

Доклад

На внутреннем семинаре ИПФ РАН 22 апреля 2004 г.

Кутис И.С. - докладчик

Исследование влияния фемтосекунднокоррелированного излучения с длиной волны 1300 нм на семена ячменя сорта «Зазерский-85»

Начну с комментария запроса поисковых слов - «стволовые клетки» в Интернет на поисковой машине АПОРТ. Прямо сейчас компьютер АПОРТ выдает 1800 сайтов, бурно обсуждающих огромные перспективы применения эмбриональных стволовых клеток в практической медицине. Несколько важных пояснений о том, что это такое.

Термин "стволовая клетка" был введен в биологию Александром Максимовым в 1908 году на съезде гематологического общества в Берлине.

Однако, лишь в 90-х годах прошедшего XX века эта область клеточной биологии получила статус большой науки.

Первые «бессмертные» линии стволовых недифференцированных плюрипотентных клеток были получены в начале 80-х годов XX века из эмбриобласта мышцы. Однако, это событие тогда не привлекло особого внимания мировой общественности. Лишь спустя 18 лет Д.Томсон и Д.Герхарт изолировали «бессмертные» линии эмбриональных стволовых клеток человека.

За этим последовало признание журнал Science 1999 году открытие эмбриональных стволовых клеток третьим по значимости событием в биологии после расшифровки двойной спирали ДНК и программы "Геном человека".

Осознание важнейшей роли эмбриональных стволовых клеток в биологии и медицине повлекло за собой бурный рост научных исследований и публикаций в этой зоне. Так в 1999 г было зафиксировано 5 публикаций об эмбриональных стволовых клетках человека и 2500 патентов на новые технологии и манипуляции с этими клетками.

Эволюция манипулирует одной исходной тотипотентной клеткой, которая с помощью внешней информации подгоняет свое устройство для наиболее адекватной функции, которая реализуется белковыми машинами.

С помощью информации устройство клеток наиболее эффективно подгоняется под контекст местных химических условий.

Сеймур Бреннер указал, что открытие эмбриональных стволовых клеток ведет к самому простому и экономичному способу долгосрочного макромасштабного выращивания специализированных клеток человека. По сути именно это предположение и открыло широкую дорогу для бурного роста этого направления клеточной биологии с большими перспективами для практической медицины.

Однако, на этом пути стоит еще множество препятствий. Например, сейчас далеко неясен механизм функционирования эмбриональных стволовых клеток. Изолирование линий этих клеток от их естественного окружения одновременно модифицирует спектр управляющих сигналов и резко затрудняет расшифровку механизмов.

Между тем, в биологии существуют легкодоступные и массовые модели для изучения механизмов функционирования стволовых клеток. Эти модели столь массовые, обыденные и давно известные, что на них до сего времени просто не обращали должного внимания. Возможно, именно интерес к расшифровке механизмов функционирования эмбриональных стволовых клеток человека подстегнет интерес к изучению этих моделей.

О каких моделях идет речь? Это так называемые «меристемы» или меристематические ткани растений. Термин «меристема» происходит от греческого термина «меристос», что означает делящийся. То есть, меристема, это активно делящаяся ткань в течение всей жизни растения.

Долгое время считалось. Что одним из самых принципиальных различий между животными и растениями являлось наличие именно меристематических тканей, которые придают высшим растениям уникальное качество постоянного роста и увеличения размеров от момента оплодотворения половой клетки до самой смерти растения. При этом считалось, что животные достигая своих «характерных» размеров во взрослом состоянии уже не содержат эмбриональных клеток. Однако, как мы знаем сейчас, это не так и у животных и человека тоже есть эмбриональные ткани с неограниченным потенциалом роста, обнаруженные, например, в тканях костного мозга и в обновляющейся стенке кишечника.

Это общеприродное сходство растений и животных позволяет использовать легкодоступные (в отличие от животных и человека) меристематические «бессмертные» ткани для изучения механизмов их функционирования.

