

ГЕНЕТИКА ЛЮДИНИ ТА МЕДИЧНА ГЕНЕТИКА

БАБІЙ І.П., ПОБЕРЕЖНИК О.В., ГОЛУБ Н.Я., ЧЕРНИК Я.І.

Львівський національний університет імені Івана Франка,

Україна, 79005, Львів, вул. Грушевського, 4, email: irinanet@centrum.cz

ВПЛИВ ЛАЗЕРНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ І ФАРМОКОЛОГІЧНОГО ПРЕПАРАТУ ЦЕРЕБРАЛУ НА ДЕГЕНЕРАТИВНІ ТА РЕГЕНЕРАТИВНІ ПРОЦЕСИ У СТРУКТУРІ ГОЛОВНОГО МОЗКУ МУТАНТІВ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

В наш час актуальними залишаються дослідження генетично зумовлених захворювань нервової системи людини. Нейродегенеративні захворювання (НДЗ) займають чи не найперше місце серед таких поширених патологій як онкологічні, судинні, імунні. Нейродегенеративні розлади – це група хронічних прогресивних захворювань, які починаються у зрілому віці, призводять до фізичних та розумових розладів і передчасної смерті. Хвороби Альцгеймера, Паркінсона, Гантінгтона, атаксійні синдроми та ін., які пов'язані із втратою нейронів у певних ділянках мозку, є спадково зумовлені – локалізовано гени, які детермінують їх розвиток [1, 2]. В останні роки досягнуто певного прогресу у терапії НДЗ. Застосовано низку фармакологічних препаратів із різними механізмами дії, але жоден з них не дає 100% ефективності при лікуванні [2, 5, 6].

На сьогоднішній день швидкими темпами впроваджується в практичну медицину застосування лазерної терапії і хірургії. З наукових джерел [7] відомо про використання лазерного випромінювання для лікування захворювань нервової системи людини, а саме хвороб Паркінсона та Альцгеймера. Беручи до уваги факт подібності процесів диференціації і дегенерації нервової системи в різних організмів, а також високу еволюційну консервативність генів (до 70%) [11], які контролюють ці процеси, дослідження проводили на модельному еукаріотичному об'єкті – *Drosophila melanogaster*. Метою даної роботи було дослідити вплив лазерного випромінювання і макрофракції фармакологічного препарату церебралу на дегенеративні та регенеративні процеси у структурі головного мозку нейродегенеративних мутантів *D. melanogaster*.

Матеріали і методи

Матеріалом дослідження служили мутантні лінії *D. melanogaster* 76.15, 28.11 і 3.5.8 зі змінами структур головного мозку, попередньо отримані в нашій лабораторії під впливом етилметансульфонату [3, 8], а також лінія дикого типу Oregon (в якості контролю). Нейродегенеративні зміни у мутантів виявлялися у вигляді вакуолей, отворів, прогалин, у результаті чого тканина мозку на гістологічних зрізах нагадувала губку, павутину, або швейцарський сир [3].

У роботі було проаналізовано декілька варіантів дослідів по впливу фармакологічного препарату церебралу (личинкове згодовування, обробка препаратом імаго) та двох видів лазерного випромінювання (сканованого і неперервного). Церебрал вносили в поживне середовище в концентрації, яку розраховували, виходячи з рекомендованої максимальної добової дози фармакологічного препарату на одиницю ваги людини в перерахунку її на 100мл поживного середовища (3,6мг /100мл середовища). Доза сканованого випромінювання – 0,2 мДж та неперервного – 40 мДж. Використовували максимально допустиму дозу, виходячи з даних по застосуванню лазерного випромінювання у терапії стосовно людини [4].

Для дослідження фенотипового прояву структур головного мозку виготовляли гістологічні препарати зрізів мозку за методом Джагера і Фіжбака [10]. Аналізували препарати за допомогою мікроскопа марки Carl Zeiss в ультрафіолетовому світлі при збільшенні 12 x 40. Мух утримували в термостаті при температурі 25°C в пробірках, заповнених стандартним поживним середовищем [9].

Результати та обговорення

Поява нейродегенерацій у досліджуваних мутантів зафіксована в різні терміни: у лінії 76.15 пористість тканини мозку виникає вже на 2–3 день життя імаго; у лінії 3.5.8 та 28.11 вакуолі різного розміру по всій мозковій тканині простежуються на 10 – 11 день.

