

Метод вимірювання ЕП тканин інтактних листків ефективний для виявлення фізіологічних змін при дослідженні взаємодії вірусної інфекції з рослинами-хазяями в умовах модельованої мікрогравітації.

1. Бойко А. Л., Силаева А. М., Мищенко Л. Т., Решетник Г. В. Особливості ультраструктурної організації клітин мезофілу озимої пшениці за умов вірусної інфекції // Цитология и генетика.—1997.—31, № 5.—С. 71—78.
2. Колесник Л. В., Щербатенко І. С. Особливості інфекційного процесу і захисних реакцій у протоклонів тютюну, відібраних за стійкістю до вірусу тютюнової мозаїки // Доповіді Національної академії наук України.—2003.—№ 1.—С. 161—166.
3. Кордюм Е. Л., Сытник К. М., Белявская Н. А. и др. Современные проблемы космической клеточной фитобиологии. — М.: Наука, 1994.—293 с.
4. Мищенко Л. Т., Бойко А. Л., Чернок С. О. Вплив клинотатування на показники серологічного аналізу вірусу смугастої мозаїки пшениці в рослинах *Triticum aestivum* L. // Биополимеры и клетка.—1999.—15, № 4.—С. 319—323.
5. Мищенко Л. Т., Кюне Т., Мищенко И. А., Бойко А. Л. Инфекционный процесс вируса полосатой мозаики (ВПМП) в клинотатированных растениях пшеницы Апогей // Космична наука і технологія.—2003.—9, № 5/6.—С. 211—215.
6. Тороп В. В. Застосування електрометричних методів у садівництві // Проблеми моніторингу в садівництві. — К.: Аграрна наука, 2003.—С. 145—154.
7. Behrens H. M., Weisenseel M. H., Sievers A. Rapid changes in the pattern of electric current around the root tip of *Lepidium sativum* L. following gravistimulation // Plant Physiol.—1982.—70.—P. 1079—1083.
8. Fensom D. S. On electrical resistance in situ in higher plants // Canadian J. Plant Science.—1986.—46, N 2.—P. 169—175.
9. Harker F. R., Maindonald J. H. Changes in the cell wall, vacuole and membranes detected using electrical impedance

measurements // Plant physiology.—1990.—106, N 1.—P. 165—171.

10. Kordyum E. L. Biology of plant cells in microgravity and under clinostating // Int. Rev. Cytol.—1997.—171.—P. 1—78.
11. Kordyum E. L. Plant growth and development in microgravity // International conference on plant ontogenesis in natural and transformed environments, July 1—4. — Львів: СПОЛОМ.—1998.—P. 11—13.
12. Mishchenko L. T., Silayeva A. M. Effect of Clinostating on Physiological and Biochemical Characteristics of Wheat Plants Infected by the Streak Mosaic Virus of Wheat (SMVW) // Horticulture & Vegetable Crowing (Lithuania).—1998.—17, N 3.—P. 386—394.
13. Mishchenko L. T., Silayeva A. M., Boyko A. L. Effect of simulated microgravity on the virus-infected wheat plants // Abstracts 31st Scientific Assembly of COSPAR 14—21 July, 1996.—The University of Birmingham, England.—P. 385.
14. Purvis P., Chong C., Lumis G. P. Recirculation of nutrients in container nursery production // Canadian Journ. of plant science.—2000.—80.—P.39—45.
15. Wright K. M. Duncan G. H., et al. Analysis of the N gene hypersensitive response induced by a fluorescently tagged tobacco mosaic virus // Plant Physiology.—2000.—123.—P. 1375—1385.

CLINOROTATION EFFECTS ON VIRUS INFECTED WHEAT LEAF TISSUE ELECTRIC CONDUCTIVITY

L. T. Mishchenko, V. V. Torop, I. A. Mishchenko

We present our results on the electric conductivity of Apogee wheat leaf tissue infected with wheat streak mosaic virus and grown under simulated microgravity conditions. It is shown that the electric conductivity measurements may be effective in the detection of physiologic changes in plants caused by the impact of abiotic and biotic agents.