Где находятся у растений меристемы? Например, в кончиках корней любого высшего растения и в почве их многие триллионы. Верхушки миллиардов побегов. Это так называемые апикальные меристемы (пример – фото). Есть еще так называемые интеркалярные или «вставочные» меристемы, расположенные, например, во всех междоузлиях травянистых злаков (пример расположения – фото).

Где находится легкодоступный для исследования в течение всего года, вне зависимости от сезонов источник меристем? Ответ простой – это семена высших растений.

Чрезвычайно распространенный источник. Среди великого разнообразия можно выделить семена злаковых культур – пшеницы, ржи, ячменя.

В естественном состоянии семена растений, являющихся проектами полноценного взрослого растения со всеми его жизненными функциями, могут в течении десятилетий сохранять в «свернутом» состоянии информацию и «проснуться» для ее развертывания при получении «благоприятных» сигналов из внешней среды.

Для семян высших растений таких одновременно действующих факторов всего два: наличие капельножидкой воды (химический фактор) и тепла (электромагнитный, информационный фактор).

Только если эти два фактора действующие **ОДНОВРЕМЕННО** семена, в исходном, так называемом «сухом» состоянии, содержащие 12-14% кристаллической воды, начинают разворачивать свою внутреннюю генетическую информацию. Этот процесс разворачивается стремительно и начинается с водопоглощения. (фото – водопоглощения ОКТ). Через 10-30 минут вода проникает на глубину до 500 мкм, достигая зоны локализации тканей зародыша растения. Происходит их интенсивное оводнение.

Через 2-3 часа из законсервированного, сухого состояния выходят митохондрии – энергетические станции клеток, а через 5-6 часов начинается процесс считывания информации с ДНК, синтеза информационной РНК и синтеза структурных белков. С этого момента процесс разворачивания носит необратимый характер и высушивание семени приводит к его гибели.

Однако, если вода продолжает поступать в семя, то начинается стремительное образование первичных «внешних» органов водопоглощения – корней. Именно они и являются самым массивным источником апикальных меристем (фото-рисунок корня).

Следом за ними, буквально через несколько часов появляются стебли с встроенными интеркалярными меристемами.

Чрезвычайно простым методом регистрации «результативности» действия меристемы является элементарная регистрация массы и линейных размеров корней и стеблей проростков.

Как мы уже упоминали, одним из двух **ГЛАВНЫХ** и совершенно необходимых факторов активации генетического аппарата семян высших растений является **ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫЙ**, тепловой фактор.

В поставленных нами экспериментах на фоне двух важнейших действующих факторов, необходимых и достаточных для разворачивания генофонда семени: капельно-жидкой воды и тепла мы использовали в варианте опыт фемтосекундно коррелированное излучение сверхлюминесцентного диода с центральной длиной волны 1300 нм.

Мы попытались задать вопрос, а может ли это излучение с пространственной корреляцией фаз фотонов в 100 мкм и длиной волны в 1300 нм, не имеющее стандартно известных в настоящее время молекул-акцепторов, оказать воздействие на семена и разворачивающиеся в ювенильных проростках процессы? Естественно, в первую очередь нас интересовали процессы прироста массы и линейных размеров.

Для исследования мы использовали семена ячменя сорта «Зазерский-85». В качестве источника фемтосекунднокоррелированного излучения с длиной волны 1300 нм мы использовали медицинский томограф сконструированный с ИПФ РАН. Фактор усреднения 3-3 и время экспозиции каждого индивидуального семени составляло 3-4,6 с.

В течение 200-2004 г было проведено 4 эксперимента на **ОЧЕНЬ** большом статистическом материале, с основными результатами которого мы Вас и хотели бы сейчас познакомить.

Схема облучения каждого семени - фото реконструкции.

В связи с использованием в медицинской диагностике метода оптической когерентной томографии (ОКТ), применяющего источники ИК-излучения на основе суперлюминесцентных диодов [2] и практически полным отсутствием информации об инвазивности метода по отношению к модельным биологическим объектам, содержащим меристемы в качестве имитационной модели ЭСК, представляло интерес провести исследование в этом направлении.

