

ISSN 0002-354X

ДОКЛАДЫ

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ
НАУК БЕЛАРУСИ

ТОМ 49



2

МАРТ-АПРЕЛЬ

2005

ДОКЛАДЫ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

Выходит шесть номеров в год

Журнал основан в июле 1957 года

МИНСК, БЕЛОРУССКАЯ НАУКА, 2005, ТОМ 49, № 2

Учредитель — Национальная академия наук Беларуси

Редакционная коллегия:

М. В. Мясникович (главный редактор),
Н. С. Казак (зам. главного редактора),
С. В. Абламейко, Е. Д. Белоенко, Н. А. Борисевич, П. А. Витязь, И. Д. Волотовский,
И. В. Гайшун, В. Г. Гусаков, С. А. Жданок, Н. А. Изобов, Ф. Ф. Комаров,
Н. П. Крутько, В. А. Лабунов, Ф. А. Лахвич, А. И. Лесникович, М. М. Маханек,
А. А. Махнач, А. А. Михалевич, П. Г. Никитенко, Ю. М. Плескачевский,
В. И. Тимошпольский, Л. М. Томильчик, Л. В. Хотылева, А. Л. Худолей,
Т. М. Амосова (ведущий редактор)

Адрес редакции:

220072, Минск, пр. Ф. Скорины, 66, к. 404,
т. 284-19-19

<http://www.ac.by/publications/dan/>

E-mail: belnauka@infonet.by

СОДЕРЖАНИЕ

МАТЕМАТИКА

Забрейко П. П., Кирсанова-Евхута О. Н. Метод минимальных невязок в банаховых пространствах.....	5
Малютин В. Б. Приближенное вычисление функциональных интегралов по спиновым переменным.....	11
Гринько А. П. Интегральное уравнение типа Абеля и локальные дробные интегралы и производные.....	17
Лешин В. В. Алгоритм нахождения числа независимости рекурсивно порождаемого гиперграфа.....	22
Евтухова С. М., Монахов В. С. Конечные группы с порядками кофакторов подгрупп, свободными от квадратов.....	26
Королева Е. В., Лебедев А. В. Индекс сингулярных интегральных операторов с разрывными осциллирующими коэффициентами.....	30

ФИЗИКА

Верещагин М. Н., Комаров Ф. Ф., Шепелевич В. Г., Остриков О. М. Влияние имплантации ионов N^{+2} на неомогенную пластическую деформацию аморфного сплава Fe—Cr—Mo—V—B—Si.....	35
Демидчик В. И., Корнев Р. В., Кухарчик П. Д. Математическое моделирование характеристик рассеяния проволочных частиц произвольной конфигурации в композиционных материалах на их основе.....	38
Кудряшов В. В., Томильчик Л. М. Феноменологический подход к описанию внутригалактических движений.....	42

ХИМИЯ

Бильдюкевич А. В., Фенько Л. А. Критические температуры смешения в системе полисульфон-полиэтиленгликоль-диметилацетамид.....	47
---	----

БИОЛОГИЯ

Алексейчук Г. Н., Задворнова Ю. В., Грут С., Бергервоет Я. Особенности активации клеточного цикла при прорастании и обезвоживании семян <i>Brassica Oleracea L.</i> различного физиологического качества.....	50
Солтанов В. В., Лукашенко Т. М. Изменение эфферентной импульсации шейного симпатического нерва после введения в тощую и подвздошную кишку эндотоксина <i>E. coli</i>	54
Сачок Г. И., Камышенко Г. А. Растительная масса и ее углеродный эквивалент в региональной геоэко-системе Беларуси.....	57
Деренговская Р. А., Остапеня А. П. Накопление зоопланктона в седиментационных ловушках и оценка потока осаждающей взвеси.....	62
Лобанок Е. С., Квачева З. Б., Вотяков В. И., Шуканова Н. А., Воробей А. В., Николаева С. Н. Ингиби-рование герпесвирусной инфекции в перевиваемых культурах клеток при фотодинамической инфекции....	69
Нижандров В. Н., Полукошко Е. Ф., Лукашевич В. С., Лукашевич И. Б., Балашко С. И., Островской Ю. П., Сидоренко Г. И. Особенности развития клеточных элементов миокарда новорожденных крыс в культуре...	73
Бушмакина И. М., Мартынова М. А., Дроздова Н. И., Конев С. В. Влияние холестерина на состояние липидной фазы в липосомальном рифампицине.....	77
Семенченко В. П., Бусева Ж. Ф. Образование агрегаций зоопланктона.....	80

