

М.В. ЦЕЛЕВИЧ, О.Р. КУЛАЧКОВСЬКИЙ,
Д.І. САНАГУРСЬКИЙ

Львівський національний університет ім. Івана Франка, Україна
e-mail: biofiz@franko.lviv.ua

**ОСОБЛИВОСТІ
УЛЬТРАСТРУКТУРНИХ ЗМІН
ЗАРОДКІВ В'ЮНА
MISGURNUS FOSSILIS L.
ЗА УМОВ ВПЛИВУ БОРОЦИНУ**



Наведено результати дослідження ультраструктури клітин зародків *Misgurnus fossilis* L. на стадії двох бластомерів в контролі та за умов інкубації в присутності антибіотика фторхінолонового ряду — бороцину. Встановлено, що дія бороцину приводить до таких змін ультраструктурної організації зародкових клітин, як гіпертрофія гранулярного та агранулярного ендоплазматичного ретикулуму, розпад полісом, дезорганізація мітохондрій, порушення структури мембрани та набряк клітин. Отже такі зміни підтверджують токсичний вплив бороцину на зародки в'юна протягом раннього ембріогенезу.

© М.В. ЦЕЛЕВИЧ, О.Р. КУЛАЧКОВСЬКИЙ,
Д.І. САНАГУРСЬКИЙ, 2004

Вступ. Фторхінолони — велика група синтетичних препаратів класу хінолонів. Широке застосування фторхінолонів та їх висока клінічна ефективність пов'язані з швидким проникненням в клітини організму, повільною елімінацією та низькою токсичністю цих антибіотиків [1, 2]. Рекомендовані для застосування в медичній практиці антибіотики фторхінолонового ряду не проявляють мутагенної, канцерогенної та тератогенної дії по відношенню до клітин і не впливають на репродуктивні функції організму [2–5].

На відміну від впливу на клітинні процеси прокаріот шляхом інгібування ДНК-гірази [6] дія фторхінолонів на еукаріоти реалізується на мембранному рівні [1, 7]. За рахунок наявності 3-карбоксі- та 4-оксигруп антибіотиків можуть утворюватись зв'язки зі складовими мембран, що призводить до дестабілізації мембранної структури, зміни її характеристики, порушення роботи мембранних ферментів і в результаті — до пошкоджень та загибелі клітини [7]. Дослідниками показано [8], що дія антибіотиків фторхінолонового ряду приводить до змін електрофізіологічних характеристик плазматичних мембран зародків в'юна *Misgurnus fossilis* протягом раннього ембріогенезу — збільшення амплітуди та періоду коливань трансмембранного потенціалу, загальної деполяризації зародкових мембран. Крім цього, виявлено інгібувальний вплив фторхінолонів на Na^+ , K^+ -активовану, Mg^{2+} -залежну АТФазу зародків в'юна [9]. Фторхінолони інгібують також продукцію мембранних рецепторів інтегринів хондріоцитів 12-денних зародків мишей [4], які сумісно локалізовані з Na^+ , K^+ -АТФазою, натрієвими каналами та потенціалкерованими Ca^{2+} -каналами плазматичних мембран хондріоцитів зародків [10].

Загальною властивістю для всіх антибіотиків фторхінолонового ряду є здатність утворювати нерозчинні хелатні комплекси з катіонами Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , Ca^{2+} , Al^{3+} [3, 4, 11], що приводить до дефіциту цих металів у клітині, наслідком чого є порушення хімічної рівноваги в живому організмі і викликає розвиток різноманітних аномалій.

Оскільки зародки в період раннього ембріонального розвитку є чутливою тест-системою для дослідження рівня токсичності речовин, доцільно дослідити морфологічні варіації внутрішньоклітинних структур та органел, які суп-

роводжують метаболічні зміни при дії антибіотиків фторхінолонового ряду.

