

УДК 577.21;57.043.

ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНИЙ ГОМЕОСТАЗ ЗАРОДКІВ В'ЮНА ЗА ДІЇ НИЗЬКОІНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ОПРОМІНЕННЯ

Головчак Н.П., Тарновська А.В., Бура М.В., Романюк М.С., Санагурський Д.І.

*Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, м. Львів, Україна, 79005
e-mail: golovchak_nataly@ukr.net*

Надійшла до редакції 05.05.2009

На підставі проведених досліджень встановлено, що дія низькоінтенсивного лазерного опромінення призводить до порушення прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу зародків в'юна різних етапів розвитку. Проте, показано, що експозиція опромінення протягом 3 хвилин не впливає на рівень вільнорадикальних реакцій досліджуваних етапів розвитку зародка. Встановлено, що на етапі 64 бластомерів відбувається закономірне підвищення інтенсивності процесів перекисного окиснення ліпідів та підвищення активності ферментів антиоксидантної системи зародкових клітин.

Ключові слова: перекисне окиснення ліпідів, супероксиддисмутаза, каталаза, зародки в'юна.

ВСТУП

Одним із актуальних питань сучасної біофізики є дослідження процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) та впливу деяких чинників на їх інтенсивність. Вільнорадикальне окиснення ліпідів властиве всім тканинам аеробних організмів у мембранах і ліпопротеїнових структурах і є вироджено-розгалуженим ланцюговим процесом. Процеси ПОЛ поділяють на етапи: зародження ланцюгів, розвиток ланцюгових реакцій і їх розгалуження, обрив ланцюгів. На початковому етапі зародження ланцюгів із валентно-насичених молекул ліпідів у біологічних системах утворюються вільні радикали. Зародження ланцюгів з утворенням первинних радикалів R[•] відбувається за дії екзогенних фізичних або хімічних факторів, таких як іонізуюча радіація, ультрафіолетове випромінювання, ксенобіотики (токсини), та ін. [9]. Останнім часом в клінічній практиці широко застосовують низькоінтенсивне лазерне випромінювання (НЛВ). Проте механізм його дії залишається на рівні гіпотез, хоча відомо, що існує чітка залежність ефекту терапії від дози опромінення [1, 3, 6]. Окрім того, на сьогодні не з'ясовано є дія НЛВ на зародкові об'єкти. Тому, метою нашого дослідження було проаналізувати залежність дози випромінювання лазера на

інтенсивність процесів ліпопероксидації та відповідно активність ферментів антиоксидантної системи зародків в'юнів різних етапів розвитку.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дослідження проводили на зародках в'юна (*Misgurnus fossilis* L.) через 60, 210, 330 хв після запліднення яйцеклітин під час стадій, які відповідають першому дробленню зиготи (2 бластомери), шостому (64 бластомери), десятому (512 бластомерів). Овуляцію стимулювали внутрішньом'язовим введенням самкам хоріогонічного гонадотропіну (500 од.). Ікру одержували через 36 год після стимуляції та запліднювали в чашках Петрі суспензією сперміїв за Нейфахом [10]. Сім'яники одержували шляхом декапітації тварин та розтину черевної порожнини самців. Через 5-10 хв після запліднення відмиті зиготи інкубували у фізіологічному розчині Гольфретера (t=20-22 °C). Після запліднення зиготи опромінювали He-Ne лазером з довжиною хвилі 632,8 нм, за допомогою світловода (діаметр вихідної лінзи 1,2 мм), який знаходився на відстані 1 см від пробірки, з густиною потоку $1,5 \times 10^2$ Вт/м². Час опромінення становив: 1 хв, 3 хв та 5 хв після чого зиготи залишали розвиватися. За кожного дослідного часу опромінення на етапах

поділу 2 бластомери, 64 бластомери та X (512 бластомерів) поділі відбиралися проби (стадії розвитку контролювали візуально під бінокулярним мікроскопом МБС-9).