МЕДИЦИНА

Волошенко А. Н. Эндопротезирование тазобедренного сустава в сложных клинических ситуациях.....	83
--	----

НАУКИ О ЗЕМЛЕ

Конищев В. С. Типы верхнефранских соляных поднятий Припятского прогиба.....	86
Таран Л. Н., Варакса В. В. Вещественный состав гродненского комплекса в кристаллическом фунда-менте северо-западной части Беларуси.....	89

ТЕХНИЧЕСКИЕ НАУКИ

Шелег В. К., Пятав В. В., Ковчур А. С. Экструзия изотропного материала.....	94
Почтенный Е. К. Расчет ресурса конструкций при случайном нагружении.....	97
Тимошпольский В. И., Постольник Ю. С., Ратников П. Э., Калинин Е. В. Математическое моделиро-вание нагрева призмы в противотоке (на примере нагревательных печей прокатного производства).....	103
Яшеринь П. И., Хейфец М. Л., Клименко С. А., Васильев А. С. Технологическое и эксплуатационное наследование показателей качества в жизненном цикле изделий машиностроения.....	108

СОЦИАЛЬНО-ГУМАНИТАРНЫЕ НАУКИ

Никитенко П. Г., Платонова Л. А. Оценка связи между показателями работы предприятия и объемом экспорта.....	114
Березкина Н. Ю. Роль книги в распространении научных знаний в Беларуси XVI—XVII вв.....	117
Вахтомов Г. В. Цивилизационные приоритеты Беларуси в приграничном сотрудничестве.....	121

Технический редактор Т. В. Л е т ь е н
Компьютерная верстка Л. И. К у д е р к о

Сдано в набор 14.03.05. Выпуск в свет 29.04.2005. Формат 60×84¹/₈. Бумага офсетная. Офсетная печать. Усл. печ. л. 14,88. Усл. кр.-отт. 15,81. Уч.-изд. л. 16,4. Тираж 240 экз. Заказ 1011.

Республиканское унитарное предприятие «Издательский дом «Белорусская наука». ЛИ № 02330/0056800 от 30.04.2004 г. 220141. Минск, Староборисовский тракт, 40. Свидетельство 453.

Отпечатано РУП «Минсктиппроект». ЛП № 02330/0133165 от 29.03.2004 г. 220123. Минск, ул. В. Хоружей, 13/61.

© Издательский дом «Белорусская наука»
Доклады НАН Беларуси, 2005

УДК 576.535:616.12

В. Н. НИКАНДРОВ, Е. Ф. ПОЛУКОШКО, В. С. ЛУКАШЕВИЧ, И. Б. ЛУКАШЕВИЧ,
С. И. БАЛАШКО, Ю. П. ОСТРОВСКИЙ, академик Г. И. СИДОРЕНКО

ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ КЛЕТОЧНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ МИОКАРДА НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС В КУЛЬТУРЕ

