

## ВПЛИВ НИЗЬКОІНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НА УЛЬТРАСТРУКТУРНУ ОРГАНІЗАЦІЮ ЕМБРІОНАЛЬНИХ КЛІТИН В'ЮНА

*Досліджено ультраструктурну організацію ембріональних клітин в'юна (*Misgurnus fossilis* L.) на стадіях першого та десятого поділів зародків за умов впливу низькоінтенсивного гелій-неонового лазерного випромінювання експозицією 5 хв. Встановлено, що дія лазерного випромінювання призводить до ультраструктурних змін клітинних органел: змінюється форма мітохондрій та мультивезикулярних тілець. Одержані результати пояснюють можливий механізм впливу низькоінтенсивного лазерного випромінювання на клітинному рівні.*

**Ключові слова:** низькоінтенсивне лазерне випромінювання, ембріональні клітини, ультраструктурна організація клітин, органели, мітохондрії, біостимуляція.

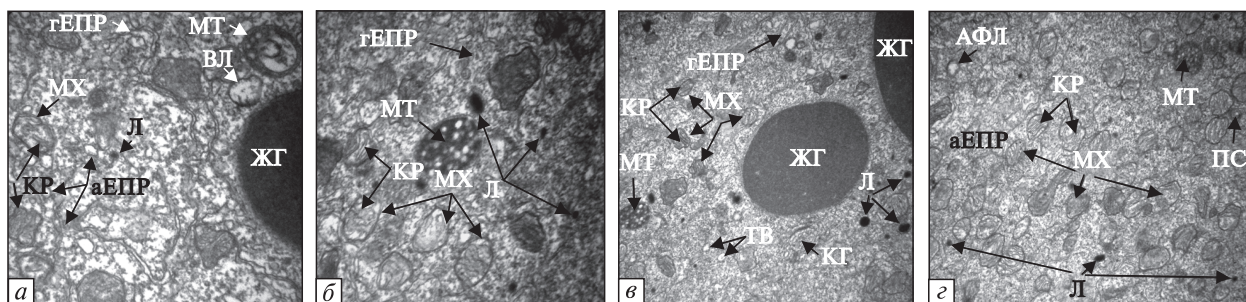
**Вступ.** Упродовж останніх десятиліть оптичні квантові генератори знайшли широке застосування в багатьох галузях практичної медицини. Низькоінтенсивне лазерне випромінювання (НІЛВ) досліджується вже більше 30 років [1, 2]. Проведено дослідження впливу НІЛВ *in vitro* на клітинні процеси, включаючи синтез ДНК і експресію генів [3, 4], продукування цитокіну аугментину [5, 6], а також стимуляцію проліферації клітин [7–10]. Низькоінтенсивне випромінювання малих потужностей (в межах одиниць та десятих Вт/м<sup>2</sup>) використовують для опромінення клітин, тканин, органів та цілого організму з метою впливу на біофізичні, біохімічні та фізіологічні процеси. Так, наприклад, одним з найбільш важливих напрямків використання лазера є впровадження новітніх технологій в лікуванні злоякісних новоутворень.

Ефекти впливу НІЛВ досліджували на багатьох біологічних об'єктах на молекулярному, клітинному та органному рівнях [14, 15]. За дії гелій-неонового лазера посилюється синтез РНК, що показано в дослідках на лейкоцитах [11], відбувається захист РНК В-лімфоцитів від дії УФ-променів [12] та посилення синтезу клітинних і мітохондріальних білків гепатоцитів

[13]. Так, опромінення НІЛВ ( $\lambda = 632,8$  нм у дозі 460 Дж/м<sup>2</sup>) дріжджових клітин прискорює їхній поділ [16], збільшує кількість мітохондрій у клітинах, при цьому змінюється форма перших, що встановлено мікроскопічним дослідженням. Опромінення клітин *Escherichia coli* світлом НІЛВ прискорює їхній поділ, швидкість якого прямо пропорційно залежить від дози опромінення [17, 18].

