

УДК 575.23+615.222:581.143.6

## ДИНАМІКА КЛІТИННИХ СИСТЕМ *in vitro*. І. ОРГАНІЗАЦІЯ У ЧАСІ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ СИСТЕМИ КУЛЬТУРИ ТКАНИН РАУВОЛЬФІЇ ЗМІІНОЇ НА ДОБОВОМУ РІВНІ ОРГАНІЗАЦІЇ

Н. Ю. Мірjuta  
В. А. Кунах

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

E-mail: kunakh@imbg.org.ua

Ріст і розвиток як цілісного організму, так і культивованих тканин рослин зумовлені певними коливальними змінами динамічних характеристик клітинних систем, що формують відповідні тканини чи організм у цілому. Проте ці фундаментальні процеси вивчено недостатньо.

На прикладі культури тканин раувольфії зміїної досліджено динаміку клітинних систем, зокрема їх організацію в часі на добовому ієрархічному рівні. За показниками Ляпунова досліджено фазові траєкторії динаміки частки клітин з різним вмістом ДНК в ядрі й різною площею ядерця та динаміки показників проліферації (мітозів і амітозів) за зміни умов культивування для високопродуктивного штаму К-27 *Rauwolfia serpentina* — продуцента протиаритмічного алкалоїду аймаліну. Висунуто гіпотезу, згідно з якою в разі застосування біотехнологічних прийомів збільшення продуктивності досліджуваної культури клітин включаються механізми динамічної спадкової пам'яті.

**Ключові слова:** клітинні популяції *in vitro*, динаміка клітинних систем, фазові траєкторії, *Rauwolfia serpentina*.

Коливальний режим функціонування регуляторних систем клітини давно привертає увагу дослідників. Такі коливання часто виникають у системах зі зворотним зв'язком. Існує низка фактів, які свідчать, що в динамічній організації клітини закладено певну фундаментальну періодичність. Свого часу було сформульовано гіпотезу про те, що первинні коливання, які лежать в основі організації клітини в часі, виникають через наявність зворотних зв'язків у системах, що регулюють фізіологічну активність [1, 2]. Проте ці фундаментальні явища і процеси вивчено недостатньо. Разом з тим подальше накопичення даних з динаміки клітинних систем є важливим для розроблення теоретичних основ клітинної біотехнології.

В організації клітинних систем, що формують тканини чи організм у цілому як у природі, так й *in vitro*, виділяють різні рівні за часом релаксації (хвилини, години,

дні і т. д.). Для систем *in vitro* ми виділили для вивчення добовий (циркадний), пасажний та міжпасажний рівні організації. У цьому дослідженні розглянуто клітинну систему на добовому рівні організації.

Одним з показників фізіологічного гомеостазу є добова ритміка мітотичних поділів [3, 4]. У цілісних рослин за збереження ритму характер кривої може бути різним для меристеми різних органів і може змінюватися залежно від плоідності рослини, температури, сезону, тривалості світлового дня та інших чинників [3–7]. За введення в культуру *in vitro* первинному калюсу добова ритміка є властивою не лише для загальної кількості мітозів, а й для мітозів клітин різних рівнів плоідності. При цьому клітини з неоднаковим числом хромосом діляться переважно в різний час доби. У другому-третьому пасажі після отримання калюсних тканин порушується добовий ритм мітотичної активності

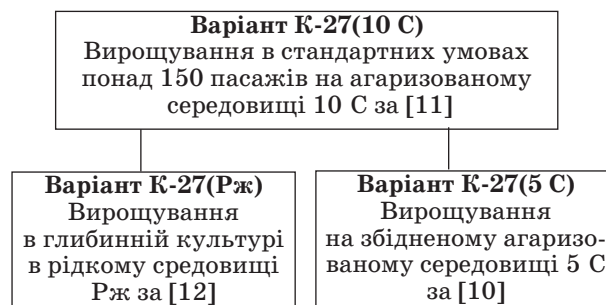
аж до аритмії. Водночас порушується і ритміка вступу в мітози клітин різних рівнів плоідності. Було встановлено, що протягом другого-третього пасажів у інших штамів частота поділів клітин різних рівнів плоідності упродовж доби змінювалася незначною мірою за чітко вираженої ритміки мітотичної активності. Сформовані клітинні штами характеризуються чітким ритмом часу проходження мітозу клітинами різних рівнів плоідності: клітини з різною кількістю хромосом діляться в різний час доби [3, 4]. Проте математичного моделювання цих процесів проведено не було.

Метою цієї роботи було дослідження стійкості культури тканин штаму К-27 *Rauwolfia serpentina* — продуцента протиаритмічного алкалоїду аймаліну — за різних умов вирощування. У розрахунках було використано експериментальний матеріал, описаний в роботах [8, 9]. Проведено аналіз показників Ляпунова для фазових траєкторій динаміки частки клітин з різним вмістом ДНК в ядрі й різною площею ядерця та динаміки показників проліферації (мітозів і амітозів) на добовому ієрархічному рівні. Досліджували також алгоритм керування системою за допомогою комбінаторного функціонального епігена на добовому ієрархічному рівні та переходу від добового рівня до пасажного.

### Матеріали і методи

Об'єктом дослідження слугував гормононезалежний штам К27 культури тканин *Rauwolfia serpentina*, який вирощували на твердому середовищі 5 С або 10 С за [10, 11] чи в рідкому середовищі Рж [12] за умов перенесення із середовища 10 С, що є стандартним для цього штаму. Культуру тканин *Rauwolfia serpentina* вирощували в темряві понад 40 років, включаючи час описуваного експерименту. Штам К-27 було отримано в результаті оброблення калюсних тканин мутагеном етиленіміном і за спеціально розробленою схемою добору, наведеною в [4, 13]. Штам є гомогенним і стабілізованим за ознакою «накопичення індолінових алкалоїдів» [4, 14]. Молекулярно-генетичну стабільність штаму К-27 як за зміни умов культивування, так і за умов тривалого вирощування в стабільних умовах було показано пізніше [15, 16]. Тому завдання полягало в кількісному дослідженні субпопуляцій клітин, які здатні ділитися, роблячи внесок в характеристику «накопичення біомаси», та клітин, які спеціалізуються на синтезі

індолінових алкалоїдів, що є важливим для характеристики «накопичення індолінових алкалоїдів». Окрім того, слід враховувати субпопуляцію спеціалізованих клітин — трахеїдних елементів, яка може сягати 60% від загальної популяції [17]. Схему досліду зі зміни умов культивування штаму К-27 культури *Rauwolfia serpentina* наведено нижче.



Імовірно, величина стресу, якого зазнають клітини в разі перенесення на свіже живильне середовище, змінюється залежно від складу нового середовища. Тому в експерименті, проведеному нами на пасажному рівні (тобто протягом пасажу з відбором проб щодоби), було також відібрано проби кожні дві години протягом трьох днів для дослідження на добовому рівні. На пасажному рівні (тобто з відбором проб щодоби протягом пасажу) було досліджено, як змінюються сили (осцилятори, реалізацією яких є динаміка зміни чисельності субпопуляцій), потоки (осцилятори, реалізацією яких є динаміка питомих швидкостей накопичення біомаси, елементів диференціювання клітин — трахеїд та індолінових алкалоїдів) та коефіцієнти (величини, які характеризують інтенсивність внесків сил у потоки) за зміни складу середовища в умовах періодичного культивування на пасажному рівні [18, 19]. Дослідження відібраних на добовому рівні проб дало змогу з'ясувати, як змінюються сили (осцилятори, реалізацією яких є динаміка різних типів поділу), потоки (осцилятори, реалізацією яких є динаміка зміни чисельності субпопуляцій за характеристиками «відносний вміст ДНК в ядрі» та «площа ядерця»), а також феноменологічні коефіцієнти на добовому рівні на певному часовому проміжку.

Цитологічні дослідження проводили, як описано в роботі [20]. Паралельно з пробами для вивчення пасажної динаміки (тобто описаних вище характеристик з інтервалом відбору проб щодоби протягом пасажу) відбирали проби через кожні дві години про-

тягом трьох діб для добового вивчення (тобто описаних вище відмінних від характеристик пасажної динаміки характеристик з інтервалом відбору проб кожні дві години протягом трьох днів) на проміжках пасажу, в яких продукція індолінових алкалоїдів досягала максимальних значень: 12–15-та доба росту для К-27 (10 С) та 9–11-та доба для варіанта К-27(Рж). Кількість поділів враховували в кожній точці фіксації на 5 тис. клітин на чотирьох препаратах із різних ділянок тканини.