Зародки в'юна на різних стадіях розвитку гомогенізували за допомогою гомогенізатора Поттера-Ельвенгейма у розчині Гольтфрета. По 1 мл гомогенату кожної проби заморозували у морозильній камері при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, які в подальшому використовували для дослідження. Кількість білка у кожному зразку визначали за методом Лоурі.

У відібраних зразках визначали інтенсивність процесів ПОЛ за вмістом вторинного продукту ліпопероксидації – малонового діальдегіду (МДА) використовуючи метод Р.Р. Тимирбулаева [12]. Також вмірювали активність ферментів антиоксидантної системи – супероксиддисмутази (СОД) за методом В.А. Костюка [8] та каталази (КАТ) за методом М.А. Королюка [7].

Для визначення вмісту МДА до 0,1 мл гомогенату зародків (розведення 1:1) додавали 3 мл 10 мМ К-На фосфатного буфера, приготованого на 125 мМ КСІ (рН=7,4) та 0,5 мл 1 мМ КМnO₄. Для індукції ПОЛ двічі з інтервалом у 10 хв додавали 10 мМ FeSO₄. Реакцію припиняли за допомогою 20% ТХО, відцентрували. До 2 мл супернатанту додавали 0,5 мл 1н НСІ і 1 мл 0,7 мМ ТБК та інкубували на водяній бані при температурі 95-100 °С протягом 20 хв. Після охолодження додавали 3 мл бутанолу, центрифугували протягом 10 хв при 1500 g [11, 12]. Екстинкцію вимірювали у верхньому бутаноловому шарі при $\lambda=532\text{ нм}$. Обчислення виконували за формулою:

$$[МДА] = \frac{E \cdot V_1 \cdot V_2}{\varepsilon \cdot V \cdot C} \text{ мкмоль/мг білка};$$

де [МДА] – вміст МДА; E – екстинкція дослідної проби; ε – молярний коефіцієнт екстинкції, рівний $156000\text{ М}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$, в розрахунках використовували значення мілімолярного коефіцієнта екстинкції, виражене як $156\text{ см}^2/\text{мкмоль}$; V_1 – об'єм бутанолу; V_2 – об'єм проби; V – об'єм супернатанту; C – концентрація білка в супернатанті.

Активність СОД вимірювали додаючи у дослідну пробу 1 мл реактиву С, який містив рівні об'єми 0,08 мМ ЕДТА та 0,1 М фосфатного буферу (рН=7,8) доведеного до рН \geq 10 ТЕМЕДом; 2,3 мл дистильованої Н₂O; 0,1 мл гомогенату (розведеного 1:1000) та 0,1 мл 1,4мкМ кверцетину приготованого на диметилсульфоксиді та розведеним гарячій дистильованій воді у відношенні 1:10. Холоста проба містила 1 мл реактиву С 2,4 мл дистильованої Н₂O, 0,1 мл кверцетину [8]. Вимірювання проводили на спектрофотометрі при $\lambda=406\text{ нм}$ зразу після додавання кверцетину та через 20 хв. Розрахунок здійснювали за формулою:

$AKT_{СОД} = [(D' - D''/D') \cdot 100] \cdot 29,49\text{ од.акт/хв мг білка}$;
де $AKT_{СОД}$ – активність супероксиддисмутази, $D' = E_{\text{к вих.}} - E_{\text{дослід}} 20\text{ хв}$, $D'' = E_{\text{досл вих.}} - E_{\text{досл}} 20\text{ хв}$, D – значення оптичної густини; E – екстинкція.

При визначенні активності КАТ каталазну реакцію запускали додаванням 0,1 мл гомогенату (розведеним у відношенні 1:10) та 2 мл 0,03% розчину Н₂O₂. Холоста проба містила 1 мл 4% розчину молібдату амонію та 2 мл 0,03% мл Н₂O₂, 1 мл 0,25н Н₂SO₄ та 0,1 мл гомогенату. Реакцію у дослідній пробі припиняли через 10 хв додаванням 1 мл 0,25н Н₂SO₄ та 1 мл 4% розчину молібдату амонію, приготованого на 0,025н Н₂SO₄. Проби центрифугували 10 хв при 10000 g. Кількість утвореного забарвленого комплексу у холостій та дослідній пробах визначали фотометрично при довжині хвилі 410 нм [7, 11]. Активність КАТ визначали за формулою:

$$A_{КАТ} = \frac{\Delta E \cdot V \cdot n}{\varepsilon \cdot C \cdot t \cdot \alpha \cdot l} \text{ мкмоль Н}_2\text{O}_2/\text{хв мг білка},$$

