

ВПЛИВ НИЗЬКОІНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НА АКТИВНІСТЬ Na^+ , K^+ -АТФАЗИ ЗАРОДКІВ В'ЮНА ВПРОДОВЖ РАНЬОГО ЕМБРІОГЕНЕЗУ

Романюк М.С., Мандзинець С.М., Бура М.В., Санагурський Д.І.

Львівський національний університет ім. Івана Франка,
вул. Грушевського, 4, м. Львів, 79005 Україна,
e-mail: myrosik.R@gmail.com, mcelevyach@yahoo.com

*Досліджено вплив експозиції (1, 3 або 5 хв.) низькоінтенсивного лазерного випромінювання (НЛІВ) на активність Na^+ , K^+ -АТФази зародків в'юна (*Misgurnus fossilis* L.) упродовж раннього ембріогенезу. За умов опромінення ембріонів *in vitro* встановлено достовірне зниження активності Na^+ , K^+ -АТФази зародків упродовж синхронних поділів бластомерів. НЛІВ не чинило вираженого впливу *in vivo* на АТФазну активність зародків упродовж раннього ембріогенезу. Відмічено, що при експозиції НЛІВ 3 хв *in vivo* властиво відсутній інгібіторний ефект, оскільки активність Na^+ , K^+ -АТФази зародків не відрізнялася від контролю. Результати дисперсійного аналізу впливу НЛІВ різної тривалості на активність Na^+ , K^+ -АТФази протягом раннього періоду розвитку зародків в'юна в усіх випадках підтвердили залежність активності цього ферменту від дії лазеру. Водночас залежність АТФазної активності від фактора тривалості розвитку зародків не підтверджено. Отримані дані засвідчують значний модулюючий та додозалежний регуляторний потенціал монохроматичного світла по відношенню до біологічних систем, що розвиваються.*

Ключові слова: лазер, Na^+ , K^+ -АТФаза, зародки в'юна, *in vivo*, *in vitro*, біологічний ефект, дисперсійний аналіз.

Вступ

На сьогодні в медицині все більша увага приділяється активації життєвих процесів при лазерному опроміненні, яку називають терміном біостимуляція [25]. Ефекти впливу низькоінтенсивного лазерного випромінювання (НЛІВ) досліджували на багатьох біологічних об'єктах на молекулярному, клітинному та органному рівнях [11, 17]. Так, опромінення НЛІВ з довжиною хвилі 632,8 нм у дозі 460 Дж/м² дріжджових клітин прискорює їхній поділ [10], збільшує кількість мітохондрій у клітинах; при цьому змінюється форма перших, що встановлено мікроскопічним дослідженням. Опромінення клітин *Esherichia coli* НЛІВ прискорює їхній поділ, швидкість якого прямо пропорційно залежить від дози опромінення [18, 20].

Багатьма вченими виявлено захисний вплив лазерного опромінення клітин HeLa в разі дії на них γ -променів [6, 19], а також посилення міжклітинних контактів таких клітин у разі диспергування їх після опромінення монохроматичним

світлом [5]. Введення мелатоніну в суспензію клітин HeLa зменшує їхню адгезію, а опромінення інфрачервоним світлом з довжиною хвилі 760-840 нм (щільність енергії 52 Дж/м²) відновлює її до контрольного рівня [17]. За дії світла гелій-неонового лазера посилюється синтез РНК, що показано в дослідях на лейкоцитах [23], відбувається захист РНК В-лімфоцитів від дії УФ-променів [13, 24] та посилення синтезу клітинних і мітохондріальних білків гепатоцитів [26]. Показовими є експериментальні дані щодо впливу НЛІВ на ізольовану нервову тканину [14]: виявлено, що за опромінення лазером відбувається прискорення на 85% росту аксонів нервових клітин. Також відзначено, що за допомогою НЛІВ можна змінювати напрямок росту нервового волокна.

Показано, що на ізольованому нейроні виноградного слимака НЛІВ впливає на мембранний потенціал дії, збільшуючи його амплітуду та зменшуючи частоту, при цьому цей ефект чітко корелює з довжиною хвилі і найбільш виражений ефект виявлено в діапазоні хвиль від 540 до 632,8

нм [21]. Випромінювання He-Ne лазера збільшувало проліферацію шванівських клітин [27], стимулювало поділ астроцитів і активувало синтез макроергів [16].

З'ясування механізмів регуляції поділу клітин – один з важливих напрямків досліджень сучасної біології. Особливої уваги заслуговують зародкові клітини – бластомери, початкові стадії дроблення яких є чітко синхронізованим ритмічним процесом, що протікає з максимальною швидкістю для кожного виду тварин [3]. Вплив НІЛВ на іон-транспортні системи зародкових клітин є актуальною проблемою, оскільки зміни електрофізіологічних показників їх мембран у період ембріогенезу, з одного боку, тісно пов'язані із системами мембранного транспорту, а з другого, – з функціональним станом цілого організму, що може істотно впливати на його подальший розвиток.