Хімічні і біологічні процеси, що лежать в основі взаємодії випромінювання лазера з біооб'єктами, на відміну від фізичних вивчені мало. Це пояснюється як новизною всього напрямку в цілому, так і труднощами дослідження складних метаболічних сіток різних хімічних і біохімічних реакцій, які проходять при опроміненні біологічних структур. Окрім цього, характер дії НІЛВ на живі та неживі об'єкти є досить відмінним.

Власне, біостимуляція різних процесів НІЛВ лежить в основі медичної лазеротерапії і найширше використовується для фотодинамічної терапії. Однак позитивне ефективне застосування даного виду світла у різних цілях не є остаточно науково обґрунтованим, оскільки механізм дії монохроматичного світла низької потужності залишається невідомим. Окрім того, на сьогодні нез'ясовано є дія НІЛВ на зародкові об'єкти. Попередніми дослідженнями встановлено, що п'ятихвилинна експозиція НІЛВ викликає достовірне підвищення вмісту МДА, активує ферментативну ланку системи антиоксидантного захисту клітин зародків вже на першій годині розвитку [24]. З врахуванням того, що зародки в'юна (*Misgurnus fossilis* L.) у період раннього ембріогенезу є зручною адекватною тест-системою для дослідження дії різних фармакологічних, фізичних та хімічних [16, 19] чинників на живі організми та механізмів реалізації їх впливу на біооб'єкти, мета роботи полягала у дослідженні ультраструктурних змін ембріональних клітин в'юна за дії НІЛВ протягом раннього ембріогенезу.



**Рис. 1.** Ультраструктура ембріональних клітин зародків в'юна на стадії розвитку двох бластомер за експозиції НЛВ 5 хв (*б* –  $\times 10000$ ; *в, г* –  $\times 4000$ ) порівняно з контролем (*а* –  $\times 10000$ ): аЕПР – агранулярний ендоплазматичний ретикулум; АФЛ – автофаголізосоми; гЕПР – гранулярний ендоплазматичний ретикулум; ЖГ – жовткові гранули; КГ – комплекс Гольджі; КР – кристи мітохондрій; Л – лізосоми; МХ – мітохондрії; МТ – мультивезикулярні тільця; ПМ – плазматична мембрана; ПС – полісоми

**Матеріали і методи.** Дослідження проведено на зародках в'юна (*Misgurnus fossilis* L.) у період від запліднення (перша година розвитку) до стадії десятого поділу бластомер (шоста година розвитку). Овуляцію стимулювали внутрішньом'язовим введенням самкам хоріогонічного гонадотропіну (500 од.). Ікру одержували через 36 год після стимуляції. Сім'яники отримували шляхом декапітації та розтину черевної порожнини самців. Ікру запліднювали в чашках Петрі суспензією спермій за Нейфахом [18]. Через 5–10 хв після запліднення зиготи відмивали та інкубували у фізіологічному розчині Гольфрета (рН 7,4;  $t = 20\text{--}22\text{ }^\circ\text{C}$ ).

В умовах досліді зародки опромінювали лазером He-Ne з довжиною хвилі 632,8 нм упродовж 5 хв відразу після запліднення й інкубували у розчині Гольфрета. Лазер, діаметр вихідної лінзи якого становив 1,2 мм, знаходився на відстані 15 см від пробірки, густина потоку  $1,5 \cdot 10^2$  мВт/см<sup>2</sup>. Запліднені яйцеклітини (діаметром 1,2–1,5 мм) були розташовані одним шаром на чашці Петрі з мінімальною кількістю розчину Гольфрета. Спостереження та контроль стадій розвитку зародків здійснювали за допомогою бінокулярного мікроскопа МБС-9 з фотографічною приставкою. Для ультраструктурних досліджень відбирали зародки на стадіях першого та десятого поділів (перша та шоста години розвитку) ембріональних клітин.

