

ПРОГНОЗ БІОЛОГІЧНОЇ ЕФЕКТИВНОСТІ НИЗЬКОІНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО СВІТЛА ПРИ ОПРОМІНЕННІ ІНКУБАЦІЙНИХ ЯЄЦЬ ПТИЦІ

М.А. Мельник, І.Л.Якименко

Білоцерківський державний аграрний університет

Показано стимулюючий вплив певних режимів використання низькоінтенсивного червоного лазерного світла на формування сомітів у 38-годинних ембріонів перепела японського. При цьому виявлено інтервал ефективних та індиферентних доз опромінення щодо впливу на даний морфометричний показник. Обґрунтовується доцільність використання морфометричних показників розвитку перепелиних ембріонів для оцінки подальшої ефективності дії лазерного випромінювання на об'єкт.

лазерне опромінення, інкубація яєць, соміти, перепелині ембріони

Низькоінтенсивне лазерне випромінювання знайшло широке застосування у сільськогосподарському виробництві, зокрема у птахівництві [1-3]. Передінкубаційна обробка курячих яєць світлом гелій-неонового лазера збільшує виведення та збереження курчат і підвищує якість інкубаційного матеріалу [2-3]. Проте питання дозиметрії лазерного випромінювання при його застосуванні для прикладних цілей в значній мірі залишається відкритим. Крім того, важливим аспектом цієї проблеми є пошук можливостей раннього прогнозу ефективності тих чи інших доз та режимів опромінення. Слід наголосити, що дані питання є актуальними не тільки з точки зору практичного використання лазерного випромінювання у птахівництві, а й у більш широкому контексті вивчення проблеми біологічної ефективності низькоінтенсивного монохроматичного світла, і зокрема, його впливу на ембріогенез тваринних організмів.

Метою роботи була оцінка можливості використання морфометричних показників розвитку перепелиних ембріонів на ранніх стадіях ембріогенезу для прогнозу біологічної ефективності низькоінтенсивного лазерного світла при опроміненні інкубаційних яєць сільськогосподарської птиці.

Матеріал і методи. Дослідження були виконані на інкубаційному матеріалі перепелів японських віварію Білоцерківського державного аграрного університету. Для першого дослідження було сформовано дослідні і контрольні групи-аналоги свіжих інкубаційних яєць ($m=9-10$ г, $n=10-15$). Відомо, що у свіжому інкубаційному яйці ембріон перебуває на стадії ранньої гаструли [4]. Яйця дослідних груп за 2 години до інкубації опромінювали розфокусованим світлом гелій-неонового лазера ЛГН-602-Н ($\lambda=633$ нм) при густині енергії від $0,3$ мДж/см² до 1200 мДж/см² у затемненому приміщенні (фонове освітлення до 5 лк) при кімнатній температурі. Контрольну групу яєць не опромінювали. Усі групи яєць інкубували в лабораторному інкубаторі ИЛУ-Ф-0,3 із дотриманням стандартних вимог до процесу інкубації перепелиних яєць.

Критерієм оцінки впливу лазерного випромінювання на об'єкт було обрано кількість диференційованих пар сомітів, що утворилися на 38-му годину інкубації, оскільки саме цей показник об'єктивно характеризує інтенсивність розвитку ембріона на ранніх строках ембріогенезу [5]. Відомо також, що м'язові клітини походять від сомітів і кількість міофібрил у м'язах перепелів визначається ще в ранній ембріональний період [6].

Після 38-ми годин інкубації яйця діставали з інкубатора, охолоджували до 10-15°C, розрізали шкаралупу та видаляли білкову оболонку. Ембріони відпрепаровували від жовтка за допомогою кілець фільтрувального паперу. Препарат відмивали у дистильованій воді та фіксували на предметному скельці 5% розчином трихлороцтової кислоти. Кількість диференційованих пар сомітів підраховували під мікроскопом при малому збільшенні (8×7).