В качестве исходной модели в своем исследовании мы использовали семена ячменя сорта «Зазерский-85», а в качестве действующего фактора экспериментального воздействия излучение суперлюминесцентного диода с центральной $\lambda = 1300$ нм.

Схема обработки семени приведена на рис.1. В качестве источника излучения применяли суперлюминесцентный диод с центральной $\lambda = 1300$ нм от томографа конструкции ИПФ РАН по ТУ 9442-001-04683326-2003В. Обработывали область семени размерами 1,5x1,5 мм, путем последовательного автоматического сканирования полосой 1,5x0,03 мм в течение 3,00-4,67 с в разных вариантах эксперимента с плотностью мощности $1,1 \times 10^4$ Вт/м². Время между обработкой семян и контактом с капельно-жидкой водой для инициации процесса прорастания, в дальнейшем называемое термином «отлежка», составляло 0,5 сут, 1,0 сут, 4,5 сут, 10,5 сут. Температура проведения всех экспериментов +18-20 градусов Цельсия.

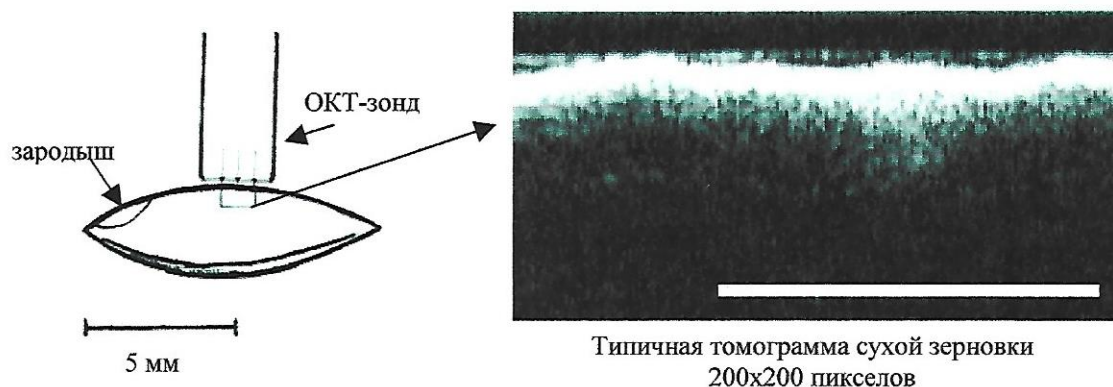


Рис. 1 Схема обработки семян и типичная томограмма сухого семени.

Полученные данные по энергии прорастания и всхожести семян ячменя при суммарном времени сканирования 4,67 с, времени отлежки 0,5 сут (опыт 1) и 1,0 сут представлены на рис. 2. За первые сутки в необработанном контроле взошло 68% семян, при отлежке 0,5 сут – 63%, при отлежке 1,0 сут – 82%. За вторые сутки прирост в контроле

составил +15%, при отлежке 0,5 сут +20%, при отлежке 1,0 сут +13%. Максимальную энергию прорастания наблюдали в варианте опыта с отлежкой 1,0 сут – 95% за двое суток.