Показник «відносний вміст ДНК» (ввДНК) в інтерфазних ядрах аналізували на забарвлених за Фольгеном препаратах [21], вивчаючи вибірку зі 100 ядер на чотирьох препаратах у кожній точці фіксації. Відносний вміст ДНК визначали фотографуванням ядер через відповідні світлофільтри та денситометруванням досліджуваного інтерфазного ядра відносно анафази диплоїдної клітини за допомогою програми ScionImage.

Для аналізу показника «площа ядерця» проводили імпрегнацію ядерцевих організаторів сріблом за модифікованою методикою імпрегнації азотнокислим сріблом [22], морфометрію ядерця та ядер. Слід відзначити, що до вибірки потрапляли тільки клітини, що мають ядра та ядерця (живі клітини).

**Статистичні методи.** Клітини за визначеними характеристиками відносного вмісту ДНК у ядрі та площі ядерця розбили на класи, розміри яких для кожної характеристики та частки класу відповідних характеристик з урахуванням повного об'єму вибірки наведено в роботах [8, 9]. Динаміку різних характеристик порівнювали методом парної лінійної регресії [23].

**Математичні методи.** Аналіз стійкості стаціонарного стану тісно пов'язаний з параметром порядку та принципом підлеглості. Дотепер такий аналіз проводили для динамічних рівнянь певного вигляду. Однак цього не завжди достатньо під час дослідження та узагальнення великої кількості експериментального матеріалу, тому для опису складних експериментальних систем застосовують поняття, які раніше вважали теоретичними (наприклад, «атрактор») [24]. Ми послуговувались низкою таких теоретичних понять для дослідження експериментальної системи, подібно до того, як це робили дослідники популяцій різних видів організмів [25]. Насамперед здійснювали якісний аналіз дослідженої динамічної системи. Аналіз стійкості стаціонарного рішення за лінійним наближенням проводили та-

ким чином. Уводили мале збурення  $\delta x$  (будь-якої вимірної величини  $x$ , в нашому випадку — чисельності клітин субпопуляції), подавши його як  $x(t) = x_0 + \delta x(t)$ . Тоді маємо:

$$d\delta x/dt = -\alpha\delta x,$$

де  $\alpha$  — показник ступеня для випадку, коли рішення  $\delta x(t)$  є експонентою. Оскільки в лінійному наближенні член третього порядку  $x^3 \approx x_0^3 + 3x_0^2\delta x$  у диференційному рівнянні третього ступеня не робить внеску в рівняння для малого збурення  $\delta x$ , тому  $x_0 = 0$  (стаціонарне рішення). Рішенням цього рівняння є функція:

$$\delta x(t) = \delta x(0)\exp(-\alpha t).$$

Таким чином, за умови  $\alpha > 0$  рішення  $x_0 = 0$  є стійким, а якщо  $\alpha < 0$ , те саме рішення втрачає свою стійкість, оскільки збурення  $\delta x(t)$  починає експоненціально наростати із часом. Зручним методом аналізу стійкості фазових траєкторій є дослідження показників Ляпунова. Ці показники можна визначити, узагальнивши показник ступеня  $\alpha$  у виразі для експоненціального в часі рішення  $\delta x(t)$ , яке характеризує диференціальне рівняння першого порядку довільного вигляду, а саме:

$$\lambda_i = \lim_{t \rightarrow \infty} [\delta x_i(t)]/t.$$

Тоді маємо:  $\lambda_i = -\alpha_i$ .

Кількість показників Ляпунова не має перевищувати розмірність простору, в якому задано шукану величину  $\delta x(t)$  [26].

Ми проаналізували досліджену систему як двовимірну, враховуючи два показники Ляпунова (для двох досліджених субпопуляцій клітин). Для визначення показників Ляпунова розраховували: експоненти динаміки чисельного складу субпопуляцій, коефіцієнти кореляції і відповідні значення F-розподілу, порівняння яких з верхніми точками F-розподілу дає можливість визначити, чи є показник Ляпунова нульовим, чи ненульовим [23].

## Результати та обговорення

У роботах [8, 9] було показано наявність лінійної залежності на добовому ієрархічному рівні між потоками (динамікою кількісного складу виділених субпопуляцій клітин за двома показниками, визначеними незалежно: «відносний вміст ДНК в ядрі» та «площа ядерця») і силами (динамікою популяцій клітин, що діляться шляхом мітозу —  $X_1$ , і вийшли зі стану поділу або поділилися

амітозом —  $X_2$ ). Система може перебувати в різних стійких та нестійких станах. Одно-рідні в просторі та стаціонарні в часі стани системи зазвичай ототожнюють зі стійкою (термодинамічною) «гілкою» станів, яка в дослідженому нами випадку описується системою рівнянь:

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

де  $I_1(t)$  — потік клітин субпопуляції з ввДНК 1,0–2,9С,  $I_2(t)$  — потік клітин субпопуляції з ввДНК 3,0–6,9С для К-27(10 С) або 3,0–8,9С 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 ( $t$  — час,  $m$  — первісне значення  $t$  від початку пасажу, з якого розпочато відбір проб добової динаміки,  $k$  — кількість точок, на які проводиться зсув динаміки величини, що є силою, відносно динаміки величини, яка є потоком, з метою урахування внесків попередніх значень біологічних сил у моменти часу  $t + m$  у біологічні потоки у моменти часу  $t + m + k$ ). Конкретне значення та знак коефіцієнта кореляції ( $R_{lsk}$ ) свідчить 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  $I_2(t)$  (табл. 1, 2).  $A_{ls}$  — коефіцієнти адаптації, конкретні числові значення для кожної з досліджених систем подано в роботах [8, 9], як і експериментальні значення динаміки потоків та їх значення, розраховані з рівнянь.

За зміни зовнішніх параметрів термодинамічна гілка може втратити свою стійкість і в системі може реалізуватись якісно новий тип поведінки.

Для того, щоб зрозуміти, за яких умов система втрачає стійкість, ми проаналізували також показники Ляпунова для фазових портретів двокомпонентної системи, утвореної субпопуляціями (осциляторами) клітин, що діляться у різний спосіб (рис. 1, а, б), — для системи, вирощуваної на агаризованому середовищі 10 С. Особлива точка на фазовому портреті  $X_1 - X_2$  (рис. 1, в) ( $l_1 = 0, l_2 < 0$ ) є нестійкою (НОТ). У випадку, коли потоками є динаміка зміни субпопуляцій за ввДНК в ядрі, вид атрактора потенціальної поверхні системи з переходом від сили до потоку змінюється так: НОТ → сідлова точка

Таблиця 1. Коефіцієнти кореляції  $R_{lsk}$  динаміки потоків\*, а також сил\*\* із послідовними зсувами на  $k$  точок кожні дві години ( $k = 1 \div 33$ ) динаміки показника проліферації відносно динаміки відповідної субпопуляції клітин за відносним вмістом ДНК в ядрі

k	Зсув, год	К-27 (10 С)				К-27 (Рж)			
		$I_1(X_{lk})$		$I_2(X_{lk})$		$I_1(X_{lk})$		$I_2(X_{lk})$	
		$R_{11k}$	$R_{12k}$	$R_{21k}$	$R_{22k}$	$R_{11k}$	$R_{12k}$	$R_{21k}$	$R_{22k}$
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	0	0	-0,66	-0,49
15	20	0	0	0	0	0	0	0	0
16	32	0,63	0	0	-0,48	0	0	0	0
17	34	0,81	0	0	-0,71	0	0	0	0
18	36	0,61	0	0	-0,54	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
30	60	0	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 ввДНК в ядрі 1,0–2,9С; потік  $I_2$  — динаміка частки субпопуляції клітин з ввДНК в ядрі 3,0–6,8С для К-27 (10 С) та 3,0–8,9С ( $I_2$ ) для К-27 (Рж).

\*\* Сила  $X_{lk}$  — 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% -ї межі  $F$ -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 —  $k = 30$ ).