Институт физиологии НАН Беларуси

Поступило 04.10.2004

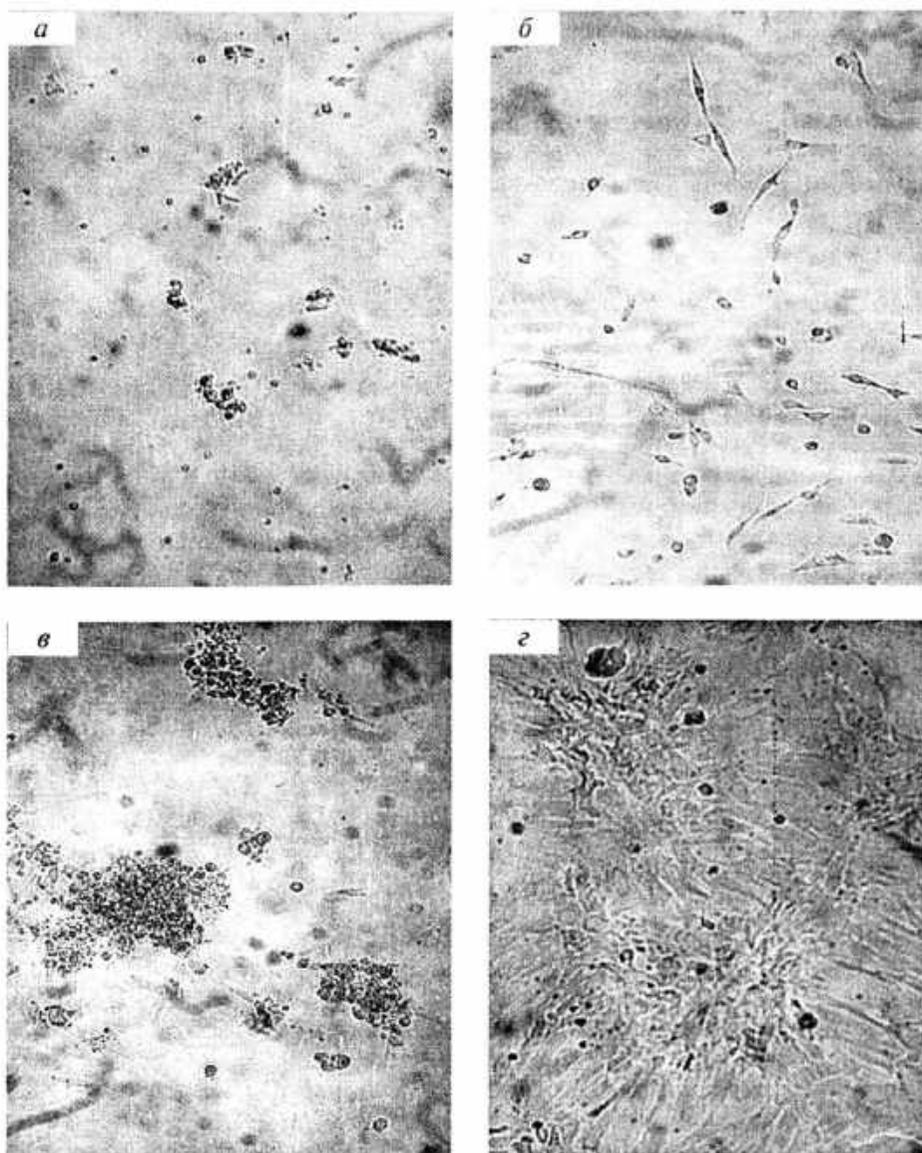
Пролиферация кардиомиоцитов — основы синтициальной структуры миокарда является важной проблемой биологии и медицины. Ряд заболеваний сопровождается поражениями в том числе некротического характера мышцы сердца с последующим замещением дефекта рубцовой тканью, что чревато аневризмами, ухудшением сократительной способности миокарда и т. д. К подобному исходу кроме инфарктов миокарда приводят ранения сердечной мышцы, эхинококкоз, ревматоидные поражения [1]. По-видимому, целый ряд инфекционно-токсических состояний также сопровождается такими же нарушениями. Последние, в частности, наблюдаются при воздействии целого ряда экстрацеллюлярных белков гемолитических стрептококков группы А (эритрогенного токсина, стрептолизина О, кардиогепатического токсина, стрептококковой протеиназы) [2], дифтерийного токсина [3] (кстати, способностью продуцировать этот токсин, как стало известно, наделен не только возбудитель дифтерии, но и близкие виды коринебактерий, считавшиеся непатогенными [4]), и метаболитов других микроорганизмов.

Исследования пролиферации клеток сердечной мышцы в культуре предпринимались и ранее [5—7], однако при этом стремились получить культуры именно кардиомиоцитов, максимально очищенных от немышечных элементов. Между тем, высокодифференцированные клетки — кардиомиоциты отличаются низкой способностью к пролиферации. Стимуляция ее требует присутствия ряда дефицитных факторов, объединяемых под термином «факторы роста сердца» и включающих гепаринсвязывающий фактор роста (HBMGF), стимулирующий размножение кардиомиоцитов и продуцируемый немышечными элементами сердечной мышцы [8]. Этот белок (45—50 кДа) в силу подобной особенности называют еще «фактор роста немышечного происхождения» (NMDGF). Кроме того, как правило, срок наблюдения культур клеток в указанных выше работах не превышал 2,0—2,5 недель.

