

## ВПЛИВИ ПРЕПАРАТУ МІТОХОНДРИН-2 НА ДИНАМІКУ ДЕГЕНЕРАЦІЇ ТКАНИН МОЗКУ У СТАРИХ ОСОБИН ДРОЗОФІЛИ ЗІ ЗМІНЕНОЮ ФУНКЦІЄЮ ГЕНА *SWISS CHEESE*

Надійшла 31.01.14.

Ми вивчали можливі нейропротекторні впливи експериментального препарату мітохондрин-2 (М-2) на прояви нейродегенеративного фенотипу у старих особин *Drosophila melanogaster*, мутантних за геном *swiss cheese* (*sws*), та особин із функціональною інактивацією гена *sws* у глії. Було використано точкових мутантів за геном *sws*; в одній із досліджених груп із застосуванням системи *Gal4-UAS* був функціонально інактивований ген *sws* у гліоцитах. Аналізувався стан тканин мозку на їх гістологічних зрізах з оцінкою рівня пенетрантності та розміру зон дегенерації. Після згодовування препарату М-2 личинкам істотно (на 25 %) знижувалася пенетрантність нейродегенеративного фенотипу у старих мутантів за геном *sws* та зменшувався (в середньому на 31.5 %) розмір зон нейродегенерації в мозку особин із інгібуванням гена *sws* у гліоцитах. При застосуванні М-2 протягом стадії імаго змін характеристик нейродегенерації не спостерігалось.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** мітохондрин-2, нейропротекція, *Drosophila*, нейродегенерація, ген *swiss cheese*, *Gal4-UAS*-функціональна інактивація.

### ВСТУП

Ефективне лікування нейродегенеративних порушень (не лише спадкових, але й тих, що виникли внаслідок розвитку того або іншого органічного ураження мозку) залишається актуальною невирішеною проблемою сучасності. Адже з кожним роком у світі спостерігається тенденція до зростання кількості людей, що страждають на захворювання подібного роду [1]. Найбільш сумнозвісні нейродегенеративні патології людини (синдром Паркінсона, хвороби Альцгеймера, Хантінгтона, Шарко-Марі-Туз та ін.) пов'язані із втратою великої кількості клітин у певних ділянках мозку. Такі хвороби, як правило, починаються в пострепродуктивному віці та закінчуються передчасною смертю. Деякі гени, відповідальні за появу спадкових деменцій, ідентифіковано [2], однак молекулярні характеристики та механізми виникнення цих патологій залишаються невідомими, що ускладнює розробку ефективної терапії.

Існують низка нових лікарських засобів пептидної природи, що можуть мати терапевтичний ефект у лікуванні як гіпоксичних, так і нейродегенеративних розладів, проте механізми їх дії залишаються не до кінця з'ясованими. Одним із таких засобів є запропонований нещодавно експериментальний нейропротектор мітохондрин-2 (М-2). Він являє собою набір пептидів із молекулярною масою 250–7000 Да та низку домінуючих амінокислот. Препарат був отриманий з певних тканин новонароджених поросят, що пережили гіпоксію під час пологів [3].

Зважаючи на складність проведення клініко-генетичних досліджень у людини, є цілком зрозумілим, що для вивчення природи нейродегенеративних захворювань та пошуку терапевтичних засобів у багатьох випадках доцільно використовувати модельні підходи. Одним із найкраще вивчених еукаріотичних модельних об'єктів у генетичних дослідженнях є *Drosophila melanogaster*. На сьогодні встановлено, що значна кількість описаних генів дрозофіли являють собою ортологи генів людини. Крім того, патологічні зміни в структурі мозку нейродегенеративних мутантів дрозофіли за морфологічними, біохімічними та функціональними характеристиками є до певної міри аналогічними таким у людей,

<sup>1</sup>Львівський національний університет ім. Івана Франка (Україна).

<sup>2</sup>Київський національний університет ім. Тараса Шевченка (Україна).

Ел. пошта: matiytsiv@yahoo.com (Н. Матійців).

