

Реферат

ВАРИАНТЫ ПЕРИНАТАЛЬНОЙ АНАТОМИИ ВНУТРЕННИХЖЕНСКИХ ПОЛОВЫХ ОРГАНОВ

Проняев Д.В.

Ключевые слова: морфометрия, рентгенанатомическое исследование, яичники, маточные труб

Исследование проведено комплексом современных и классических анатомических методов исследования: морфометрия, макро- и микропрепарирования, рентгенанатомическое исследование, инъекция сосудов, на 50 трупах плодов. Во время исследования шести, семи месячных плодов женского пола выявили некоторые варианты строения внутренних женских половых органов и кровеносных сосудов. Описаны особенности формы исинтопии яичников, маточных труб и их морфометрические параметры. Установлено что анатомические особенности внутренних женских половых органов плодов характеризуется широкой вариабельностью строения исинтопии, которые в свою очередь зависят от топографии и строения смежных органов и структур.

УДК 616.006.487-018:616-089.5

Савосько С.І., Макаренко О.М., Погоріла Н.Х., Васильєва І.Г.

ВПЛИВ ФРАКЦІЙ ЦЕРЕБРАЛУ НА РОЗВИТОК МОРФОЛОГІЧНИХ ПОРУШЕНЬ В КЛІТИНАХ НЕЙРОБЛАСТОМИ ЛЮДИНИ ІМР-32 ПРИ ДІЇ ЕФІРА ДЛЯ НАРКОЗУ

Київський національний університет ім. Тараса Шевченка, м. Київ;

Інститут фізіології шм. О.О. Богомольця НАН України, м. Київ;

Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, м. Київ

Досліджена дія окремих фракцій перебрала на моделі морфологічного диференціювання клітин нейробластоми людини ІМР-32. Результати дослідження показали, що церебрал і його низькомолекулярні фракції різною мірою активують нейритогенез низькодиференційованих клітин. Одночасно з цим церебрал продемонстрував більш виразний протекторний вплив на процеси нейритогенезу і ретракції відростків при дії ефіра для наркозу, ніж при внесенні в культуральне середовище інших досліджуваних фракцій препарату.

Ключові слова: нейробластома ІМР-32, фракції церебралу, морфологічне диференціювання, ефір для наркозу.

Вступ

Одним із найбільш небезпечних судинних захворювань головного мозку пацієнтів, що найчастіше зустрічаються, є розвиток гострого інсульту [2,3,8-13]. Ризик церебрального інсульту та його ускладнень є реальним для відповідних груп майже усіх вікових категорій, і, особливо, актуальний для пацієнтів працездатного віку. Пошук лікарських засобів, які могли б здійснювати нейропротекторну та нейроактивуючу дію, підвищували б виживаність пацієнтів та знижували частоту та ступінь їх інвалідизації в постінсультному періоді, є виключно актуальним. В якості одного з таких засобів запропоновано препарат церебрал, розроблений та прийнятий до впровадження на виробництві фармацевтичної компанії «Дніпрофарм» (Дніпропетровськ, Україна) [6]. Препарат представляє собою очищений набір пептидів, олігопептидів і амінокислот, які утворюються в мозку тварин-реконвалесцентів після попереднього відтворення гострого аутогеморагічного інсульту, тобто у тварин, які успішно перенесли інсульт [5]. Активними діючими компонентами препарату, які забезпечують фармакотерапевтичний вплив, є нейропептиди, виділені у фракції і які містять від трьох до дванадцяти амінокислотних залишків. По механізму своєї нейрофармакологічної дії дані пептиди представляють собою ендогенні регулятори синтезу і секреції фактора росту не-

рвів (NGF). Було, зокрема, показано, що введення церебралу призводить до підвищення інтенсивності синтезу і секреції NGF в клітинних утворах ЦНС в умовах відтворення гострого експериментального геморагічного інсульту. Разом з тим, церебрал не впливав на процеси синтезу і секреції даного ростового фактору нервовими клітинами у інтактних тварин. Іншими словами його діючі фактори, очевидно, є трофінотропінами, або ендогенними регуляторами (up-regulators) синтезу NGF при гострому інсульті [1]. В умовах *in vitro* встановлено, що церебрал активує диференціювання клітин феохромоцитоми РС-12, тобто спостерігається виражений нейритогенез та інгібування проліферації клітин [7].

