

І. Л. Якименко, О. С. Цибулін

Регуляторна дія низькоінтенсивного видимого світла на сомітогенез птиці*(Представлено академіком НАН України М. Є. Кучеренком)*

We research the influence of monochromatic red ($\lambda_{\max} = 630 \text{ nm}$), blue ($\lambda_{\max} = 470 \text{ nm}$), and green ($\lambda_{\max} = 520 \text{ nm}$) light of laser light-emitting diodes on the early embryo development of Japanese Quail by the number of the differentiated pairs of somites which were generated by the 38-th hour of incubation. It is shown that red and blue lights at the intensity of a light beam of 0.1 mW/cm^2 increases the number of the differentiated pairs of somites by 20.43% (and 15.18%, respectively) at the optimum temperature of incubation and by 27.62% (and 38.48%, respectively) at a lower temperature as compared with control group. A significant reduction of the number of the differentiated pairs of somites by 24.61% (31.26%) at the optimum temperature of incubation was observed at the intensity of red and blue lights of 1 mW/cm^2 . Green light at a similar intensity did not influence somitogenesis.

Виражені фототерапевтичні ефекти монохроматичного низькоінтенсивного видимого світла виявлені в багатьох областях медичної практики: дерматології, оториноларингології, кардіології, стоматології, неврології та ін. Найбільш поширеними джерелами монохроматичного світла червоного діапазону, що використовуються в біології та медицині, є гелій-неонові ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$) лазери та, в останній час, напівпровідникові світлодіоди. Це обумовлено численними експериментальними даними щодо впливу монохроматичного світла на біологічні об'єкти та виділенням серед інших довжин хвиль червоного діапазону, який має найбільш виражені біологічні ефекти [1, 2].

Широта терапевтичних ефектів монохроматичного видимого світла ставить питання про механізми регуляторного впливу даного фактора на метаболічні процеси тваринного організму. У ряді досліджень [3, 4] показана здатність ключових ферментів антиоксидантного захисту (супероксиддисмутази, каталази та церулоплазміну) до фотоактивації під впливом червоного лазерного світла. Встановлено виражений вплив монохроматичного світла на активність цитохром-*c*-оксидази [5] та вміст окисненої форми цитохрому P-450 у печінці птиці [6], що свідчить про причетність гідроксильоючої системи ендоплазматичного ретикула та енергетичної системи мітохондрій до фотобіологічних ефектів монохроматичного світла.

Показовими виявились експериментальні дослідження щодо вивчення впливу червоного лазерного світла на ізольовану нервову тканину [7]. Встановлено, що при застосуванні лазерного світла відбувається прискорення на 85% росту аксонів нервових клітин. Також відмічено, що, застосовуючи лазерний промінь, можна координувати напрямок росту нервового волокна.

У досліді на щурах [8], у яких внаслідок модельного отруєння метиловим спиртом відбувалось пошкодження сітківки ока та зорового нерва, при дії монохроматичного червоного світла на окремі ділянки тіла тварин відмічали відновлення зору на 95%. Показано, що