У другому досліді оцінювали рівень перекисного окислення ліпідів, активність ферментів антиоксидантної системи у тканинах та масу 7-добових ембріонів за умов впливу лазерного випромінювання при густині енергії 3 мДж/см². Для цього було сформовано дослідну та контрольну групи перепелиних яєць (n=10). Яйця дослідної групи перед інкубацією опромінювали у відповідному режимі, контрольну групу яєць не опромінювали. Масу ембріонів визначали без плідних оболонок. Рівень перекисного окислення ліпідів у гомогенатах ембріонів визначали у тесті з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) [7], активність каталази – за [8], церулоплазміну – за [9] та глутатіон-пероксидази – за [10].

Для оцінки впливу лазерного опромінення у дозі 3 мДж/см² на виведення молодняку було закладено третій дослід. Для цього було сформовано дослідну та контрольну групи свіжих інкубаційних яєць (n=99-100), перша з яких перед інкубацією була опромінена у відповідному режимі. Біологічний контроль та аналіз інкубації здійснювали за загальноприйнятою методикою.

Статистичну обробку отриманих даних здійснювали у програмі Excel, вірогідність різниць між групами оцінювали за критеріями Стюдента та Фішера.

Результати досліджень. Вірогідну активацію процесу формування сомітів у ембріонів перепела японського відмічали при густині потужності 3 мДж/см² і 30 мДж/см² (рисунок). Кількість пар сомітів, що утворилися при цих режимах опромінення, перевищила контрольні показники на 17,24 % та 13,07 %, відповідно. Опромінення інкубаційних яєць при густині енергії 120 мДж/см² також викликало активацію процесу утворення сомітів у ембріонів, проте різниця з контролем у цьому випадку була невірогідна. При опроміненні інкубаційного яйця лазерним світлом при густині енергії 0,3 мДж/см² та 1200 мДж/см² не було відмічено виражених ефектів щодо формування сомітів у ембріонів (досліджуваний показник за обох режимів був на 7 % нижчий, ніж у контролі).

Таким чином, застосування зазначеного методу морфометричної оцінки дозволило виявити діапазон ефективних доз низькоінтенсивного лазерного опромінення для передінкубаційної обробки яйця.