З урахуванням вищесказаного досліджувались впливи церебралу і деяких його фракцій на культуру клітин нейробластоми людини ІМР-32, в культуральне середовище яких додавали ефір для наркозу в токсичній дозі. З метою визначення найактивнішого компоненту здійснювали фракціонування препарату. Результати цитопротекторного впливу перебрала і його фракцій порівнювались з контролем в дослідах *in vitro* на певних етапах експериментального дослідження.

Методика

Фракціонування церебралу здійснювали за допомогою гель-хроматографії на сефадексі G-25 (Pharmacia, Швеція). Отримали по 7-10 мл кожної з трьох фракцій.

Дослідження проведені на клітинах людської нейробластоми лінії IMR-32. Усі клітини культивувались при +37°C у флаконах Карреля в атмосфері повітря, збагаченого CO₂ до 5%. Використовувалось культуральне середовище RPMI-1640 («Sigma», США) з додаванням 10% сироватки коня і 5% ембріональної сироватки великої рогатої худоби («Gibco», США), а також 400 мкг/мл гентаміцину («Sigma», США) з метою попередження проростання мікрофлори. Зразки культури клітин IMR-32 були розділені на 4 групи: 1) контрольні клітини з додаванням фізіологічного розчину; 2) клітини, які культивувались в згаданому середовищі з додаванням церебралу («Дніпрофарм», Україна); 3) речовини I фракції не використовувалися; 4) клітини, які культивувалися в середовищі з додаванням II фракції церебралу (молекулярна маса 1,5-4,5 кДа); 5) клітини в середовищі з додаванням III фракції церебралу (молекулярна маса 1,2 кДа і менше).

Ефір додавався через ін'єкційну голку в середовище Хенкса (рН 7,4), якою на 1/3 був заповнений флакон Карреля (об'єм 15 мл). Спочатку в середовище додавали 350 мкл ефіру, що призводило до створення в ній концентрації, в 30 разів більш високої, ніж у крові ссавців в термінальній стадії ефірного наркозу. Через 27-28 хвилин в середовище додавали ще 650 мкл ефіру, після чого створювана концентрація перевищувала гранично допустиму в середньому на два порядки.

Кожні 30-35 хвилин попередньо відібрані ділянки клітинних культур вказаних груп фотографувались з використанням фазовоконтрастного мікроскопа «Diavert». Для характеристики динаміки морфологічного диференціювання і цитопротекції в межах всього періоду спостереження (140 хвилин) враховувались наступні морфометричні параметри досліджуваних клітин: площа

видимого профілю клітин, кількість клітин з відростками і довжини відростків. В кожній групі досліджуваних культур клітин оцінювали їх проліферативну активність, враховуючи одночасну кількість в межах стандартної тест-зони 525×325 мкм².

Щільність клітин, а також вказані вище морфометричні показники підраховували за допомогою напівавтоматичної програми для обробки графічних зображень (UTHSCSA ImageTool). Достовірність міжгрупових відмінностей численних значень оцінювали згідно t-критерія Стьюдента, для чого використовували стандартні програми біомедицинської статистичної обробки BioStat.

Результати та їх обговорення

Результати виконаних досліджень свідчать про існування безпосереднього впливу молекул церебралу і окремих його фракцій на досліджувані параметри клітин нейробластоми при дії ефіра для наркозу в токсичній дозі. Варто відмітити, що протягом усього періоду спостереження, який складав у середньому 95 хвилин, кількість клітин нейробластоми IMR-32 з відростками в контрольній групі різко зменшувалась (на 61,76%) після 30 хвилин експозиції з ефіром для наркозу, послідовно знижуючись до нуля до кінця експерименту (Табл. 1). Попереднє додавання в культуральне середовище 0,2% розчину церебралу попереджувало розвиток реакції збільшення кількості клітин з нейритами протягом I етапу дослідження (перші 35 хвилин експозиції клітин), як це можна було спостерігати у клітин контрольної групи. Крім цього даний лікувальний засіб потенціював наркотичний і цитотоксичний ефекти ефіра для наркозу на культуру клітин нейробластоми (70 і 105 хвилин). Про це, зокрема, свідчить швидка втрата клітинами нейритів (Табл. 1).