Зародки в'юна на зазначених 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 та додатково фіксували

1 год у 2%-ному розчині чотириокису осмію в тому ж буфері ( $t = 4\text{ }^\circ\text{C}$ ), відмивали від фіксаторів, обезводнювали спочатку в зростаючих концентраціях етилового спирту, а потім в двох змінах окису пропілену і поміщали в епоксидну смолу епон-812 [19]. Зрізи готували на ультрамікромомі УМТП-6 алмазним ножом, контрастували 15 хв 2%-ним розчином ураніацетату і додатково цитратом свинцю за Рейнольдсом [19]. Зрізи переглядали і фотографували на електронному трансмісійному мікроскопі ПЕМ-100.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Ультраструктура ембріональних клітин в'юна на першій годині розвитку за умов дії НЛВ. Плейотропність ефектів НЛВ на біологічні системи передбачає модифікуючий вплив лазерного випромінювання на процеси підтримання гомеостазу, що в свою чергу відображається на ультраструктурній організації ембріональних клітин.

В результаті електронно-мікроскопічного дослідження ультратонких зрізів зародків в'юна на стадії розвитку двох бластомер у нормі встановлено, що цитоплазма складається в основному з дрібнозернистої гіалоплазми середньої електронної щільності, цитоплазматичних органел та включень [20]. У цитоплазмі ідентифіковано канали гранулярного (гЕПР) та агранулярного ендоплазматичного ретикулуму (аЕПР), скупчення полісом та окремі рибосоми. Серед скупчень рибосом і полісом знаходяться округлої, рідше – овальної форми мітохондрії, які мають добре розвинуті зовнішні та внутрішні мітохондріальні мембрани. Внутрішня мітохондріальна мембрана утворює розгалужену систему крист, між якими знаходиться речовина се-

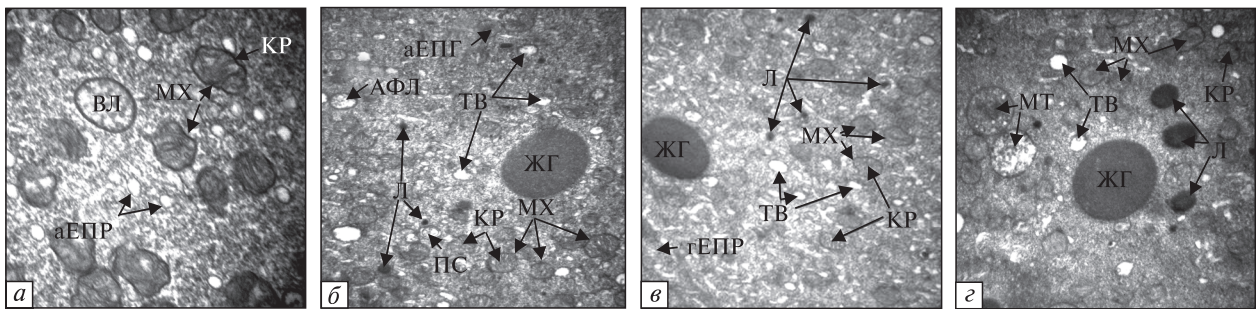


Рис. 2. Ультраструктура ембріональних клітин зародків в'юна на стадії розвитку 10 поділу (6 год розвитку) бластомер за експозиції НІЛВ 5 хв (б, в, з, а –  $\times 4000$ ) порівняно з контролем (а –  $\times 10000$ ). Позначення, як на рис. 1

редньої електронної щільності, так званий внутрішньомітохондріальний матрикс (рис. 1, а). Гранули жовтка оточені по периферії мембраною, яка в багатьох місцях продовжується у трубкоподібних виростах гЕПР. Отримані електронно-мікроскопічні зрізи повністю відповідають результатам ультраструктурного дослідження, які висвітлені у роботах Целевич та ін. [21, 22].

