

УДК 575.162:57.024:591.185.1

**Н. П. Матійців**, к.б.н., доцент,**І. І. Могиляк**, аспірант,**О. І. Труш**, аспірант,**Я. І. Черник**, к.б.н., доцент

Львівський національний університет імені І. Франка,

кафедра генетики і біотехнології,

вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна, e-mail:m.n.p@mail.ru

**РУХОВА АКТИВНІСТЬ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНИХ МУТАНТІВ  
*DROSOPHILA MELANOGASTER***

Використовуючи різні методичні підходи вивчено рухову активність мутантів *Drosophila melanogaster* із дегенерацією клітин мозку. Встановлено відмінність локомоторної поведінки мутантів від лінії дикого типу. Поведінкові відхилення корелювали з генотипом і функціональними змінами у мозку.

**Ключові слова:** нейродегенерація, поведінка, рухова активність, дрозофіла.

Мутації, що зумовлюють дегенеративні зміни в нервових клітинах є й причиною порушень поведінки. Гени контролюють не безпосередньо поведінкові реакції, а особливості організації мозку, його структури і складових, і вже через особливості цієї організації успадковується специфіка поведінки. Тому важливим є дослідження генетичного контролю як нормальних поведінкових реакцій, так і патологічних форм, які, зокрема, зумовлені нейродегенеративними змінами мозку. Спадкові нейродегенеративні хвороби людини супроводжуються деменцією та порушеннями поведінки [4, 8]. Однак вивчення природи нейродегенеративних хвороб людини та поведінкових змін під час перебігу захворювання ускладнюється низкою методичних та етичних проблем. Останнє десятиліття досліджень нейродегенерації у модельних об'єктів підтвердило важливу роль вивчення цих процесів у *Drosophila melanogaster* [9, 12]. Еволюційно високо організована нервова система дрозофіли, короткий період генерації, наявність у геномі багатьох генів-ортологів людини доводять доцільність вивчення генетично зумовленої дегенерації мозку та поведінкових змін, що її супроводжують, у *D. melanogaster*. Метою дослідження було вивчити особливості рухової поведінки у особин різних мутантних ліній *D. melanogaster*, що характеризувались дегенеративними змінами мозку, в порівнянні з лінією дикого типу. При цьому поставлено завдання визначити індекс рухової активності у «клаймбінг тесті» та довільну рухливість у «відкритому полі» мутантних особин із різними механізмами дегенерації мозку.

**Матеріали та методи дослідження**

Матеріалом дослідження служили нейродегенеративні X-зчеплені мутанти: лінії 76-15 та 72-7, одержані в лабораторії шляхом хімічного мутагенезу [1; 3], лінія

*sws<sup>o/E</sup>* отримана з музею Bloomington Drosophila Stock Center (США), лінія *sws<sup>l</sup>* люб'язно надана Д. Кречмар (Dr. Doris Kretzschmar) [10, 11] та лінія *sni<sup>l</sup>* люб'язно надана професором Ш. Шнеулі (Prof. Stephan Schneuwly) [6]. Як контроль використовували лінію дикого типу *Oregon-R*. Мух утримували на стандартному середовищі при температурі +25 °С в затемненому термостаті. Аналізували поведінку самців. Всі поведінкові тести проводили у той же самий час доби за однакових умов освітлення лампою денного світла та при кімнатній температурі (+22 – +24 °С). Досліджувані особини перед тестуванням не піддавались ефірізації як мінімум протягом доби.

Індекс рухової активності визначали, проводячи “клаймбінг тест” (climbing test) з використанням установки для визначення фототаксису [5] із деякими модифікаціями [9]. Установка представляє собою п'ять послідовних пробірок. Підраховували кількість самців, що переповзли у верхню пробірку за 30 секунд. Не даючи часу на відпочинок, струшували мух з п'ятої пробірки у першу і через 30 секунд підраховували кількість самців, які залишились в ній. Ті особини, які переповзли у верхню, п'яту пробірку, знову без відпочинку перекидали у наступну пробірку, і так аж до останньої пробірки в установці. Цей тест проводили для 1–3, 4–6, 10–12, 16–18-денних імаго, тестували по 160 особин кожного генотипу. Індекс рухової активності розраховували за формулою:

$$\frac{(n_1) + (n_2 \times 2) + (n_3 \times 3) + (n_4 \times 4) + (n_5 \times 5)}{n \times 5},$$

де  $n_x$  – кількість мух в  $x$  пробірці.

