

КОМПЛЕКСНОЕ ВЛИЯНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ НА ДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ В МОЗГЕ МУТАНТОВ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

В. В. Радыш, Д. В. Максимив, А. Н. Макаренко¹

Разработана схема комплексного применения фармакологических веществ в последовательности “нейропротектор + нейроактиватор + нейроретардатор” при дегенеративных процессах в мозге. Ее терапевтическая эффективность прослежена на модельном объекте — нейродегенеративных мутантах *Drosophila melanogaster*. Установлено, что при изолированном использовании фармакологические вещества отдаляли появлению изменений: донепезила гидрохлорид (арисепт) — на 9 – 10 дней, адреналин и нимодипин (нимотоп) — на 1 – 2 дня. После комплексного применения препаратов в последовательности “арисепт + адреналин + нимотоп” достигался эффект нейрорегенерации до 15-го дня жизни имаго.

Ключевые слова: нейродегенерация, арисепт, адреналин, нимотоп, ацетилхолинэстераза

ВВЕДЕНИЕ

Нейродегенеративные заболевания (НДЗ) — гетерогенная группа хронических прогрессирующих болезней, начинающихся, как правило, в старшем возрасте и ведущих к физической, умственной отсталости и смерти [2]. Наиболее распространенными среди них являются болезни Альцгеймера, Паркинсона, разнообразные типы склерозов, атаксий, прионовые заболевания. При разных заболеваниях поражаются определенные группы нейронов, однако в их патогенезе имеются и общие закономерности [4]. Поэтому большинство исследователей считает, что лечение НДЗ должно базироваться на объединении нескольких подходов [8]. Например, при болезни Альцгеймера — это замещение нейромедиаторов в совокупности с лекарственными средствами, защищающими от токсического действия амилоид- β -протеида [5, 10, 16]. Для выявления эффектов комплексного влияния фармакологических препаратов их тестирование проводят на модельных системах. В нашей работе в качестве модельной системы использованы нейродегенеративные мутанты *Drosophila melanogaster* [11]. Дрозофила хорошо изучена в генетическом плане, установлены общие механизмы в процессах развития центральной нервной системы (ЦНС) дрозофилы и позвоночных [14], наблюдается высокое сходство между некоторыми заболеваниями ЦНС человека и развитием нейродегенеративных процессов у мух. Поэтому использование указанной модельной системы тестирования потенциальных препаратов для лечения НДЗ является инновационным и обоснованным на доклиническом этапе.

Целью работы явилось исследование эффективности комплексного поэтапного эффекта фармакологических веществ с разным механизмом действия на динамику проявления нейродегенеративных изменений в ткани мозга мутантов дрозофилы.

МЕТОДЫ И ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследованиях были использованы мутантные по генам X-хромосомы линии *D. melanogaster* (2 – 14, 76 – 15, 61 – 7, 77 – 4) с изменениями в головном мозге, полученные в нашей лаборатории индукцией этил-метансульфонатом, музейный нейродегенеративный мутант — *sws*, а также линия дикого типа Oregon (в качестве контроля). Нейродегенеративные изменения вызваны мутациями в разных комплементарных группах и проявлялись в виде вакуолей, “дырок”, в результате чего ткань мозга на гистологических срезах напоминала губку, паутину или швейцарский сыр [13].

Для исследования регенеративных эффектов веществ мы применяли следующие лекарственные средства: донепезила гидрохлорид (арисепт) — ингибитор ацетилхолинэстеразы [3], который оказывает нейропротекторное действие, останавливает распад и регенерацию нейронов, обеспечивает минимальную регенерацию; адреналин, возбуждающий все типы адренорецепторов [9]; нимодипин (нимотоп) — антагонист медленных Ca^{2+} -каналов L-типа, стабилизирует функцию нервных клеток [9]. Препараты вносили в питательную среду в концентрациях, рассчитанных, исходя из рекомендуемой максимальной суточной дозы лекарственного препарата на единицу массы (1 кг) человека, в пересчете ее на количество питательной среды (100 мл): арисепт — 2,9 мг/мл (7 мМ), адреналин — $4,8 \cdot 10^{-5}$ мг/мл (0,48 мМ), нимотоп — 3,43 мг/мл (8 мМ).

Для исследования фенотипического проявления нейродегенеративных процессов, а также для анализа динамики изменений готовили гистологические препараты срезов мозга на 1, 5, 10 и 15-й день жизни имаго по стандартной методике [14]. Анализ препаратов проводили с помощью микроскопа Carl Zeiss в ультрафиолетовом свете при увеличении 40×15 .

