

М.В. ЦЕЛЕВИЧ

Львівський національний університет ім. Івана Франка, Україна
E-mail: mcelewych@yahoo.com

ОСОБЛИВОСТІ УЛЬТРАСТРУКТУРИ ЗАРОДКІВ В'ЮНА ЗА УМОВ ВПЛИВУ НОРФЛОКСАЦИНУ



*Наведено результати дослідження ультраструктури зародків *Misgurnus fossilis* L. на стадіях першого та десятого поділів бластомерів у контролі та за присутності в середовищі інкубації антибіотика фторхінолонового ряду – норфлоксацину (5 та 25 мкг/мл). Дія норфлоксацину веде до ультраструктурних змін клітинних органел: гіпертрофії гранулярного та агранулярного ендоплазматичного ретикулуму, дезорганізації мітохондрій та плазматичної мембрани зародків. Встановлено, що фторхінолон інгібує біосинтетичні процеси безпосередньо впливаючи на біосинтетичні структури бластомерів. Деструктивні зміни органел є наслідком порушення асиміляційних процесів, які зрештою ведуть до загибелі зародків. Таким чином, отримані результати свідчать про те, що для норфлоксацину характерна висока ембріотоксичність.*

© М.В. ЦЕЛЕВИЧ, 2008

Вступ. Антибіотики фторхінолонового ряду – група синтетичних препаратів класу хінолонів. Широке застосування фторхінолонів та їх висока клінічна ефективність пов'язані з швидким проникненням в клітини організму [1, 2], повільною елімінацією та низькими офто-, гепато-, кардіо-, нефро-, імуно-, фото- та нейротоксичними властивостями [3–6].

Проникнення фторхінолонів усередину клітин здійснюється через зовнішню плазматичну мембрану [1]. Препарати з гідрофобними властивостями, до яких можна віднести і норфлоксацин (біодоступність 30–40 %), проникають головним чином через ліпополісахаридний шар плазматичної мембрани. Наявність у молекулі фторхінолонів 3-карбокси- та 4-оксигруп сприяє утворенню зв'язків із фосфоліпідами та глікопротеїнами, що в свою чергу призводить до дестабілізації структури цитоплазматичної мембрани, змін її електрофізіологічних характеристик, інактивації мембранозв'язаних ферментів, порушення іонного гомеостазу і зрештою веде до пошкодження та загибелі клітин [7]. Дослідниками підтверджено [8], що дія фторхінолонів веде до збільшення амплітуди та періоду коливань трансмембранного потенціалу (ТМП), загальної деполяризації мембрани бластомерів, дозозалежного інгібування Na^+ , K^+ -АТФази [9], зумовлює різноспрямовані зміни перекисного окиснення ліпідів, а також активностей супероксиддисмутази (СОД) й каталази зародків в'юна протягом ембріогенезу [10].

Оскільки зародки в період раннього ембріонального розвитку є адекватною тест-системою для дослідження рівня токсичності речовин, доцільно дослідити морфологічні варіації внутрішньоклітинних структур та органел, які супроводжують метаболічні зміни при дії норфлоксацину – антибіотика фторхінолонового ряду (рис. 1).

Мета роботи – дослідження ультраструктурних змін бластомерів в'юна *Misgurnus fossilis* L. за умов впливу норфлоксацину протягом раннього онтогенезу.

Матеріали і методи. Дослідження проведені на зародках в'юна (*Misgurnus fossilis* L.) у період від моменту запліднення (60 хв, перша година розвитку) до стадії десятого поділу бластомерів (шоста година розвитку). Овуляцію стимулювали внутрішньом'язовим введенням самкам хоріогонічного гонадотропіну (500 од.). Ікру одержували через 36 год після стимуляції.