Таблиця 2. Коефіцієнти кореляції  $R_{ljk}$  динаміки потоків\*, а також сил\*\* із послідовними зсувами на  $k$  точок кожні дві години ( $k = 1 \div 33$ ) динаміки показника проліферації відносно динаміки відповідної субпопуляції клітин за площею ядерця

k	Зсув, год	К-27 (10 С)				К-27 (Рж)			
		$I_1(X_{lk})$		$I_2(X_{lk})$		$I_1(X_{lk})$		$I_2(X_{lk})$	
		$R_{11k}$	$R_{12k}$	$R_{21k}$	$R_{22k}$	$R_{11k}$	$R_{12k}$	$R_{21k}$	$R_{22k}$
0	0	0	0	0,50	0	0	0	0,35	0
1	2	0	0	0	0	-0,39	0	0,42	0,36
2	4	0	0	0	0	0	-0,50	0	0,57
3	6	0	0	0	0	0	-0,59	0	0,62
4	8	0	0	0	0	0	-0,41	0	0,48
5	10	0	0	0,45	0	0,41	0	-0,38	0
6	12	0	0	0,38	0	0,46	0	-0,40	0
7	14	0	0	0	0	0	0	0	0
8	16	0	0	0	0	0	0	0	0
9	18	0	0	0	0	-0,39	-0,48	0	0,41
10	20	0	0	0	0	0	-0,43	0	0
11	22	0	0	0	0	0	0	0	0
12	24	0	0	0	0	0	0	0	0
13	26	0,41	0	0	0	0	0	0	-0,42
14	28	0,46	0	0	0	0	0	0	-0,54
15	20	0	0	0	0	0	0	0	0
16	32	0	0	0	0	0	0	0	0
17	34	0	0,56	0	0	0	0	0	0
18	36	0	0	0	0	0	0	0	0
19	38	0	0	0	0	0	0	0	0
20	40	0	0	0,52	0	0	0,60	0	-0,64
21	42	0	0	0	0	0	0,72	0	-0,73
22	44	0	0	0	0	0	0	0	-0,53
23	46	0	0	0	0	0	0	0	0
24	48	0	0	0	0,82	0	0	0	0
25	50	0	0,81	0	0,68	0	0	0	0
26	52	0	0,65	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
30	60	0	0	0	0	0	0	0	0
31	62	0	0	0	0	0	-0,91	0	0,92
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 субпопуляцій клітин з площею ядерця 12,0–16,9 для К-27 (10 С) та менше 8  $\mu\text{м}^2$  для К-27 (Рж); потік  $I_2$  — динаміка частки субпопуляцій клітин з площею ядерця понад 17  $\mu\text{м}^2$  для К-27 (10 °С) та понад 8  $\mu\text{м}^2$  для К-27 (Рж);

\*\* Сила  $X_{1k}$  — динаміка частки клітин, що проліферують за допомогою мітозу ( $l = 1$ ) або амітозу ( $l = 2$ ). Для ненульових коефіцієнтів кореляції значення критеріальної статистики перевищувало значення верхньої 5% -ї межі F-розподілу, яке для  $N = 36$  становить  $F_{1,34} = 4,17$  (перший рядок —  $k = 0$ ), для  $N = 6$   $F_{1,4} = 7,71$  (31-й рядок —  $k = 30$ ).

(рис. 1, 2), а в разі, коли потоком є динаміка зміни субпопуляцій за площею ядерця, вид атрактора потенціальної поверхні системи з переходом від фазових портретів осциляторів, які визначають сили, до фазових портретів осциляторів потоків, змінюється у такий спосіб: НОТ → НОТ (рис. 1, 3). Характеристику повного набору особливих точок системи клітин культури тканин *Rauwolfia serpentina* подано в табл. 3.

На агаризованому середовищі 10 С зміни типів атракторів можна подати у вигляді ланцюжка, де особлива точка є сідловою тільки для потенціальної поверхні, яку утворюють субпопуляції (осцилятори) клітин за ввДНК в ядрі, а невизначена особлива точка є характерною для потенціальної поверхні, що її утворюють субпопуляції за площею ядерця на добовому рівні.

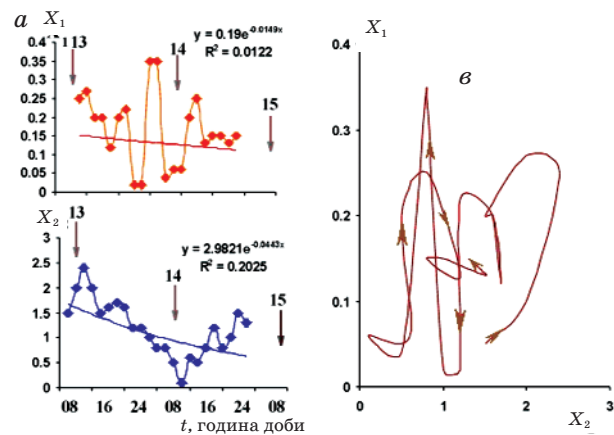


Рис. 1. Динаміка популяцій клітин, що діляться шляхом мітозу ( $X_1$ ) (а) і вийшли зі стану поділу (або поділилися амітозом,  $X_2$ ) (б) за умов періодичного культивування на агаризованому середовищі 10 С та фазовий портрет системи (в).

Відбір проб здійснювали кожні дві години для інтервалу вирощування 12–15-та доба.  $X_1$  — частка клітин, які діляться шляхом мітозу,  $X_2$  — частка клітин, що вийшли зі стану поділу (або діляться амітозом). Наближення за допомогою експоненціальної залежності динаміки популяцій клітин для всього інтервалу (а, б) показало, що квадрати відповідних коефіцієнтів кореляції  $R^2$  становлять 0,0122 та 0,2025. Значення критеріальної статистики для них: а —  $F_{1,19} = 0,288$ , що не перевищує значення верхньої 5% -ї межі F-розподілу для  $N = 21$  ( $F_{1,19} = 4,38$ ), б —  $F_{1,21} = 5,33$  — перевищує значення верхньої 5% -ї межі F-розподілу для  $N = 23$  ( $F_{1,21} = 4,32$ ), що свідчить про наявність експоненційної залежності для популяції клітин  $X_2$ . Тут і далі стрілками позначено (а, б) початок відповідної доби росту, на кривих фазових портретів (в) — напрям руху системи клітин у часі

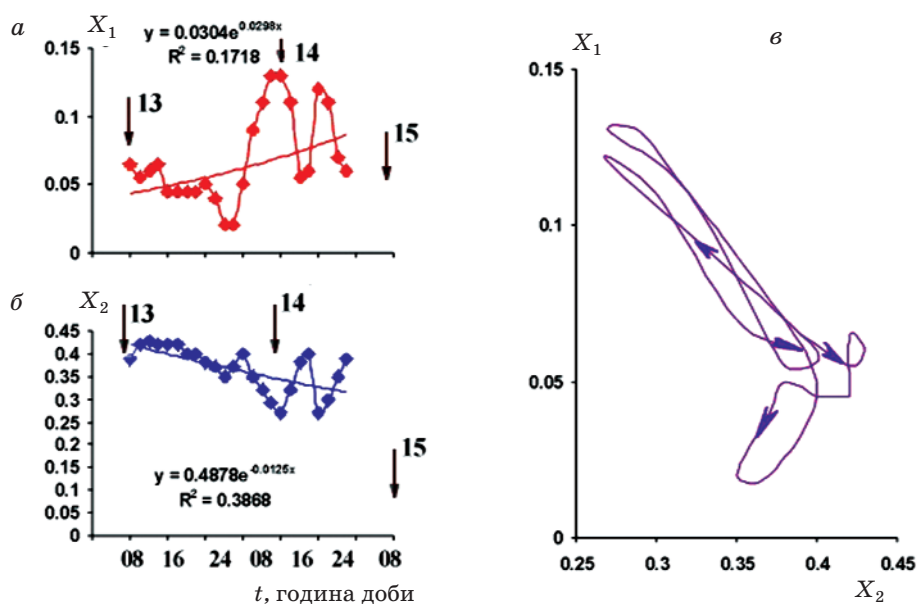


Рис. 2. Динаміка популяцій клітин зі вмістом ДНК в ядрі 1–2,99 С ( $X_1$ ) (а) і 3–6,99 С ( $X_2$ ) (б) за умов періодичного культивування на агаризованому середовищі 10 С та фазовий портрет системи (в).

