

НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА СВЕРХСЛАБЫХ ИЗЛУЧЕНИЙ (ССИ) ЯЙЦЕКЛЕТОК, ЗАРОДЫШЕЙ И КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

Л.В. Белоусов, И.В. Володяев

Лаборатория биофизики развития Биологического факультета Московского государственного университета

ВВЕДЕНИЕ

В настоящей работе мы описываем следующие свойства ССИ названных биообъектов, отличающие их от «обычных» световых потоков, в том числе от ССИ «неживого» фона:

(1) неаддитивность ССИ биообъектов: интенсивность ССИ части системы может быть больше интенсивности ССИ целой системы;

(2) в присутствии биообъектов значения ССИ могут принимать значения ниже фоновых, если за фон принимать излучение кварцевой кюветы или кюветы с питательной средой;

(3) наличие у биообъектов характерных Фурье-спектров в диапазонах $10^0 - 10^2 \text{ с}^{-1}$, порождаемых отдельными вспышками ССИ длительностью не более 10^{-3} с каждая.

Мы обсуждаем возможные физические основы и биологическое значение этих свойств. Наряду с этим, на примерах дробящихся яйцеклеток мы подтверждаем ранее полученные данные [1] о связи ССИ с клеточными делениями.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работу проводили в Международном институте биофизики (Нойсс, Германия). Объектами исследований были неоплодотворенные и оплодотворенные яйцеклетки и зародыши выюна (*Misgurnus fossilis* L.), шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis* Pall.), помещенные в кварцевые кюветы, а также монослойные культуры фибробластов линии СЗН10Т1/2 в количестве от 2 до 6×10^5 клеток, посеянные на вертикальную стенку кварцевой кюветы площадью $48 \times 22 \text{ мм}^2$. Кюветы были заполнены средой DMEM + HEPES pH 7,4. В ряде опытов в среду добавляли фактор роста фибробластов (FGF-1, 0,05 mg/ml), цитохалазин D (10 µg/ml), колхицин (10^{-4} М) или трипсин/ЭДТА (0,025%). Для измерений ССИ объекты помещали на 10-100 мин в камеру ФЭУ [2]. Счет фотонов проводили в сплошном спектральном диапазоне 200-800 нм. Использовали периоды накопления фотонов (пнф) от 10^{-3} с до 0,5с. Обработку данных проводили с использованием программ STATISTICA 5.0 и 6.0 и MATLAB. В настоящем сообщении приводятся также данные по ССИ различных компонентов куриных яиц [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Неаддитивность ССИ.

Такие данные были получены при сравнении ССИ: (1) целых куриных яиц и их скорлуп; (2) зародышей *X. laevis* на стадии нейрулы и их яйцевых оболочек; (3) различных количеств (от 5 до 35) зародышей *X. laevis* на стадии ранней хвостовой почки. У куриных яиц интенсивность ССИ желтков с зародышами не превышает 2% интенсивности ССИ изолированных скорлуп (Рис. 1А), а другие компоненты яйца не излучают. Поэтому, согласно обычной линейной логике, интенсивность ССИ целых яиц должна быть практически равной ССИ их скорлуп. Однако это справедливо только для неоплодотворенных яиц: у целых яиц с зародышами ранних сроков развития (до 2 дней) ССИ по большей части выше, а с зародышами 9 суток развития – ниже ССИ их свежее-изолированных скорлуп (Рис. 1Б). Таким образом, на 9 сутках ССИ части яйца (скорлупы) достоверно выше, чем у целого яйца. Аналогично, у *X. laevis* ССИ свежее-изолированных яйцевых оболочек выше ССИ зародышей как в оболочках, так и без оболочек (Рис. 1В).

У группы из 5 зародышей интенсивность ССИ несколько выше фона (Рис. 2А). При последовательном добавлении в ту же кювету по 10 зародышей суммарная интенсивность ССИ постепенно падала и для 35 зародышей выходила на уровень фона (Рис. 2Б). При последующем отбавлении по 10 зародышей интенсивность ССИ существенно не изменялась (Рис 2В).