© Н. Ф. Гамалея, Е. Д. Шишко, О. Б. Горобец

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Е. Кавецького
НАН України, Київ

КЛЕТОЧНАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВЛИЯНИЯ ИЗМЕНЕННОЙ ГРАВИТАЦИИ НА ЦИРКАДИАННУЮ РИТМИКУ ЧЕЛОВЕКА

Однією з найважливіших медико-біологічних проблем, пов'язаних з космічними польотами людини, є порушення нормальної часової організації фізіологічних процесів в організмі космонавта: сну, ритмів «спокій-активність», температурної регуляції, метаболічного гомеостазу. Розробка шляхів запобігання цим несприятливим ефектам чи їхнього усунення вимагає фундаментальних досліджень, направлених на з'ясування характеру впливу факторів космічного польоту на хронобіологічну архітектоніку організму людини. Встановлено, що лімфоцити крові людини містять світлочутливий циркадіанний годинник, і культуру цих клітин можна використати як унікальну модель для досліджень впливу космічних факторів, зокрема зміненої гравітації, на циркадіанну (добову) ритміку людини.

Одной из наиболее серьезных медико-биологических проблем, возникающих в связи с пребыванием
204

человека в космосе, является нарушение нормальной временной структуры всех основных физиоло-

гических процессов в организме космонавта. Это приводит к развитию состояния так называемого десинхроноза, нарушению сна и ритмов «покой-активность» [13, 16, 21], температурной регуляции тела и метаболического гомеостаза [11, 20, 22]. Вследствие этого у человека ухудшается самочувствие и снижается работоспособность. Разработка путей предотвращения этих неблагоприятных эффектов или их устранения требует фундаментальных исследований, направленных на выяснение характера влияния космических факторов на хронобиологическую архитектуру организма человека. Естественно, что такие исследования были бы значительно облегчены, если бы существовала модель, позволяющая проводить биоритмологические эксперименты с клетками человека *in vitro*. Однако до сих пор подобные модели не были предложены.

Лимфоциты как легко доступные человеческие клетки неоднократно использовались в медико-биологических космических экспериментах для изучения эффектов микрогравитации на митогенную и антигенную активацию клеток [6—8, 10, 14, 23], их локомоторную активность [9, 17], процессы сигнальной трансдукции [14, 17]. Однако в космических экспериментах хронобиологического характера человеческие лимфоидные клетки до сих пор не использовались.

Нами разработана простая и доступная клеточная модель для изучения влияния измененной гравитации на циркадианную (суточную) ритмику человека. Модель основана на культивировании *in vitro* лимфоцитов, выделенных из периферической крови человека.

Материал и методы. Предложенный подход базируется на использовании иммунологической реакции взаимодействия эритроцитов с поверхностью лимфоидных клеток (т. н. реакция активного Е-розеткообразования Е-РОК) [15]. Кровь для исследований брали из локтевой вены здоровых доноров-добровольцев. Донорами были мужчины 20—35-летнего возраста. Лимфоциты из свежезятой гепаринизированной (20 ед/мл) крови выделяли центрифугированием на градиенте фиколл-верографин ($d = 1.077$), трижды отмывали от фиколл-верографина физиологическим раствором Хенкса pH = 7.2. Все процедуры выполняли в стерильных условиях с использованием стерильных растворов. Жизнеспособность выделенных лимфоцитов в тесте с трипановым синим составляла не менее 95 %. Лимфоциты культивировали при концентрации $2 \cdot 10^6$ клеток/мл в питательной среде RPMI-1640 без фенолового красного с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, 2 мМ L-глутамина и 80 мкг/мл гентамицина, при темпе-

ратуре $t = 37^\circ\text{C}$ в воздушной среде с 5 % CO_2 . Е-розеткообразующую активность лимфоцитов определяли на протяжении суток через каждые 4 часа: в 9, 13, 17, 21, 1 и 5 ч.

Методика постановки реакции активного Е-розеткообразования соответствовала ранее описанной [15]. Во всех выбранных временных точках суток реакцию ставили в трех повторностях. В каждом препарате анализировали по 1000 лимфоцитов и определяли долю розеткообразующих клеток. Таким образом, данные для каждой временной точки представляли собой результат подсчета 3000 лимфоцитов.

Для подтверждения наличия циркадианных ритмов полученные хронограммы анализировали статистически с применением парного *t*-теста Стьюдента.

В опытах по изучению влияния измененной гравитации на суточный ритм Е-розеткообразования лимфоцитов человека использовали горизонтальный клиностат со скоростью вращения 2-4 об./мин.

