

І.Л. Якименко, Є.П. Сидорик
Білоцерківський державний
аграрний університет,
м. Біла Церква
Інститут експериментальної
патології, онкології і радіології
ім. Р.Є. Кавецького НАН
України,
м. Київ

Захисна дія червоного лазерного світла на радіаційно уражені ембріони птиці

Protective effect of red laser on exposed to radiation embryos of birds

Цель работы: Исследовать возможность радиозащитного действия низкоинтенсивного красного лазерного света на пораженные ионизирующим излучением эмбрионы птицы.

Материалы и методы: Работа проведена на эмбрионах перепела японского. На стадии ранней гаструлы (перед инкубацией) на эмбрионы опытных групп при помощи аппарата РУМ-17 воздействовали рентгеновским излучением в дозах 8,0–8,55 Гр. На этом фоне эмбрионы одной из групп-аналогов (каждого опыта) облучали красным светом гелий-неонового лазера ЛГН-111 в дозах 40–90 мДж. Кроме этого, в каждом опыте присутствовали контрольные группы эмбрионов, не подвергавшиеся рентгеновскому и лазерному воздействию. В процессе инкубации анализировали эмбриональную смертность и вывод молодняка в группах-аналогах. Для оценки отдаленных последствий воздействия рентгеновского и лазерного излучений оценивали уровень перекисного окисления липидов, активность ферментов-антиоксидантов, содержание окисленной формы цитохрома P-450 в печени птицы, полученной из соответствующих эмбрионов.

Результаты: Установлено возрастание в 4,5–6 раз ранней эмбриональной смертности и уменьшение в 2–3,1 раза вывода молодняка после рентгеновского облучения эмбрионов по сравнению с контролем. Облучение радиационно пораженных эмбрионов красным лазерным светом привело к увеличению в 1,5–1,7 раза ($p < 0,05$) выживаемости эмбрионов на ранних стадиях инкубации и увеличению в 1,6 раза, по сравнению с группами-аналогами, обработанными только рентгеновским излучением, вывода молодняка. У взрослой птицы, полученной из эмбрионов, обработанных рентгеновским и комбинированным излучением, установлено достоверное повышение уровня перекисей липидов в печени по сравнению с контролем. При этом отмечено достоверное повышение уровня активности каталазы и содержания окисленной формы цитохрома P-450 в печени птицы, полученной из эмбрионов, обработанных красным лазерным светом после рентгеновского воздействия, по сравнению с полученной из эмбрионов, обработанных только рентгеновским излучением.

Выводы: Низкоинтенсивное лазерное излучение красного диапазона способно оказывать радиозащитный эффект на предварительно обработанные рентгеновским излучением эмбрионы перепела японского, достоверно снижая в 1,5–1,7 раза ($p < 0,05$) раннюю эмбриональную смертность и повышая в 1,6 раза ($p < 0,05$) вывод молодняка. Воздействие красного лазерного света на радиационно пораженные эмбрионы вызывает достоверное повышение активности каталазы и содержания окисленной формы цитохрома P-450 в печени взрослой птицы.

Ключевые слова: низкоинтенсивное лазерное излучение, рентгеновское излучение, эмбрионы перепела японского, радиозащитное действие, каталаза, цитохром P-450.

Objective: To investigate the possibility of radioprotective action of low-intensity red laser on the embryos of birds exposed to ionizing radiation.

Material and Methods: The experiment was done on the embryos of quail. On the stage of early gastrula (before incubation) the embryos of the experimental group were irradiated with x-rays (8.0–8.55 Gy) using PUM-17 unit. The embryos from similar groups were also irradiated by red helium-neon laser ЛГН-111 (40–90 mJ). Besides, in each series there was a control group which was not exposed to any radiation. During incubation embryo mortality and birth rate were analysed for each group. To evaluate the long-term effects of x-ray and laser radiation the level of lipid peroxidation, activity of antioxidant enzymes, the content of oxidized cytochrome P-450 in the liver of the birds were studied.

Results: 4.5–6 fold increase in early embryonic death and 2–3.1 fold reduction of the birth rate after x-ray irradiation of embryos was determined when compared with the controls. Irradiation with red laser increased 1.5–1.7 times ($p < 0.05$) the survival at early stages of incubation and increased 1.6 times the birth rate, when compared with the groups exposed to x-rays only. In adult birds from the embryos exposed both to x-rays and laser radiation significant increase in the level of lipid peroxides in the liver was found out when compared with the controls. Significant increase of catalase activity and the amount of oxidized cytochrome P-450 was noted in the liver of the birds from the embryos exposed to red laser after x-ray irradiation.