Для исследования активности ацетилхолинэстеразы мозга мух готовили 10 % гомогенаты в 0,1 М трис-буфере (рН 8,6) [1]. Активность энзима определяли по стандартной методике [12], принцип которой заключается в гидролизе ацетилхолина с образованием холина и уксус-

¹ Кафедра генетики и биотехнологии Львовского национального университета имени Ивана Франко, 79005, Украина, Львов, ул. Грушевского, 4.
e-mail: oazis_vir@yahoo.com

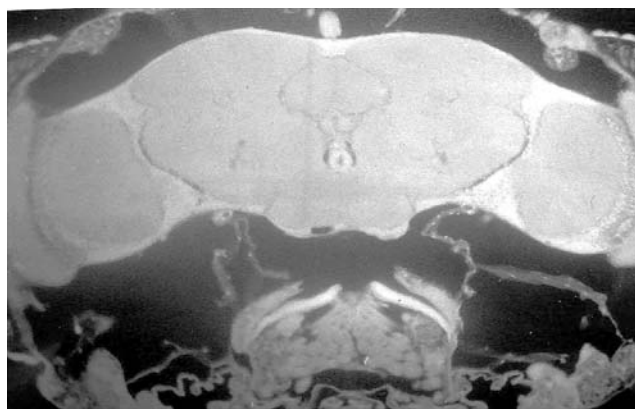
ной кислоты, количество которой определяли с помощью СФ-26 [7]. Активность фермента выражали в ммоль/с на мг белка. Количество белка в пробах определяли по методу [15]. Статистическую обработку результатов исследований проводили по [6]. Достоверной ($p \leq 0,01$) считали разницу при $t \geq 2,3$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

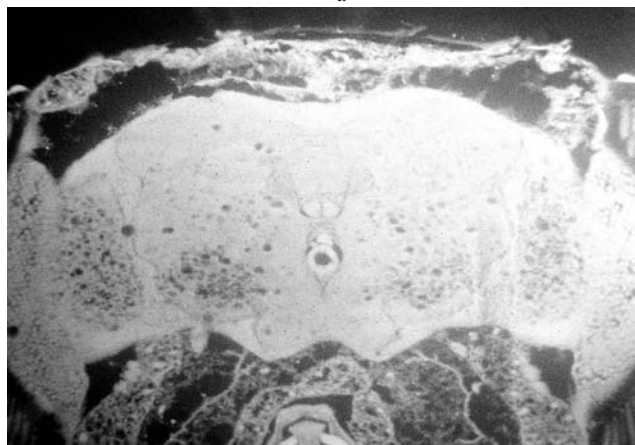
Старение у *D. melanogaster* в норме начинается после 20-го дня жизни имаго [13]. В отличие от этого нейродегенеративные изменения у исследованных мух-мутантов наблюдали у молодых особей: у линии 2 – 14 на 3-й день после вылупления мух проявлялись изменения в виде “дырок” и пятен по всей структуре головного мозга; у линии 76 – 15 на 2-й день возникала пористость ткани мозга; у *sws* уже на 1-й день прослеживались соответствующие изменения (рис. 1, б).

Теоретической основой новой схемы коррекции развития нейродегенеративных процессов с помощью фармакологических веществ с разным механизмом действия (комбинированное поэтапное влияние) явились следующие предпосылки. Поскольку все дегенерации сопровождаются выраженной потерей нейронов необходимо, прежде всего, остановить или замедлить процессы их гибели, обеспечить минимальную регенерацию. Этот первый этап — нейропротекция. Эффективными нейропротекторами считают арисепт, церебролизин и др. [2, 5]. На втором этапе (нейроактивация) следует усилить регенеративные механизмы, восстановление структурных компонентов нейронов, развитие спраутинга, что обеспечивает образование новых межнейрональных связей. Такое действие оказывают адреналин, церебрал, адемент [8, 9]. Поскольку чрезмерная активация может привести к образованию глиом, а избыток фактора роста нейронов ведет к развитию амилоидной нейродегенерации [8, 17], то важным является следующий этап (нейроретардация²), который обеспечит остановку избыточного разрастания нейритов нейронов. Здесь предлагается использовать антагонисты Ca^{2+} -каналов (нимотоп и др.).

