

ДІЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОЛОГІЧНІ ОБ'ЄКТИ

УДК 597.551.2-131+621.384

**МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ЗАРОДКІВ ТА ЛИЧИНОК В'ЮНА
MISGURNUS FOSSILIS L. ЗА ДІЇ СВІТЛОДІОДІВ ІЗ СИНІМ ТИПОМ СВІТЛА****О. М. Семочко, М. В. Бура, С. М. Мандзинець, Я. П. Ференсович, О. І. Білий,
Д. І. Санагурський***Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, 79005, Львів, Україна,
e-mail: olena-yu@ukr.net*

Надійшла до редакції 18 грудня 2010 г.

Прийнята 30 січня 2010 г.

Особливістю біологічної дії електромагнітного випромінювання оптичного діапазону є яскраво виражена залежність біологічного ефекту від довжини хвилі, змінюючи яку можна вибірково запускати ті чи інші фотобіологічні процеси. У роботі досліджено вплив монохроматичного видимого світла на розвиток зародків в'юна (*Misgurnus fossilis L.*) протягом раннього ембріогенезу. Встановлено, що низькоінтенсивне світло суттєво гальмує морфологічний розвиток зародків упродовж синхронних поділів бластомерів. Виявлено значний вплив синього світла на відсоток виживання опромінених зародків.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: світлодіод, синє світло, зародки в'юна, морфологія, ембріогенез, поділ бластомерів.

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЗАРОДЫШЕЙ И ЛИЧИНОК ВЬЮНА
MISGURNUS FOSSILIS L. ПОД ДЕЙСТВИЕМ СВЕТОДИОДОВ С СИНИМ ТИПОМ СВЕТА****О. М. Семочко, М. В. Бура, С. М. Мандзинець, Я. П. Ференсович, О. І. Білий, Д. І.
Санагурський***Львовский национальный университет имени Ивана Франко,
ул. Грушевского 4, 79005, Львов, Украина
e-mail: olena-yu@ukr.net*

Исследовано влияние монохроматического видимого света на развитие зародышей вьюна (*Misgurnus fossilis L.*) на протяжении раннего эмбриогенеза. Показано, что низкоинтенсивный синий свет существенно тормозит морфологическое развитие зародышей в течение синхронных делений бластомеров. Установлено существенное влияние синего света на процент выживаемости облученных зародышей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: светодиод, синий свет, зародыши вьюна, морфология, эмбриогенез, деление бластомеров.

**MORPHOLOGICAL CHANGES LOACH EMBRYOS AND LARVAE MISGURNUS
FOSSILIS L. FOR ACTION WITH LED BLUE TYPE LIGHT****O. Semochko, M. Bura, S. Mandzynets, Y. Ferensovich, O. Bilyj, D. Sanagurski***Ivan Franko National University of Lviv, 4 Hrushevsky st., 79005, Lviv, Ukraine**e-mail: olena-yu@ukr.net*

The effect of monochromatic visible light on the development of embryos loach (*Misgurnus fossilis L.*) during early embryogenesis. It was shown that of low blue light significantly inhibits morphological development of embryos during synchronous division of the blastomers. Found significant effect of blue light on the survival rate of irradiated embryos.

KEY WORDS: light diod, blue light, loach embryo, morphology, embryogenesis, division of blastomers.

Останні роки з метою лікування різних патологічних станів широко застосовується фотодинамічна терапія, в основу якої покладено використання монохроматичного світлового випромінювання [1], зокрема, у багатьох областях медичної практики. В оториноларингології, стоматології, дерматології, кардіології, неврології та ін. виявлені фототерапевтичні ефекти низькоінтенсивного видимого світла [2].

© Семочко О. М., Бура М. В., Мандзинець С. М., Ференсович Я. П., Білий О. І., Санагурський Д. І., 2010

Найбільш широко використовується потужне лазерне випромінювання, зокрема гелій-неонові ($\lambda=632,8$ нм) лазери. Встановлено, що ключові ферменти антиоксидантного захисту здатні до фотоактивації під впливом червоного лазерного світла [3,4]. У ряді досліджень підтверджено доцільність опромінення різноманітних об'єктів монохроматичним світлом [5]. Показано зменшення кількості загиблих на перших стадіях розвитку ембріонів птиці, які піддавались опроміненню червоним лазерним світлом [6]. Встановлено, що червоне та синє світло, отримане з допомогою світлодіодів, за певної інтенсивності виявляє стимулюючу або пригнічуючу дію на соматогенез і ембріогенез перепела [2].