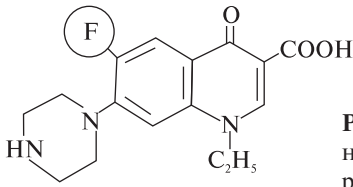


Рис. 1. Хімічна будова норфлораксину (діюча речовина офлораксин)

Сім'яники отримували шляхом декапітації та розтину черевної порожнини самців. Ікру запліднювали в чашках Петрі суспензією сперміїв за Нейфахом [11]. Через 5–10 хв після запліднення зиготи відмивали та інкубували у фізіологічному розчині Гольтфретера (рН 7,4, $t = 20\text{--}22\text{ }^\circ\text{C}$) за присутності норфлораксину в концентрації 5 та 25 мкг/мл. Контрольні зародки інкубували в розчині Гольтфретера.

Зародки в'юна на вказаних стадіях розвитку фіксували 1 год у 1,5%-ному розчині глютарового альдегіду в 0,2 М какодилатному буфері (рН 7,2, $t = 4\text{ }^\circ\text{C}$). Зразки промивали в какодилатному буфері і додатково фіксували 1 год у 2%-ному розчині чотирьохокису осмію в тому ж буфері ($t = 4\text{ }^\circ\text{C}$). Потім відмивали від фіксаторів і збезводнювали в зростаючих концентраціях етилового спирту. Додатково збезводнювали в двох змінах окису пропілену і помішали в епоксидну смолу епон-812 [12]. Зрізи готували на ультрамікротомі УМТП-6 алмазним ножом, контрастували 15 хв 2%-ним розчином ураніацетату і додатково цитратом свинцю по Рейнольдсу [13]. Зрізи переглядали і фотографували на електронному трансмісійному мікроскопі ПЕМ-100.

Вміст білка у гомогенаті визначали за методом Lowry [14]. Зародки попередньо гомогенізували у буферному розчині наступного складу (ммоль/л): сахароза – 120,0; КСІ – 130,0; MgCl_2 – 5,0; тріс-НСІ – 10,0 (рН 7,4; $t = 4\text{ }^\circ\text{C}$). Рештки зародкового жовтка осаджували центрифугуванням упродовж 10 хв при 1600 g [15].

Результати досліджень та їх обговорення.
Ультраструктура зародків на першій годині розвитку при дії норфлораксину. Ультраструктурна організація зародкових клітин в'юна, що були інкубовані протягом першої години розвитку (стадія 2 бластомерів) у середовищі з додаванням норфлораксину (5 та 25 мкг/мл), характеризувалася зміною електронної щільності гіалоплазми та дезоргані-

зованими органелами у порівнянні з контролем [16]. Цитоплазматична мембрана бластомерів при дії 5 мкг/мл бороцину [16] залишалася цілісною і зберігала хвилеподібну форму (рис. 2, а). За умов впливу норфлораксину в зазначеній концентрації для бластомерів характерна наявність електронно-світлого примембранного шару. Товщина останнього в середньому становить 230 нм, проте інколи досягає й 530 нм, у ньому присутні скупчення електронно-щільних агрегатів (рис. 2, а). При дослідженні впливу бороцину на розвиток зародків в'юна [16] і грепафлораксину на 12-денних ембріонів мишей [17, 18] відзначено також утворення подібних агрегатів у примембранних ділянках цитоплазми. Вважають, що ці зміни пов'язані з проникненням антибіотиків через цитоплазматичну мембрану у цитоплазму. Про це свідчать розрідження цитоплазми та частковий набряк як деяких органел, так і зародкових клітин в цілому.

У кортикальних шарах цитоплазми зародкових клітин виявлено поодинокі мітохондрії, що перебували в стані набряку (рис. 2, а), кристи яких частково зруйновані, матрикс електронно-світлий, однак зовнішні мітохондріальні мембрани зберігали цілісність (рис. 2, з). Поряд з такими органелами зустрічаються неправильної зірчастої форми мітохондрії зі щільно упакованими кристами й електронно-темним матриксом (рис. 2, а–в). Такий феномен називають «мітохондріальним пікнозом» [19], його виявлено і у зародків, інкубованих за присутності бороцину [16, 20]. Не виключено, що деструкція цих органел пов'язана з посиленням перекисного окислення ліпідів, можливо, за рахунок інгібування антиоксидантних ферментів [10]. Ймовірно, такі деструктивні зміни мітохондрій є характерною особливістю ембріотоксичної дії антибіотиків фторхінолонового ряду.