Метою роботи було дослідити характер ультраструктурних змін бластомерів зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L. за умов впливу фторхінолону борошину в різних концентраціях на стадії двох бластомерів.

Матеріали і методи. Дослідження проведені на зародках в'юна (*Misgurnus fossilis* L.) у період від запліднення до закінчення стадії дроблення бластомерів. 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 спермій за Нейфахом [12]. Через 5–10 хв після запліднення зиготи

відмивали та інкубували при температурі 20–22 °С протягом 1–1,5 год у фізіологічному розчині Гольфрета в присутності борошину в концентрації 5 та 25 мкг/мл. Контрольні зародки інкубували в розчині Гольфрета.

Зародки в'юна на стадії двох бластомерів (60 хв) фіксували в 1,5%-ному розчині глютарового альдегіду в 0,2 М какодилатному буфері (рН 7,2) при $t = 4^{\circ}\text{C}$ протягом 1 год. Промивали зразки в какодилатному буфері і додатково фіксували в 2%-ному розчині чотирьохокису осмію в тому ж буфері на протязі 1 год ($t = 4^{\circ}\text{C}$). Потім відмивали від фіксаторів і збезводнювали в зростаючих концентраціях етилового спирту (50, 70, 90 % і абсолютному — 100 %). Додатково збезводнювали в двох змінах окису пропілену і поміщали в апоксидну смолу епон-812 [13]. Зрізи готували на ультрамикротомі УМТП-6 алмазним ножом, контрастували 2%-ним розчином ураніацетату протягом 15 хв і додатково цитратом свинцю за Рейнольдсом [14]. Зрізи переглядали і фотографували на електронному трансмісійному мікроскопі ПЕМ-100.

Результати досліджень та їх обговорення.
Ультраструктура зародків на стадії двох бластомерів в нормальних умовах. Електронно-мікроскопічне дослідження ультратонких зрізів бластомерів зародків в'юна на стадії двох бластомерів в контролі встановило, що цитоплазма складається з середньої електронної щільності дрібнозернистої гіалоплазми, органел та включень.

Поверхня бластомерів покрита суцільною плазматичною мембраною, яка має чіткі контури і хвилясту форму (рис. 1, з). Гіалоплазма зародкових клітин містить канали агранулярного (АЕР) та гранулярного ендоплазматичного ретикулуму (ГЕР), скупчення полісом, кулястої або овальної форми мітохондрії, які мають добре розвинуті зовнішні і внутрішні мітохондріальні мембрани (рис. 1, а, в), поодинокі лізосоми (рис. 1, а), автофаголізосоми та невеликі за розмірами ліпопротеїдні краплі (рис. 1, з). Разом з мітохондріями також зустрічаються значних розмірів травні вакуолі, які обмежені власною мембраною. В цитоплазмі клітин присутні мітохондрії, що однією з бокових поверхонь зливаються з травними вакуолями, або, виходячи з рис. 1, а, можуть бути їх попередниками.