де $A_{КАТ}$ – активність КАТ, ΔE – різниця екстинкції холостої та дослідної проб; V – загальний об'єм суміші в кюветі; n – розведення вихідного екстракту; ε – молярний коефіцієнт екстинкції комплексу Н₂O₂ з молібдатом амонію рівний $22200\text{ М}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$, в розрахунках використовували значення мілімолярного коефіцієнта екстинкції $22,2\text{ см}^2/\text{мкмоль}$; C – концентрація білка в гомогенатах; t – час реакції; α – об'єм екстракту; l – довжина оптичного шляху.

Дані досліджень обробляли статистично з вираховуванням середніх арифметичних величин M , середньої квадратичної похибки σ та відхилення від середнього арифметичного m між показниками. Статистичну обробку усіх даних результатів досліджень проводили з використанням програми „Excel-2003” для Windows.

Для оцінки достовірності різниці між статистичними характеристиками двох альтернативних сукупностей даних обраховували коефіцієнт Стюдента. Достовірною вважалася різниця при показнику достовірності $p \geq 0,95$ (або рівні значимості $P < 0,05$), $p \geq 0,99$ (або рівні значимості $P < 0,01$), $p \geq 0,999$ (або рівні значимості $P < 0,001$). Результати обробки виводилися у вигляді рисунків.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Нами встановлено, що однохвилинне опромінення лазером з довжиною хвилі 632.8 нм призводить до порушення природного вмісту МДА зародків в'юна як на етапі двох бластомерів, 64 бластомерів, так і на X поділ (512 бластомерів). Ці результати підтверджуються даними літератури щодо інтенсифікації процесів ПОЛ при однохвилинному

опроміненні зародкових клітин [13]. 3-хвилинне опромінення не спричинює зміни процесів ліпопероксидації. При експозиції 5 хв НІЛВ викликає достовірне підвищення вмісту МДА (на 13 % відносно контролю) лише на етапі двох бластомерів. Ймовірно, ранні етапи розвитку зародка є чутливими до такої високої дози опромінення (рис. 1).

Позитивна стимулююча дія НІЛВ проявляється, як правило, у вузькому інтервалі доз, а потім зникає або навіть змінюється негативною дією [1, 3, 6]. В нашому випадку найкращою дозою, яка не призвела до посилення процесів вільнорадикальних реакцій у зародках різних етапів розвитку, була експозиція 3 хв.

За час експозиції 1 хв на етапі двох бластомерів на фоні різкого підвищення вмісту МДА (на 30 %) відбувається достовірне зниження активності ферментів СОД (на 80 %) та КАТ (на 44 %). Проте однохвилинне опромінення зародків в'юна на стадії 64 бластомерів достовірно ініціює зростання активності СОД (на 29 %), тоді як інтенсивність процесів ПОЛ демонструє тенденцію зростання на 15 % (рис. 1, 2, 3, 4).

На Х поділ (512 бластомерів) за експозиції 1 хв НІЛВ відбувається достовірне зниження вмісту МДА (на 17 %), спадання активності ферменту СОД (на 24 %) та зростання активності КАТ (на 13 %).

Наведені дані дозволяють зробити висновки, що опромінення протягом 1 хв призводить до дисбалансу прооксидантно-антиоксидантної системи зародкових клітин, а, ймовірно, і до пошкодження мембранних структур. Відомо, що зрив антиоксидантного захисту внаслідок будь-якого зовнішнього впливу викликає посилення вільнорадикального окислення, що супроводжується зміною конформації ліпідів і призводить до порушення структурних і функціональних властивостей біомембран, підвищенню їхньої лабільності й проникності, розбалансуванню ферментних систем мембран та ін. [4].