Для оцінки рухової активності методом “відкритого поля” використовували виготовлену нами установку, яка складалась із скляної чашки Петрі діаметром 7 см, дно якої розграфлене на квадрати зі стороною 0,5 см. Чашку накривали плоскою скляною накривкою із такого ж скла. Дослідники [8, 15, 16], які використовували подібні методи у різних варіаціях, зазначили, що мухам потрібно кілька хвилин для адаптації до нового середовища. Надалі вони демонструють типову для себе поведінку впродовж тривалого часу, тому для оцінки типової поведінки достатньо спостерігати за особинами лінії короткий час. Протягом експерименту проводили 10 хв відеозапис після 2 хв адаптації мух. Відзнятий матеріал аналізували на комп'ютері, оцінювали довжину пробігу в сантиметрах, при цьому перетин одного квадрата рахували пробігом 0,5 см. В кожному досліді аналізували молодих (3–5-денних) та старих (18–20-денних) самців індивідуально, не менше 25 особин кожного генотипу та вікової категорії.

Статистичне опрацювання даних було проведено за допомогою програмного забезпечення «Excel». Достовірність отриманих результатів перевіряли за допомогою критеріїв Пірсона або Ст'юдента. Позначали (\*\*\*) – достовірну різницю при рівні значущості  $p \leq 0,001$ ; (\*\*) –  $p \leq 0,01$ ; (\*) –  $p \leq 0,05$ .

### Результати досліджень та обговорення

Для дослідження особливостей рухової поведінки використали лінії з нейродегенеративними змінами мозку, що були зумовлені мутаціями у різних генах, а отже, мали відмінні механізми відмирання клітин, функціональні та морфологічні особливості. Є деякі відомості щодо генетичних та морфологічних характеристик досліджуваних мутантів, однак системного вивчення поведінкових реакцій у них не проводилось.

Відомо, що мутації в гені *sws* є причиною появи нейродегенерації, в основі якої відмирання нейронів та патологія гліальних клітин. Досліджували три різні лінії мутантні за геном *sws*, кожна з яких представляє відмінну алельну форму цього гена – *sws<sup>ol/E</sup>*, *sws<sup>1</sup>* та 76-15 (*sws<sup>76-15</sup>*) [1; 3; 10; 11]. Зміни у клітинах мозку, зумовлені мутаціями в гені *sws*, можуть визначати порушення поведінкових реакцій, зокрема, ольфакторної поведінки, що описано для мутанта *sws<sup>ol/E</sup>* [10]. Мутація в гені *sniffer* ушкоджує НАДФ(Н)-залежну карбонілредуктазу, яка зумовлює відмирання клітин мозку внаслідок оксидативного стресу [13], та супроводжується деякою млявістю у мутантів *sn<sup>1</sup>*. У лінії 72-7 та *sws<sup>ol/E</sup>* вперше описано специфічну, прогресуючу з віком дегенерацію дофамінових нейронів, тоді як особини лінії 76-15, які несли мутацію, що ушкоджує білок SWS-A, не мали значної дегенерації дофамінових нейронів [2]. Функції нейротрансмітера дофаміна є еволюційно консервативними у нервовій системі багатьох видів, зокрема, у дрозофіли і ссавців, та є визначальними перш за все у контролі моторної активності. Рухова активність є універсальною поведінковою реакцією, а також складовою майже всіх складніших поведінкових реакцій, таких як статевая активність, фото- і геотаксис, ольфакторна поведінка та інші. Отже для її дослідження потрібно оцінити показники декількох локомоторних проявів.

Визначення індексу локомоторної активності виявило безпосередній зв'язок між віком і руховою активністю особин проаналізованих ліній із тенденцією до суттєвого зниження рухливості (рис. 1). Молоді імаго *sn<sup>1</sup>* мали найнижчий рівень активності, однак у 10–18 денному віці активність співпадала з рівнем контролю. У лінії *sws* до 12-денного віку суттєвої відмінності порівняно з диким типом не було, а зниження активності у 16–18-денних особин відбувалось значно сильніше, ніж в контролі.