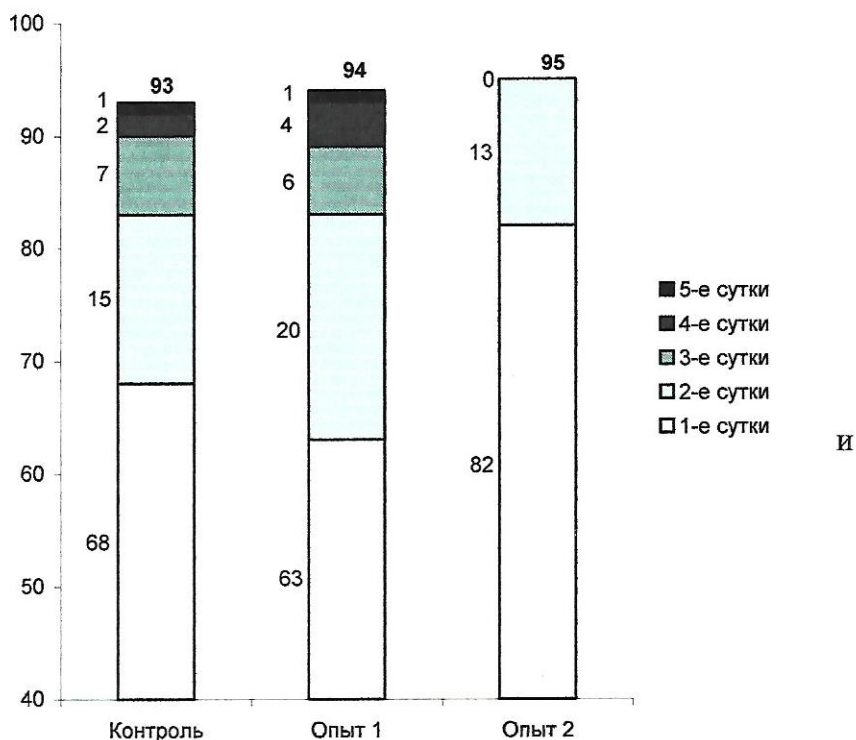


Рис. 2. Энергия прорастания всхожесть семян ячменя при суммарном времени сканирования 4,67 с, времени отлежки 0,5 сут. (опыт 1) и 1,0 сут.

На рис. 3 представлены данные по показателю массы 14-ти суточных проростков в различных вариантах двух экспериментов, проведенных в марте-апреле 2004 г.: контроль 1 – необработанный контроль, опыт 1- время экспонирования 3,00 с, отлежка 4,5 сут, опыт 2 – время экспонирования 3,50 с, отлежка 4,5 сут. На этом же рисунке представлены данные по массе 14-ти суточных проростков, семена которых были подвергнуты обработке со временем сканирования 3,00 с и временем отлежки 10,5 сут. Во всех вариантах обработки семян и вариантах отлежки масса 14-ти суточных проростков статистически достоверно превышала массу соответствующих контрольных групп.

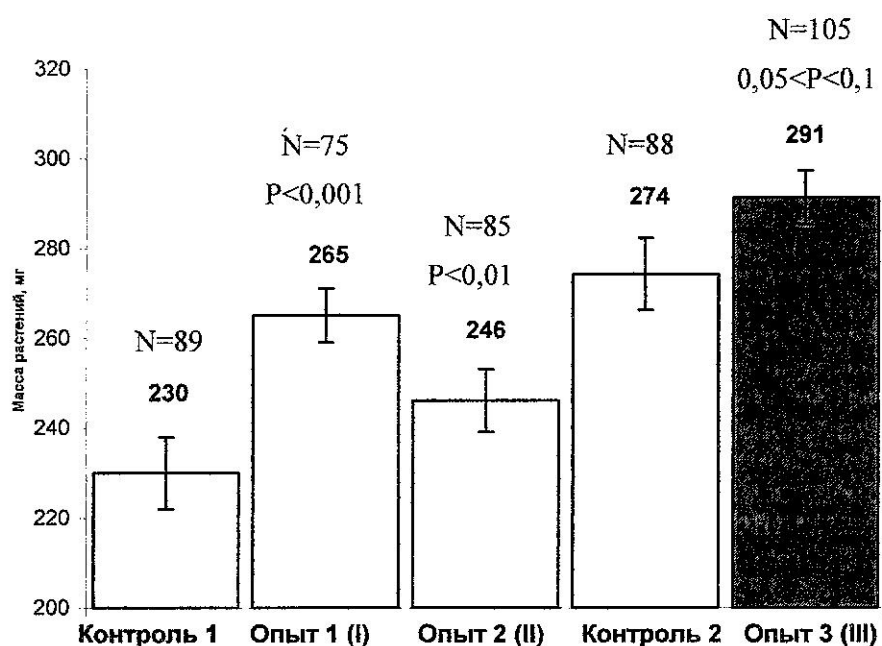


Рис. 3. Масса 14-ти суточных проростков ячменя. Контроль 1 – необработанный контроль, опыт 1- время экспонирования 3,00 с, отлежка 4,5 сут, опыт 2 – время экспонирования 3,50 с, отлежка 4,5 сут. Опыт 3 - обработка со временем сканирования 3,00 с и временем отлежки 10,5 сут., Контроль 2 – внутренний контроль к Опыту 3.