Таблиця 1.
Протекторний вплив церебрала і окремих його фракцій на зміну кількості тіл клітин з відростками при дії ефіра для наркозу (%).

Група	35 хвилин	70 хвилин	105 хвилин	140 хвилин
Контроль	20,4	25,7	7,8	0
Церебрал	48,4	37,1	0	0
Фракція II	41,6	28,3	18,2	0
Фракція III	29,2	35,9	2,5	0

На відміну від цього при використанні фракції церебралу II, але не III спостерігалось виражена фармакоіндукуюча цитопротекторна дія. При інших рівних умовах нами виявлений ефект тривалого (в цілому вище 60 хвилинної експозиції клітин з ефірним наркозом) збереження значної кількості (в середньому 43,75%) клітин нейробластоми з відростками без стадії реактивного нейритогенезу. В той же час по II етапу спостереження клітини інших дослідних груп практично втрачали свої відростки. Динамічні спостере-

ження показали, що цей процес відбувається в результаті здійснення реакції інвагінації вмісту цитоплазми нейритів в клітинні тіла, причому ця реакція до кінця досліду набула незворотного характеру. Варто підкреслити, що молекули речовин II фракції церебралу, подібно сумарному препарату також попереджують розвиток клітинної реакції відповіді нейробластоми на дію ефіру у вигляді нетривалого реактивного нейритогенезу (Табл. 1; Рис. 1:А,Б,В,Г).

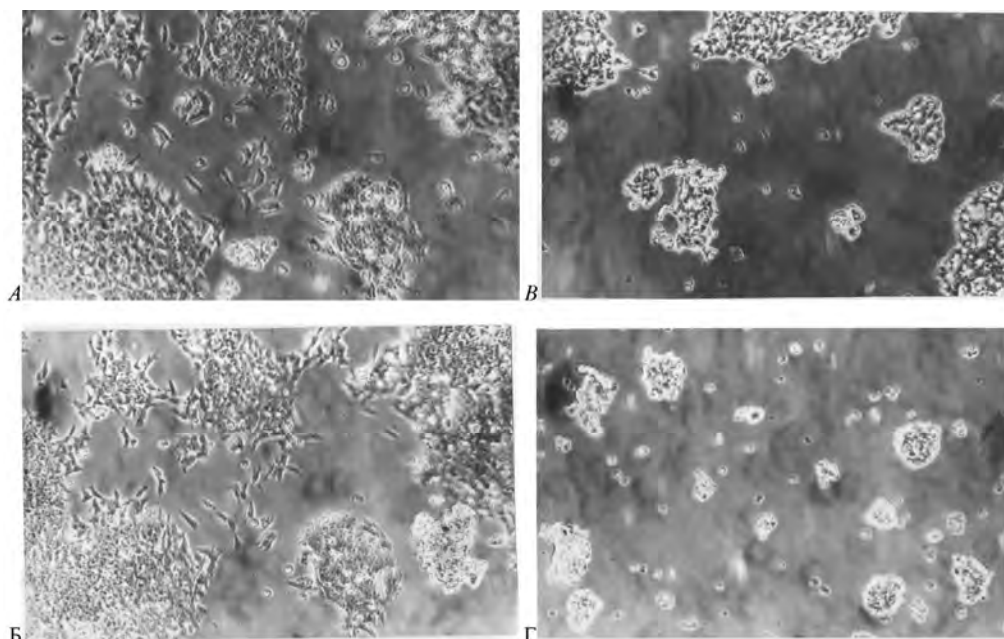


Рис. 1. Вплив ефіра на клітини нейробластоми IMR-32.
Умови: А-35 хвилин; Б-70 хвилин; В-105 хвилин; Г-140 хвилин. Об.10, ок. 10.