У лінії 72-7 індекс рухової активності відрізнявся від загальної тенденції у бік значного підвищення з віком. Показник становив 0,66 для 1–3 денних і 0,518 для 16–18-денних самців лінії 72-7, тоді як у контрольній лінії він становив 0,68 і 0,21 відповідно. Вищий індекс рухової активності у “клаймбінг тесті” в особин лінії 72-7, порівняно із контролем та іншими дослідними лініями, можна пояснити неадекватною реакцією на процес “реактивації” – посилення рухової активності при механічному струшуванні мух, а таке струшування й лежить в основі цього тесту. Виявлене відхилення від норми може свідчити також про порушення передачі

сигналів до мотонейронів в результаті патологічного стану дофамінових нейронів або загальної нестачі нейромедіатора дофаміна у лінії 72-7. Подібні хаотичні рухи та стан гіперкінезії описано у людей із деякими нейродегенеративними розладами, зокрема у разі хореї Гентінгтона, що супроводжується зниженням рівня дофаміну [14].

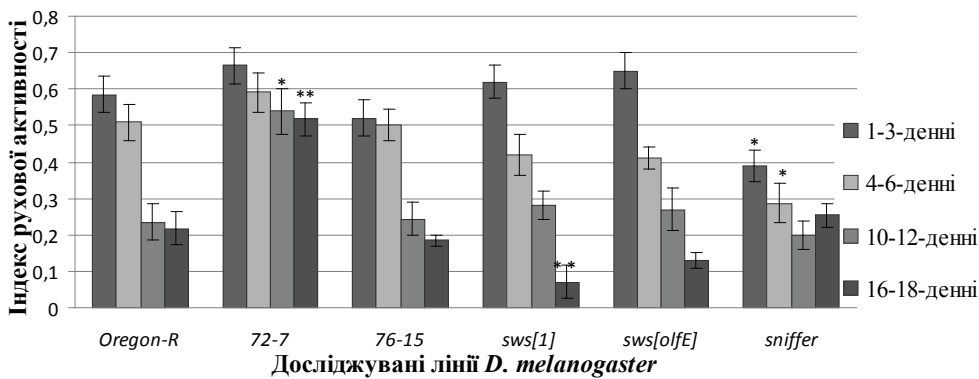


Рис. 1. Індекс рухової активності (“клаймбінг тест”) досліджуваних ліній *D. melanogaster*. Лінія *Oregon-R* є контролем.

На відміну від “клаймбінг тесту”, метод “відкритого поля” не передбачає жодного втручання чи додаткового стимулювання досліджуваних особин. Це фіксація довільної поведінки за стандартних умов. Загалом, як і у попередньому тесті, спостерігалось зниження відносної рухової активності особин всіх ліній з віком (рис. 2).

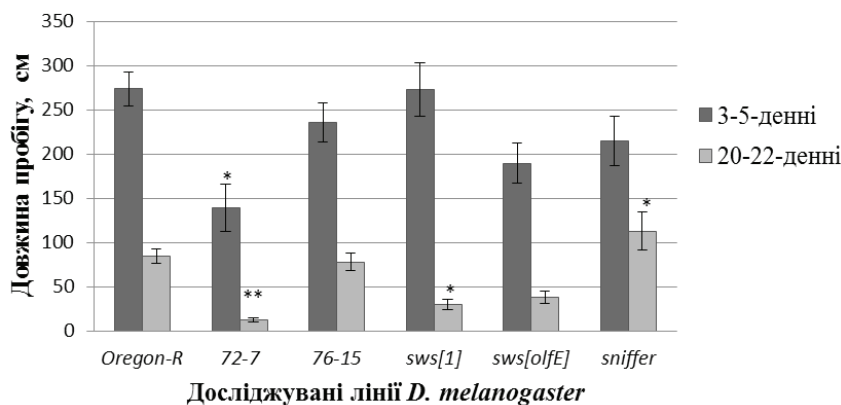


Рис. 2. Рухова активність самців імаго досліджуваних ліній *D. melanogaster* у “відкритому полі”. Лінія *Oregon-R* є контролем.

Найнижчою серед мутантів та значно нижчою, ніж у дикого типу була рухова активність у “відкритому полі” у лінії 72-7, в той час як індекс рухової активності в “клаймбінг тесті” у цієї лінії був високим. Такі дані добре корелюють між собою, доводячи, що без додаткового стимулювання особини з відмиряючими дофаміновими нейронами відмовляються від активного руху.