Механізми біологічної дії лазерного випромінювання вивчені ще недостатньо. На сьогодні найбільш обґрунтованою є гіпотеза про те, що механізм дії НІЛВ може бути опосередкованим структурами цитоплазматичної мембрани за рахунок поглинання квантів фотоакцепторними молекулами, що насамперед призведе до активації біохімічних реакцій в клітині [12]. Отримані дані по впливу НІЛВ (тривалістю 1, 3 та 5 хв) на прооксидантно-антиоксидантний баланс зародків упродовж ембріогенезу [4], а також зміни морфології зародків та личинок [2] свідчать про вагомий вплив випромінювання гелій-неонового (He-Ne) лазера на фізіологічний стан клітин. Однак відомості про зміни функціонування за умов впливу НІЛВ мембранопов'язаних ферментів, зокрема, АТФ-гідролаз, є мало чисельними.

Тому, враховуючи, що зародки в'юна (*Misgurnus fossilis L.*) у період раннього ембріогенезу є зручною адекватною тест-системою для дослідження впливу різних фармакологічних, фізичних та хімічних [3] чинників на живі організми, мета нашої роботи полягала у дослідженні характеру змін активності Na^+ , K^+ -АТФази зародків в'юна за дії НІЛВ упродовж 1, 3 та 5 хв. після запліднення.

Матеріали та методи

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

вали і запліднювали за Нейфахом [3]. Овуляцію стимулювали внутрішньом'язовим введенням самкам хоріогонічного гонадотропіну (500 од.). Ікру одержували через 36 год. після стимуляції. Сім'яники отримували після декапітації та розтину черевної порожнини самців [7]. Ікру запліднювали в чашках Петрі суспензією сперміїв. Через 5-10 хв. після запліднення зиготи відмивали та інкубували при температурі 20-22°C.

Зародки та личинки в'юна в умовах контролю інкубували у фізіологічному розчині Гольфрета наступного складу (ммоль/л): CaCl_2 - 1,8, NaCl - 110, KCl - 1,4, Tris-HCl - 5. В умовах досліду зародки опромінювали He-Ne лазером з довжиною хвилі 632,8 нм упродовж 1, 3 та 5 хв. відразу після запліднення й інкубували у розчині Гольфрета. Зародки опромінювали за допомогою світловода (діаметр вихідної лінзи 1,2 мм), який знаходився на відстані 1 см від пробірки, з густиною потоку потужності $1,5 \times 10^2$ мВт/см² (рис. 1). Спостереження за зародками й личинками здійснювали за допомогою бінокулярного мікроскопа МБС-9 з фотографічною приставкою.

Для проведення біохімічних досліджень зародки відбирали через 60, 150, 210, 270 і 330 хв. розвитку після запліднення яйцеклітин під час стадій, які відповідають першому дробленню зиготи (2 бластомери), четвертому (16 бластомерів), шосто-

му (64 бластомери), восьмому (256 бластомерів) та десятому (1024 бластомери). Експерименти проводили за двох умов: *in vitro* – фракцію бластомерів зародків опромінювали на відповідній стадії у ході досліду, *in vivo* – опромінювали відразу після запліднення, і зразки відбирали на відповідній стадії розвитку.

Мікросомну фракцію мембран зародків в'юна одержували методом диференційного центрифугування у градієнті густини сахарози [8]. Спочатку зародки гомогенізували в буферному розчині такого складу (ммоль/л): сахароза – 120,0; KCl – 130,0; MgCl_2 – 5,0; Tris-HCl – 10,0 (pH 7,4; 4°C). Потім рештки зародкового жовтка осаджували центрифугуванням (10 хв., 1600 g). Збагачену фрагментами плазматичної та ретикулярної мембран надосадову рідину, одержану після 10-хвилинного центрифугування при 10000 g, зберігали при температурі -20°C [8].

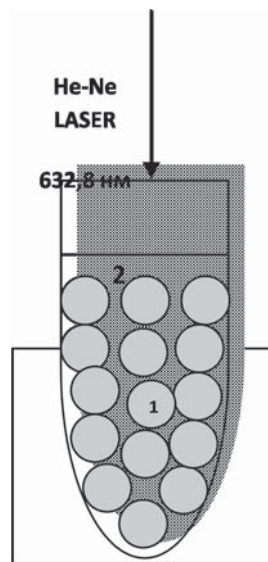


Рис. 1. Схема опромінювання зародків в'юна в розчині He-Ne-лазером:
1 – зародки,
2 – пробірка з фізіологічним розчином.