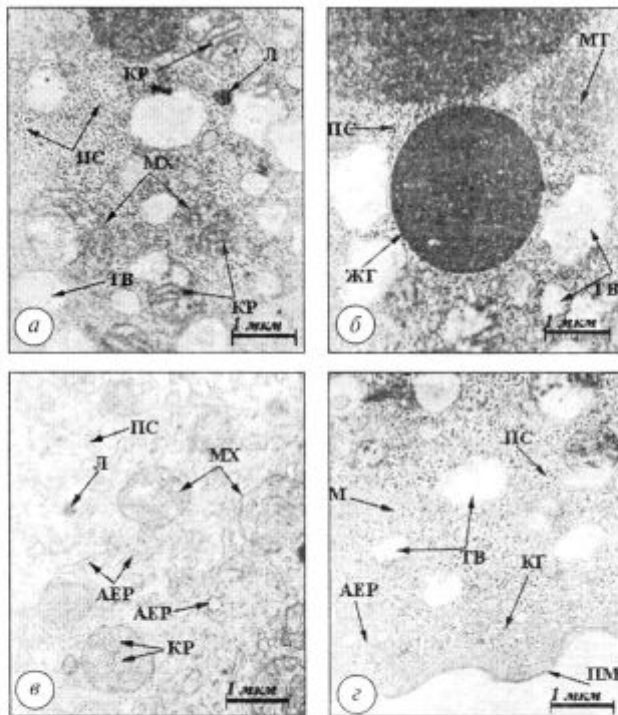


Рис. 1. Ультраструктура бластомерів зародків в'юна на стадії двох бластомерів в нормі: АЕР — гранулярний ендоплазматичний ретикулум; АФЛ — автофаголізосоми; ГЕР — гранулярний ЕПР; ЖГ — жовткові гранули; КГ — комплекс Гольджі; КР — кристи мітохондрій; Л — лізосоми; МХ — мітохондрії; МТ — мультивезикулярні тіลця; ПМ — плазматична мембрана; ПМШ — примембранний шар цитоплазми; ПС — полісоми; М — моносоми; ТВ — травні вакуолі; А — електронно-щільний агрегат; $\times 10\,000$

В глибоких шарах цитоплазми бластомерів присутні різної електронної щільності та неоднакового діаметра гранули жовтка кулястої форми (рис. 1, б). Жовткові гранули оточені по периферії мембраною, яка в багатьох місцях продовжується у трубкоподібні вирости ГЕР. Між такими гранулами зустрічаються середньої електронної щільності мультивезикулярні тільця (рис. 1, б).

При наближенні до кортикального шару бластомерів кількість жовткових гранул зменшується. Також зменшуються розміри травних вакуолей, а цитоплазма насичена розширеними каналами АЕР та цистернами комплексу Гольджі (рис. 1, з).

Ультраструктура зародків на стадії двох бластомерів при дії бороцину. Інкубування зародків в'юна на стадії двох бластомерів в середовищі з додаванням бороцину в концентраціях 5 та 25 мкг/мл приводило до ультраструктурних змін органел та включень бластомерів.

Цитоплазматична мембрана бластомерів залишається суцільною (рис. 2, а, б), зберігає хвиляподібну форму (рис. 2, б), однак в ділянках інвагінацій спостерігається розпушення її поверхні (рис. 2, б). Шар цитоплазми, що безпосередньо прилягає до мембрани бластомерів, має низьку електронну щільність і не містить клітинних органел (рис. 2, а, б). Ширина цього примембранного шару інколи досягає 450 нм. В ділянках інвагінацій мембрани відзначено скупчення електронно-щільних агрегатів (рис. 2, а, б). При дослідженні впливу грепафлосацину в концентрації 10 мкг/мл на 12-денні зародки мишей також відмічено утворення подібних агрегатів у примембранному шарі цитоплазми [15]. Дослідники вважають, що таке відшарування цитоплазми може бути пов'язане з входженням антибіотиків у клітину, про що свідчить також розрідження цитоплазми та набряк зародкових клітин.

Як в кортикальних, так і в глибоких шарах цитоплазми знаходяться мітохондрії середніх розмірів неправильної зірчастої (рис. 2, в, з), рідше кулястої форми (рис. 2, а, б). Більшість мітохондрій перебувають у стані набряку (рис. 2, а), а їх матрикс заповнений речовиною низької електронної щільності (рис. 2, б–з). Набряк мітохондрій в свою чергу викликає порушення окисного фосфорилювання. Поряд з набряк-

