

Циркадна динаміка структури клітинних популяцій *Rauwolfia serpentina* Benth. за різних умов культивування *in vitro*

І. Ю. Парнікоза, Н. Ю. Мірюта¹, В. І. Адонін¹, В. А. Кунах¹

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Вул. Володимирська, 64, Київ, 01033, Україна

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03680, Україна

kunakh@imbg.org.ua; Parnikoza@gmail.com

За допомогою математичного апарату, розробленого для характеристики фізичних, хімічних та біологічних систем, процеси в яких є спряженими, який отримав назву термодинамічного підходу, досліджено та описано залежності між динамікою часток клітин з різним відносним вмістом ДНК в ядрі (біологічні потоки) та показників проліферації – мітозів та амітозів – (біологічні сили) на циркадному ієрархічному рівні за зміни умов культивування для високопродуктивного штаму K-27 *R. serpentina* – продуцента протиаритмічного алкалоїду аймаліну.

Ключові слова: культура тканин рослин, *Rauwolfia serpentina*, циркадна динаміка, клітинні популяції *in vitro*.

Вступ. Характерною ознакою культури тканин рослин є її висока цитогенетична мінливість [1, 2]. Раніше нами вивчено особливості залежності між динамікою кількісного складу субпопуляцій клітин з різним відносним вмістом ДНК в ядрі (ввДНК) і площею ядра та динамікою питомих швидкостей показників продуктивності впродовж пасажу для різних варіантів культивування високопродуктивного штаму K-27 цінної лікарської рослини раувольфії зміїної *R. serpentina* Benth. – джерела важливих для медицини індолінових алкалоїдів – за допомогою математичного апарату, сконструйованого для опису фізичних, хімічних і біологічних систем, процеси в яких є спряженими, який одержав назву термодинамічного підходу. Відповідні системи рівнянь фактично характеризу-

ють сітку взаємодій перехресних (спряжених) процесів.

З робіт Зотіних [3, 4], де удосконалено відповідний математичний апарат для опису процесів росту і диференціації тканин для вищих організмів, зрозуміло, що при дослідженні культур клітин вищих рослин апарат термодинаміки незворотніх процесів використовувати можна. І проблема полягає у вдалому виборі сил і потоків, а також феноменологічних коефіцієнтів і наданні їм біологічного змісту. На пасажному рівні дослідження проведено досліди з вибору та надання біологічного змісту поняттям сил, потоків, феноменологічних коефіцієнтів, а також визначення коефіцієнтів розмірності, які докладно описано в повідомленні [5]: вивчено та проаналізовано внесок динаміки кількісного складу відповідних субпопуляцій (як біоло-

гічних сил) у динаміку біологічних потоків – динаміку питомих швидкостей показників продуктивності [3–6]. На нижчому ієрархічному рівні – циркадному – динаміку зміни кількісного складу різних субпопуляцій за такою значущою для диференціювання ознакою, як ввДНК, можна вважати потоками, біологічними силами можуть виявитися циркадні динаміки кількісного складу клітин, що проліферують, оскільки фізіологічні явища в культурах тканин, зокрема, проліферативна активність мають циркадні (добові) ритми [2, 7].

Дійсно, градієнт кількості «клітин з певним значенням ввДНК» за «часом біологічного розвитку» при переході на нижчий ієрархічний рівень може вважатися швидкістю накопичення клітин з цією ознакою, тобто, за визначенням, біологічним потоком. Виконання принципів лінійності, Кюрі та Онзагера щодо залежностей біологічних потоків з кандидатами на біологічні сили буде свідчити про вдалий вибір сил і потоків [8]. З іншого боку, при спуску на ще одну сходинку в ієрархії часів релаксації до рівня, де діють найповільніші молекулярні осцилятори, авторами досліджень [9–11], проведених найсучаснішими молекулярними методами на культурі клітин дріжджів, показано, що на рівні експресії блоку з п'яти генів, відповідальних за три стани диференціації клітин у культурі, існує сітка посттранскрипційних шарів регуляції, специфічність одного з генів блоку визначається за більшою кількістю зв'язків [10]. На цьому ієрархічному рівні при дослідженні колективної взаємодії клітин [9–11] кількість останніх, що одночасно синтезують одні й ті самі транскрипти оцінювали непрямыми методами. В дослідженні кількісного складу субпопуляцій клітин, відповідальних різні фізіологічні стани, ми використали стратегії одержання інформації за допомогою статистичних методів, багато в чому подібні до стратегій авторів [10], але на відміну від них спробували записати результати своїх досліджень (які також являють собою сітку взаємодій на рівні популяції клітин) у вигляді системи рівнянь.

У цій роботі ми робимо спробу описати внески біологічних сил – динаміки зміни частки клітин, що проліферують у той чи інший спосіб

(мітозом чи амітозом), у біологічні потоки – динаміку зміни частки субпопуляцій клітин з різним значенням ввДНК за зміни умов культивування штаму K-27 *R. serpentina*.

Матеріали і методи. *Об'єкт дослідження.* Вивчали генетично стабільний протягом понад 15 років вирощування (близько 150 пасажів) штаму K-27 культури тканин *R. serpentina* за стандартних умов культивування на агаризованому середовищі 10С з 10 % сахарози – варіант K-27 (10 С), детально описаний у роботах [2, 12]. Досліджували також варіант вирощування штаму K-27 за умов глибинної культури у рідкому середовищі Рж (варіант K-27 (Рж)). Середовище Рж відрізняється від середовища 10С чотириразовим зменшенням вмісту сахарози (2,5 %) та зниженою концентрацією макро- і мікросолей (див. [13, 14]). Це середовище рекомендовано для промислового вирощування тканин *R. serpentina* [15]. Клітини варіанта K-27 (Рж) зазнають фізіологічного стресу внаслідок зміни способу вирощування (в рідкому середовищі на гойдалках) та істотної зміни вмісту сахарози і солей у живильному середовищі. Усі варіанти культивування вирощували в темряві (досліджувана культура тканин вирощується у темряві від моменту її введення в культуру, тобто протягом 44 років).

