

УДК 576.35:581.143.6

**ВПЛИВ ЗМІНИ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ  
НА ЦИРКАДНУ ДИНАМІКУ СТРУКТУРИ  
КЛІТИННИХ ПОПУЛЯЦІЙ  
*RAUWOLFIA SERPENTINA* BENTH. *IN VITRO***

І. Ю. ПАРНІКОЗА<sup>1</sup>, Н. Ю. МІРЮТА<sup>2</sup>, В. І. АДОНІН<sup>2</sup>, В. А КУНАХ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Київський національний університет імені Тараса Шевченка,  
Україна, 01033, м. Київ, вул. Володимирська, 64, *Parnikoza@gmail.com*;

<sup>2</sup> Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,  
Україна, 03143, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 150, *kunakh@imbg.org.ua*

*За допомогою термодинамічного підходу досліджено та описано залежності між динамікою часток клітин із різним вмістом ДНК в ядрі та площею ядерця, як біологічних потоків, та показників проліферації (мітозів та амітозів), які можуть виступати біологічними силами, на циркадному ієрархічному рівні за зміни умов культивування для високопродуктивного штаму K-27 *Rauwolfia serpentina* – продуцента протиаритмічного алкалоїду аймаліну.*

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

**Вступ.** У попередніх дослідженнях нами за допомогою термодинамічного підходу описано на пасажному рівні внесок субпопуляцій клітин з різним відносним вмістом ДНК в ядрі (ввДНК) та площею ядерця, як біологічних сил, у динаміку біологічних потоків – показників продуктивності у різних варіантах культивування штаму K-27 *Rauwolfia serpentina* Benth. – продуцента індолінових алкалоїдів [1, 2]. Динаміку досліджених субпопуляцій за ввДНК та показником синтетичної активності – площею ядерця ми описуємо на циркадному ієрархічному рівні як потоки, біологічними силами для яких може виступати динаміка проліферації. Метою цієї роботи є вивчення залежності між відповідними потоками і силами за зміни умов культивування штаму K-27 *R. serpentina*.

**Матеріали і методи**

Вивчали генетично стабільний протягом понад 15 років вирощування штам K-27 *R. serpentina* на агаризованому середовищі 10С (K-27(10С)), а також варіант його вирощування у рідкому середовищі Рж

© І. Ю. ПАРНІКОЗА, Н. Ю. МІРЮТА, В. І. АДОНІН, В. А КУНАХ, 2008

(К-27(Рж)) [3, 4]). Для аналізу ввДНК та проліфераційної активності через кожні 2 години протягом трьох днів (12–15-ї для К-27(10С), та 9–11-ї для К-27(Рж)), коли продукція індолінових алкалоїдів досягала максимальних значень, відбирали матеріал, який забарвлювали за Фольгеном (для аналізу ввДНК), а також ацетоорсеїном та імпрегнували нітратом срібла, як описано в [2, 5]. Аналіз ввДНК здійснювали згідно [2]. Частку мітозів (ЧМ) та амітозів (ЧАМ) отримували множенням вирахованого згідно з [5] відповідного індексу на 0,01. Між динаміками частки клітин з різним вмістом ввДНК та динаміками ЧМ та ЧАМ, згладжених за середнім змінним, шукали лінійні залежності за методом парної лінійної регресії за [6].

#### Результати та обговорення

В обох варіантах культивування на циркадному рівні використовували виділені на пасажному рівні дві субпопуляції клітин за ввДНК: 1,0–2,9С та 3,0–6,9С у К-27 (10С) і 1,0–2,9С та 3,0–8,9С у К-27 (Рж). У досліджених варіантах культивування на циркадному рівні також було виділено наступні субпопуляції клітин за площею ядерця: 12,0–16,9 мкм<sup>2</sup> та понад 17 мкм<sup>2</sup> у К-27 (10С) і понад 8 мкм<sup>2</sup> у К-27(Рж). Внесок динаміки частки проліферуючих клітин в динаміку окремих субпопуляцій за обома показниками в загальному вигляді відбиває система феноменологічних рівнянь:

$$I_1(t) - I_{1m}(t=m) = \sum_{s=m}^{m+36} \sum_{k=m} A_{1s} R_{1sk}(t+k) X_{sk}(t+k),$$

де для ввДНК:  $I_1(t)$  — потік клітин субпопуляції з ввДНК 1,0–2,9С,  $I_2(t)$  — з ввДНК 3,0–6,9С для К-27 (10С) або 3,0–8,9С для К-27 (Рж), ( $I_l(t)$ ,  $l=1,2$ ), а

