

ЖАБРОНОГИЙ РАЧОК *ARTEMIA SALINA* L. КАК ОБЪЕКТ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ОПТИЧЕСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НИЗКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ

Н. В. Барулин¹, В. Ю. Плавский², В. А. Орлович²

¹ Белорусская государственная сельскохозяйственная академия

² Институт физики НАН Беларуси
barulin@list.ru

GILL-FOOTED CRUSTACEANS *ARTEMIA SALINA* L. AS AN OBJECT FOR THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF LOW INTENSITY OPTICAL RADIATION STUDY

Barulin¹ N. V., Plavskii² V. Yu., Orlovich² V. A.

¹ Belorussian State Agricultural Academy

² B. I. Stepanov Institute of Physics, National Academy of Sciences of Belarus
barulin@list.ru

(Поступила в редакцию 25.05.2012)

Реферат: В работе представлены данные о влиянии оптического излучения низкой интенсивности красной (0,63 нм) и инфракрасной (0,8 – 1,34 нм) областей спектра на развитие *Artemia salina* L. Нами впервые обнаружено в отношении зоопланктона регуляторное действие лазерного излучения ближней инфракрасной области спектра, расположенного вне полос электронного поглощения биологических макромолекул и эндогенных красителей-фотосенсибилизаторов. Данный эффект объясняется прямым возбуждением синглетного кислорода и его последующим влиянием, как сигнальной (триггерной) молекулы, на протекание физиологических процессов в живом организме.

Ключевые слова: артемия, лазерное облучение, физиологическая активность.

Abstract. The article contains data on the low intensity optical radiation effect of red (0.63 nm) and infrared (0.8 - 1.34 nm) spectral regions for the *Artemia Salina* L. development. The regulatory effect of the near infrared region laser irradiation located outside the electronic absorption bands of biological macromolecules, dyes and endogenous photosensitizers was discovered for the first time with respect to zooplankton. This effect is explained by direct excitation of singlet oxygen and its subsequent effect as a signal (trigger) molecule on the physiological processes in vivo.

Keywords: artemia, laser irradiation, physiological activity.

Введение

В рыбохозяйственных научных исследованиях в качестве модельных организмов используют различные биологические объекты. Наибольшую популярность в лабораторных исследованиях получила пресноводная рыба данио-рерио (*Danio rerio*), благо-

даря быстрому сроку эмбрионального развития, высокой выживаемости и жизнестойкости личинок и молоди [1]. В наших предыдущих исследованиях мы показали, что эмбрионы (оплодотворенная икра) и сперма осетровых рыб являются также удобными модельными организмами [2, 3].

Жаброногий рачок *Artemia salina* L. является популярным объектом в технологии аквакультуры, который с успехом используется для стартового кормления молоди рыб. Простота получения науплий из покоящихся цист, а также доступность и массовость материала делают этот вид удобным модельным организмом для изучения влияния различных физических факторов на биологические системы.

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в последние годы в изучении фотофизических процессов, определяющих биологическую активность оптического излучения низкой интенсивности, становится все более очевидным отсутствие универсального механизма, объясняющего выраженное регуляторное действие света, характеризующегося различной степенью когерентности и поляризации, спектральным диапазоном, диапазоном интенсивностей и энергетических доз.

В настоящей работе представлены данные по влиянию непрерывного лазерного излучения красной (0,63 мкм) и ближней инфракрасной (0,8–1,34 мкм) областей спектра на выживаемость науплий жаброногого рачка *Artemia salina* L. при облучении его цист. В качестве теста на действие лазерного излучения выбран процент выклева науплиусов из цист (защитной оболочки) после инкубирования яиц в солевом растворе в условиях поддержания стабильного теплового режима.

Материал и методика исследований

Исследования проводились в Институте физики им. Б. И. Степанова Национальной академии наук Беларуси в 2011 году. Для оценки качества цист артемии использовали экспресс-метод, который заключался в раздавливании цист между двумя предметными стеклами и рассматривании в лупу при 10–15 кратном увеличении. Жирные пятна на стекле свидетельствовали о том, что яйца живые. Для придания цистам сферической формы и для подготовки их к декапсуляции использовали метод гидратации,

который заключался в замачивании яиц в артезианской воде в течении 2 часов при температуре 26°C.