що страждають на нейропатії [4]. Тому особливу цінність у дослідницькому аспекті представляють точкові мутанти дрозофіли з нейродегенеративними змінами в мозку та трансгенні лінії даного виду, які дозволяють створювати спрямований функціональний нокаут окремих генів у клітин певних типів. Детальне вивчення цих об'єктів дає змогу не лише поглибити розуміння генетичної природи патології деяких церебральних уражень, але й створює підґрунтя для дослідження ефективності нових експериментальних терапевтичних препаратів.

## МЕТОДИКА

Дослідження були проведені на нейродегенеративних мутантах *D. melanogaster* за геном *swiss cheese* (*sws*); мутація була індукована етилметансульфонатом. Лінія 76-15 (*sws*<sup>76-15</sup>) була одержана в лабораторії Львівського національного університету ім. Івана Франка (Україна) [5, 6]; лінію *sws*<sup>1</sup> для досліджень люб'язно надала д-р Доріс Кретчмар (США) [7]. Контролем слугувала лінія дикого типу *Oregon-R* (походження – Bloomington Drosophila Stock Center, США). Досліджені лінії *D. melanogaster* були використані для реалізації функціонального нокауту гена *sws* у гліальних клітинах із застосуванням бінарної системи *Gal4-UAS* [8, 9]. Лінію *w<sup>\*</sup>;P{UAS-*sws*-RNAi}3* було отримано з Vienna Drosophila RNAi Center (Австрія); драйверна лінія *Repo-Gal4/TM3, Ser* була люб'язно надана проф. Карлом-Фрідріхом Фішбахом (ФРН).

Мух утримували в стандартних умовах при температурі +24...+25 °С в термостаті в цукрових стаканчиках. В одній із груп препарат М-2 додавали до стандартного поживного середовища [10], яке згодували лише личинкам. Дорослих особин у цьому разі утримували на середовищі без досліджуваного засобу. У другій групі препарат М-2 згодували особинам у стадії імаго; його вносили в комплексі з 10 %-вим розчином сахарози. Мух утримували в пробірках, на дні яких розміщувався фільтрувальний папір, змочений розчином з додаванням препарату. Контролем слугували особини того ж самого генотипу, які утримувалися в аналогічних умовах, але не споживали досліджуваного засобу.

М-2 вносили в поживне середовище, перераховуючи максимальну добову дозу для людини (26 мкл) на 100 мл стандартного поживного середовища або 10 %-вого розчину сахарози [10].

Морфологічні дегенеративні зміни в тканинах

мозкового ганглію дрозофіли виявляли на гістологічних зрізах, виготовлених за стандартною методикою [11]. Аналіз препаратів проводили на мікроскопі „Loboval-3 Corl 2 Zeiss-Jena” (ФРН) в ультрафіолетовому світлі при збільшенні  $\times 600$ . Пенетрантність фенотипу мутантів визначали за нормованою кількістю особин, в яких спостерігали вакуолізацію тканини мозку; аналізували препарати не менше ніж від 60 самців кожного генотипу. Сумарну площу вакуолей у тканині мозку трансгенних особин обчислювали за допомогою аналізу мікрофотографій, зроблених в умовах фіксованого збільшення, в графічному редакторі Kompas 13 portablemini. Як безпосередні числові показники для кількісного аналізу та міжгрупового порівняння використовували умовні значення площ на фотографіях при вказаному збільшенні, виміряні у квадратних міліметрах з урахуванням роздільної здатності апаратури. Аналізували препарати не менше ніж від 10 особин кожного генотипу.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програмного забезпечення „Microsoft Office Excel 03” та „Statistic 17”. Вірогідність міжгрупових відмінностей перевіряли з використанням критерію Пірсона, двофакторного Т-тесту з різними дисперсіями та критерію Вілкоксона для непараметричних порівнянь.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