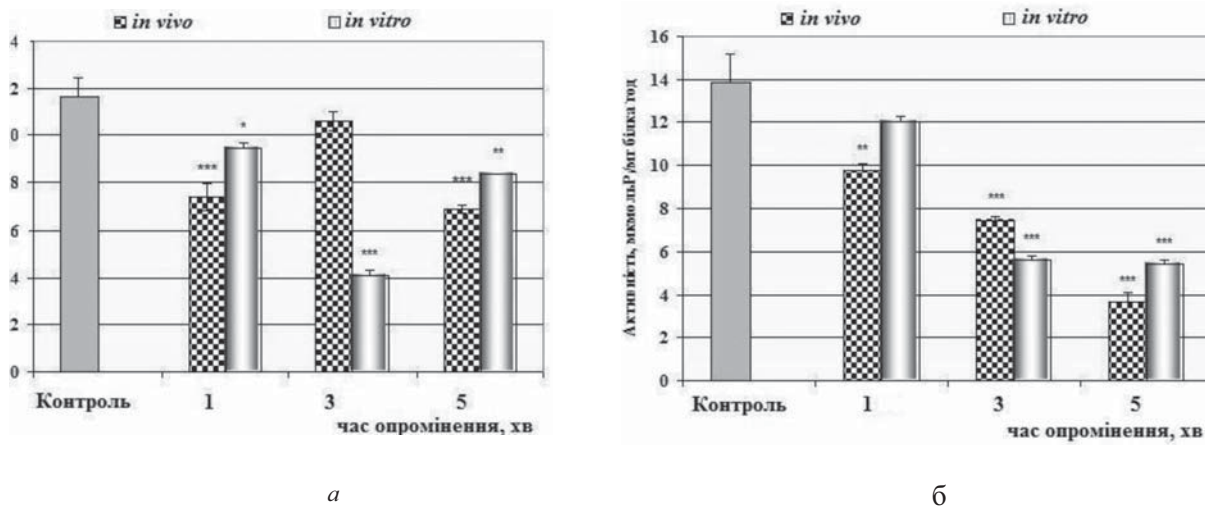


Рис. 2. Зміни активності Na^+ , K^+ -АТФази зародків в'юна за дії НІЛВ з різною експозицією на стадіях 2 (а) та 16 бластомерів (б); * – $p > 0,95$; ** – $p > 0,99$; *** – $p > 0,999$ – тут і надалі вірогідні зміни порівняно із контролем ($n=9$).

Активність Na^+ , K^+ -АТФази (КФ 3.6.1.37) (в мкмольх P_i /год. на 1 мг білка) клітин на різних стадіях бластуляції оцінювали за різницею вмісту неорганічного фосфату (P_i), утвореного в середовищі інкубації за наявності та відсутності в ньому фрагментів мембран, а також з урахуванням поправки на вміст у мембранному препараті ендогенного P_i . Кількість продукту реакції P_i тестували модифікованим методом Фіске-Суббароу [15], а вміст білка в мембранному препараті – методом О.Н.Lowry et al. [22].

У дослідженнях використовували реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації х. ч. або зарубіжного виробництва EGTA, NaN_3 (Merk, Німеччина); убаїн (Fluka, Швейцарія); АТР (Acros, Бельгія); Tris, тапсигаргін (Sigma, США). Вірогідність різниці одержаних показників з контролем визначали за t -критерієм Стьюдента.

Результати та їх обговорення

У результаті проведених досліджень встановлено, що дія НІЛВ різної тривалості (1, 3 та 5 хв.) призводить до змін активності Na^+ , K^+ -АТФази протягом ранніх стадій розвитку зародків в'юна. На стадії розвитку 2 бластомерів вплив НІЛВ *in vivo* тривалістю 1 хв. (рис. 2, а) зумовлює зниження активності Na^+ , K^+ -АТФази до значень $7,4 \pm 0,2$ мкмоль P_i /год. на 1 мг білка, тобто активність ферменту знизилася на $36,3 \pm 0,8\%$. Дещо відмінний вплив НІЛВ виявлено за умов *in vitro* – активність досліджуваної АТФази знизилася на $18,6 \pm 0,7\%$. Дія НІЛВ тривалістю 3 хв. *in vivo* (див. рис. 2, а) спричиняє недостовірне зниження Na^+ , K^+ -АТФазної активності у порівнянні з контролем (на $7,7 \pm 0,1\%$), тоді як в умовах *in vitro* встановлено достовірний інгібуючий вплив НІЛВ. У випад-

ку експозиції випромінювання 5 хв. як в умовах *in vivo*, так і *in vitro* (рис. 2, а) АТФазна активність зародків складає $65,5\%$ від контролю і становить $7,6 \pm 0,2$ мкмоль P_i /год. на 1 мг білка.

Тобто за умов різної експозиції на першій годині розвитку бластомерів виявлено достовірний інгібуючий вплив НІЛВ на активність досліджуваної АТФази зародків, що ймовірно пов'язано з високою чутливістю Na^+ , K^+ -АТФази зародків на цій стадії розвитку.

Подібні зміни активності Na^+ , K^+ -АТФази зародків в'юна за дії НІЛВ виявлено на стадії розвитку 16 бластомерів (рис. 2, б). Встановлено, що тривалість експозиції прямо пропорційно зменшує активність досліджуваної АТФази зародків: чим більша тривалість дії лазера, тим нижча питома активність АТФази зародків. Слід зазначити, що рівень активності Na^+ , K^+ -АТФази зародків за умов дослідження *in vivo* достовірно не відрізняється від питомих значень активності АТФази за умов *in vitro* при різній тривалості дії НІЛВ. Лише 1-хвилинна експозиція випромінювання *in vitro* не викликає достовірних змін досліджуваної АТФ-гідролази.

На стадії розвитку 64 бластомерів, як й на попередній стадії розвитку зародків, дія випромінювання з експозиціями 1 та 5 хв. *in vivo* (рис. 3, а) веде до достовірних змін активності Na^+ , K^+ -АТФази мембран зародків в'юна (відмічено зниження активності мембранного ферменту у порівнянні з контролем). Опромінювання з тривалістю 3 хв. призводить до того, що на цій стадії активність досліджуваного мембранного ферменту зародків *in vivo* (рис. 3, а) практично не змінюється у порівнянні з контролем і становить $99,13\%$ від останнього.