На першій годині розвитку зародків за умов впливу норфлораксину (5 мкг/мл) найбільших змін зазнав гранулярний ендоплазматичний ретикулум (ГЕР) (рис. 2, а). При дії антибіотика не відзначено гіпертрофії каналів АЕР (агранулярний ендоплазматичний ретикулум), але виявлено дефрагментацію і лізування ділянок його мембран (рис. 2, а, з), поруч з якими зустрічаються вторинні лізосоми середніх розмірів. Подібних змін зазнавав

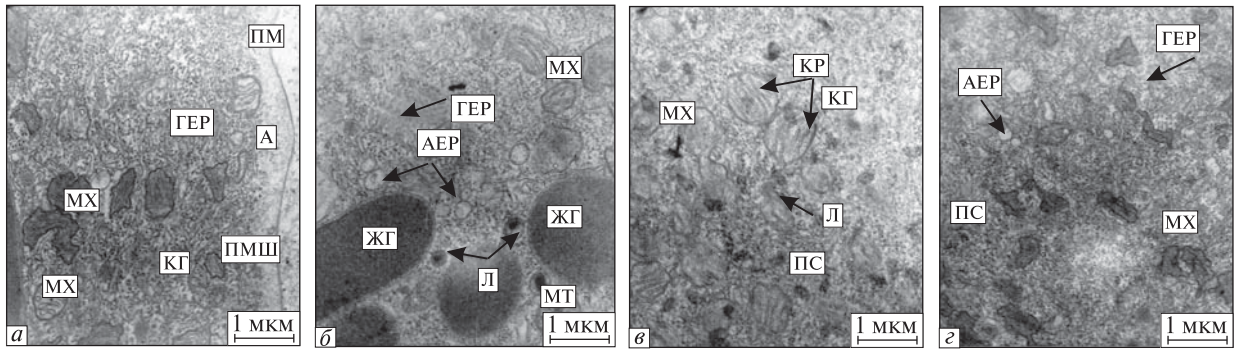


Рис. 2. Ультраструктура зародків в'юна на першій годині розвитку за умов впливу 5 (а, б) та 25 (в, г) мкг/мл норфлораксацину: АЕР – агранулярний ендоплазматичний ретикулум; АФЛ – автофаголизосоми; ГЕР – гранулярний ендоплазматичний ретикулум; ЖГ – жовткові гранули; КГ – комплекс Гольджі; КР – кристи мітохондрій; Л – лізосоми; МХ – мітохондрії; МТ – мультивезикулярні тільця; ПМ – плазматична мембрана; ПМШ – примембранний шар цитоплазми; ПС – полісоми; М – моносоми; ТВ – травні вакуолі; А – електронно-щільний агрегат; $\times 10\,000$

і комплекс Гольджі, цистерни якого частково розпушені і зруйновані (рис. 2, а). Останнє можна пояснити порушенням метаболізму та транспорту ліпопротеїнів.

При частковій або повній дегрануляції мембран ГЕР у цитоплазмі нагромаджуються скупчення рибосом і поодиноких моносом (рис. 2, г), поява яких у цих ділянках гіалоплазми свідчить про порушення синтезу білка у зародків. Оскільки подібні зміни ультраструктури виявлено і при дії борацину [16, 20], проведено серію досліджень впливу норфлораксацину на інтенсивність синтезу білка у зародків протягом ембріогенезу.

