

UTJECAJ ULTRALJUBIČASTOG ZRAČENJA NA EMBRIONALNI RAZVOJ JEŽINACA

INFLUENCE OF ULTRA-VIOLET RADIATION ON THE EMBRYONIC DEVELOPMENT OF SEA-URCHINS

Stjepan Kečkeš i Zvonimir Pučar

Institut »Ruđer Bošković«, Zagreb i Institut za biologiju mora, Rovinj

Neki organizmi mora služe već odavno kod najrazličitijih bioloških ispitivanja kao odličan materijal. Morski ježinac je jedan od tih klasičnih eksperimentalnih objekata. Njegove gamete su gotovo idealne za proučavanje procesa oplodnje i embrionalnog razvoja zbog relativne jednostavnosti tog procesa i lake pristupačnosti ispitivanju. Kod ispitivanja utjecaja ultraljubičastog zračenja na oplodnju i embrionalni razvoj već su razni autori koristili te procese kod ježinaca (1—6). I nama se on učinio vrlo pogodnim objektom pri pokušaju da se ustanovi ovisnost osjetljivosti tih procesa o količini ultraljubičastih zraka, kojima na njih djelujemo.

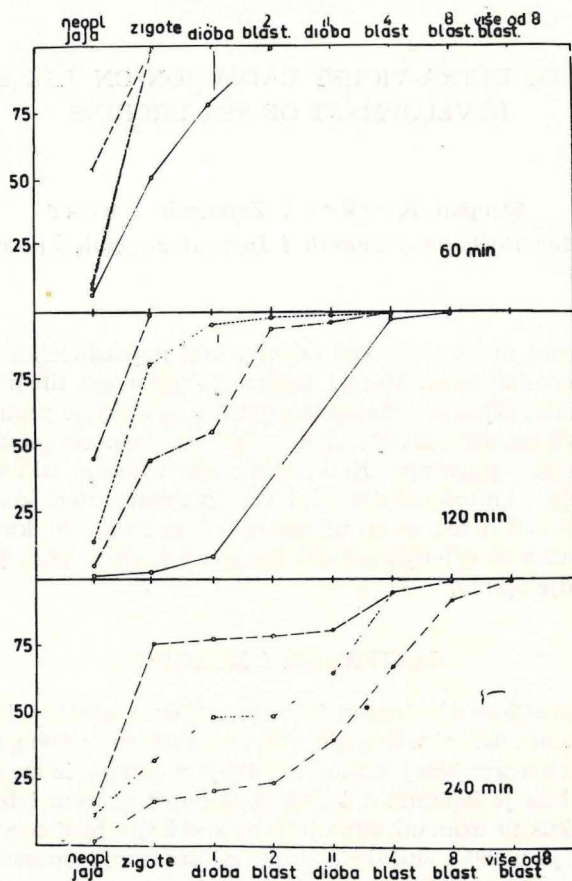
MATERIJAL I METODE

Radili smo sa svježe ulovljenim ježincima (*Paracentrotus lividus* Lam.) koji su do početka pokusa držani u basenima uz protok morske vode. Gamete su dobivene cirkularnim otvaranjem ježinaca i vađenjem gonada iz zrelih jedinki. Prije početka pokusa bila je ispitana oplodna sposobnost gameta i broj oocita među jajašcima. Za pokus su uzimani samo ježinci, kod kojih broj oocita nije premašio 5% i kod kojih je u 90% slučajeva došlo do stvaranja oplodne opne u regularnom roku.

Kao izvor zračenja upotrebljena je snažna ultraljubičasta lampa s maksimumom emisijonog spektra kod 2.537 Å (Mineralight, USA). Energije zračenja u fizikalnim jedinicama iznosile su $2,1 \times 10^3$, $7,0 \times 10^3$ odnosno $16,3 \times 10^3$ erga/cm²/sek. Doza zračenja varirana je pomoću vremena, kroz koje su gamete bile zračene i pomoću njihove udaljenosti od izvora zračenja.

Za ispitivanje ovisnosti efekta zračenja o dozi zračenja zračene su suspenzije gameta u otvorenim plitkim staklenim posudicama. Sloj morske vode, u kojem su se gamete nalazile prilikom zračenja, nije bio deblji od 1/mm. Nakon

određenog vremena poslije zračenja raznospolne gamete bile su pomiješane i na taj način oplodene. Oplodna smjesa je razrijeđena i inkubirana u ultratermostatu kod konstantne temperature. U raznim vremenskim intervalima nakon oplodnje uzimani su uzorci oplodne smjese, fiksirani u formalinu (konačna koncentracija formalina bila je 1.3%) i određivan je u njima postotak pojedinih razvojnih stupnjeva. Paralelno s ozračenim oplodnim smjesama pratila se i kontrolna, nezračena oplodna smjesa.



