначення – як в рис. 1.



a



б



в



г

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

Особливістю таких ділянок цитоплазми є також присутність гіпертрофованого комплексу Гольджі, по периферії якого знаходяться невеликі за розміром первинні лізосоми (рис. 3, в).

Шар цитоплазми бластомерів, що безпосередньо прилягає до цитоплазми мембрани, як видно з рис. 3, з, вміщує поодинокі мітохондрії, які перебувають у стані набряку, дрібні вакуолі, які не завжди мають чіткі лімітуючі оболонки і кортикальні гранули, що мають нечіткі контури.

Плазматична мембрана бластомерів за умов впливу іонів кадмію має легко випуклу форму, особливо в тих частинах, що представлені суцільним електронно-щільним тяжем її преципітатів і коагулятів.

Відмічено також ділянки плазматичної мембрани, на яких вона є розпушеною. В незначних кількостях виявлені ділянки поверхні бластомерів, на яких плазматична мембрана не є суцільною (рис. 3, з).

ЗАКЛЮЧЕННЯ

Електронно-мікроскопічне дослідження бластомерів зародків в'юна показало, що вплив іонів таких важких металів, як кадмій та цинк приводить до порушення ультраструктурної організації клітин. Дія іонів кадмію спричинювала зменшення кількості та розмірів вакуоль, збільшення кількості первинних лізосом. У випадку впливу іонів цинку спостерігались такі зміни, як гіпертрофія каналів комплексу Гольджі і агранулярного ЕПР, розпушення мітохондріальних мембран та крист. Зниження електронної щільності гіалоплазми та набряк цитоплазми, дезорганізація мітохондрій, розпушення та пошкодження цитоплазматичної мембрани, а також зменшення її хвилястості спостерігалось при дії як іонів кадмію, так і цинку.

Вище описані зміни підтверджують ембріотоксичний вплив іонів кадмію та цинку на клітини зародків.

Оскільки іони кадмію мають здатність накопичуватися в клітині, за рахунок формування комплексів із специфічними білками-лігандами, це призводить до дезорганізації органел. З іншого боку, вплив іонів кадмію та цинку спричинює пошкодження цитоплазматичної мембрани, а також набряк цитоплазми та клітинних органел, що викликаний надмірним надходженням молекул води в клітину. Це може бути пов'язано зі збільшенням концентрації іонів натрію в клітині, очевидно, внаслідок інгібування іонами цинку та кадмію Na^+ , K^+ -АТФ-ази і, таким чином, зменшення активного виходу натрію з клітини. Отже, ці результати узгоджуються з одержаними нами раніше даними про інгібування Na^+ , K^+ -АТФ-ази катіонами важких металів [10].

Дезорганізація мітохондрій і гіпертрофія комплексу Гольджі та агранулярного ЕПР при дії катіонів цинку та кадмію може свідчити про гальмування процесів метаболізму, 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 [11].

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Халилов С.З. Особенности влияния неорганических соединений кадмия на эмбриогенез животных в условиях повторных воздействий // Гигиена труда и профессиональные заболевания. – 1987, №8. – С. 25-27.
2. Литвинов Н.Н., Ламентова Т.Г., Казачков В.И. Структурно-функциональные изменения в печени беременных крыс и их плодов при воздействии кадмия, бензола и нитрата свинца // Гигиена и санитария. – 1991, №5. – С.19-22.
3. Строчкова Л.С. Ультраструктурные исследование клеток HeLa после воздействия иона кадмия // Цитология и генетика. – 1990. – Т. 24, №6. – С. 7-11.
4. Eichorn G. Metals ions as stabilizers or destabilizers of the deoxyribonucleic acid structure // Nature. – 1962. – 194, № 4. – P. 474-475.
5. Tal M. On the role of Zn^{2+} and Ni^{2+} in ribosome structure // Biochem. et biophys. acta. – 1968. – 169, № 4. – P. 564-565.
6. Ершов Ю.А., Плетенева Т.В. Механизмы токсического действия неорганических соединений. – М.: Медицина – 1989. – 272с.
7. Нейфах А.А. Использование метода радиоактивной инактивации ядер для исследования их функций в раннем развитии рыб. // Журн. общ. биол. – 1959. – Т. 20. – С. 202-213.
8. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. – М.: Мир. – 1975. – 325 с.
9. 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.
10. Бойко Н.М., Целевич М.В., Санагурський Д.І. 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. – 2002. – Вип. 2 (41). – С. 17-23.
11. Бойко Н.М., Санагурський Д.І. Вплив іонів важких металів на динаміку трансмембранного потенціалу зародків риби // Вісник Харківського університету. Серія Біофізичний вісник. – 2000. – Вип. 2 (7). – С. 42-46.