

ДИНАМИКА НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ И ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ МУТАНТОВ *DROSOPHILA MELANOGASTER* ПРИ ВЛИЯНИИ ЦЕРЕБРАЛА В КОМБИНАЦИИ С ДРУГИМИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИМИ ПРЕПАРАТАМИ

Е. Л. Плахта, А. Г. Кушнир, Д. В. Максимив, А. Н. Макаренко, Н. Я. Голуб, Я. И. Черник¹

Показано влияние cerebrala, его микро- и макрофракций на продолжительность жизни и динамику возникновения нейродегенераций у дрозофилы. Не выявлено доза — эффект зависимости при исследовании различных концентраций “тотального” препарата. Использование cerebrala в качестве нейроактиватора в комбинации с пираретамом и верапамилем оказалось наиболее эффективным: увеличивалась продолжительность жизни особей и отдалялось появление дегенераций в мозге.

Ключевые слова: нейродегенерация, пираретам, верапамил, cerebrал, дрозофила

ВВЕДЕНИЕ

Исследования нейродегенеративных процессов (НДП) являются определяющими для выявления геназа распространенных заболеваний центральной нервной системы. Современная фармакология обладает значительным арсеналом лечебных средств для их терапии, однако использование многих препаратов часто не сопровождается желаемым эффектом при лечении нейродегенераций [9, 12, 15]. В связи с этим в последнее время заметно повышение интереса к поиску лекарственных средств, полученных при использовании различных вариантов биологических моделей. Они касаются идентификации и получения из тканей или отдельных клеток организма (в определенных условиях) значительного количества эндогенных веществ с выраженной фармакологической активностью [1]. Недавно в лечении нейродегенеративных заболеваний (НДЗ) началось использование средств пептидной природы, в частности, cerebrala и адеманта [3, 4], механизм действия которых окончательно не выяснен.

Одним из всесторонне изученных эукариотических модельных объектов генетики является *Drosophila melanogaster*. Этот объект обладает значительной гомологией (около 70 %) к структуре и функции генов, включенных в процессы дифференциации и развития нейродегенераций человека [5, 6, 10]. С помощью индуцированного этилметансульфонатом мутагенеза нами получено большое количество нейродегенеративных мутантов *D. melanogaster* — аналогов нейропатологий человека [7]. Целью работы стало исследование влияния cerebrala и его отдельных фракций на продолжительность жизни и динамику появления нейродегенераций у мутантов дрозофилы с изменениями в ткани головного мозга.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на линиях нейродегенеративных мутантов по X-хромосоме (*sws*, 76 – 15, 61 – 7), которые характеризовались укороченной продолжительностью жизни и ранним (1 – 5-й день жизни имаго) возникновением НДП в клетках мозга [7]. В качестве контроля была использована линия дикого типа Oregon. Для изучения влияния лекарственных средств на развитие НДП их вводили в питательную среду в концентрациях, которые высчитывали, исходя из максимальной терапевтической суточной дозы (*dosis therapeutic max.*) препарата на единицу массы человека в пересчете ее на 100 мл питательной среды. Пираретам использовали в дозе 0,085 мг/100 мл среды, верапамил — 2,8 мг/100 мл. Для cerebrala ранее была изучена зависимость доза — эффект. Последний вводили в среду в разных количествах: 26 мкл/100 мл (однократная доза), 260 мкл/100 мл среды (10-кратная доза) и 2600 мкл/100 мл среды (100-кратная доза). Cerebrал не оказывал токсического и негативного действия на жизнеспособность особей. Анализ гистологических срезов мозга мутантов дрозофилы показал, что корреляции между концентрацией препарата и ингибированием развития нейродегенерации не наблюдалось. Исходя из этого, в работе была использована однократная доза cerebrala 26 мкл/100 мл среды. В качестве контрольного средства во всех экспериментах использовали бидистиллированную воду. Гистологические препараты головного мозга мух изготавливали по стандартной методике [8, 13] и анализировали в ультрафиолетовом свете на микроскопе Laboval-3 Carl Zeiss Jena при увеличении 15 × 40. Срезы для электронной микроскопии (с предшествующей фиксацией материала в растворе 0,1 М какодилата натрия и 2,5 % глутаральдегида и последующей постфиксацией его в 2 % растворе тетраокиси осмия) готовили на ультрамикротоме УМПТ-6М согласно методике [2]. Статистическую обработку данных проводили с помощью компьютерной программы Excel.