Результаты. Ранее нами было показано [1, 2], что Е-розеткообразующая активность лимфоцитов здоровых доноров закономерно изменяется на протяжении суток, причем максимум активности проявляется около полудня (13 ч), а минимум — в полночь (1 ч). Этот ритм Е-розеткообразования сохраняется у лимфоцитов и при культивировании *in vitro* на протяжении 10 суток (рис. 1). Кроме того, установлено, что циркадианные ритмы свежееизолированных лимфоцитов, содержащихся в течение суток в питательной среде при комнатной температуре или при $t = +4^\circ\text{C}$ и тестируемых через каждые 4 часа, были близки к суточным кривым Е-розеткообразования лимфоцитов при взятии крови у доноров 6 раз в течение суток в те же временные точки. Таким образом, лимфоциты человека оказались способными сохранять на протяжении 10 сут культивирования *in vitro* в темноте циркадианный ритм Е-розеткообразующей активности, характерный для них в организме человека (*in vivo*).

Механизмы отсчета времени («биологические часы») в многоклеточном организме считались ранее атрибутом только нервных структур. Однако в последние годы такие часы были найдены во многих периферических тканях и органах, полученных от животных различных классов и поддерживаемых в условиях культуры [4, 5, 12, 18]. Некоторые из этих часов оказались светочувствительными и могли «подводиться» светом [19, 24]. Однако на человека такие исследования не распространялись из-за отсутствия известных ритмических реакций, пригодных для наблюдения *in vitro*. Обнаруженное нами сохранение лимфоцитами человека *in vitro*

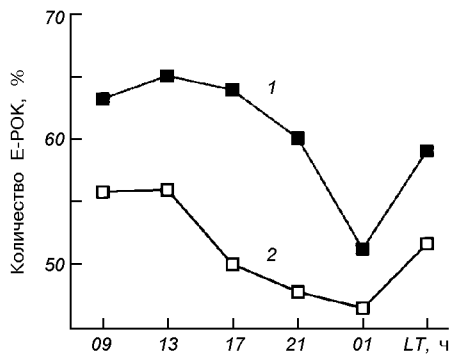


Рис. 1. Циркадианный ритм E-розеткообразующей активности лимфоцитов (E-РОК) после 10 сут культивирования в темноте: 1 — первые сутки, 2 — 11-е сутки

суточного ритма E-розеткообразующей активности свидетельствовало о том, что эти клетки содержат эндогенные циркадианные часы, и следовательно, могут служить адекватной моделью для хронобиологических исследований.

Представлялось вероятным, что время этих часов (т.е. фазы верхнего и нижнего экстремумов суточного ритма) устанавливалось в организме естественной сменой дня и ночи (циклами «свет-темнота»), тем более что в более ранних исследованиях [3] нами была показана высокая чувствительность лимфоцитов человека к видимому, в частности красному свету. (Известно, что до сосочкового слоя дермы кожи человека, в капиллярах которого может одновременно находиться около 1 л крови, доходит более 30 % красной составляющей солнечного спектра). В случае подтверждения этого предположения была возможность «перестановки» часов искусственными циклами освещения.

Для проверки этих представлений в дальнейших экспериментах культивировавшиеся клетки освещали через плоское дно культуральных флаконов проекционной лампой, свет которой подавался в термостат по фиброоптическому световоду. При этом использовали относительно монохроматический широкополосный свет, полученный с помощью сине-зеленого (полоса пропускания $\lambda\lambda = 400...570$ нм) или красного фильтров (излучение с длиной волны более 600 нм). Плотность мощности излучения составляла 0.5 Вт/м². Клетки культивировали при одном из двух противоположных режимов освещения: одни культуры освещались с 8 ч до 20 ч, другие — с 20 ч до 8 ч. В качестве контроля часть культур содержалась в постоянной темноте. В предварительных опытах мы определили, что для перевода часов необходимо культивировать клетки в течение 4-5 сут. Поэтому тестирова-