Для обох аналізованих варіантів паралельно з пробами для вивчення пасажної динаміки відбирали проби через кожні дві години протягом трьох діб для циркадного дослідження на відрізках пасажу, де продукція індолінових алкалоїдів досягала максимальних значень: 12–15-та доба росту для K-27 (10 С) та 9–11-та доба – для варіанта K-27 (Рж). Продуктивність та умови вирощування див. у роботах [12, 14, 15]. Шматочки калюсу масою близько 1 г відбирали з двох колб, починаючи з 10-ї год ранку першої доби вивчення, через кожні 2 год і закінчуючи 8-ю год останньої доби дослідження. Відібраний матеріал відразу фіксували в суміші льодяної оцтової кислоти та 96 %-го розчину етанолу (1:3) і через добу переносили у 70 %-й етанол, де зберігали до забарвлення.

Відносний вміст ДНК вивчали в ядрах інтерфазних клітин. Готували забарвлені за методом

Фьольгена препарати, як описано раніше [16, 17]. Фотографували 100 забарвлених клітинних ядер на чотирьох препаратах, виготовлених з різних ділянок тканини, через оптичну систему, що складалася з зеленого світлофільтра мікроскопа NU-2E («Carl Zeiss», Австрія), червоного світлофільтра цифрової камери CCD Sac-410 PA, відеодрайвера Asus V 3000. Щільність засвітки вимірювали в пікселях на цифрових фотографіях відносно забарвленої за Фьольгеном анафази, використовуючи програму Scion Image.

Визначення проліфераційних індексів. Готували давлені препарати, забарвлені ацетоорсеїном, як описано в [17]. Мітотичний та амітотичний індекси (МІ та АМІ відповідно) підраховували, аналізуючи кожні дві години росту 5 тис. клітин на чотирьох різних препаратах, виготовлених з різних ділянок калусної тканини. На основі отриманих щодві години даних будували циркадну динаміку відповідного проліфераційного індексу. Як біологічні сили використовували динаміки частки мітозів чи амітозів (МІ*0,01 або АМІ*0,01).

Статистична обробка. З кожної точки відбору проб брали по 100 клітин і за значеннями ввДНК в ядрі їх розділяли на окремі морфометричні класи (табл. 1), у такий спосіб одержано динаміку розподілів клітин за значеннями ввДНК в ядрі. Для кожного класу зроблено зріз уздовж осі часу, частку клітин в кожний момент часу помножено на частку клітин цього класу у загальній вибірці (табл. 1) і таким чином отримано динаміки часток клітин з різними значеннями ввДНК у ядрі для морфометричних класів, наведених у табл. 1 (рис. 1). Ці криві, як і динаміки частки мітозів та амітозів (вираховані на 5000 клітин за стандартною методикою), згладжували методом середнього змінного по двох точках (російськомовний варіант – скользящее среднее, англ. moving average). Після цього динаміки ввДНК різних значень порівнювали з динамікою показників проліферації методом парної лінійної регресії згідно з [18], знаходили коефіцієнти кореляції і відповідне значення критеріальної статистики за формулою, наведеною у примітці до табл. 2; за незначущої кореляції відповідні коефіцієнти позначено 0.

Таблиця 1

Частка класів клітин з різним відносним вмістом ДНК в ядрі (ввДНК) у різних варіантах вирощування штаму К-27 *R. serpentina*

ввДНК, С	Частка класу	
	К-27 (10 С)	К-27 (Рж)
<i>Перша субпопуляція</i>		
<1	0,0003	0,0006
1–2,99	0,2761	0,1717
<i>Друга субпопуляція</i>		
3–4,99	0,5867	0,5303
5–6,99	0,1189	0,2292
7–8,99	–	0,0569
<i>Третя субпопуляція (незалучена)</i>		
7–8,99	0,0133	–
9–10,99	0,0028	0,0083
>11	0,0019	0,0031

За принципом термодинамічного підходу біологічними потоками на циркадному ієрархічному рівні будемо вважати динаміку зміни частки клітин за показником ввДНК у ядрі для субпопуляцій, виділених на пасажному рівні [6]. Лінійні залежності між динаміками часток клітин відповідних субпопуляцій і динаміками частки мітозів та амітозів, які при застосуванні термодинамічного підходу на циркадному рівні претендують на роль біологічних сил, визначали методом парної лінійної регресії за [18]. Подальшу процедуру обробки детально наведено у [5]. Для оцінки адекватності розрахованих кривих до експериментальних використано метод оцінки нормальності розподілу з нульовим математичним очікуванням квадратів відхилень між порівнюваними кривими [18].

Результати і обговорення. На пасажному рівні вивчення у двох варіантах вирощування культури тканин *R. serpentina* К-27 (10 С) та К-27 (Рж) використано дві основні субпопуляції клітин, які різняться за відносним вмістом ДНК у ядрі: 1,0–2,9 С і 3,0–6,9 С та 1,0–2,9 С і 3,0–8,9 С відповідно. Циркадну динаміку зміни їхніх часток на відрізках: 12–15-та доба росту для К-27 (10 С) та 9–11-та доба