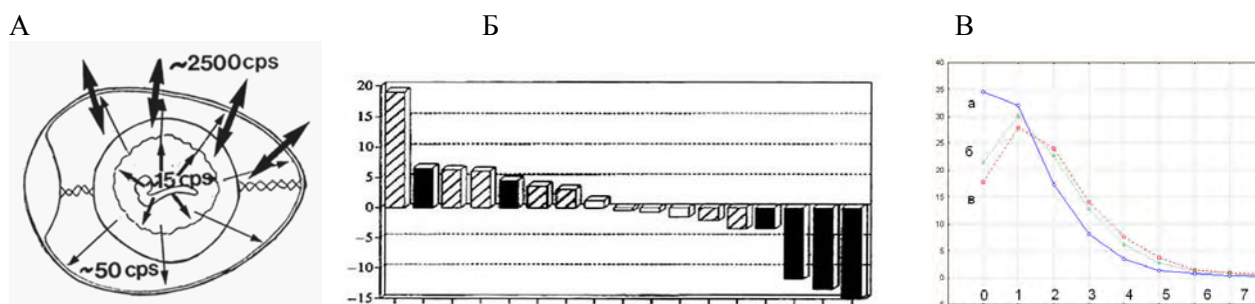


Рис. 1. Неаддитивность ССИ компонентов развивающихся яйцеклеток. А: излучатели куриного яйца. ССИ собственно зародыша 0-3 дней развития порядка 15, желтка – 50, скорлупы вместе с подскорлуповой оболочкой – 2500 имп/с. Б: разности интенсивностей ССИ целых интактных яиц и свежеизолированных скорлуп от этих же яиц у неоплодотворенных яиц (белые столбцы), яиц 2 суток (заштрихованные) и 9 суток развития (зачерненные столбцы). Ордината – тысячи импульсов при пнф=3 мин. Только у неоплодотворенных яиц разности между ССИ целых яиц и их скорлуп несущественны. У большинства развивающихся 2-дневных ССИ выше такового их изолированных скорлуп, а у 9-дневных яиц это соотношение по большей части обратное – ССИ скорлупы больше, чем у того же целого яйца. В: гистограммы ССИ зародышей *X.laevis* в своих оболочках (а), свежеизолированных оболочек (б) и зародышей без оболочек (в). Горизонтальная ось: импульсы за 0,1 с. Вертикальная ось – проценты. Видно, что процент нулевых импульсов у интактных зародышей в оболочках примерно вдвое больше такового как у оболочек, так и у зародышей без оболочек: каждый из компонентов излучает больше системы в целом.

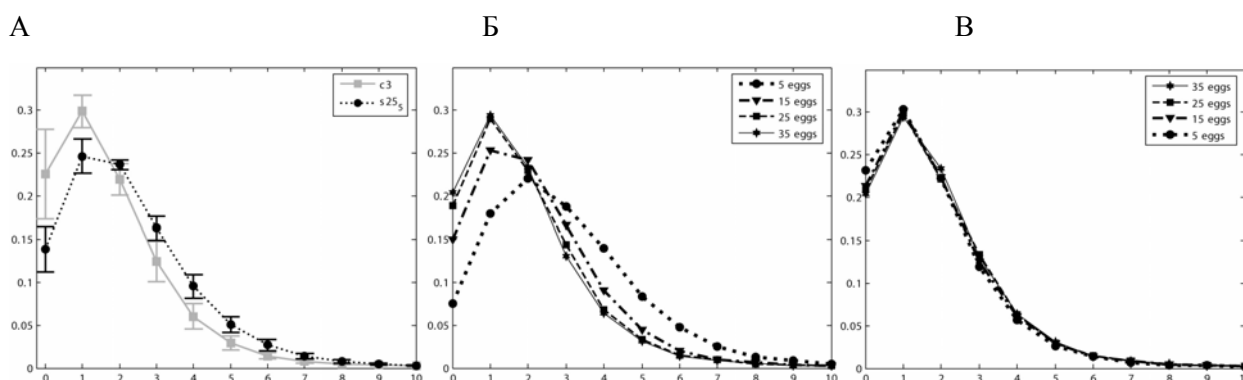


Рис. 2. Гистограммы ССИ групп из разного количества (5, 15, 25 и 35) зародышей *X.laevis* на стадии ранней хвостовой почки за пнф = 0,1с (абсциссы – количества импульсов, ординаты – доли от общего количества измерений). А: пунктир – 5 зародышей, сплошная серая линия – фон. Б: уменьшение интенсивности ССИ (возрастание значений 0 и 1 импульс/пнф и падение более высоких значений) при увеличении числа зародышей. В: последующее уменьшение числа зародышей от 35 до 5 не изменяет значений ССИ.