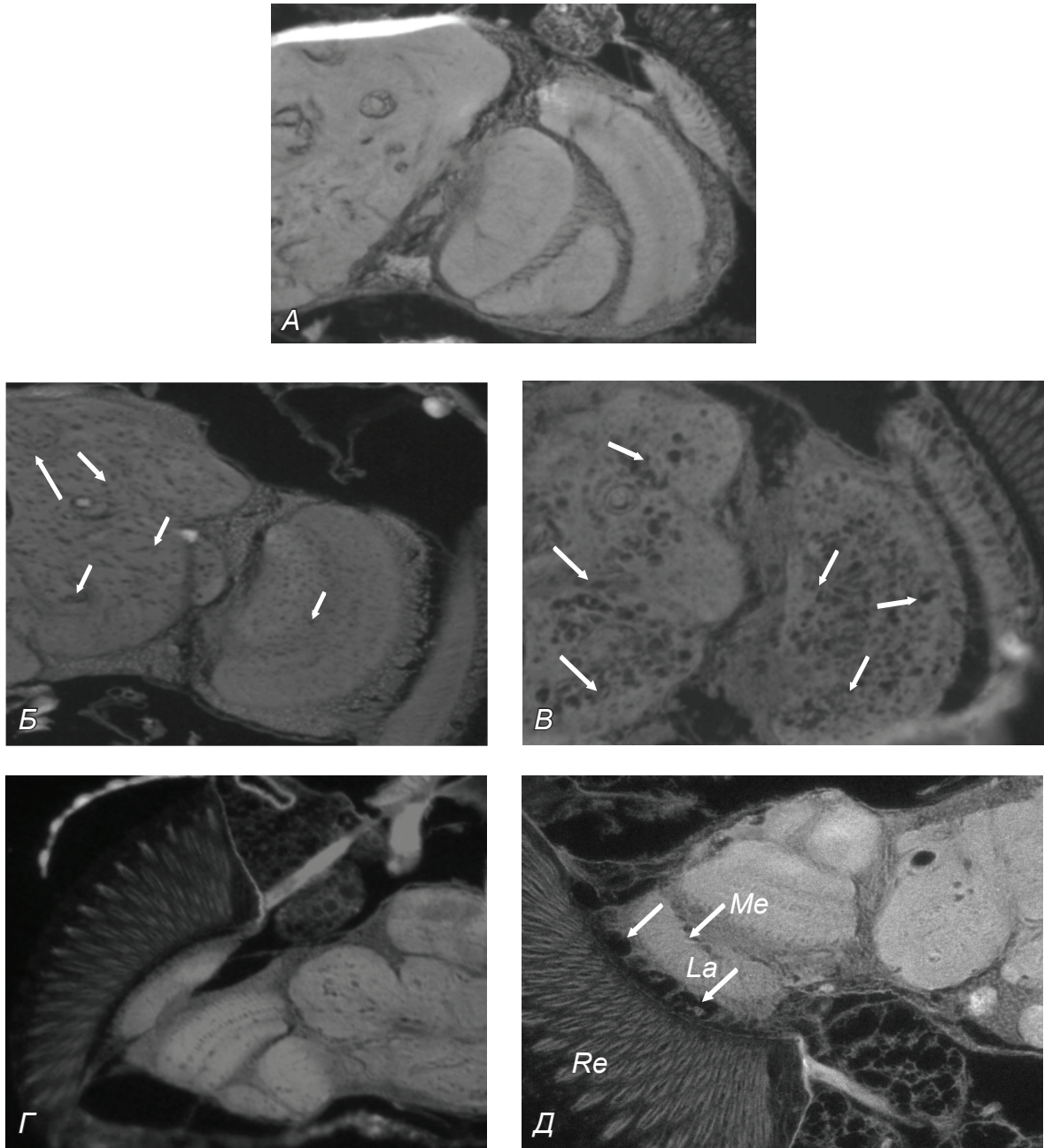
Ген *sws* локалізований у ділянці 7D1 X-хромосоми *D. melanogaster*. Мозок мутантів за *sws* характеризується аномально інтенсивним закручуванням відростків гліоцитів навколо нейронів, вакуолізацією та раннім відмиранням нейронів за сценарієм апоптозу [7]. Апоптотичні зміни з'являються в мутантів у віці трьох-чотирьох днів; дегенерація тканини мозку значно прогресує зі старінням особин. Нейродегенерація поширюється не лише на нейрони, але й на гліальні клітини. Ортологи гена *sws* наявні в хребетних, в тому числі і в людини. Це робить особин дрозофіли зі зміненою функцією цього гена хорошою модельною системою для вивчення дії експериментальних фармакологічних засобів [5, 12].