¹ Кафедра генетики и биотехнологии (зав. — проф. В. А. Федоренко) Львовского национального университета имени Ивана Франко, г. Львов, 79005, Украина, ул. Грушевского, 4. e-mail: maksimiv@mail.ru

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В исследованиях на насекомых с нейродегенерацией был использован церебрал — смесь протеинов, пептидов, низкомолекулярных пептидов и свободных аминокислот. Этот экстракт водорастворимых молекул был выделен [1, 3] из коры большого млекопитающих, у которых моделировали геморрагический инсульт. После геморрагического инсульта в мозге животных происходят регенеративные и репарационные процессы, стимулируются рост нейритов, процессы спрутинга и синапсообразования. Было показано [1, 11], что церебрал реализует свое фармакологическое (антиинсультное) действие, усиливая синтез NGF (фактора роста нейронов), оказывает модулирующее влияние на иммунную систему подопытных животных, что может быть одним из основных механизмов его нейроактивирующего действия. Гипотетически этот механизм приостанавливает развития НДП и активацию репаративных процессов, что изучалось в проведенных нами экспериментах.

Первым этапом работы было исследование эффективности действия церебрала в зависимости от его дозы. Анализ гистологических препаратов мозга мутантов дрозофилы показал, что корреляции между ингибированием нейродегенерации и концентрацией препарата не наблюдалось.

Для выявления фармакологически наиболее активно действующих компонентов церебрала его разделили на две фракции. В нашей работе исследовано влияние “тотального” средства, его низкомолекулярных (< 1000 Da) и высокомолекулярных (> 4,5 kDa) фракций на развитие НДП в мозге мутантов *D. melanogaster*. Данные таблицы показывают, что церебрал и его фракции обладают фармакологической активностью. “Тотальный” церебрал отодвигает появление нейродегенераций до 7–8 дней жизни имаго, а его фракции задерживают развитие НДП на 5–6 дней в зависимости от генотипа исследованных линий. Таким образом, “тотальный” церебрал более эффективен относительно отдаления появления нейродегенераций, нежели его микро- и макрофракции.

На рис. 1, а представлены электронно-микроскопические фотографии мозга мух дикого типа и линии sws под влиянием церебрала. Ультраструктура мозговой ткани нейродегенеративного мутанта 76–15 свидетельствует о повреждении: хроматин конденсирован и фрагментирован, вакуоли и пробелы разного размера являют собой определенные зоны дегенерирующих нейронов (рис. 1, б; белые стрелки). После затравки особой линии 76–15 “тотальным” церебралом мозговая ткань характеризовалась отсутствием макровакуолей, нормальной организацией хроматина и становилась похожей на ткань мозга мух дикого типа (рис. 1, в).

В последние годы предпринимаются попытки использовать в терапии НДЗ комбинированное влияние фармакологических средств с разными механизмами

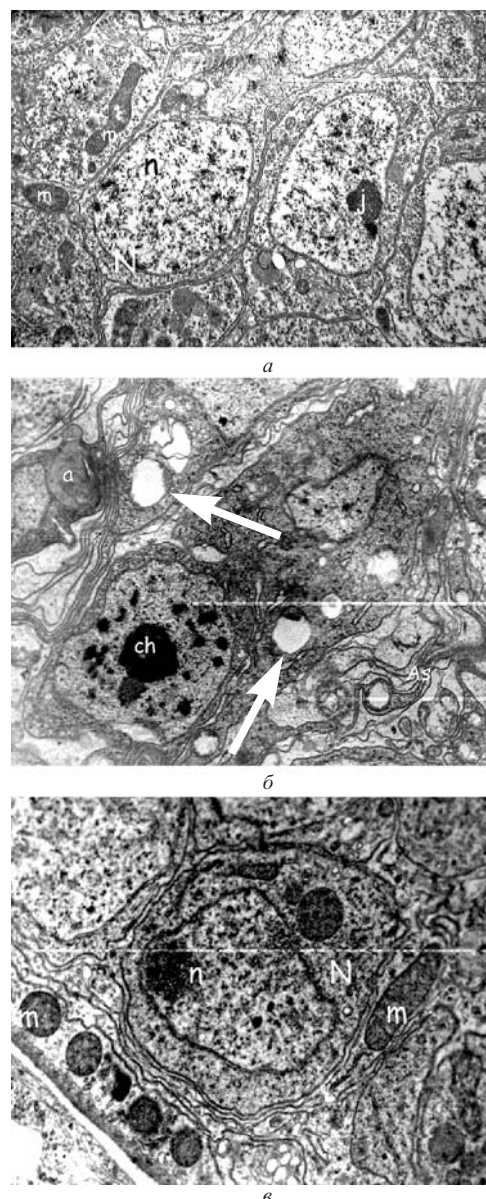


Рис. 1. Электронограммы мозга дрозофилы ($\times 400$). а — дикий тип (линия Oregon), б — мутант 76–15 (контроль), в — мутант 76–15 под влиянием церебрала; N — нейрон, n — ядро, m — митохондрия, ch — хроматин; стрелками указаны пробелы и вакуоли в ткани мозга.

