

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

Н. Ю. Мірюта  
В. А. Кунах

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

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

Отримано 18.07.2011

Ріст і розвиток як цілісного організму, так і культивованих тканин рослин зумовлюється коливаннями різних параметрів клітинних систем, що формують клітинні лінії, тканини чи організм загалом не тільки на рівні процесів, які мають добову ритміку (добовий рівень організації), а й на рівні пасажних ритмів (пасажний рівень організації). Проте ці фундаментальні процеси вивчено недостатньо.

На прикладі культури тканин раувольфії зміїної досліджено динаміку клітинної системи на пасажному рівні, зокрема її організацію в часі та стійкість як системи. Для високопродуктивного штаму К-27 *Rauwolfia serpentina* — продуцента протиаритмічного алкалоїду аймаліну — досліджено фазові траєкторії динаміки показників продуктивності (накопичення біомаси та індолінових алкалоїдів) і динаміки показника морфогенезу (трахеїдних елементів), а також динаміки часток кількості клітин із різним вмістом ДНК в ядрі і різною площею ядерця впродовж пасажу за зміни умов культивування *in vitro*. Згідно з отриманими даними застосовані біотехнологічні прийоми збільшення продуктивності, зокрема зміна умов вирощування, на пасажному рівні культури тканин раувольфії зміїної ґрунтуються на механізмах динамічної спадкової пам'яті.

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

Культури клітин рослин характеризуються стабільною як добовою, так і пасажною ритмікою фізіологічних процесів, детально описаною в роботах [1–3]. Проте математичне моделювання ритміки цих процесів досі не проводили.

Головною особливістю популяцій культивованих клітин є їхня висока поліморфність та мінливість на цитоморфологічному, цитогенетичному та молекулярно-біологічному рівнях. Конкретні чинники та особливості цієї мінливості досить різноманітні [2, 4]. Так, у тканинних культурах спостерігається велика гетерогенність за плоідністю, а також за коефіцієнтом успадкування багатьох ознак, зокрема продуктивності [2, 4–6], що може бути пов'язано з диференціюванням клітин, насамперед з їхньою здатністю на певному етапі онтогенезу до продукування біологічно активних речовин. Отримані для раувольфії зміїної дані дають підстави припустити, що для кожної клітинної лінії чи штаму для якнайповнішої реалізації генетичних потенцій слід підбирати умови ви-

рощування індивідуально [7]. Дані про різний ступінь зростання рівня накопичення аймаліну в клітинній лінії А та штамів К-20 і К-27 культури тканин раувольфії зміїної за умов впливу однакової комбінації фітогормонів у живильному середовищі, наведені в [7], свідчать про те, що найперспективнішою для подальшої роботи з підвищення продуктивності є клітинна лінія А, тоді як штам К-27 є найбільш гомогенним і вирівняним відселектованим штамом за ознакою «накопичення аймаліну». Молекулярно-генетичну стабільність штаму К-27 як за зміни умов культивування, так і за умов тривалого вирощування у стабільних умовах методом RAPD-ПЛР було показано пізніше [8, 9]. Тому наступне завдання загалом зводиться до кількісного дослідження субпопуляцій клітин, які здатні ділитися (становлять проліферативний пул) і роблять внесок в характеристику «накопичення біомаси», та клітин, що спеціалізуються на синтезі індолінових алкалоїдів і роблять внесок у характеристику «накопичення

індолінових алкалоїдів». Окрім того, слід враховувати субпопуляцію спеціалізованих клітин — трахеїдних елементів, яка в досліджуваній популяції наприкінці пасажу може сягати 60% [2, 10].

Раніше було вивчено динаміку структури клітинної популяції штаму К-27 *R. serpentina* за показниками відносного вмісту ДНК та площі ядерця, що пов'язані з диференціюванням клітин та їхньою біосинтетичною активністю відповідно, а також залежність питомих швидкостей показників продуктивності від динаміки чисельності окремих субпопуляцій клітин за зміни умов культивування [11–13]. Використовуючи сучасну термінологію, було досліджено осцилятори кількісного складу окремих субпопуляцій клітин, які забезпечують осциляції питомих швидкостей показників продуктивності.

Метою цієї роботи було: 1) дослідження станів стійкості клітинної системи штаму К-27 *Rauwolfia serpentina* — продуцента протиритмічного алкалоїду аймаліну — на пасажному ієрархічному рівні за різних умов вирощування на експериментальному матеріалі, наведеному в роботах [11, 12], за допомогою аналізу показників Ляпунова для фазових траєкторій (динаміки питомих швидкостей накопичення біомаси та індолінових алкалоїдів і трахеїдних елементів залежно від біомаси), а також для фазових траєкторій різних субпопуляцій (динаміки часток кількості клітин з різним вмістом ДНК в ядрі та різною площею ядерця); 2) формулювання гіпотези про керування системою на пасажному ієрархічному рівні за допомогою комбінаторного алгоритму (функціонального епігена), за яким перемикаються осцилятори кількості клітин у субпопуляціях із різним вмістом ДНК у ядрі або з різною площею ядерця (двопозиційний модуль пам'яті), що відповідають за трикомпонентний нестационарний модуль, який утворюється за участю осциляторів питомих швидкостей накопичення біомаси та індолінових алкалоїдів і швидкістю утворення трахеїдних елементів за різних умов культивування.

### Матеріали і методи

Об'єктом дослідження був гормоннезалежний штаму К27 культури тканин *Rauwolfia serpentina*, який вирощували на агаризованому (твердому) середовищі 5С (5% цукрози) або 10С (10% цукрози) за [15, 16] чи в рідкому середовищі Рж (2,5% цукрози) [17] після перенесення із середовища 10С, стандартного для штаму. Схему досліджу наведено на рис. 1.

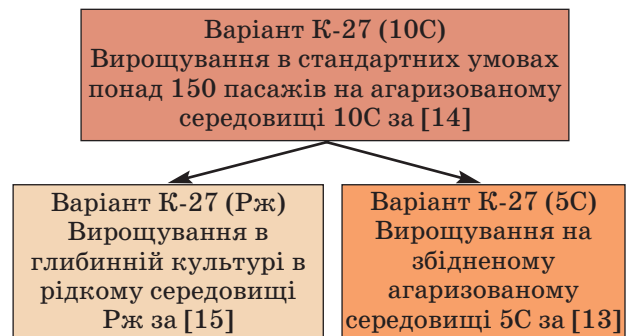


Рис. 1. Схема досліджу з вивчення станів стійкості клітинної системи штаму К-27 *Rauwolfia serpentina* за різних умов вирощування

Такі параметри, як накопичення сухої маси та індолінових алкалоїдів, вивчали в динаміці протягом 90 діб росту (за звичайної тривалості пасажу до пересадження 30–35 діб та до збору врожаю 60–70 діб) з інтервалом у 5 або 10 діб. Сушу масу визначали після висушування тканини за температури 50–55 °С до повітряно-сухого стану. Вміст алкалоїдів визначали спектрофотометрично та мікрохроматографічно [18, 19]. Для аналізу кількості накопиченої біомаси і вмісту алкалоїдів відбирали не менше трьох зразків, а для цитологічного аналізу — не менше двох зразків кожного варіанта в кожній вивченій точці росту впродовж пасажу. На графіках у роботах [11, 12] наведено середні арифметичні значення вивчених показників (трикратних для біохімічних та двократних для цитологічних досліджень), що їх вираховано методом найменших квадратів за допомогою програми CurveExpert 1.3.

Було встановлено, як змінюються сили (осцилятори, реалізацією яких є динаміка чисельності субпопуляцій), потоки (осцилятори, реалізацією яких є динаміка питомих швидкостей накопичення біомаси, елементів диференціювання клітин — трахеїд та питомих швидкостей накопичення індолінових алкалоїдів) і коефіцієнти (величини, які характеризують інтенсивність внесків сил у потоки) за зміни складу середовища в умовах періодичного культивування на пасажному рівні [11, 12].

Цитологічні дослідження проводили за методиками, описаними в роботах [20–22]. Проби для вивчення пасажної динаміки відбирали через добу.