На основе такой гипотезы (нейропротекция + нейроактивация + нейроретардация) нами разработана схема (рис. 2), принцип которой заключался в проверке на особях одного поколения эффективности влияния каждого вещества в отдельности и в разных комбинациях. В опыте арисепт вносили в среду личинкам второго возраста (I.2), а в контроле — дистиллированную воду (I.1). После вылета самцов разделяли и рассаживали: одну часть на среду с адреналином (II.4), вторую — на среду с водой (II.3; II.1). На третьем этапе (на 10-й день после вылета имаго) самцов снова разделяли и рассаживали: одну часть на среду с нимотопом (III.2; III.4; III.6; III.8); вторую — с водой (III.1; III.3; III.5; III.7). На 15-й день жизни



a



б

Рис. 1. Фенотип ткани мозга у мух *D. melanogaster* на 10-й день.

а — дикий тип Oregon; б — нейродегенеративный мутант 76 – 15.

ни мух для выявления фенотипического проявления нейродегенерации готовили гистологические срезы (табл. 1). При исследовании мух дикого типа Oregon во всех опытах наблюдали нормальный фенотип. Анализ среза головного мозга мутантов с дегенеративными процессами без влияния препаратов (III.1) выявил типичный мутантный фенотип. Все фармакологические вещества в отдельности (III.2 нимотоп, III.3 адреналин, III.5 арисепт) значительных позитивных изменений не оказывали. Однако следует отметить, что арисепт обладает большей эффективностью: у 15-дневных особей (III.5) мутантный фенотип был менее выраженным: в структуре мозга появлялись лишь единичные отверстия. Подобный фенотип наблюдали на срезах мозга мух после совместного действия двух препаратов (нимотоп + адреналин, III.4; арисепт + нимотоп, III.6; арисепт + адреналин, III.7), хотя комбинация нейроактиватор + нейроретардатор (III.4) оказалась наименее эффективной. Только в случае применения фармакологических препаратов трех групп (арисепт + адреналин + нимотоп, III.8) получено восстановление нормального фенотипа у нейродегенеративных мутантов разных генотипов. Такое поэтапное комплексное использование фармакологических средств возможно использовать и в терапии нейродегенеративных процессов при НДЗ, в основе развития которых преобладают разные патогенетические механизмы.

² Нейроретардация — новый термин, который вводится в научный обиход (от англ. retardation — замедление, задержка, опаздывание). Подразумевает торможение процессов, задержку во времени или предупреждение развития постактивационных дегенеративных изменений, развивающихся в образованиях центральной нервной системы, приводящих к гибели опытных животных. Нейроретардационный эффект нимотопа (в рукописи статьи) показывает, что он отличается от других блокаторов Ca^{2+} -каналов по признаку задержки развития процессов нейродегенерации.

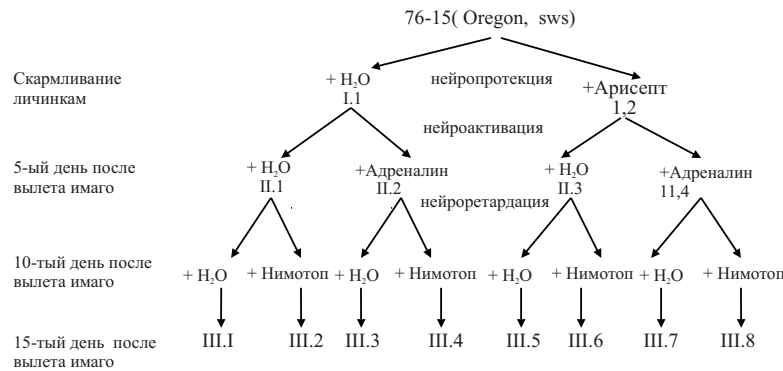


Рис. 2. Схема исследования поэтапного действия препаратов в комбинации “арисепт + адреналин + нимотоп” на нейродегенеративные процессы у мутантов *D. melanogaster*.

Нейропротекция направлена на блокирование дегенерации нейронов, одним из направлений такого действия является регуляция функционирования медиаторных систем непосредственно через влияние на активность ферментов или уровень медиаторов, которые участвуют в синаптической передаче нервных импульсов. Например, при болезни Альцгеймера нарушен механизм холинэргической передачи, уровень ацетилхолина снижен, поскольку нарушена активность ацетилхолинтрансферазы, обеспечивающей высвобождение медиатора в синаптическую щель. Способ влияния на этот фермент до сих пор не найден, поэтому дефект устраняют другим путем — подавляя активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ), которая разрушает ацетилхолин после передачи нервного импульса [7]. Среди препаратов с таким механизмом действия наиболее эффективным считается арисепт — ингибитор АХЭ [2]. Исходя из этого, была предпринята попытка анализа конкретных сдвигов в медиаторных процессах. Это выразилось, прежде всего, в исследовании активности АХЭ у нейродегенеративных мутантов на каждом этапе исследования. У дрозофилы обнаружен ген ацетилхолинэстеразы, он локализован в третьей хромосоме в локусе 87E-5. Ген клонирован, открытая рамка считывания кодирует последовательность в 650 аминокислот. АХЭ состоит из двух субъединиц 4,5 и 4,8 кД [13].