3 хвилинне опромінення, як вже зазначалося, не змінює природного вмісту МДА зародків в'юна, проте приводить до достовірного зростання активності СОД на 24 % на етапі 64 бластомерів. Нами також відмічено зниження активності СОД (на 79 %) на Х поділ (512 бластомерів) тоді як активність КАТ достовірно зростає відносно контролю на 73 %. Потрібно зазначити, що на етапі 2 бластомерів також відбувається підвищення активності КАТ на 63 %. Ймовірно, 3-хвилинна експозиція НІЛВ позитивно впливає на фермент КАТ і пояснення цьому потрібно шукати у його структурі. H_2O_2 утворюється не тільки при дії СОД, а й у інших реакціях (наприклад, у ланцюзі вільнорадикального окиснення ліпідів) на яку і реагує КАТ.

Загалом 3-хвилинне опромінення найкраще впливає на інтенсивність процесів ПОЛ, а також не значно стимулює активність ферментів антиоксидантного захисту якщо не враховувати Х поділу (512 бластомерів) (можливо це пов'язано з критичними етапами розвитку зародка), що є позитивним для збереження прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу, адже відомо що значне підвищення активності ферментів антиоксидантної системи можуть ініціювати зростання вільнорадикальних реакцій [9].

5 хвилинне опромінення призводить до різкого достовірного зниження активності СОД (на 44 %) на етапі 2 бластомерів, та достовірного зростання активності КАТ (на 170 %). Слід зазначити, що вміст МДА на цьому етапі розвитку підвищувався на 13 %.

При дії лазерних променів протягом 5 хв на етапі 64 бластомерів зародків в'юна лише активність СОД достовірно зростала на 70 %. За такої дози опромінення на Х поділ (512 бластомерів) зародка зафіксовано пониження (на 32 %) активності СОД та достовірне пониження активності КАТ на 42%.

Потрібно зазначити, що етап розвитку 64 бластомерів виявився найбільш пластичним щодо протікання процесів ПОЛ та активності СОД, КАТ за різних часових експозицій НІЛВ. Це, ймовірно, пов'язано з тим, що на такому етапі розвитку кожний бластомер зберігає ще здатність до перетворення в будь-яку клітину організму (диференціації) і усі клітини зародка функціонують однаково, синхронно.

Проаналізувавши досліджувані дані системи антиоксидантного захисту нами зауважено, що фермент СОД є дуже чутливим до дії НІЛВ. Це добре видно на етапі 2 бластомерів та Х поділу (512 бластомерів), де активність його спадає за всіх часових експозицій. Нами також відмічено зв'язок між активністю СОД та активністю КАТ: при зростанні активності одного ферменту активність іншого спадає (рис. 4, 5). Відомо, що СОД і КАТ здатні перехоплювати активні форми кисню [5], і ймовірно, за таких умов відбувається конкуренція в активності досліджуваних ферментів-антиоксидантів.

Зростання інтенсивності процесів ПОЛ, а також зміни конкурентного характеру у активності СОД та КАТ підтверджують гіпотезу дії НІЛВ. Дана гіпотеза твердить, що хромофорами в червоній області спектру можуть бути молекули ферментів СОД, КАТ, а також молекулярний кисень, в якому відбувається фотозбудження з утворенням синглетного кисню [2, 5].