Додаткове вивчення препарату церебрал і окремих його фракцій на лінійні параметри відростків клітин людської нейробластоми IMR-32 при дії загальних анестетиків дозволило встановити наступні закономірності. У порівнянні з окремими клітинами контрольної групи, яким в

цих умовах експозиції з ефіром для наркозу додавали церебрал, прискорився процес ретракції нейритів клітинами нейробластоми, тобто в даних умовах церебрал не проявляв властиві йому протекторні властивості (Табл.2).

Таблиця 2.
Протекторний вплив церебрала і окремих його фракцій на зміну довжини відростків клітин при дії ефіра для наркозу (мкм).

Група	11:20	11:45	12:20	12:55
Контроль	6,35±0,33	4,25±0,34	5,32±1,23	0
Церебрал	4,18±0,37*	3,53±1,55	0	0
Фракція II	3,37±0,27*	3,66±0,33	3,66±0,33	0
Фракція III	3,27±0,18*	3,47±0,27	3,14±0,85	0

*P<0.05

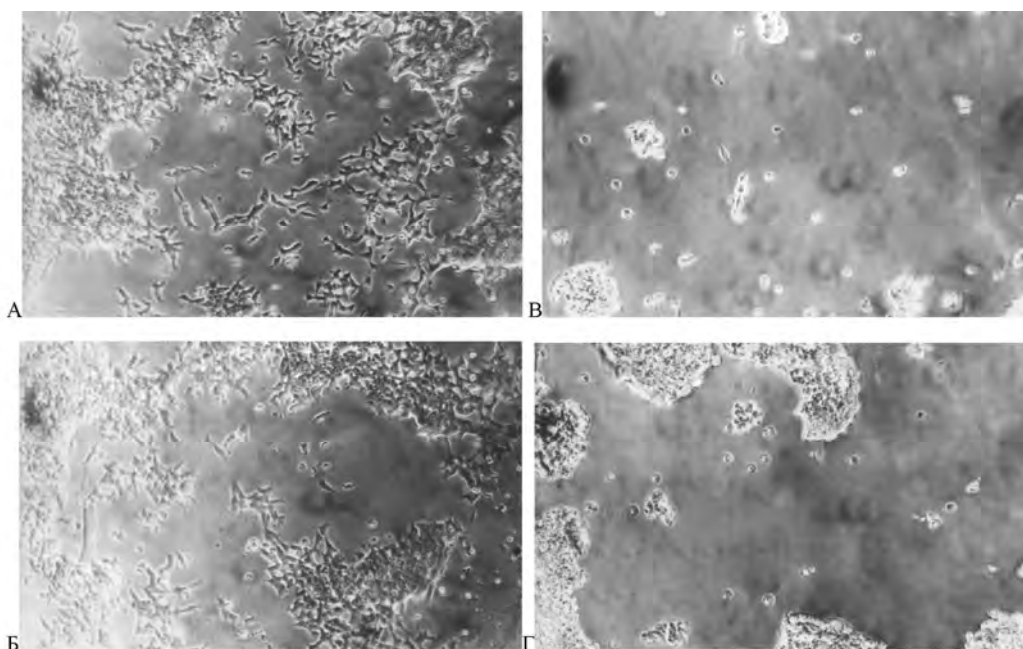


Рис.2. Вплив фракції III на морфогенез клітини людської нейробластоми IMR-32.
Умови: А-35 хвилин; Б-70 хвилин; В-105 хвилин; Г-140 хвилин. Об.10, ок. 10.

Результати, отримані при використанні фракції церебралу II і III свідчать про те, що молекули речовин, які входять до їхнього складу, мають виражений протекторний вплив на структурно-функціональні і метаболічні процеси, які протікають в клітинах нейробластоми IMR-32. Про це свідчить тривале збереження (понад 60 хвилин) структурних параметрів нейритів клітин, властивих початковому стану (Табл.2; Рис.2:В), які в термінальній стадії швидко зникають.