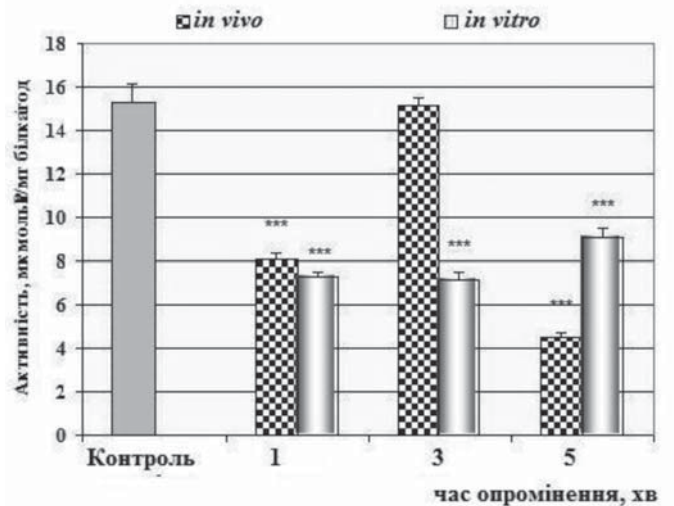
На відміну від змін активності АТФ-гідролази в умовах *in vivo*, при опроміненні зародків за різної тривалості НЛІВ на стадії 64 бластомерів (*in vitro*) активність Na^+ , K^+ -АТФази зародкових мембран достовірно знижувалася і становила в середньому $7,9 \pm 0,3$ мкмоль P_i /год. на 1 мг білка.

Подібні зміни активності АТФази в умовах *in vitro* за різної тривалості дії НЛІВ виявлено на стадії 8 поділу бластомерів (рис. 3, б). Активність при 1-хвилинній експозиції опромінення знижувалася до рівня $8,7 \pm 0,2$ мкмоль P_i /год. на 1 мг білка і не змінювалася при збільшенні тривалості опромінення зародків. Тоді як для активності Na^+ , K^+ -АТФази зародків за дії НЛІВ *in vivo* виявлено дозозалежний ефект впливу досліджуваного випромінювання.

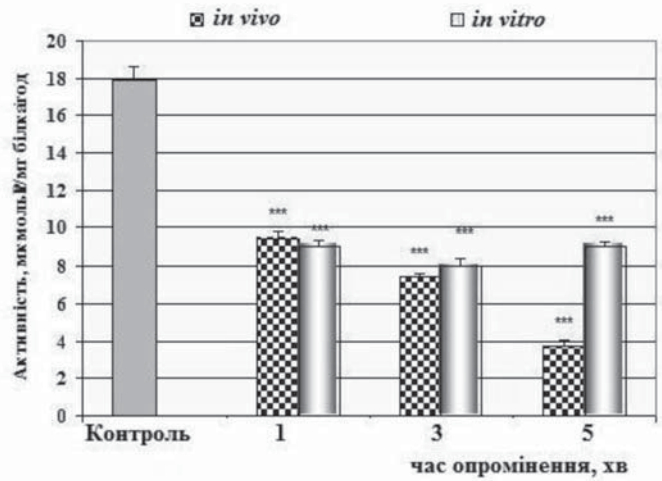
На останній з досліджуваних стадій розвитку зародків в'юна (10-й поділ, 330 хв.) вплив лазерного опромінення на функціонування Na^+ , K^+ -АТФази *in vitro* має подібний характер, як і на попередній досліджуваній стадії розвитку. При дії НЛІВ тривалістю 1 хв. (рис. 3, в) Na^+ , K^+ -АТФазна активність *in vitro* знижується на $47,4 \pm 1,6\%$ у порівнянні з контролем, і становить $10,6 \pm 0,2$ мкмоль P_i /год. на 1 мг білка. Як 3-хвилинна, так і 5-хвилинна експозиція НЛІВ *in vitro* (рис. 3, в) веде до незначного достовірного зниження активності досліджуваного мембранного ферменту в середньому на $54,6 \pm 1,8\%$ у порівнянні з контролем.

Як видно з рис. 3, в, в умовах впливу НЛІВ *in vivo* з 1- та 5-хвилинною експозицією на відповідному періоді розвитку зародків у ході дослідження встановлені аналогічні зміни Na^+ , K^+ -АТФазної активності зародкових мембран - достовірно інгібування роботи АТФ-гідролази. Найбільш виражений інгібуючий вплив на ферментативну активність Na^+ , K^+ -помпи зародків в'юна спостерігається за впливу НЛІВ з тривалістю 5 хв. *in vivo* (рис. 3, в). Така дія призводить до значного достовірного зниження Na^+ , K^+ -АТФазної активності зародків у середньому на $31,6 \pm 0,7\%$ у порівнянні з контролем; вона становить $10,8 \pm 0,3$ мкмоль P_i /год. на 1 мг білка.