Как известно, цисты артемии покрыты хорионом — твердым слоем, состоящим из липопротеинов, пропитанных хитином и продуктом распада гемоглобина — гематином. Важной функцией хориона является защита эмбриона от механического повреждения и радиации. Поэтому для определения влияния оптического излучения важным было снять хорионовую оболочку. Для удаления хориона использовали метод декапсуляции. Для приготовления декапсулирующего раствора использовали $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ с содержанием активного хлора 52% в количестве 40 г/л, а также Na_2CO_3 в количестве 40 г/л. После декапсуляции цист осуществляли интенсивную промывку в водопроводной, а затем в артезианской воде. Адсорбированный осадок $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ на декапсулированных цистах дезактивировали методом погружения в 0,1% раствор $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, после чего снова промывали в воде. Для приготовления инкубационной среды использовали артезианскую воду и поваренную нейодированную соль NaCl . Соленость инкубационной среды составляла 5 г/л. Для увеличения буферной способности среды дополнительно вносили 2 г/л NaHCO_3 . Для активации цист непосредственно в инкубационную среду вносили 3% раствор H_2O_2 из расчета 1 мг/л.

После завершения процесса декапсуляции цисты помещались в чашки Петри внутренним диаметром 3,4 см и подвергались воздействию лазерного излучения при плотности мощности $P = 3 \text{ мВт/см}_2$. Чашки Петри с контрольными группами науплий находились рядом и были экранированы от облучаемых светонепроницаемым экраном. Длительность лазерного воздействия варьировалась в ряду: 60; 90; 180; 300; 600 с. Длина волны излучения составляла 632,8 нм (гелий-неоновый лазер); 808; 976 нм (полупроводниковые лазеры); 1064; 1342 нм (лазеры на кристаллах Nd:YVO_4 с диодной накачкой и реализацией генерации на ${}^4\text{F}_{3/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{11/2}$ и ${}^4\text{F}_{3/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{13/2}$ (переходах ионов Nd); 1176 нм (лазер с диодной накачкой и с последующим ВКР-преобразованием излучения 1064 нм). После завершения процедуры лазерного воздействия чашки Петри с контрольными и облученными особями помещались в воздушный термостат, в котором обеспечивалось поддержание температуры на уровне $27 \pm 0,05^\circ\text{C}$ и исключалась посторонняя засветка. Через 24 и 48 часов после процедуры об-

лучения производилось фотографирование содержимого каждой чашки Петри на цифровую камеру Cyber-Shot DSC-P200 с объективами Carl Zeiss® Vario-Tessar® с последующей обработкой результатов с помощью программы Photoshop CS3 и использованием инструмента Count Tool и функции Grid. Для удобства подсчета пользовались графическим планшетом Trust Canvas Widescreen Tablet, с помощью которого визуально подсчитывалась доля выключившихся науплий: $N = n_v/n_{\text{ц}}$ — отношение числа выключившихся (n_v) науплий к числу цист, заложенных на инкубацию ($n_{\text{ц}}$). Величина фотобиологического эффекта оценивалась как $\gamma = (N_o/N_{\text{к}}) \cdot 100\%$, где N_o и $N_{\text{к}}$ — доля выключившихся науплий в опытных и контрольных чашках соответственно.

Для оценки количественных признаков пользовались описательной статистикой, которая включала в себя такие параметры, как среднее значение, стандартное отклонение, стандартная ошибка среднего, коэффициент вариации. Для определения нормальности распределения совокупности рассчитывали медиану, а также 25-й и 75-й процентиля. Для проверки нулевой гипотезы использовали однофакторный дисперсионный анализ. Для сравнения групп между собой использовали общий критерий Стьюдента, если число сравнений было больше двух — применяли методы множественных сравнений (поправка Бонферрони, критерий Ньюмена-Кейлса, критерий Даннета). Для расчета указанных параметров и критериев использовали компьютерные статистические пакеты STATISTICA 8, BioStat 2009, OriginPro 8, Stat Plus 2007.

Результаты исследований и обсуждение

Проведенные исследования позволили впервые обнаружить способность излучения красного диапазона, а также ближней инфракрасной области спектра, располагающейся вне полосы электронного поглощения основных хромофоров животной клетки, оказывать регуляторное действие на протекающие биохимические процессы, контролирующие выклев науплиусов.

Типичные зависимости величины биологического эффекта от времени воздействия на цисты науплий излучения с $\lambda = 632,8$ и 1176 нм ($P = 3,0$ мВт/см²) представлены на рис. 1. Характерной особенностью полученных дозовых кривых является наличие ярко выраженного экстремума, соответствующего максимальному стимулирующему или ингибирующему действию излучения

(в зависимости от его длины волны). Тот факт, что зависимость $\gamma = f(t)$ не описывается экспоненциальной (полиэкспоненциальной) функцией, указывает на регуляторный характер биологического действия указанного физического фактора. Для сравнения отметим, что деструктивное действие света, вызываемое коротковолновым ультрафиолетовым излучением или фотодинамическим действием, сенсibilизированным экзогенными или эндогенными красителями, как правило, описывается экспоненциальной (полиэкспоненциальной) функцией.