У досліді використали церебрал – суміш білків, низькомолекулярних пептидів і вільних амінокислот. Екстракт водорозчинних молекул був виділений групою авторів [2, 5] із кори головного мозку ссавців, у яких відбувся геморагічний інсульт. Після цього у мозку тварин відбуваються активні регенеративні і репараційні процеси, стимулюється ріст нейронів і синапсоутворення. Церебрал підсилює синтез NGF (фактора росту нейронів), проявляє моделюючий вплив на імунну систему піддослідних тварин, що може бути одним із основних механізмів його нейроактивуючої дії.

Ми дослідити вплив церебралу на дегенеративні процеси в структурі головного мозку нейродегенеративних мутантів дрозофіли. У табл. 1 наведено результати досліджень по впливу препарату методом личинкового згодовування на динаміку появи змін у мозковій тканині мутанта 76.15. Гістологічні препарати зрізів головного мозку виготовляли у мух з 1 по 11 день життя. Результати аналізу засвідчили, що церебрал відтерміновує появу мутантного фенотипу на 6 – 7 днів. Препарат блокує порушення метаболічних процесів і частково відновлює функцію нейронів, але ці процеси не є довготривалими, і в мутантних особин з 9 –10 денного віку нейродегенеративні зміни знову виявляються (рис.1).

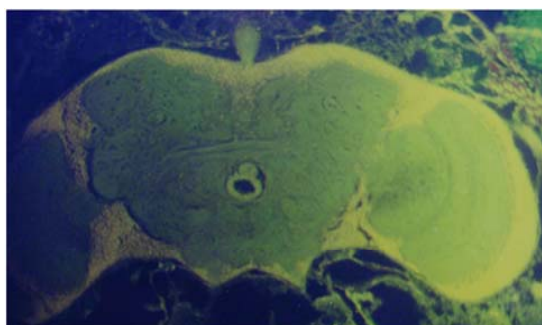
Таблиця 1

Динаміка появи змін у мутантів *D.melanogaster* лінії 76.15 після впливу церебралу (личинкове згодовування)

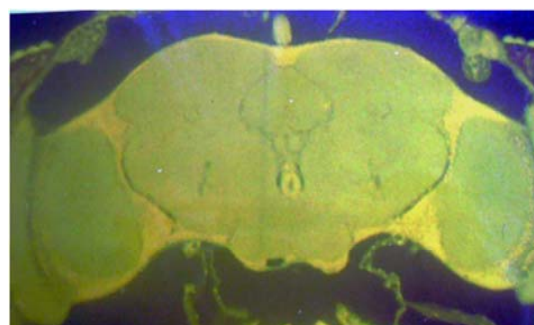
Вид досліджу	Дні										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
контроль	N	N	N/M	M	M+	M+	M+	M++	M++	M++	M++
дослід	N	N	N	N	N	N	N	N	N/M	M	M+

Примітка. N – фенотип дикого типу; M – мутантний фенотип; + – поодинокі плями, малі отвори; ++ – великі отвори.

Для лінії 3.5.8 було показано, що під впливом церебралу (личинкове згодовування) зони дегенерації у структурі мозку не виявлялися до 13-го дня життя імаго (в той час як без дії препарату – до 10-го дня).



А



Б

Рис.1. Гістологічні зрізи мозку лінії 76.15 при личинковому згодовуванні церебралу: А – 11 денні, Б – 6 денні

З метою визначення можливого впливу церебралу на регенеративні процеси в тканині головного мозку (коли вже появилися початкові зміни), ми використали мутантну лінію 3.5.8 з пізнім проявом нейродегенерацій. В одному випадку згодовували церебрал дорослим 10-денним імаго, вносячи препарат у верхні шари поживного середовища, у другому – наносили на фільтрувальну салфетку в пробірку (без середовища), в яку поміщали на ніч дорослих імаго. Контролем служили особини лінії 3.5.8 без дії препарату. Гістологічні зрізи мозку виготовляли щоденно з 11-го по 17-ий дні життя мух. Аналіз препаратів тканини мозку не показав відмінностей – у всіх імаго впродовж досліджуваного періоду проявлявся мутантний фенотип, який прогресував з віком особин (табл. 2).