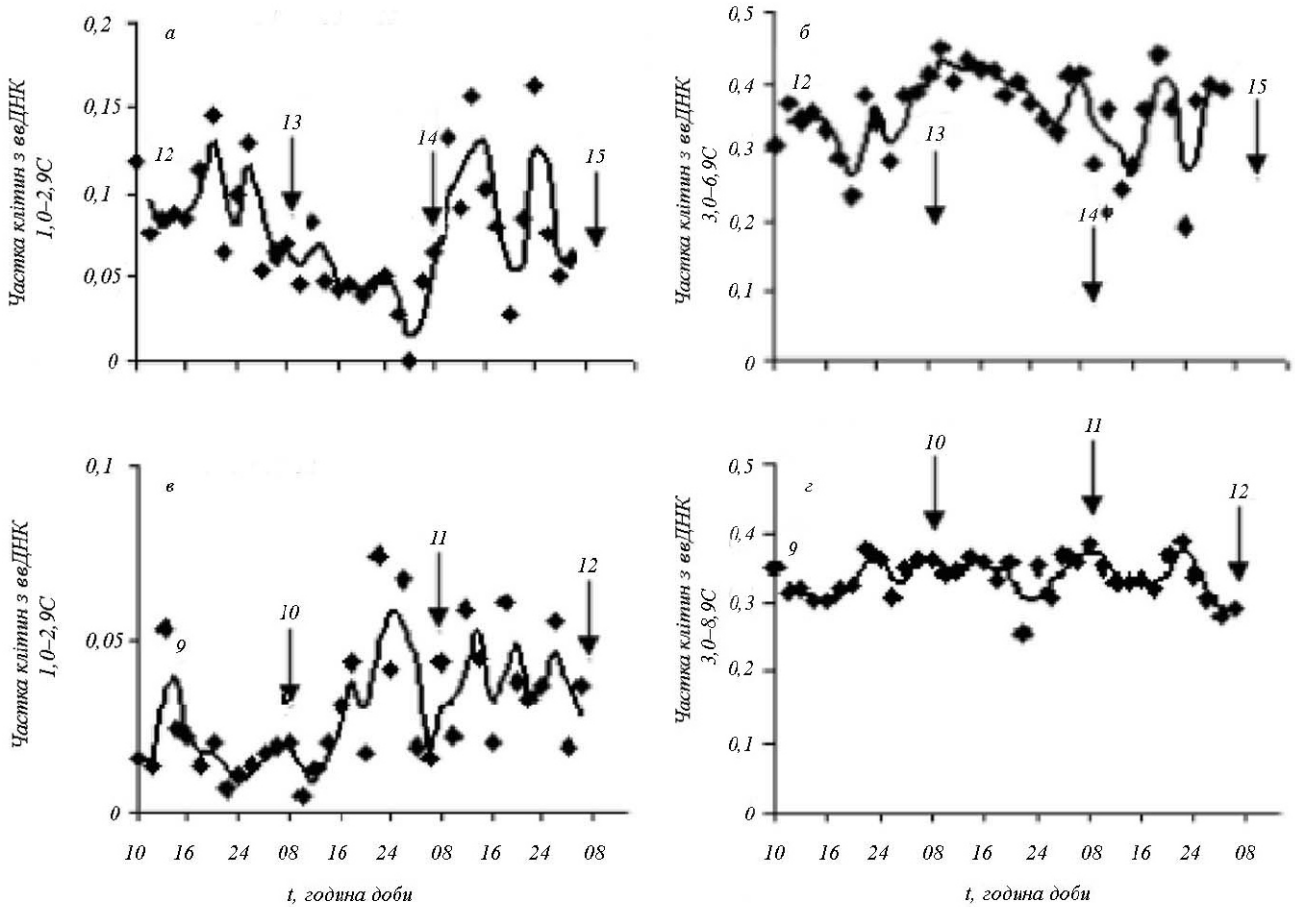


Рис. 1. Динаміка зміни частки клітин (де за 100 % прийнято 1) з різним вДНК в ядрі за умов культивування на агаризованому середовищі 10 С (варіант К-27 (10 С)) (а, б) та за умов глибинного вирощування в рідкому середовищі Рж (варіант К-27 (Рж)) (в, г) протягом 12–15-ї та 9–12-ї діб культивування. Стрілками позначено початок відповідної доби росту

для К-27 (Рж) представлено на рис. 1. Частки окремих морфометричних класів для циркадної динаміки, надалі об'єднаних у субпопуляції, наведено у табл. 1. У досліджених варіантів культивування на вивченому відрізку пасажу домінувала субпопуляція з вДНК 3,0–6,9 С – 70,6 % (0,71) для К-27 (10 С) та з вДНК 3,0–8,9 С – 82 % (0,82) для К-27 (Рж). Тобто на циркадному рівні зміни домінуючої субпопуляції клітин за вДНК на дослідженому проміжку трьох діб пасажу не спостерігали.

В обох варіантах (К-27 (10 С) і К-27 (Рж)) визначено два механізми проліферації: мітотичну та амітотичну проліферацію, їхню циркадну динаміку представлено на рис. 2.

Циркадна ритміка мітозів упродовж трьох діб вивчення виявилася подібною в обох варіантах

культивування. Так, в обох випадках спостерігали шість основних піків, на кожену добу припадало по два піки мітотичної активності, положення яких у часі змінювалося від доби до доби (рис. 2, а, б). Зміна умов культивування практично не впливала ні на середню, ні на максимальну величину МІ, які для обох варіантів культивування залишалися на рівні 0,14 та 0,4 % відповідно.

В динаміці АМІ в обох випадках також відмічено шість основних піків, утім конфігурація кривої візуально відрізнялася (рис. 2, в, г). У К-27 (10 С) середній АМІ дорівнював 1,1 %, перевищуючи МІ (0,14 %) майже на порядок, тоді як у варіанта К-27 (Рж) АМІ становив у середньому 0,52 %, що більше, ніж МІ (0,14 %), майже в 3 рази. Максимальні значення АМІ були вищими у варіанті К-27 (10 С) – 2,5 проти 1,2 % у К-27 (Рж).