для площі ядерця:  $I_1(t)$  — потік клітин субпопуляції з площею ядерця 12,0–16,9 мкм<sup>2</sup> для К-27 (10С) або потік субпопуляції менше 8 мкм<sup>2</sup> у К-27(Рж);  $I_2(t)$  — потік клітин субпопуляції понад 17 мкм<sup>2</sup> у К-27 (10С) або потік субпопуляції понад 8 мкм<sup>2</sup> у К-27(Рж); ( $I_l(t)$ ,  $l=1,2$ ); феноменологічні коефіцієнти (як і сили), мають складнішу структуру, ніж  $L_{1s} = R_{1sk} A_{1sk} (X_{1k}(t))$ ,  $s=1,2$  через урахування впливів попередніх значень сили на наступні значення потоку (див. позначення  $t, m, k$ ). Значення та знак коефіцієнта кореляції ( $R_{1sk}$ ) свідчить про внесок даної динаміки ЧМ та ЧАМ — сили  $X_1(t+k)$  або  $X_2(t+k)$  у відповідний потік  $I_1(t)$  або  $I_2(t)$ , ( $t$  — час,  $m$  — початкове значення  $t$  від початку пасажу, з якого розпочато відбір проб добової динаміки,  $k$  — кількість точок, на які проводиться зсув динаміки величини, яка є силою, відносно динаміки величини, яка є потоком, з метою урахування внесків попередніх значень біологічних сил у моменти часу  $t+m$  в потоки у моменти часу  $t+m+k$  (табл. 1, 2));  $A_{1s}$  — коефіцієнти адаптації, які вираховували із співставлення експериментальних значень динаміки субпопуляцій з такими, що розраховані з рівнянь, значення  $A_{1s}$  (табл. 3,4). Експериментальні значення динаміки потоків та їх значення, розраховані з рівнянь, наведено на рис. 1, 2.

У варіанті К-27 (10С) без зсуву в часі та із зсувом на дві — дванадцять годин динаміки частки проліферуючих клітин відносно динаміки частки субпопуляцій клітин з різним ввДНК встановлено позитивний внесок ЧМ та ЧАМ у зміну частки клітин з ввДНК 3,0–6,9С та негативний — у зміну частки клітин з ввДНК 1,0–2,9С (табл. 1).

У варіанті К-27 (Рж) без зсуву в часі та із зсувом на дві — шістнадцять годин вздовж осі  $t$  вправо спостерігали

**Таблиця 1.** Коефіцієнти кореляції  $R_{Isk}$  динаміки потоків (частки субпопуляцій клітин з відносним вмістом ДНК в ядрі 1,0–2,9С ( $I_1$ ) та 3,0–6,9С або 3,0–8,9С ( $I_2$ ) для умов культивування на агаризованому середовищі (К-27 (10С)) або глибинного вирощування (К-27 (Рж)) відповідно, а також сил (часток клітин, що проліферують за допомогою мітозу ( $X_{1k}$ ) або амітозу ( $X_{2k}$ )) із послідовними зсувами на  $k$  точок (щодві години) динаміки проліферації відносно динаміки частки субпопуляцій клітин з відповідним ввДНК в ядрі)

k	зсув, год.	К-27 (10С)				К-27 (Рж)			
		$I_1$ : 1,0–2,9	$I_2$ : 3,0–6,9	$I_1$ : 1,0–2,9	$I_2$ : 3,0–6,9	$I_1$ : 1,0–2,9	$I_2$ : 3,0–8,9	$I_1$ : 1,0–2,9	$I_2$ : 3,0–8,9
		$X_{1k}$ (MI)	$X_{1k}$ (MI)	$X_{2k}$ (AMI)	$X_{2k}$ (AMI)	$X_{1k}$ (MI)	$X_{1k}$ (MI)	$X_{2k}$ (AMI)	$X_{2k}$ (AMI)
		$R_{11k}$	$R_{21k}$	$R_{12k}$	$R_{22k}$	$R_{11k}$	$R_{21k}$	$R_{12k}$	$R_{22k}$
0	0	0	0,42	-0,40	0,49	0,42	0	0,53	0
1	2	0	0	-0,40	0,43	0	0	0,50	0
2	4	0	0	-0,47	0,41	0	0	0,52	0
3	6	0	0	-0,47	0,39	0	0	0,57	0
4	8	0	0	-0,44	0,37	0	0	0,56	0
5	10	-0,37	0	-0,52	0,42	0	0	0,63	0
6	12	-0,47	0	-0,50	0,37	0	0	0,69	-0,47
7	14	0	0	0	0	0	0	0,52	-0,49
8	16	0	0	0	0	0	0	0,38	0
9	18	0	0	0	0	0	0,41	0	0
10	20	0	0	0	0	0	0,41	0	0
11	22	0	-0,46	0	0	0	0	0	0
12	24	0	-0,70	0,49	-0,55	0	0	0	0
13	26	0	-0,43	0,53	-0,70	0	-0,60	-0,59	0
14	28	0	0	0	-0,58	0	-0,66	0	-0,49
15	30	0	0	0	0	0	0	0	0
16	32	0,63	-0,48	0	0	0	0	0	0
17	34	0,81	-0,71	0	0	0	0	0	0
18	36	0,61	-0,54	0	0	0	0	0	0
19	38	0	0	0	0	0	0	0	0
20	40	0	0	0,50	0	0	0	0	-0,60
21	42	0	0	0,55	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	0,82	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