Відбір проб здійснювали кожні дві години для інтервалу вирощування 12–15-та доба.  $X_1$  — частка клітин зі вмістом ДНК в ядрі 1–2,99 С (перша субпопуляція),  $X_2$  — частка клітин зі вмістом ДНК в ядрі 3–6,99 С (друга субпопуляція). Наближення за допомогою експоненціальної залежності динаміки популяцій клітин для всього інтервалу (а, б) показало, що квадрати відповідних коефіцієнтів кореляції  $R^2$  становлять 0,1718 та 0,3868. Значення критеріальної статистики: а —  $F_{1,22} = 4,55$ , б —  $F_{1,23} = 14,51$  перевищують значення верхньої 5% -ї межі F-розподілу для  $N = 24$  ( $F_{1,22} = 4,3$ ) та  $N = 25$  ( $F_{1,23} = 4,28$ ), що свідчить про наявність експоненціальної залежності для популяції клітин  $X_1$  та  $X_2$

Таблиця 3. Типи особливих точок системи клітин культури тканин *Rauwolfia serpentina* на добовому рівні для різних умов вирощування

1		2		3		4	
Тип середовища	Взаємодія осциляторів виду	Динаміка кількісного складу клітин за характеристикою		Показники Ляпунова для двовимірної системи за характеристикою			
		відносний вміст ДНК у ядрі	сумарна площа ядерець	відносний вміст ДНК у ядрі	сумарна площа ядерець		
10 С	D' — E'	Сідло	НОТ (типу центр)	$\lambda_1 > 0, \lambda_2 < 0$	$\lambda_1 > 0, \lambda_2 = 0$		
Рж	D' — E'	НОТ (типу центр)	Сідло	$\lambda_1 > 0, \lambda_2 = 0$	$\lambda_1 > 0, \lambda_2 < 0$		
	2n–3n	НОТ (типу центр)		$\lambda_1 < 0, \lambda_2 = 0$			
5 С	3n–4n	НОТ (типу центр)		$\lambda_2 = 0, \lambda_3 > 0$			
	2n–4n	Сідло		$\lambda_1 < 0, \lambda_3 > 0$			
1	2	3		4			
		Вид поділу		Вид поділу			
10 С	D — E	НОТ (типу центр)		$\lambda_1 = 0, \lambda_2 < 0$			
Рж	D — E	НОТ (типу центр)		$\lambda_1 = 0, \lambda_2 > 0$			

Примітки: (D' — E') — популяційно-клітинний осцилятор за характеристикою «відносний вміст ДНК в ядрі» або «площа ядерець» на добовому рівні, феноменологічна реалізація якого має прояв на пасажному рівні; (D — E) — популяційно-клітинний осцилятор за характеристикою «вид поділу» на добовому рівні; характеристики конкретних значень D, E, D', E' наведено в табл. 4; 2n — осцилятор диплоїдних мітозів; 3n — осцилятор триплоїдних мітозів; 4n — осцилятор тетра- і високоплоїдних мітозів.

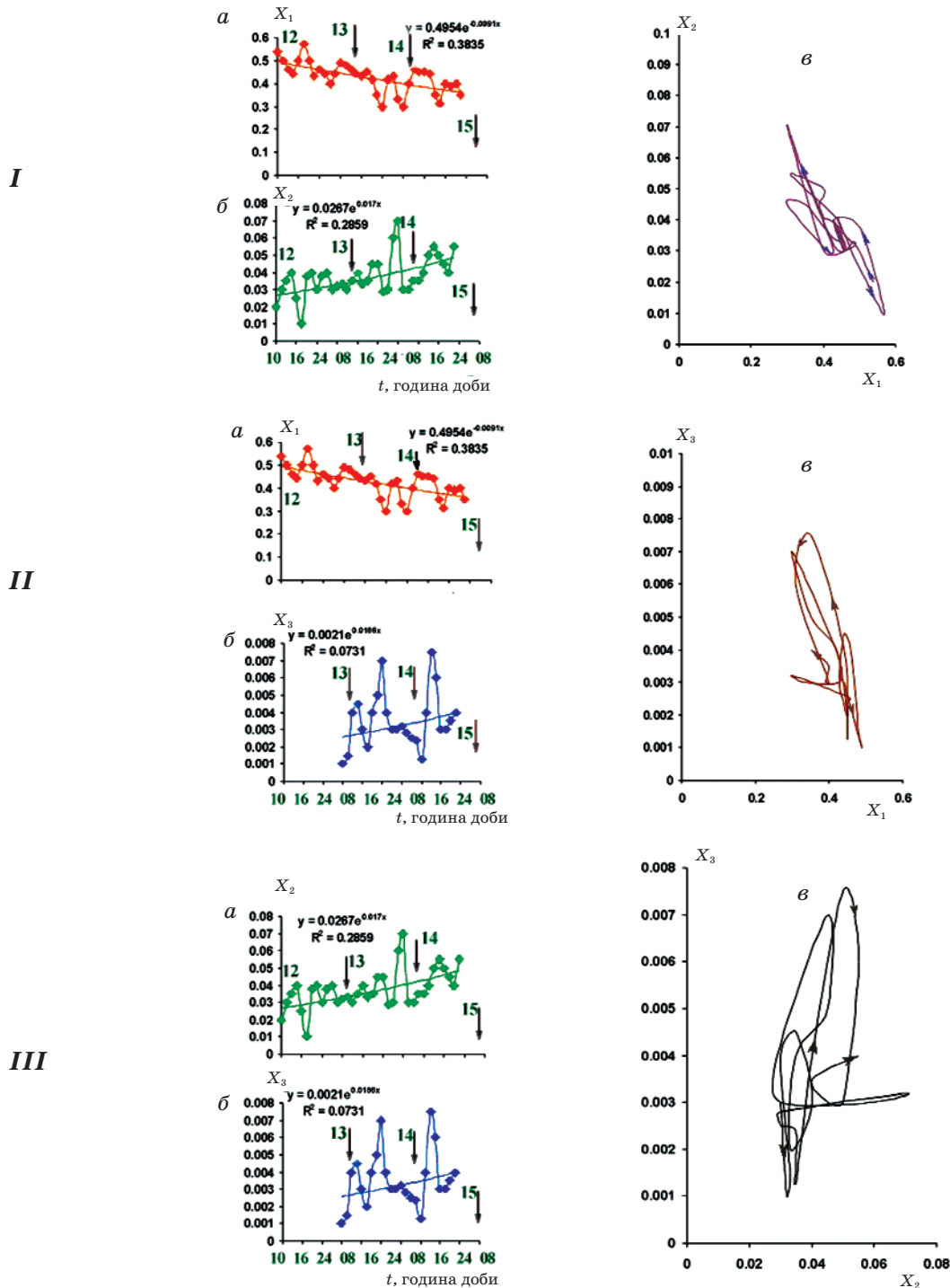
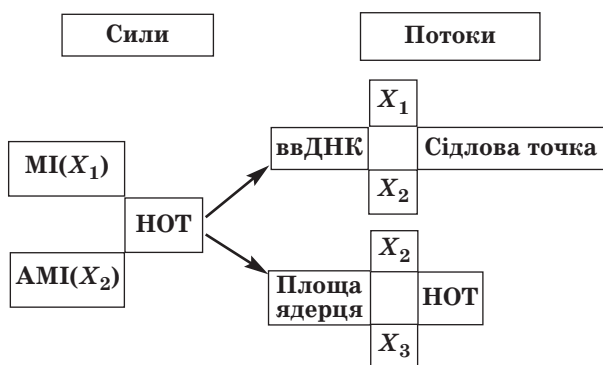


Рис. 3. Динаміка чисельності клітин із площею ядра < 10,99 мкм<sup>2</sup> ( $X_1$ ), 12,0–16,99 мкм<sup>2</sup> ( $X_2$ ) та > 17 мкм<sup>2</sup> ( $X_3$ ) (а, б) за умов періодичного культивування на агаризованому середовищі 10 С та фазовий портрет системи (в):