Соотношение интенсивностей ССИ биообъектов и их «неживого» окружения.

При пнф $\leq 0,1$ с частоты нулевых значений импульсов (I_0) в присутствии био-объектов были хотя и меньше, чем I_0 темного фона ФЭУ, но, как правило, больше I_0 «неживого окружения» биообъектов. За последнее в случае яйцеклеток и зародышей принимали кварцевые кюветы с водой, а в случае культур клеток – кюветы с питательными средами (Рис. 3). У *M. fossilis* I_0 была наименьшей у неоплодотворенных яйцеклеток, плавно возрастала по ходу развития и вновь падала или не изменялась на поздних стадиях (Рис. 4).

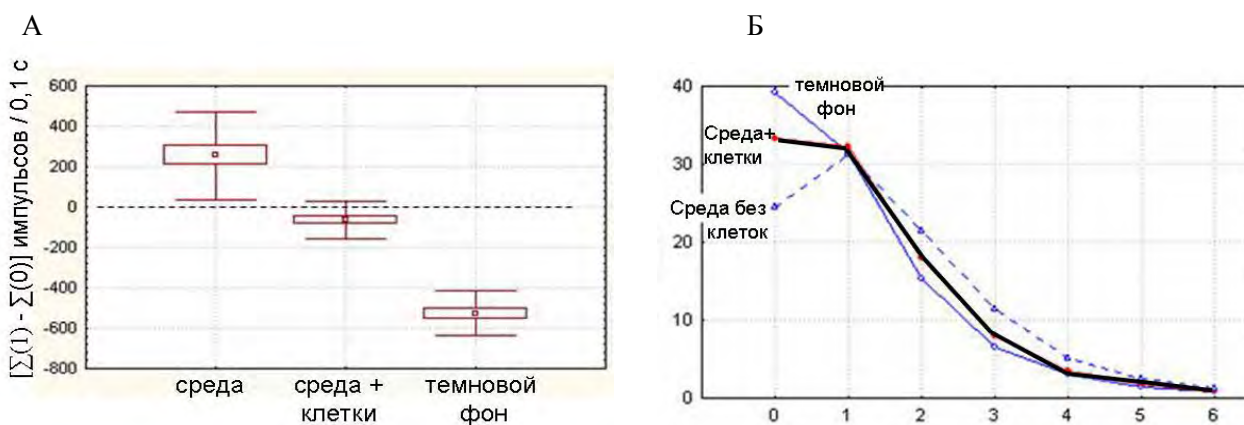


Рис. 3. Превышение частот нулевых значений ССИ в присутствии монослойных культур фибробластов над таковыми их неживого окружения (кюветы с питательной средой). А: разности между частотами регистрации 1 импульса и 0 импульсов при пнф 0,1 с (указаны доверительные интервалы и ошибки разности). Б: Гистограммы частот 0 – 6 импульсов/0,1 с для среды без клеток, среды с клетками и темнового фона ФЭУ. Ордината – проценты. Периоды регистрации везде 10 мин.

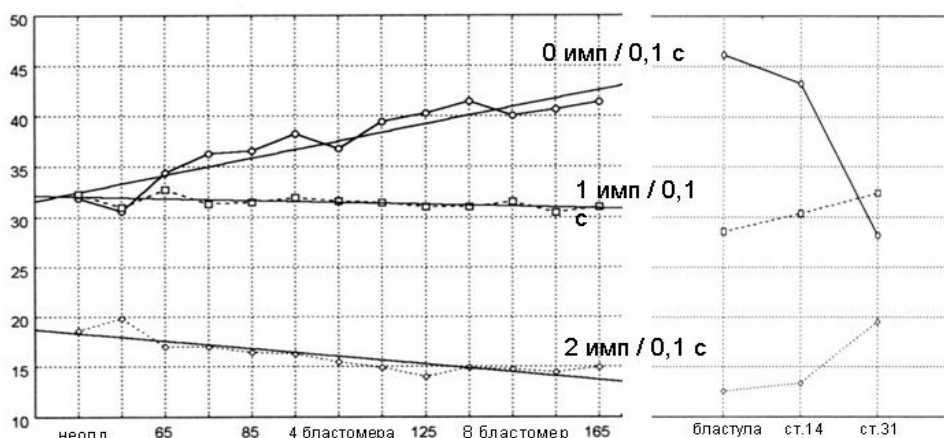


Рис. 4. Динамика 0, 1 и 2 имп / 0,1 с по ходу развития зародышей мыша. Горизонтальная ось – стадии или минуты от начала развития. До стадии бластулы процент нулевых значений возрастает почти в 1,5 раза, а затем убывает.