Показник «відносний вміст ДНК» (ввДНК) в інтерфазних ядрах аналізували на забарвлених за Фьольгеном препаратах, 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 азотнокислим сріблом за модифікованою методикою [22], здійснювали морфометрію ядерця та ядер. До вибірки потрапляли тільки клітини, що мали ядра та ядерця (живі клітини).

**Статистичні методи.** Визначені характеристики клітин за відносним вмістом ДНК у ядрі та площею ядерця розділили на класи, розміри субпопуляцій клітин за якими для кожної характеристики та частки класу відповідних характеристик з урахуванням повного об'єму вибірки наведено в роботах [11, 12]. Порівняння динамік кількості клітин різних субпопуляцій і питомих швидкостей накопичення біомаси, трахеїд та індолінових алкалоїдів проводили методом парної лінійної регресії [23].

**Математичні методи.** Аналіз стійкості стаціонарного стану тісно пов'язаний з параметром порядку та принципом підлеглості. Донедавна такий аналіз проводили для динамічних рівнянь певного вигляду. Однак цього не завжди достатньо під час дослідження та узагальнення великої кількості експериментального матеріалу, тому було введено поняття «атрактор» для опису складних експериментальних систем [24]. Ми застосували низку таких теоретичних понять, як атрактор та фазова траєкторія, для дослідження експериментальної системи, подібно до того, як це робили дослідники популяцій різних видів організмів [25]. Для аналізу стійкості фазових траєкторій було вивчено показники Ляпунова [26, 27].

Досліджену систему проаналізували як двовимірну, враховуючи два показники Ляпунова (для двох використаних субпопуляцій клітин). Для визначення показників Ляпунова динаміки чисельного складу субпопуляцій добирали за допомогою експоненційних залежностей методом найменших квадратів, визначали коефіцієнти кореляції і відповідні значення F-розподілу, порівняння яких з верхніми точками F-розподілу дає можливість визначити, чи є показник Ляпунова нульовим, чи відрізняється від нульового [23].

## Результати та обговорення

Адекватною математичною моделлю для описаних варіантів досліду є теорія Пригожина–Віам, яка ґрунтується на вивченні процесів відхилення від рівноваги в біологічних системах, граничними умовами застосування якої до біологічних систем виявилися, зокрема, наявність ембріогенезу, процесів старіння, регенерації та злоякісного росту у тварин, запалення і ушкодження клітин у культурі клітин, тканин [28, 29]. Із цих робіт Зотіних випливає, що в дослідженні культури клітин вищих рослин може бути використаний математичний апарат термодинаміки незворотних процесів. Проблема полягає у вдалому виборі сил і потоків, а також феноменологічних коефіцієнтів та надання їм біологічного змісту.

Будемо вважати, що відхилення від рівноважного стану не є великими під час пересадження, але для конкретних умов вирощування, особливо для значних стресів під час пересадження, можуть скластися умови для відхилення від лінійності, тому може виникнути потреба у проведенні додаткового аналізу, який застосовують для аналізу систем, що далеко відхиляються від рівноваги. Аналіз відповідності стану штучної системи клітин стану «термодинамічної гілки» проведено в роботах [11–14] на основі експериментальних даних з кількісного складу субпопуляцій клітин за значущими характеристиками.

У роботах [11, 12] було показано наявність лінійної залежності на пасажному ієрархічному рівні між потоками (питомі швидкості накопичення біомаси, трахеїд та індолінових алкалоїдів) та силами (динаміками кількісного складу окремих субпопуляцій клітин за двома показниками, визначеними незалежно: «відносний вміст ДНК в ядрі» та «площа ядерця»). Відповідно до розрахунків, наведених у цих роботах, система може перебувати в різних стійких та нестійких станах. Однорідні у просторі й стаціонарні в часі стани системи, яка описується даною системою рівнянь, звичайно ототожнюють зі стійкою («термодинамічною») гілкою станів, яка в дослідженому нами випадку описується системою рівнянь:

$$\begin{aligned} I_g(j) &= R_{gg} A_{gg} k_{gg} X_g(j) + R_{gd} A_{gd} k_{gd} X_d(j) + R_{gc} A_{gc} k_{gc} X_c(j); \\ I_d(j) &= R_{dg} A_{dg} k_{dg} X_g(j) + R_{dd} A_{dd} k_{dd} X_d(j) + R_{dc} A_{dc} k_{dc} X_c(j); \\ I_c(j) &= R_{cg} A_{cg} k_{cg} X_g(j) + R_{cd} A_{cd} k_{cd} X_d(j) + R_{cc} A_{cc} k_{cc} X_c(j). \end{aligned}$$

Літерою  $j$  позначено порядковий номер показника, за яким досліджували субпопу-

ляції щодо можливості представлення динаміки кількості клітин у клітинних субпопуляціях як сили  $[X(j)]$ . Було перевірено сім характеристик, з яких придатними виявилися дві:  $j = 3$  (відносний вміст ДНК у ядрі) та  $j = 6$  (площа ядерця) [11]. Під структурою популяції будемо розуміти кількісний склад субпопуляцій клітин з певним значенням ввДНК ( $j = 3$ ) або площі ядерця ( $j = 6$ ), а динаміку кількості клітин з певними ознаками називатимемо скорочено осцилятором кількісного складу певної субпопуляції. Внесок кожної субпопуляції за ввДНК чи за площею ядерця у потік накопичення біомаси, алкалоїдів та трахеїд у загальному вигляді відбиває наведена вище система феноменологічних рівнянь, де  $I_g$  — потік біомаси,  $I_{dt}$  — потік трахеїд,  $I_{dc}$  — потік алкалоїдів,  $L_{mn}$  — феноменологічні коефіцієнти:  $L_{mn} = R_{mn}A_{mn}$ . Конкретне значення та знак коефіцієнта кореляції ( $R_{mn}$ ) свідчить про внесок конкретного осцилятора кількісного складу субпопуляції (термодинамічної сили)  $X_g(j)$ ,  $X_{dt}(j)$  чи  $X_{dc}(j)$  за ввДНК ( $j = 3$ ) та площею ядерця ( $j = 6$ ) у відповідний біологічний потік,  $A_{mn}$  — коефіцієнти адаптації,  $k_{mn}$  — коефіцієнт

розмірності (де  $m$  та  $n$  по черзі набувають значення  $g$ ,  $d_t$ ,  $d_c$ ) [12]. Конкретні числові значення для кожної з досліджених систем наведено в табл. 1, 2.

Якщо відхилення від рівноважного стану не є великими під час пересадження для найбільш рівноважного варіанта К-27(5С) [11, 12], то для екстремальніших умов вирощування вони можуть виявитись такими, що відводять систему досить далеко від рівноваги, що може призводити до зміни коефіцієнтів адаптації [12]. Тоді маємо аналізувати фазові траєкторії кожної із субпопуляцій для кожного з варіантів вирощування. Приклади таких фазових траєкторій подано на рис. 2.

Як видно з рис. 2, на якому представлено фазові траєкторії для загального пулу клітин (характеристика — накопичення біомаси) у клітинній системі штаму К-27 *Rauwolfia serpentina* впродовж всього пасажу (I), фазові траєкторії для трьох досліджених варіантів найбільше нагадують стійкий фокус (за класифікацією Пуанкаре [26, 27]) в околі особливої точки, яка є характерною для кожного з досліджених варіантів. Це