На рис. 4 представлены данные по линейным размерам корней 14-ти суточных проростков в различных вариантах двух экспериментов, проведенных в марте-апреле 2004 г.: контроль 1 – необработанный контроль, опыт 1- время экспонирования 3,00 с, отлежка 4,5 сут, опыт 2 – время экспонирования 3,50 с, отлежка 4,5 сут. На этом же рисунке представлены данные по линейным размерам корней 14-ти суточных проростков, семена которых были подвергнуты обработке со временем сканирования 3,00 с и временем отлежки 10,5 сут. Во всех вариантах обработки семян и вариантах отлежки линейные размеры корней 14-ти суточных проростков статистически достоверно превышали этот показатель для соответствующих контрольных групп.

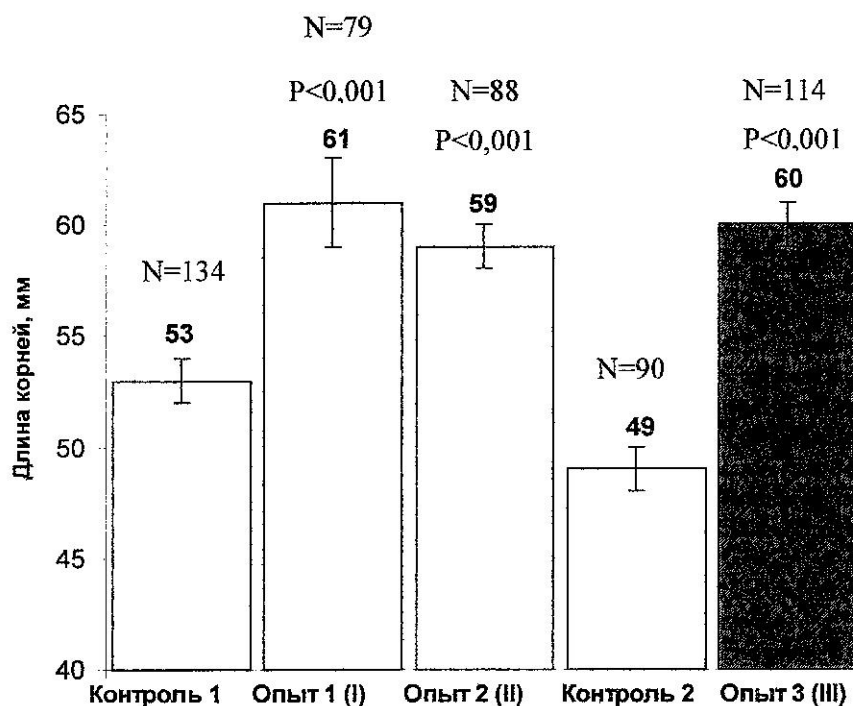


Рис. 4. Линейные размеры корней 14-ти суточных проростков: контроль 1 – необработанный контроль, опыт 1- время экспонирования 3,00 с, отлежка 4,5 сут, опыт 2 – время экспонирования 3,50 с, отлежка 4,5 сут., опыт 3 - обработка со временем сканирования 3,00 с и временем отлежки 10,5 сут., контроль 2 – внутренний контроль к опыту 3.

На рис. 5 представлены данные по линейным размерам стеблей 14-ти суточных проростков в различных вариантах двух экспериментов, проведенных в марте-апреле 2004 г.: контроль 1 – необработанный контроль, опыт 1- время экспонирования 3,00 с, отлежка 4,5 сут, опыт 2 – время экспонирования 3,50 с, отлежка 4,5 сут. На этом же рисунке представлены данные по линейным размерам стеблей 14-ти суточных проростков, семена которых были подвергнуты обработке со временем сканирования 3,00 с и временем отлежки 10,5 сут. Во всех вариантах обработки семян и вариантах отлежки линейные размеры стеблей 14-ти суточных проростков статистически достоверно превышали этот показатель для соответствующих контрольных групп.