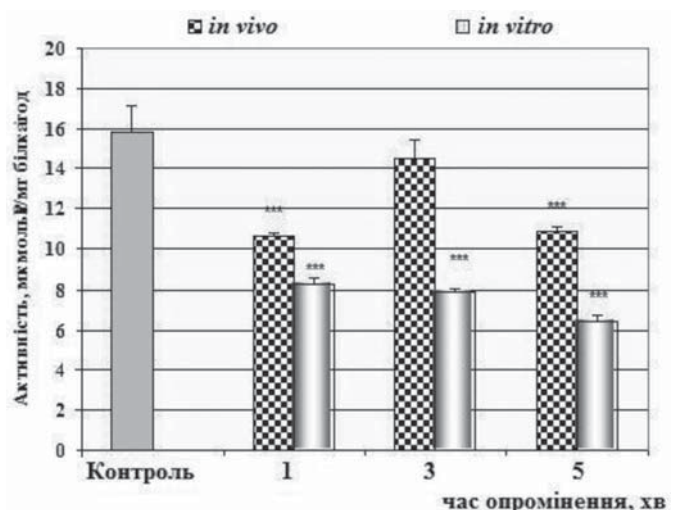
Слід відмітити, що для НЛІВ з тривалістю 3 хв *in vivo* властиво відсутній інгібіторний ефект, оскільки активність Na^+ , K^+ -АТФази зародків не відрізнялася від контролю. Отримані результати підтвер-



а



б



в

Рис. 3. Зміни активності Na^+ , K^+ -АТФази зародків в'юна за дії НЛІВ різної експозиції на стадіях 64 бластомерів (а), 8 (б) та 10 (в) поділах бластомерів

джуються морфологією зародків, які піддавалися опроміненню впродовж 3 хв. – вона майже не відрізнялася від контрольних зародків [2]. Подібні результати описані у роботі [28]: показано, що у разі опромінення світлом із довжиною хвилі 670 нм культури нервових клітин, в яких активність цитохром с-оксидази знижена внаслідок додавання тетродотоксину, відбувається підвищення активності ферменту до контрольного рівня.

Загалом 3-хвилинне опромінення найкраще впливає на інтенсивність процесів перекисного окислення ліпідів, а також незначно стимулює активність ферментів антиоксидантного захисту, якщо не враховувати 10 поділу (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 може ініціювати зростання активності вільнорадикальних реакцій [4].

Отже, можна припустити, що для дії НІЛВ властива здатність модулювати динамічні процеси в цитоплазматичній мембрані зародків за рахунок поглинання квантів фотоакцепторними молекулами, що призводить до конформаційних змін мембранозв'язаних ферментів (в свою чергу й АТФаз [1]). У цілому, дія НІЛВ на клітинні мембрани виступає як пусковий фактор каскаду молекулярних і морфологічних процесів [2]. У клітині активуються біосинтез нуклеїнових кислот та білків, ферментні системи, окисно-відновні процеси, збільшується енергетичний потенціал, стимулюється біогенез мембранних органел, підвищується різниця заряду на клітинних мембранах. Тобто для реалізації ефекту впливу НІЛВ необхідний хромофор, здатний поглинати чітко визначені кванти енергії гелій-неонового лазера, властиво володіти співпа-

дінням спектра поглинання з довжиною хвилі випромінювання джерела монохроматичного світла.

Для з'ясування, від чого, перш за все, залежать зміни активності Na^+ , K^+ -АТФази – від дії НІЛВ різної експозиції або від тривалості розвитку зародків – доцільно кількісно оцінити, порівняти і підтвердити наявність або відсутність впливу цих чинників. Зазвичай доводиться зважати на одночасний вплив на організм багатьох чинників (як зазначених вище, так і інших, які не враховуються в експериментах). Одним із адекватних способів оцінки кожного з них (за відносними частками цієї дії на мінливість значень досліджуваного показника) та їхньої взаємодії, а також підтвердження такого впливу на розвиток організму є багатифакторний дисперсійний аналіз [9].

З метою порівняння впливу різної тривалості дії НІЛВ (1, 3, 5 хв.) на активність досліджуваної АТФази мембран бластомерів в'юна в різний час розвитку зародків проведено 6 серій двофакторного дисперсійного аналізу, результати якого представлені на рис 4, а (N = 3). Визначено величини внеску впливу різної експозиції та фактора часу розвитку зародків на фоні впливу інших, неврахованих у експерименті чинників, а також оцінено достовірність впливу досліджуваних чинників. Рівень достовірності для отриманих результатів відносно впливу фактора тривалості дії НІЛВ становить 0,99.

Результати двофакторного дисперсійного аналізу даних впливу НІЛВ на активність Na^+ , K^+ -АТФази різної тривалості протягом раннього періоду розвитку зародків в'юна в усіх випадках підтвердили залежність активності ферменту від дії гелій-неонового лазера. Водночас залежність його активності від фактора тривалості розвитку зародків не підтверджено. Відносні частки впливу останнього на міни активності досліджуваної АТФ-гідролази (мін-