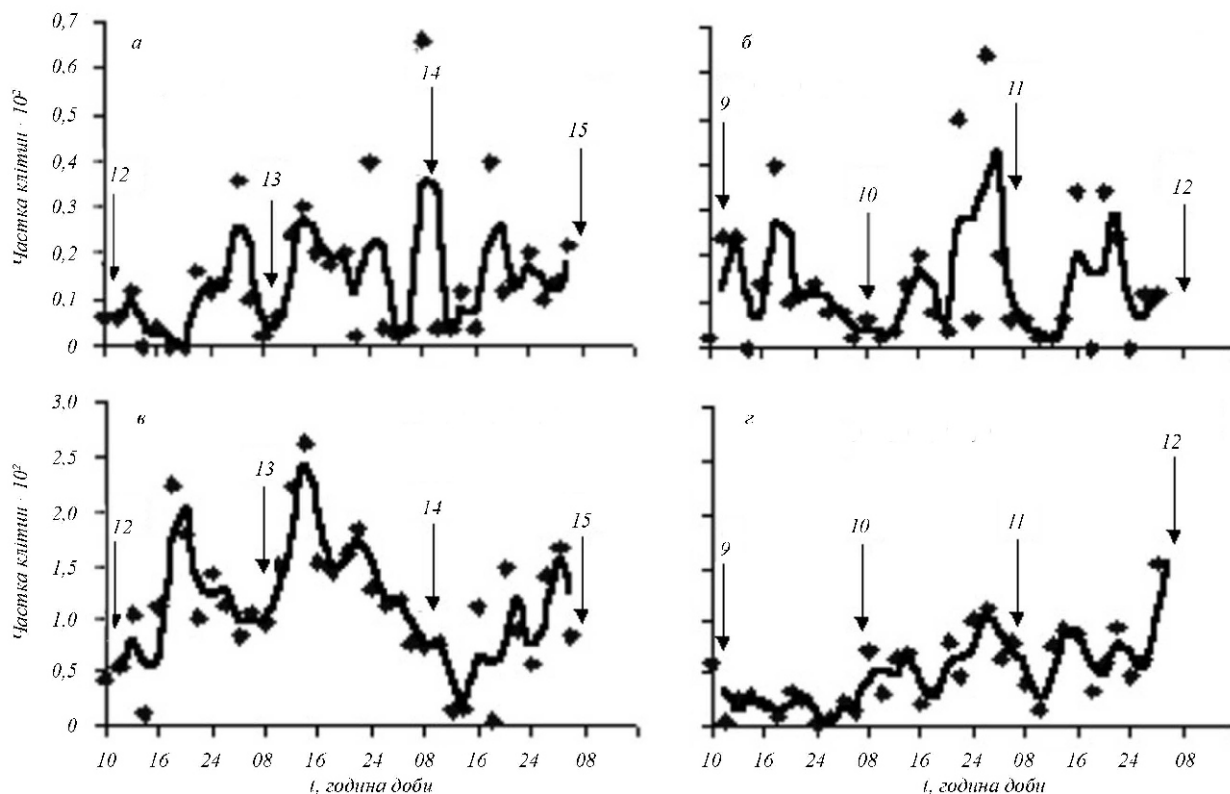


Рис. 2. Динаміка зміни частки мітозів (а) та амітозів (в) за умов культивування на агаризованому середовищі 10 С (варіант К-27 (10 С)), а також мітозів (б) та амітозів (г) за умов глибинного вирощування в рідкому середовищі Рж (варіант К-27 (Рж)) протягом 12–15-ї та 9–12-ї діб культивування відповідно. Стрілками позначено початок доби росту. Для зручності розрахунку за допомогою термодинамічних рівнянь замість проліфераційних індексів (%) використано частку мітозів чи амітозів, де 100 % прийнято за 1

Підґрунтям для опису дослідженої системи за допомогою феноменологічної системи рівнянь стали загальнотеоретичні роботи Зотіних [3, 4], де викладено основні принципи термодинамічного підходу, зокрема, для культури клітин і тканин, експериментальна робота [5], де надано біологічний зміст поняттям сил і потоків для досліджень на пасажному рівні культури тканин *R. serpentina* та представлено докази на користь можливості застосування термодинамічної моделі з відповідними значеннями сил і потоків на рівні пасажу.

В експериментальній роботі [6] наведено результати досліджень трьох варіантів культивування із значеннями їхніх феноменологічних коефіцієнтів. В ній уведено також поняття коефіцієнта адаптації, який практично характеризує зміну величини коефіцієнта «провідності» відповідної властивості (градієнт якої – динаміка частки клітин з даною властивістю при релаксації

системи після пересадки – являє собою силу) порівняно з коефіцієнтом адаптації властивості накопичення біомаси (який завжди дорівнює одиниці) у «провіднику» (культура тканин, вміщена у середовище з певним вмістом живильних речовин, яка створює певний градієнт концентрацій цих речовин у процесі росту і диференціації клітин різними шляхами, що призводить до зміни частки клітин відповідної спеціалізації протягом пасажу).

Намагаючись перейти до досліджень на циркадному рівні, ми користувалися одержаними раніше Кунахом і співавт. даними [2] та дослідями і моделями для культури дріжджів за умов проточного культивування (на відміну від застосованих нами умов періодичного культивування) [19]. З останньої роботи ми взяли ідею урахування «віку» клітин і застосували її при складанні відповідної системи феноменологічних рівнянь. Досліджена нами система є ергодичною, ми не синхронізували