ССИ биообъектов состоят из всплесков длительностью не более 10^{-3} с каждая.

Такая оценка следует из того, что различия в количестве всплесков между биообъектом и фоном (оцениваемые по куртозисам) наиболее значимы при минимальном пнф = 10^{-3} с (Рис. 5А). При этом интенсивности отдельных всплесков были по порядку величин не ниже, чем при больших пнф. Таким образом, всплески являются одиночными, они друг с другом не суммируются. На клеточных культурах видно, что превышение числа всплесков в присутствии биообъектов над фоном наблюдается только при нормальной для данных биообъектов температуре (Рис. 5 Б, В). Следовательно, «вспышечный» характер ССИ биообъектов связан с их физиологической активностью.

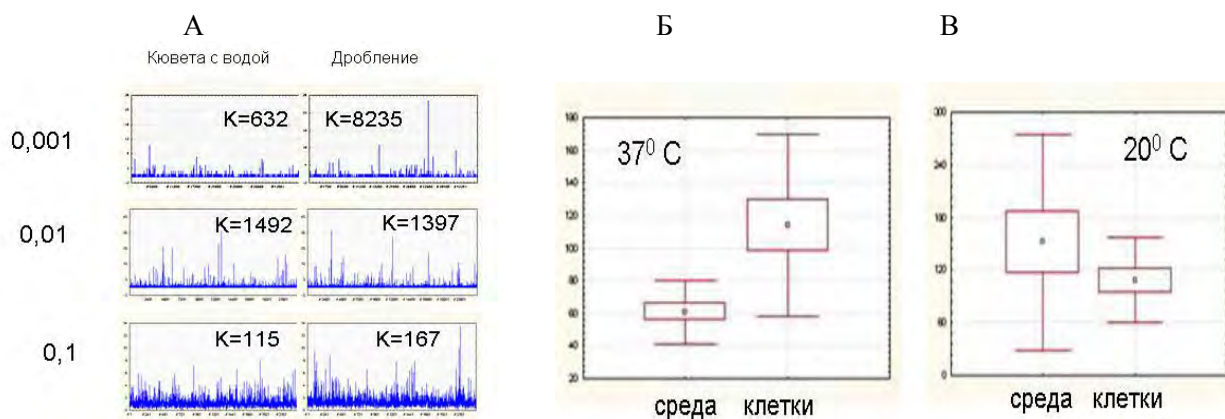


Рис. 5. Куртозисы как показатели «вспышечного» характера ССИ. А: величины куртозисов для фонового излучения (слева) и для дробящихся яйцеклеток выюна (справа) при различных пнф (доли секунды, показаны слева). Достоверное превышение куртозиса биообъектов над таковым фона регистрируется только при пнф = 10^{-3} с. Масштаб вертикальной шкалы один и тот же. Б: куртозисы среды без клеток и среды с культурой фибробластов при 37° С. В: то же при 20° С. В обоих случаях пнф = 0,1 с. Видно, что увеличение куртозиса в присутствии клеток связано с их физиологической активностью.

ССИ биообъектов имеют характерные частотно-амплитудные Фурье-спектры в диапазонах частот $10^0 - 10^2$ с⁻¹.

Хотя, как уже говорилось, ССИ биообъектов состоят из отдельных вспышек длительностью не более 10^{-3} с каждая, характерные Фурье-спектры начинают просматриваться лишь на значительно более низких частотах (Рис. 6).