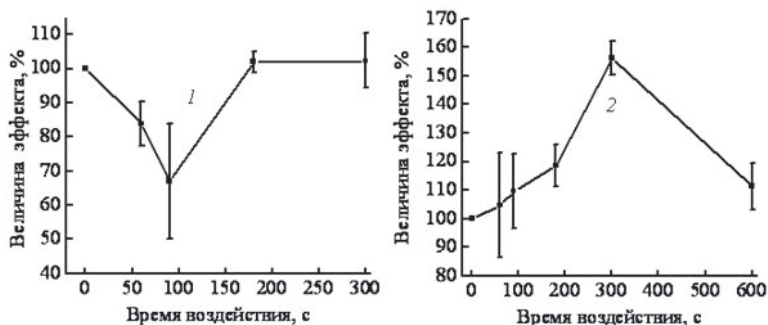


Рисунок 1 — Влияние лазерного излучения ($P = 3,0$ мВт/см²) с длиной волны 632,8 (1) и 1176 нм (2) на выклев науплий при облучении их цист

Обращает на себя внимание, что если при оптимальных условиях воздействия излучение $\lambda = 632,8$ нм оказывает ингибирующее действие на выклев науплий, то излучение с $\lambda = 1176$ нм — стимулирующее. Так, для $\lambda = 1176$ нм при энергетической дозе $E = 0,9$ Дж/см² ($t = 300$ с) величина стимулирующего эффекта составляет $\gamma = 156,3 \pm 5,8\%$ (достоверность отличия от контроля $P < 0,001$). Уменьшение или увеличение времени воздействия приводит к снижению ингибирующего действия и при $t = 600$ с ($1,8$ Дж/см²) интенсивность выклева у облученных групп ($\gamma = 111,4 \pm 8,2\%$) слабо отличается от контрольных.

Исследования показали, что выраженным стимулирующим действием обладает также излучение с длиной волны $\lambda = 808$ нм и $\lambda = 1342$ нм. При воздействии света с $\lambda = 808$ нм оптимум в дозовой зависимости наблюдается при $t = 90$ с ($E = 0,27$ Дж/см²),

а величина стимулирующего эффекта составляет $\gamma = 118,9\%$. При облучении цист лазерным излучением с длиной волны 1342 нм максимальное стимулирующее действие составляет $\gamma = 129,9\%$ и наблюдается при $t = 180$ с ($E = 0,54$ Дж/см²).

В отличие от излучения с длиной волны 808; 1176 и 1342 нм, облучение цист артемий светом с $\lambda = 632,8$; 976 и 1064 нм сопровождается ингибированием процесса выклева науплий. Так, для $\lambda = 632,8$ нм при энергетической дозе $E = 0,27$ Дж/см² ($t = 90$ с) величина фотобиологического эффекта составляет $\gamma = 67,0 \pm 17,0\%$. Уменьшение или увеличение времени воздействия приводит к снижению ингибирующего действия и при $t = 180$, и 300 с ($E = 0,54$ и $0,9$ Дж/см²) величина выклева у облученных и необлученных группах практически не отличаются (рис. 1).

При воздействии на цисты излучением $\lambda = 1064$ нм в течение $t = 180$ с ($E = 0,54$ Дж/см²) величина фотобиологического эффекта составляет $\gamma = 81,9\%$. Увеличение дозовой нагрузки до $E = 0,9$ Дж/см² ($t = 300$ с) сопровождается незначительным превышением ($\gamma = 109,4\%$) интенсивности выклева над контролем.

Еще большее ингибирующее действие на интенсивность выклева науплий оказывает излучение с $\lambda = 976$ нм. Так, при $t = 90$ –180 с ($E = 0,27$ – $0,54$ Дж/см²) величина фотобиологического эффекта составляет $\gamma \approx 77\%$. При увеличении времени воздействия до 300–600 с ($E = 0,9$ – $1,8$, Дж/см²) фотобиологический эффект практически отсутствует ($\gamma \approx 100\%$).

Полученные результаты по действию лазерного излучения на выклев науплий *Artemia salina* L. позволяют сделать ряд заключений о механизме биологической активности оптического излучения в ближней инфракрасной области спектра. Как правило, при анализе механизмов фотофизических процессов, определяющих регуляторное действие лазерного излучения видимой области спектра, наличие фотобиологического эффекта связывают с попаданием оптического излучения либо в полосу поглощения белковых макромолекул (включая ферменты), содержащих простетические группы (гемоглобины, цитохромы, супероксиддисмутаза, каталаза и др.), либо с активацией светом эндогенных молекул-фотосенсибилизаторов (прежде всего порфириновой природы, таких как копропорфирин, уропорфирин). Считается, что в первом случае воздействие излучения приводит к изменению кислородтранспортной функции гемоглобина, изменению ло-

кальной концентрации кислорода за счет фотодиссоциации его от оксигемоглобина, изменению активности ферментных систем (цитохромоксидазы, супероксиддисмутазы, каталазы). При этом изменение функциональных характеристик макромолекул, как правило, связывают со светоиндуцированным изменением их конформации. В случае определяющей роли фотосенсибилизированных реакций в механизме биологической активности лазерного излучения важную роль отводят процессам изменения проницаемости клеточных мембран за счет процессов перекисного окисления липидов и других процессов.