LED – терапія із застосуванням світлодіодів, сприяє прискоренню природного загоєння ран і швидкому поверненню організму до попередньої активності [7]. У роботі А. Lowe [8] вивчено стимулюючий вплив фототерапії на загоєння механічних ран у мишей [9]. При застосуванні червоного лазерного світла відбувається суттєве прискорення росту аксонів нервових клітин, а також координація напрямку росту нервового волокна [10]. Вчені відзначають стимулюючий ефект певних доз червоного лазерного світла на ембріогенез перепелів [11].

У фотодинамічній терапії із метою лікування дерматологічного захворювання акне у людей комбіновано застосовують світлодіоди із синім та червоним типом світла [12, 13, 14]. Опромінення синім світлом піддослідних тварин із захворюванням меланоми органу зору сприяє сповільненню прогресу захворювання [15]. Вченими описана [16] ефективність фотомодуляції за допомогою світлодіодного приладу для запобігання виникнення радіодерматитів при лікуванні раку молочної залози. На практиці синє світло, отримане з допомогою світлодіодів, широко використовується у терапії новонароджених із захворюванням жовтухи [17, 18].

Для оцінки лікувального ефекту важливо знайти такі чутливі тести, котрі дозволять з високою точністю встановити ступінь ефекту впливу лікувального агента (хіміотерапії чи лазерного випромінювання). Одним з таких чутливих тестів, які відображають фізіологічний стан клітини як в нормальних умовах, так і в результаті впливу різноманітних фармакологічних [19], фізичних та хімічних агентів [20, 21], є розвиток зародків в'юна. Тому мета роботи полягала у дослідженні характеру змін морфології зародків в'юна за дії світлодіодів із синім типом світла упродовж 5 хв після запліднення.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Об'єктом досліджень були зародки та личинки в'юна (*Misgurnus fossilis L.*).

Яйцеклітини одержували і запліднювали за Нейфахом А. А. [22]. Овуляцію стимулювали внутрішньом'язовим уведенням 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. Через 5-10 хв після запліднення зиготи відмивали та інкубували при температурі 20-22° С.

Зародки та личинки в'юна в умовах контролю інкубували у фізіологічному розчині Гольтфретера, в умовах досліду – зародки опромінювали синім світлодіодом «AVAGO» ASMT M 600 - NAE00 PBF ($\lambda = 460$ нм) потужністю 1 Вт і рефлектором «Fraen» - FC-M2-XR79-OR для фокусування випромінювання у площині одразу після запліднення протягом 5 хв. Спостереження за зародками й личинками здійснювали за допомогою бінокулярного мікроскопа МБС-9 з фотографічною приставкою.

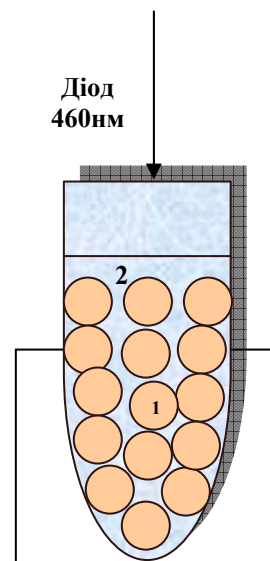


Рис. 1. Схема опромінення зародків в'юна в розчині світлодіодом: 1 – зародки, 2 – пробірка з фізіологічним розчином.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

У ході проведеного спостереження були виявлені морфологічні зміни у зародків та личинок в'юна, що піддавалися впливу випромінювання світлодіода із синім типом світла, у порівнянні з контрольними тваринами.

У зародків в'юна, що розвивались за нормальних умов у середовищі Гольтфретера, після запліднення жовткова оболонка відділялась від поверхні ядра з утворенням перивітелінового простору, відбувалось формування цитоплазматичного горбика. Через годину розвитку відбувався поділ на два бластомери, через 1,5 години – на чотири бластомери і т.д. Стадії розвитку визначали по таблицях нормального розвитку в'юна [23].