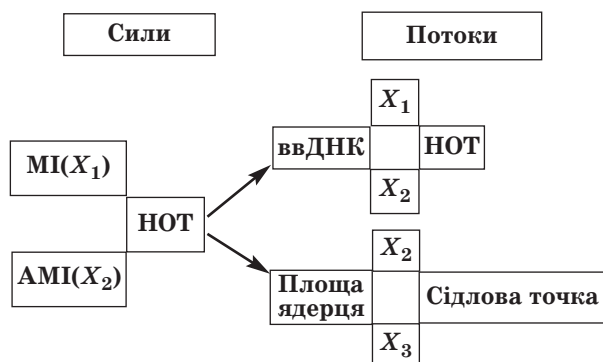
відбір проб здійснювали кожні дві години для інтервалу вирощування 12–15-та доба.  $X_1$  — частка клітин із площею ядра < 10,99 мкм<sup>2</sup> (перша субпопуляція),  $X_2$  — частка клітин із площею ядра 12,0–16,99 мкм<sup>2</sup> (друга субпопуляція),  $X_3$  — частка клітин із площею ядра > 17 мкм<sup>2</sup> (третя субпопуляція). *I* — система клітин  $X_1$ – $X_2$ ; *II* — система клітин  $X_1$ – $X_3$ ; *III* — система клітин  $X_2$ – $X_3$ . Наближення за допомогою експоненціальної залежності динаміки популяцій клітин для всього інтервалу (а, б) показало, що квадрати відповідних коефіцієнтів кореляції  $R^2$  становлять:  $X_1$  — 0,3835,  $X_2$  — 0,2859,  $X_3$  — 0,0731. Значення критеріальної статистики:  $X_1$  —  $F_{1,34} = 21,15$ ,  $X_2$  —  $F_{1,33} = 13,2$ ,  $X_3$  —  $F_{1,21} = 1,66$  перевищують значення верхньої 5% -ї межі F-розподілу для  $N = 36$  ( $F_{1,34} = 4,17$ ),  $N = 35$  ( $F_{1,33} = 4,17$ ) та  $N = 23$  ( $F_{1,21} = 4,32$ ), що свідчить про наявність експоненційної залежності для популяції клітин  $X_1$  та  $X_2$  та відсутність такої для популяції  $X_3$



Примітка: НОТ — невизначена особлива точка (типу центр).

Це означає, що на добовому рівні більш значущою характеристикою для збільшення навіть невеликої флуктуації є відносний вміст ДНК у ядрі.

Аналогічним чином було отримано ланцюжок руху за потенціальною поверхнею для вирощування в рідкому середовищі Рж за умов перенесення з агаризованого середовища 10 С:



Отже, на добовому рівні за умов вирощування в рідкому середовищі Рж більш значущою характеристикою для збільшення навіть невеликої флуктуації є площа ядерця.

У цьому сенсі варто згадати сучасне дослідження, проведене на дріжджах [24], в якому автори роблять висновок про те, що інформація від клітини до клітини найімовірніше передається за допомогою концентраційних осциляцій з певними параметрами, значення яких здатні пройти крізь шлюз певного розміру.

Проаналізуємо результати дослідження, здійсненого в культурі клітин, яку вирощували на агаризованому середовищі 5 С на добовому рівні [3, 4] за іншою схемою, ніж було описано вище. Цей спосіб поставлення досліду допоможе зрозуміти, чому осциляції чисельності клітин, які діляться мітотичним шляхом, інтенсивніше протягуються

через шлюз транскрипційного циклу (або мають ширший шлюз) [24], ніж ті, що діляться амітотичним шляхом [8]. У наведеному експерименті було досліджено динаміку чисельності клітин із диплоїдними, триплоїдними та тетра- і високоплоїдними мітозами [4], для яких ми побудували фазові портрети (рис. 4).

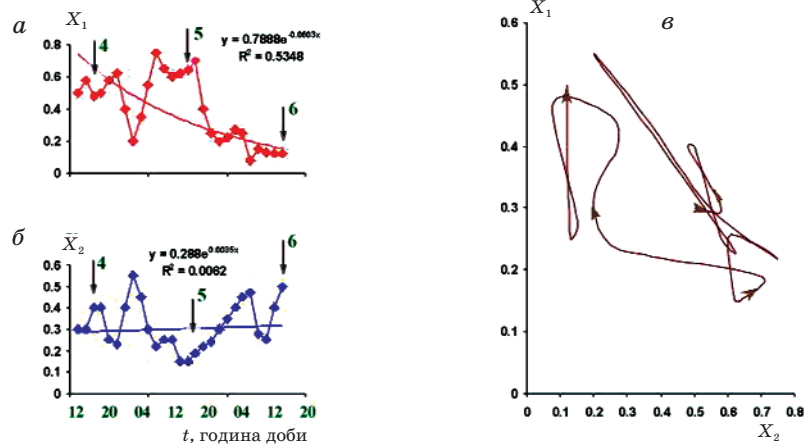
Аналіз показників Ляпунова для випадку, коли рішення системи рівнянь є експонентами, які описують динаміку чисельності клітин різних субпопуляцій ( $X_1$  — динаміка популяцій клітин з диплоїдними,  $X_2$  — з триплоїдними,  $X_3$  — із тетра- і високоплоїдними мітозами), показав, що потенційні поверхні, за якими рухаються системи  $X_1$ - $X_2$  та  $X_2$ - $X_3$ , описуються атрactorами з невизначеними особливими точками типу центр, тоді як система  $X_1$ - $X_3$  — пересувається за поверхнею із сідловою точкою. Це означає, що остання система є більш значущою з погляду виникнення в ній сили, яка прагне збільшити невелику флуктуацію у системі  $X_1$ - $X_3$  (тобто динаміка частки диплоїдних — динаміка частки поліплоїдних мітозів клітин), за характеристикою «плоїдність», аналогічною характеристиці «відносний вміст ДНК». Наявністю сідлової точки на потенціальній поверхні  $X_1$ - $X_3$  можна пояснити високі коефіцієнти адаптації, що може свідчити про пріоритетність мітотичної проліферації для збільшення частки клітин, які потім диференціюються за допомогою поліплоїдизації у клітини, які продукують індолінові алкалоїди за умов вирощування на середовищі 5 С [8].

### Гіпотеза про керування динамікою клітинної системи *in vitro* на добовому рівні за допомогою епігенної мережі

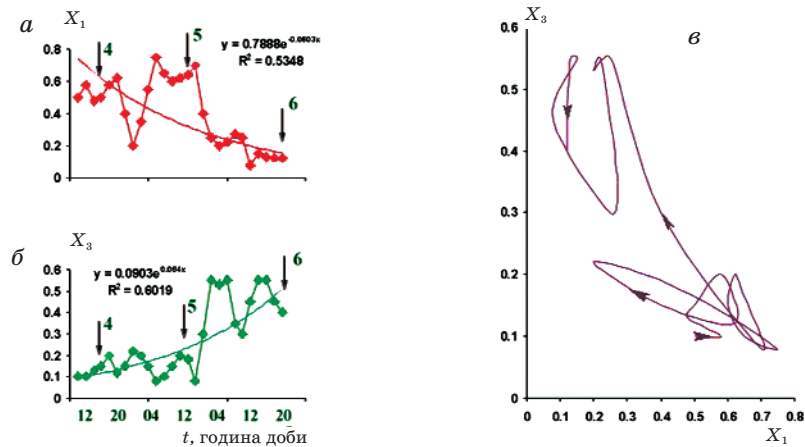
У роботах [27, 28] на прикладах конкретних генних мереж (підпрограм) бактеріальних систем та конкретних генних мереж, зокрема блок-схеми керування морфогенезом квітки *Arabidopsis thaliana*, було показано, що генетичні тригери (Т) та осцилятори утворюють стаціонарні та нестаціонарні динамічні епігени. Трансформовані за певними правилами, наведеними у [27, 29], мережі можна розглядати як функціональні епігенні мережі, елементами яких є динамічні епігени. Епігенні мережі містять також модулі затримки, логічні комбінатори (М). Організацію керування клітиною, спеціалізованою певним чином, на молекулярному ієрархічному рівні можна описувати найпростішим способом за допомогою



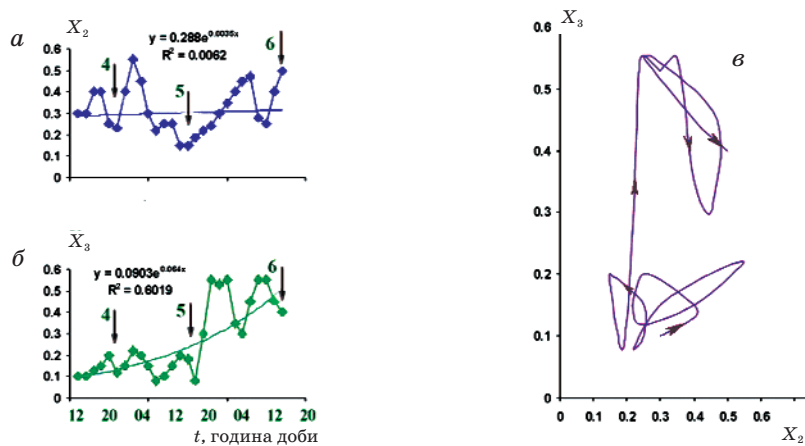
I



II



III



**Рис. 4.** Динаміка чисельності клітин із диплоїдними ( $X_1$ ), триплоїдними ( $X_2$ ) та тетра- і високоплоїдними мітозами ( $X_3$ ) (а, б) за умов періодичного культивування на агаризованому середовищі 5 С культури тканин раувольфії зміїної (клітинна лінія А) та фазовий портрет системи (в):

відбір проб здійснювали кожні дві години для інтервалу вирощування 4–6-та доба.  $X_1$  — частка клітин із диплоїдними мітозами (перша субпопуляція),  $X_2$  — частка клітин із триплоїдними мітозами (друга субпопуляція),  $X_3$  — частка клітин із тетра- і високоплоїдними мітозами (третья субпопуляція).