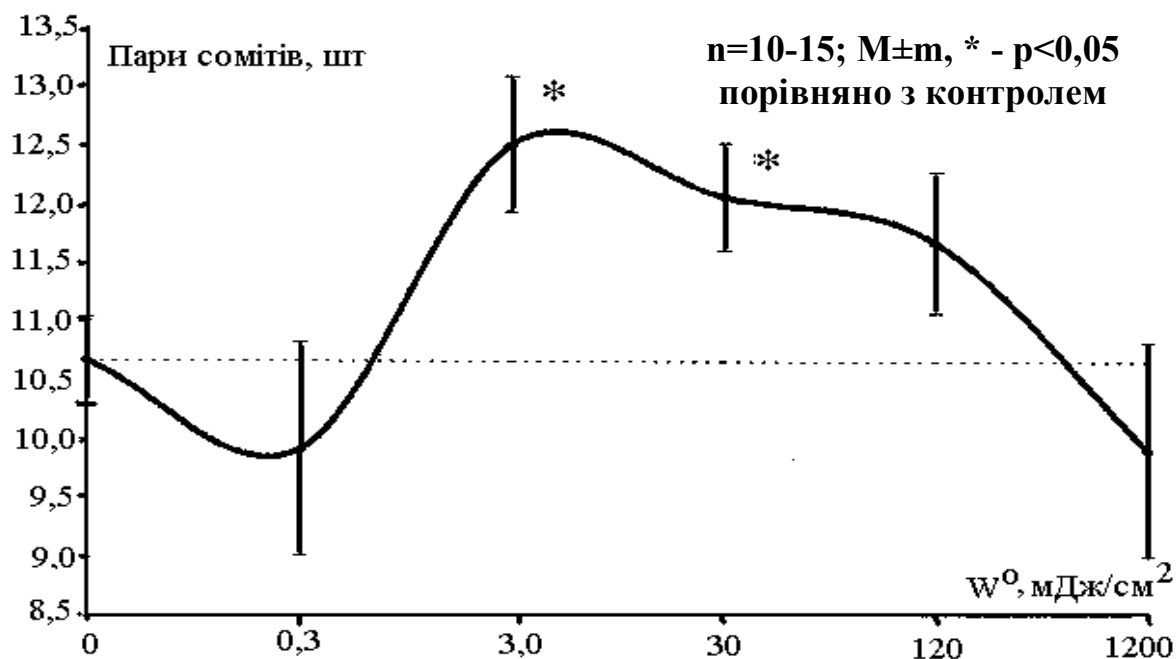


Рис. Вплив густини енергії випромінювання гелій-неонового лазера на формування сомітів у ембріонів перепела японського на 38-му годину інкубації

Враховуючи, що нормальний ембріональний розвиток птиці на ранніх етапах ембріогенезу є позитивною прогностичною ознакою розвитку птиці в подальшому [4, 6], в наступних експериментах ми використали режим опромінення, що найбільш виражено стимулював сомітогенез птиці.

При дослідженні маси 7-добових перепелиних ембріонів, отриманих з опромінених при густині енергії 3 мДж/см² інкубаційних яєць, вірогідної різниці між дослідною та контрольною групами не виявили, проте аналіз стану антиоксидантної системи тканин ембріонів можна розцінювати як такий, що свідчить про активацію проліферативних процесів у ембріонів дослідної групи. Так, у гомогенатах тканин ембріонів дослідної групи (табл. 1) рівень ТБК-реагуючих пероксидних ліпідних сполук був вірогідно вищим, ніж у контролі – на 27,5% ($p < 0,01$). Такі зміни рівня пероксидного окислення ліпідів характерні для тканин, у яких відбуваються активні процеси проліферації.

1. Вплив лазерного опромінення (густина енергії 3 мДж/см²) на стан антиоксидантної системи 7-добових ембріонів перепела японського

Показники	Дослідна група	Контрольна група
Маса ембріонів, г	0,562±0,0108	0,547±0,0144
Перекиси ліпідів, ум. од.	0,0951±0,0040**	0,0746±0,0054
Активність церулоплазміну, ум. од.	0,0544±0,0043*	0,0399±0,0030
Активність каталази, ум. од.	0,3297±0,0419*	0,4544±0,0278
Активність глутатіонпероксидази, ум. од.	108,27±13,76	83,73±8,87

Примітка: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ порівняно з контролем.

Зазначені зміни супроводжувалися підвищенням активності церулоплазміна на 36,6% ($p < 0,05$) та зниженням активності каталази на 27,4% ($p < 0,05$) і глутатіонпероксидази на 29,3%.

Стимулююча дія режимів низькоінтенсивного лазерного випромінювання, які виявилися ефективними у перші дні ембріонального розвитку, підтверджена і аналізом результатів інкубації та виведення молодняку (табл. 2).

Передінкубаційне опромінення яєць червоним лазерним світлом при густині енергії 3 мДж/см² забезпечило вірогідне зниження (до нуля) загибелі ембріонів у дослідній групі в перші 5 діб інкубації, що призвело до збільшення виведення молодняку у дослідній групі на 6,9 %, а виводимості – на 4,5 % при високому рівні виведення та виводимості у контролі.

Очевидно, що на підставі проведених досліджень не можна зробити однозначний висновок про найбільшу ефективність режимів опромінення, що виражено стимулювали сомітогенез, порівняно з іншими, щодо впливу на виведення молодняку птиці. Проте використаний методичний підхід дозволив нам у короткі терміни виявити ефективний режим лазерної обробки інкубаційного яйця, що позитивно вплинув на ембріональний розвиток та виведення молодняку перепелів.

Висновки. Використання морфометричної оцінки розвитку ембріонів перепела японського на 38-му годину інкубації дало змогу виявити інтервал ефективних та індіферентних густин енергії опромінення інкубаційних яєць птиці щодо впливу на даний показник. Це дало змогу в короткий термін оцінити і частково спрогнозувати вплив певних режимів опромінення інкубаційних яєць на подальший ембріональний розвиток та виведення молодняку птиці.