Зміни морфології личинок після дії синього світла спостерігали вже на стадії 8 поділу (рис. 2, А-Б). Для опромінених зародків на цій стадії характерними були руйнування плазматичної мембрани та вихід жовтка у перивітеліновий простір, на відміну від зародків контролю [23], у яких на цьому етапі починалось формування морули, розміщення бластомерів у декілька шарів, з утворенням шапочки, що супроводжувалось десинхронізацією поділів ядра.

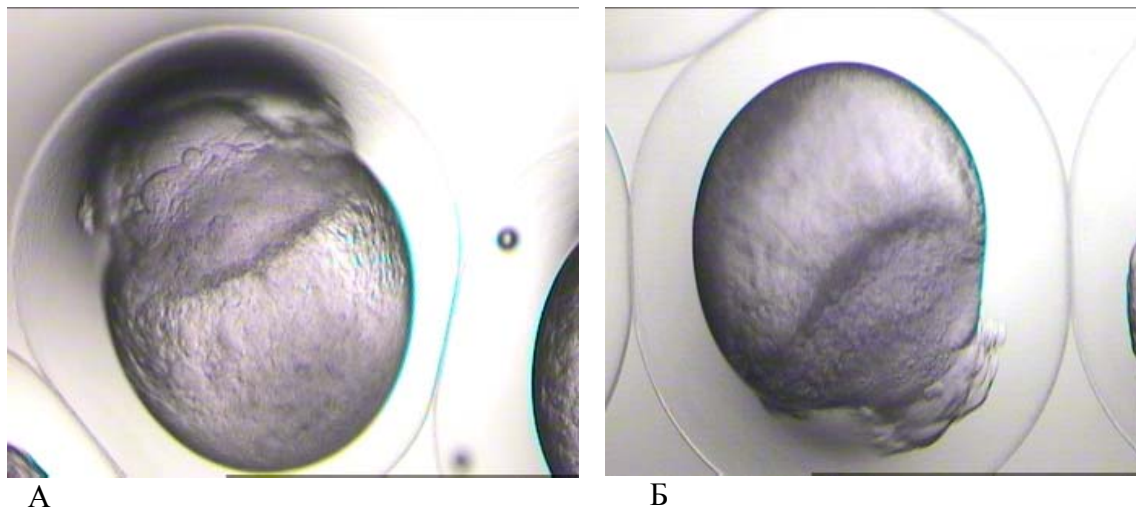


Рис. 2. Розвиток зародка на стадії 7 поділу, після опромінення синім світлом.

Процес опромінення синім світлом зародків після запліднення викликає суттєві порушення їх нормального розвитку, які проявляються і на першу добу розвитку (рис. 3, А-Б). У опроміненних зародків ще не завершився процес обростання жовтка бластодермою, не має характерного для даного періоду формування сомітів та закладання щільних зачатків органів зору. У зародків контролю вже спостерігали закладання хорди, нервової трубки, хвостового та головного відділів.