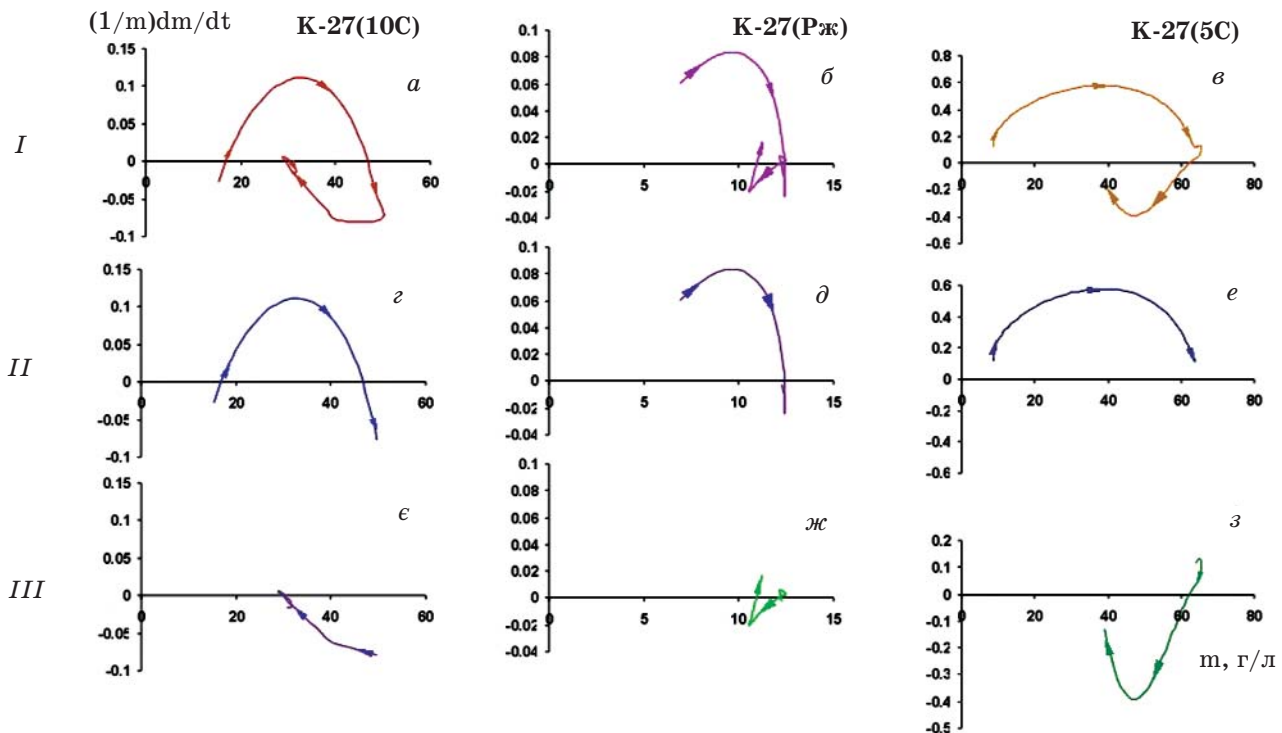


Рис. 2. Фазові траєкторії клітинної системи штаму К-27 *Rauwolfia serpentina*: (характеристика — накопичення біомаси) впродовж усього пасажу (I); першої частини пасажу (II), коли спостерігається перший пік питомої швидкості накопичення біомаси; другої частини пасажу (III), коли спостерігається другий пік питомої швидкості накопичення біомаси; під час вирощування: а, з, е — варіант К-27(10С); б, д, ж — варіант К-27(Рж); в, е, з — варіант К-27(5С); за віссю абсцис — біомаса (m); за віссю ординат — питома швидкість накопичення біомаси  $[1/m(dm/dt)]$ . Стрілками позначено напрям руху системи за фазовою траєкторією

Таблиця 1. Феноменологічні коефіцієнти  $L_{mn}$ \* та їхні множники: коефіцієнти кореляції  $R_{mn}$  і адаптації  $A_{mn}$  та коефіцієнти розмірності  $k_{mn}$  для різних варіантів вирощування штаму K-27 *R. serpentina*

| Варіант    | $R_{mg}$                       | $R_{mdt}$ | $R_{mde}$ | $k_{mg}$         | $k_{mdt}$             | $k_{mde}$            | $A_{mn}$ | $L_{mg}$ | $L_{mdt}$ | $L_{mde}$ |
|------------|--------------------------------|-----------|-----------|------------------|-----------------------|----------------------|----------|----------|-----------|-----------|
| 1          | 2                              | 3         | 4         | 5                | 6                     | 7                    | 8        | 9        | 10        | 11        |
| K-27 (10С) |                                |           |           |                  |                       |                      |          |          |           |           |
| Перша      | Відносний вміст ДНК, С         |           |           |                  |                       |                      |          |          |           |           |
| складова   | 3-6,9                          | 3-6,9     | 1-2,9     | 3-6,9            | 3-6,9                 | 1-2,9                |          | 3-6,9    | 3-6,9     | 1-2,9     |
| m = g      | 0,58                           | 0,65      | -0,67     | 1                | 1                     | 1                    | 1        | 0,58     | 0,65      | -0,67     |
| m = dt     | 0,65                           | 0,54      | -0,56     | 10 <sup>-1</sup> | 1.76·10 <sup>-1</sup> | 10 <sup>-1</sup>     | 2        | 1,30     | 1,08      | -1,12     |
| m = dc     | -0,67                          | -0,56     | 0,63      | 10 <sup>-3</sup> | 10 <sup>-3</sup>      | 4,1·10 <sup>-3</sup> | 2,5      | -1,68    | -1,4      | 1,58      |
|            | Площа ядерця, мкм <sup>2</sup> |           |           |                  |                       |                      |          |          |           |           |
|            | >17                            | >17       | 12-16,9   | >17              | >17                   | 12-16,9              |          | >17      | >17       | 12-16,9   |
| m = g      | 0,66                           | -0,67     | 0,48      | 1                | 1                     | 1                    | 1        | 0,66     | -0,67     | 0,48      |
| m = dt     | 0,67                           | 0,68      | 0,79      | 10 <sup>-1</sup> | 1.76·10 <sup>-1</sup> | 10 <sup>-1</sup>     | 2        | 1,34     | 1,36      | 1,58      |
| m = dc     | -0,48                          | -0,79     | 0,78      | 10 <sup>-3</sup> | 10 <sup>-3</sup>      | 4,1·10 <sup>-3</sup> | 2,5      | -1,2     | -1,98     | 1,95      |
| K-27(10С)  |                                |           |           |                  |                       |                      |          |          |           |           |
| Друга      | Відносний вміст ДНК, С         |           |           |                  |                       |                      |          |          |           |           |
| складова   | 1-2,9                          | 3-6,9     | 1-2,9     | 1-2,9            | 3-6,9                 | 1-2,9                |          | 1-2,9    | 3-6,9     | 1-2,9     |
| m = g      | 0,49                           | -0,82     | 0,65      | 1                | 1                     | 1                    | 1        | 0,49     | -0,82     | 0,65      |
| m = dt     | -0,82                          | 0,71      | -0,54     | 10 <sup>-1</sup> | 1.76·10 <sup>-1</sup> | 10 <sup>-1</sup>     | 2        | -2,52    | 1,42      | -1,08     |
| m = dc     | -0,65                          | -0,54     | 0,57      | 10 <sup>-3</sup> | 10 <sup>-3</sup>      | 4,1·10 <sup>-3</sup> | 1        | -0,65    | -0,54     | 0,57      |
|            | Площа ядерця, мкм <sup>2</sup> |           |           |                  |                       |                      |          |          |           |           |
|            | <10,9                          | <10,9     | 12-16,9   | <10,9            | <10,9                 | 12-16,9              |          | <10,9    | <10,9     | 12-16,9   |
| m = g      | 0,87                           | -0,55     | -0,92     | 1                | 1                     | 1                    | 1        | 0,87     | -0,55     | -0,92     |
| m = dt     | -0,55                          | 0,99      | -0,93     | 10 <sup>-1</sup> | 1.76·10 <sup>-1</sup> | 10 <sup>-1</sup>     | 2        | -1,10    | 1,98      | -1,86     |
| m = dc     | -0,92                          | 0,93      | 0,77      | 10 <sup>-3</sup> | 10 <sup>-3</sup>      | 4,1·10 <sup>-3</sup> | 1        | -0,92    | 0,93      | 0,77      |
| K-27 (Рж)  |                                |           |           |                  |                       |                      |          |          |           |           |
| Перша      | Відносний вміст ДНК, С         |           |           |                  |                       |                      |          |          |           |           |
| складова   | 1-2,9                          | 3-8,9     | 3-8,9     | 1-2,9            | 3-8,9                 | 3-8,9                |          | 1-2,9    | 3-8,9     | 3-8,9     |
| m = g      | 0,67                           | -0,79     | -0,70     | 1                | 1                     | 1                    | 1        | 0,67     | -0,79     | -0,70     |
| m = dt     | -0,79                          | 0,76      | -0,68     | 10 <sup>-1</sup> | 1.76·10 <sup>-1</sup> | 10 <sup>-1</sup>     | 3        | -2,37    | 2,28      | -2,04     |
| m = dc     | -0,70                          | -0,68     | 0,67      | 10 <sup>-3</sup> | 10 <sup>-3</sup>      | 4,3·10 <sup>-3</sup> | 0,75     | -0,53    | -0,51     | 0,50      |
|            | Площа ядерця, мкм <sup>2</sup> |           |           |                  |                       |                      |          |          |           |           |
|            | >8,0                           | >8,0      | >8,0      | >8,0             | >8,0                  | >8,0                 |          | >8,0     | >8,0      | >8,0      |
| m = g      | 0,60                           | -0,55     | -0,60     | 1                | 1                     | 1                    | 1        | 0,60     | -0,55     | -0,60     |
| m = dt     | -0,55                          | 0,76      | -0,75     | 10 <sup>-1</sup> | 1.76·10 <sup>-1</sup> | 10 <sup>-1</sup>     | 3        | -1,65    | 2,28      | -2,25     |
| m = dc     | -0,60                          | -0,75     | 0,59      | 10 <sup>-3</sup> | 10 <sup>-3</sup>      | 4,3·10 <sup>-3</sup> | 0,75     | -0,45    | -0,56     | 0,44      |
| K-27(Рж)   |                                |           |           |                  |                       |                      |          |          |           |           |
| Друга      | Відносний вміст ДНК, С         |           |           |                  |                       |                      |          |          |           |           |
| складова   | 3-8,9                          | 3-8,9     | 1-2,9     | 3-8,9            | 3-8,9                 | 1-2,9                |          | 3-8,9    | 3-8,9     | 1-2,9     |
| m = g      | 0,58                           | -0,51     | -0,53     | 1                | 1                     | 1                    | 1        | 0,58     | -0,51     | -0,53     |
| m = dt     | -0,51                          | 0,46      | -0,49     | 10 <sup>-1</sup> | 1.76·10 <sup>-1</sup> | 10 <sup>-1</sup>     | 3        | -1,53    | 1,38      | -1,47     |
| m = dc     | -0,53                          | -0,49     | 0,61      | 10 <sup>-3</sup> | 10 <sup>-3</sup>      | 4,3·10 <sup>-3</sup> | 0,25     | -0,13    | -0,12     | 0,15      |
|            | Площа ядерця, мкм <sup>2</sup> |           |           |                  |                       |                      |          |          |           |           |
|            | 2,0-4,9                        | >8,0      | >8,0      | 2,0-4,9          | >8,0                  | >8,0                 |          | 2,0-4,9  | >8,0      | >8,0      |
| m = g      | 0,56                           | -0,59     | -0,62     | 1                | 1                     | 1                    | 1        | 0,56     | -0,59     | -0,62     |
| m = dt     | -0,59                          | 0,64      | -0,75     | 10 <sup>-1</sup> | 1.76·10 <sup>-1</sup> | 10 <sup>-1</sup>     | 3        | -1,77    | 1,92      | -2,25     |
| m = dc     | -0,62                          | -0,75     | 0,60      | 10 <sup>-3</sup> | 10 <sup>-3</sup>      | 4,3·10 <sup>-3</sup> | 0,25     | -0,13    | -0,12     | 0,15      |