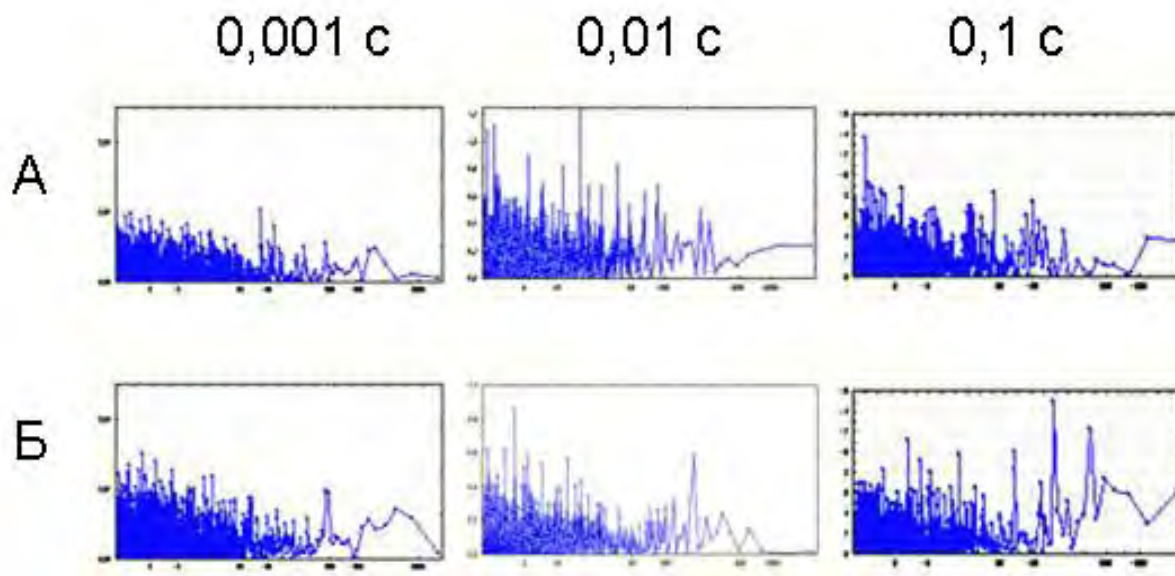


Рис. 6. Периодограммы Фурье-спектров фона (А) и дробящихся яйцеклеток выюна (Б) при значениях пнф, указанных сверху. Длительности записей составляют (слева направо) 10 с, 100 с и 1000 с $\approx$ 16 мин. Отчетливые спектральные максимумы при частотах несколько мин⁻¹ обнаруживаются только у биообъектов (Б при пнф = 0,1 с).

У зародышей выюна наблюдается отчетливая стадио-специфичность Фурье-спектров и их высокая внутренняя коррелированность, особенно на стадиях дробления (Рис.7).