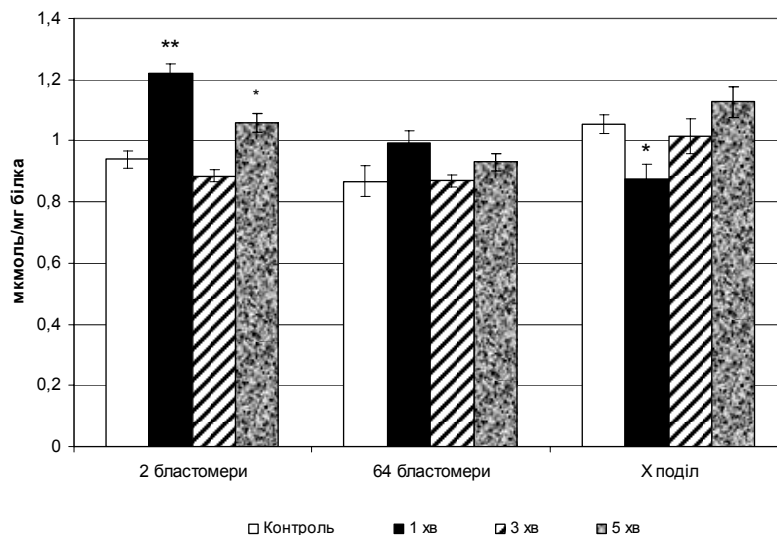


Рис. 1. Вміст МДА окремих етапів розвитку зародків в'юна при дії НІЛВ різних доз експозиції (* – $p \geq 0,95$; ** – $p \geq 0,99$).

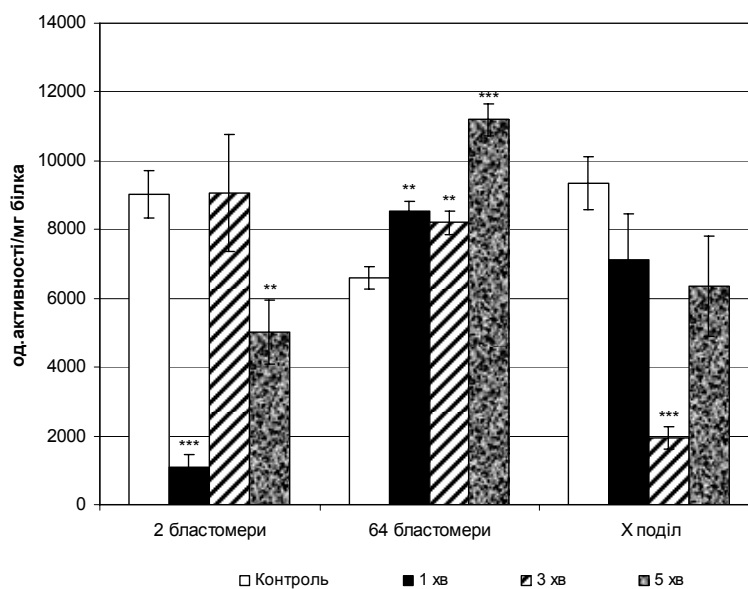


Рис. 2. Активність СОД окремих етапів розвитку зародків в'юна при дії НІЛВ різних доз експозиції (** – $p \geq 0,99$; *** – $p \geq 0,999$).

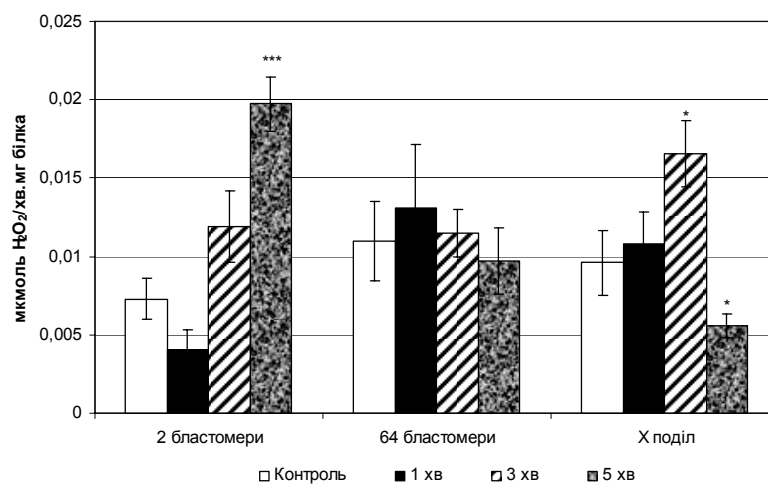


Рис. 3. Активність КАТ окремих етапів розвитку зародків в'юна при дії НІЛВ різних доз експозиції (* – $p \geq 0,95$; *** – $p \geq 0,999$).