Продовження таблиці 1

| 1         | 2                              | 3     | 4     | 5                | 6                     | 7                     | 8 | 9     | 10    | 11    |
|-----------|--------------------------------|-------|-------|------------------|-----------------------|-----------------------|---|-------|-------|-------|
| К-27 (5С) |                                |       |       |                  |                       |                       |   |       |       |       |
| Перша     | Відносний вміст ДНК, С         |       |       |                  |                       |                       |   |       |       |       |
| складова  | 1-2,9                          | 1-2,9 | 3-6,9 | 1-2,9            | 1-2,9                 | 3-6,9                 |   | 1-2,9 | 1-2,9 | 3-6,9 |
| m = g     | 0,83                           | 0,77  | -0,65 | 1                | 1                     | 1                     | 1 | 0,83  | 0,77  | -0,65 |
| m = dt    | 0,77                           | 0,75  | -0,58 | 10 <sup>-1</sup> | 1.76·10 <sup>-1</sup> | 10 <sup>-1</sup>      | 1 | 0,77  | 0,75  | -0,58 |
| m = dc    | -0,65                          | 0,58  | 0,64  | 10 <sup>-3</sup> | 10 <sup>-3</sup>      | 3,68·10 <sup>-3</sup> | 1 | -0,65 | 0,58  | 0,64  |
|           | Площа ядерця, мкм <sup>2</sup> |       |       |                  |                       |                       |   |       |       |       |
|           | <4                             | <4    | >5    | <4               | <4                    | >5                    |   | <4    | <4    | >5    |
| m = g     | 0,61                           | 0,84  | 0,64  | 1                | 1                     | 1                     | 1 | 0,61  | 0,84  | 0,64  |
| m = dt    | -0,84                          | 0,88  | -0,82 | 10 <sup>-1</sup> | 1.76·10 <sup>-1</sup> | 10 <sup>-1</sup>      | 1 | -0,84 | 0,88  | -0,82 |
| m = dc    | -0,64                          | 0,82  | 0,72  | 10 <sup>-3</sup> | 10 <sup>-3</sup>      | 3,68·10 <sup>-3</sup> | 1 | -0,64 | 0,82  | 0,72  |

Примітка: \*  $L_{mn} = R_{mn}A_{mn}$ ; таблиця використаних символів: для потоків сухої біомаси ( $m = g$ ), трахеїд ( $m = dt$ ), індолінових алкалоїдів ( $m = dc$ ); для конкретної сили (динаміки субпопуляції) з відносним вмістом ДНК та площею ядерця поточний індекс по черзі змінював значення  $n = g, dt, dc$ .

Таблиця 2. Характеристики та позначення конкретних осциляторів клітинної системи штаму К-27 *Rauwolfia serpentina* у різних умовах вирощування

| Варіант   | Часовий інтервал (доба) | Популяційно-клітинний осцилятор за характеристикою |                      |                      |                                                  |                      |                      |
|-----------|-------------------------|----------------------------------------------------|----------------------|----------------------|--------------------------------------------------|----------------------|----------------------|
|           |                         | відносний вміст ДНК в ядрі (С)                     |                      |                      | сумарна площа ядерця клітини (мкм <sup>2</sup> ) |                      |                      |
|           |                         | A (m' <sub>1</sub> )                               | B (m' <sub>2</sub> ) | C (m' <sub>3</sub> ) | A (m' <sub>1</sub> )                             | B (m' <sub>2</sub> ) | C (m' <sub>3</sub> ) |
| К-27(10С) | 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)              |
|           | 30-40                   | D (1,0-2,9)                                        | E (3,0-6,9)          | D (1,0-2,9)          | E (12,0-16,9)                                    | D (<10,9)            | D (<10,9)            |
|           | 20-40                   | D (1,0-2,9)                                        | E (3,0-6,9)          | D (1,0-2,9)          | E (12,0-16,9)                                    | D (<10,9)            | D (<10,9)            |
| К-27(5С)  | 0-40                    | E (3,0-6,9)                                        | D (1,0-2,9)          | D (1,0-2,9)          | E (>5)                                           | D (<4)               | D (<4)               |
| К-27(Рж)  | 0-20                    | E (3,0-8,9)                                        | E (3,0-8,9)          | D (1,0-2,9)          | E (>8)                                           | E (>8)               | E (>8)               |
|           | 20-45                   | D (1,0-2,9)                                        | E (3,0-8,9)          | E (3,0-8,9)          | D (2,0-4,9)                                      | E (>8)               | E (>8)               |

означає, що досліджена система на пасажному рівні є грубою, тобто характер траєкторії її у фазовому просторі зберігається за невеликих змін параметрів. Для субпопуляцій клітин, які диференціювалися шляхом утворення трахеїд, та клітин, які продукують алкалоїди, фазові траєкторії були складніші, але найбільше все ж нагадували стійкий фокус.