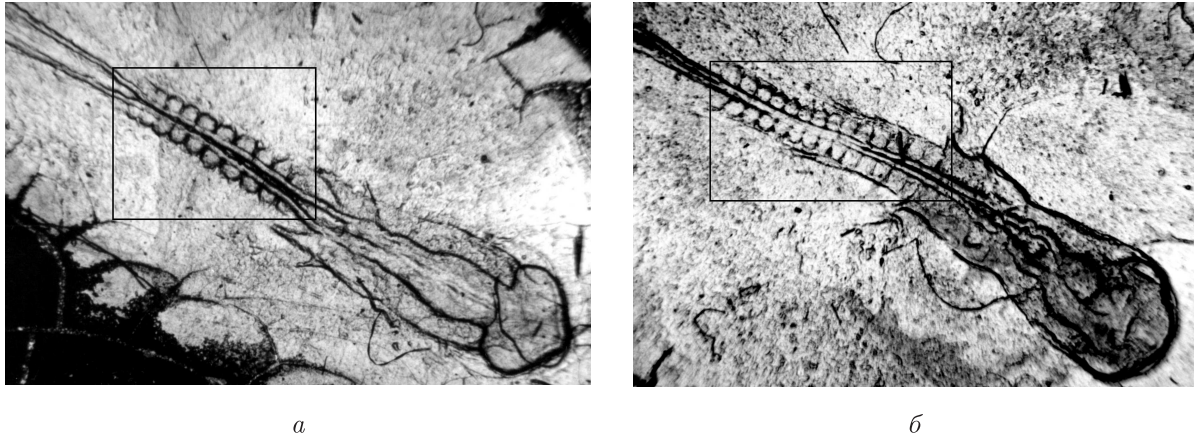


Рис. 1. Мікрофото (збільшення 8 x 3) ембріона перепела японського (температура інкубації 38,5 °С):
a — ембріон контрольної групи, 10 пар сомітів; *б* — ембріон дослідної групи, 14 пар сомітів (опромінення монохроматичним червоним світлом інтенсивністю 0,1 мВт/см²)

в терапевтичному ефекті червоного світла безпосередню участь бере цитохромоксидазний комплекс мітохондрій.

Існують дані про доцільність опромінення інкубаційного яйця сільськогосподарської птиці монохроматичним світлом. У роботі [9] показано зменшення кількості загиблих на перших стадіях розвитку ембріонів, які піддавались опроміненню червоним лазерним світлом. При дії червоного світла на інкубаційне яйце перепела до закладання на інкубацію відмічена [10] стимуляція раннього ембріонального розвитку та вірогідне збільшення маси ембріонів. При вивченні впливу червоного лазерного світла на ембріогенез перепелів при одноразовому опроміненні ембріонів відзначено [11] стимулюючий ефект певних його доз на інтенсивність розвитку ембріона. Деякі дози опромінення практично не виявляли ефекту впливу. Не відмічалось негативного впливу монохроматичного низькоінтенсивного світла на ембріональний розвиток пташиного ембріона.

Мета нашої роботи — на моделі сомітогенезу оцінити можливі регуляторні (як позитивні, так і негативні) ефекти монохроматичного видимого світла нетеплових інтенсивностей різного діапазону щодо інтенсивності ембріогенезу птиці.

Досліди проводили на свіжому інкубаційному яйці перепелів віварію Білоцерківського державного аграрного університету. Для дослідів формували групи-аналоги інкубаційного яйця по 10 шт. у кожній. Опромінення інкубаційного яйця здійснювали за допомогою світлодіодів L7113PDC/Н ($\lambda_{\max} = 630$ нм), L7143PDC/Н ($\lambda_{\max} = 470$ нм), L7143VGCH ($\lambda_{\max} = 520$ нм) протягом 60 с у цілковитій темряві триразово у перші доби інкубації. Контрольні групи яєць не опромінювали. Для оцінки впливу опромінення на ранній ембріональний розвиток перепела використовували морфометричний метод підрахунку диференційованих пар сомітів, що сформувались на 38-му год інкубації. Препарати ембріонів готували за методикою зняття бластодиска з використанням паперових кілець [12]. Інкубацію яєць проводили при температурах 38,5 °С, що є, за нашими даними, оптимальною для розвитку перепелиного ембріона, та 36,5 °С, при якій ембріональний розвиток уповільнюється.

На рис. 1 показано мікрофото ембріонів перепела японського контрольної та дослідної груп (виділені соміти ембріонів, кількість яких вказує на інтенсивність розвитку ембріо-

на) на 38-му год інкубації. На цю годину інкубації при оптимальній температурі кількість диференційованих пар сомітів у контрольній групі становила $10,33 \pm 0,56$.

Для оцінки дії червоного ($\lambda_{\max} = 630$ нм) світла на розвиток перепелиного ембріона нами було вибрано чотири величини інтенсивності світлового потоку: 0,01; 0,1; 1 та 20 мВт/см², яку змінювали, варіюючи площину світлової плями після розфокусування лінзою. При інтенсивності світлового потоку 0,1 мВт/см² кількість сомітів вірогідно ($p < 0,01$) збільшилась на 20,43% порівняно з контролем (рис. 2, а). Підвищення інтенсивності світла до 1 мВт/см² призвело до пригнічення ембріонального розвитку, про що свідчить вірогідне ($p < 0,01$) зменшення кількості диференційованих пар сомітів на 24,61% порівняно з контролем. При інтенсивності світлового потоку 0,01 та 20 мВт/см² вірогідного впливу опромінення на сомітогенез не встановлено (див. рис. 2, а).