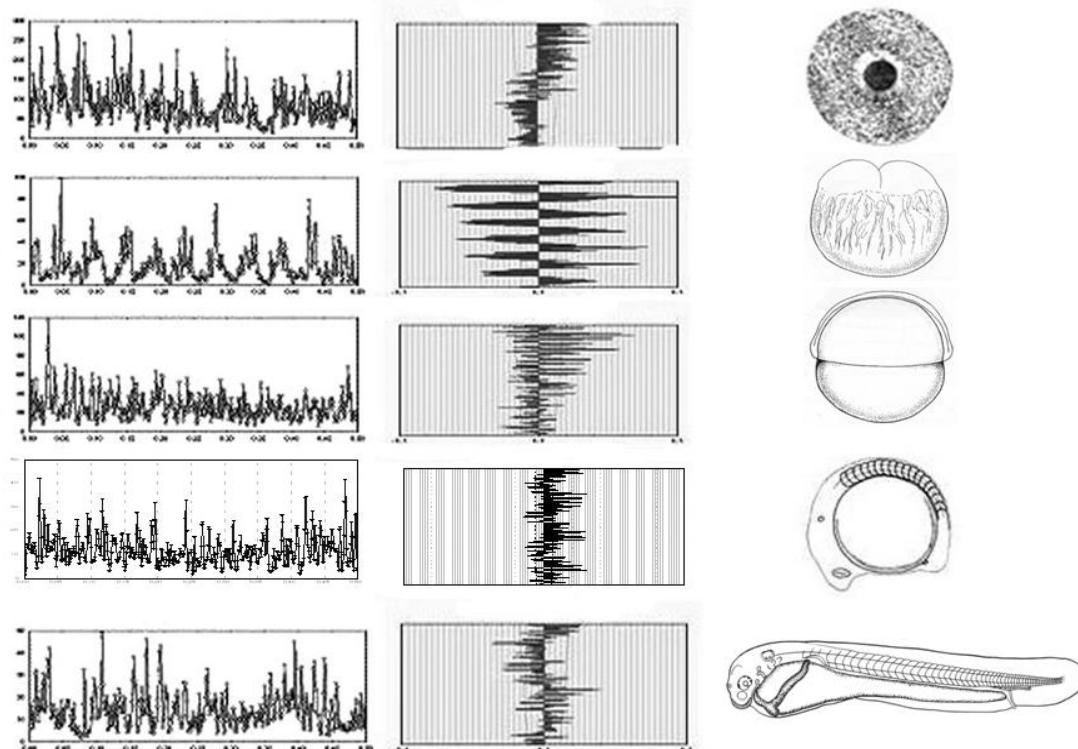


Рис. 7. Спектры Фурье (левая колонка, по абсциссам – частоты), их автокорреллограммы (средняя колонка) и соответствующие стадии развития зародышей выюна (правая колонка). Сверху вниз: неоплодотворенные яйцеклетки, начало дробления (1 ч после оплодотворения), завершение эпиболии, формирование сомитов и свободноплавающие личинки. Полная шкала частот равна 1 Hz. Из [4].

У клеточных культур характерные спектры Фурье в тех же частотных диапазонах выявляются и в отсутствие каких-либо специфических воздействий, но наиболее отчетливы они в первые минуты после воздействия либо специфического фактора (фактор роста фибробластов, FGF-1), либо агентов, действующих на цитоскелет и клеточные контакты (цитохалазин, колхицин, трипсин). При этом не только возрастают спектральные максимумы, но и возникает отчетливая автокорреляция внутри спектров, отсутствующая в интактных условиях. Иными словами, в спектрах появляются кратные между собой (гармонические) частоты (Рис. 8 В-З, 9 Б-Г).

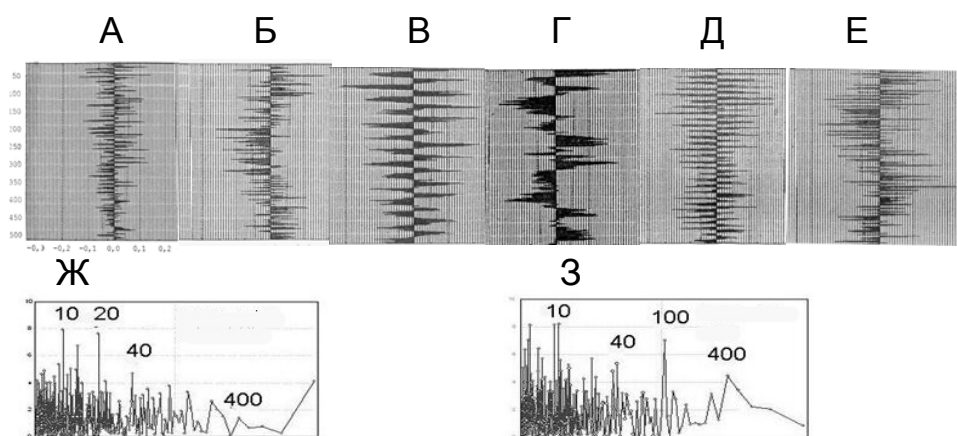


Рис. 8. Фурье-спектры культур фибробластов в зависимости от добавления FGF-1 . А-Е: автокорреллограммы Фурье-спектров за последовательные 10 мин промежутки времени до (А) и после добавления FGF-1. Ж, З: периодограммы Фурье-спектров до и через 30 мин после добавления FGF-1.

Обратите внимание на возрастание и кратность (гармоничность) низкочастотных спектральных максимумов.