позитивний внесок ЧМ та ЧАМ у зміну частки клітин з ввДНК 1,0–2,9С та негативний внесок ЧАМ (за відсутності кореляції з ЧМ) у зміну частки клітин субпопуляції 3,0–6,9С (табл. 1). Отже,

на дослідженому відрізку в обох варіантів культивування проліферативна активність, що випереджає на величину вищевказаного зсуву появу клітин певної субпопуляції, ймовірно визна-

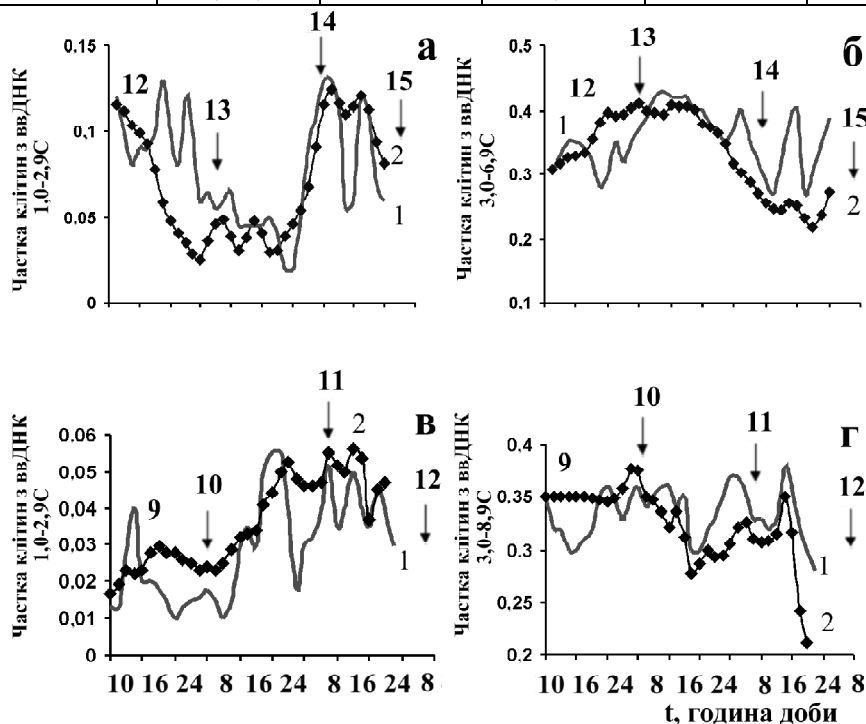
**Вплив зміни умов культивування на циркадну динаміку структури клітинних...**

**Таблиця 2.** Коефіцієнти кореляції  $R_{lSk}$  динаміки потоків (частки субпопуляцій клітин з площею ядра 12,0–16,9 або менше  $8 \text{ мкм}^2$  ( $l_1$ ) та понад 17 або понад  $8 \text{ мкм}^2$  ( $l_2$ ) для умов культивування на агаризованому середовищі (К-27 (10С)) або глибинного вирощування (К-27 (Рж)) відповідно, а також сил (часток клітин, що проліферують за допомогою мітозу ( $X_{1k}$ ) або амітозу ( $X_{2k}$ )) із послідовними зсувами на  $k$  точок (щодві години) динаміки проліферації відносно динаміки частки субпопуляцій клітин з відповідною площею ядра)

k	зсув, год.	К-27 (10С)				К-27 (Рж)			
		$l_1$ : 12,0–16,9	$l_2$ : >17	$l_1$ : 12,0–16,9	$l_2$ : >17	$l_1$ : <8	$l_2$ : >8	$l_1$ : <8	$l_2$ : >8
		$X_{1k}$ (MI)	$X_{1k}$ (MI)	$X_{2k}$ (AMI)	$X_{2k}$ (AMI)	$X_{1k}$ (MI)	$X_{1k}$ (MI)	$X_{2k}$ (AMI)	$X_{2k}$ (AMI)
		$R_{11k}$	$R_{21k}$	$R_{12k}$	$R_{22k}$	$R_{11k}$	$R_{21k}$	$R_{12k}$	$R_{22k}$
0	0	0	0,50	0	0	0	0,35	0	0
1	2	0	0	0	0	-0,39	0,42	0	0,36
2	4	0	0	0	0	0	0	-0,50	0,57
3	6	0	0	0	0	0	0	-0,59	0,62
4	8	0	0	0	0	0	0	-0,41	0,48
5	10	0	0,45	0	0	0,41	-0,38	0	0
6	12	0	0,38	0	0	0,46	-0,40	0	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	-0,48	0,41
10	20	0	0	0	0	0	0	-0,43	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	30	0	0	0	0	0	0	0	0
16	32	0	0	0	0	0	0	0	0
17	34	0	0	0,56	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	0,52	0	0	0	0	0,60	-0,64
21	42	0	0	0	0	0	0	0,72	-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	0,81	0,68	0	0	0	0
26	52	0	0	0,65	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	-0,91	0,92
32	64	0	0	0	0	0	0	0	0
33	66	0	0	0	0	0	0	0	0