У результаті проведених досліджень впливу норфлораксацину (25 мкг/мл) на розвиток зародків *in vivo* (рис. 3) встановлено гіперболічну залежність між процесами синтезу білка та тривалістю розвитку зародків. Слід зазначити, що наявність в середовищі інкубації фторхінолону протягом першої години розвитку (2 бластомери, 60 хв) вела до зниження інтенсивності біосинтетичних процесів (яку оцінювали по вмісту загального білка в гомогенаті) в середньому на $25,2 \pm 0,6\%$ у порівнянні з контролем, який становив 685,8 мкг/мл (рис. 3). Подібні достовірні зміни виявлено і на 5-й годині розвитку (270 хв, $28,0 \pm 1,3\%$), тоді як на стадії 16 бластомерів (150 хв) та десятого поділу бластомерів (330 хв) зниження вмісту білка у гомогенаті становило від $17,9 \pm 0,2$ до $18,8 \pm 0,2\%$ відповідно. Лише на стадії 64 бластомерів (3,5 годин розвитку) не виявлено досто-

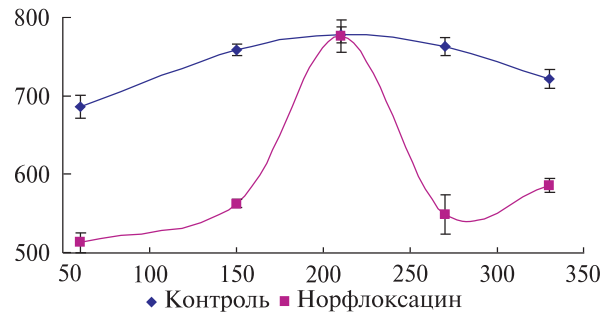


Рис. 3. Зміни загального вмісту білка у гомогенаті зародків в'юна протягом ембріогенезу за дії норфлораксацину (25 мкг/мл): по вертикалі – білок, мкг/мл; по горизонталі – час, хв

вірних змін кількості білка в гомогенаті у порівнянні з контролем. Це можна пояснити тим, що на цій стадії поділів бластомерів закінчується формування бластули і далі відбувається збільшення розмірів ембріональних клітин й формування гастрული, що в свою чергу вимагає підвищення синтезу білкових компонентів. Отримані результати підтверджують припущення про те, що порушення біосинтетичних процесів пов'язані з безпосереднім впливом норфлораксацину на білоксинтезвальні структури бластомерів.

У цитоплазмі зареєстровано невеликі за розміром гранули жовтка (рис. 2, г). У ділянках їх локалізації траплялися мультивезикулярні тільця (МТ, рис. 2, г), які досягали в діаметрі до 1,81 мкм (рис. 2, г). Поверхня МТ нечітка і зруйнована, інколи зливалась з пошкодженими мітохондріями (рис. 2, б). Вважають, що

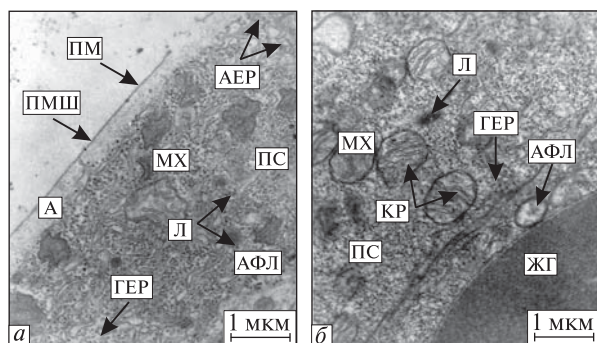


Рис. 4. Ультраструктура зародків в'юна на шостій годині розвитку за умов впливу 5 мкг/мл норфлоксацину. Позначення, як на рис. 2.

збільшення кількості МТ зумовлене підвищенням процесів деструкції та лізису органел.

За присутності в середовищі інкубації 25 мкг/мл норфлоксацину спостерігали більш виражені зміни ультраструктури зародків у порівнянні з контролем [16]. Гіалоплазма бластомерів за таких умов характеризується високою електронною щільністю і відсутністю примембранного електронно-світлого шару цитоплазми. Поверхня бластомерів, однак, залишилася чіткою і становила до 6 нм.