Активность фермента АХЭ измеряли после действия каждого фармакологического вещества на 5, 10, 15-й день жизни имаго. Результаты представлены в табл. 2. Анализ приведенных данных свидетельствует, что активность фермента у нейродегенеративных мутантов досто-

верно ($p \leq 0,01$) выше активности АХЭ у линии дикого типа Oregon; особенно высокий показатель ее активности выявлен у линии 2 – 14. Данная линия, а также 61 – 7 и sws относятся к одной группе комплементации, у sws и 61 – 7 активность АХЭ находится на одном уровне, а у 2 – 14 она в 1,2 раза выше, что может свидетельствовать о различном количестве холинэргических синапсов у мутантов с разным генотипом. После действия арисепта активность фермента у исследуемых линий, как и следовало ожидать, достоверно снижалась в 1,5 – 2 раза; у линии 2 – 14 наблюдалось стремительное снижение активности АХЭ более, чем в 3 раза. При влиянии адреналина, который активирует регенеративные процессы, активность фермента возрастала в 1,15 – 2 раза (повышение активности АХЭ частично вызвано также прекращением действия препарата арисепт) и практически достигала уровня контроля после добавления нейроретардатора нимотопа, который стабилизирует внутриклеточные метаболические процессы. Такое колебание активности АХЭ после комплексного воздействия фармакологических средств отражает изменения в медиаторной системе — в одном из звеньев метаболических процессов на этапе регенерации нейрона, и подтверждает наличие высокой терапевтической эффективности использования лекарственных препаратов по предложенной схеме (нейропротектор + нейроактиватор + нейроретардатор) в терапии прогрессирующих нейродегенераций.

Таким образом, нами предложена и протестирована схема комплексного влияния фармакологических препаратов в последовательности “арисепт + адреналин + нимотоп”

Таблица 1. Фенотип ткани мозга нейродегенеративных мутантов на 15-й день после поэтапного действия препаратов в разных комбинациях

Линия	Фенотип мозга							
	+ H ₂ O + H ₂ O + H ₂ O III 1	+ H ₂ O + H ₂ O + нимотоп III 2	+ H ₂ O + адреналин + H ₂ O III 3	+ H ₂ O + адреналин + нимотоп III 4	+ арисепт + H ₂ O + H ₂ O III 5	+ арисепт + H ₂ O + нимотоп III 6	+ арисепт + адреналин + H ₂ O III 7	+ арисепт + адреналин + нимотоп III 8
OR	N	N	N	N	N	N	N	N
2 – 14	M ⁺⁺⁺	M ⁺⁺	M ⁺⁺	M ⁺⁺	M+	M+	M+	N
sws	M ⁺⁺⁺	M ⁺⁺⁺	M ⁺⁺	M ⁺⁺	M ⁺⁺	M+	M+	N
76 – 15	M ⁺⁺⁺	M ⁺⁺	M ⁺⁺	M+	M ⁺⁺	M+	M+	N

Примечание. N – дикый фенотип; M – мутантный фенотип; +++ – пористая структура; ++ – большие отверстия разбросаны по всей структуре мозга; + – единичные отверстия.

Таблица 2. Активность ацетилхолинэстеразы (в ммоль/с на мг белка, $\cdot 10^{-6}$) после поэтапного действия препаратов в комбинации “арисепт + адреналин + нимотоп” на мутантов *D. melanogaster*

Линия	Препарат							
	К	t	A	t	A + A	t	A + A + H	t
Oregon	35,5 ± 0,06		19,3 ± 0,06	5,5	22,6 ± 0,1	5,5	32,5 ± 0,07	9,2
sws	37,7 ± 0,09	5,5	20,07 ± 0,1	4,6	25,1 ± 0,15	4,4	33,2 ± 0,05	5,7
2 – 14	46,7 ± 0,02	20	15,2 ± 0,02	7,5	29,5 ± 0,1	5,0	30,3 ± 0,12	4,5
76 – 15	36,5 ± 0,05	3,38	21,2 ± 0,1	4,5	25,6 ± 0,06	4,3	33,6 ± 0,13	5,7
61 – 7	37,6 ± 0,03	8,3	23,4 ± 0,05	6,6	24,1 ± 0,04	5,4	34,2 ± 0,07	6,7
77 – 4	41,0 ± 0,05	10	23,1 ± 0,06	5,3	26,2 ± 0,04	4,8	35,7 ± 0,07	5,4

Примечание. К – контроль (без влияния препаратов); А – арисепт; А + А – арисепт + адреналин; А + А + Н – арисепт + адреналин + нимотоп.