**Таблиця 3.** Коефіцієнти адаптації  $A_{lSk}$  динаміки потоків (частки субпопуляцій клітин з відносним вмістом ДНК в ядрі 1,0–2,9С ( $I_1$ ) та 3,0–6,8С або 3,0–8,9С ( $I_2$ )) (для умов культивування на агаризованому середовищі 10С (К-27 (10С)) та глибинного вирощування у рідкому середовищі Рж (К-27 (Рж)) відповідно) та сил (індексів проліферації за допомогою мітозу ( $X_{1k}$ ) або амітозу ( $X_{2k}$ )) із послідовними зсувами на  $k$  точок (щодві години) динаміки проліферації відносно динаміки кількісного складу відповідної субпопуляції клітин за ввДНК в ядрі)

Варіант культивування	$I_l(l=1,2)$	$m$ (тчк)	$I_m(l=1,2)$	$X_{1k}$ (МІ)	$X_{2k}$ (АМІ)
				$A_{l1}$	$A_{l2}$
К-27 (10С)	1,0-2,9	144	0,12	2	2
	3,0-6,9	144	0,3	5	3
К-27 (Рж)	1,0-2,9	108	0,013	5	1
	3,0-8,9	108	0,35	60	1



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

чає появу клітин-попередниць саме цієї субпопуляції клітин, яка у досліджених варіантах культивування різна.

У варіанті К-27(10С), із зсувом динаміки проліфераційних індексів вздовж осі  $t$  вправо відносно динаміки

**Таблиця. 4.** Коефіцієнти адаптації  $A_{Isk}$  динаміки потоків (субпопуляцій клітин з площею ядерця  $l_1$  або менше  $8 \text{ мкм}^2$  ( $l_1$ ) та понад  $17 \text{ мкм}^2$  або понад  $8 \text{ мкм}^2$  ( $l_2$ )) (для умов культивування на агаризованому середовищі (К-27 (10С)) та глибинного вирощування (К-27 (Рж)) відповідно) та сил (часток клітин, що проліферують за допомогою мітозу ( $X_{1k}$ ) або амітозу ( $X_{2k}$ )) із послідовними зсувами на  $k$  точок щодві години динаміки проліферації відносно динаміки відповідної субпопуляції клітин за площею ядерця)

Варіант культивування	$l_i (i=1,2)$	$m$ (тчк)	$l_m (i=1,2)$	$X_{1k}$	$X_{2k}$
				(MI)	(AMI)
К-27 (10С)	12,0-16,9	144	0,02	15	0,3
	>17	144	0,001	0,1	0,05
К-27 (Рж)	<8	108	0,047	7	1,4
	>8	108	0,58	20	20

відповідних субпопуляцій частки клітин з різним ввДНК більше ніж на шістьнадцять годин, внески ЧМ та ЧАМ в зміну частки обох субпопуляцій клітин змінюються на протилежні: для субпопуляції 1,0–2,9С вони стають позитивними, а для 3,0–6,9С – негативними. У варіанті К-27(Рж) динаміка ЧМ та ЧАМ із зсувом вздовж осі  $t$  вправо відносно динаміки відповідних субпопуляцій за ввДНК мають як позитивні, так і негативні внески в зміну частки обох субпопуляцій клітин з різним ввДНК (табл. 1). Таким чином, за зміни умов культивування проліферація переключасться на продукцію клітин іншої субпопуляції (у даному випадку – з більшим вмістом ввДНК, тобто поліплоїдних клітин). При порівнянні варіантів культивування виявляється зміна часових проміжків, на яких динаміки біологічних сил – динаміки часток мітозів та амітозів роблять позитивний внесок в ту чи іншу субпопуляцію клітин за ввДНК в ядрі.