Conclusion: Low-intensity laser radiation of red range produces radioprotective effect in the embryos of quails exposed to x-rays reducing significantly (1.5–1.7 times, $p < 0.05$) early embryonic mortality and increasing 1.6 times the birth rate. Irradiation of embryos exposed to x-rays with red laser causes significant increase in catalase activity and the amount of oxidized cytochrome P-450 in the liver of the adult birds.

Key words: low-intensity laser radiation, x-rays, embryos of quails, radioprotective effect, catalase, cytochrome P-450.

Пошук нових ефективних радіозахисних засобів широкого спектра дії сьогодні є вельми актуальним як з точки зору екологічної безпеки людини, так і використання їх у комплексній радіотерапії онкологічних хворих. У цьому сенсі на особливу увагу заслуговують дані, що свідчать про можливість використання низькоінтенсивного лазерного випромінювання з радіозахисною метою.

Так, показана [1] виражена радіозахисна дія низькоінтенсивного лазерного ви-

промінювання з довжиною хвилі 532 нм на культуру *Escherichia coli* при її опроміюванні α -частинками.

Курсове опроміювання щурів світлом гелій-неонового лазера ($\lambda = 633$ нм) після дії на них напівлетальної дози γ -випромінювання збільшувало виживаність тварин з 40 до 58% [2].

Виявлено можливість гальмування методами лазерної терапії розвитку постпроменевих змін у клітинах, органах та тканинах людини [3]. У радіаційно уражених

тканинах після курсу лазерного опромінення виявлено стимуляцію внутріклітинної регенерації частково уражених органел та хроматину клітинних ядер [3]. Дія червоного лазерного світла з густиною енергії 20 Дж/см² на культуру клітин після нейтронного опромінення у дозі 100 Р приводила до зниження кількості хромосомних аберацій з 8,3±0,5 до 2,1±0,3%, тобто до повного усунення мутагенної дії іонізуючого випромінювання [4].

Крім того, слід зазначити, що здобутком останніх років став значний прогрес у розумінні ключових механізмів біологічної ефективності червоного лазерного світла. Так, доведено фотореактивуючу дію цього фактора на ключові ферменти антиоксидантного захисту [5, 6] та можливість його регуляторного впливу на інтенсивність окисних і перекисних процесів в організмі [7, 8].

Зважаючи на виявлені властивості низькоінтенсивного лазерного світла, за мету роботи ми обрали оцінку захисних можливостей останнього при дії на ембріони ранніх стадій розвитку, уражені іонізуючим випромінюванням у значних дозах.

Методика дослідження

Роботу виконано на ембріонах перепела японського (*Coturnix coturnix japonica*). Для моделювання променевого ураження використано рентгенівське випромінювання від терапевтичного апарата РУМ-17. Джерелом лазерного світла були гелій-неонові лазери ЛГН-111, що випромінюють хвилі з довжиною 633 нм з потужністю променя 25 мВт.

У свіжому інкубаційному яйці півці ембріони перебувають на стадії ранньої гастрული. Для першого дослідження було сформовано 3 групи-аналоги свіжих інкубаційних яєць. Ембріони 1-ї групи за добу до інкубації піддавали дії рентгенівського випромінювання у дозі 8,55 Гр. Для цього використовували апарат РУМ-17 у режимі: U=200 кВ, I=15 мА, ВДП=40 см, фільтр — Cu 1 мм, час опромінення — 10 хв. У такому ж режимі опромінювали 2-гу групу ембріонів, та, крім того, — двічі — через 1–2 хв і 2 год після цього обробляли світлом гелій-неонового лазера у сумарній дозі порядку 40 мДж на яйце. Опромінювання лазерним світлом та зберігання яєць до інкубації проводили у затемненому приміщенні (фонове освітлення не більше 3 люкс). Дії рентгенівського та лазерного випромінювання не піддавали 3-тю групу ембріонів (контрольну).