У кортикальних шарах цитоплазми бластомерів знаходяться дезорганізовані канали як АЕР, так і ГЕР (рис. 2, *з*), мітохондрії в стані набряку (рис. 2, *в*) і на різних стадіях пікнозу (рис. 2, *з*). Для перших характерні електронно-світлий матрикс та розпушені кристи. Подекуди такі мітохондрії зливаються і утворюють автофаголізосоми, а зрештою є скупченням ліпопротеїнів (рис. 2, *в*). Мітохондрії в стані пікнозу мають неправильну зірчасту форму, а в їх матриксі проходить ущільнення крист (рис. 4, *а*). Дезорганізований комплекс Гольджі (рис. 2, *в*) характеризується частково зруйнованими ділянками мембран й великими відстанями між його везикулами, що зумовлює порушення метаболічних процесів.

Ультраструктура зародків в'юна на 6-й годині розвитку при дії норфлоксацину. Інкубування зародків протягом 6 год (десятий поділ) в середовищі з додаванням 5 та 25 мкг/мл норфлоксацину веде до ще більш виражених змін ультраструктури бластомерів. Поверхня клітин за таких умов втратила свою хвилястість і перебувала в натягнутому стані (рис. 4, *а*), на певних ділянках спостерігалися значні її розриви.

Втрата хвилястості мембрани й низька електронна щільність цитоплазми свідчать про загальний набряк цих клітин.

За умов впливу норфлоксацину в концентрації 5 мкг/мл, як і при дії бороцину [20], у клітинах виявлено утворення електронно-світлого примембранного шару без клітинних органел. Ширина цього шару у порівнянні з дією антибіотику на першій годині розвитку досягала лише 270 нм (рис. 4, *а*). Товщина новоутвореного примембранного шару пов'язана із здатністю фторхінолонів проникати через цитоплазматичну мембрану (тобто ступенем їх біодоступності), а також тривалістю інкубації.

У кортикальних шарах гіалоплазми бластомерів зустрічаються мітохондрії на різних стадіях пікнозу: від ущільнення крист до утворення коагулятів та преципітатів (на відміну від дії бороцину [20]). У глибоких шарах цитоплазми знаходяться також органели з локальним просвітленням матриксу (рис. 4, *а*). Такі мітохондрії мають розширені кристи та зруйновані зовнішні мітохондріальні мембрани, поруч виявлено автофаголізосоми (рис. 4, *б*).

У ділянках дезорганізованого кортикального шару цитоплазми за умов впливу антибіотику (5 мкг/мл) спостерігається значна гіпертрофія каналів АЕР, ГЕР (рис. 4, *а*), комплексу Гольджі, виявлено первинні та вторинні лізосоми. Внаслідок дезорганізації ГЕР у цитоплазмі й біля примембранного шару відзначено збільшення кількості моносом. Жовткові гранули мають досить високу електронну щільність і подекуди оточені власною суцільною мембраною. У таких шарах цитоплазми зустрічаються ділянки первинного некрозу (рис. 4, *б*).

При додаванні в середовище інкубації 25 мкг/мл фторхінолону спостерігали незворотні ультраструктурні зміни бластомерів. Плазматична мембрана зародкових клітин лише частково зберігала хвилястість, однак втрачала цілісність (рис. 5, *а, б*). Товщина примембранного шару на 6-й годині розвитку значно зменшувалася. На відміну від попередніх досліджень шар характеризувався високою електронною щільністю, не містив органел, але в ньому зустрічались скупчення електронно-щільних агрегатів (рис. 5, *б*).