Оскільки, як було показано в [11, 12], потоки трьох основних показників ( $I_g$  — потік біомаси,  $I_{dt}$  — потік трахеїд,  $I_{dc}$  — потік алкалоїдів) визначаються силами, які являють собою динаміки частки клітин певних субпопуляцій (осцилятори певних субпопу-

ляцій), ми спробували отримати й оцінити фазові траєкторії для двокомпонентних систем, які є субпопуляціями клітин за відносним вмістом ДНК (перша — 1-2,99 С і друга — 3-6,99 С) та за площею ядерця (комбінація другої 12-16,9 мкм<sup>2</sup>) та третьої (>17 мкм<sup>2</sup>) для першої складової варіанта К-27(10 С) або комбінація першої (<10,9 мкм<sup>2</sup>) та другої (12-16,9 мкм<sup>2</sup>) субпопуляцій для другої складової варіанта К-27(10 С). Як приклад наводимо тільки результати такого аналізу експериментальних даних лише для варіанта К-27(10 С) (рис. 3-5).

Проаналізуємо досліджену систему як двовимірну, враховуючи два показники

Ляпунова (для двох задіяних субпопуляцій клітин), і як тривимірну, приписуючи кожній із сил, що відповідає певному потоку, показник Ляпунова.

У випадку двовимірної системи такий аналіз дає два типи результатів: фокус є подібним до стійкого або до нестійкого. Як впливає з результатів для варіанта К-27(10 С), приклад яких наведено на рис. 3, фазова траєкторія двокомпонентної системи субпопуляції клітин за відносним вмістом ДНК (перша — 1–2,99 С і друга — 3–6,99 С) є найбільш подібною до стійкого фокуса [27], тоді як для двох пар субпопуляцій за площею ядра для першої та другої часової складової вона є подібною до нестійкого фокуса; для варіантів К-27(5 С) та К-27(Рж) — за обома характеристиками фазова траєкторія є найбільш подібною до стійкого фокуса. Фазова траєкторія для всіх варіантів подібна також до фазової траєкторії двокомпонентної системи, яка складається з популяцій одноклітинних хижаків (*T. pyriformis*) та жертви (*E. coli*) в умовах культивування в хемостаті [25]. Не виключено, що досліджені нами коливання кількості клітин у субпопуляціях за відносним вмістом ДНК не є затухаючими, доки не вичерпаються запаси живильного середовища. І в цьому разі система становитиме граничний цикл або центр, або може виявитися схильною до біфуркацій з одного фокуса у два фокуси чи до утворення незвичайного атрактора [27]. Як видно з аналізу системи як двовимірної, вона для всіх варіантів вирощування дає схожі результати. Тому було зроблено спробу детальніше проаналізувати досліджені на пасажному рівні системи, використовуючи показники Ляпунова для тривимірного випадку з урахуванням тієї обставини, що системи рівнянь в [11], за допомогою яких було описано систему, мають три рівняння. Для цього ми визначали знаки показників Ляпунова, проводячи експоненти в графіках *a* та *б* (рис. 3–5), і враховували, динаміки яких субпопуляцій дають внесок у три основні потоки [12].

Аналіз дослідженої клітинної системи за характеристикою «відносний вміст ДНК в ядрі» для варіанта К-27(10С) показав, що на всьому часовому відрізку два показники Ляпунова є негативними, а третій дорівнює нулю, що означає: аттрактор є граничним циклом. Аналіз дослідженої системи за характеристикою «площа ядра» для цього варіанта показав, що на всьому часовому відрізку всі три показники Ляпунова є негативними, а це означає: аттрактор є стійким

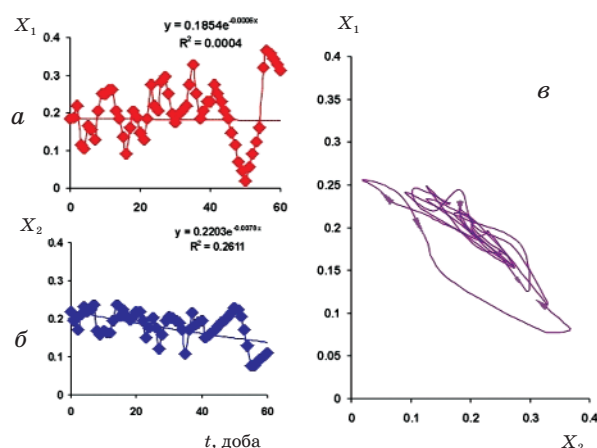


Рис. 3. Динаміка популяцій клітин зі вмістом ДНК в ядрі 1-2,99 С ( $X_1$ ) (а) і 3-6,99 С ( $X_2$ ) (б) за умов періодичного культивування на агаризованому середовищі 10 С — варіант К-27(10С) та фазова траєкторія системи (в)

для інтервалу вирощування 0–60 діб:

$X_1$  — 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) з урахуванням частки клітин у всій популяції. Наближення за допомогою експоненціальної залежності динаміки популяцій клітин, наведених на графіках *a* та *б*, показало, що квадрати відповідних коефіцієнтів кореляції  $R^2$  становлять 0,0004 та 0,2611. Значення критеріальної статистики для них: *a* —  $F_{1,59} = 0,059$ , *б* —  $F_{1,59} = 20,82$ , що перевищують значення верхньої 5% -ї межі F-розподілу для  $N = 59$  ( $F_{1,59} = 4,00$ ) у випадку *б*, означає наявність експоненційної залежності для популяції клітин  $X_2$

фокусом. З огляду на те, що на різних часових відрізках діють різні сили (задіяні різні субпопуляції), ми провели аналіз стійкості для кожної складової для кожного потоку. Клітинна система за характеристикою «відносний вміст ДНК в ядрі» на часовому відрізку, характерному для першої складової (0–30-, 0–30-, 0–20-та доба) кривої питомої швидкості накопичення біомаси, трахеїд та індолінових алкалоїдів (перша та друга складові потоків тут і далі визначалися за графіками, наведеними в [11, 12]), виявилась аттрактором, який являє собою стійкий фокус ( $\lambda_1 < 0$ ,  $\lambda_2 < 0$ ,  $\lambda_3 < 0$ ). Клітинна система на часовому відрізку, характерному для другої складової (30–40-, 30–40-, 20–40-ва доба) кривої потоків біомаси, трахеїд, індолінових алкалоїдів, виявилась аттрактором, який є стійким тором ( $\lambda_1 = 0$ ,  $\lambda_2 < 0$ ,  $\lambda_3 = 0$ ). Клітинна система за площею ядра на часовому відрізку, характерному для першої складової (0–30-, 0–30-, 0–20-та доба) кривої потоків біомаси, трахеїд та індолінових алкалоїдів, є аттрактором, який є стій-

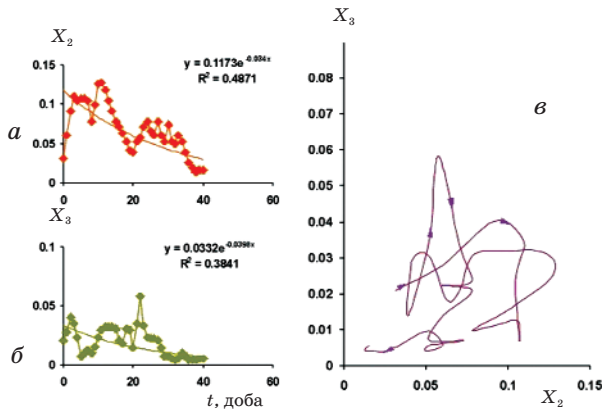


Рис. 4. Динаміка популяцій клітин із площею ядра  $12,0\text{--}16,99\text{ мкм}^2$  ( $X_2$ ) (а) і  $>17\text{ мкм}^2$  ( $X_3$ ) (б) за умов періодичного культивування на агаризованому середовищі 10С — варіант К-27(10С) та фазова траєкторія системи (в) для інтервалу вирощування 0–40 діб:

$X_2$  — частка клітин зі площею ядра  $12,0\text{--}16,99\text{ мкм}^2$  (перша субпопуляція),  $X_3$  — частка клітин із площею ядра  $>17\text{ мкм}^2$  (друга субпопуляція) з урахуванням частки клітин у всій популяції у системі  $X_2\text{--}X_3$ . Наближення за допомогою експоненціальної залежності динаміки популяцій клітин для всього інтервалу, наведених на графіках а та б, показало, що квадрати відповідних коефіцієнтів кореляції  $R^2$  становлять 0,4871 та 0,3841. Значення критеріальної статистики для них: а —  $F_{1,39} = 37,05$ , б —  $F_{1,39} = 24,34$ , що перевищують значення верхньої 5% -ї межі F-розподілу для  $N = 39$  ( $F_{1,39} = 4,08$ ), означає наявність експоненціальної залежності для популяції клітин  $X_2$  та  $X_3$ .  $X_2$  і  $X_3$  — осцилятори, що беруть участь у процесах, які відбуваються у перші 30 діб пасажу (табл. 1, 2)

ким фокусом ( $\lambda_1 < 0, \lambda_2 < 0, \lambda_3 < 0$ ). Клітинна система на часовому відрізку, характерному для другої складової (30–40-, 30–40-, 20–40-ва доба) кривої потоків біомаси, трахеїд та індолінових алкалоїдів, не є атрактором ( $\lambda_1 > 0, \lambda_2 > 0, \lambda_3 < 0$ ) (рис. 3–5, табл. 3). Це означає, що найбільш значущою характеристикою для збільшення навіть невеликої флуктуації є площа ядра, за потенційною поверхнею якої система клітин рухається до стоку (стійкий фокус) (рис. 2) на пасажному рівні за умов вирощування на агаризованому середовищі 10С — варіант К-27(10С).