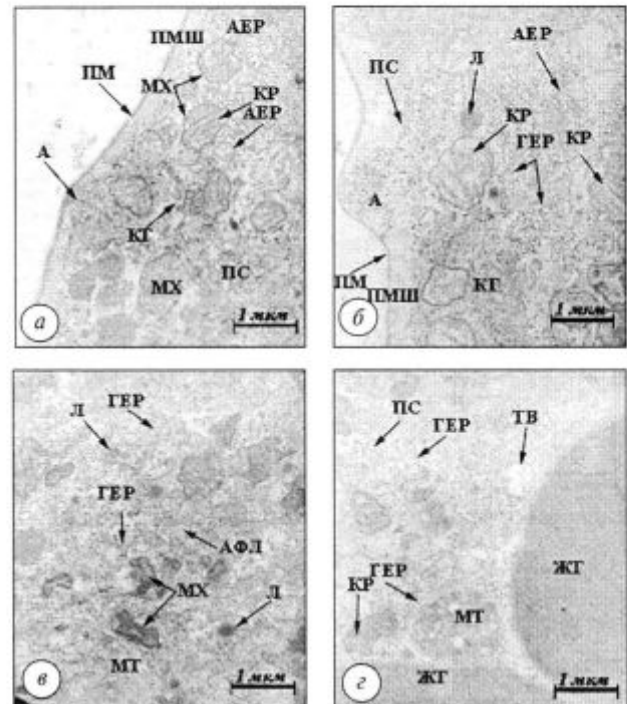


Рис. 2. Ультраструктура бластомерів зародків в'юна на стадії двох бластомерів за умов впливу бороцину в концентрації 5 мкг/мл. Позначення, як на рис. 1

лими мітохондріями зустрічаються мітохондрії на різних стадіях так званого «мітохондріального пікнозу» [16]. Цей феномен розпочинається зі зміни форми мітохондрій, конденсації внутрішньомітохондріального матриксу (рис. 2, в). Не виключено, що деструкція цих органел пов'язана з посиленням перекисного окислення ліпідів, можливо, за рахунок інгібування антиоксидантних ферментів.

Слід відзначити, що вже на першій годині розвитку спостерігається розширення цистерн ГЕР (рис. 2, б) і дезорганізація їх мембран (рис. 2, а, б). Поява моносом в цих ділянках гіалоплазми пов'язана з частковою або повною дегрануляцією мембран ГЕР, що приводить до порушення синтезу білка.

В міру наближення до поверхні бластомерів в цитоплазмі знаходяться гіпертрофовані канали АЕР. Навколо цих каналів зустрічаються невеликі первинні лізосоми і ділянки протеолізу. Останнє можна пояснити порушенням метаболізму та транспорту ліпопротеїнів. Найменших пошкоджень в порівнянні з контролем зазнав комплекс Гольджі (рис. 2, б), який

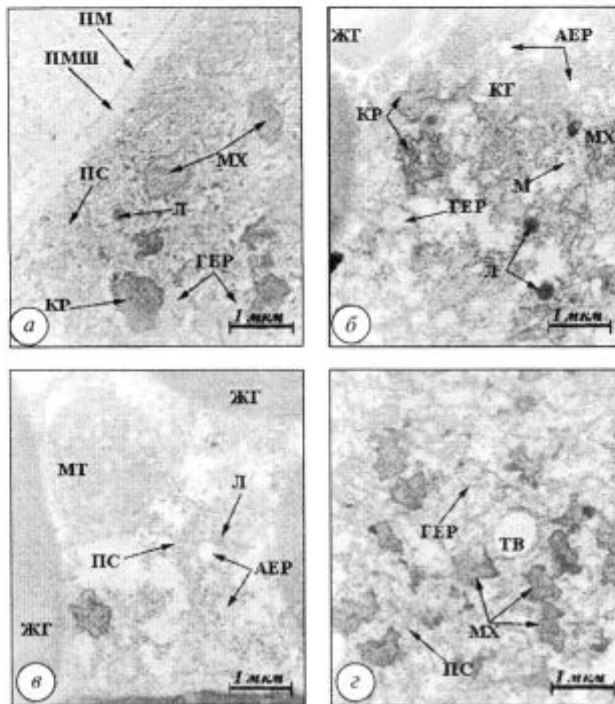


Рис. 3. Ультраструктура бластомерів зародків в'юна на стадії двох бластомерів за умов впливу бороцину в концентрації 25 мкг/мл. Позначення, як на рис. 1

розташований між дезорганізованими мітохондріями.