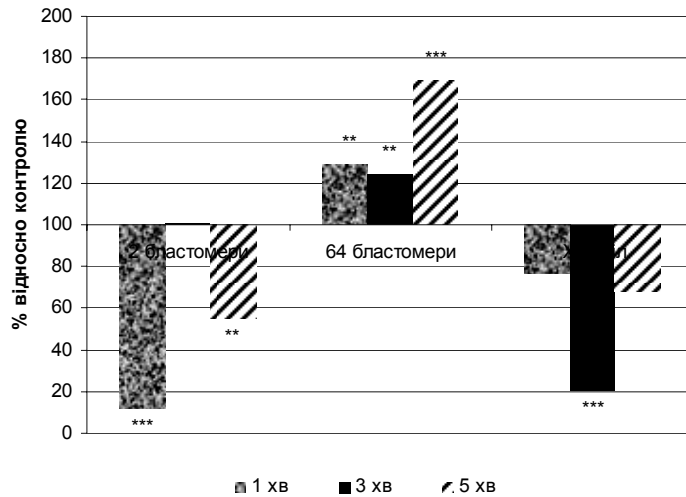


Рис. 4. Зміна активності СОД на окремих етапах розвитку зародків в'юна при дії НІЛВ різних доз експозиції (контроль прийнято за 100 %) (** – $p \geq 0,99$; *** – $p \geq 0,999$).

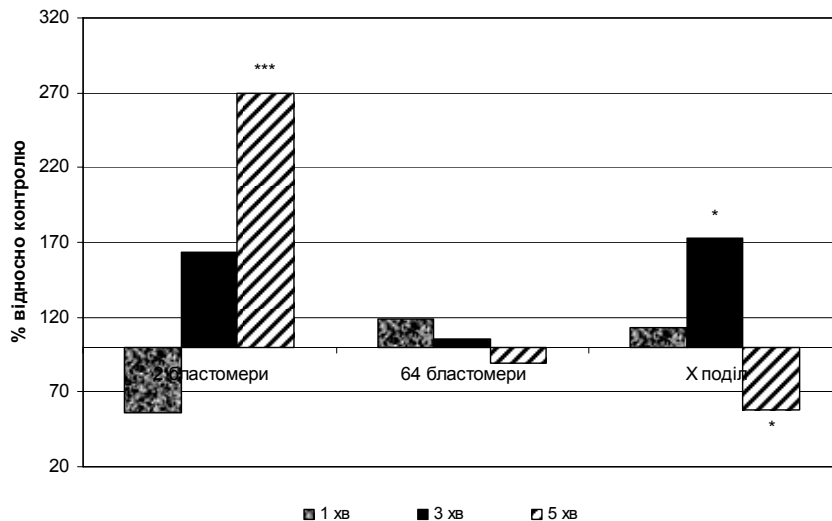


Рис. 5. Зміна активності КАТ на окремих етапах розвитку зародків в'юна при дії НІЛВ різних доз експозиції (контроль прийнято за 100 %) (* – $p \geq 0,95$; *** – $p \geq 0,999$).

ВИСНОВКИ

1. Оптимальним для зародків в'юна є трихвилинне опромінення при якому інтенсивність процесів ПОЛ не підвищується, а активність ферментів незначно зростає.

2. На етапі поділу 64 бластомерів різні дози експозиції приводять до закономірного підвищення вмісту МДА та активності ферментів СОД і КАТ. Зародки на стадії 64 бластомерів, ймовірно мають більш виражені адаптаційні можливості і є більш пластичними.

3. Лазерне опромінення негативно діє на фермент СОД, про що свідчить зниження активності ферменту за різного часу експозиції зародків в'юна.

4. Зростання інтенсивності процесів ПОЛ, зміни активності СОД та КАТ конкурентного характеру підтверджують гіпотезу дії НІЛВ.