Цель настоящей работы — исследование особенностей развития диссоциированной культуры клеток миокарда новорожденных крыс (как первого этапа в создании трансплантационных культур для восстановительной кардиоластики) при длительном наблюдении — до 30 суток и влияния на клетки добавки плазминогена.

Материалы и методы. В работе использовали трипсин, бактериальную коллагеназу, эмбриональную телячью сыворотку, питательные среды DMEM, RPMI-1640, ISCOVES, сбалансированный физиологический раствор, не содержащий ионов кальция и магния (Sigma, США), пластиковую посуду — чашки Петри (Sigma и Sartorius). Все растворы готовили на деионизированной бидистиллированной воде. Плазминоген выделяли из обогащенной β-глобулинами фракции плазмы крови человека методом аффинной хроматографии на лизинсодержащем сорбенте. Подробно техника получения плазминогена и характеристика его образцов рассмотрена нами ранее [9]. Остальные реактивы квалификации «х. ч.» или «ч. д. а.» были производства стран СНГ.

Сердечную мышцу новорожденных крысят (1—2 суток) тщательно промывали охлажденным физраствором, подвергали механической дезинтеграции и полученную кашичу обрабатывали 0,25%-ным раствором трипсина в течение 10—15 мин, а затем — эмбриональной телячьей сывороткой. Полученную взвесь центрифугировали в течение 2 мин при 1000 об/мин [10]. Супернатант, содержащий клеточные элементы, переносили на чашки Петри. Клетки культивировали при 37 °С в атмосфере, содержащей 5% CO₂, в инкубаторе Heracell (Швейцария). Дважды в неделю питательную среду заменяли на свежую.



Диссоциированная культура клеток сердечной мышцы новорожденных крыс через: *a* — 1 сутки, *б* — 3 суток, *в* — 5 суток, *г* — 14 суток культивирования. Световая микроскопия, проходящий свет, увеличение 7×16

Число диссоциированных клеток учитывали прямым подсчетом в камере Горяева. Морфологию культур исследовали методом прижизненной световой микроскопии на микроскопе TELEVAL (Германия). Для оценки пролиферативной активности клеток использовали метод включения ^3H -тимидина в ДНК. С этой целью питательную среду заменяли соответствующей средой, содержащей меченый нуклеотид ($1 \mu\text{Ci}/\text{мл}$) на 24 ч. Затем среду с радиометкой удаляли, клетки дважды отмывали бескальциевым раствором, экстрагировали 10%-ной трихлоруксусной кислотой при 0°C в течение 1 ч и растворяли клеточный детрит в $0,5 \text{ N NaOH}$ при 37°C . Радиоактивность аликвот полученного лизата исследовали на β -счетчике Mark III (Tracor Analytic, США). Активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ, EC 1.1.1.27) определяли в культуральной жидкости по восстановлению пирувата, используя оптический тест Варбурга (изменение абсорбции при 340 nm). За единицу активности принимали восстановление 1 мкМ пирувата в 1 мин при 37°C и $\text{pH } 7,4$. Для определения внутриклеточной активности креатинкиназы (КК, EC 2.7.3.2) клетки снимали с пластика 0,02%-ным раствором версена, подсчитывали в камере Горяева, гомогенизировали на блендере Virtis 45 (США) в гомогенизаторе со стеклянным пестиком. Полученный гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин. Активность определяли также по оптическому тесту Варбурга через гексокиназную и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназную реакции и выражали в единицах (Е) в пересчете на 1 млн клеток. Биохимические наборы для анализа ЛДГ и КК были НТПК «Анализ-Х».

Все исследования выполнены не менее, чем 3-кратно, результаты обработаны статистически с вычислением t-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. Взвесь свежедиссоциированных клеток миокарда представляет собой дисперсную жидкость, содержащую округлившиеся клетки ткани (рисунок). В течение первых суток адгезии на пластиковые поверхности подвергались прежде всего более плоские фибробластоидные клетки, а затем клетки веретенообразной формы (рисунок), соответствующие кардиомиоцитам [6].

Через 2—3 суток пролиферирующие кардиомиоциты ориентировались в виде звездочек. Клетки начинали сокращаться с частотой 20—40 пульсаций/мин. Активная пролиферация прикрепившихся клеток подтверждалась включением в нуклеиновые кислоты ^3H -тимидина (таблица). В этот период отмечена наиболее высокая активность ЛДГ в культуральной жидкости. Это обусловлено, по-видимому, гибелью неадгезировавшихся клеток, а также повышенной проницаемостью клеточных мембран.