Настільки виражені (протягом 70 хвилин) цитологічні зміни процесів ретракції відростків повинні були суттєво впливати і на морфометричні параметри клітинних тіл нейробластоми. При цьому враховувались раніше отримані нами дані про те, що у умовах термінальної стадії ефірного наркозу і особливо гіпоксії площа і об'єм тіл пірамідних нейронів і клітин нейробластоми сут-

тєво зменшується [4,6]. Отримані результати дозволили в'яснити наявність тенденції до збільшення площі клітин на 39,69% через 35 хвилин експозиції із загальним анестетиком, що відповідає періоду первинного зменшення довжини відростків на 33,07% (Табл. 2,3). Важливо відмітити, що надалі цей показник повертався практично до початкових даних і суттєво не змінювався до кінця спостереження. Ефект призначення засобу церебрала, перед використанням ефіра для наркозу, на I етапі експерименту частково нагадував картину, виявлену у контрольній групі клітин. Але надалі, тобто через 60 і 90 хвилин експозиції клітин нейробластоми з загальними анестетиками, коли реакція інвагінації нейритів була завершена, площа соми клітин значно зменшувалась і у порівнянні з контролем, складала в середньому 74,08% і 74,01% (Табл.3).

Таблиця 3.

Протекторний вплив перебрала і окремих його фракцій на зміну площі соми клітин при дії ефіра для наркозу (мкм²).

Група	11:20	11:45	12:20	12:55
Контроль	32,5±2,02	45,4±2,84	28,0±1,04	30,1±1,49
Церебрал	43,1±2,08*	46,5±2,32	31,93±1,70*	31,9±2,25
Фракція II	41,8±2,13	31,0±3,11*	29,9±2,28	30,5±0,98
Фракція III	35,2±1,88	42,91±2,34	29,9±1,93	32,19±3,85

*P<0,05

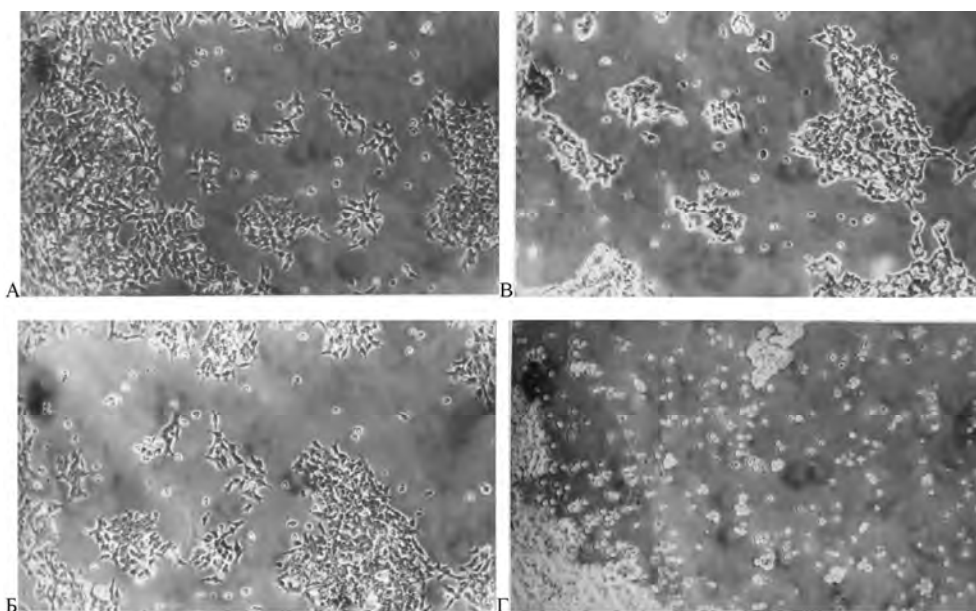


Рис.3. Вплив фракції II на морфогенез клітини людської нейробластоми IMR-32. Умови: А-35 хвилин; Б-70 хвилин; В-105 хвилин; Г-140 хвилин. Об.10, ок. 10.