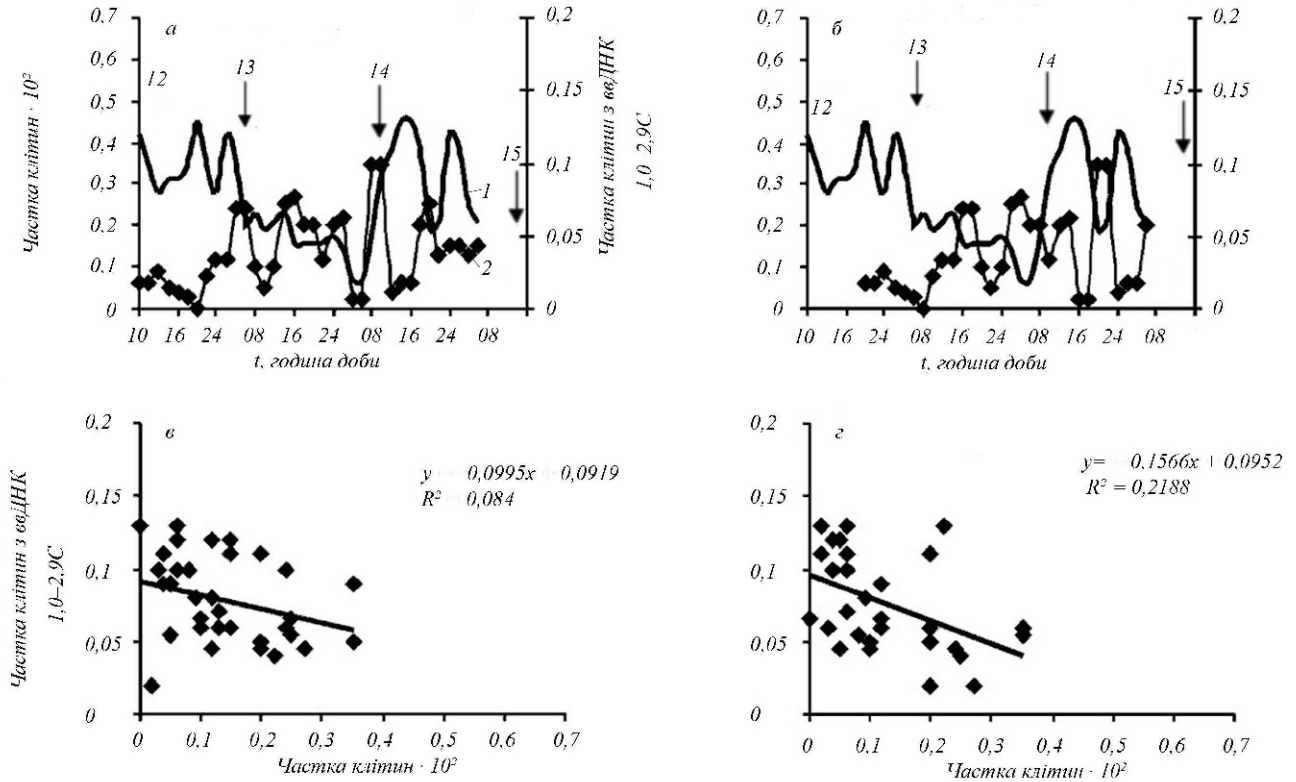


Рис. 3. Циркадна динаміка зміни частки клітин з ввДНК в ядрі 1,0–2,9 С (крива 1) та частки мітозів (крива 2) впродовж 12–15-ї діб росту клітинної лінії К-27 (10 С) *R. serpentina* за умов поверхневого культивування на агаризованому середовищі 10 С: без зсуву (а) та із зсувом кривої мітотичного індексу відносно кривої частки клітин з ввДНК 1,0–2,9 С на 12 год (б); на графіках в та г наведено рівняння прямих регресії, проведених методом найменших квадратів, та квадрати відповідних коефіцієнтів кореляції. Значення критеріальної статистики для величин R^2 , наведених на графіках: в – $F_{1,34} = 3,13$ (не перевищують значення верхньої 5 % межі F -розподілу для $N = 36$ ($F_{1,34} = 4,17$)) та г – $F_{1,28} = 7,84$ (перевищують значення верхньої 5 %-ї межі F -розподілу для $N = 30$ ($F_{1,28} = 4,20$)), що означає відсутність лінійної залежності у першому випадку і наявність лінійної залежності у другому

поділи ніяким методом, включаючи спеціальну світлову обробку, тобто вона є системою «з відключеним годинником» [9].

З літератури відомо [20], що практично неможливо розрізнити довжину мітотичного циклу та циклів епігенетичних процесів за характерними часами релаксації, отже, не виключено, що ми спостерігаємо на кривих циркадної динаміки спектр коливань метаболічних процесів, не пов'язаних із світловим годинником, тому період коливань змінюється протягом пасажу при періодичному культивуванні (разом з використанням наданих при пересадці ресурсів живильних речовин) [2]. Ця обставина збільшила підстави використати термодинамічний підхід.

Таким чином, внесок кожної динаміки зміни частки проліферуючих клітин у динаміку зміни

частки відповідної субпопуляції за ввДНК, у загальному вигляді відбиває система феноменологічних рівнянь:

$$I_l(t) = I_{lm}(t) + \sum_{s=1}^m \sum_{k=1}^{36} A_{ls} R_{lsk}(t-k) X_{sk}(t-k),$$

де $I_l(t)$ – потік клітин субпопуляції з ввДНК 1,0–2,9 С; $I_2(t)$ – потік клітин субпопуляції з ввДНК 3,0–6,9 С для К-27 (10 С) або 3,0–8,9 С для К-27 (Рж); ($I_l(t)$, $l = 1, 2$), феноменологічні коефіцієнти (як і сили) мають складнішу структуру, ніж $L_{ls} = R_{lsk} A_{lsk}$ ($X_{lk}(t)$, $s = 1, 2$) через урахування впливів попередніх значень сили на наступні значення потоку (див. розшифровку позначень t , m , k). Конкретне значення та знак коефіцієнта кореляції (R_{lsk})

Таблиця 2

Коефіцієнти кореляції R_{lsk} динаміки потоків* і сил** із послідовними зсувами на k точок щодві години ($k = 1 \dots 33$) динаміки проліферації відносно динаміки відповідної субпопуляції клітин за ввДНК в ядрі

k	Зсув, год	К-27 (10 С)				К-27 (Рж)			
		$I_1 (X_{ik})$		$I_2 (X_{ik})$		$I_1 (X_{ik})$		$I_2 (X_{ik})$	
		R_{11k}	R_{12k}	R_{21k}	R_{22k}	R_{11k}	R_{12k}	R_{21k}	R_{22k}
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	0	0	-0,40	0,42	0,49	0,42	0,53	0	0
1	2	0	-0,40	0	0,43	0	0,50	0	0
2	4	0	-0,47	0	0,41	0	0,52	0	0
3	6	0	-0,47	0	0,39	0	0,57	0	0
4	8	0	-0,44	0	0,37	0	0,56	0	0
5	10	-0,37	-0,52	0	0,42	0	0,63	0	0
6	12	-0,47	-0,50	0	0,37	0	0,69	0	-0,47
7	14	0	0	0	0	0	0,52	0	-0,49
8	16	0	0	0	0	0	0,38	0	0
9	18	0	0	0	0	0	0	0,41	0
10	20	0	0	0	0	0	0	0,41	0
11	22	0	0	-0,46	0	0	0	0	0
12	24	0	0,49	-0,70	-0,55	0	0	0	0
13	26	0	0,53	-0,43	-0,70	0	-0,59	-0,60	0
14	28	0	0	0	-0,58	0	0	-0,66	-0,49
15	30	0	0	0	0	0	0	0	0
16	32	0,63	0	-0,48	0	0	0	0	0
17	34	0,81	0	-0,71	0	0	0	0	0
18	36	0,61	0	-0,54	0	0	0	0	0
19	38	0	0	0	0	0	0	0	0
20	40	0	0,50	0	0	0	0	0	-0,60
21	42	0	0,55	0	0	0	0	0	-0,64
22	44	0	0	0	0	0	0	0	-0,64
23	46	0	0	0	0	0	0	0	0
24	48	0	0	0	0	0	0	0	0
25	50	0	0	0	0	0,71	0	0	0,63
26	52	0	0	0	0	0	0	0	0
27	54	0	0	0	0	0	0	0	0
28	56	0	0	0	0	0	0	0	0
29	58	0	0	0	0	0	0	0	0

Закінчення табл. 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
30	60	0	0	0		-0,88	0,82	0	0
31	62	0	0	0	0	0	0	0	0
32	64	0	0	0	0	0	0	0	0
33	66	0	0	0	0	0	0	0	0

Примітка. *Потік I_1 – динаміка частки субпопуляції клітин з відносним вмістом ДНК 1,0–2,9 С; потік I_2 – динаміка частки субпопуляції клітин з відносним вмістом ДНК 3,0–6,9 С для К-27 (10 С) та 3,0–8,9 С для К-27 (Рж); **сила X_{ik} – динаміка частки клітин, що проліферують за допомогою мітозу ($l = 1$) або амітозу ($l = 2$).