Таблиця 2

Динаміка появи змін у мутантів *D.melanogaster* лінії 3.5.8 після впливу церебралу (обробка препаратом імаго)

Вид досліджу	Дні						
	11	12	13	14	15	16	17
контроль	N/M	M	M	M+	M+	M+	M++
середовище +церебрал	N/M	M	M	M+	M+	M+	M++
фільтр+церебрал	N/M	M	M	M+	M+	M+	M++

Отже, фармакологічний препарат церебрал проявляє нейропротекторну дію – призупиняє нейродегенерації, але не призводить до регенеративних процесів у головному мозку мутантів *D. melanogaster*.

Застосування лазерної терапії і хірургії, яка є безмедикаментозною, не призводить до звикання, не має побічних ефектів; посилює дію лікарських препаратів, дозволяючи значно зменшити їх дозу [7]. Нами досліджено вплив двох видів лазерного випромінювання – сканованого і неперервного – на регенеративні процеси у структурі головного мозку мутантних ліній 76.15 та 28.11. Як контроль використано неопромінених особин. Як видно з табл. 3, у лінії 76.15 з раннім проявом нейродегенерацій як в контролі, так і під впливом випромінювання впродовж з 4 по 10 дні життя імаго на всіх зрізах мозку проявлявся мутантний фенотип – регенеративні зміни у тканині головного мозку не відбувалися.

Таблиця 3

Динаміка появи змін у мутантів *D. melanogaster* лінії 76.15 після впливу лазерного випромінювання

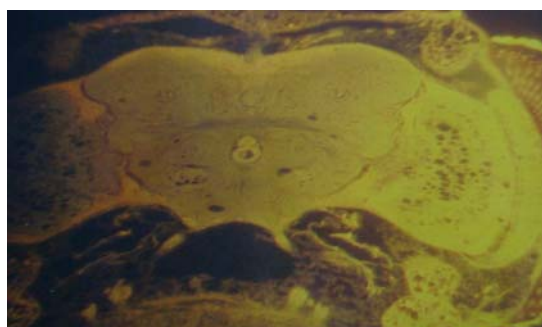
Вид досліджу	Дні						
	4	5	6	7	8	9	10
контроль	M	M+	M+	M+	M++	M++	M++
скановане випромінювання	M	M+	M+	M++	M++	M++	M++
неперервне випромінювання	M	M+	M+	M++	M++	M++	M++

Не призводить до відновлення пошкодженої структури мозку вплив лазерного випромінювання і у мух лінії 28.11 з пізнім проявом нейродегенерацій – впродовж з 10 по 14 день життя у всіх проаналізованих особин спостерігався мутантний фенотип (табл. 4, рис. 2).

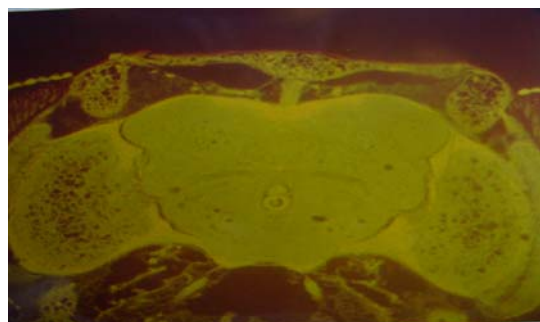
Таблиця 4

Динаміка появи змін у мутантів *D.melanogaster* лінії 28.11 після впливу лазерного випромінювання

Вид досліджу	Дні				
	10	11	12	13	14
контроль	N/M	M	M+	M+	M++
скановане випромінювання	N/M	M	M+	M++	M++
неперервне випромінювання	N/M	M	M+	M++	M++



А



Б

Рис. 2. Нейродегенеративні зміни у структурі головного мозку у мух лінії 28.11 на 14 день життя імаго: А - контроль, Б – після дії лазерного випромінювання

Таким чином показано, що ефективнішою у затримці розвитку нейродегенерацій у *D. melanogaster* є дія фармакологічного препарату церебралу, ніж лазерного випромінювання. Однак, жоден з проаналізованих чинників не призводив до регенеративних процесів у тканині головного мозку досліджених мутантів як з ранньою, так і з пізньою нейродегенерацією.