действия [9, 12]. В частности, первым и наиболее важным шагом является остановка процессов отмирания нейронов за счет апоптоза и некроза, то есть нейропротекция. Следующим этапом комбинированного подхода является нейроактивация — возобновление энергетического обмена и структурных компонентов поврежденных нейронов, что ведет к образованию и стабилизации новых нейрональных связей. Завершающим этапом этой схемы выступает нейроретардация, которая приводит к остановке чрезмерного разрастания отростков нейронов, что сопровождается активацией новой волны НДП. Такая схема влияния комбинации фармакологических средств пирацетам + цереб-

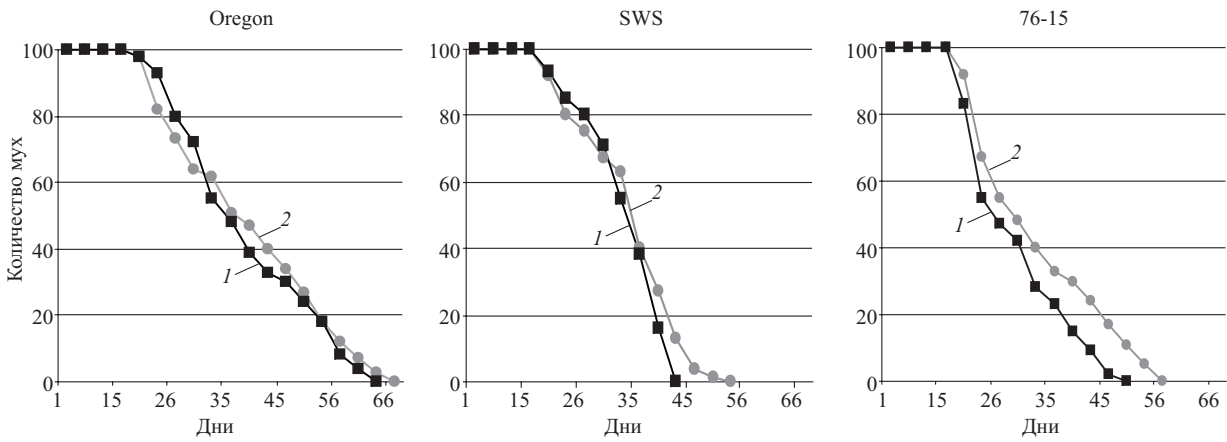


Рис. 2. Кривые выживания особей дрозофилы после комбинированного влияния пирацетама, церебрала и верапамила.

1 — контроль, 2 — + пирацетам + церебрал + верапамил.

рал + верапамил была апробирована на нейродегенеративных мутантах *D. melanogaster*. Она оказалась эффективной (таблица). При совместном влиянии этих препаратов появление нейродегенеративных процессов в мозге мутантов отдалось до 17–20-го дня жизни имаго. Построены кривые выживания и проанализированы параметры продолжительности жизни мутантов дрозофилы при действии “тотального” церебрала. Показано, что мутантные линии имели сниженную продолжительность жизни по сравнению с диким типом на 20–25 %, что является следствием нарушения метаболизма нервных клеток и отмирания групп нейронов, которые выполняют жизненно важные функции. Выявлено, что более эффективно действует “тотальный” церебрал на линию *sws*, приводя к увеличению продолжительности жизни исследуемых особей на 6 % по сравнению с контролем. Влияние микро- и макрофракций на продолжительность жизни нейродегенеративных мутантов оказалось более успешным — их использование увеличивало среднюю продолжительность жизни мух на 6–13 %. Наибольший эффект наблюдали после использования комбинации пирацетам + церебрал + верапамил: средняя продолжительность жизни увеличивалась на 10–23 % по сравнению с контролем (рис. 2).

С целью выяснения способности церебрала влиять на процессы регенерации в ткани головного мозга (когда уже появились начальные изменения в мозге),

мы использовали мутантов дрозофилы с поздним проявлением дегенераций (на 10-й день жизни имаго). Опыт проводили двумя способами. В первом случае скармливали церебрал взрослым имаго (10-дневным), внося препарат в верхние слои среды. Во втором случае церебрал наносили на фильтровальную салфетку в чистый (без среды) стаканчик, в который помещали на ночь взрослых имаго после 4-часового голодания. Контролем служили особи той же линии без воздействия церебрала. Срезы мозга подопытных насекомых готовили каждодневно с 11-го по 17-й дни жизни мух. Анализ препаратов ткани мозга не выявил отличий: у всех имаго в течение исследованного периода проявлялся мутантный фенотип, который прогрессировал с возрастом особей. Очевидно, церебрал проявляет протекторное действие — приостанавливает нейродегенеративные процессы, но не оказывает регенерирующего воздействия в измененной ткани мозга.

Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования церебрала как “одиночного” препарата, так и в комбинации с другими фармакологическими средствами.

ВЫВОД

На основании полученных результатов можно сделать заключение об эффективности влияния церебрала и его фракций на нейродегенеративные процессы: де-

Фенотипическое проявление изменений в ткани мозга мутантов дрозофилы после воздействия церебрала, его фракций, а также в комбинации с другими фармакологическими средствами

Линия	+H ₂ O, день			+церебрал, день			+микрофракции, день			+макрофракции, день			+пирацетам+церебрал+верапамил, день		
	5	10	15	5	10	15	2	6	10	2	6	10	5	15	20
Oregon	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<i>sws</i>	M	M	M	N	M	M	M	M	M	N	M	M	N	N	M
76–15	M	M	M	N	M	M	N	M	M	N	N	M	N	N	M
61–7	M	M	M	N	M	M	N	M	M	N	M	M	N	N	M

Примечание. N — нормальный фенотип ткани мозга, M — мутантный фенотип, повреждена ткань головного мозга.

генерация мозга у насекомых задерживается и наступает после 5 – 8-го дня жизни имаго в зависимости от генотипа линии, а продолжительность жизни возрастает на 6 – 13 % по сравнению с контролем. Следует отметить, что применение церебрала как нейроактиватора в комбинации с пирacetамом и верапамилом является наиболее эффективным.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. Г. Аркадьев, А. Н. Макаренко, Л. В. Новик и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **65**, № 2, 20 – 23 (2002).
2. Г. Гайер, *Электронная гистохимия*, Мир, Москва (1974).
3. А. Н. Макаренко, Н. С. Косицын, М. М. Свинов, И. В. Назимов, *Архів психіатрії*, № 2 (37), 141 – 145 (2004).
4. А. Н. Макаренко, Ю. Н. Королев, С. В. Касьянов, *Архів психіатрії*, № 2, 3 (17, 18), 138 – 143 (1998).
5. В. Радиш, І. Ступницька, М. Кучеренко и др., *Цит. и генет.*, 39, № 4, 45 – 52 (2005).
6. В. В. Радыш, Д. В. Максимив, А. Н. Макаренко, *Экспер. и клин. фармакол.*, **69**, № 5, 16 – 19 (2006).
7. Г. Щербата, Н. Матийцив, Я. Чернык и др., *Генетика*, **40**(9), 1286 – 1292 (2004).
8. M. Ashburner, *Drosophila: a laboratory manual*, NY, USA: Cold Spring harbor Univ. Press, V. 1, (1989).
9. R. Bullock, *Br. J. Psychiatry*, **180**, 135 – 139 (2002).
10. M. Driscoll and B. Garstbrein, *Genetics*, **4**, 181 – 194 (2003).
11. G. Danilenko and O. Makarenko, *J. neurobiology*, № 1, 1 – 12, (2002).
12. S. Fanh and D. Sulzer, *J. Amer. Society Experim. Neurotherap.*, **1**, 139 – 154 (2004).
13. R. Greenspan, *Fly pushing. The theory and practice of Drosophila genetics*, NY, USA: Cold Spring harbor Lab. Press, (1997).
14. L. Higgins and Cordell., *Neurodegeneration*, **4**, 117 – 129 (1995).
15. St. Hurlley and J. Hardy, *Science*, **282**, 171 – 183 (1998).

Поступила 23.04.08

DYNAMICS OF NEURODEGENERATIVE PROCESSES AND LIFESPAN UNDER THE ACTION OF CEREBRAL COMBINED WITH OTHER PHARMACEUTICALS IN DROSOPHILA MELANOGASTER MUTANTS

E. L. Plahta, A. G. Kushnir, D. V. Maksimiv, A. N. Makarenko, N. Ya. Holub, and Ya. I. Chernyk

Genetics and Biotechnology Department, Ivan Franko National University, Grushevsky str. 4, 79005, Lvov, Ukraine

Effective influence of the drug Cerebral and its micro- and macrofractions on the mean lifespan and degenerative process dynamics of *Drosophila melanogaster* have been investigated. No dose – effect dependence was detected when different concentrations of Cerebral were used. The administration of Cerebral as a neuroactivating remedy combined with piracetam and verapamil was most effective, leading to an increase in the lifespan and a delay in the appearance of brain degenerative processes.

Key words: Neurodegeneration, piracetam, verapamil, cerebral, drosophila