За умов вирощування в рідкому середовищі — варіант К-27(Рж) утворюється стаціонарна система на пасажному рівні (табл. 3). На відміну від варіанта К-27(10С), клітинна система, перенесена із середовища 10С в рідке середовище Рж, вирощується в стресових умовах принаймні за двома показниками: глікемічний стрес і гідродинамічний стрес. Можливо, саме відсутність стаціонарності й

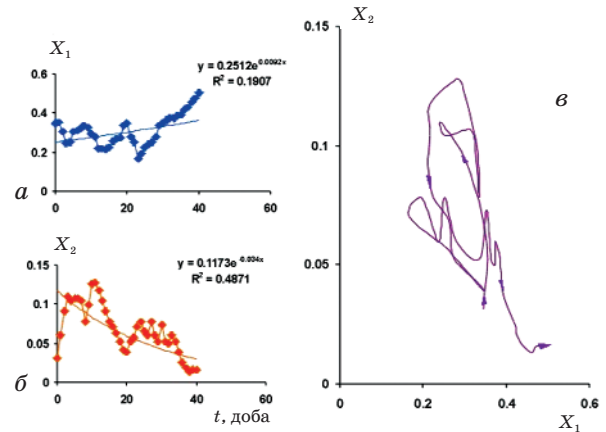


Рис. 5. Динаміка популяцій клітин із площею ядра  $<10,9\text{ мкм}^2$  ( $X_1$ ) (а) і  $12,0\text{--}16,99\text{ мкм}^2$  ( $X_2$ ) (б) за умов періодичного культивування на агаризованому середовищі 10С — варіант К-27(10С) та фазова траєкторія системи (в) для інтервалу вирощування 0–40 діб:

$X_1$  — частка клітин із площею ядра  $<10,9\text{ мкм}^2$  (перша субпопуляція),  $X_2$  — частка клітин із площею ядра  $12,0\text{--}16,99\text{ мкм}^2$  (друга субпопуляція) з урахуванням частки клітин у всій популяції. Наближення за допомогою експоненціальної залежності динаміки популяцій клітин для всього інтервалу, наведених на графіках а і б, показало, що квадрати відповідних коефіцієнтів кореляції  $R^2$  становлять 0,1907 та 0,3841. Значення критеріальної статистики для них: а —  $F_{1,39} = 9,2$ , б —  $F_{1,39} = 24,34$ , що перевищують значення верхньої 5% -ї межі F-розподілу для  $N = 39$  ( $F_{1,39} = 4,08$ ), це означає наявність експоненціальної залежності для популяції клітин  $X_1$  та  $X_2$ .  $X_1$  і  $X_2$  — осцилятори, що беруть участь у процесах, які відбуваються після 30-ї доби пасажу (табл. 1, 2)

те, що система не є атрактором на першому часовому відрізку — за показником ввДНК (нестійкий тор) і не є атрактором на другому відрізку — за площею ядра на пасажному рівні, призводить до фокального стоку для параметрів продуктивності (табл. 3, рис. 2).

### Гіпотеза керування динамікою клітинної системи *in vitro* на пасажному рівні за допомогою епігенетичної мережі

Існує припущення, що існування епігенетичної функціональної спадкової пам'яті уможливило реалізацію недарвінівської еволюційної стратегії, коли відносно невдалі кроки у спадковій пам'яті деяких організмів не «забуваються», і відповідні підпрограми зберігаються у вимкненому стані у функціональній спадковій пам'яті без виявлення в онтогенезі. За якісної зміни навколишнього середовища увімкнення цих підпрограм може забезпечити «вдалий крок» відносно нового середовища,



Таблиця 3. Типи особливих точок клітинної системи штаму K-27 *Rauwolfia serpentina* на пасажному рівні для різних умов вирощування

| Варіант    | Часовий інтервал (доба) | Динаміка кількісного складу клітин за характеристикою |                     | Показники Ляпунова для тривимірної системи за характеристикою |                                               |
|------------|-------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
|            |                         | відносний вміст ДНК в ядрі                            | площа ядерець       | відносний вміст ДНК в ядрі                                    | площа ядерець                                 |
| K-27 (10C) | 0-60                    | Граничний цикл                                        | Стійкий фокус       | $\lambda_1 < 0, \lambda_2 < 0, \lambda_3 = 0$                 | $\lambda_1 < 0, \lambda_2 < 0, \lambda_3 < 0$ |
|            | 0-30                    | Стійкий фокус                                         | Стійкий фокус       | $\lambda_1 < 0, \lambda_2 < 0, \lambda_3 < 0$                 | $\lambda_1 < 0, \lambda_2 < 0, \lambda_3 < 0$ |
|            | 0-30                    |                                                       |                     |                                                               |                                               |
|            | 0-20                    |                                                       |                     |                                                               |                                               |
|            | 0-20                    | Стійкий тор                                           | Не є атрактором     | $\lambda_1 = 0, \lambda_2 < 0, \lambda_3 = 0$                 | $\lambda_1 < 0, \lambda_2 > 0, \lambda_3 > 0$ |
|            | 30-40                   |                                                       |                     |                                                               |                                               |
| 30-40      |                         |                                                       |                     |                                                               |                                               |
| K-27 (5C)  | 0-40                    | Не є атрактором                                       | Не є атрактором     | $\lambda_1 > 0, \lambda_2 > 0, \lambda_3 < 0$                 | $\lambda_1 > 0, \lambda_2 > 0, \lambda_3 < 0$ |
| K-27 (Рж)  | 0-45                    | Стаціонарна система                                   | Стаціонарна система | $\lambda_1 = 0, \lambda_2 = 0, \lambda_3 = 0$                 | $\lambda_1 = 0, \lambda_2 = 0, \lambda_3 = 0$ |
|            | 0-20                    | Нестійкий тор                                         | Стаціонарна система | $\lambda_1 = 0, \lambda_2 > 0, \lambda_3 > 0$                 | $\lambda_1 = 0, \lambda_2 = 0, \lambda_3 = 0$ |
|            | 20-45                   | Граничний цикл                                        | Не є атрактором     | $\lambda_1 < 0, \lambda_2 < 0, \lambda_3 = 0$                 | $\lambda_1 < 0, \lambda_2 > 0, \lambda_3 > 0$ |

і навпаки. Таким чином, припускається існування додаткового еволюційного механізму, який спирається на виявлення функціональної спадкової пам'яті. Функціональна спадкова пам'ять складається з епігенів, і її призначення полягає в розширенні можливостей реакцій спадкової системи організму на фактори зовнішнього та внутрішнього середовища [30]. На користь цієї гіпотези свідчать також експериментальні дані про зміну морфогенетичного потенціалу рослин за умов їхнього культивування на модифікованих синтетичними регуляторами росту живильних середовищах [31].