Для дослідження дії препарату М-2 були обрані нейродегенеративні мутанти, дефектні за геном *sws*, із різними морфологічними та генетичними характеристиками. Так, фенотипу мутантів *sws*<sup>1</sup> властиве утворення більших вакуолей у тканині мозку, ніж фенотипу мутантів лінії 76-15 (див. рисунок, *Б*, *В*).

Мутація *sws<sup>1</sup>* пов'язана з появою стоп-кодону, що призводить до синтезу продукту SWS-A з молекулами втричі коротшими, ніж у нормі [7]. У лінії 76-15 у С-кінцевому домені ймовірної послідовності білка SWS-A відбувається заміна залишку глутамінової кислоти на аспарагінову кислоту [5].

Стандартним методом тестування дії експери-

ментальних засобів та речовин у дослідженнях на дрозофілі є згодовування таких агентів личинкам [10]. Оскільки ми досліджували характеристики нейродегенерації, характерної для старіючого організму, та оцінювали фенотип старих 20-денних особин, важливим у даному разі було перевірити впливи експериментального засобу М-2 при його



Мікрофотографії тканин мозку особин *D. melanogaster* 20-денного віку.

*A* – лінія дикого типу *Oregon-R*, *Б* – мутантна лінія *76-15*, *В* – *sws<sup>1</sup>*; *Г* – гетерозиготна драйверна лінія, що слугувала контролем *Repo-Gal4/+*, *Д* – *Repo-Gal4>UAS-sws-RNAi*. *Re* – ретина, *La* – ламіна, *Me* – медула. Стрілки вказують на прояви нейродегенеративних процесів у тканинах мозку (вакуолізацію), специфічні для кожного генотипу.

вживанні і протягом личинкової стадії, і в перебігу стадії дорослої комахи (імаго).

У випадках спадкових нейродегенерацій як у людини, так і в комах (дрозофілі) характерною є неповна пенетрантність нейродегенеративного фенотипу [5, 6, 13]. Тому вивчення механізмів, задіяних у регуляцію пенетрантності прояву таких патологій, є важливим етапом у перебігу пошуку терапевтичних і профілактичних нейропротекторних засобів. Ми провели аналіз гістологічних зрізів тканини мозку 20-денних самців обох мутантних ліній та лінії дикого типу *Oregon-R*, що споживали експериментальний препарат М-2 та вирощувалися без нього, використовуючи два способи згодовування цього агента. У контрольних особин дикого типу та тих, що споживали М-2, в усіх випадках спостерігали нормальний морфологічний патерн тканини мозку без ознак вакуолізації (див. рисунок, А). У мозку мутантних особин проявлялися властиві кожному генотипу особливості дегенерації мозку (Б, В) при всіх умовах згодовування даного препарату. Проте у мутантних особин, які споживали М-2 протягом личинкового розвитку, пенетрантність нейродегенеративного фенотипу помітно знижувалася (табл. 1). Так, пенетрантність мутації *sws<sup>1</sup>* становила 75 % без дії препарату і 50 % після його використання. Пенетрантність фенотипу лінії 76–15 на стандартному середовищі дорівнювала 50 % у контролі та 25 % після споживання М-2 личинками. В той же час вживання М-2 протягом дорослої стадії не зумовлювало вірогідних відмінностей між показниками пенетрантності особин обох мутантних ліній, підданих та не підданих дії тестованого препарату (табл. 1).

**Т а б л и ц я 1.** Пенетрантність нейродегенеративного фенотипу ліній *D. melanogaster* у контролі (К) та після згодовування препарату мітохондрин-2 (+М-2)

Лінія	Пенетрантність мутантного фенотипу (%) після			
	згодовування личинкам		згодовування протягом стадії імаго	
	К	+М-2	К	+М-2
<i>Oregon-R</i>	0	0	0	0
76-15	50	25***	47	53
<i>sws<sup>1</sup></i>	75	50***	79	67

Примітка. Трьома зірочками відмічені випадки вірогідної відмінності від контролю з  $P < 0.001$ .

