

УДК: 612.017.2:611.018.2:595.123

ОБНАРУЖЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ВНУТРИСУТОЧНОГО РИТМА ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПАРЕНХИМЫ ПЛАНАРИЙ SCHMIDTEA MEDITERRANEA

Велеславский А.Н.¹, Ермаков А.М.², Крещенко Н.Д.¹

¹ФГБУН Институт биофизики клетки РАН;

²ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

Ключевые слова: внутрисуточный ритм, пролиферативная активность стволовые клетки, планарии schmidtea mediterranea.

Живой организм - сложная многочастотная и многоуровневая система, временная организация которой образуется спектром ритмических процессов, согласованных между собой. Ритмичность, лежащая в основе организации биологических систем, является фундаментальным свойством живой материи.

Физиологическое состояние организма характеризуется всем спектром биоритмов, имеющих между собой фазовые соответствия, что обеспечивает оптимальный режим функционирования [Комаров Ф.И., Рапопорт С.И., 2000]. Принцип фазовой синхронизации биоритмов наблюдается на всех уровнях интеграции биологических систем [Соколов В.Е., Кузнецов Г.В., 1978]. Однако при функционировании организма в физиологических условиях наблюдается определенная степень десинхронизации биологических ритмов, обеспечивающая более быструю адаптацию к изменяющимся условиям внешней среды [Баевский Р.М., 1979].

Взаимодействие биосистемы с разнообразными периодическими факторами внешней среды обеспечивает соответствующую адаптационную настройку биоритмов. Основными ритмогенными факторами внешней среды являются: естественные электромагнитные поля Земли (в том числе микропульсации ГМП и Шумановский резонанс), естественный радиационный фон, атмосферный инфразвук, освещенность (фотопериодизм), УФ излучение (~ 290 нм), метеофакторы (температура, атмосферное давление), космические корпускулярные излучения, гравитационные поля.

Экспериментально установлено, что из всего многообразия значимых периодических внешних факторов реальными "датчиками времени" биоритмов могут быть фотопериодика, вариации температуры и электромагнитного поля. Наиболее изученными являются суточные ритмы, которые обладают высокой чувствительностью к различным видам внешних воздействий, поэтому характеристика этих ритмов используется в качестве критерия нормы и адаптационных способностей организма. Вопрос о "датчиках времени" для внутрисуточных ритмов остается открытым. Исследователи сходятся во мнении, что реальными синхронизирующими факторами могут быть вариации естественных электромагнитных полей и других факторов в соответствующем диапазоне периодов. Причиной таких вариаций является сложная динамика взаимодействий в системе Земля-космическое пространство.

В настоящее время из-за методических трудностей отсутствуют строгие экспериментальные доказательства синхронизации биоритмов внешними физическими периодами. Один из подходов к решению данной проблемы заключается в поиске периодичностей в биосистемах и их сопоставлении с известными гео-, гелио- и космофизическими периодами. Сопоставление внутрисуточных биоритмов с космогеофизическими периодами затруднено вследствие недостаточности биоритмологических данных.

В связи с этим, нами проведен ряд экспериментов, задачей которых являлось исследование суточной динамики биологического процесса с целью обнаружения внутрисуточных периодов.

В качестве объекта исследования выбран процесс репродукции клеток, основная роль в котором принадлежит пролиферации и синтезу ДНК. Выбор данного биологического процесса обусловлен его особой значимостью. Изучение механизмов формирования ритма клеточной пролиферации необходимо для понимания жизненно важных процессов, таких как передача наследственной информации, морфогенез, рост и развитие организмов, физиологическая и репаративная регенерация органов и тканей, сохранение и восстановление тканевого гомеостаза. Нарушение пролиферативного биоритма является одним из первых признаков начинающихся отклонений в функционировании организма и возникновения заболеваний. Выяснение хронобиологических особенностей деления клеток позволяет выявить механизмы контроля пролиферации как внешними, так и внутренними факторами и осуществлять её направленную регуляцию, определяя закономерности патологического развития, в том числе

и злокачественных новообразований.

Учитывая тип исследуемого биологического процесса, в качестве опытного объекта выбрана бесполоя лабораторная раса плоских червей планарий *Schmidtea mediterranea*, важной особенностью которых является их способность к целостной регенерации. Кроме того, секвенированный геном планарий и высокая степень гомологии их белков, регулирующих жизненно важные процессы, с белками высших животных, в том числе и человека, представляют данный лабораторный объект как идеальную модель в исследованиях процессов, связанных с клеточной репродукцией.