У роботах [30, 32, 33] показано, що трансформовані мережі можна розглядати як функціональні епігенні мережі, елементами яких є динамічні епігени. Епігенні мережі можуть містити також модулі затримки, логічні комбінатори. Організація керування клітиною, спеціалізованою певним чином на молекулярних ієрархічних рівнях, може описуватися найпростішим способом за допомогою функціонального нестационарного п'ятикомпонентного епігена (рис. 6) [30]. Коли виникає система, яка має кілька типів тканин, керованих різними генними блоками  $m'$  [34, 35], до того ж, можливо, несинхронізованими, контексти тієї самої схеми, позначені літерами А-Е у комірках, матимуть інакший зміст на іншому ієрархічному рівні. Ми поставили завдання: перевірити цю гіпотезу.

Надамо інакший зміст молекулярним інтерпретаціям контекстів (тригери, осци-

лятори та логічні комбінатори), який відповідатиме рівню популяції клітин. Підставою для цього є експериментальні дані, опубліковані в роботах [11, 12]. Як видно з рисунків, наведених у цих роботах, питомі швидкості продуктивності за біомасою та продукуванням цільового продукту, а також кількісного складу трахеїд упродовж пасажу, є осциляторами, частота коливань яких є найповільнішою. З осциляторів, що мають вищу частоту коливань упродовж пасажу, внесок у повільніші коливання давали тільки осциляції кількості клітин за такими характеристиками, як відносний вміст ДНК в ядрі та площа ядерця (із семи перевірених характеристик, а саме: площа ядра, площа клітини, ввДНК в ядрі, площа ядра/площа клітини, ввДНК в ядрі/площа ядра, площа ядерця, площа ядерця/площа ядра) [11]).

На нашу думку, перехід від контексту «молекулярних реалізацій у клітині» до контексту «популяційних реалізацій у трикомпонентній системі клітин» у логічному комбінаторі у вигляді п'ятикомпонентної системи нестационарного епігена (рис. 6) є можливим з огляду на систему ідей Гудвіна на основі класифікації за часом релаксації [36, 37]. У даному разі цей епіген слід називати нестационарним функціональним епігеном. Конкретизація «популяційних реалізацій» для кожного варіанта умов вирощування виглядає так (конкретні характеристики осциляторів наведено в табл. 2).

Для варіанта К-27(10С) під час першої частини пасажу (у період росту й продукування вторинних метаболітів клітинами, вибраними експериментатором під час пересадження) осцилятор D з двопозиційного модуля пам'яті забезпечує осциляції кількості клітин, які продукують цільовий продукт (алкалоїди) (А), тоді як осцилятор Е — осциляції кількості клітин, які ростуть (С) або утворюють трахеїди (В). Це стосується осциляторів D та Е за обома значущими характеристиками («відносний вміст ДНК в ядрі» або «площа ядерця»). З переходом до другої частини пасажу (коли система закладає основу для майбутньої диференціації клітин та морфогенезу) осцилятор D забезпечує осциляції кількості клітин, які продукуватимуть цільовий продукт (А) та даватимуть стовбурові клітини (С), осцилятор Е — осциляції кількості клітин за характеристикою «відносний вміст ДНК в ядрі», які увійдуть у морфогенез, утворюючи трахеїди (В). За характеристикою «площа ядерця» осцилятор D забезпечує осциляції кількості клітин, які мають потенціал вступу в морфогенез (В) і утворюватимуть стовбурові клітини (С), осцилятор Е — осциляції кількості клітин, які продукуватимуть цільовий продукт (А).

Для варіанта вирощування в рідкому середовищі К-27(Рж) під час першої частини пасажу осцилятор D з двопозиційного модуля пам'яті забезпечує осциляції кількості клітин за характеристикою «відносний вміст ДНК в ядрі», які ростуть (С), тоді як осцилятор Е — осциляції кількості клітин, які продукують цільовий продукт (А) або трахеїди (В). За характеристикою «площа ядерця» осцилятор Е забезпечує осциляції кількості клітин усіх трьох типів. У разі переходу до другої частини пасажу осцилятор D забезпечує осциляції кількості клітин, які продукуватимуть цільовий продукт (А), осцилятор Е — осциляції кількості клітин, які увійдуть у морфогенез (В) або утворюватимуть стовбурові клітини (С), за обома значущими характеристиками («відносний вміст ДНК в ядрі» або «площа ядерця»).

Ситуація для умов вирощування варіанта К-27(5С) на всьому інтервалі є такою: осцилятор D забезпечує осциляції кількості клітин, які увійдуть у морфогенез (В) або утворюватимуть стовбурові клітини (С), осцилятор Е — осциляції кількості клітин, які продукуватимуть цільовий продукт (А), за обома значущими характеристиками.

Підсумовуючи викладене, слід зазначити, що дослідження, проведені на пасажному рівні показали, що мережа взаємодії популяційних осциляторів клітинної системи культури тка-

нин *Rauwolfia serpentina* Benth. у різних умовах вирощування визначається певною комбінацією осциляторів, яка описується схемою, аналогічною схемі п'ятикомпонентного нестационарного функціонального епігена, в якому введено такі позначення: А — осциляції кількості клітин, які продукуватимуть цільовий продукт; В — осциляції кількості клітин, які диференціюються, утворюючи трахеїди; С — осциляції кількості клітин, які формуватимуть стовбурові клітини; D — осциляції кількості клітин першої субпопуляції за однією з двох значущих характеристик («відносний вміст ДНК в ядрі» або «площа ядерця»), Е — осциляції кількості клітин другої субпопуляції за однією з цих двох характеристик (рис. 6). Конкретизація позначень для кожного з варіантів вирощування виглядає так.

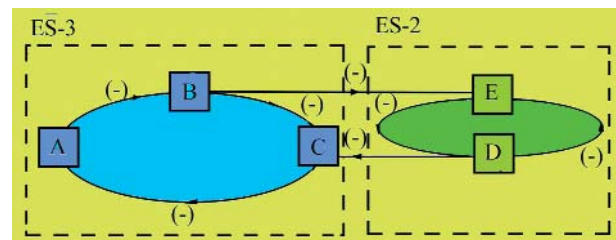


Рис. 6. Гіпотетична схема керування дослідженою системою клітин *in vitro* на пасажному рівні, яка являє собою функціональний п'ятикомпонентний нестационарний епіген

У найстійкішій своїй формі, за умов вирощування на агаризованому середовищі 10 С — варіант К-27(10С) — під час першої частини пасажу осцилятор D з двопозиційного модуля пам'яті забезпечує осциляції кількості клітин А, тоді як осцилятор Е — осциляції кількості клітин С та В. У цей час осцилятори задіяних субпопуляцій клітин за обома значущими характеристиками утворюють атрактор типу «стійкий фокус». У разі переходу до другої частини пасажу осцилятор D забезпечує осциляції кількості клітин А та С, осцилятор Е — осциляції кількості клітин В за характеристикою «відносний вміст ДНК в ядрі», що сприяє утворенню атрактора «стійкий тор». За характеристикою «площа ядерця» осцилятор D забезпечує осциляції кількості клітин В та С, осцилятор Е — осциляції кількості клітин А, при цьому осцилятори задіяних субпопуляцій клітин не утворюють атрактора.

У системі клітин, яка може існувати десятки пасажів — за умов вирощування на агаризованому середовищі 5С — варіант К-27 (5С) осцилятор D забезпечує осциляції кількості клітин В та С, осцилятор Е — осциляції кількості клітин А, за обома значущими характе-

ристиками, при цьому осцилятори даних субпопуляцій клітин не утворюють атракторів.

У системі клітин, призначеній для продукування алкалоїдів на збідненому за вмістом цукрози та мінеральних компонентів середовищі, за умов вирощування в рідкому середовищі Рж при перенесенні з 10 С — варіант К-27(Рж) — під час першої частини пасажу осцилятор D з двопозиційного модуля пам'яті забезпечує осциляції кількості клітин С, тоді як осцилятор Е — осциляції кількості клітин А та В за характеристикою «відносний вміст ДНК в ядрі», утворюючи «нестійкий тор». За характеристикою «площа ядерця» осцилятор Е забезпечує осциляції кількості клітин усіх трьох типів, перебуваючи у стані «стаціонарна система». З переходом до другої частини пасажу осцилятор D забезпечує осциляції кількості клітин А, ос-

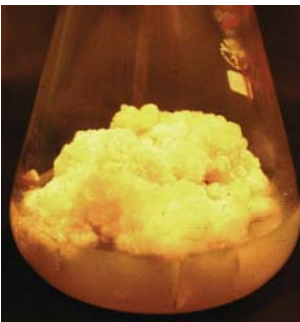
цилятор Е — осциляції кількості клітин В та С, за обома значущими характеристиками, причому за першою характеристикою осцилятори задіяних субпопуляцій клітин утворюють атрактор типу «граничний цикл», за другою — не утворюють атракторів.