Изменения включения ^3H -тимидина в ДНК, лактатдегидрогеназной активности культуральной жидкости и активности креатинкиназы клеток культуры сердечной мышцы новорожденных крыс в динамике развития культуры ($n = 5$)

Время культивирования, сут	Включение ^3H -тимидина, (имп/мин $^{-1}$ ·мл $^{-1}$)	Активность лактатдегидрогеназы, ед/мл	Активность креатинкиназы, Е/млн. клеток
3	824 ± 55	0,23 ± 0,11	2,0 ± 0,9
7	3650 ± 260	0,10 ± 0,07	4,6 ± 1,3
14	4700 ± 300	0,09 ± 0,05	8,8 ± 2,4
20	не исслед.	0,08 ± 0,06	9,1 ± 3,6

На 7—9 сутки развития культуры формировался монослой бурно разрастающихся фибробластов, эндотелиоцитов, клеток гладкой мускулатуры и кардиомиоцитов. Последние образовывали скопления (рисунок), причем каждое имело собственный ритм сокращений: от 1 до 30 пульсаций/мин. Пролиферация сопровождалась интенсификацией биосинтеза ДНК в 4,4 раза, судя по включению радиоактивной метки. Стабилизация жизнеспособности культуры к этому сроку выражалась в падении уровня активности внеклеточной ЛДГ в 2,5 раза (таблица). Фактически, на таком уровне эта активность оставалась до 3-х недель развития культуры. Вместе с тем происходило существенное увеличение креатинкиназной активности клеток.

Спустя 14—18 суток отмечено уплотнение монослоя культуры, пролиферация еще продолжалась, хотя, судя по включению ^3H -тимидина, темпы ее снижались: синтез ДНК возрастал лишь на 28,8%. Именно к этому сроку число очагов пульсирующих клеток достигало максимума, что ассоциировалось с максимальной активностью КК (таблица). Имела место двоякая картина: либо наблюдались несколько очагов пульсирующих клеток (каждый со своей частотой сокращения), либо происходила генерализация сократительной активности по всему монослою. По-видимому, это может быть связано с различиями развития пейсмейкерных клеток в культуре. В ряде случаев морфологически выявлялись клетки нервной ткани с хорошо развитыми отростками.

На более поздних сроках наблюдения (21—30 сутки) отмечены постепенное затухание сократительной активности кардиомиоцитов, скопления фагоцитов, что вело к лизису монослоя.

Учитывая значение реакции перичеселлюлярного протеолиза, в частности, звена «плазминоген-плазмин» в жизнедеятельности ряда видов клеток, в том числе и нервной ткани [11], нами было исследовано действие плазминогена человека на сократительную активность кардиомиоцитов в культуре. Добавка однократно этого зимогена в концентрации 0,1 мкг/мл (соответствует 10^{-9} М) к 10-суточной культуре в ряде случаев вызывала беспорядочные сокращения (типа мерцаний) на протяжении 20 мин и полное прекращение пульсации. Это весьма напоминает эффект плазминогена на электрическую активность нейронов ядер ствола головного мозга, контролирующей активность дыхательного центра: суперфузия раствором плазминогена понтобульбоспинального препарата мозга крысы более 10 мин вела к резкому (на 150—175%) увеличению частоты генерации инспираторных залпов с последующей необратимой блокадой респираторной активности [12]. Описанный эффект плазминогена на сократительную способность кардиомиоцитов в культуре существенно отличался от такового белкового фактора ZC. Внесение последнего в концентрации $2 \cdot 10^{-8}$ — $4 \cdot 10^{-6}$ М в культуральную жидкость способствовало возрастанию числа сокращений скоплений кардиомиобластов в 1,5—5,0 раз, и этот эффект сохранялся до двух суток [13].