I — система клітин  $X_1$ – $X_2$ ; II — система клітин  $X_1$ – $X_3$ ; III — система клітин  $X_2$ – $X_3$ . Наближення за допомогою експоненціальної залежності динаміки популяцій клітин для всього інтервалу (а, б) показало, що квадрати відповідних коефіцієнтів кореляції  $R^2$  становлять: для  $X_1$  — 0,5348,  $X_2$  — 0,0062 та  $X_3$  — 0,6019. Значення критеріальної статистики:  $X_1$  —  $F_{1,25} = 28,75$ ,  $X_2$  —  $F_{1,25} = 0,15$ ,  $X_3$  —  $F_{1,25} = 37,8$  перевищують значення верхньої 5%-ї межі F-розподілу для  $N = 27$  ( $F_{1,25} = 4,24$ ), що свідчить про наявність експоненціальної залежності для популяції клітин  $X_1$  та  $X_3$  та відсутність такої для популяції  $X_2$

нестационарного п'ятикомпонентного епігена (рис. 5) [29]. Коли виникає система, яка має кілька видів тканин, що керуються різними генними блоками  $m'$  [30], можливо несинхронізованими, контексти тієї самої схеми, позначені літерами А–Е у комірках, матимуть інакший зміст.

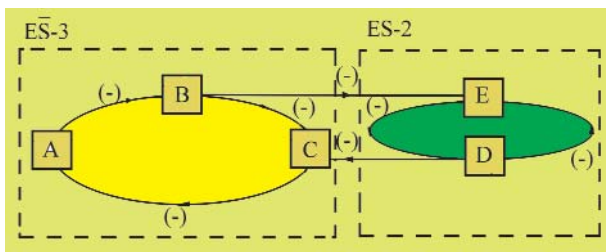


Рис. 5. Структура п'ятикомпонентного нестационарного епігена:

елементарні епігени:  $ES-3$  — осцилятор, нестационарний трикомпонентний епіген;  $ES-2$  — двопозиційний модуль пам'яті, стаціонарний двокомпонентний епіген. Мінусами позначено негативні зв'язки (за [29])

Спробуємо зрозуміти, яким із наведених вище елементів є той, що пов'язує стаціонарний динамічний епіген — тригер (перемикач) осциляторів клітин, які діляться у різний спосіб (комірки, позначені літерами D і E — МІ та АМІ — рис. 5), і стаціонарний динамічний епіген — тригер осциляторів різних субпопуляцій клітин (комірки, позначені літерами D' та E' ( $< 3C$  і  $> 3C$ ) за характеристикою «відносний вміст ДНК» або характеристикою «площа ядерця», — значення D' та E' подано в табл. 4 для різних умов вирощування). По-перше, дані, наведені в табл. 1, 2, свідчать про те, що досліджуваний елемент є комбінатором із затримкою. По-друге, оскільки дані, наведені в табл. 1, 2 та роботах [8, 9], вдалося описати за допомогою наведеної вище системи лінійних рівнянь, свідчить про те, що досліджуваний елемент є лінійним комбінатором із затримкою. По-третє, залишається незрозумілим, чи є досліджуваний елемент логічним чи стохастичним комбінатором, адже відомо, що мітоз не може початися без певного сигналу, але невідомо, чи потрібен хоч якийсь сигнал, щоб відбувся амітоз. Аби зрозуміти природу затримки в часі в лінійному комбінаторі, розглянемо роботу [30], в якій проаналізовано наслідки стресової ситуації в клітинах печінки щурів під час часткової гепатотектомії (видалення трьох чвертей печінки) порівняно з наслідками дії сублетальної дози антибіотика (циклогексиміду), який блокує трансляцію протеїнів. При цьо-

му будемо враховувати ту обставину, що осцилятори клітин, які діляться мітотично або амітотично, дають свій внесок в осциляції клітин різних субпопуляцій за характеристикою «відносний вміст ДНК» або характеристикою «площа ядерця» з певною періодичністю (табл. 1, 2).

Досліджуючи на добовому рівні систему (з відбором проб кожні дві години), слід мати на увазі, що в інтенсивному розмноженні та поділах клітин (мітотичних або амітотичних) чи поліплоїдизації можуть бути задіяні лише стовбурові клітини популяції, керовані блоком  $m'_3$ . Клітини, якими керує блок генів  $m'_1$ , упродовж першої частини пасажу зайняті продукуванням вторинного метаболіту. Клітини популяції, чисельність якої є керованою блоком генів  $m'_2$ , не беруть участі в подальшому клітинному циклі: вони утворюються, виконують свою функцію і деградує з досить високою частотою — упродовж доби чисельність цієї популяції може змінюватись від значної до нульової і навпаки. Згідно з гіпотезою Тодорова [30] у кожній клітині певної тканини за стресових умов послідовність переходу у форсований режим груп генів  $m$  (відповідає за метаболічні процеси), R (за синтез рибосом) та N (за синтез протеїнів, необхідних для мітотичного поділу клітини) збігається з фазами клітинного циклу:  $G_0$  (спокій),  $G_1$  (збільшення маси протеїнів), S (реплікація ядерної ДНК),  $G_2$  (підготовка до мітозу і нормалізація метаболізму) і, нарешті, або мітоз, або поліплоїдизація (ендополіплоїдія — кратне збільшення набору хромосом). Чинники, що порушують роботу протеїнсинтезуючого апарату, приводять у дію весь механізм кількісної регуляції транскрипції, тобто викликають один або кілька клітинних циклів, які відбуватимуться доти, доки екстремальний фактор не зникне і робота протеїнсинтезуючого апарату не нормалізується. Тоді клітина зможе повернутися до фази  $G_0$  та відновити оптимальну пропорцію в експресії груп генів і, відповідно, гармонійне співвідношення основних функцій: синтез протеїнів «на експорт» у внутрішнє середовище організму; протеїнів, необхідних для внутрішньоклітинного метаболізму; компонентів протеїнсинтезуючої системи та генетичного апарату клітини [30, 31].

За часом релаксації осцилятори кількості клітин, які вступили у поділ або поділилися (можливо, амітозом), відповідають часу релаксації блоків R та N (години або десятки годин), який може бути вимірний як на добовому, так і на пасажному

рівні. Як було показано вище, на добовому ієрархічному рівні стаціонарні групи комбінаторної схеми (рис. 5) пов'язані між собою лінійним комбінаторним елементом із затримкою. Вважаючи силами динаміку кількості клітин, які вступили у поділ, та динаміку тих, які поділилися (добовий рівень), на їх основі розраховували потоки — динаміку кількості клітин з відносним вмістом ДНК у ядрі  $< 3С$  та динаміку кількості клітин з відносним вмістом ДНК у ядрі  $> 3С$  [8]. Аналогічно робимо із субпопуляціями клітин за площею ядра [9]. Це дає змогу показати наявність сигнального зв'язку між добовим і пасажним ієрархічними рівнями (стаціонарної групи комбінаторної схеми — рис. 5), яку утворюють одиниці D та E для кожного з рівнів. На добовому рівні перемикачі осциляторів D та E (популяційні осцилятори мітотично та амітотично поділених клітин) і D' та E' (популяційні осцилятори «біядиплоїдних» та поліплоїдних клітин), пов'язані між собою лінійним комбінатором із затримкою, залежать від нестаціонарного тричленного епігена (модуля із затримкою), де популяційні осцилятори A, B, C відповідають популяційним осциляторам біосинтезу відповідних протеїнів, якими керують групи генів m, R та N. Припущення про те, що сигнальний зв'язок, який існує між стаціонарними двочленними модулями осциляторів мітозів та амітозів (на добовому рівні) та осциляторів диплоїдних і поліплоїдних клітин (на добовому і, відповідно, пасажному рівнях), можна вважати лінійним комбінатором із затримкою, ґрунтується на даних, наведених у табл. 1 та 2. Причому ймовірно, що популяційні осцилятори диплоїдних та поліплоїдних клітин за умов дії чинників, які тимчасово порушують роботу протеїнсинтезуючого апарата (наприклад, акт пересадки), залежать від популяційних осциляторів клітин, що здатні поділитися за допомогою мітозу (керваному блоком генів N), коли робота протеїнсинтезуючого апарата нормалізується після одного чи кількох клітинних циклів, та клітин, що поділилися за допомогою амітозу (не чекаючи, коли буде ввімкнено керування блоком генів N, тоді, коли приведено в дію тільки механізм кількісної регуляції транскрипції блоками m або m та R). Отже, природа затримки має комбінований характер: осцилятор клітин у стані мітозу працює в логічному режимі (тобто залежить від осциляцій транскриптів кожної групи генів під час нормалізації роботи клітин — сигналів внутрішньоклітинного зв'язку), а ос-

цилятор клітин у стані амітозу найімовірніше працює в стохастичному режимі (тобто залежить тільки від сигналів міжклітинного зв'язку).