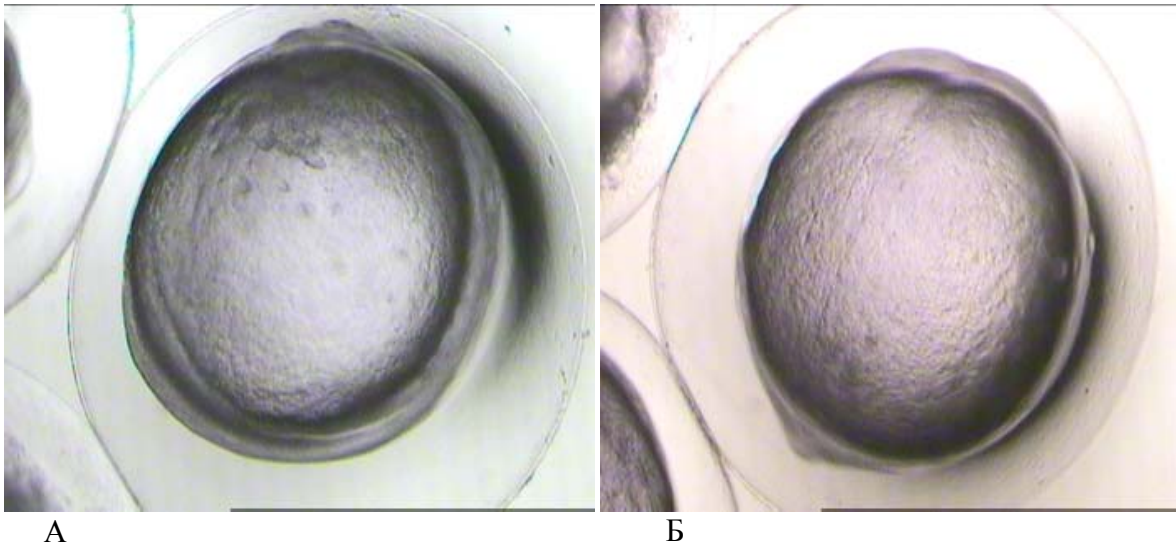


Рис. 3. Розвиток зародка в'юна на першу добу після опромінення синім світлом

На початку другої доби розвитку в'юнів відмічено суттєву затримку росту досліджуваних личинок (рис. 4, А-В). Розвиток даних зародків відповідає зародкам контролю на першу добу, у них тільки починається формування сомітів, тоді як на другу добу у зародків контролю сформовані головна і хвостова частини, вони готові до вилуплення, у них утворився орган приклеювання, повністю завершилось формування очних бокалів, почалась пігментація очей. Зародки контролю енергійно рухаються всередині оболонок, котрі виглядають дещо ослабленими.

Морфологічні відхилення у розвитку опроміненних личинок спостерігались і на стадії вилуплення (рис. 5, А-В). На третю добу спостерігали затримку процесу вилуплення зародків, у більшості яких погано розвинута хвостова частина, у поодиноких випадках спостерігали їх вилуплення із млявою активністю, тоді як зародки контролю, що розвивались за нормальних умов, були рухливими, з подовгастою формою тіла, розвиненими плавцями, мали зачатки спіракулярної і зябрової щілин і виражену пігментацію. Для них характерна наявність досить великого зачатку грудного плавника.

Такі аномалії спостерігалися приблизно у 82% зародків, опроміненних протягом 5 хв після запліднення, синім світлом. Решта тварин, в яких не було відмічено яскраво виражених аномалій розвитку, також були малорухливими. На четверту добу досліджувані зародки загинули.

Опромінення синім світлом викликає не лише затримку морфологічного розвитку, а і суттєво знижує тривалість життя зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L.