У другому досліді 1-шу групу ембріонів (інкубаційних яєць) за добу до інкубації піддавали дії рентгенівського випромінювання у дозі 8,0 Гр, 2-гу — обробляли рентгенівським випромінюванням у такому ж режимі та, крім того, — тричі — через 1–2 хв, 2 і 12 год після цього — світлом лазера у сумарній дозі 90 мДж на яйце. Ембріони 3-ї групи (контрольної) не опромінювали.

Усі групи яєць інкубували у стандартному режимі, здійснюючи при цьому біологічний контроль розвитку ембріонів. Виведений молодняк оцінювали за ек-

тер'єрними ознаками. У півці, вирощеної з опромінених ембріонів, оцінювали стан антиоксидантної системи за рівнем ТБК-реагуючих перекисних сполук [9] та активністю каталази [10] у тканинах печінки. Методом електронного парамагнітного резонансу [11] за вмістом окисненої форми ферменту оцінювали функціональний стан системи цитохрому Р-450 у печінці. Рівень гемоглобіну крові визначали гемоглобінціанідним методом, кількість еритроцитів крові — підрахунком у камері Горяєва. Залізовв'язувальну здатність (ЗЗЗ) сироватки крові визначали за допомогою тест-наборів фірми «Агат» (Росія).

Вірогідність різниць між групами оцінювали за критеріями Фішера та Стьюдента.

Результати та їх обговорення

Аналіз результатів інкубації першого досліді (табл. 1) свідчить про зростання у 4,5 разу ($p < 0,001$) ембріональної смертності протягом перших діб інкубації у 1-й дослідній групі та зниження у 3,1 разу ($p < 0,001$) виведення молодняку порівняно з 3-ю (контрольною) групою.

Таблиця 1 — Вплив рентгенівського (8,55 Гр) та лазерного (40 мДж) опромінювання перепелиних ембріонів на їх смертність
Influence of x-ray (8.55 Gy) and laser (40 mJ) irradiation of quail embryos on their mortality

| Показник | Група | | |
|--|------------------------------|---|----------------|
| | 1-ша, рентгенівське опромін. | 2-га, рентгенівське та лазерне опромін. | 3-тя, контроль |
| Закладено на інкубацію запліднених яєць (шт.) | 50 | 45 | 48 |
| Ембріональна смертність на 7-й день інкубації (шт.): | | | |
| 1-4 | 28 *** | 15 **, * | 6 |
| 5-15 | 9 | 13 | 8 |
| 16-17 | 2 | 1 | 1 |
| Виведено перепелят (шт.) | 11 | 16 | 33 |
| Виводчі місткість (%) | 22,0 *** | 35,6 *** | 68,8 |

Примітка: * — $p < 0,05$ порівняно з 1-ю групою; ** — $p < 0,01$ порівняно з 3-ю групою; *** — $p < 0,001$ порівняно з 3-ю групою.

Так, рання ембріональна смертність у 1-й групі становила 56,0%, виведення молодняку — 22,0%. У 3-й (контрольній) групі ці показники були відповідно 12,5 та 68,8%. У 2-й групі ембріонів, оброблених крім рентгенівського випромінювання червоном лазерним світлом, рання ембріональна смертність становила 33,3%, тобто зменшилась у 1,7 разу ($p < 0,05$) порівняно з 2-ю групою ембріонів, оброблених тільки рентгенівським випромінюванням. Виводимість молодняку в цій групі у 1,6 разу перевищила даний показник у 1-й групі і дорівнювала 35,6%. Таким чином, черво-

не лазерне світло в опрацьованому режимі чинило вірогідний радіозахисний ефект на променево уражені ембріони птиці.

Результати інкубації другого досліду (табл. 2) також свідчать про те, що опромінювання червоним лазерним світлом збільшило виживаність ембріонів на ранніх стадіях ембріогенезу майже в 1,5 разу та виведення молодняку — у 1,6 разу на фоні значного радіаційного ураження ембріонів (порівняно з 1-ю групою). В обох випадках різниця статистично вірогідна ($p < 0,05$).