Крім того, нами був проаналізований такий вид активності як стрибки (рис. 3), які також є проявом довільної локомоторної активності. Як свідчать досліди, найспокійнішою виявилась лінія дикого типу – 2–3 стрибки за десять хвилин – як у молодих так і у старих особин. Порівняно з нею мутантна лінія *sws<sup>olfE</sup>* характеризувалась значним збільшенням цього показника – в два рази вищим у 3–5 денних особин та втричі у 18–20 денних мух. Подібну активність виявила лінія 76-15. Найменше стрибали особини *sni<sup>1</sup>* у віці 18–20 днів.

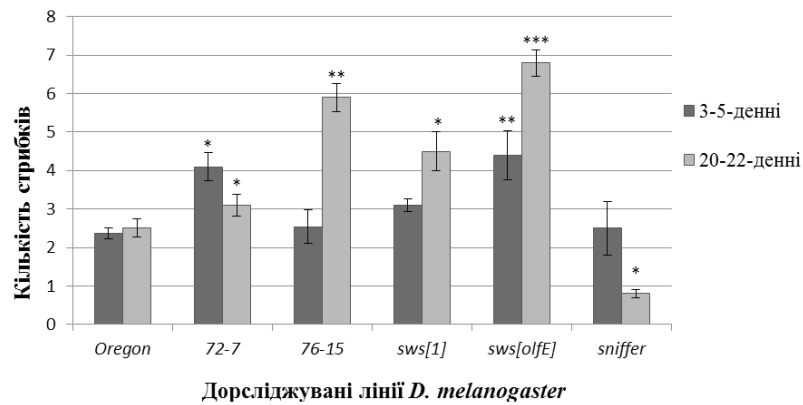


Рис. 3. Кількість стрибків самців імаго досліджуваних ліній *D. melanogaster* у “відкритому полі”. Лінія *Oregon-R* є контролем.

Таким чином, всі досліджувані лінії проявили відхилення у показниках рухової активності порівняно з особинами дикого типу із спільними закономірностями змін у ліній із спільною природою розвитку нейродегенерації.

### Висновки

1. Найвищий індекс рухової активності у “клаймбінг тесті” виявлено у лінії 72-7, для якої характерне відмирання дофамінових нейронів; найнижчий – для лінії *sni<sup>1</sup>*, нейродегенеративні зміни якої зумовлені порушенням антиоксидантної системи.
2. Загальний пробіг у “відкритому полі” був найнижчий у старих особин лінії 72-7, натомість у старих самців *sni<sup>1</sup>* був найбільшим.
3. Мутанти (76-15, *sws<sup>1</sup>*, *sws<sup>olfE</sup>*) з різними алельними форми гена *sws*, мали подібні профілі рухових характеристик з віком у всіх тестах – значне зниження індексу рухової активності та загального пробігу, а також збільшення стрибків порівняно з контролем.