Таким чином, можна надати біологічного змісту контексту комбінаторної схеми, поданої на рис. 5 на добовому рівні, та сигнальному зв'язку між добовим та пасажним рівнями (рис. 6, табл. 4).

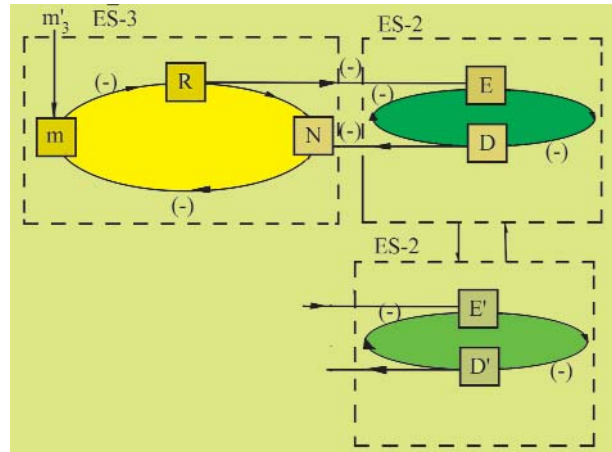


Рис. 6. Гіпотетична гетерархічна схема керування дослідженою клітинною системою на добовому рівні, яка складається з функціонального п'ятикомпонентного нестаціонарного епігена, та зв'язок між циркадним і пасажним ієрархічними рівнями за допомогою лінійного комбінатора із затримкою

Відбувається певна низка подій. Відхилення від рівноваги під час пересадження культури тканин на свіже живильне середовище спричиняють приведення в дію механізму кількісної регуляції транскрипції у стовбурових клітинах (які підлягають керуванню блоком генів  $m'₃$ ), тобто викликають один або кілька клітинних циклів, які відбуватимуться доти, доки екстремальний фактор не зникне і робота протеїнсинтезуючого апарата не нормалізується, що призводить до поліплоїдизації частини стовбурових клітин згідно з [30]; частина їх вступає в поділ (амітозом), не очікуючи дозволу клітини на поділ мітозом; частина клітин (диплоїдних та поліплоїдних) ділиться після отримання дозволу на мітоз. Це зумовлює ускладнення формул залежності динаміки зміни кількості диплоїдних та поліплоїдних клітин від динаміки зміни кількості клітин, що перебувають у стані поділу (мітози), та клітин, які вже поділилися (можливо, за допомогою амітозу). Нестационарний функціональний епіген у цьому разі є модулем затримки, перемикач осциляторів якого (D та E) пов'язаний за допомогою

Таблиця 4. Характеристики та позначення конкретних осциляторів системи клітин штаму K-27 *Rauwolfia serpentina* для різних умов вирощування на першій частині пасажного та на добовому рівні

Тип середовища	Часовий інтервал (доба)	Популяційно-клітинний осцилятор за характеристикою					
		відносний вміст ДНК у ядрі (С)			сумарна площа ядерця (мкм <sup>2</sup> )		
		A'(m'1)	B'(m'2)	C'(m'3)	A'(m'1)	B'(m'2)	C'(m'3)
10 С	0–30	D' (1,0–2,9)	E' (3,0–6,9)	E' (3,0–6,9)	D' (12,0–16,9)	E' (>17)	E' (>17)
	0–20	D' (1,0–2,9)	E' (3,0–6,9)	E' (3,0–6,9)	D' (12,0–16,9)	E' (>17)	E' (>17)
5 С	0–40	E' (3,0–6,9)	D' (1,0–2,9)	D' (1,0–2,9)	E' (>5)	D' (<4)	D' (<4)
Рж	0–20	E' (3,0–8,9)	E' (3,0–8,9)	D' (1,0–2,9)	E' (>8)	E' (>8)	E' (>8)

**Примітка.** А', В', С' — популяційно-клітинні осцилятори за характеристиками «накопичення алкалоїдів», «накопичення трахеїдних елементів», «накопичення біомаси» на пасажному рівні; D'—E' — популяційно-клітинні осцилятори за характеристикою «відносний вміст ДНК в ядрі» або «площа ядерця» на добовому рівні, феноменологічна реалізація яких відбувається на пасажному рівні.

лінійного комбінатора із затримкою [8, 9] з перемикачем осциляторів D' та E', де D' — осциляції кількості клітин першої субпопуляції за характеристикою «відносний вміст ДНК в ядрі» (<3 С) або за характеристикою «площа ядерця»; E' — осциляції кількості клітин другої субпопуляції за цією характеристикою (>3 С) або за характеристикою «площа ядерця» (табл. 4, рис. 6).

Отже, в результаті проведеної роботи було математично обґрунтовано процеси, які відбуваються у клітинних популяціях *in vitro* на добовому рівні в стабільних умовах вирощування та за їх зміни. Висунуто гіпотезу про те, що в разі застосування біотехнологічних методів збільшення продуктивності дослідженої культури клітин задіяні механізми динамічної спадкової пам'яті. У найстійкішій своїй формі — за умов вирощування на агаризованому середовищі 10 С — осцилятори задіяних субпопуляцій клітин за характеристикою «відносний вміст ДНК в ядрі» утворюють атрактор типу «сідлова точка»; за характеристикою «площа ядерця» осцилятори задіяних субпопуляцій клітин утворюють атрактор «невизначена особлива точка»; у системі клітин, яка може існувати десятки пасажів — за умов вирощування на агаризованому середовищі 5 С, — осцилятори задіяних субпопуляцій

клітин за характеристикою, аналогічною ввДНК, — «плоідність» утворюють атрактор «сідлова точка»; у системі клітин, призначеній для продукування алкалоїдів на збідненому середовищі — за умов вирощування у рідкому середовищі Рж при перенесенні з 10 С — за характеристикою «відносний вміст ДНК в ядрі» осцилятори задіяних субпопуляцій клітин утворюють атрактор типу «граничний цикл», за характеристикою «площа ядерця» осцилятори задіяних субпопуляцій клітин не утворюють атракторів. Для виникнення в клітинній системі *in vitro* сили, яка прагне збільшити невелику флуктуацію для варіантів вирощування на агаризованих середовищах 10 С та 5 С, найбільш значущою характеристикою є «відносний вміст ДНК у ядрі», а за умов вирощування в рідкому середовищі Рж такою характеристикою є «площа ядерця» — через наявність на відповідних потенціальних поверхнях особливої точки типу «сідлова точка». Розповсюдження такої флуктуації на добовому рівні відбувається згідно з мережею взаємодії популяційних осциляторів системи клітин для різних типів вирощування і визначається певною комбінацією осциляторів, яка описується схемою, аналогічною схемі п'ятикомпонентного нестационарного функціонального епігена.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Гудвин Б. Временная организация клетки. — М.: Мир, 1966. — 251 с.
2. Гудвин Б. Аналитическая физиология клеток и развивающихся организмов. — М.: Мир, 1979. — 287 с.
3. Кунах В. А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 5. Изменчивость роста и митотического режима в процессе адаптации к условиям выращивания *in vitro* // Биополимеры и клетка. — 1999. — Т. 15, № 5. — С. 343–359.
4. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. — К.: Логос. — 2005. — 730 с.
5. Valog С. The mitotic index in diploid and triploid *Allium* roots // Cytologia. — 1982. — V. 47, N 3–4. — P. 689–697.