Встановлено, що п'ятихвилинна експозиція НІЛВ викликає зниження електронної щільності гіалоплазми у порівнянні з контролем. Цитоплазма бластомер містить велику кількість неправильної форми мітохондрій, які збільшені за розмірами. Кристи мітохондрій в основному чіткі, ущільнені та представлені у вигляді коагулятів (рис. 1, в, з). Фотодинамічна дія лазерного опромінення може бути спрямована не тільки на клітинні мембрани, але й на мітохондріальні [23]. За умов впливу НІЛВ збільшується кількість мітохондрій, лізосом, полісом, каналів гЕПР, що відображає активацію білкового синтезу. Мітохондрії, що прилягають до жовткових гранул, також зберігають цілісність крист, але мають неправильну зірчасту форму (рис. 1, в, з). Між мітохондріями міститься велика кількість частково дезорганізованих рибосом та полісом, первинні лізосоми, канали гЕПР та аЕПР.

*Ультраструктура ембріональних клітин в'юна на шостій годині розвитку за умов впливу НІЛВ.* Показано, що електронна щільність гіалоплазми бластомер зародків в'юна на 6-й годині розвитку за нормальних умов [20–22] є незначною. Міжбластомерні простори розширені та заповнені речовиною незначної електронної щільності, що має дрібнозернисту консистенцію

[20–22]. Цитоплазма, що прилягає до плазматичної мембрани, має малий вміст цитоплазматичних органел, тоді як по мірі віддалення до центру клітини дрібнозерниста гіалоплазма наповнюється мітохондріями округлої чи овальної форми з чітко контурованими кристами [20–22]. В безпосередній близькості до мітохондрій виявлено канали аЕПР та гЕПР, рибосоми, полісоми (рис. 2, а).

Опромінення зародків НІЛВ упродовж 5 хв призводить до незначних змін ультраструктури бластомер зародків у порівнянні з контролем. Електронна щільність гіалоплазми є зниженою порівняно з контролем [21, 22]. У цитоплазмі зародкових клітин виявлено поодинокі мітохондрії, що перебували в стані набряку (рис. 2, б), кристи яких частково зруйновані, матрикс електронно-світлий, однак зовнішні мітохондріальні мембрани зберегли цілісність (рис. 2, з). Подібні спостереження, що при опроміненні з'являються популяції змінених мітохондрій, описані також у роботі [23].

Жовткові гранули мають невисоку електронну щільність у порівнянні з попередньою стадією розвитку (рис. 2, в). Між мітохондріями міститься велика кількість частково дезорганізованих рибосом та полісом, первинні лізосоми, канали гЕПР та аЕПР. Також у цитоплазмі наявні скупчення розгалуженої системи мікроміхурців та каналців.

Попередньо отримані дані по впливу НІЛВ (тривалістю 1, 3 та 5 хв) на прооксидантно-антиоксидантний баланс зародків упродовж ембріогенезу [24], морфологію зародків та личинок [17], а також функціонування мембранозв'язаних ферментів, зокрема, АТФ-гідролаз [25], свід-



чать про вагомий вплив He-Ne лазерного випромінювання на фізіологічний стан клітин. Цікавим також є той факт, що при опроміненні лімфоцитів крові людини лазером спостерігали зростання рівня АТФ в клітинах [23]. Показано, що при опроміненні ізольованих мітохондрій печінки світлом лазера He-Ne в них підвищувався вміст АТФ [23]. Одночасно відбувалося зростання трансмембранного потенціалу, рН і спостерігалися зміни ультраструктури органел: збільшувалася частка мітохондрій в конденсованому стані за рахунок зниження частки частинок в ортодоксальному стані [23].

Дія НІЛВ вказує на структурні ознаки стимуляції проліферації клітин *Toxulopsis sphaerica*, опромінених лазером He-Ne (6 год інкубації в поживному середовищі) [25]: зменшення клітинних розмірів, кількості мітохондрій, елонгація клітин і мітохондрій, підвищення варіабельності ряду клітинних параметрів. Такі зміни мітохондрій можуть свідчити про підготовку клітини до поділу [23], але незрозуміло, чи передують вони іншим змінам в клітинах, які зумовлені дією лазерного опромінювання, чи є наслідком останнього.