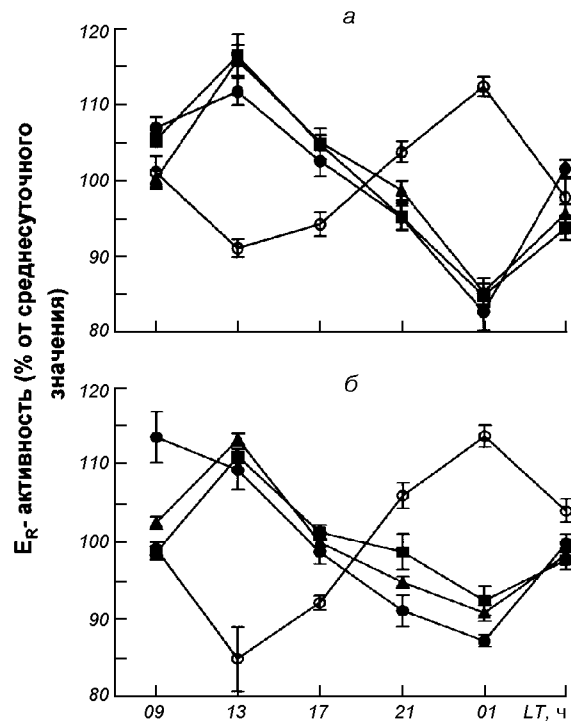


Рис. 2. Фотокоррекция циркадианных ритмов E-розеткообразующей активности лимфоцитов при периодическом освещении клеточных культур красным (а) и синим (б) светом (шестые сутки культивирования). Представлены данные, полученные на четырех донорах в четырех независимых экспериментах

ние циркадианных ритмов проводили после 5 сут культивирования.

Культивирование клеток при освещении красным или синим светом в дневное время суток, как и содержание их в постоянной темноте, существенно не изменяло характер исходного циркадианного ритма, т.е. того, каким он был в день взятия крови и выделения клеток. Напротив, освещение клеток в ночное время приводило к полной инверсии ритма со сдвигом пика розеткообразования с приблизительно полудня (13 ч) на полночь (1 ч) (рис. 2).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что циркадианные часы, содержащиеся в лимфоцитах крови человека, являются автономными (самоподдерживающимися) и светочувствительными.

Исходя из описанных результатов, представляло интерес выяснить, будут ли циркадианные часы лимфоцитов человека реагировать на условия невесомости при культивировании их *in vitro*. На данном (первом) этапе исследования были проведены эксперименты по трехсуточному культивированию в условиях измененной гравитации (в горизонталь-

ном клиноstate, 2—4 об./мин) лимфоцитов, выделенных из крови доноров. Контрольные клетки культивировались тот же срок в условиях нормальной гравитации.

Опыты показали, что измененная гравитация оказывала значительное влияние на жизнеспособность лимфоцитов в культуре. Так, если через сутки культивирования в клиноstate показатели гибели клеток не отличаются от контрольной культуры и составляют около 5 %, то уже через двое суток клиноstateирования жизнеспособной остается лишь половина клеточной популяции, а через трое суток все лимфоциты, культивировавшиеся в клиноstate, погибают.

Полученные в этих экспериментах результаты подтверждают данные других исследований о том, что в условиях измененной гравитации нарушается нормальная активность лимфоцитарных клеток, теряется их способность отвечать на воздействие митогенов, значительно усиливаются процессы апоптоза (программированной смерти) в культивируемых лимфоцитах [7, 10, 14, 23]. Одной из причин гибели лимфоцитов при клиноstateировании может являться перераспределение в клетке субклеточных структур (в первую очередь обладающих высокой удельной плотностью), а также вызванные этим нарушения в морфофункциональном состоянии цитоскелета.

В ходе дальнейших исследований влияния измененной гравитации на лимфоциты в культуре будет выяснено, как отражается на жизнеспособности и циркадианной ритмике клеток кратковременное клиноstateирование (например, в течение суток) с последующим культивированием их в условиях нормальной гравитации.

1. Гамалея Н. Ф., Шишко Е. Д. Первые данные о наличии фоточувствительных биологических часов в лимфоцитах крови человека // Доклады НАН Украины.—2001.—№ 6.—С. 181—185.
2. Гамалея Н. Ф., Шишко Е. Д., Косинская Н. П., Черный А. П. Суточные ритмы Е-розеткообразующей способности лимфоцитов человека // Иммунология.—1990.—№ 1.—С. 211—213.
3. Гамалея Н. Ф., Шишко Е. Д., Яниш Ю. В. Механизм лазерной биостимуляции — факты и гипотезы // Изв. АН СССР. Сер. физич.—1986.—№ 3.—С. 1027—1032.
4. Balsalobre A., Damiola F., Schibler U. A serum shock induced circadian gene expression in mammalian tissue culture cells // Cell.—1998.—93.—P. 929—937.
5. Brown S. A., Schibler U. The ins and outs of circadian timekeeping // Curr. Opin. Genet. Dev.—1999.—9.—P. 588—594.
6. Cogoli A. The effect of hypogravity and hypergravity on cells of the immune system // J. Leukoc. Biol.—1993.—54 (3).—P. 259—268.
7. Cogoli A., Cogoli-Greuter M. Activation and proliferation of lymphocytes and other mammalian cells in microgravity // Adv.