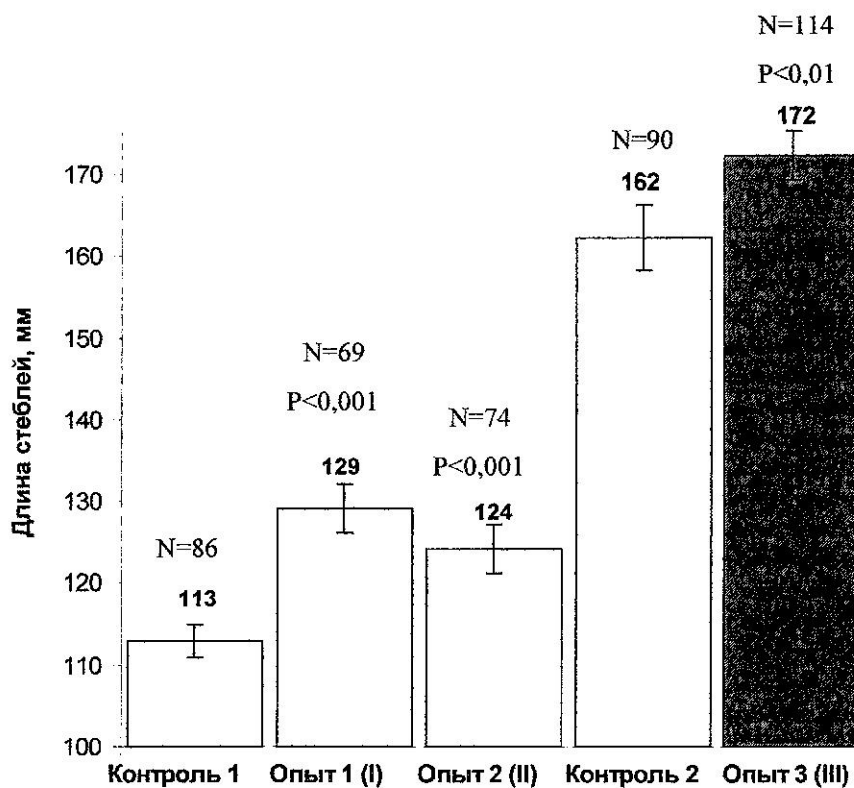


Рис. 5. Линейные размеры стеблей 14-ти суточных проростков: контроль 1 – необработанный контроль, опыт 1- время экспонирования 3,00 с, отлежка 4,5 сут, опыт 2 – время экспонирования 3,50 с, отлежка 4,5 сут., опыт 3 - обработка со временем сканирования 3,00 с и временем отлежки 10,5 сут., контроль 2 – контроль к опыту 3.

Вывод:

Обработка семян ячменя излучением суперлюминесцентного диода с центральной $\lambda = 1300$ нм, плотностью мощности облучения $1,1 \times 10^4$ Вт/м², временем сканирования 3,00-4,67 с и отлежкой 0,5 сут, 1,0 сут, 4,5 сут, 10,5 сут до момента активации проращивания капельно-жидкой водой, приводит к статистически достоверным морфометрическим изменениям массы, линейных размеров корней и стеблей 14-ти суточных проростков.

Показатель энергии прорастания по суткам – фото.

Показатель массы – фото.

Линейные размеры корней – фото.

Линейные размеры стеблей – фото.

Выводы:

1. Фемтосекунднокоррелированное излучение с центральной длиной волны 1300 нм с высокой степенью достоверности влияет, и в частности, активизирует процесс прироста биомассы проростков ячменя, линейных размеров корней и стеблей.
2. Процесс акцепции фемтосекунднокоррелированного излучения с длиной волны 1300 нм с последующей трансформацией в биологически значимые реакции зависит от времени между облучением и стартом прорастания семян.
3. Семена злаковых культур и их ювенильные проростки являются адекватной моделью для дальнейшего изучения процессов акцепции и трансформации фемтосекунднокоррелированного излучения с центральной длиной волны 1300 нм.
4. Дальнейшие исследования целесообразно сосредоточить на меристематических тканях первичных корешков, как удобной имитационной биологической модели недифференцированных клеток и их взаимодействия с фемтосекунднокоррелированным излучением с центральной длиной волны 1300 нм.