Отримані результати свідчать про те, що дія НІЛВ на ембріональні клітини зародків в'юна виступає як пусковий фактор каскаду молекулярного окислення ліпідів та вплив на маркерні ензими плазматичних мембран ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза) і морфологічних процесів, які знаходять своє відображення у змінах ультраструктурної організації клітин. Встановлено, що зміни у будові мітохондрій можуть бути наслідком прямої або опосередкованої дії квантів випромінювання на мембранні структури органел, що може бути клітинною відповіддю на дію такого фізичного чинника.

*M.S. Romaniuk, M.V. Bura,  
S.M. Mandzynets, O.R. Kulachkovsky, D.I. Sanagursky*

Ivan Franko National University of L'viv, Ukraine  
E-mail: myrosik.R@gmail.com

#### THE INFLUENCE OF LOW-INTENSITY LASER IRRADIATION ON THE LOACH EMBRYO CELLS

The ultrastructural organization of loach embryo cells (*Misgurnus fossilis* L) at the stage of the first and the tenth embryo divisions was investigated in the control and under the influence of low intensity helium-neon laser irradiation of 5 min exposure. The effect of laser

irradiation led to ultrastructural changes in cell organelles, increasing the number and size of mitochondria, and as a result their shape changes. Under the influence of laser irradiation, the activation of cellular digestion processes took place, the number of vacuoles and lysosomes increased. The results explain the possible mechanism laser irradiation impact at the cellular level.

*M.S. Romaniuk, M.V. Bura, S.M. Mandzinec,  
O.P. Kulachkovskiy, D.I. Sanagurskiy*

#### ВЛИЯНИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА УЛЬТРАСТРУКТУРНУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ КЛЕТОК ВЬЮНА

Исследована ультраструктурная организация клеток вьюна (*Misgurnus fossilis* L.) на стадии первого и десятого делений зародышей в условиях воздействия низкоинтенсивного гелий-неонового лазерного излучения экспозицией 5 мин. Установлено, что действие низкоинтенсивного лазерного излучения приводит к ультраструктурным изменениям клеточных органелл: увеличивается количество и размеры митохондрий, при этом меняется их форма, что подтверждается микрофотографиями ультраструктуры клеток. При влиянии лазера происходит активация процессов клеточного пищеварения, о чем свидетельствует наличие мультивезикулярных телец, пищеварительных вакуолей и лизосом. Полученные результаты объясняют возможный механизм влияния низкоинтенсивного лазерного излучения на клеточном уровне.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Moshkovska T., Mayberry J.* It is time to test low level laser therapy in Great Britain // *Postgrad. Med. J.* – 2005. – **81**, № 957. – P. 436–441.
2. *Gavish L., Perez L., Gertz S.D.* Low-level laser irradiation modulates matrix metalloproteinase activity and gene expression in porcine aortic smooth muscle cells // *Lasers Surg. Med.* – 2006. – **38**, № 8. – P. 779–786.
3. *Snyder S.K., Byrnes K.R., Borke R.C. et al.* Quantitation of calcitonin gene-related peptide mRNA and neuronal cell death in facial motor nuclei following axotomy and 633 nm low power laser treatment // *Lasers Surg. Med.* – 2002. – **31**, № 3. – P. 216–222.
4. *Karu T.I., Kolyakov S.F.* Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy // *Photomed. Laser Surg.* – 2005. – **23**, № 4. – P. 355–361.
5. *Kipshidze N., Nikolaychik V., Keelan M.H. et al.* Low-power helium-neon laser irradiation enhances production of vascular endothelial growth factor