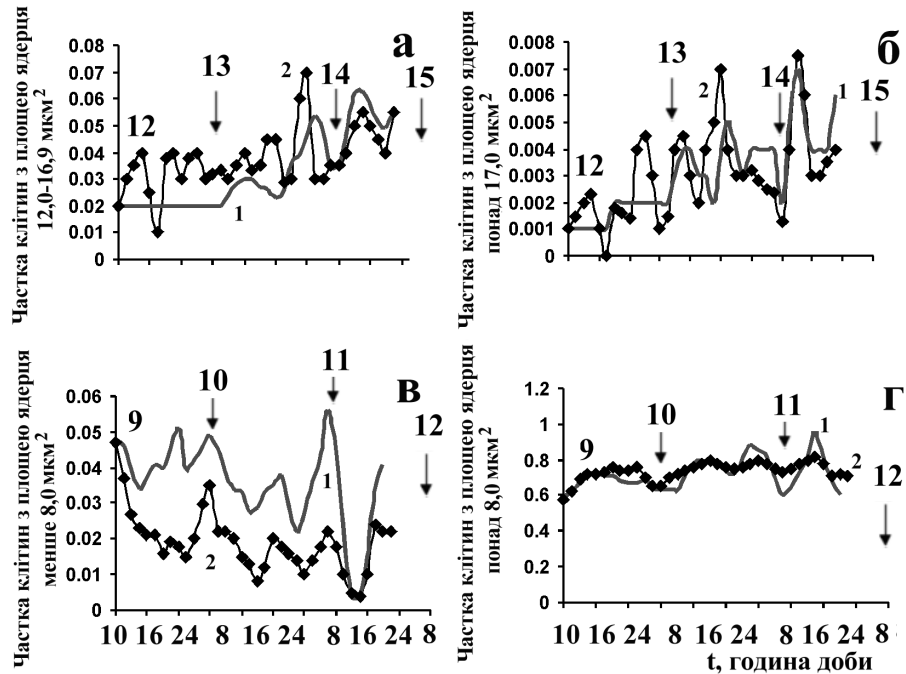
Порівняльний аналіз вирахованих з системи рівнянь коефіцієнтів адаптації  $A_{Is}$  (табл. 3) свідчить, що за зміни умов культивування  $A_{Is}$  при ЧМ зростає у 12 разів та  $A_{Is}$  при ЧАМ зменшується в 3 рази у рівнянні, яке описує потік клітин з високими значеннями ввДНК, які

значною мірою забезпечують потік накопичення індолінових алкалоїдів або утворення трахеїд для випадку глибинного культивування на пасажному ієрархічному рівні [2].

У варіанті К-27 (10С), без зсуву в часі та із зсувом на десять — дванадцять годин динаміки частки проліферуючих клітин відносно динаміки частки субпопуляцій клітин з високими значеннями площі ядерця, встановлено позитивний внесок ЧМ у зміну частки клітин з площею ядерця  $>17 \text{ мкм}^2$  (рис. 2).

У варіанті К-27 (Рж) без зсуву в часі та із зсувом на дві — вісім годин вздовж осі  $t$  вправо виявили позитивний внесок ЧМ та ЧАМ у зміну частки клітин з більшими значеннями площі ядерця та негативний внесок ЧМ при зсуві на десять — дванадцять годин (за відсутності кореляції з ЧАМ) у зміну частки клітин з більшими значеннями площі ядерця. Отже, на дослідженому відрізку часу в обох варіантах культивування проліферативна активність, що випереджає на величину вищевказаного зсуву появу клітин певної субпопуляції, ймовірно визначає появу клітин-попередниць домінуючої субпопуляції клітин за площею ядерця.

У варіанті К-27(10С), із зсувом динаміки проліфераційних індексів



**Рис. 2.** Динаміка зміни частки субпопуляцій клітин з площею ядра 12,0–16,9 мкм<sup>2</sup> (а) та понад 17,0 мкм<sup>2</sup> (б) у варіанта К-27(10С) протягом 12–15-ї діб культивування (1 — потік  $I(t)$ , визначений з експерименту; 2 — потік  $I(t)$ , визначений з рівняння,  $l=1,2$ ) і субпопуляцій клітин з площею ядра менше 8,0 мкм<sup>2</sup> (в) та більше 8,0 мкм<sup>2</sup> (г) у варіанта К-27(Рж) протягом 9–12-ї діб культивування (1 — потік  $I(t)$ , визначений з експерименту; 2 — потік  $I(t)$ , визначений з рівняння,  $l=1,2$ ) Всі дані згладжено за середнім змінним. Стрілками позначено початок відповідної доби росту

вдвох осі  $t$  вправо відносно динаміки відповідних субпопуляцій частки клітин з великими значеннями площі ядра більше ніж на шістнадцять годин, внески ЧМ та ЧАМ в зміну частки з великим значенням площі ядра залишались позитивними. У варіанті К-27(Рж) динаміка ЧАМ, із зсувом вздовж осі  $t$  вправо відносно динаміки відповідних субпопуляцій з великими значеннями площі ядра більше ніж на вісімнадцять годин, мають як позитивні, так і негативні внески в зміну частки клітин з великими значенням площі ядра. Таким чином, за зміни умов культивування проліферація переключається на продукцію субпопуляції клітин з більшими значеннями площі ядра за

допомогою внесків ЧАМ. При порівнянні варіантів культивування виявляється зміна знаків внесків у динаміку частки субпопуляції з більшими значеннями площі ядра динаміки біологічних сил – динаміки часток мітозів та амітозів.