Література

1. Ernst E., Fialka V. Low-dose laser therapy: critical analysis of clinical effects // Schweiz-Med-Wochenschr. – 1993. – Vol. 123. – P. 949-954.
2. Tiina Karu Primary and secondary mechanisms of action of visible and near infra red radiation on ceis // J.Photochem Photobiol. – 1999 - Vol.49, №1. - P.1-17.
3. Барбараш О.Л., Марціян А.А., Шейбак Т.В., Чукаєва І.І., Корочки І.М., Сырнев А.А. Стресс-модулирующие эффекты лазеротерапии у больных ишемической болезнью сердца // Тер. Архив. – 1996. – № 12. – С. 50–53.
4. Говта Л. Загальний механізм патології // Донецький вісник наукового товариства ім. Шевченка. Т. 20. Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції «Медико-біологічні студії екосистем», 4-5 січня 2008, Донецьк. - С. 6-24.
5. Егоров С.Ю., Таубер А.Ю., Красновский А.А., Нижник А.Н., Нокаль А.Ю., Миронов А.Ф.

- Фотогенерація синглетного молекулярного кисню компонентами производного гематопорфірина // Бюлл. експ. биол. мед. – 1989. – Т. 108, №10. – С. 440–442.
6. *Зверева К.В., Грунина Е.А.* Отрицательные эффекты низкоинтенсивной лазерной терапии при ревматоидном артрите // Тер. Архив. – 1996. – № 5. – С. 22–24.
7. *Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г.* Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
8. *Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.М.* Простой и чувствительной метод определения СОД, основанный на реакции окисления кверцетина // Вопросы мед. химии. – 1990. – Т. 36, № 2. – С. 88–91.
9. *Меньщикова Е.Б.* Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. – М.: Фирма «Слово», 2006. – 556 с.
10. *Нейфах А.А., Тимофеева М.Я.* Проблемы регуляции в молекулярной биологии развития. – М.: Наука, 1978. – 336 с.
11. *Сибірна Н.О., Маєвська О.М., Барська М.Л.* Дослідження окремих біохімічних показників за умов оксидативного стресу Навчально-методичний посібник. – Л.: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2006. – 58 с.
12. *Тимирбулаев Р.Р., Селезнев Е.И.* Метод повышения интенсивности свободнорадикального окисления липидосодержащих компонентов крови и его диагностическое значение // Лаб. дело. – 1981. – № 4. – С. 209–211.
13. *Якименко И., Бссулин В., Бессарабок Б.* Эффективность облучения яиц красным лазерным светом // Птицеводство. – 2002. – №4. – С. 10–12.

ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНИЙ ГОМЕОСТАЗ ЗАРОДЫШЕЙ В'ЮНА ПРИ ДЕЙСТВИИ НИЗЬКОІНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ОБЛУЧЕНИЯ

Головчак Н.П., Тарновская А.В., Бура М.В., Романюк М., Санагурский Д.И.

В результате проведенных исследований установлено нарушение прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза зародышей вьюна разных этапов развития, которое вызвано действием низкоинтенсивного лазерного облучения. Показано, что экспозиция облучения на протяжении 3 минут не влияет на уровень свободнорадикальных реакций исследованных этапов развития зародыша. Установлено, что на этапе 64 бластомеров совершается закономерное увеличение интенсивности процессов перекисного окисления липидов и увеличение активности ферментов антиоксидантной системы зародышевых клеток.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, супероксиддисмутаза, каталаза, зародыши вьюна.

PROOXIDANT-ANTIOXIDANT HOMEOSTASIS OF EMBRYOS LOACH AT THE ACTIONS OF LOW INTENSIVE OF LASER IRRADIATION

Holovchak N.P., Tarnovska A.V., Byra M.V., Romaniyk M., Sanahursky D.I.

It is set on the basis of the conducted researches that the action of low intensive of laser irradiation results in violation of prooxidation-antioxidation homeostasis of embryos of loach of the different stages of development. However, it is rotined that the display of irradiation during 3 minutes does not influence on the level of free radicals reactions of the investigated stages of development of embryo. It is set that on the stage of 64 blastomeres there is an appropriate increase of intensity of processes of peroxidation of lipid and increase of activity of enzymes of the antioxidant system of embryonic cells.

Key words: peroxidation of lipid, superoxide dismutase, catalase, embryos loach.