Порівняння динамік проводили методом парної лінійної регресії. Критеріальну статистику вираховували за формулою $F_{1,N-2} = (N-2)R^2/(1-R^2)$, для ненульових коефіцієнтів кореляції значення критеріальної статистики перевищувало значення верхньої 5% границі F -розподілу, яке для $N = 36$ становить $F_{1,34} = 4,17$ (перший рядок – $k = 0$) та для $N = 6$ $F_{1,4} = 7,71$ (31-й рядок – $k = 30$).

свідчать про внесок конкретної динаміки зміни частки клітин, що проліферують певним чином (мітозом, амітозом), – термодинамічної сили: $X_1(t+k)$ чи $X_2(t+k)$ – у відповідний біологічний потік $I_1(t)$ чи $I_2(t)$ (t – час, m – початкове значення t від початку пасажу, з якого розпочато відбір проб циркадної динаміки, k – кількість точок, на які зсувається динаміка величини, що є силою, відносно динаміки величини, яка є потоком, для урахування внесків попередніх значень біологічних сил у моменти часу $t+m$, у біологічні потоки у моменти часу $t+m+k$) (рис. 3, табл. 2); A_{ls} – коефіцієнти адаптації, конкретні числові значення для кожної з досліджених систем представлено нижче.

Експериментальні значення динаміки потоків та їхні значення, розраховані з рівнянь, наведено на рис. 4. Оцінку адекватності відповідних кривих проведено за допомогою методу оцінювання нормальності розподілу з нульовим математичним очікуванням квадратів відхилень між порівнюваними кривими. Ця оцінка показує адекватність кривих принаймні на відрізку, що відповідає останнім двом дням з трьох досліджених (відхилення протягом першої доби можуть бути наслідком того, що не враховано внески сил попередньої доби).

Порівняння внесків динаміки мітозів та амітозів у динаміку частки клітин з різним ввДНК в ядрі. За зміни умов культивування спостерігали відмінності в залежності динаміки окремих субпопуляцій клітин за ввДНК від частки клітин, що проліферу-

ють. У варіанті К-27 (10 С) без зсуву в часі та із зсувом на 2–12 год динаміки частки проліферуючих клітин відносно динаміки частки субпопуляцій клітин з різним ввДНК встановлено позитивний внесок МІ та АМІ у зміну частки клітин з ввДНК 3,0–6,9 С та негативний – у зміну частки клітин з ввДНК 1,0–2,9 С.

У варіанті К-27 (Рж) без зсуву в часі та із зсувом на 2–16 год уздовж осі t вправо відмічено позитивний внесок МІ та АМІ в зміну частки клітин з ввДНК 1,0–2,9 С та негативний внесок АМІ (за відсутності кореляції з МІ) у зміну частки клітин субпопуляції 3,0–6,9 С (табл. 2). Отже, на дослідженому відрізку в обох варіантах культивування проліферативна активність, що випереджає на величину вищевказаного зсуву появу клітин певної субпопуляції, імовірно, визначає появу клітин – попередниць саме цієї субпопуляції клітин, яка у досліджених варіантах культивування різна.

У варіанті К-27 (10 С) із зсувом динаміки проліфераційних індексів уздовж осі t вправо відносно динаміки відповідних субпопуляцій частки клітин з різним ввДНК більш ніж на 16 год внески МІ та АМІ у зміну частки обох субпопуляцій клітин змінюються на протилежні: для субпопуляції 1,0–2,9 С вони стають позитивними, а для 3,0–6,9 С – негативними. У варіанті К-27 (Рж) динаміка МІ та АМІ із зсувом уздовж осі t вправо відносно динаміки відповідних субпопуляцій за ввДНК мають як позитивні, так і негативні внески в