Порівняльний аналіз вирахованих з системи рівнянь коефіцієнтів адаптації  $A_{IS}$  (табл. 4) свідчить, що за зміни умов культивування коефіцієнт  $A_{IS}$  для динаміки ЧМ збільшується у 1,3 раза та коефіцієнт  $A_{IS}$  для динаміки ЧАМ збільшується в 67 разів у рівнянні, яке описує потік клітин, що у варіанта К-27(10С) характеризуються площею ядра 12,0–16,9 мкм<sup>2</sup>, які переважно забезпечують потік накопичення індо-

лінових алкалоїдів, а у К-27(Рж) характеризуються площею ядерця понад 8 мкм<sup>2</sup>, які, власне, забезпечують потоки всіх показників продуктивності для випадку глибинного культивування на відрізьку першої складової пасажного ієрархічного рівня (субпопуляція клітин менше 8 мкм<sup>2</sup> починає робити внески в динаміку показників продуктивності та трахеїд лише на відрізьку другої складової пасажного ієрархічного рівня).

Опис за допомогою наведеної вище системи феноменологічних рівнянь дозволяє перейти до наочної схеми шляхів переходу клітинних субпопуляцій клітин за відносним вмістом ДНК та площею ядерця за допомогою різних цитологічних механізмів на циркадному рівні шляхом різних "часових каналів", що їх описують  $k_i$  та  $k_j$ , та їх подальшої долі на пасажному ієрархічному рівні динаміки структури клітинної популяції (рис. 3, 4).

На пасажному рівні у варіанті К-27(10С) диференціація клітинної популяції на дві субпопуляції за значенням ввДНК супроводжується розподілом між двома субпопуляціями за площею ядерця. При цьому субпопуляція клітин з ввДНК 3,0–6,9С та ядерцями площею понад 17 мкм<sup>2</sup> роблять позитивний внесок в динаміку питомої швидкості накопичення сухої біомаси та трахеїд, а клітини з ввДНК 1,0–2,9С та площею ядерця 12,0–16,9 мкм<sup>2</sup> робить внесок в динаміку питомої швидкості індолінових алкалоїдів. При цьому можна відмітити, що частина субпопуляції клітин з 3,0–6,9С ввДНК в процесі диференціації може набувати значень площі ядерця 12,0–16,9 мкм<sup>2</sup>, тому що робить позитивний внесок в динаміку питомої швидкості накопичення трахеїд на першій складовій росту.

У варіанті К-27(Рж) на першій складовій пасажу можна виділити субпопу-

ляцію клітин, що мають ввДНК 3,0–8,9С та площу ядерця понад 8 мкм<sup>2</sup>, які роблять позитивний внесок в динаміку питомої швидкості накопичення трахеїд та індолінових алкалоїдів. Клітини з ввДНК 1,0–2,9С та площею ядерця менше 8 мкм<sup>2</sup>, можливо, йдуть на поповнення субпопуляцій клітин, які починають робити внески у питому швидкість накопичення сухої біомаси та індолінових алкалоїдів тільки на другій складовій пасажу.

Таким чином, в процесі адаптації до зміни умов культивування зміна кількості клітин з певним ввДНК в ядрах супроводжується зміною кількості клітин з відповідною синтетичною активністю, яку відбиває показник площі ядерця.