Відомо, що для гена *sws* є характерною виражена клітинспецифічна активність [9, 14]. У точкових мутантів за геном *sws* у всіх клітинах утворюється білковий продукт із порушеною функцією, а в мозку аномально рано гинуть як нейрони, так і гліюцити. Серед клітин мозку саме для гліоцитів нормальне функціонування *sws* є найбільш значним фактором [15]. Можна було припустити, що позитивний вплив препарату М-2 зумовлений його дією саме на клітини глії. Використання *Gal4-UAS*-системи тканинспецифічної експресії дозволяє створювати функціональне інгібування трансляції певного гена у визначених тканинах або клітинах. Ми забезпечили функціональний нокаут гена *sws* у гліюцитах для перевірки дії засобу М-2 у разі функціональної нестачі *sws* винятково в глії. Особин необхідного генотипу (*Repo-Gal4 > UAS-sws-RNAi*) одержували в першому поколінні після схрещування двох ліній. В одній із них під контролем *UAS*-промотора знаходився конструкт сенс- і антисенсуючих послідовностей гена *sws* (*UAS-sws-RNAi*), а драйверна *Gal4*-лінія (*Repo-Gal4*) забезпечувала активацію цього конструкта в гліюцитах. Контролем патологічного фенотипу в даному випадку дикий тип слугувати не може, оскільки відомо, що драйверні лінії можуть мати неспецифічний фенотип [8, 9]. Тому контролем у цьому разі були особини  $F_1$  від схрещування драйверної лінії з диким типом (*Repo-Gal4/+*).

При аналізі фенотипу тканини мозку мух з генотипом *Repo-Gal4 > UAS-sws-RNAi* із функціональним нокаутом гена *sws* у гліюцитах було виявлено специфічний тип патології глії. А саме, в ділянці, що відповідає переходу ламіни в ретину та медулу і де наявна найбільша концентрація гліоцитів, спостерігалася значна вакуолізація тканини мозку (див. риунок, Д). У контрольних особин з генотипом *Repo-Gal4/+* у цій ділянці мозку зберігалася цілком нормальна структура тканини (Г).

У контрольних особин *Repo-Gal4/+* після дії М-2 за двома модусами (коли препарат згодовували личинкам та протягом стадії імаго) фенотипових змін тканини мозку не виявлялося. У досліджених особин *Repo-Gal4 > UAS-sws-RNAi* після споживання засобу М-2 зберігалися патологічні зміни в тканині мозку, аналогічні тим, що були у мух, не підданих дії препарату.

Оскільки візуально помітних змін при аналізі тканини мозку не було виявлено, необхідним був



**Т а б л и ц я 2.** Умовна площа зон дегенерації в тканині мозку особин *D. melanogaster* із функціональною інактивацією гена *sws* у гліальних клітинах в умовах контролю (К) та після згодовування препарату мітохондрин-2 (+М-2)

Генотип	Площа зон дегенерації на мікрофотографії (мм <sup>2</sup> ) після			
	згодовування личинкам		згодовування протягом стадії імаго	
	К	+М-2	К	+М-2
<i>Repo-Gal4/+</i>	0	0	0	0
<i>Repo-Gal4&gt;</i> <i>UAS-swS-RNAi</i>	698.11 ± 58.1	478.02 ± 76.6*	721.58 ± 61.3	729.88 ± 80.9

Примітка. Зірочкою відмічено випадок вірогідної відмінності від групи контролю ( $P < 0.05$ ).

кількісний аналіз нейродегенеративних зон. Як вже згадувалося, ми обрахували площу вакуолей, аналізуючи мікрофотографії за допомогою графічного редактора Komras 13 portable mini. Середня умовна (та, що визначалася на фотографіях) площа вакуолей у 20-денних особин, вирощених на стандартному середовищі, складала 698.11 мм<sup>2</sup>, а у тих, що утримувалися на 10 %-вій сахарозі, – 721.58 мм<sup>2</sup> (табл. 2). Після згодовування М-2 личинкам площа вакуолей ставала меншою на 31.5 %, складаючи 478.02 мм<sup>2</sup> (відмінність вірогідна). Вживання М-2 мухами протягом фази імаго не зумовлювало зменшення інтенсивності нейродегенерації, і в цьому разі середня умовна площа вакуолізації дорівнювала 729.88 мм<sup>2</sup> (табл. 2).