Таким чином, надано математичне обґрунтування процесам, які відбуваються у клітинних популяціях *in vitro* у стабільних умовах вирощування та за їхньої зміни. Отримані результати свідчать, що застосовані біотехнологічні методи та прийоми збільшення продуктивності дослідженої культури тканин базуються на механізмах динамічної (або функціональної = структурної + динамічної) спадкової пам'яті, яка, імовірно, згідно з [30] є додатковим еволюційним механізмом формування спадкових програм онтогенезу.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Кунах В. А. Особенности митотического режима и роста клеток *Harporappus gracilis* в культуре *in vitro* // Цитология и генетика. — 1973. — Т. 7, № 6. — С. 510–513.
2. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. — К.: Логос, 2005. — 730 с.
3. Кунах В. А., Півень Н. М. Динамика циркадного ритма митозов в процессе формирования штаммов *Harporappus gracilis* в культуре *in vitro* // Цитология и генетика. — 1974. — Т. 8, № 6. — С. 492–496.
4. Кунах В. А. Механізми та деякі закономірності соматональної мінливості рослин // Вісн. Укр. тов. генет. селекц. — 2003. — № 1. — С. 101–106.
5. Lee M. The chromosomal basis of somaclonal variation // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. — 1988. — V. 39. — P. 413–437.
6. Николаева Л. А., Вахтин Ю. Б., Гужова И. В. и др. Поддерживающий отбор в культуре ткани *Rauwolfia serpentina* Benth. // ДАН УССР. — 1985. — № 7. — С. 73–75.
7. 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.
8. 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 // Биополимеры и клетка. — 2007. — Т. 23, № 2. — С. 86–92.
9. 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.
10. Кунах В. А., Можилевская Л. П., Губарь С. И. Особенности получения и продуктивность суспензионных клонов раувольфии змеиной *Rauwolfia serpentina* Benth. *in vitro* // Биотехнология (Москва). — 2001. — № 4. — С. 9–21.
11. 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.
12. Парникоза И. Ю., Мирюта 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.
13. Парникоза И. Ю., Мирюта Н. Ю., Адонін В. І., Кунах В. А. Циркадна динаміка структури клітинних популяцій *Rauwolfia serpentina* Benth. за різних умов культивування *in vitro* // Там само. — 2008. — Т. 24, № 6. — С. 476–486.
14. Парникоза И. Ю., Мирюта 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. тов. генет. селекціонерів. — 2008. — Т. 6, № 1. — С. 98–107.
15. 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.
  16. 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.).
  17. Каухова И. Е., Воллосович А. Г., Цыганков В. А. Выбор питательной среды для глубокого культивирования тканей раувольфии змеиной (*Rauwolfia serpentina* Benth.) // Растит. ресурсы. — 1981. — Т. 17, Вып. 2. — С. 217–224.
  18. Воллосович Н. Е., Воллосович А. Г., Ковалева Т. А. и др. Штаммы культуры ткани *Rauwolfia serpentina* Benth. и их продуктивность // Там же. — 1976. — Т. 12, Вып. 4. — С. 578–583.
  19. Губарь С. И., Константинова Е. П., Кунах В. А. Количественное определение индольных алкалоидов в культивируемых клетках раувольфии с использованием микроколоночной хроматографии // Биополимеры и клетка. — 1990. — Т. 6, № 5. — С. 78–80.
  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, Сиб. отделение, 1990. — 170 с.
  26. Эйген М., Шустер П. Гиперцикл (принципы самоорганизации макромолекул). — М.: Мир, 1982. — 270 с.
  27. Чалый А. В. Неравновесные процессы в физике и биологии. — К.: Наукова думка, 1997. — 183 с.
  28. Зотин А. И., Зотина Р. С. Термодинамический подход к проблемам развития, роста и старения // Журн. общ. биол. — 1969. — Т. 30, № 1. — С. 94–109.
  29. Зотина Р. С., Зотин А. И. Объединённые уравнения роста // Там же. — 1973. — Т. 34, № 4. — С. 606–616.
  30. Чураев Р. Н. Эпигенетика: генные и эпигенные сети в онто- и филогенезе // Генетика. — 2006. — Т. 42, № 9. — С. 1276–1296.
  31. Tsygankova V. A., Blume Ya. B. Screening and peculiarity of the biological action of synthetic plant growth regulators // Біополімери і клітина. — 1997. — Т. 13, № 6. — С. 484–492.
  32. Чураев Р. Н. Прикладные аспекты концепции эпигенов // Журн. общ. биол. — 1982. — Т. 43, № 1. — С. 79–87.
  33. 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.
  34. Тодоров И. Н. Механизмы клеточной стабильности // В мире науки. — 1986. — № 10. — С. 50–61.
  35. Тодоров И. Н., Бойков П. Я., Сидоренко Л. И. и др. Стимуляция репликации ДНК в клетках печени крыс как результат ингибирования синтеза белков // Докл. АН СССР. — 1978. — Т. 239 — С. 1255–1258.
  36. Гудвин Б. Временная организация клетки. — М.: Мир, 1966. — 251 с.
  37. Гудвин Б. Аналитическая физиология клеток и развивающихся организмов. — М.: Мир, 1979. — 287 с.



**ДИНАМИКА КЛЕТОЧНЫХ СИСТЕМ *in vitro*.  
II. ОРГАНИЗАЦИЯ ВО ВРЕМЕНИ  
И СТАБИЛЬНОСТЬ СИСТЕМЫ КУЛЬТУРЫ  
ТКАНЕЙ РАУВОЛЬФИИ ЗМЕИНОЙ  
НА ПАССАЖНОМ УРОВНЕ**

*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 колебаниями различных параметров клеточных систем, которые формируют клеточные линии, ткани или организм в целом не только на уровне процессов, имеющих суточную ритмику (суточный уровень организации), но и на уровне пассажных ритмов (пассажный уровень организации). Однако эти фундаментальные процессы изучены недостаточно.

На примере культуры тканей раувольфии змеиной исследована динамика клеточной системы на пассажном уровне, в частности ее организация во времени и устойчивость как системы. Для высокопродуктивного штамма К-27 *Rauwolfia serpentina* — продуцента противоракового алкалоида аймалина — исследованы фазовые траектории динамики показателей продуктивности (накопление биомассы и индолиновых алкалоидов), динамики показателя морфогенеза (трахеидных элементов), а также динамики частиц количества клеток с разным содержанием ДНК в ядре и разной площадью ядрышка в течение пассажа при изменении условий культивирования *in vitro*. Согласно полученным данным примененные биотехнологические приемы увеличения продуктивности исследованной культуры тканей раувольфии змеиной, в частности изменение условий культивирования на пассажном уровне, основаны на механизмах динамической наследственной памяти.

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

**DYNAMIC OF CELL POPULATION  
SYSTEMS *in vitro*.  
II. TEMPORAL ORGANIZATION AND  
ROBUSTNESS OF RAUWOLFIA SER-  
PENTINA BENTH CULTURE TISSUES  
SYSTEM  
AT PASSAGE 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*

A growth and development as a complete organism as a plant tissue culture have determined by different parameters oscillation of the cell system that formed culture lines, tissue or an organism as a whole not only at level processes with circadian rhythms (circadian organization level) but at level processes with passage rhythms during passage organization. However this basic processes have not been adequately explored.

Dynamic of cell population systems *in vitro* has been studied by the example of *Rauwolfia serpentina* Benth culture tissues at passage level, specifically temporal organization and robustness of this system. The phase trajectories of productivity indexes dynamics (biomass and indoline alkaloids accumulation), morphogenesis index dynamic (traheid elements dynamic), as well as dynamics of cell part with different DNA content in the nucleus and different nucleoli square at passage level under culturing condition variation for the high-productive *Rauwolfia serpentina* K-27 strain (ajmaline producer) were researched. The obtained results have indicated point of view that applied biotechnological methods of productivity increasing in the researched cell culture are based on dynamics hereditary memory.

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