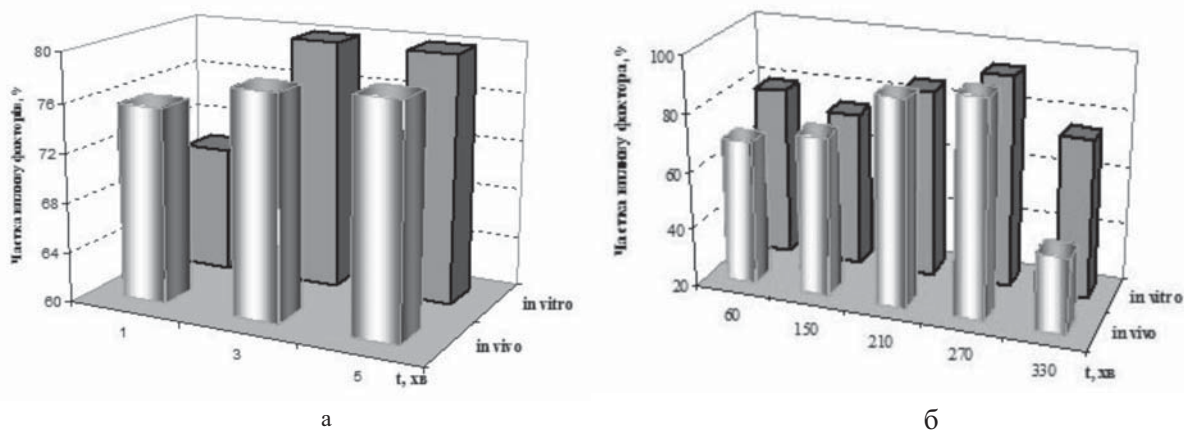


Рис. 4. Результати дво- (а) та однофакторного (б) дисперсійного аналізу впливу НІЛВ різної експозиції на активність Na^+ , K^+ -АТФази зародків в'юна в різний період розвитку, $p > 0,99$.

ливість значень показника) у 6 серіях аналізу становить близько 14,5% *in vivo* та 12,6% *in vitro*. Отже цей вплив є недостовірним ($p < 0,90$, $N_1 = 5$, $N_2 = 3$). Лише за дії НІЛВ *in vitro* тривалістю 3 хв. встановлено достовірну частку впливу фактора часу, яка становила 15,4%, $p > 0,99$. Отже, більшою мірою мінливість активності АТФази мембран зародків визначається впливом НІЛВ різної тривалості, ніж впливом фактора часу розвитку зародків в'юна.

З метою кількісної оцінки внеску НІЛВ різної тривалості (1, 3 та 5 хв.) у загальну мінливість активності Na^+ , K^+ -АТФази мембран у зародків в'юна в період раннього ембріогенезу проведено по 5 серій однофакторного дисперсійного аналізу, результати якого представлено на рис. 4, б.

Наявність дозозалежності підтверджують досить істотні частки впливу тривалості дії НІЛВ - в діапазонах 46,4÷94,7% в умовах *in vivo* та 73,5÷93,2% в умовах *in vitro*. Як видно на рис. 4, б, вагомий внесок частки фактора (дія НІЛВ) у мінливість активності Na^+ , K^+ -АТФази спостерігається в різний час розвитку зародків в'юна: максимальний на стадіях 64 бластомерів (210 хв.) та 8 поділу бластомерів (270 хв.) в обидвох умовах досліду; відносні частки фактора знаходяться в діапазоні 91÷94% та 85÷93%, відповідно. Дещо менший внесок фактора у мінливість активності Na^+ , K^+ -АТФази виявлено на перших досліджуваних стадіях розвитку – 71÷78% ($p > 0,999$). Слід зазначити, що на останньому синхронному поділі бластомерів внесок ефекту дії НІЛВ у зміни активності Na^+ , K^+ -АТФази *in vivo* є найменшим і становить 46,7%, на відміну від умов дослідження *in vitro*.

Розбіжності в оцінках дії випромінювання з різною експозицією (і енергією дози) в різних умовах досліду можуть свідчити про неоднаковий тип дії НІЛВ. Ймовірно, що Na^+ , K^+ -АТФаза є прямою мішенню НІЛВ в умовах *in vitro*, про що свідчить отримане інгібування досліджуваного ферменту зародків. В умовах *in vivo* за дії НІЛВ на зародки

включаються захисні механізми, тобто лазерне випромінювання опосередковано діє на досліджуваний мембранопов'язаний фермент, частково стабілізує ферментативну активність Na^+ , K^+ -помпи (3-хвилинна експозиція). Зокрема це можна пояснити структурними признаками стимуляції клітинної проліферації клітин *Torulopsis sphaerica*, опроміненних He-Ne-лазером (6 годин інкубації в поживному середовищі) [10]: зменшенням клітинних розмірів, кількості мітохондрій, елонгацією клітин і мітохондрій, підвищенням варіабельності ряду клітинних параметрів. Встановлено значне збільшення кількості мітохондрій, мембрани яких асоційовані (зближені) з мембранами ендоплазматичного ретикулу, що у відповідності із сучасними уявленнями може означати активацію синтезу АТФ.

Висновки

Враховуючи отримані результати, можна зробити висновок, що на різних етапах розвитку зародків в'юна чутливість Na^+ , K^+ -АТФази до дії НІЛВ варіює. Згідно отриманих значень чутливість АТФази зародків в'юна до дії лазерного випромінювання змінюється від ранніх стадій дроблення бластомерів до пізніх. Найвища чутливість ферменту до опромінення гелій-неоновим лазером - на стадії 2 бластомерів та 10 поділу, нижча - на стадіях 64 бластомерів. Однак слід відмітити, що для НІЛВ з експозицією 3 хв. властиво відсутній інгібіторний ефект, оскільки активність Na^+ , K^+ -АТФази зародків не відрізнялася від контролю. Отже, можна припустити, що для 3-хвилинної дії лазерного випромінювання властивий протекторний ефект, котрий залежить від тривалості дії зазначеного фізичного чинника, і при певних захворюваннях, зокрема серцево-судинних, його можна застосовувати в терапії. Отримані дані засвідчують значний модулюючий та дозозалежний регуляторний потенціал монохроматичного світла по відношенню до біологічних систем, що розвиваються.