В глибоких шарах цитоплазми зареєстровані значних розмірів мультивезикулярні тілця (рис. 2, в, г), оточені суцільною мембраною, на поверхні якої видно утворення у вигляді сот. В цитоплазмі бластомерів присутні кулястої форми значних розмірів гранули жовтка (рис. 2, г).

При додаванні в інкубаційне середовище бороцину в концентрації 25 мкг/мл спостерігалися значні зміни ультраструктури зародкових клітин. Поверхня бластомерів зародків за умов впливу бороцину була несучільною, а на певних ділянках спостерігались значних розмірів розриви мембрани (рис. 3, а). Товщина шару, який має низьку електронну щільність і прилягає до цитоплазми, становить 240 нм. Слід зазначити, що при дії високої концентрації бороцину мембрана втратила свою хвилястість і перебувала в натягнутому стані (рис. 3, а), що свідчить про набряк клітини. Набряк бластомерів, що являє собою ранній результат пошкодження клітини, є наслідком надмірного

входження Na^+ , K^+ та молекул води в цитоплазму клітини. Ці зміни зумовлені порушенням функції енергозалежної Na^+ , K^+ -АТФази зародкових мембран [9]. В цитоплазмі клітин проходять також зміни концентрацій інших електролітів, особливо Mg^{2+} і Ca^{2+} , які в свою чергу можуть приводити до порушення внутрішньоклітинних процесів та інгібування інших мембраноспрояжених ферментів.

Цитоплазма бластомерів характеризувалася неомогенною гіалоплазмою (рис. 3, б–г), в якій зустрічалися гіпертрофовані канали агранулярного та гранулярного ендоплазматичного ретикулуму, заповнені речовиною низької електронної щільності (рис. 3, б–г), проте в глибоких шарах цитоплазми зафіксовано значне руйнування мембран ГЕР, внаслідок чого проходить і розпад полісом на моносоми та їх дезорганізація.

За умов впливу бороцину в концентрації 25 мкг/мл в цитоплазмі практично не зустрічаються нормальні мітохондрії, однак зростає кількість конденсованих форм мітохондрій з щільно упакованими кристами (рис. 3, г), а також зустрічаються мітохондрії, кристи яких є зруйнованими.

При дії антибіотику відмічено значну гіпертрофію цистерн апарату Гольджі (рис. 3, г). Від дистальних ділянок цистерн відбруньковуються численні везикули, які розсіюються в цитоплазмі, поряд з цими везикулами знаходяться первинні лізосоми.

В глибоких шарах цитоплазми знаходяться значних розмірів гранули жовтка (рис. 3, б, в), мембрани яких переважно розпушені. Відзначено збільшення розмірів мультивезикулярних тілець, які є своєрідними «мініцитоплазмами», що оточені власною мембраною. Всередині цих утворень знаходяться фрагменти цитоплазми і зруйнованих органел у вигляді невеликих пухирців середньої електронної щільності.

На основі наведених результатів можна зробити висновок, що фторхінолон бороцин проявляє токсичну дію по відношенню до зародків, зумовлює деструктивні зміни зародкових клітин, які практично стосуються всіх клітинних органел. Такі зміни ультраструктурної організації клітин зародків є наслідком порушення перебігу метаболічних процесів, що в результаті веде до загибелі клітини.