Таблиця 2 — Вплив рентгенівського (8,0 Гр) та лазерного (90 мДж) опромінювання перепелиних ембріонів на їх смертність

Influence of x-ray (8.0 Gy) and laser (90 mJ) irradiation of quail embryos on their mortality

| Показник | Група | | |
|---|------------------------------|---|----------------|
| | 1-ша, рентгенівське опромін. | 2-га, рентгенівське та лазерне опромін. | 3-тя, контроль |
| Закладено на інкубацію запліднених яєць (шт.) | 78 | 70 | 102 |
| Ембріональна смертність на 90 днів інкубації (шт.): | | | |
| 1-4 | 27 *** | 14 **, * | 6 |
| 5-15 | 16 | 12 | 7 |
| 16-17 | 6 | 2 | 9 |
| Виведено перепелят (шт.) | 29 | 42 | 80 |
| Виводимість (%) | 37,2*** | 60,0**, * | 78,4 |

Примітка: * — $p < 0,05$ порівняно з 1-ю групою; ** — $p < 0,01$ порівняно з 3-ю групою; *** — $p < 0,001$ порівняно з 3-ю групою.

Аналіз віддалених наслідків дії рентгенівського та лазерного випромінень на ембріони виявив, що не спостерігалось істотної різниці в екстер'єрних ознаках та тем-

Таблиця 3 — Вплив рентгенівського (8,55 Гр) та лазерного (40 мДж) опромінювання перепелиних ембріонів на показники метаболізму тримісячної птиці ($M \pm m$, $n=7$)

Influence of x-ray (8.55 Gy) and laser (40 mJ) irradiation of quail embryos on metabolism indices in 3-month birds ($M \pm m$, $n=7$)

| Показник | Група | | |
|--|------------------------------|---|----------------|
| | 1-ша, рентгенівське опромін. | 2-га, рентгенівське та лазерне опромін. | 3-тя, контроль |
| У крові | | | |
| Еритроцити (млн/мкл) | 3,16 ± 0,15 | 3,34 ± 0,12 | 3,29 ± 0,14 |
| Гемоглобін (г/л) | 134,7 ± 3,9 | 141,5 ± 8,2 | 139,4 ± 3,6 |
| ЗЗЗ сироватки (мкмоль/л) | 98,1 ± 10,2 | 78,1 ± 7,6 | 80,7 ± 5,4 |
| У печінці | | | |
| Перекиси ліпідів (мкмоль/г) | 0,83 ± 0,15 | 0,88 ± 0,09** | 0,53 ± 0,02 |
| Активність каталази (нкат/г) | 317,3 ± 24,8 | 426,0 ± 16,5 | 384,8 ± 30,8 |
| Цитохром P-450, окси-форма (умов. од.) | 0,304 ± 0,021 | 0,388 ± 0,016*** | 0,265 ± 0,008 |

Примітка: * — $p < 0,05$ порівняно з контролем; ** — $p < 0,01$ порівняно з контролем; *** — $p < 0,001$ порівняно з контролем; $\pm p < 0,01$ порівняно з 1-ю групою.

пах розвитку птиці, виведеної з інкубаційних яєць усіх трьох груп.

Не виявлено вірогідних відмінностей у кількості еритроцитів та рівні гемоглобіну крові у дорослої (тримісячної) птиці трьох груп 1-го досліду (табл. 3), хоч у птиці 2-ї групи ці показники були ближчі до контрольних і на 5,0–5,7% перевищували такі 1-ї групи. Крім того, у птиці 1-ї групи зафіксовано збільшення залізов'язувальної здатності сироватки крові на 20% порівняно з контролем, що свідчить про відповідне зниження насиченості трансферину плазми залізом. У птиці 2-ї групи цей показник був на рівні контролю. Тобто, червоне лазерне світло модифікувало дію рентгенівського опромінення, повертаючи даний показник до норми. Відомо, що трансферин, вільний від заліза (апо-трансферин), проявляє антиоксидантні властивості і означені зміни можуть бути причетні до реакції антиоксидантної системи (АОС) плазми крові на дію даних факторів.

Аналіз інших показників стану АОС птиці дослідних груп також виявив певні відмінності від контролю. Так, у птиці 1-ї та 2-ї груп виявлено вірогідне збільшення рівня ТБК-реагуючих перекисних ліпідних сполук у печінці, порівняно з контролем, яке становило 56,4% ($p < 0,05$) та 66,1% ($p < 0,01$) відповідно.