Література

1. Бура М. В. Исследование действия лазерного излучения на ферментативную активность Na^+ , K^+ -насоса зародышей в'юна / М.В.Бура, С.М.Мандзинец // Ломоносов-2009: Материалы докладов XVI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных (Москва, Россия, 14-17 апреля 2009) [Электронный ресурс].- М.: Изд. МГУ; СП МЫСЛЬ, Москва, 2009.- С.8-9.
2. Бура М. Развитие зародков і личинок в'юна *Misgurnus fossilis* L. за умов впливу низькоінтенсивного гелій-неонового випромінювання / М.Бура, С.Мандзинець,

М.Темник та інш. // Вісник Львівського університету, Серія Біологічна.- 2010.- Вип. 54.- С.59-68.

3. Гойда О. А. Биофизические аспекты раннего онтогенеза животных.- Киев: Наук. думка, 1993.- 224 с.

4. Головчак Н.П. Прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз зародків в'юна за дії низькоінтенсивного лазерного опромінення / Н.П.Головчак, А.В.Тарновська, М.В.Бура та інш. // Фізика живого.- 2009.- Т.17, №1.- С.76-81.

5. Кару Т.Й. Влияние излучения гелий-неонового лазера на адгезивные свойства клеточной мембраны / Т.Й.Кару,

- Л.В.Пятибрат, Г.Т.Календо // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.– 1993.– №6.– С.622–623.
6. Кару Т.Й. Действие излучения аргонового лазера и некогерентного синего света на бактерии *Escheria Coli* / Т.Й.Кару, Л.В.Пятибрат, Г.Т.Календо // Радиобиология.– 1992.– №2.– С.202–206.
7. Костомарова А.А. Вьюн *Misgurnus fossilis* // Объекты биологии развития.– Москва: Наука, 1975.– С.308–323.
8. Луцки М.Д. Очистка и частичная характеристика плазматических мембран клеток зародышей вьюна / М.Д.Луцкий, С.И.Кусень, А.В.Лукьяненко // Онтогенез.– 1986.– Т.17.– С.314–321.
9. Любищев А.А. Дисперсионный анализ в биологии.– М.: Изд. Московского университета, 1986.– 200 с.
10. Мантейфель В.М. Морфометрическое исследование дрожжевых клеток *Torulopsis sphaerica* после облучения светом He-Ne-лазера / В.М.Мантейфель, Л.Н.Дьячкова, Т.Й.Кару // Цитология.– 2002.– №12.– С.1205–1211.
11. Чудновский В.М. Биологические модели и физические механизмы лазерной терапии / В.М.Чудновский, Г.Н.Леонова, С.А.Скопинов и др.– Владивосток: Дальнаука, 2002.– 157 с.
12. Эйдус Л.Х. Роль мембран в реакциях клеток на внешние воздействия // Биофизика живой клетки.– Пушкино, 1974.– С. 96–108.
13. Dube A. He-Ne laser irradiation protects B-lymphoblasts from UVA-induced DNA damage / A.Dube, C.Bock, E.Bauer et al. // Radiat. Environ. Biophys.– 2001.– Vol.1.– P.77–82.
14. Ehrlicher A. Guiding neuronal growth with light // Proc. of the Natl. Acad. Sci. USA.– 2002.– Vol.99.– P.16024–16028.
15. Fiske C.H. The colorimetric determination of phosphorus / C.H.Fiske, Y. Subbarow // J. Biol. Chem.– 1925.– Vol.66.– P.375–400.
16. Folk R.L. Laser stimulation of nerve cells in *Aplysia* // Science.– 1971.– Vol.171.– P.907–908.
17. Karu T. Low-power laser therapy.– CRC Press.: New York, 2003.– P.4825–4841.
18. Karu T.J. Action of low-intensity laser radiation on *Escherichia coli* / T.J.Karu, O.S.Tiphlova // Crit. Rev. Biomed. Eng.– 1991.– Vol.6.– P.387–412.
19. Karu T.J. Irradiation with He-Ne laser can influence the cytotoxic response of HeLa cells to ionizing radiation / T.J.Karu, L.V.Pyatibrat, G.T.Kalendo // Int. J. Radiat. Biol.– 1994.– Vol.6.– P.691–697.
20. Karu T.J. Two different mechanisms of low-intensity laser photobiological effects on *Escherichia coli* / T.J.Karu, O.S.Tiphlova, R.F.Esenaliev // J. Photochem. Photobiol.– 1994.– Vol.3.– P.155–161.
21. Kwon Yong Wha. Interactions of local anesthetics with neuronal 1,4-dihydropyridine binding sites / Yong Wha Kwon, D.J.Triggle // Biochem. Pharmacol.– 1991.– Vol.42, №2.– P.213–216.
22. Lowry O.H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H.Lowry, N.G.Rosebrough, A.L.Farr et al. // J. Biol. Chem.– 1951.– Vol.193.– P.265–275.
23. Manteifel V.M. A comparative study of chromatin from lymphocyte nuclei upon activation of transcription by irradiation from an He-Ne-laser or phytohemagglutinin / V.M.Manteifel, T.J.Karu, T.V.Andreichuk // Mol. Biol.– 1992.– Vol.5.– P.1054–1062.
24. Smolyanova N.K. Effects of He-Ne laser irradiation on chromatin properties and synthesis of nucleic acids in human peripheral blood lymphocytes / N.K.Smolyanova, T.J.Karu, G.E.Fedoseeva // Biomed. Sci.– 1991.– Vol.2.– P.121–126.
25. Tiflova O.A. Effect of He-Ne laser radiation on the bacteriophage T4-*Escherichia coli* L. system / O.A.Tiflova, T.I.Karu // Radiobiologia.– 1989.– Vol.29, №2.– P.278–280.
26. Vacca R.A. Increase in cytosolic and mitochondrial protein synthesis in rat hepatocytes irradiated in vitro by He-Ne laser / R.A.Vacca, E.Marra, S.Passarella // J. Photochem. Photobiol. B.– 1996.– Vol.3.– P.197–202.
27. Van Breugel H.H. Low energy He-Ne laser irradiation effects on proliferation and laminin production of rat Schwann cells *in vitro* / H.H. Van Breugel, P.Sodaar, P.R.Bar // Lasers Surg. Med. Suppl.– 1991.– Vol.3.– P.10.
28. Wong-Riley M.T. Light-emitting diode treatment reverses the effect of TTX on cytochrome oxidase in neurons / M.T.Wong-Riley, X.Bai, H.T.Whelan // Neuroreport.– 2001.– Vol.14.– P.3033–3037.

**ВЛИЯНИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА АКТИВНОСТЬ
Na⁺, K⁺-АТФазы ЗАРОДЫШЕЙ ВЬЮНА НА ПРОТЯЖЕНИИ РАННЕГО ЭМБРИОГЕНЕЗА**

*Романюк М.С., Мандзинец С.М., Бура М.В., Санагурский Д.И.
Львовский национальный университет им. Ивана Франко,
ул. Грушевского, 4, г. Львов, 79005 Украина,
e-mail: myrosik.R@gmail.com, mcelevych@yahoo.com*

*Исследовано влияние экспозиции (1, 3, 5 мин.) низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) на активность Na⁺, K⁺-АТФазы зародышей вьюна (*Misgurnus fossilis* L.) в течении раннего эмбриогенеза. При облучении эмбрионов вьюна *in vitro* установлено достоверное снижение активности Na⁺, K⁺-АТФазы зародышей на протяжении синхронных делений бластомеров. НИЛИ не оказывало выраженного влияния *in vivo* на АТФазную активность зародышей на протяжении раннего эмбриогенеза. Отмечено, что для НИЛИ с экспозицией 3 мин. *in vivo* свойственно отсутствие ингибирующего эффекта, поскольку активность Na⁺, K⁺-АТФазы зародышей не отличалась от контроля. Результаты дисперсионного анализа влияния НИЛИ разной продолжительности на активность Na⁺, K⁺-АТФазы на протяжении раннего периода развития зародышей вьюна во всех случаях подтвердили зависимость активности этого фермента от действия лазера. В то же время наличие зависимости АТФазной активности от фактора длительности развития зародышей не подтверждено. Полученные данные свидетельствуют о значительном модулирующем и дозозависимом регуляторном потенциале монохроматического света по отношению к развивающимся биологическим системам.*

Ключевые слова: лазер, Na⁺, K⁺-АТФаза, зародыши вьюна, *in vivo*, *in vitro*, биологический эффект, дисперсионный анализ.

**THE INFLUENCE OF LOW-INTENSITY LASER RADIATION ON THE Na⁺, K⁺-ATPase ACTIVITY
OF LOACH EMBRYOS DURING EARLY EMBRYOGENESIS**

*M.S.Romanjuk, S.M.Mandzynets, M.V.Bura, D.I.Sanagursky
Ivan Franko National University of Lviv,
4 Hrushevsky Str., Lviv, 79005 Ukraine,
e-mail: myrosik.R@gmail.com, mcelevych@yahoo.com*

*Low intensive monochromatic radiation with different exposition in time influence on activity Na⁺, K⁺-ATPase loach embryos (*Misgurnus fossilis* L.) during early embryogenesis was studied. In condition *in vitro* radiation was inhibit significantly activity Na⁺, K⁺-ATPase during synchronous divisions of blastomers. *In vivo* radiation did not have evident influence on enzyme activity. It was noted that exposure of radiation 3 min *in vivo* inhibition effect was an absence. Analysis of variance was showed the dependence of the activity of membrane enzyme from laser radiation. The dependence of the ATPase activity from time of the embryogenesis has not been confirmed. These data suggest a significant dose-dependent and frequency-regulatory potential of no thermal monochromatic light intensities in relation to developing biological systems.*

Keywords: laser, Na⁺, K⁺-ATPase, loach embryo, *in vivo*, *in vitro*, blastomer division, biological effect, analysis of variance.