Література

1. Абрамов В.А., Івнев Б.Б., Казаков В.Н. и др. Болезнь Альцгеймера. – Донецк, 2001, – 625 с.
2. Бредли Р., Фримен А. Эффекты холинергических препаратов при болезни Альцгеймера // Фармакология и токсикология. – 1991. – Т. 54, № 3. – С. 4–10.
3. Бобак Я.П., Кімак Н.Я., Максимів Д.В., та ін. Пошук морфологічних змін мозку, індукованих етилметансульфанатом, в лінії Oregon *Drosophila melanogaster* // Цитологія і генетика. – 2001. – № 6. – С.34–37.
4. Гримблатов В.М. Индивидуализация дозы в лазеротерапии // Науч. приборостроение. – 1995. – № 3. – С. 102–109.
5. Даумумен И.В. Современные подходы к терапии болезни Альцгеймера // Журнал неврологии и психиатрии. – 1998. – Т. 12. – С. 56–62.

6. *Макаренко А.Н., Григорьева Т.И., Гасуль Е.Р. и др.* Адемент – новое и эффективное средство для лечения болезни Альцгеймера // Стресс и поведения. Материалы 7-й Междунар. конф. по биол. психиатрии. – М., 2003. – С.60.
7. *Самосюк И.З., Карабень И.Н., Березецкая Н.М., Гаркавенко В.В.* Эффективность магнитолазерной терапии у пациентов с болезнью Паркинсона: результаты клинкоэлектрэнцефалографического исследования // Український медичний часопис. – 2004, – № 5 (43) – IX/X. – С. 54–60.
8. *Щербата И.Р., Матийцив Н.П., Черник Я.И.* Генетический анализ нейродегенеративных мутантов *Drosophila melanogaster* по X – хромосоме, индуцированных этилметансульфаном и нитрозэтилмочевинной // Генетика, 2004. – Т. 40, № 9. – С. 1280–1285.
9. *Greenspan R. J.* Fly puhsing. The Theory and practice of *Drosophila* genetics // Gold Spring harbor Lab. Press., NY, USA. – 1997. – P. 23–46.
10. *Heisenberg M., Bohl K.* Isolation of anatomical brain mutants of *Drosophila* by histological means. *Z. Naturforsch [C]*. – 1979. – vol. 34.
11. *Paul A., Hardy I.* Genetic aspects of nervous system development // *J. neurogenetics*. – 1990. – vol. 6. – P. 115–131.

Резюме

У проведених дослідках вивчалась дія лазерного випромінення та фармакологічного препарату церебралу на дегенеративні та регенеративні процеси у структурі головного мозку нейродегенеративних мутантів *D. melanogaster*. Церебрал призводив до відтермінування появи змін у тканині мозку на 6 – 7 днів у мутантів з ранньою дегенерацією; дія лазерного випромінювання такого результату не виявила. Регенеративні процеси після прояву мутантного фенотипу не спостерігалися.

В проведених опытах изучалось действие лазерного излучения и фармакологического препарата церебралу на дегенеративные и регенеративные процессы в структуре головного мозга нейродегенеративных мутантов *D. melanogaster*. Церебрал приводил к отсрочиванию появления изменений в ткани мозга на 6 – 7 дней у мутантов с ранней дегенерацией; действие лазерного излучения такого результата не обнаружило. Регенеративные процессы после проявления мутантного фенотипу не наблюдались.

The influence of laser radiation and pharmacological preparation cerebral was studied on degenerative and regenerative processes in the brain structure of neurodegenerative mutants of *D. melanogaster*. Cerebral causes delaying of changes into brain tissues of mutant with early degeneration for 6 - 7 days; the influence of laser radiation doesn't cause the same results. The regenerative processes after appearance of mutant phenotype weren't observed.

БАГАЦКАЯ Н.В., НЕФИДОВА В.Е.

*ГУ «Институт охраны здоровья детей и подростков АМН Украины»,
Украина, 61153, Харьков, пр. 50-лет ВЛКСМ, 52-А, e-mail: iozdp@ukrpost.ua*

ОЦЕНКА СТАБИЛЬНОСТИ ХРОМОСОМНОГО АППАРАТА ПОДРОСТКОВ, БОЛЬНЫХ ОСТЕОАРТРОЗОМ, ДО И ПОСЛЕ МУТАГЕННОЙ НАГРУЗКИ МИТОМИЦИНОМ С IN VITRO

Изучение стабильности функционирования генетического аппарата у человека является одним из фундаментальных вопросов современной цитогенетики, в связи с тем, что повреждения генома могут составлять основу нарушений иммунной системы, развития канцерогенеза, снижения продолжительности жизни. Развитие методов современной генетики показало наличие большого количества спонтанных повреждений ДНК, возникающих под влиянием эндогенных причин, и только небольшая часть этих повреждений реализуется в конечные цитогенетические аномалии. Известно, что