Поскольку длина волны лазеров с $\lambda = 808; 976; 1064; 1176; 1342$ нм находится вне полосы поглощения порфиринов, то возможную роль фотосенсибилизированных реакций с их участием следует исключить. Наличие выраженных фотобиологических реакций при воздействии излучения с $\lambda = 1176; 1342$ нм позволяет также исключить возможную роль прямых фотохимических реакций с участием макромолекул, содержащих простетические группы, поскольку, согласно литературным данным, электронное поглощение для них отсутствует при $\lambda > 1100$ нм.

По нашему мнению, наблюдаемое биологическое действие лазерного излучения может быть обусловлено прямым триплет-синглетным возбуждением молекулярного кислорода, растворенного в биотканях. Как известно, основное состояние молекул O_2 — триплетное. При поглощении кислородом световых квантов энергии происходит заселение синглетных уровней $^1\Delta_g$ и $^1\Sigma_g$. Энергия $^1\Delta_g$ состояния составляет ~ 1 эВ, энергия $^1\Sigma_g$ — $\sim 1,6$ эВ. По различным оценкам и экспериментальным данным, полученным при высоком давлении кислорода, полосы поглощения кислорода в жидких органических средах характеризуются наличием максимумов в области 1273, 1064, 920, 765, 630 нм. Молярный коэффициент экстинкции для кислорода в области 1273 нм составляет $0,003 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$, а в области 765 нм еще в 3,5 раза меньше. Для сравнения отметим, что молярный коэффициент экстинкции в максимуме полосы Соре гемоглобина составляет $1,65 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Несмотря на столь слабый коэффициент молярной экстинкции, имеются данные, свидетельствующие о возможности прямого триплет-синглетного возбуждения молекулярного кислорода. Учитывая низкое значение коэффициента молярной экстинкции такого перехода и относительно низкую плотность

мощности воздействующего излучения (3 мВт/см^2), концентрация синглетного кислорода в биологической системе достаточно низка, чтобы вызвать заметное деструктивное действие. Скорее всего, его образование в биологической системе способно играть сигнальную (триггерную) функцию, влияющую на протекание биохимических и физиологических процессов в организме, например, таких как запуск апоптоза. Возможно, по этой причине при воздействии излучения $\lambda = 632,8; 1064 \text{ нм}$, соответствующего максимумам полос поглощения кислорода, как правило, отмечается ингибирование процесса выклева науплий. При сопоставимой дозовой нагрузке ($E = 0,27\text{--}0,9 \text{ Дж/см}^2$) излучение с $\lambda = 808; 1176; 1342 \text{ нм}$, находящееся вдали от известных максимумов полос поглощения кислорода в органических растворах, оказывает стимулирующее действие.

Таким образом, полученные нами данные позволили впервые обнаружить в отношении зоопланктона регуляторное действие лазерного излучения ближней инфракрасной области спектра, расположенного вне полос электронного поглощения биологических макромолекул и эндогенных красителей-фотосенсибилизаторов, и объяснить данный эффект прямым возбуждением синглетного кислорода и его последующим влиянием, как сигнальной (триггерной) молекулы, на протекание физиологических процессов в живом организме *Artemia salina* L.

Список использованных источников:

1. Ивашкин, Е. Г. VI Европейская конференция по биологии развития и генетике данио и других костистых рыб / Е. Г. Ивашкин // Отногенез. — 2010. — Т. 41, № 3. — С. 236–238.
2. Плавский, В. Ю. Сперма рыб как объект для исследования механизмов биологической активности оптического излучения низкой интенсивности / Плавский В. Ю., Барулин Н. В. // Полупроводниковые лазеры и системы на их основе: сборник статей 7-го Белорусско-Российского семинара, Минск, 1–5 июня 2009 г. / Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси ; редкол.: В. В. Зубелевич [и др.]. — Минск, 2009. — С. 217–220.
3. Plavskii, V. Yu. Fish Embryos as Model for Research of Biological Activity Mechanisms of Low Intensity Laser Radiation / V. Y. Plavskii, N. V. Barulin // Advances in Laser and Optics Research. — 2010. — Volume 4. — P. 1–48.