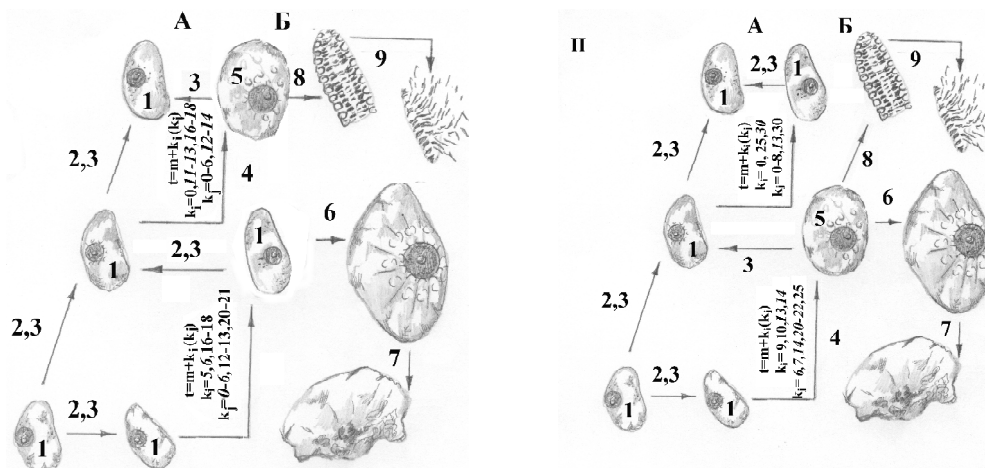
#### **Висновки**

1. Термодинамічний підхід дозволяє описати в культурі тканин циркадну залежність динаміки частки клітин з різним вмістом ДНК в ядрі (як біологічних потоків) від динаміки частки мітотично та амітотично проліферуючих клітин (як біологічних сил).

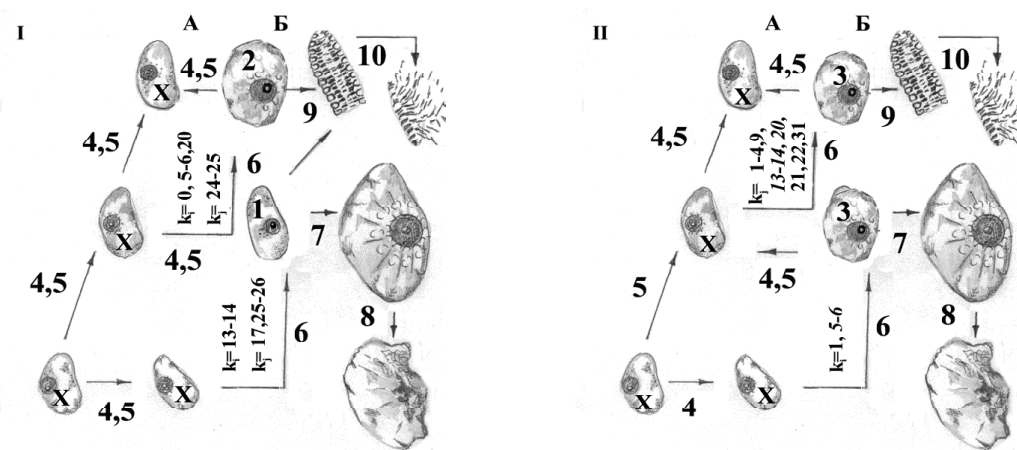
2. Перехід культури тканин *R. serpentina* до глибинного вирощування підвищує роль мітотичної проліферації в зростанні кількості клітин з майбутнім високим вмістом ДНК в ядрі. Це може свідчити про пріоритетність мітотичного проліфераційного механізму для продукції клітин, що згодом диференціюються шляхом поліплоїдизації та на пасажному ієрархічному рівні роблять позитивний внесок у потік накопичення індолінових алкалоїдів.

3. Реакцію культури тканин *R. serpentina* на перехід до глибинного вирощування також відображує адаптація обох проліферативних механізмів (невелике збільшення ролі мітотичної проліферації та значне підвищення ролі амітотичної проліферації) у продукцію клітин, які згодом характеризу-





**Рис. 3.** Схема гіпотетичних залежностей між біологічними силами та потоками на циркадному (А) та пасажному (Б) ієрархічному рівнях у варіанта культивування К-27(10С) (І) та К-27(Рж) *R. serpentina* (ІІ): клітини з ввДНК 1,0–2,9С (1), мітоз (2) та амітоз (3), ендоредуплікація/ендомітоз (4), клітини з ввДНК 3,0–6,9С (для К-27(10С)) та 3,0–8,9С (для К-27(Рж)) (5), диференціація клітин за шляхом накопичення вторинних метаболітів (6), руйнування старих диференційованих клітин (7), диференціація клітин за шляхом формування трахеїд (8), руйнування трахеїд (9);  $t+k_i(k_j)$  – часовий зсув ( $k_i$  – для мітозів,  $k_j$  – для амітозів), при якому спостігається залежність динаміки кількості клітин субпопуляції за ввДНК від динаміки кількості клітин відповідного виду від відповідного виду проліферації (для  $k_i$  та  $k_j$  курсивом позначено негативні кореляції, прямим шрифтом – позитивні).