**Список використаної літератури**

1. *Матійців Н. П.* Молекулярно-генетичний аналіз нейродегенеративних мутацій *Drosophila melanogaster*, локалізованих в Х-хромосомі : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : спец. 03.00.15 «генетика» / Матійців Наталія Петрівна. – Львів, 2009. – 20 с.
2. *Могіляк І. І.* Чутливість нейродегенеративних мутантів *Drosophila melanogaster* групи *swiss cheese* до умовоксидативного стресу / І. І. Могіляк, Н. П. Матійців, Н. І. Груник, Я. І. Черник // *Biopolymers and Cell*. – 2011. – V. 27, № 6. – P. 453–458.
3. *Щербата Г. Р.* Генетический анализ нейродегенеративных мутантов *Drosophila melanogaster* по Х-хромосоме, индуцированных этилметансульфонатом и нитрозоэтилмочевинной / Г. Р. Щербата, Н. П. Матийцев, Я. И. Черник, А. С. Яценко, В. В. Радыш, М. М. Кучеренко, Д. В. Максимив // *Генетика*. – 2004. – Т. 40, № 9. – С. 1286–1292.
4. *Ahmed Z.* The neuropathology, pathophysiology and genetics of multiple system atrophy / Z. Ahmed, Y. Asi, A. Sailer, A. Lees et al. // *Neuropathol Appl Neurobiol*. – 2012 – V. 38. – P. 4–24.
5. *Benzer S.* Genetic dissection of behavior / S. Benzer // *Sci. Am*. – 1973. – V. 229. – P. 24–37.
6. *Botella J.* The *Drosophila* Carbonyl Reductase Sniffer Prevents Oxidative Stress-Induced Neurodegeneration / J. Botella, J. Ulschmid, C. Gruenewald et al // *Current Biology*. – 2004. – V. 14. – P. 782–786.
7. *Cookson M.* Evolution of neurodegeneration / M. Cookson // *Curr Biol*. – 2012. – V. 11. – P. 753–761.
8. *Hirth F.* *Drosophila melanogaster* in the Study of Human Neurodegeneration / F. Hirth // *CNS Neurol Disord Drug Targets*. – 2010. – V. 9. – P. 504–23.
9. *Greene J.* Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila* parkin mutants / J. Greene, A. Whitworth, I. Kuo et al // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2003. – V. 100. – P. 4078–4083.
10. *Kretzschmar D.* The *swiss cheese* mutant cause glial hyperwrapping and brain degeneration in *Drosophila* / D. Kretzschmar, G. Hasan, S. Sharma, M. Heisenberg // *J. Neurosci*. – 1997. – Vol. 17, N 19. – P. 7425–7432.
11. *Kretzschmar D.* Neurodegenerative mutants in *Drosophila*: a means to identify genes and mechanisms involved in human disease? / D. Kretzschmar // *Invert. Neurosci*. – 2005. – Vol. 3. – P. 97–109.
12. *Kretzschmar D.* Swiss cheese et alii, some of the first neurodegenerative mutants isolated in *Drosophila* // *J Neurogenet*. – 2009. – Vol. 23. – P. 34–41.
13. *Martin H.* The *Drosophila* carbonyl reductase sniffer is an efficient 4-oxonon-2-enal (4ONE) reductase / H. Martin, M. Ziemba, M. Kisiela et al. // *Chem Biol Interact*. – 2010. – Vol. 191. – P. 48–54.
14. *Roos R.* Huntington's disease: a clinical review / R. Roos // *Orphanet J Rare Dis*. – 2010 – Vol. 20. – P. 5–40.
15. *Soibam B.* Open-field arena boundary is a primary object of exploration for *Drosophila* / B. Soibam, M. Monica, L. Lingzhi, et al. // *Brain Behav*. – 2012 – Vol. 2. – P. 97–108.
16. *Valente D.* Analysis of the Trajectory of *Drosophila melanogaster* in a Circular Open Field Arena. / D. Valente, I. Golani, P. Mitra // *PLoS ONE* – Vol. 2. – P. 1083.

Стаття надійшла до редакції 28.06.2013

**Н. П. Матийцив, И. И. Могиляк, Е. И. Труш, Я. И. Черник**

Львовский национальный университет имени И. Франко,  
кафедра генетики и биотехнологии,  
ул. Грушевского, 4, Львов, 79005, Украина

### **ДВИГАТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ МУТАНТОВ *DROSOPHILA MELANOGASTER***

#### **Резюме**

Используя различные методические подходы, изучали двигательную активность мутантов *Drosophila melanogaster* с дегенерацией клеток мозга. Установлено отличие локомоторного поведения мутантов от линии дикого типа. Поведенческие отклонения коррелировали с генотипом и функциональными изменениями в мозге.

**Ключевые слова:** нейродегенерация, поведение, двигательная активность, дрозофила.

**N. P. Matiytsiv, I. I. Mohylyak, O. I. Truhs, Y. I. Chernik**

Ivan Franko National University of Lviv, Department of Genetics and Biotechnology, 4,  
Hrushevsky Str., Lviv, 79005, Ukraine

### **MOTOR ACTIVITY OF *DROSOPHILA MELANOGASTER* NEURODEGENERATIVE MUTANTS**

#### **Summary**

Motor activity of *Drosophila melanogaster* mutants with brain cells degeneration using different methodological approaches was studied. There were found out the difference in locomotor behaviour of mutants compare with wild type flies. Behavioural abnormalities correlated with genotype and functional changes in brain.

**Key words:** neurodegeneration, behavior, motor activity, *Drosophila*.