Зниження температури інкубації до 36,5 °С уповільнювало розвиток перепелиного ембріона, на що вказує зменшення кількості диференційованих пар сомітів, що сформувались на 38-му год інкубації, у контрольній групі до $6,88 \pm 0,44$ (див. рис. 2, б). При зниженій температурі інкубації червоне світло інтенсивністю 0,1 мВт/см² також стимулювало сомітогенез: кількість сомітів вірогідно ($p < 0,001$) збільшилась на 27,62% порівняно з контрольною групою (див. рис. 2, б). За дії червоного світла інтенсивністю 0,01 мВт/см² кількість диференційованих пар сомітів збільшилась на 9,88%, а при 1 мВт/см² — знизилась на 9,55%. Різниця в обох групах не була вірогідною.

Таким чином, нами встановлено, що червоне світло інтенсивністю 0,1 мВт/см² стимулює сомітогенез як при оптимальній, так і при зниженій температурі інкубації. Вірогідне пригнічення темпів сомітогенезу відмічається при інтенсивності світла 1 мВт/см² тільки при оптимальній температурі інкубації.

Аналогічні дослідження нами проведені щодо впливу синього та зеленого світла на сомітогенез перепела при оптимальній та зниженій температурах інкубації. Інтенсивність світлового потоку становила 0,1 та 1 мВт/см² — значення, при яких виявлялась стимуляція та пригнічення сомітогенезу за дії червоного світла.

При оптимальній температурі інкубації синє світло, як і червоне, виявляло стимулюючу або пригнічуючу дію на ембріональний розвиток перепела залежно від інтенсивності випромінювання. Так, при інтенсивності світлового потоку 0,1 мВт/см² кількість диференційованих пар сомітів вірогідно збільшувалась на 15,18% ($p < 0,01$), а при інтенсивності 1 мВт/см² — вірогідно зменшувалась на 31,26% ($p < 0,001$) порівняно з контролем — $11,0 \pm 0,31$ (див. рис. 2, в).

При зниженій температурі інкубації синє світло інтенсивністю 0,1 мВт/см² призводило до вірогідного збільшення кількості сомітів на 38,48% порівняно з контролем — $6,8 \pm 0,37$ (див. рис. 2, г). Інтенсивність світлового потоку 1 мВт/см² практично не впливала на сомітогенез.

Звертає на себе увагу те, що в серіях дослідів як з червоним, так і з синім світлом зменшення інтенсивності сомітогенезу за рахунок зниженої температури інкубації виявляло більш виражені стимулюючі ефекти опромінювання та нівелювало пригнічуючі ефекти останнього на фоні відповідного контролю.

Встановлений вплив на сомітогенез червоного та синього світла інтенсивністю 0,1 та 1 мВт/см² не був виявлений у дослідях з монохроматичним зеленим світлом світлодіода. Обидві величини інтенсивності світлового потоку практично не впливали на ранній ембріональний розвиток птиці як при оптимальній, так і при зниженій температурі інкубації (див. рис. 2, д, е).