Sl. 1. Tok embrionalnog razvoja prikazan kao kumulirani % pojedinih razvojnih stupnjeva 60, 120 i 240 minuta nakon oplodnje

Grupe: kontrolna nezračena (—), ozračena sa $2,1 \times 10^3$ erga/cm²/sek (---), ozračena sa $7,0 \times 10^3$ erga/cm²/sek (- - - - -), ozračena sa $16,3 \times 10^3$ erga/cm²/sek (- · - · -). Zračenja su bila jajašca. Trajanje zračenja 5 minuta. Zračenje završeno 10 minuta prije oplodnje. Temperatura tokom pokusa 20°C. U kontrolnoj grupi 240 minuta nakon oplodnje nije bilo razvojnih stupnjeva s manje od 8 blastomera.

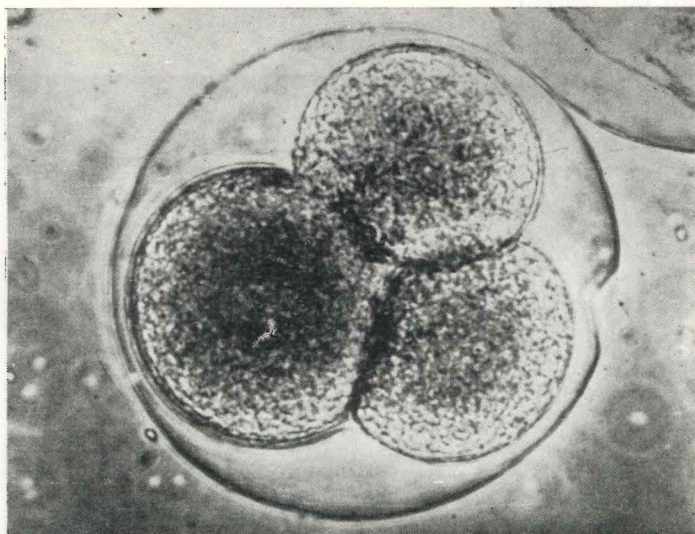
Fig. 1. The progress of the embryonic development shown in a cumulative percentage of various development stages found 60, 120 and 240 minutes after fertilization

REZULTATI

Detaljan prikaz jednog karakterističnog pokusa u kojem se ispitivala ovisnost usporenja toka embrionalnog razvoja o dozi ultraljubičastih zraka, vidljiv je iz slike 1.

Iz prikazanih rezultata vidi se da postoji proporcionalnost između primljene doze zračenja i usporenja embrionalnog razvoja. Karakteristično je i znatno produženje vremena potrebnog za oplodnju, što se dobro može uočiti uspoređivanjem početnih tačaka krivulja dobivenih za 60. i 120. minutu nakon što su gamete pomiješane.

Kod grupa zračenih sa $7,0 \times 10^3$ i $16,3 \times 10^3$ erga/cm²/sek primijećeno je 240 minuta nakon oplodnje manji broj (2—5%) citoliziranih razvojnih stupnjeva a u grupi zračenju sa $16,3 \times 10^3$ erga/cm²/sek pojavio se i manji broj atipičnih dioba (slika 2 i 3). Nepravilnosti u embrionalnom razvoju naročito su uočljive u grupi zračenju sa $16,3 \times 10^3$ erga/cm²/sek nakon 480 minuta, kada je oko 90% svih razvojnih stupnjeva citolizirano, a preostali pokazuju atipične diobe.



Sl. 2. Atipična dioba pri kojoj su stvorene samo tri blastomere

Fig. 2. Atypical division where only 3 blastomeres were formed

Oplodena jaja u svim ozračenim grupama imaju tanju oplodnu opnu, a često se oplodna opna stvara samo na jednom dijelu jajne površine. Jačina, odnosno učestalost tih efekata proporcionalna je primljenoj dozi ultraljubičastih zraka.

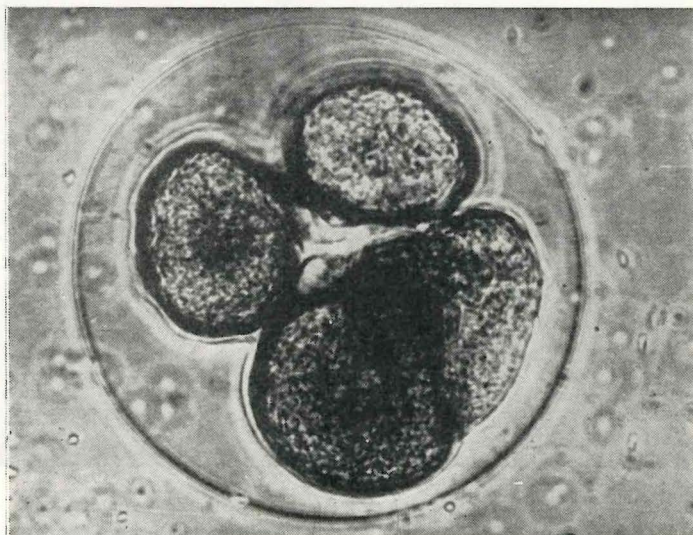
Osim opisanog pokusa u istom smislu dalo je rezultate još 6 daljnjih pokusa.