Нами исследована суточная динамика пролиферативной активности стволовых клеток паренхимы планарий с целью обнаружения закономерностей внутрисуточной динамики клеточной пролиферации.

Все опыты проводились по установленной схеме: 1). Отбор и распределение животных по группам и временным суточным точкам в среде постоянного термостатирования; 2). Их содержание на протяжении 2-х суток с целью адаптации к условиям контроля и опыта; 3). Химическая фиксация животных каждые 2 часа на протяжении 3-х суток (всего 12 точек); 4). Оценка митотической активности, включающая применение иммуногистохимического метода с использованием первичных антител к p-Histone H3 (Ser-10) и фотосъемку с дальнейшим определением и усреднением соотношения количества митотически активных клеток к площади тела планарий. Статистическая обработка данных дисперсионным однофакторным анализом ANOVA (доверительные интервалы значений в точках фиксации рассчитаны с вероятностью 5 %).

Опыты проводились на протяжении двух лет в разное время года. В контрольных группах животные находились в режиме естественного освещения, в опытных - в темновом режиме. Обнаружен полиэкстремальный характер кривой внутрисуточной митотической активности стволовых клеток паренхимы, как в контрольных, так и в опытных группах. Кратностью проведенных экспериментов установлено, что полиэкстремальность кривой внутрисуточной митотической активности в контрольных группах носит случайный характер с очевидной десинхронизацией внутрисуточного ритма. В опытных же группах отмечен стойкий ритм динамики внутрисуточной пролиферативной активности с периодом около 4-6 часов, с пятью максимумами (около 0, 4, 10, 16, 20 часов) и столькими же минимумами (около 2, 6, 12, 18, 22 часов) независимо от времени года. Подобный характер внутрисуточной динамики других биологических процессов описан ранее [Глыбин Л.Я., 1992], [Клочек Н.В., 1993], [Темурьянц Н.А., Владимирский Б.М., 1992].

В последующих сериях экспериментов, целью которых стало исследование влияния экранирования геомагнитного поля и естественного радиационного фона на внутрисуточный ритм клеточной пролиферации, в качестве контроля использовались группы, содержащиеся в условиях темноты. В условиях экранирования естественного радиационного фона обнаружено повышение митотической активности стволовых клеток в ночное время (с 18 до 06 часов), при сохранении структуры внутрисуточного ритма. В условиях экранирования геомагнитного поля обнаружено повышение митотической активности стволовых клеток в дневное время (с 06 до 18 часов), при сохранении структуры внутрисуточного ритма.

С целью изучения роли эндогенных факторов в регуляции внутрисуточного ритма митотической активности проведен поиск clock-генов планарий в геномной базе данных SmedGD и NCBI по алгоритмам BLAST со сравнением гомологии с высшими животными и определением экспрессии этих генов (ПЦР в реальном времени) по четырем суточным точкам. Полученные данные требуют дальнейшего анализа.

В настоящее время нет общего мнения по ряду основных вопросов теории биоритмов. Существует несколько точек зрения на местоположение "биологических часов". Большинство исследователей предполагают, что периодические колебания морфофизиологических функций биосистемы обусловлены эндогенными факторами. Вопреки распространенному мнению, полученные результаты дают основание считать, что сутки характеризуются не только очевидным ритмом смены дня и ночи, но и сложно-периодическими спадами и подъемами пролиферативной активности биосистемы. Эта картина оказалась одинаковой в разные сезоны года, что позволяет предположить, что работа биологических часов жестко скоррелирована с каким-то ранее не учитываемым космофизическим фактором (факторами), не сводимым к положению Земли на околосолнечной орбите.

Таким образом, высказывается предположение о том, что обнаруженная закономерность сопряжена с вращением Земли вокруг своей оси (суточный ход) и не обусловлена экспозицией Земли относительно Солнца.

REVEALING AND STUDYING INTRA-DIURNAL RHYTHM OF PROLIFERATIVE ACTIVITY OF THE STEM CELLS OF PARENCHYMA PLANARI SCHMIDTEA MEDITERRANEA

Veleslavsky A.N., Yermakov A.M., Kreshchenko N.D.

Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences; FGBUN Institute for Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

Keywords: intradiurnal rhythm, proliferative activity, stem cells, planarii schmidtea mediterranea.