Показано, що опромінення інкубаційних перепелиних яєць червоним лазерним світлом при густині енергії 3 мДж/см² вірогідно стимулює сомітогенез у ембріонів на 38-у годину інкубації, вірогідно підвищує рівень пероксидного окислення ліпідів у тканинах 7-добових ембріонів та позитивно впливає на показники виведення молодняку.

Перспективою даного дослідження є проведення повної оцінки ефективності широкого інтервалу доз лазерної обробки яйця щодо впливу як на сомітогенез, так і подальший розвиток птиці із проведенням кореляційного аналізу між цими показниками.

2. Вплив лазерного опромінення (густина енергії 3 мДж/см²) на ембріональний розвиток та виведення перепела японського

Показники	Група	
	дослідна	контрольна
Закладено яєць, шт.	99	100
Незапліднені, шт.	7	11
Ембріональна смертність, %:	0*	2,0
1-5 доба інкубації,	2,02	2,0
6-15 доба інкубації,	1,01	2,0
16-17 доба інкубації.	89	83
Отримано перепелят, шт.	89,90	83,0
Виведення, %	96,74	93,26
Виводимість, %		

Примітка. * - $p < 0,05$ порівняно з контролем

Бібліографічний список

1. Михайлов Н. В., Устинсков И. Б., Устинскова Л. А. Влияние света гелий-неонового лазера на рост куриного эмбриона и цыплят // Ученые записки Казанского вет ин-та им. Н.Э. Баумана.–1977.– Т.128.– С.104-108.

2. Якименко І.Л., Рубан А.В., Розумнюк В.Т. До питання про ефективність низькоінтенсивного лазерного опромінення яєць сільськогосподарської птиці // Вісник Білоцерківського держ. аграр. ун-ту. – Біла Церква, 1997. – Вип. 3. – С. 184-187.

3. Мамукаев М. Н. Физиологические показатели, выводимость и жизнеспособность цыплят-бройлеров при светолазерной активации яиц: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.- Боровск, 1988.-18 с.

4. Рольник В.В. Биология эмбрионального развития птиц.– Л.:Наука, 1968.– 425 с.

5. Объекты биологии развития. Под ред. Б.Л.Астаурова. – М.:Наука, 1975.– 580 с.

6. Luiz L et al. Delayed somite formation in a quail line exhibiting myofiber hyperplasia is accompanied by delayed expression of myogenic regulatory factors and myosin heavy chain. Development, 1993, V.117, P 563-569.

7. Андреева Л.И., Кожемякин Л.А., Кишкун А.А. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // Лаб. дело.– 1988.– № 11.– С. 41-43

8. Королюк М.А, Иванова Л.И., Майорова И.Г. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело.– 1988.– № 1.– С. 16-18

9. Тен Э.В. Экспресс-метод определения активности церулоплазмينا в сыворотке крови // Лаб. дело.– 1981.– № 6.– С. 334-335.

10. Моин В.М. Простой и специфичный метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаб. дело.– 1986.– № 12.– С. 724-727.

11. Буртов Ю.З., Владимиров Ю.Н., Голдин Ю.С. Справочник по инкубации яиц – М.: Колос, 1983. – 176 с.

Показано стимулирующее влияние определенных режимов использования красного лазерного света на формирование сомитов у 38-часовых эмбрионов перепела японского. При этом выявлен интервал эффективных и индифферентных доз облучения по влиянию на данный морфометрический показатель. Обосновывается целесообразность использования морфометрических показателей развития эмбрионов для оценки дальнейшей эффективности действия лазерного излучения на объект.

In the experiments Japanese quail embryos at the early stages of development were used as a biological detector of low level laser irradiation. The stimulating effect of somites formation in embryos at 38 hours of incubation under the influence of certain regimens is shown. It is discussed the reason of using of Japanese quail embryos to evaluate the influence of laser irradiation at biological objects.