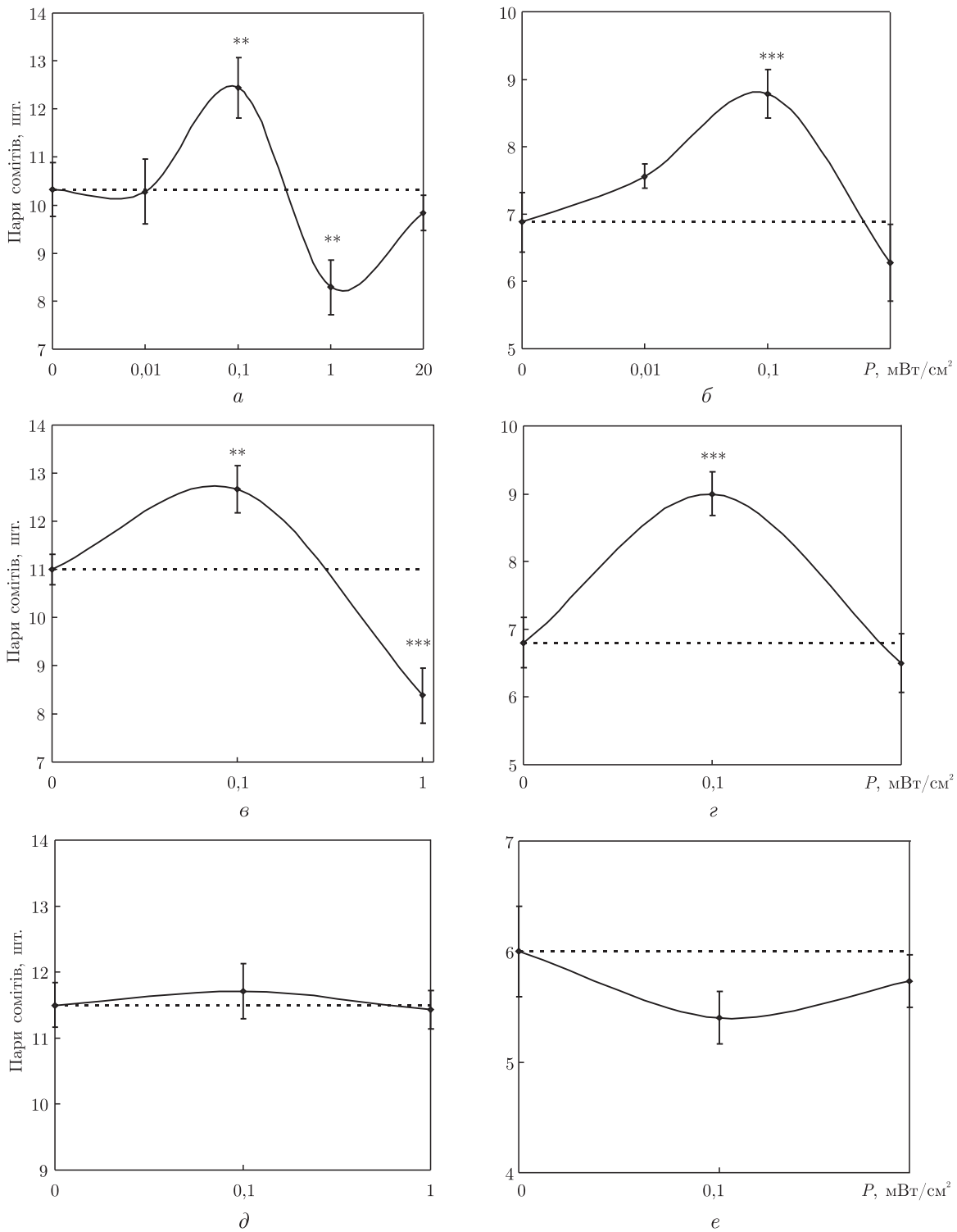


Рис. 2. Вплив триразового опромінення інкубаційного перепелиного яйця монохроматичним червоним, $\lambda = 630 \text{ нм}$ (а, б) синім, $\lambda = 470 \text{ нм}$ (в, г) та зеленим, $\lambda = 520 \text{ нм}$ (д, е) світлом на кількість диференційованих пар сомітів ембріонів на 38-му год інкубації при $38,5^\circ\text{C}$ (а, в, д) та $36,5^\circ\text{C}$ (б, г, е) ($n = 10$; $M \pm m$).
 ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$ порівняно з контролем

Таким чином, виявлено вірогідний стимулюючий (при інтенсивності світлового потоку $0,1 \text{ мВт/см}^2$) та пригнічуючий (1 мВт/см^2) вплив на ембріональний розвиток перепела червоного та синього світла і відсутність такого впливу для зеленого світла.