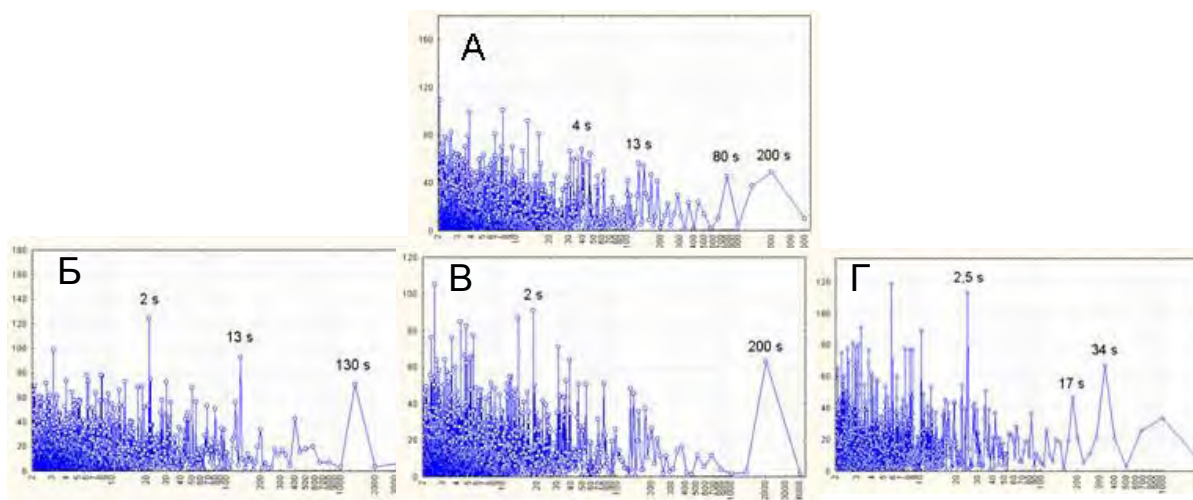


Рис. 9. Характерный Фурье-спектр интактной культуры фибробластов (А) и спектры в тех же масштабах через 7 мин после добавления цитохалазина D (Б), колхицина (В) и через 4 мин после добавления трипсина (Г). Во всех случаях появляются новые низкочастотные и как правило кратные между собой (гармоничные) спектральные максимумы.

Интенсивность ССИ повышается перед делениями дробления.

На дробящихся яйцеклетках выюна одновременно с регистрацией ССИ наблюдали за прохождением делений дробления в другой части той же кладки. Налицо отчетливое совпадение «каскадов» всплесков ССИ со временем прохождения первых трех делений (Рис. 10). Растяннутость каскада всплесков в случае 3-го деления (Рис. 10В) и наличие двух каскадов при 4-м делении (Рис. 10Г) объясняется их асинхронностью. На дробящихся яйцеклетках шпорцевой лягушки также отмечена корреляция ССИ с делениями дробления, хотя здесь наблюдаются дополнительные, не связанные с делениями колебания интенсивности ССИ (Рис. 10 Д, Е). Как правило (Рис. 10А, Б, Д, Е) подъемы интенсивности ССИ предшествуют клеточным делением, что отмечалось уже в [1].

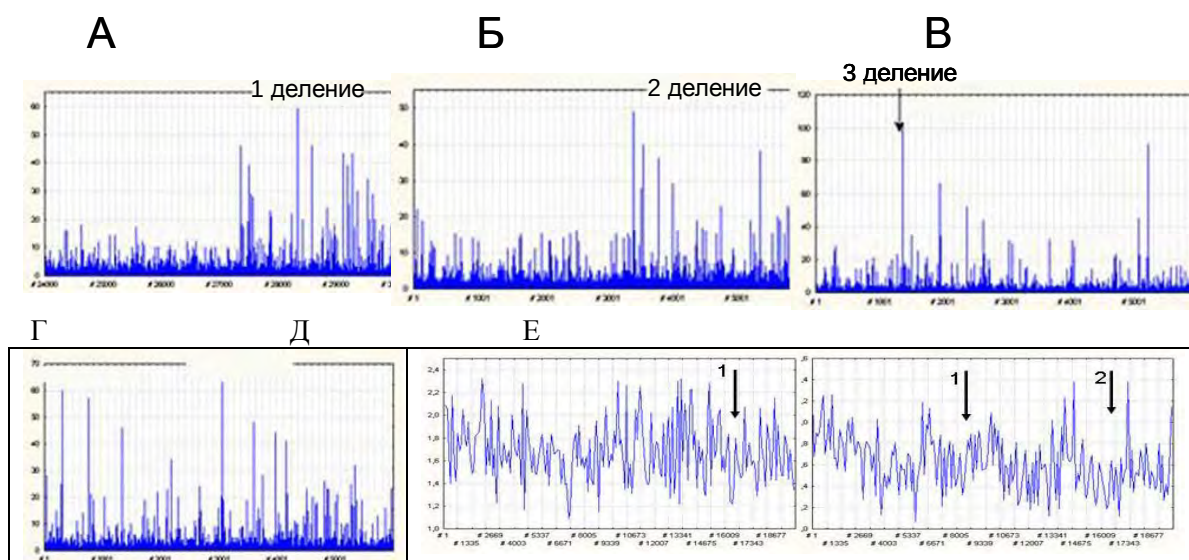


Рис. 10. Корреляция ССИ с делениями дробления у яйцеклеток выюна (А-Г) и шпорцевой лягушки (Д, Е). На кладке, соответствующей Г, отмечены две волны 4-х делений дробления. На Д, Е стрелки указывают времена 1 и 2 делений дробления в данных кладках. Везде ппф = 0,1 с. А-Г охватывают 10 мин промежутки времени, данные не агрегированы. Д, Е – 20 мин промежутки, данные агрегированы в 200 раз.