**Рис. 4.** Схема гіпотетичних залежностей між біологічними силами та потоками на циркадному (А) та пасажному ієрархічному рівнях (Б) для варіантів культивування К-27(10С) (І) та К-27(Рж) *R. serpentina* (ІІ): Вихідні клітини, площа ядерця в яких невідома (X), клітини з ядерцем площею 12,0–16,9 мкм<sup>2</sup> (1), клітини з ядерцем площею понад 17 мкм<sup>2</sup> (2), клітини з ядерцем площею понад 8 мкм<sup>2</sup> (3), мітоз (4), амітоз (5), нарощення біосинтетичної активності (6), диференціація клітин за шляхом накопичення вторинних метаболітів (7), руйнування старих диференційованих клітин (8), диференціація клітин за шляхом формування трахеїд (9), руйнування трахеїд (10);  $t+k_i(k_j)$  – часовий зсув ( $k_i$  – для мітозів,  $k_j$  – для амітозів), при якому спостігається кореляція динаміки проліферації та відповідної субпопуляції клітин за площею ядерця (для  $k_i$  та  $k_j$  курсивом позначено негативні кореляції, прямим шрифтом – позитивні)

ються збільшеною площею ядра (понад 8 мкм<sup>2</sup>), що може відобразити підсилення біосинтетичних процесів у досліджуваній культурі тканин.

### Перелік літератури

1. Зотин А.И., Зотина Р.С. Термодинамический подход к проблемам развития, роста и старения // Журнал общей биологии. – 1969. – Т. 30, №1. – С. 94-109.
2. Мирюта Н. Ю., Парникоза И. Ю., Аль-Аммури Ю., Кунах В. А. Применение термодинамического подхода для изучения динамики клеточных популяций *in vitro* на примере культуры тканей *Rauwolfia serpentina* Benth. – продуцента индолиновых алкалоидов // Биотехнология. – 2006. – № 2. – С. 78-95.
3. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – Київ: Логос. – 2005. – 730 с.
4. Кунах В. А., Аль-Аммури Ю., Мирюта Н. Ю., Можилевская Л. П. Накопление индолиновых алкалоидов клеточными линиями раувольфии змеиной при поверхностном и глубинном выращивании // Биополимеры и клетка. – 2006. – Т. 22, № 2. – С. 149-156.
5. Парникоза І.Ю., Мирюта Н. Ю., Ал-Аммури Ю., Адонін В.І., Кунах В. А. Особливості процесів проліферації та диференціації в культурі тканин *Rauwolfia serpentina* Benth. // Вісн. Укр. тов. генетиків і селекціонерів. – 2006. – Т. 4, № 2. – С. 210-216.
6. Поллард Дж. Справочник по вычислительным методам статистики. – Москва: Финансы и статистика. – 1982. – 344 с.

### IN VITRO CULTIVATION CONDITION MODIFICATION EFFECT ON *RAUWOLFIA SERPENTINA* BENTH CIRCADIAN CELL POPULATION STRUCTURE

<sup>1</sup>J. Yu. Parnikoza, <sup>2</sup>N. Yu. Miriuta,  
<sup>2</sup>V. I Adonin, <sup>2</sup>V. A Kunakh

1. Taras Shevchenko Kyiv National University, Ukraine, 01033, Kyiv, Volodimirska st., 64, [Parnikoza@gmail.com](mailto:Parnikoza@gmail.com)

2. Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Zabolotnogo st., 150, [kunakh@imbg.org.ua](mailto:kunakh@imbg.org.ua)

Through the thermodynamic approach dependences between incidence of cells carrying various DNA content in nucleus, nucleoli area and proliferation rate (mitoses and amitoses) have been researched and described as biological fluxes (currents) and forces at the circadian hierarchic level upon changes in culture conditions as exemplified by the *Rauwolfia serpentina* K-27 strain – producent of the antiarrhythmic alkaloid ajmaline.

Key words: plant tissue culture, *Rauwolfia serpentina*, circadian cell population dynamics *in vitro*

### ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ЦИРКАДНУЮ ДИНАМИКУ СТРУКТУРЫ КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ *RAUWOLFIA SERPENTINA* BENTH. *IN VITRO*

И. Ю. Парникоза<sup>1</sup>, Н. Ю. Мирюта<sup>2</sup>,  
В. И. Адонин<sup>2</sup>, В. А. Кунах<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Украина 01033, г. Киев, ул. Владимирская, 64, [Parnikoza@gmail.com](mailto:Parnikoza@gmail.com);

<sup>2</sup> Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Украина, 03143, г. Киев, ул. Акад. Заболотного, 150, [kunakh@imbg.org.ua](mailto:kunakh@imbg.org.ua)

С помощью термодинамического подхода исследованы и описаны зависимости между динамикой частоты субпопуляций клеток с разным содержанием ДНК в ядре и площадью ядрышка, как биологических потоков, и показателей пролиферации (митозов и амитозов), которые могут выступать биологическими силами, на циркадном иерархическом уровне при изменении условий культивирования высокопродуктивного штамма K-27 *Rauwolfia serpentina* – продуцента противоярительного алкалоида аймалина.

Ключевые слова: культура тканей растений, *Rauwolfia serpentina*, циркадная динамика клеточных популяций *in vitro*.