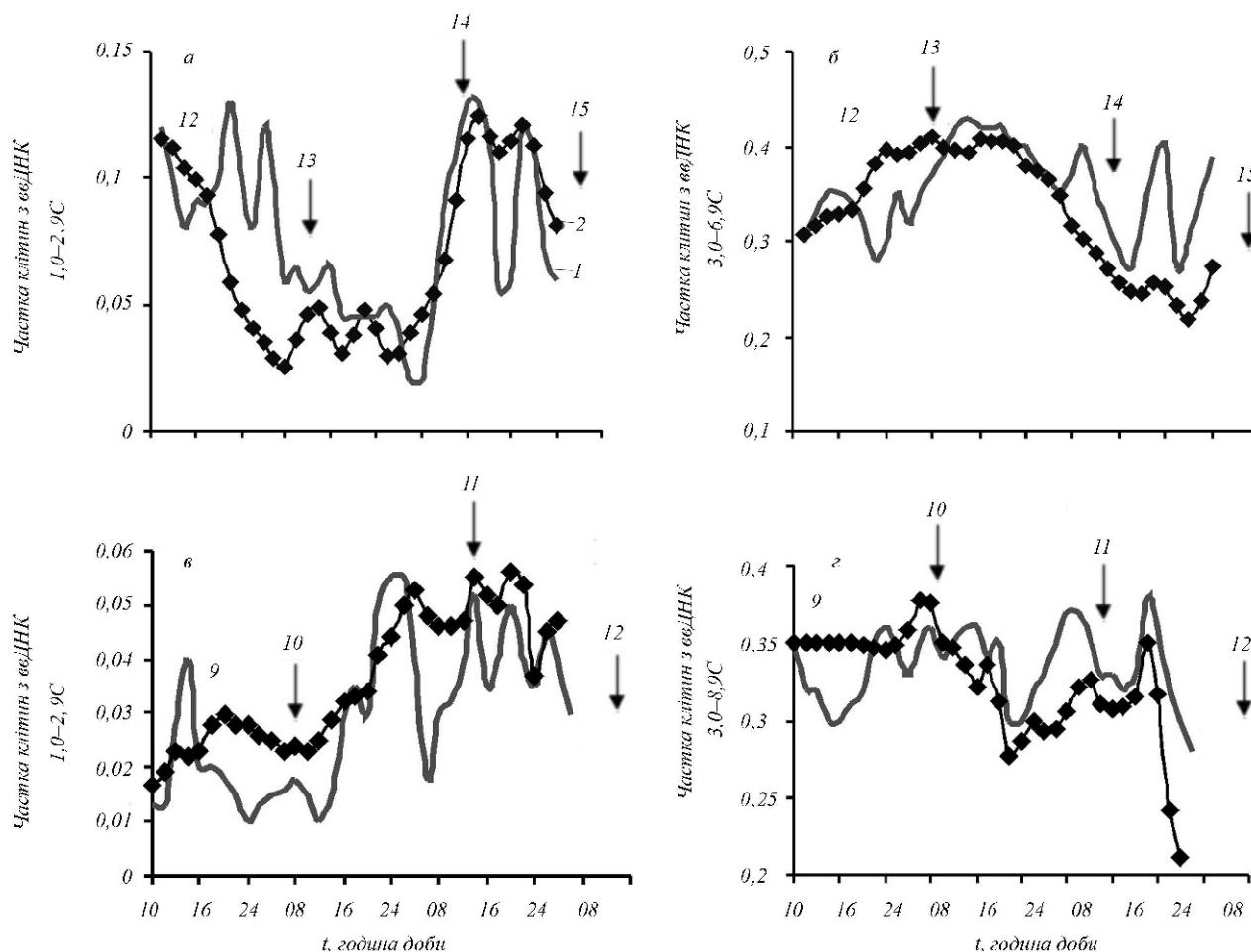


Рис. 4. Динаміка зміни частки субпопуляцій клітин з ввДНК в ядрі 1,0–2,9 С (а) та 3,0–6,9 С (б) у варіанта К-27 (10 С) протягом 12–15-ї діб культивування і субпопуляцій клітин з ввДНК в ядрі 1,0–2,9 С (в) та 3,0–8,9 С (г) у варіанта К-27 (Рж) протягом 9–12-ї діб культивування (а–г: 1 – потік $I_1(t)$, визначений з експерименту; 2 – потік $I_1(t)$, визначений з рівняння, $l = 1, 2$). Усі експериментальні дані згладжено за середнім змінним. Стрілками позначено початок відповідної доби росту

зміну частки обох субпопуляцій клітин з різним ввДНК (табл. 2).

Таким чином, за зміни умов культивування проліферація переключається на продукцію протилежної субпопуляції клітин (у даному разі – з більшим вмістом ввДНК, тобто поліплоїдних клітин). При порівнянні варіантів культивування виявляється зміна субпопуляції клітин за ввДНК в ядрі, в динаміку якої з певним часовим зсувом роблять позитивний внесок динаміки біологічних сил – мітозів та амітозів.

Аналіз коефіцієнтів адаптації біологічних сил та потоків A_{ls} за зміни умов культивування. Виявилося, що зміна умов культивування впливає на ви-

рахуваний за наведеною вище системою рівнянь коефіцієнт адаптації A_{ls} динаміки окремих показників проліферації – біологічних сил до певного потоку. Для варіанта К-27 (10 С) коефіцієнти адаптації описуються матрицею: $A_{ls} \begin{vmatrix} 2 & 2 \\ 5 & 3 \end{vmatrix}$ для системи рівнянь з початковими значеннями $m = 144$ (точка відбору проб, яка відповідає 10-й год 12-ї доби); $I_{1m} = 0,12$ (значення потоку субпопуляції клітин з ввДНК 1,0–2,9 С у момент початку відбору проб); $I_{2m} = 0,3$ (значення потоку субпопуляції клітин з ввДНК 3,0–6,9 С у момент початку відбору проб); для варіанта К-27 (Рж) коефіцієнти адаптації описуються матрицею: $A_{ls} \begin{vmatrix} 5 & 1 \\ 60 & 1 \end{vmatrix}$ для системи рівнянь з початковими значеннями $m = 108$ (точка відбору

проб, яка відповідає 10-й год 9-ї доби); $I_{1m} = 0,013$ (значення потоку субпопуляції клітин з ввДНК 1,0–2,9 С у момент початку відбору проб); $I_{2m} = 0,35$ (значення потоку субпопуляції клітин з ввДНК 3,0–8,9 С у момент початку відбору проб). Так, у варіанті К-27 (10 С) коефіцієнти адаптації обох біологічних сил відносно потоку субпопуляції клітин з ввДНК 1,0–2,9 С рівні. У випадку субпопуляції 3,0–6,9 С коефіцієнт адаптації біологічної сили – динаміки зміни частки мітозів – в 1,67 разу більший, ніж іншої біологічної сили – динаміки зміни частки амітозів. У разі біологічного потоку субпопуляції клітин з ввДНК 1,0–2,9 С у варіанті культивування К-27 (Рж) коефіцієнт адаптації біологічної сили – динаміки зміни частки мітозів – перевищує значення цього ж параметра для амітозів у 5 разів. У випадку другого потоку – динаміки субпопуляції клітин з ввДНК 3,0–8,9 С – коефіцієнт адаптації біологічної сили – динаміки зміни частки мітозів – перевищує значення цього ж параметра для амітозів у 60 разів.

Порівняльний аналіз коефіцієнтів адаптації свідчить про те, що за зміни умов культивування у 12 разів зростає коефіцієнт адаптації динаміки зміни частки мітозів та в 3 рази зменшується коефіцієнт адаптації динаміки зміни частки амітозів до продукції клітин з високими значеннями ввДНК, причетних до диференціації, за рахунок накопичення індолінових алкалоїдів чи утворення трахеїд, як це показано на пасажному ієрархічному рівні.

Висновки. Математичний апарат, сконструйований для опису фізичних, хімічних і біологічних систем, процеси в яких є спряженими, дещо модифікований для урахування «віку» клітин. Він дозволяє визначити в культурі тканин залежність динаміки частки клітин з різним вмістом ДНК в ядрі (як біологічних потоків) від динаміки частки мітотично та амітотично проліферуючих клітин (як біологічних сил) на циркадному ієрархічному рівні.

Аналіз коефіцієнтів кореляції між силами і потоками показав: за зміни умов культивування змінюється перебіг процесів, що спричиняють динаміку частки субпопуляції клітин за ввДНК в ядрі, в динаміку якої із певним часовим зсувом роблять

позитивний внесок біологічні сили – динаміки частки мітозів та амітозів.