Раніше було встановлено, що додавання в культуральне середовище фракції перебрала III збільшує на 22,94% кількість клітин IMR-32, які реагують на дію загального анестетика на I етапі формування соми клітин також зростала на 21,9% (Табл.3). Загальний анестетик швидко інгібує цю клітинну реакцію, при цьому площа соми клітин особливо різко зменшувалась на II етапі ефірної наркотизації – на 15,6%, що в цілому свідчить про часткову фармакопротекторну дію молекул фракції перебрала III на клітини нейробластоми IMR-32, які вивчалися в даних

експериментальних умовах. На відміну від цього ефект молекул фракції церебралу II був іншим – їхній цитостабілізуючий ефект, який проявляється при вивченні реакції клітин і зміна довжини нейритів на дію загальних анестетиків, був доповнений виразною стабілізуючою дією на структурно-морфологічні процеси, які протікають в клітин, часткова редукція котрих (на 25,8%) у перші 35 хвилин експозиції в умовах впливу наркозу в подальшому не супроводжувалася додатковими деструктивними змінами.

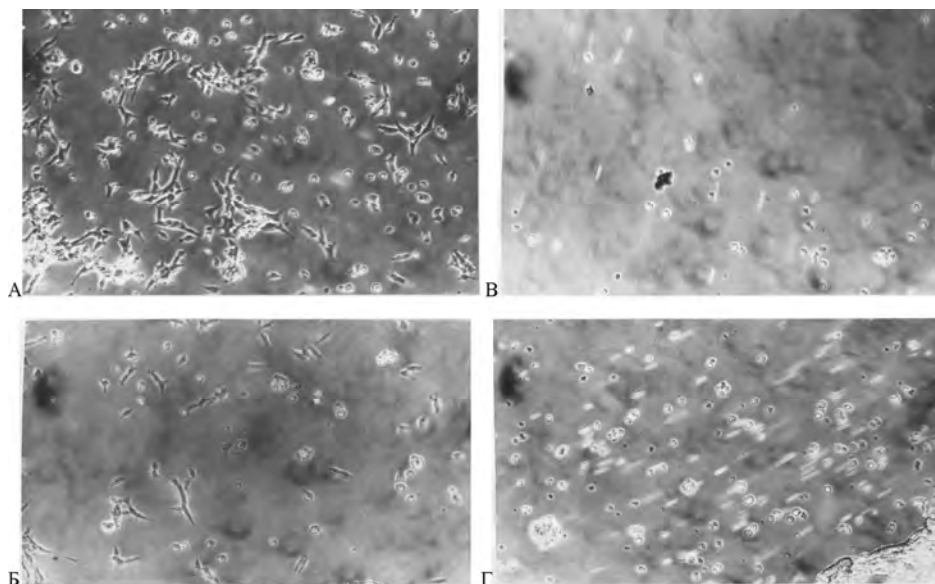


Рис. 4 Вплив перебрала на морфогенез клітини людської нейробластоми IMR-32.
Умови: А-35 хвилин; Б-70 хвилин; В-105 хвилин; Г-140 хвилин. Об.10, ок. 10.

Таким чином, результати досліджень свідчать про те, що церебрал і окремі його фракції впливають на морфологічну реактивність клітин людської нейробластоми в умовах передозування загального анестетика. Спостерігається зокрема збільшення реактивного нейритогенезу в культурах при використанні фракції церебралу III на першому етапі реакції. Фракція III викликала часткове збільшення площі клітин і довжини їхніх відростків. На відміну від цього фракція II продемонструвала виражений цитостабілізуючий вплив на клітини нейробластоми протягом понад 60 хвилин культивування з ефіром для наркозу. При додаванні в культуральне середовище перебрала, цитопротекторні ефекти не виявлялись. Таким чином, отримані нами результати свідчать про те, що протекторні впливи церебралу багато в чому визначаються співвідношенням і кількістю вмісту речовин, які здійснюють вплив на стан нервових клітин не лише в мозку цілісного організму, але і, як показали результати даного дослідження, в експериментах *in vitro*.