Авторы: Кутис С.Д. и Кутис И.С.



Кутис И.С. апр. 2004г.

Схема меристематических зон стебля ржи

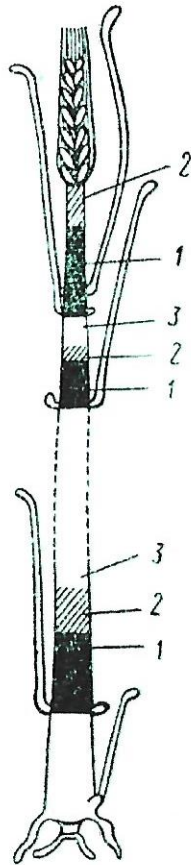


Рис. 33. Схема меристематических зон в стебле ржи—
Secale cereale:

1 — интеркалярные меристемы, 2 — формирующиеся ткани, 3 — зрелые ткани

По: В.Г. Хржановский «Основы ботаники с практикумом»,
Москва, Высшая школа, 1969, с. 79

Структура кончика корня злаковых

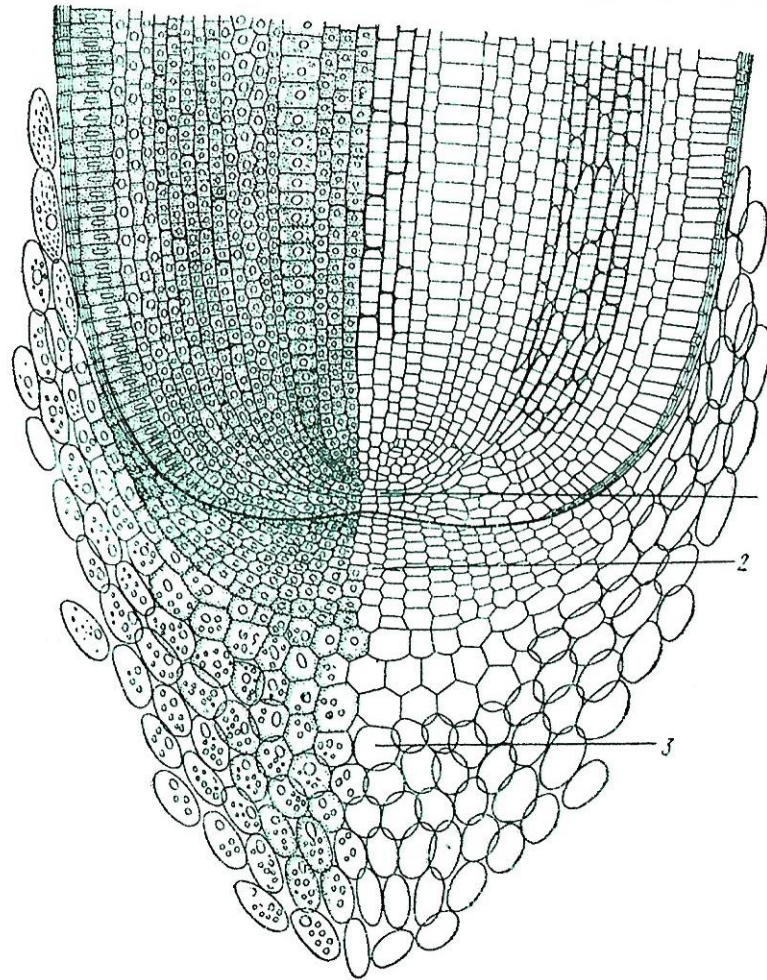


Рис. 31. Конус нарастания придаточного корня кукурузы — *Zea mays* (на левой половине рисунка даны клетки с протопластом, на правой — только клеточные стенки):
1 — клетки образовательной ткани, 2 — калитроген (образовательная ткань корневого чехлика), 3 — клетки корневого чехлика