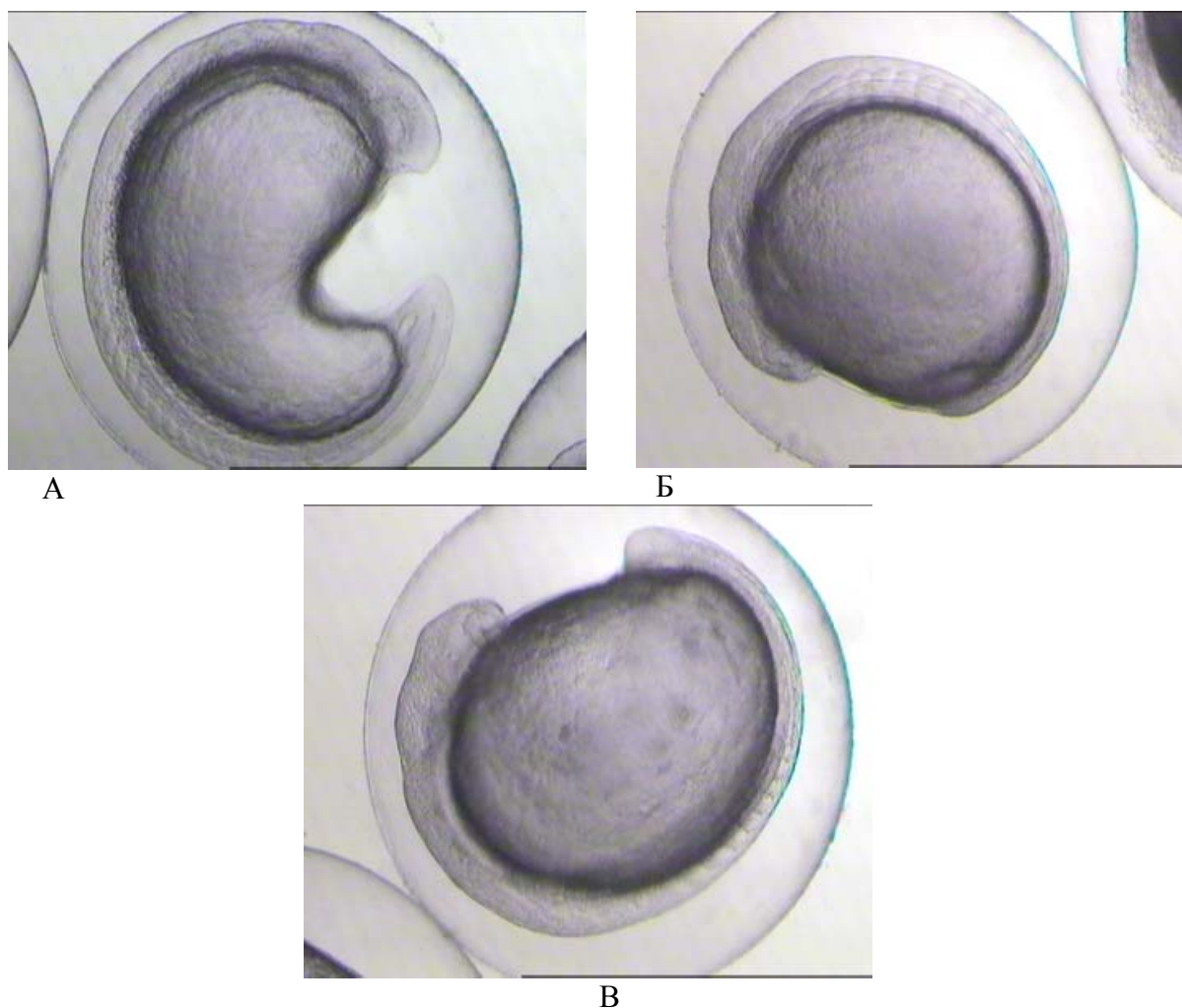
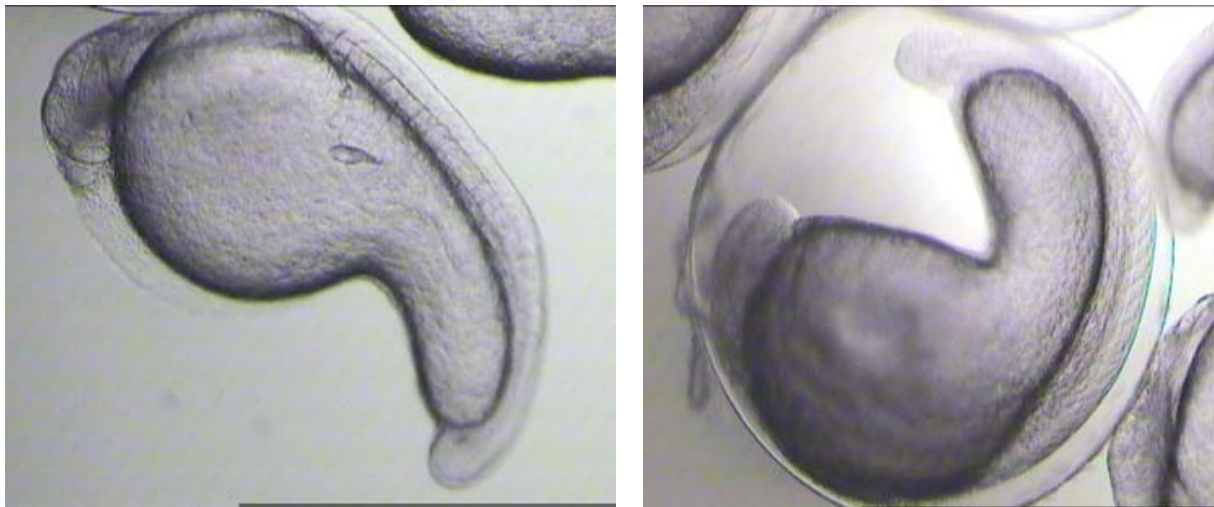


Рис. 4. Розвиток зародка на другу добу після опромінення синім світлом

Можна припустити, що дана доза опромінення є дещо зовеликою для чутливих зародків в'юна, котрі зазнають впливу синього світла, за умовами досліду одразу після запліднення, коли вони знаходяться у найчутливішій фазі свого розвитку [21, 23].