Встановлену залежність ефектів опромінення від функціонального стану об'єкта можна оцінювати як нормалізуючий вплив останнього. Раніше нами [10] було виявлено, що ефект опромінення інкубаційного яйця птиці червоном лазерним світлом істотно залежав від інкубаційних якостей яйця — коефіцієнт кореляції між виведенням у контролі та підвищенням виведення в опроміненіх групах становив $r = -0,98$ ($p < 0,001$). Тобто чим нижчою була вихідна інкубаційна якість яйця, тим більш вираженим був ефект опромінення. Подібні закономірності біологічної дії червоного лазерного світла виявлені рядом дослідників і в роботах з практичної фототерапії [13, 14]. Разом з цим у літературі практично не зустрічається відомостей, що вказують на вірогідні пригнічуючі (гальмуючі) ефекти низькоінтенсивного монохроматичного світла відносно стану тваринних організмів, за винятком даних щодо тривалого перебування організму в монохроматичному світлі [15]. При цьому звертає на себе увагу факт, що застосовані нами потужності випромінювання, які виявляли виражений гальмуючий ефект на інтенсивність сомітогенезу птиці (1 мВт/см^2), далекі від теплових і навіть нижчі за ті, що зазвичай використовуються в практиці фототерапії. Очевидно, це може вказувати на те, що до регуляторних ефектів монохроматичного (червоного та синього) світла причетні метаболічні системи ембріона, які тісно пов'язані з регуляцією темпів ембріогенезу. Безумовно, до цих систем належать антиоксидантна, енергетична, гідроксилююча клітинні системи, які, як було відмічено раніше, виявляють свою причетність до біологічних ефектів монохроматичного видимого світла нетеплової дії на тваринний організм.

1. Кару Т. Й. Клеточные механизмы низкоинтенсивной лазерной терапии // Успехи соврем. биологии. – 2001. – **121**, № 1. – С. 110–120.
2. Самойлов Н. Г. Взгляд на механизм действия лазерного излучения на биологические объекты. – Харьков, 1998. – 23 с.
3. Якименко І. Л., Сидорик Є. П. Дія низькоінтенсивного лазерного випромінювання на перекисне окиснення ліпідів та активність антиоксидантних ферментних систем в організмі птиці // Доп. НАН України. – 2000. – № 8. – С. 175–179.
4. Артюхов В. Г., Башарина О. В. Действие низкоинтенсивного лазерного (632, 8 нм) и ультрафиолетового излучений на спектральные свойства и функциональную активность церулоплазмينا человека // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2002. – **42**, № 2. – С. 173–178.
5. Karu T. I., Pyatibrat L. V. Absorption measurements of a cell monolayer relevant to phototherapy: Reduction of cytochrome c oxidase under near IR radiation // J. Photochem. Photobiol. B. – 2005. – No 25. – P. 205–211.
6. Якименко І. Л., Сидорик Є. П. Чувствительность системы цитохрома Р-450 печени птицы к действию красного лазерного света // Доп. НАН України. – 2000. – № 7. – С. 178–182.
7. Ehrlicher A. Guiding neuronal growth with light // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2002. – **99**. – P. 16024–16028.
8. Eells J. T., Henry M. M. Therapeutic photobiomodulation for methanol-induced retinal toxicity // Ibid. – 2003. – **6**. – P. 3439–3444.
9. Yakimenko I., Besulin V., Testik A. The effects of low intensity red laser irradiation on hatching eggs in chicken and quail // Poult. Sci. – 2002. – **1**. – P. 6–8.
10. Якименко І. Л. Вплив червоного лазерного світла на ембріональний розвиток та стан молодняка перепела японського // Доп. НАН України. – 2001. – № 5. – С. 168–171.
11. Мельник М. А., Якименко І. Л. Вплив лазерного випромінювання на ранній ембріональний розвиток перепела японського // Наук. вісн. НАУ. – 2004. – № 78. – С. 129–134.
12. Пат. 39619А Україна, 7 А01К 45/00. Спосіб оцінки ефективності низькоінтенсивного лазерного випромінювання / М. А. Мельник, І. Л. Якименко. – № 2000116330; Заявл. 09.11.2000; Опубл. 15.06.2001, Бюл. № 5. – 3 с.

13. *Bensadoun R. J., Franquin J. C., Ciais G.* Low-energy He/Ne laser in the prevention of radiation-induced mucositis. A multicenter phase III randomized study in patients with head and neck cancer // *Support Care Cancer*. – 1999. – No 7(4). – P. 244–252.
14. *Самойлов Н. Г.* Современное состояние проблемы комбинированного влияния на организм ионизирующего и лазерного излучений // *Фотобиология и фотомедицина*. – 1998. – № 1. – С. 89–95.
15. *Казначеев С. В., Молчанова Л. В., Лазаренко П. В.* Влияние видимого света на биохимические и физиологические параметры животного // *Биол. науки*. – 1983. – № 11. – С. 18–23.

*Білоцерківський державний
аграрний університет*

Надійшло до редакції 16.06.2006