Реакція культури тканин *R. serpentina* на зміну умов культивування супроводжується зміною коефіцієнту адаптації відповідної сили до потоку при переході до глибинного вирощування: виявлено підвищення внеску динаміки частки мітозів у зростання кількості клітин з високим вмістом ДНК в ядрі. Високі коефіцієнти адаптації можуть свідчити про пріоритетність мітотичної проліферації для збільшення частки клітин, які потім диференціюються поліплоїдизацією у клітини, що продукують індолінові алкалоїди.

I. Yu. Parnikoza, N. Yu. Miriuta, V. I Adonin, V. A Kunakh

Circadian rhythms of cell population structure of *Rauwolfia serpentina* Benth. under different culture conditions *in vitro*

Summary

A thermodynamic approach has been used to study dependence between the incidence of cells with various DNA content in nucleus and the proliferation rate (mitoses and amitoses). These biological fluxes and forces have been analyzed at the circadian hierarchic level upon changes in the culture conditions for the Rauwolfia serpentina K-27 strain, a product of the anti-arrhythmic alkaloid ajmaline.

Keywords: plant tissue culture, Rauwolfia serpentina, circadian cell population rhythm in vitro.

И. Ю. Парникоза, Н. Ю. Мирюта, В. И. Адонин, В. А. Кунах

Циркадная динамика структуры клеточных популяций *Rauwolfia serpentina* Benth. в различных условиях культивирования *in vitro*

Резюме

*С помощью математического аппарата, разработанного для характеристики физических, химических и биологических систем, процессы в которых являются сопряженными, получившего название термодинамического подхода, исследованы и описаны зависимости между динамикой частоты клеток с разным относительным содержанием ДНК в ядре (биологические потоки) и показателей пролиферации – митозов и амитозов – (биологические силы) на циркадном иерархическом уровне при изменении условий культивирования для высокопродуктивного штамма К-27 *R. serpentina* – продуцента противоритмического алкалоида аймалина. Ключевые слова: культура тканей растений, *Rauwolfia serpentina*, циркадная динамика клеточных популяций *in vitro*.*

PERELIK LITERATURY

1. Lee M. The chromosomal basis of somaclonal variation // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.–1988.–**39**.– P. 413–437.

2. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи.—Київ: Логос, 2005.—730 с.
3. Зотин А. И., Зотина Р. С. Термодинамический подход к проблемам развития, роста и старения // Журн. общ. биологии.—1969.—**30**, № 1.—С. 94–109.
4. Зотина Р. С., Зотин А. И. Объединенные уравнения роста // Журн. общ. биологии.—1973.—**34**, № 4.—С. 606–616.
5. Мирюта Н. Ю., Парникоза И. Ю., Аль-Аммури Ю., Кунах В. А. Применение термодинамического подхода для изучения динамики клеточных популяций *in vitro* на примере культуры тканей *Rauwolfia serpentina* Benth.—продуцента индолиновых алкалоидов // Биотехнология.—2006.—№ 2.—С. 78–95.
6. Парникоза І. Ю., Мирюта Н. Ю., Аль-Аммури Ю., Кунах В. А. Динаміка клітинних популяцій *Rauwolfia serpentina* Benth. в різних умовах культивування *in vitro* // Біополімери і клітина.—2008.—**24**, № 4.—С. 300–310.
7. Ripperger J. A., Shearman L. P., Reppert S. M., Schibler U. Clock, an essential pacemaker component, controls expression of circadian transcription factor DBP // Genes and Develop.—2000.—**14**.—Р. 679–689.
8. Чалый А. В. Неравновесные процессы в физике и биологии.— Киев: Наук. думка, 1997.—183 с.
9. Bianchi M. M. Collective behavior in gene regulation: Metabolic clocks and cross-talking // FEBS J.—2008.—**275**.—Р. 2356–2363.
10. Palumbo M. C., Farina L., De Santis A., Giuliani A., Colosimo A., Morelli G., Ruberti I. Collective behavior in gene regulation: Post-transcriptional regulation and the temporal compartmentalization of cellular cycles // FEBS J.— 2008.—**275**.—Р. 2364–2371.
11. Klevecz R. R., Li C. M., Marcus I., Frankel P. H. Collective behavior in gene regulation: The cell is an oscillator, the cell cycle a developmental process // FEBS J.—2008.—**275**.—Р. 2372–2384.
12. Кунах В. А., Аль-Аммури Ю., Мирюта Н. Ю., Можилевская Л. П. Накопление индолиновых алкалоидов клеточными линиями раувольфии змеиной при поверхностном и глубинном выращивании // Биополімери і клітина.—2006.—**22**, № 2.—С. 149–156.
13. Каухова И. Е., Волосович А. Г., Цыганков В. А. Выбор питательной среды для глубинного культивирования тканей раувольфии змеиной (*Rauwolfia serpentina* Benth.) // Растит. ресурсы.—1981.—**17**, № 2.—С. 217–224.
14. Кунах В. А., Можилевская Л. П., Губарь С. И. Особенности получения и продуктивность суспензионных клонов раувольфии змеиной *Rauwolfia serpentina* Benth. *in vitro* // Биотехнология.—2001.—№ 4.—С. 9–21.
15. Деклараційний пат. України № 12083/п1 від 27.03.2006, Спосіб вирощування калусної культури тканин раувольфії зміїної *Rauwolfia serpentina* Benth.—продуцента аймаліну / В. А. Кунах, Ю. Аль-Аммури, Л. П. Можилевська, Н. Ю. Мирюта // Бюл. № 5.
16. Kiernon J. A. Histological and histochemical methods. Theory and practice.—New-York: Pergamon press, 1990.—364 p.
17. Парникоза І. Ю., Мирюта Н. Ю., Ал-Аммури Ю., Адонін В. І., Кунах В. А. Особливості процесів проліферації та диференціації в культурі тканин *Rauwolfia serpentina* Benth. // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів.—2006.—**4**, № 2.—С. 210–216.
18. Поллард Дж. Справочник по вычислительным методам статистики.—М.: Финансы и статистика, 1982.—344 с.
19. Печуркин Н. С., Брильков А. В., Марченкова Т. В. Популяционные аспекты биотехнологии.—Новосибирск: Наука, 1990.—170 с.
20. Гудвин Б. Аналитическая физиология клеток и развивающихся организмов.—М.: Мир, 1979.—287 с.

УДК 576.53:581.143.6
Надійшла до редакції 18.02.08