Следует отметить, что культура клеток миокарда крысы является довольно сложной в плане пролиферации мышечных клеток по сравнению с таковыми других млекопитающих [14]. Аспект пролиферации в последнее время приобретает особый смысл в связи с наметившимися реально перспективами трансплантации кардиомиоцитов в очаг дефекта сердечной мышцы [15]. С этой целью используется иной тип культуры, характеризующейся преобладанием или исключительным представительством пролиферирующих кардиомиоцитов. Нами же представлен тип культуры ткани сердечной мышцы более адекватный самой ткани. Известно, что в миокарде взрослых крыс на долю миоцитов приходится не более 20% общего числа клеток [5]. Такая культура в возрасте до 20 суток вполне подходящий объект для исследования функций клеточных элементов сердечной мышцы, включая пейсмейкерные структуры. Нами обнаружен новый факт действия плазминогена на клеточном уровне, позволяющий полагать, что в использованной концентрации он вызывает явления, весьма напоминающие мерцательную аритмию. Этот достаточно неожиданный момент требует обстоятельного и глубокого изучения, что составляет отдельную задачу исследований в перспективе. Вместе с тем он может найти применение при создании (изыскании) противоаритмических препаратов.

Авторы выражают благодарность Н. С. Пыжовой за предоставленные образцы плазминогена высокой степени чистоты.

Литература

1. Полежаев Л. В., Ахабадзе Л. В., Музлаева Н. А., Явич М. П. Стимуляция регенерации мышцы сердца. М., 1965.
2. Белецкая Л. В., Верболович П. А., Полосухина Т. Я. Экспериментальная стрептококковая инфекция. Алма-Ата, 1978.
3. Даллин М. В., Фиш Н. Г. Белковые токсины микробов. М., 1980.
4. Wong T. P., Groman N. // *Infect. Immun.* 1984. Vol. 43, N 3. P.1114—1116.
5. Борисов А. Б. Методы культивирования клеток / Под ред. Г. П. Пинаева. Л., 1988. С. 290—299.
6. Борисов А. Б., Гончарова Е. И., Пинаев Г. П., Румянцев П. П. // *Цитология.* 1989. Т. 31, № 6. С. 642—646.
7. Wallikat G., Wollenberger A. // *Acta biol. med. germ.* 1980. Vol. 39. K7—K13.
8. Pimentel E. Handbook of growth factors. Vol. II: Peptide growth factors. CRC Press Inc. 1994.
9. Nikandrov V. N., Vorobyova G. V., Yankovskaya G. S., Demidchik N. V. // *Int. J. Biol. Macromol.* 1992. Vol. 14, N 8. P. 229—234.
10. Руководство по культивированию нервной ткани. / Под ред. Б. Н. Веспринцева. М., 1976.
11. Rosenblatt D. E., Cotman C., Nieto-Sampedro M., Rowe J., Knauper D. J. // *Brain Res.* 1987. Vol. 415. P. 40—48.
12. Никандров В. Н., Пятин В. Ф., Алексеева А. С., Мирошниченко Н. В., Якунина О. В., Новоселова А. М., Гарпун Ю. С., Мурашко О. Н., Кульчицкий В. А. // *Весті НАН Беларусі. Сер. мед.-біял. навук.* 2003. № 2. С. 40—43.
13. Никандров В. Н., Полукошко Е. Ф. // Юбилейная конф. посвящ. 50-летию Института физиологии НАН Беларуси: Тез. докл. Минск, 2003. С. 121—122.
14. Ногаскова М., Вусзко З. // *Exp. Cell Res.* 1997. Vol. 237, N 1. P. 158—175.
15. Потапов Н. В., Крашенинников М. Е., Онищенко Н. А. // *Вестн. трансплантологии и искусств. органов.* 2001. № 2. С. 46—53.

*NIKANDROV V. N., POLUKOSCHKO E. F., LUKASHEVITCH V. S., LUKASHEVITCH I. B.,
BALASCHKO S. I., OSTROVSKY YU. P., SIDORENKO G. I.*

PECULIARITIES OF THE DEVELOPMENT OF MYOCARDIAL CELLULAR ELEMENTS OF NEWBORN RATS IN CULTURE

Summary

Monolayer cultures of heart tissue cellular elements (including fibroblasts, endotheliocytes, smooth muscle cells, nervous cells and cardiomyocytes) were prepared. The dynamics of development and fading of these cultures during 30 days was described and compared with the ³H-thymidine incorporation, extracellular lactate dehydrogenase activity, creatine kinase activity of cells. Two types of the functional activity of cardiomyocyte groups were demonstrated, and effect of plasminogen on the cardiomyocytes contractile ability was established.