ОБСУЖДЕНИЕ

По-видимому, все описанные выше свойства ССИ могут иметь общую физическую природу. Как неаддитивность, так и феномен субфоновых значений ССИ указывает на то, что биообъекты способны не только излучать, но и поглощать фотонную энергию окружающих их излучателей. Подчеркнем, что речь идет не о пассивном поглощении (абсорбции), а об активном «захвате» энергии (photon sucking – всасывание фотонов, по терминологии Поппа [5]) – иначе нельзя объяснить ни немедленное повышение ССИ яйцевых оболочек после их изоляции от зародышей, ни падение ССИ ниже фона в присутствии биообъектов. Об этом же свидетельствует парадоксальное, на первый взгляд, снижение ССИ при возрастании количества биообъектов (это отмечалось ранее на дафниях [6]). Интересно, что этот эффект отсутствует в культурах раковых клеток [7]. С другой стороны, он описан на культурах бактерий [8] и образцах крови [9]. Согласно [5], «всасывание фотонов» объясняется взаимодействием когерентных излучателей.

Обнаружение в ССИ биообъектов выраженных и автокоррелированных (содержащих кратные максимумы) Фурье-спектров в диапазоне $10^0 - 10^2 \text{ с}^{-1}$ на основе отдельных всплесков длительностью не более 10^{-3} с также характерно для когерентных систем: в них возможно «сцепление мод», отстоящих друг от друга по шкале времени на несколько порядков [10]. В нашем случае речь идет не менее чем о 5 порядках (от 10^{-3} с до 10^2 с).

«Всасывание фотонов» и низкочастотные Фурье-спектры могут быть напрямую связаны (поскольку процесс «всасывания» может быть периодичным) и иметь важное биологическое значение [5]. «Всасывание фотонов» указывает на обмен световыми квантами или эквивалентными им порциями энергии между компонентами яйцеклеток (зародыши и яйцевые оболочки) или между отдельными зародышами внутри популяций. Фурье-спектры могут свидетельствовать о наличии характерных «частотных кодов» ССИ, без которых было бы непонятно, как столь слабые излучения могут играть сигнальную роль в «море» окружающего света. Отметим в связи с этим, что еще в [1] отмечалась прерывистость ССИ, а также возрастание их сигнальной эффективности при дополнительном наложении внешней периодичности.

Литература.

1. Гурвич, А.Г. и Гурвич, Л.Д. (1945). Митогенетическое излучение. Медгиз, М.
2. Mieg C., W.P.MeI and F.-A. Popp (1992). In: Recent Advances in Biophoton Research (F.-A. Popp, K.H.Li and Q. Gu eds) World Scientific Singapore etc pp. 197-206.
3. Белоусов, Л.В., Ф.-А. Попп и Н.И. Казакова (1997). Онтогенез 28: 377-388.
4. Beloussov, L.V. (2002) BioSystems 68: 199-212.
5. Popp, F.-A. and Klimek, W. (2006) In: Biophotonics and Coherent Systems in Biology (L.V. Beloussov, V.L. Voeikov and V.S. Martyniuk eds) Springer Verlag N.Y. pp. 17-32.
6. Galle, M. (1992). In: Recent Advances in Biophoton Research (F.-A. Popp, K.H.Li and Q. Gu eds) World Scientific Singapore etc pp. 345-355.
7. van Wijk, R. and H. van Aken (1992). In: Recent Advances in Biophoton Research (F.-A. Popp, K.H.Li and Q. Gu eds) World Scientific Singapore etc pp. 207-229.
8. Vogel, R., Süßmuth, R. (1998). Bioelectrochemistry and Bioenergetics 45: 93-101.
9. Novikov, C.N., Asfaramov, R., Vilenskaya, N.D., Bulgarina, Yu.S. and V.L.Voeikov (2000). In: Biophotonics and Coherent Systems (L.Beloussov, F.-A. Popp, V. Voeikov and R.v.Wijk eds) . Moscow University Press, Moscow pp. 321-334.
10. F.-A. Popp, L.V.Beloussov, W.Klimek, J.Swain, Yu Yan. In: Herbert Fröhlich FRS - A Physicist ahead of his time. (G J Hyland and P. Rowland, eds.). The University of Liverpool, 2006, pp.139-175.