SUMMARY. The ultrastructure of embryo cells of the loach (*Misgurnus fossilis* L.) at the stage of first division of blastomers in control and under the conditions of fluoroquinolone borocin treatment has been investigated. The influence of this antibiotic at concentrations 5 and 25 mkg/ml has resulted in significant ultrastructural changes of embryo cells, such as hypertrophy of channels of the smooth and rough endoplasmic reticulum, disorganization of Golgi complex and mitochondrias, destruction of cytoplasm and mitochondrial membranes, rarefaction of cytoplasm and cell oedema. Such changes confirm the toxic influence of borocin on the embryo during early development.

РЕЗЮМЕ. Приведены результаты исследований ультраструктуры клеток зародышей на стадии двух бластомеров в норме и при воздействии антибиотика борацина. Установлено, что воздействие борацина обуславливает такие изменения ультраструктурной организации клеток зародышей, как гипертрофия гранулярного и агранулярного эндоплазматического ретикулума, распад полисом, дезорганизация митохондрий, нарушение мембранной структуры и отек клетки, т.е. такие изменения свидетельствуют о токсичности борацина для зародышей в раннем эмбриогенезе.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Падейская Е.Н., Яковлев В.П. Антимикробные препараты группы фторхинолонов в клинической практике. — М.: Лагота, 1998. — 351 с.
2. Korobolot N., Drusono G. Pharmacokinetics of quinolone antimicrobial agents. — Washington, 1993. — P. 195–223.
3. Падейская Е.Н. Переносимость и безопасность антимикробных препаратов группы фторхинолонов; редкие и очень редкие нежелательные явления // Антибиотики и химиотерапия. — 2001. — 3, № 1. — С. 1–18.
4. Падейская Е.Н. Артротоксичность хинолонов и фторхинолонов в эксперименте: характер поражений и возможный механизм действия // Антибиотики и химиотерапия. — 2000. — 45, № 8. — С. 36–41.
5. Wilson A.P.R., Gruneberg R.N. Ciprofloxacin: 10 years of clinical experience. — Oxford, 1997. — 275 p.
6. Буш В., Далхофф А., Цайлер Х.И. Настоящее и будущее хинолонов // Антибиотики и химиотерапия. — 1993. — 38, № 2/3. — С. 3–8.
7. Егоров А.М., Сазыкин Ю.О. Фторхинолоны и проблемы молекулярного механизма их действия // Антибиотики и химиотерапия. — 2000. — 45, № 8. — С. 3–5.
8. Бойко Н.М., Санагурский Д.І. Вплив антибіотиків класу фторхінолонів на динаміку трансмембранного потенціалу зародків в'юна // Біологія тварин. — 2000. — 2, № 2. — С. 135–137.
9. Целевич М.В., Санагурський Д.І. Вплив флюміквілу на активність Na⁺, K⁺-АТФ-аза зародків в'юна // Біологія тварин. — 2003. — 5, №1/2. — С. 289–294.
10. Shakibaei M., Mobasheri A. Beta1-integrins co-localize with Na, K-ATPase, epithelial sodium channels (ENaC) and voltage activated calcium channels (VACC) in mechanoreceptor complexes of mouse limb-bud chondrocytes // Histol. Histopathol. — 2003. — 18 (2). — P. 343–351.
11. Stahlmann R., Lode H. Safety overview. Toxicity, adverse effects, and drug interaction. The Quinolones / Ed. V.T. Andriole — London; New York; Tokyo, 1998. — P. 369–415.
12. Нейфах А.А. Молекулярная биология процессов развития. — М.: Наука, 1977. — 311 с.
13. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. — М.: Мир, 1975. — 325 с.
14. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy // J. Cell Biol. — 1963. — 17. — P. 208–212.
15. Shakibaei M., Baumann-Wilschke I., Rucker M., Stahlmann R. Ultrastructural characterization of murine limb buds after in vitro exposure to grepafloxacin and other fluoroquinolones // Arch. Toxicol. — 2002. — 75, № (11/12). — P. 725–733.
16. Chadially F. Ultrastructural pathology of the cells // Butterworths. — London; Boston, 1975. — 543 p.

Надійшла 14.04.04