У безпосередній близькості до поверхні розміщені мітохондрії неправильної зірчастої форми (рис. 5, *б*). У таких мітохондрій зруйновані

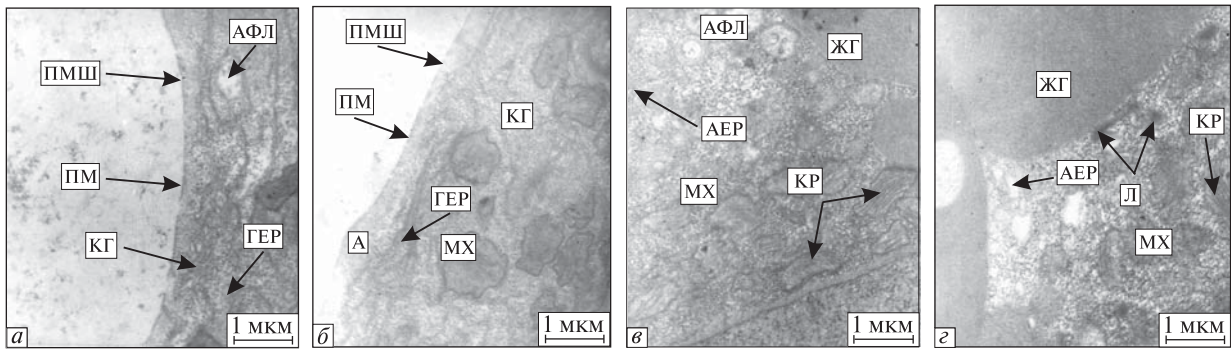


Рис. 5. Ультраструктура зародків в'юна на шостій годині розвитку за умов впливу 25 мкг/мл норфлораксацину. Позначення, як на рис. 2

кристи, матрикс заповнений речовиною високої електронної щільності, однак зовнішні мембрани мітохондрій залишаються суцільними. У більш глибоких шарах цитоплазми зустрічаються повністю дезорганізовані мітохондрії (рис. 5, в), які перетворюються в скупчення ліпопротеїнів (рис. 5, з).

За дії 25 мкг/мл норфлораксацину на стадії десятого поділу бластомерів не відзначено гіпертрофії ГЕР, але в цитоплазмі збільшується кількість моносом (рис. 5, а), що свідчить про руйнування каналів ретикулуму. У цитоплазмі поруч з жовтковими гранулами високої електронної щільності, які оточені власною мембраною, зустрічаються зруйновані канали АЕР і скупчення вторинних лізосом (рис. 5, з). Однак при дії норфлораксацину не виявлено ділянок некрозу, які появлялися на цій стадії розвитку за умов впливу бороцину [20].

На основі наведених результатів можна зробити висновок, що норфлораксацин проявляє ембріотоксичну дію по відношенню до зародків, зумовлює деструктивні зміни бластомерів, які практично стосуються всіх клітинних органел. Слід зазначити, що на відміну від впливу антибіотика бороцину [16, 20] зміни ультраструктури клітин зародків при дії норфлораксацину є більш вираженими, тобто для останнього характерна вища ступінь ембріотоксичності. Незворотні зміни органел на стадії десятого поділу бластомерів, які є наслідком порушення перебігу метаболічних процесів, зрештою ведуть до зупинки поділів бластомерів та загибелі зародків.

SUMMARY. The ultrastructure of embryo cells of the loach (*Misgurnus fossilis* L.) at the stage of the first and the tenth blastomer divisions in the control and under the con-

ditions of fluoroquinolone norfloxacin (5 and 25 mg/ml) influences has been investigated. The effect of this antibiotic has resulted in significant ultrastructural changes of embryo cells, such as hypertrophy of channels of the smooth and rough endoplasmic reticulum, disorganization of mitochondrias and cytoplasm membrane destructions of embryo. It has been established that fluoroquinolone inhibited biosynthetic processes, directly influencing on the blastomer biosynthetic structures. Such results testify a high norfloxacin embryotoxicity.