6. *Stephens C. E.* Daily mitotic cycle in common onion, *Allium cepa* // *Ibid.* — 1984. — V. 49, N 4. — P. 679–684.
7. *Гриф В. Г., Мачс Э. М.* Влияние ритма освещения на митотический цикл в корневой меристеме растений // *Цитология.* — 1996. — Т. 38, № 7. — С. 718–725.
8. *Парнікоза І. Ю., Мірюта Н. Ю., Адонін В. І., Кунах В. А.* Циркадна динаміка структури клітинних популяцій *Rauwolfia serpentina* Benth. за різних умов культивування *in vitro* // *Біополімери і клітина.* — 2008. — Т. 24, № 6. — С. 476–486.
9. *Парнікоза І. Ю., Мірюта Н. Ю., Адонін В. І., Кунах В. А.* Вплив зміни умов культивування на циркадну динаміку структури клітинних популяцій *Rauwolfia serpentina* Benth. *in vitro* // *Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів.* — 2008. — Т. 6, № 1. — С. 98–107.
10. *Воллосович А. Г., Пучинина Т. Н., Николаева Л. А.* Оптимизация состава макросолей для культуры тканей *Rauwolfia serpentina* Benth. // *Растит. ресурсы.* — 1979. — Т. 15, № 4. — С. 516–526.
11. *Воллосович А. Г., Мартынова Т. Ю., Полищук С. Я.* Питательная среда для выращивания культуры тканей раувольфии змеиной — продуцента алкалоидов. — А. с. СССР № 1167895 от 08.03.1985 (не публ.).
12. *Каухова И. Е., Воллосович А. Г., Цыганков В. А.* Выбор питательной среды для глубинного культивирования тканей раувольфии змеиной (*Rauwolfia serpentina* Benth.) // *Растит. ресурсы.* — 1981. — Т. 17, Вып. 2. — С. 217–224.
13. *Kunakh V. A.* Somaclonal variation in *Rauwolfia* // *Y.P.S. Bajaj (ed.) Biotechnology in agriculture and forestry, V. 36. Somaclonal variation in crop improvement. II.* — Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1996. — P. 315–332.
14. *Кунах В. А.* Геномная изменчивость и накопление индолиновых алкалоидов в культуре клеток раувольфии змеиной, *Rauwolfia serpentina* Benth. // *Биополимеры и клетка.* — 1994. — Т. 10, № 1. — С. 3–30.
15. *Спиридонова Е. В., Адноф Д. М., Андреев И. О., Кунах В. А.* Стабильность генома высокопродуктивной клеточной линии К-27 *Rauwolfia serpentina* Benth. при изменении условий выращивания // *Там же.* — 2007. — Т. 23, № 2. — С. 86–92.
16. *Андреев И. О., Адноф Д. М., Спиридонова Е. В., Кунах В. А.* Стабильность генома высокопродуктивных клеточных линий раувольфии змеиной при длительном выращивании *in vitro* // *Доп. НАН України.* — 2007. — № 10. — С. 147–152.
17. *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.
18. *Мирюта Н. Ю., Парникоза И. Ю., 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 // *Там же.* — 2006. — № 2. — С. 78–95.
19. *Парнікоза І. Ю., Мірюта Н. Ю., Ал-Аммурі Ю., Кунах В. А.* Динаміка клітинних популяцій *Rauwolfia serpentina* Benth. за зміни умов культивування *in vitro* // *Біополімери і клітина.* — 2008. — Т. 24, № 4. — С. 300–309.
20. *Кунах В. А., Левенко Б. А.* Модификация метода давленных препаратов для изучения хромосом в клетках культуры тканей растений // *Цитология и генетика.* — 1975. — Т. 9, № 1. — С. 56–58.
21. *Kiernon J. A.* Histological and Histochemical Methods. Theory and Practice. — New-York: Pergamon, 1990. — P. 136–364.
22. *Архипчук В. В.* Влияние малых доз радиации на ядрышковую активность эмбрионов карповых рыб // *Радиобиология.* — 1990. — Т. 30, № 4. — С. 496–501.
23. *Поллард Дж.* Справочник по вычислительным методам статистики. — М.: Финансы и статистика, 1982. — 344 с.
24. *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. — V. 275. — P. 2372–2384.
25. *Печуркин Н. С., Брильков А. В., Марченкова Т. В.* Популяционные аспекты биотехнологии. — Новосибирск: Наука, Сибирское отделение, 1990. — 170 с.
26. *Чалый А. В.* Неравновесные процессы в физике и биологии. — К.: Наук. думка, 1997. — 183 с.
27. *Чураев Р. Н.* Прикладные аспекты концепции эпигенов // *Журн. общ. биол.* — 1982. — Т. 43, № 1. — С. 79–87.
28. *Чураев Р. Н., Галимзянов А. В.* Моделирование реальных эукариотических управляющих генных подсетей на основе метода обобщенных пороговых моделей // *Мол. биол.* — 2001. — Т. 35, № 6. — С. 1088–1094.
29. *Чураев Р. Н.* Эпигенетика: генные и эпигенные сети в онто- и филогенезе // *Генетика.* — 2006. — Т. 42, № 9. — С. 1276–1296.
30. *Тодоров И. Н.* Механизмы клеточной стабильности // *В мире науки.* — 1986. — № 10. — С. 50–61.
31. *Тодоров И. Н., Бойков П. Я., Сидоренко Л. И. и др.* Стимуляция репликации ДНК в клетках печени крыс как результат ингибирования синтеза белков // *ДАН СССР.* — 1978. — Т. 239. — С. 1255–1258.

**ДИНАМИКА КЛЕТОЧНЫХ  
СИСТЕМ *in vitro*.  
I. ОРГАНИЗАЦИЯ ВО ВРЕМЕНИ  
И СТАБИЛЬНОСТЬ СИСТЕМЫ  
КУЛЬТУРЫ ТКАНЕЙ  
РАУВОЛЬФИИ ЗМЕИНОЙ  
НА СУТОЧНОМ УРОВНЕ ОРГАНИЗАЦИИ**

*Н. Ю. Мирюта  
В. А. Кунах*

Институт молекулярной биологии и генетики  
НАН Украины, Киев

*E-mail: kunakh@imbg.org.ua*

Рост и развитие как целостного организма, так и культивированных тканей растений обусловлены определенными колебательными изменениями динамических характеристик клеточных систем, которые формируют соответствующие ткани или организм в целом. Однако эти фундаментальные процессы изучены недостаточно.

На примере культуры тканей раувольфии змеиной исследована динамика клеточных систем, в частности их организация во времени на суточном иерархическом уровне. С помощью показателей Ляпунова установлены фазовые траектории динамики доли клеток с разным содержанием ДНК в ядре и разной площадью ядрышка, а также динамики показателей пролиферации (митозов и amitozov) при изменении условий культивирования для высокопродуктивного штамма К-27 *Rauwolfia serpentina* — продуцента противоритмического алкалоида аймалина. Выдвинута гипотеза, согласно которой при использовании биотехнологических приемов увеличения продуктивности исследованной культуры клеток включаются механизмы динамической наследственной памяти.

**Ключевые слова:** клеточные популяции *in vitro*, динамика клеточных систем, фазовые траектории, *Rauwolfia serpentina*.

**THE DYNAMICS  
OF CELL SYSTEMS *in vitro*.  
I. TEMPORAL ORGANIZATION  
AND STABILITY  
OF *Rauwolfia serpentina* CULTURE  
TISSUES AT CIRCADIAN LEVEL**

*N. Yu. Miryuta  
V. A. Kunakh*

Institute of Molecular Biology and Genetics  
of National Academy of Sciences of Ukraine,  
Kyiv

*E-mail: kunakh@imbg.org.ua*

Growth and development as a complete organism as a plant tissue culture were determined by oscillation changes of the cell system dynamics characteristics that formed corresponding tissues or an organism as a whole. However these basic processes are not well understood.

The dynamics of cell systems has been studied on the example of *Rauwolfia serpentina* Benth culture tissues, in particular their organization in time for the daily level of the hierarchy. The phase trajectories of the cell part dynamics with different DNA content in the nucleus and different nucleolus area, as well as dynamics of proliferation indexes (mitosis and amitosis) under variation of cultivation conditions for the high-productive *Rauwolfia serpentina* K-27 strain (antiarrhythmic alkaloid ajmaline producer) were determined by Liapunov indexes. The applied biotechnological methods of productivity increasing in the researched cell culture have been assumed to use dynamics hereditary memory mechanisms.

**Key words:** cell population *in vitro*, dynamic of the cell systems, phase trajectories, *Rauwolfia serpentina*.