У результаті проведених досліджень встановлено, що після опромінення зародків синім світлом, отриманим з допомогою світлодіода, одразу після запліднення суттєво знизився відсоток виживання в'юнів.



А Б
Рис. 5. Розвиток зародка на третю добу після опромінення синім світлом

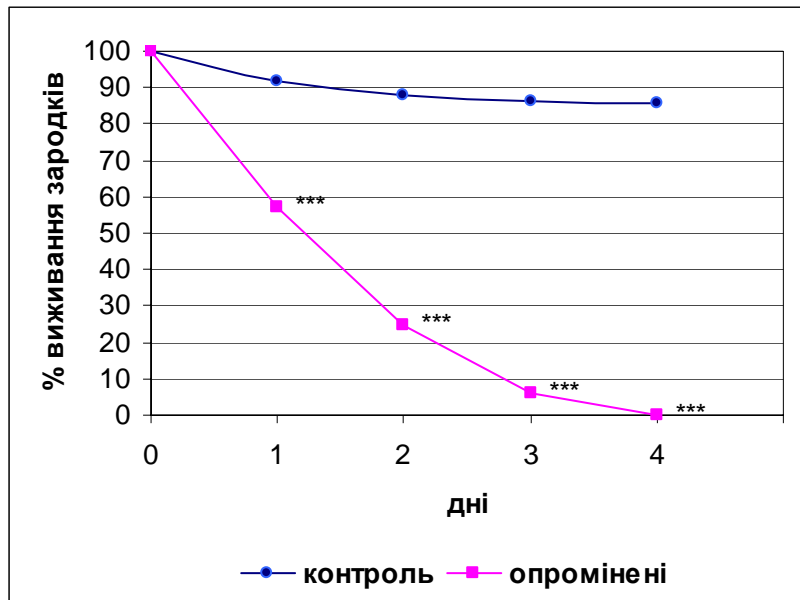


Рис. 6. Вплив синього світла на відсоток (%) виживання зародків *Misgurnus fossilis* L.:
* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,001$ - вірогідні зміни порівняно з контролем .

Після першої доби розвитку (рис. 6) загинуло 43 % опромінених зародків, тоді як у контролі, вижило 92 %.

На другу добу тенденція не змінилась. Відсоток зародків загиблих теж був високим і становив 76 %, коли у контрольній групі смертність була не високою, що відповідає результатам інших досліджень [21], і становила 11 %.

Під час подальших досліджень, на третю добу розвитку, у контролі спостерігалась певна стабілізація загибелі зародків, відсоток виживання становив 87 %, а у дослідній групі тварин, на цей період, вижило лише 6 % досліджуваних зародків.

На четверту добу, спостерігалась загибель всіх досліджуваних зародків, тоді як у контролі продовжувало нормально розвиватись 86,8 % зародків. Дослідження за личинками контролю велися ще протягом двох тижнів, тварини продовжували рости та нормально розвиватись. Ймовірно, що такий негативний вплив синього світла ($\lambda = 460$) нм на зародки в'юна *Misgurnus fossilis* L. спричинений дією світла на метаболічні системи ембріона, на його мембранні структури, що корелює з результатами авторів,

щодо впливу синього світла на антиоксидантну та енергетичні системи ембріонів [2, 3, 6]. Висока та швидка смертність ембріонів може бути спричиненою дещо великою дозою опромінення. У схожих дослідженнях по вивченню впливу монохроматичного світла на ембріональний розвиток перепела, автори не зазначають такої високої смертності, що ми пов'язуємо, можливо, з більшою чутливістю нашого об'єкта дослідження [2, 3]. Подальші дослідження по зміні дози опромінення ведуться.

ВИСНОВКИ

На даний час, мало вивченими залишаються гальмуючі ефекти низькоінтенсивного монохроматичного світла, за винятком даних, щодо тривалого перебування організму в монохроматичному світлі. Таким чином, в результаті проведеного дослідження, встановлено виражений гальмуючий вплив синього світла на морфологічний розвиток зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L. Опромінення синім світлом суттєво знижує відсоток виживання дослідних тварин та знижує тривалість їх життя.