Література

1. Васильева И.Г. Нейроактивирующий механизм действия трофинотропина церебрала / И.Г. Васильева, А.Н. Макаренко // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2004. – Т. 67, № 4. – С. 12-15.
2. Гузева В.И. Иммунологические аспекты патогенеза геморрагических инсультов / В.И. Гузева, М.Л. Чухловина, Е.М. Мацука-

3. Гусев Е.И. Ишемия головного мозга / Е.И. Гусев, В.И. Скворцова. – М.: Медицина, 2001. – 328 с.
4. Клеринг П.Г. Структурные изменения, вызываемые диэтиловым эфиром в культивируемых клетках нейробластоми / П.Г. Клеринг, А.Н. Макаренко, В.Х. Погорелая // Нейрофизиология. – 1992. – Т. 24, №3. – С. 279-285.
5. Королев Ю.Н. Средство "Церебрал" для лечения инсульта и способ его получения / Ю.Н. Королев, А.Н. Макаренко, С.Г. Морозов // Патент Российской Федерации № 2151605 от 27.06.2006 года.
6. Макаренко А.Н. Нейрохимические и нейрофизиологические механизмы протекторного влияния неокортекса при воздействии передозировки общих анестетиков / А.Н. Макаренко. – Автореф. дисс. д.м.н. - М., 1994. – 51 с.
7. Погорелая Н.Х. Возможные механизмы влияния церебрала на морфологические характеристики клеток феохромоцитомы крысы / Н.Х. Погорелая, Д.А. Василенко, А.Н. Макаренко, С.И. Савоско // Нейрофизиология. – 2011. – Т. 43, № 1. – С. 18-28.
8. Скворцова В.И. Геморрагический инсульт / В.И. Скворцова, В.В. Крылов. – М., 2005. – 160 с.
9. Gaist D. Incidence of hemorrhagic stroke in the general population: validation of data from The Health Improvement Network / D. Gaist, M.A. Wallander, A. González-Pérez, L.A. García-Rodríguez // Pharmacoepidemiol. Drug Saf. – 2013. – Т. 22, №2. – P. 176-182.
10. Katsiki N. Stroke, obesity and gender: a review of the literature / N. Katsiki, G. Ntaios, K. Vemmos // Maturitas. – 2011. – Т. 69, №3. – P. 239-243.
11. Lansberg M.G. Risk factors of symptomatic intracerebral hemorrhage after tPA therapy for acute stroke / M.G. Lansberg, V.N. Thijs, R. Bammer [et al.] // Stroke. – 2007. – V. 38, № 8. – P. 2275-2278.
12. Pradeep H. Oxidative stress - assassin behind the ischemic stroke / H. Pradeep, J.B. Diya, S. Shashikumar, G.K. Rajanikant // Folia Neuropathol. – 2012. – V. 50, №3. – P. 219-230.
13. Stapf C. Concurrent arterial aneurysms in brain arteriovenous malformations with haemorrhagic presentation / C. Stapf, J.P. Mohr, J. Pile-Spellman [et al.] // J. Neurology Neurosurgery and Psychiatry. – 2002. – V. 73, №3. – P. 294-298.

Реферат

ВЛИЯНИЕ ФРАКЦИЙ ЦЕРЕБРАЛА НА РАЗВИТИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ В КЛЕТКАХ НЕЙРОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА IMR-32 ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЭФИРА ДЛЯ НАРКОЗА

Савоско С.И., Макаренко А.Н., Погорелая Н.Х., Васильева И.Г.

Ключевые слова: нейробластома IMR-32, фракции церебрала, морфологическая дифференцировка, эфир для наркоза.

Исследовано действие отдельных фракций церебрала на модели морфологической дифференцировки клеток нейробластоми человека IMR-32. Результаты исследования показали, что церебрал и его низкомолекулярные фракции в разной степени активируют нейритогенез низкодифференцированных клеток. Одновременно с этим церебрал оказал отчетливое протекторное влияние на процессы нейритогенеза и ретракции отростков при воздействии эфира для наркоза, чем при внесении в культуральную среду остальных изучаемых фракций препарата.