РЕЗЮМЕ. Приведены результаты исследований ультраструктуры зародышей вьюна на стадиях первого и десятого делений бластомеров в норме и при воздействии антибиотика фторхинолонового ряда – норфлораксацина (5 и 25 мкг/мл). Действие норфлораксацина ведет к изменениям ультраструктуры клеточных органоидов: гипертрофии гранулярного и агранулярного эндоплазматического ретикулума, дезорганизации митохондрий и плазматической мембраны зародышей. Установлено, что фторхинолон ингибирует биосинтетические процессы, непосредственно влияя на биосинтетические структуры бластомеров. Такие изменения органел являются результатом нарушений ассимиляционных процессов, которые обуславливают гибель зародышей, т.е. полученные результаты свидетельствуют о высокой эмбриотоксичности норфлораксацина.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Падейская Е.Н., Яковлев В.П. Антимикробные препараты группы фторхинолонов в клинической практике. – М.: Лагота, 1998. – 351 с.
2. Korobolut N., Drusono G. Pharmacokinetics of quinolone antimicrobial agents. – Washington, 1993. – P. 195–223.
3. Dalhoff A., Shalit I. Immunomodulatory effects of quinolones // Lancet. Infect. Dis. – 2003. – 3, № 6. – P. 359–371.
4. Damagala J.M. Structure-activity and structure-side effect relationships for the quinolones antibacterials // J. Antimicrob. Chemother. – 1994. – 33. – P. 685–708.

5. Hooper D.C. Mode of action of fluoroquinolones // *Drugs*. – 1999. – **58** (2). – P. 6–10.
6. Lipsky B.A., Baker C.A. Fluoroquinolone toxicity profiles: a review focusing on newer agents // *Clin. Infect. Dis.* – 1999. – **28** (2). – P. 352–364.
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 Ю.О., Санагурський Д.І. Вплив антибіотиків класу фторхінолонів на динаміку трансмембранного потенціалу зародків в'юна // *Біологія тварин*. – 2000. – **2**, № 2. – С. 135–137.
9. Целевич Д.І., Мандзинець С.М., Санагурський Д.І. Na^+ , K^+ -АТФ-азна активність мембран зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L. при дії антибіотиків // *Фізіол. журн.* – 2004. – **50**, № 5. – С. 64–68.
10. Целевич М.В., Тарновська А.В., Санагурський Д.І. Дослідження впливу фторхінолону бороцину на розвиток зародків в'юна протягом раннього ембріогенезу. Біохімічний та цитологічний аспекти // *Біологія тварин*. – 2005. – **7**, № 1/2. – С. 143–151.
11. Нейфах А.А. Молекулярная биология процессов развития. – М.: Наука, 1977. – 311 с.
12. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. – М.: Мир, 1975. – 325 с.
13. 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.
14. Lowry O.H., Rosebrough N.G., Farr A.L., Randall R.C. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – **193**, № 1. – P. 265–275.
15. Луцик М.Д., Лукьяненко А.В., Кусень С.И. Метод массового механического удаления оболочек из зародышей вьюна // *Онтогенез*. – 1983. – **14**, № 6. – С. 386–388.
16. Целевич М.В., Кулачковський О.Р., Санагурський Д.І. Особливості ультраструктурних змін зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L. за умов впливу бороцину // *Цитология и генетика*. – 2004. – **38**, № 6. – С. 23–27.
17. Падейская Е.Н. Артротоксичность хинолонов и фторхинолонов в эксперименте: характер поражения и возможный механизм действия // *Антибиотики и химиотерапия*. – 2000. – **45**, № 8. – С. 36–41.
18. 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.
19. Chadially F. Ultrastructural pathology of the cells // Butterworths. – London, 1975. – 543 p.
20. Целевич М.В., Кулачковський О.Р., Косарчин С.В., Санагурський Д.І. Ультраструктура бластомерів зародків в'юна за умов впливу антибіотика бороцину // *Acta Med. Leopoliensia*. – 2005. – **11**, № 3. – С. 161–165.

Надійшла 15.02.07