Вважаємо, що такий виражений гальмуючий ефект монохроматичного синього світла на ембріогенез зародків в'юна пов'язаний із гальмуванням метаболічних систем ембріонів, які тісно пов'язані з регуляцією темпів ембріогенезу. До цих систем відносяться енергетична, антиоксидантна клітинні системи, які виявляють свою причетність до біологічних ефектів монохроматичного видимого світла.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Сімонова Л.І., Герман В.З., Перспективи застосування фотометричних технологій для лікування місцевих променевих ушкоджень // Укр. Радіол. Журн.- 2008, № 16.- С. 455-460.
2. Якименко І.Л., Цибулін О.С. Регуляторна дія низькоінтенсивного видимого світла на сомітогенез птиці // Доп. НАН України.- 2007.- № 2.- С. 163-168
3. Якименко І.Л., Сидорчик Є.П. Дія низько інтенсивного 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 // Радиаци. биология. Радиоэкология. – 2002. -42. № 2. С. 173-178.
5. Yeager R.L., Franzosa J. A. Effects of 670 – nm phototherapy on development // Photomed Laser Surg.- 2005. – Jun, 23 (3). – 268 – 272
6. 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
7. Whelan H.T., Buchman E.V. Effect of NASA light – emitting diode irradiation on molecular changes for wound healing in diabetic mice // J. Clin. Laser Med. Surg. -2003. – Apr. – 21 (2).- 67-74.
8. Lowe A.S. Walker M.D. et al Effect of low intensity monochromatic light therapy (890 nm) on a radiation impaired wound – healing model in murine skin // Lasers Surg Med. 1998.-23(5).- P. 291-298
9. Walker MD., Rumpf S. et al Effect of low-intensity laser irradiation (660 nm) on a radiation-impaired wound-healing model in murine skin // Lasers Surg Med. – 2000. – 26(1).- P. 41-47
10. Ehrlicher A. Guiding neuronal growth with light // Proc. Nat. Acad. Sci. Usa. – 2002. - 99. – P.16024-16028.
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. Lee SY, You CE, Park MY Blue and redlight combination LED phototherapy for acne vulgaris in patients with skin phototype IV // Lasers Surg Med. 2007. 39 (2).-P. 180-188
13. Sadick N. A study to determine the effect of combination blue (415nm) and near-infrared (830nm) light-emitting diode (LED) therapy for moderate acne vulgaris // J. Cosmet. Laser Ther. -2009 - Apr 24:1-4.
14. Sami NA, Attia AT, Badawi AM. Phototherapy in the treatment of acne vulgaris // J. Drugs Dermatol. 2008. 7(7).- P.627-632
15. DiCesare S., Maloney S, Fernandes B.F. The effect of blue light exposure in an ocular melanoma animal model // J. Exp. Clin. Cancer. Res. – 2009. Apr 7.-28(1).P. 48

16. DeLand M.M., Weiss R.A., et. al. Treatment of radiation-induced dermatitis with light-emitting diode (LED) photomodulation // *Lasers Surg. and Med.* – 2007.- Vol. 39. – P.164-168.
17. Tanaka K. Hashimoto H. et.al Apoptosis in the small intestine of neonatal rat using blue light-emitting diode devices and conventional halogen – quartz devices in phototherapy // *Pediatr Surg Int.* – 2008 Jul.24 (7). – P. 837-842.
18. Chang YS, Hwang JH, et. al In vitro and in vivo efficacy of new blue light emitting diode phototherapy compared to conventional halogen quartz phototherapy for neonatal jaundice // *J Korean Med Sci.* – 2005 Feb. 20 (1). – P. 61-64.
19. Целевич М.В., Мандзинець С.М., Санагурський Д.І. Na^+ , K^+ -АТФ-азна активність мембран зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L. при дії антибіотиків // *Фізіол. журн.* – 2004. – Т. 50, №5. – С. 64-68.
20. Бойко Н., Целевич М., Санагурський Д. Вплив йонів важких металів на активність Na^+ - K^+ АТФ-ази та динаміку трансмембранного потенціалу зародків в'юна // *Вісник Львів. ун-ту, Сер. Біол.* – 2002. - Вип. 29 – С. 25-31
21. Гойда Е.А. Биофизические аспекты раннего онтогенеза животных // К.: Наукова думка, 1993. – 224 с.
22. Нейфах А. А., Тимофеева М. Я. Проблемы регуляции в молекулярной биологии развития. – М.: Наука. – 1978. – 336 с.
23. Объекты биологии развития // Под. ред. Б. А. Астаурова – М.: Наука, 1975. – 579 с.