DISKUSIJA

Pretpostavljamo da su opisani efekti u prvom redu posljedica oštećenja jezgara jajašaca. S obzirom na upotrebljenu valnu dužinu ultraljubičastih zraka to se i moglo očekivati. Naši pokusi u kojima smo ozračivali spermije umjesto jajašaca pokazali su, da ista doza zračenja ima isti efekat bez obzira, da li su ozračeni samo spermiji ili samo jajašca. Kako kod spermija praktični ne dolazi do ozračivanja citoplazme već samo jezgre, može se smatrati, da upotrebljene doze zračenja u znatnijoj mjeri ne djeluju na usporenje embrionalnog razvoja, do stupnja koji smo mi registrirali, preko oštećenja neke komponente u citoplazmi.

Oštećenju citoplazme može se pripisati jednim dijelom citoliza, koja se javlja u grupi koja je najviše ozračena nakon 240 minuta. Citoliza ima doduše i u pokusima kada su zračeni spermiji, ali u puno manjoj mjeri.

Specifično djelovanje zračenja na citoplazmu očituje se kao djelomično stvaranje oplodne opne, vjerojatno samo iznad onog mjesta jajne površine, gdje je spermij ušao. Osim toga kod ozračenih jajašaca je debljina oplodne opne za oko 30% manja od njene normalne debljine. Ova dva fenomena nalazili smo samo kada smo radili sa ozračenim jajašcima, a nikada ih nismo imali kada su samo spermiji bili zračeni.



Sl. 3. Cetverostanični razvojni stupanj s uznapredovalom citolizom
Fig. 3. Quadricellular development stage with and advanced cytolysis

ZAKLJUČAK

Doze ultraljubičastih zraka od $2.537 \text{ \AA}$ u rasponu od 6,3 do $48,9 \times 10^3 \text{ erga/cm}^2$ pri opisanim eksperimentalnim uslovima usporuju oplodnju i embrionalni razvoj, sprečavaju stvaranje normalne oplodne opne i izazivlju atipičnu diobu i citolizu.

Usporenje oplodnje i embrionalnog razvoja, atipične diobe i citolize najvjerovatnije su posljedica djelovanja zračenja na jezgre, dok su smetnje u stvaranju normalne oplodne opne vjerovatno posljedica oštećenja citoplazme.

BIBLIOGRAFIJA

- J. Loeb: Activation of the unfertilized egg by ultraviolet rays. *Science*, 40:680, 1914.
- L. V. Heilbrun; R. A. Young: The action of ultra-violet rays on Arbacia egg protoplasm. *Physiol. Zool.*, 3:330, 1930.
- E. B. Harvey; A. Hollaender: Parthenogenetic development of the eggs and egg fraction of Arbacia punctulata caused by monochromatic ultraviolet radiation. *Biol. Bull.*, 75:258, 1938.
- A. C. Giese: The effects of ultraviolet radiation of various wavelengths upon cleavage of sea urchin eggs. *Biol. Bull.*, 75:238, 1938.
- H. F. Blum, J. S. Cook, G. M. Loos: A comparison of five effects of UV light on the Arbacia egg. *J. Gen. Physiol.*, 37:313, 1954.
- H. F. Blum, E. F. Kauzmann, G. B. Chapman: Ultraviolet light and the mitotic cycle in the sea urchin's egg. *J. Gen. Physiol.*, 37:325, 1954.

INFLUENCE OF ULTRA-VIOLET RADIATION ON THE EMBRYONIC DEVELOPMENT OF SEA-URCHINS

Stjepan Kečkeš and Zvonimir Pučar

SUMMARY

Experiments with sea-urchin eggs and sperm exposed to ultra-violet radiation are described. The 2,537 Å radiation ranging from 6,3 to $48,9 \times 10^5$ ergs/cm², resulted in retardation of both the fertilization process and the embryonic development, while the creation of a normal fertilization membrane was prevented and atypical division as well as cytolysis were caused.

The retardation of fertilization and embryonic development, the atypical division and cytolysis have most probably been consequences of radiation effects on the nuclei while the interference with the creation of a normal fertilization membrane probably resulted from a damage to cytoplasm.