При цьому у птиці 1-ї групи активність каталази у печінці була на 18% нижчою, ніж у контролі, а у птиці 2-ї — на 11% перевищувала контрольний показник. Різниця між дослідними групами за цим показником становила 34% ($p < 0,01$). Ката-

лаза є ферментом, що захищає клітини від прооксидантної дії перекису водню. Тому зниження активності каталази в печінці птиці 1-ї групи на фоні підвищення рівня перекисних ліпідних сполук можна розцінювати як певне пригнічення стану АОС. У 2-й групі, де рентгенівське опромінювання яєць комбінували із лазерним, на фоні підвищення вмісту у печінці перекисних ліпідних сполук спостерігається компенсаторне підвищення ферментативної активності каталази, що може свідчити про більшу стійкість антиоксидантної системи у птиці даної групи.

Аналіз вмісту окисненої (каталітично активної) форми цитохрому Р-450 у печінці виявив його найвищий рівень у птиці 2-ї групи. Різниця з контролем цих підослідних за вмістом цитохрому Р-450 становила 46% ($p < 0,001$) та з птицею 1-ї групи — 28%. Цитохром Р-450 є ключовим ферментом однієї з найактивніших гідропероксидазних систем, локалізованих у мембранах ендоплазматичного ретикулу гепатоцитів і поряд з ферментами антиоксидантної системи контролює рівень продуктів перекисного окиснення ліпідів у організмі, а також відіграє важливу роль у реакціях детоксикації. Зростання цього показника у фізіологічних межах можна, очевидно, розцінювати як прояв позитивного впливу червоного лазерного світла на стан детоксикувальної системи печінки птиці.

Висновки

1. Червоне лазерне світло у дозах 40–90 мДж вірогідно запобігає зростанню ранньої ембріональної смертності перепела японського після дії на його ембріони рентгенівського випромінювання у дозах 8,0–8,55 Гр та сприяє збільшенню в 1,6 разу виживаності молодняку.

2. У печінці тримісячної птиці, отриманої з ембріонів, оброблених рентгенівським та комбінованим (рентгенівським і лазерним) випромінюванням, вірогідно збільшується рівень перекисних ліпідних сполук на 56,4% та 66,1% відповідно, порівняно з контролем.

3. У печінці тримісячної птиці, отриманої з оброблених комбінованим (рентгенівським та лазерним) випромінюванням

ембріонів, зростають активність каталази (на 34%) та рівень окисненої форми цитохрому Р-450 (на 28%), порівняно з птицею, отриманою з ембріонів, підданих дії тільки рентгенівського випромінювання.

Література

1. Восканян К.Ш., Арзуманян Г.М. // *Радиационная биология и радиационная экология*. — 1996. — Т. 36, вып. 5. — С. 731–733.
2. Лапрун И.Б. // *Радиобиология*. — 1978. — Т. 18, вып. 4. — С. 628–630.
3. Самойлов Н.Г. // *Фотобиология и фотомедицина*. — 1998. — № 1. — С. 89–95.
4. Степанов Б.И., Мостовников В.А., Рубинов А.Н., Хохлов И.В. *Регулирование функциональной активности клеток человека с помощью лазерного излучения* // Докл. АН СССР. — 1977. — Т. 236, № 4. — С. 1007–1010.
5. Горбатенкова Е.А., Владимиров Ю.А., Парамонов Н.В. и др. // *Бюл. эксперим. биол. и мед.* — 1989. — № 3. — С. 302–305.
6. Александрова Л.А., Баселадзе Л.И., Шабуневич Л.В. *Фотоактивирующее действие излучения He-Ne лазера на церулоплазмин человека: Тез. докл. Всесоюз. науч.-практ. конф. «Действие низкоэнергетического лазерного излучения на кровь»*. — К., 1989. — С. 3–4.
7. Kari T.I. // *Laser in Life Sciences*. — 1988. — Vol. 2, № 1. — P. 53–74.
8. Доровских В.А., Бородин Е.А., Бородин Г.П. и др. // *Лазерная медицина*. — 1998. — Т. 2, вып. 2–3. — С. 16–20.
9. Андреева Л.И., Кожемякин Л.А., Кишкун А.А. // *Лаб. дело*. — 1988. — № 11. — С. 41–43.
10. Барабой В.А., Орел В.Э., Карнаух И.М. *Перекисное окисление и радиация*. — К.: Наук. думка, 1991. — 256 с.
11. Ажипа Я.И. *Медико-биологические аспекты применения метода электронного парамагнитного резонанса*. — М., 1983. — 527 с.

Дата надходження: 30.05.2000.

Адреса для листування:
Якименко Ігор Леонідович,
вул. Ак. Вула, 6, кв. 40, Біла Церква, 09100, Україна