- and promotes growth of endothelial cells in vitro // *Lasers Surg. Med.* – 2001. – **28** № 4. – P. 355–364.
6. *Byrnes K.R., Wu X, Waynant R.W. et al.* Low power laser irradiation alters gene expression of olfactory ensheathing cells in vitro // *Lasers Surg. Med.* – 2005. – **37**, № 2. – P. 161–171.
  7. *Kreisler M., Christoffers A.B., Al-Haj H. et al.* Low level 809-nm diode laser-induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts // *Lasers Surg. Med.* – 2002. – **30**, № 5. – P. 365–369.
  8. *Stein A., Benayahu D., Maltz L., Oron U.* Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro // *Photomed. Laser Surg.* – 2005. – **23**, № 2. – P. 161–166.
  9. *Souza S.C. de, Munin E., Alves L.P. et al.* Low power laser radiation at 685 nm stimulates stem-cell proliferation rate in *Dugesia tigrina* during regeneration // *J. Photochem. Photobiol. B.* – 2005. – **80**, № 3. – P. 203–207.
  10. *Tuby H., Maltz L., Oron U.* Low-level laser irradiation (LLLI) promotes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture // *Lasers Surg. Med.* – 2007. – **39**, № 4. – P. 373–378.
  11. *Manteifel V.M., Karu T.J., Andreichuk T.V.* A comparative study of chromatin from lymphocyte nuclei upon activation of transcription by irradiation from an He-Ne-laser or phytohemagglutinin // *Mol. Biol.* – 1992. – **5**. – P. 1054–1062.
  12. *Dube A., Bauer E., Bock C.* He-Ne laser irradiation protects B-lymphoblasts from UVA-induced DNA damage // *Radiat. Environ. Biophys.* – 2001. – **1**. – P. 77–82.
  13. *Vacca R.A., Marra E.* Passarella increase in cytosolic and mitochondrial protein synthesis in rat hepatocytes irradiated in vitro by He-Ne laser // *J. Photochem. Photobiol. B.* – 1996. – **3**. – P. 197–202.
  14. *Чудновский В.М., Леонова Г.Н., Скопинов С.А. и др.* Биологические модели и физические механизмы лазерной терапии. – Владивосток: Дальнаука, 2002. – 157 с.
  15. *Karu T.I.* Low-power laser therapy. – New York: CRC Press, 2003. – P. 4825–4841.
  16. *Гойда О.А.* Биофизические аспекты раннего онтогенеза животных. – К.: Наук. думка, 1993. – 224 с.
  17. *Бура М., Мандзинець С., Темник М. та ін.* Розвиток зародків і личинок в'юна *Misgurnus fossilis* L. за умов впливу низькоінтенсивного гелій-неонового випромінювання // *Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол.* – 2010. – Вип. 54. – С. 59–68.
  18. *Нейфах А.А.* Молекулярная биология процессов развития. – М.: Наука, 1977. – 311 с.
  19. *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.
  20. *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.
  21. *Tselevich M.V.* Features of the ultrastructure of loach embryos under the influence of norfloxacin // *Cytology and Genetics.* – 2008. – **42**, № 2. – P. 96–100.
  22. *Mandzynets S.M., Kulachkovskii O.R., Bura M.V.* Effect of avermectin on the ultrastructural characteristics of loach embryos // *Cytology and Genetics.* – 2011. – **46**, № 5. – P. 318–323.
  23. *Владимиров Ю.А.* Три гипотезы о механизме действия лазерного облучения на клетки и организм человека // *Эфферентная медицина: Сб. статей.* – М.: ИБМХ РАМН, 1994. – С. 51–67.
  24. *Головач Н.П., Тарновська А.В., Бура М.В. та ін.* Прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз зародків в'юна за дії низькоінтенсивного лазерного опромінення // *Фізика живого.* – 2009. – **17**, № 1. – С. 76–81.
  25. *Романюк М.С., Мандзинець С.М., Бура М.В., Санагурський Д.І.* Вплив низькоінтенсивного лазерного випромінювання різної експозиції на активність Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФази зародків в'юна впродовж раннього ембріогенезу // *Фотобіологія та фотомедицина.* – 2011. – № 1. – С. 76–83.
  26. *Мантейфель В.М., Дьячкова Л.Н., Кару Т.И.* Морфометрическое исследование дрожжевых клеток *Torulopsis sphaerica* после облучения светом He-Ne-лазера // *Цитология.* – 2002. – № 12. – С. 1205–1211.

Надійшла 05.11.12