- Space Biol. Med.—1997.—6.—P. 33—79.
8. Cogoli A., Tschopp A., Fuchs-Bislin P. Cell sensitivity to gravity // Science.—1984.—225, N 4658.—P. 228—230.
9. Cogoli-Greuter M., Meloni M. A., Sciola L., et al. Movement and interactions of leukocytes in microgravity // J. Biotechnol.—1996.—47 (2-3).—P. 279—287.
10. Cooper D., Pride M. W., Brown E. I., et al. Suppression of antigen-specific lymphocyte activation in modeled microgravity // In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal.—2001.—37 (2).—P. 63—65.
11. Fuller C. A., Hoban-Higgins T. M., Klimovitsky V. Y., et al. Primate circadian rhythms during spaceflight: results from Cosmos 2044 and 2229 // J. Appl. Physiol.—1996.—81 (1).—P. 188—193.
12. Giebultowicz J. M. Molecular mechanism and cellular distribution of insect circadian clocks // Annu. Rev. Entomol.—2000.—45.—P. 769—793.
13. Gundel A., Polyakov V. V., Zully J. The alteration of human sleep and circadian rhythms during spaceflight // J. Sleep Res.—1997.—6 (1).—P. 1—8.
14. Hashemi B. B., Penkala J. E., Vens C., et al. T cell activation responses are differentially regulated during clinorotation and in space flight // FASEB J.—1999.—13.—P. 2071—2082.
15. Immunologische Arbeitsmethoden (ed. by H. Friemel). — Jena: VEB Gustav Fischer Verlag, 1984.
16. Monk T. H., Buysse D. J., Billy B. D., et al. Sleep and circadian rhythms in four orbiting astronauts // J. Biol. Rhythms.—1998.—13 (3).—P. 188—201.
17. Pellis N. R., Goodwin T. J., Risin D., et al. Changes in gravity inhibit lymphocyte locomotion through type I collagen // In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.—1997.—33 (5).—P. 398—405.
18. Pennisi E. Multiple clocks keep time in fruit fly tissues // Science.—1997.—278.—P. 1560—1561.
19. Plautz J. D., Kaneko M., Hall J. C., et al. Independent photoreceptive circadian clocks throughout Drosophila // Science.—1997.—278.—P. 1632—1635.
20. Robinson E. L., Fuller C. A. Gravity and thermoregulation: metabolic changes and circadian rhythms // Pflugers Arch.—2000.—441 (2-3 Suppl).—P. 32—38.
21. Stampi C. Sleep and circadian rhythm in space // J. Clin. Pharmacol.—1994.—34 (5).—P. 518—534.
22. Vernikos J. Human physiology in space // Bioessays.—1996.—18 (12).—P. 1029—1037.
23. Walther I., Pippia P., Meloni M. A., et al. Simulated microgravity inhibits the genetic expression of interleukin-2 and its receptor in mitogen-activated T lymphocytes // FEBS Lett.—1998.—436 (1).—P. 115—118.
24. Whitmore D., Foulkes N. S., Sassone-Corsi P. Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock // Nature.—2000.—404.—P. 87—91.

A CELL MODEL FOR THE STUDY OF ALTERED GRAVITATION EFFECTS ON HUMAN CIRCADIAN RHYTHMICITY

N. F. Gamaleia, E. D. Shishko, O. B. Horobets

One of the most important problems associated with manned space flights is the alteration of normal temporal physiology in an astronaut's organism. This necessitates the investigation of space-environment effects on human chronobiological architectonics as a basis for elaboration of countermeasure strategies. We developed a new cell model. It is established that human blood lymphocytes contain a photosensitive circadian clock and the culture of those cells may be used for the study of the influence of space factors (especially, microgravity) on circadian rhythms in human organism.