на динамику появления нейродегенераций у мутантов *D. Melanogaster*. После комплексного влияния препаратов в последовательности “арисепт + адреналин + нимотоп” активируются процессы регенерации в ткани мозга до 15-го дня жизни имаго и восстановления активности АХЭ до контрольного уровня.

ВЫВОДЫ

1. Предложена схема комплексного поэтапного применения фармакологических веществ “донепезил + адреналин + нимодипин” для исследования их действия на регенерационные процессы в мозге мутантов *D. Melanogaster*.

2. Совместное действие лекарственных средств в последовательности “нейропротектор, нейроактиватор, нейроретардатор” на 15 дней отдалает появление нейродегенеративных изменений у мутантных особей *D. Melanogaster*.

3. Показано снижение активности ацетилхолинэстеразы под действием донепезила с последующим ее восстановлением до уровня контроля под действием адреналина и нимодипина.

4. Комплексное поэтапное применение лекарственных средств в последовательности “нейропротектор + нейроактиватор + нейроретардатор” эффективнее влияет на регенерационные процессы, протекающие в мозге мутантов *D. Melanogaster*, нежели самостоятельное применение препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. О. М. Белоконь, Я. П. Бобак, Л. С. Боднар, Д. В. Максимі, *Генетика і селекція в Україні*, В. В. Могргун (ред.), Київ, Логос (2001), сс. 232 – 237.

2. Р. Бредил, А. Фридман, *Фармакол. и токсикол.*, **54**(3), 4 – 10 (1991).
3. Н. В. Верещагин, *Справочник по неврологии*, Медицина, Москва (1991).
4. Р. Д. Вуртман, *В мире науки*, № 3, 20 – 29 (1990).
5. С. Ф. Гаврилова, *Consilium medicum*, **6**(2), 15 – 31 (2004).
6. Ю. И. Иванов, О. Н. Погорелюк, *Статистическая обработка медико-биологических исследований*, Медицина, Москва (1991).
7. Н. Е. Кучеренко, *Биохимический справочник*, Выща школа, Киев (1979).
8. А. Н. Макаренко, Е. Р. Гасуль, *Болезнь Альцгеймера. Этиопатологические и клинико-терапевтические аспекты*, Киев (1999).
9. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, Т. I, Медицина, Москва (1999).
10. И. С. Петрусенко, Е. В. Верижникова, *Глиатилин. Сборник клинических наблюдений*, 64 – 78, (2003).
11. E. Buchner, *Neurogenetics*, 153 – 182, (1992).
12. S. Hestrin, *J. Biol. Chem.*, **180**, 245 – 251 (1994).
13. W. James, B. Truman, and J. Taylor, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, **21**, 1245 – 1275 (1993).
14. M. Heisenberg, D. Kretschmar, G. Hasan, and S. Benzer, *J. Neurosci.*, **17**(19), 7425 – 7432 (1997).
15. A. L. Lowri, N. I. Resebrough, A. L. Farr, and R. I. Randell, *J. Biol. Chem.*, **1**, 265 – 272 (1951).
16. H. Mossler, *Research and practice in Alzheimer's disease*, **3**, 305 – 311 (2000).
17. J. Striessing and H. Glossman, *Encyclopedia of life sciences*, 230 – 239 (2002).

Поступила 22.02.06

COMPLEX INFLUENCE OF PHARMACOLOGICAL AGENTS ON DEGENERATIVE PROCESSES IN BRAIN OF *Drosophila Melanogaster* MUTANTS

V. V. Radysh, D. V. Maksymiv, and A. N. Makarenko

Genetics and Biotechnology Department, Lviv National University, ul. Grushevskogo 4, 79005 Lviv, Ukraine
e-mail: oasis_vir@yahoo.com

A scheme of complex administration of drugs in the order neuroprotector + neuroactivator + neuroretarder for the treatment of neurodegenerative processes in the brain has been elaborated and tested on a model object representing neurodegenerative mutants of *Drosophila melanogaster*. The appearance of changes in the brain was delayed when drugs were used separately: donepezil hydrochloride (arisept), 10 – 11 days, epinephrine and nimodipine, 1 – 2 days. The treatment of flies with the same drugs in the order arisept + epinephrine + nimodipine leads to the complete regeneration of *D. melanogaster* brain tissue to within 15 days of imago life.