Summary

EFFECTS OF CEREBRAL FRACTIONS ON THE DEVELOPMENT OF MORPHOLOGICAL DISTURBANCES IN HUMAN NEUROBLASTOMA IMR-32 CELLS UNDER THE EXPOSURE TO DIETHYL ETHER

Savosko S.I., Makarenko A.N., Pogorela N.Kh., Vasileva I.G.

Key words: neuroblastoma IMR -32, fractions of cerebral, morphological differentiation, aether pro narcosi.

Stroke is one of the most dangerous and frequent vascular diseases of the brain. Therefore searching for medicines with neuroprotective and neuroactivating properties is very topical. Cerebral (Dnipropharm, Ukraine) is proposed as one of such preparations. It is purified composition of peptides, oligopeptides and aminoacids, which appear in the brain of animals-reconvalescents after previous modeling of acute auto-hemorrhagic stroke. The active compounds of this preparation are neuropeptides. By the mechanism of its action they are endogenous regulators of synthesis and secretion of Neural Growth Factor.

That is why we investigated the influences of Cerebral and some of its fractions on the human neuroblastoma cell culture IMR-32, in culture medium of which aether pro narcosi in toxic dose was added. The preparation was fractionated for determination of the most active compound. The results of cytoprotective influence of Cerebral and its fractions were compared to control in experiments in vitro on some stages of research.

Fractionation of Cerebral was done by gel filtration chromatography on sephadex G-25 (Pharmacia, Sweden). 7-10 ml each of three fractions was obtained.

Research conducted on human neuroblastoma cell line IMR-32. Samples of cell culture were divided on 4 groups: 1) control cells with addition of physiological saline; 2) cells cultivated in RPMI-1640 medium with addition of Cerebral; 3) substances of the I fraction were not used; 4) cells cultivated in RPMI-1640 medium with addition of Cerebral II fraction (molecular weight 1,5 – 4,5 kDa); 5) cells cultivated in RPMI-1640 medium with addition of Cerebral III fraction (molecular weight 1,2 kDa and less).

The results of our investigations show the presence of direct influence of Cerebral molecules and some of its fractions on analyzed parameters of neuroblastoma cells at the toxic influence of aether pro narcosi. During the all period of observation (95 minutes) the number of neuroblastoma IMR-32 cells with fibres in control group decreased on 61,76% after 30 minutes exposition with aether pro narcosi, and was going down to zero to the end of experiment. The previous addition in culture medium of 0,2% Cerebral solution prevented development of increase of amount of cells with neuritis during the I stage of research.

Unlike it at use of Cerebral fraction II marked pharmaco-induced cytoprotective action was observed. At other equal terms we found prolonged presence of significant amount of neuroblastoma cells with fibres without reactive neuritogenesis. At the same time at the II stage of observation cells of other experimental groups practically lost their fibres.

The results obtained allowed us to find out the tendency to the increase of cell area on 39,69% after 35 minutes of exposition with anesthetic, which correspond to the period of primary decrease of fibre length on 33,07%. The effect of application of Cerebral before the addition of aether pro narcosi on the I stage of experiment partially reminded control group cells. But later in 60 and 90 minutes of neuroblastoma cells exposition to the anesthetics, the area of cell soma markedly decreased and compared to control averaged 74,08% and 74,01% respectively.

It was earlier established, that addition of Cerebral fraction III to the culture medium increase the number of IMR-32 cells by 22,94%. General anesthetic inhibited this cell reaction, at the same time the area of cell soma especially strongly decreased on the II stage of ether narcotization - on 15,6%. It shows us partially pharmacoprotective action of Cerebral fraction III molecules on neuroblastoma IMR-32 cells. In contrast to it the effect of Cerebral fraction II molecules was different – their cell-stabilizative effect was complemented by stabilizative action on morphological processes, partial reduction of which in first 35 minutes of exposition at the influence of narcosis further didn't accompanies by additional destructive changes.

Thus, the results of our research shows that Cerebral and its fractions influence on morphological reactivity of human neuroblastoma cells at the conditions of general anesthetic overdose.