Відомо, що на різних стадіях онтогенезу хребетних та безхребетних організмів спостерігається різна експресивність генів. Так, у молодих особин дрозофіли (до 12-го дня імаго) транскрипційна активність є на 23 % вищою, ніж в особин від 12-го дня і до старості. Як припускають [16], існують малі ефекторні молекули (наприклад, 4-фенілбутират, резвератрол, рапаміцин та ін.), котрі, потрапивши перорально в організм, можуть активувати чи інгібувати різноманітні функціональні шляхи, реалізуючи епігенетичні впливи. Зокрема, подібні агенти здатні впливати на рівень експресивності різноманітних генів на різних етапах онтогенезу. Впливи таких ефекторних молекул є стадієспецифічними; вони можуть бути позитивними, негативними або ж нейтральними. Це пов'язано з періодом онтогенезу дрозофіли, під час якого вони потрапили в організм. Наприклад, споживання їх до 12-го дня життя імаго призводило до сильніших ефектів, ніж із 12-го дня і до старості. Тому очевидно, що порівняльний аналіз впливу експериментальних засобів слід проводити на різних стадіях онтогенезу дрозофіли.

Результати нашого дослідження продемонстру-

вали, що препарат М-2 здатний чинити певний нейрорепротекторний ефект щодо клітин мозку старих особин дрозофіли лише за умови згодовування цього засобу личинкам, а не дорослим особинам. Послаблення дегенерації клітин ЦНС спостерігалось і в точкових мутантів, в яких була наявною виражена дисфункція нейронів та гліоцитів, і у трансгенних особин зі спрямованою дегенерацією глії. Це дозволяє припускати, що головною мішенню впливу М-2 є саме гліоцити. Конкретні механізми дії препарату М-2 ще чекають на з'ясування. Можна, однак, висловити загальне припущення: даний засіб, отриманий з тканин організмів, котрі були піддані гіпоксичному стресу, якимось чином інтенсифікує енергетичний метаболізм у мітохондріях, що позитивно впливає на ядерно-протоплазматичні взаємодії.

Експерименти на модельному об'єкті *D. melanogaster* були проведені відповідно до положень Гельсінкської Декларації 1975 р., переглянутої і доповненої в 2000 р., і директив Національних комітетів з етики наукових досліджень. Проведення експериментів було схвалено Комітетом з етики організації, в якій виконувалася робота (Львівський національний університет ім. Івана Франка).

У всіх авторів представленої роботи (М. Чад, Н. Артимович, О. Макаренко та Н. Матійців) відсутній будь-який конфлікт інтересів.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. A. L. Sosa-Ortiz, I. Acosta-Castillo, and M. J. Prince, "Epidemiology of dementias and Alzheimer's Disease," *Arch. Med. Res.*, **43**, No. 8, 600-608 (2012).
2. R. Taipa, J. Pinho, and M. Melo-Pires, "Clinico-pathological correlations of the most common neurodegenerative dementias," *Front Neurol.*, **3**, No. 68, 1-13 (2012).
3. А. С. № 2405. 558 РФ, *Лекарственный препарат для лечения гипоксических и токсических митохондриальных нарушений и способ его получения*, А. Н. Макаренко, А. Е. Кульчииков, С. Г. Морозов и др., опубл. 10.12.10, Бюл. № 23.

4. V. Debattisti and L. Scorrano, “*D. melanogaster*, mitochondria and neurodegeneration: small model organism, big discoveries,” *Mol. Cell. Neurosci.*, **55**, 77-86 (2013).
5. Н. П. Матійців, *Молекулярно-генетичний аналіз нейродегенеративних мутацій Drosophila melanogaster, локалізованих в X-хромосомі*, Автореф. дис. ...канд. біол. наук, Київ (2009).
6. Г. Р. Щербата, Н. П. Матійців, Я. И. Черник и др., “Химически индуцированный мутагенез у *Drosophila melanogaster* с целью получения мутантов с изменениями в структуре мозга”, *Генетика / Genetika*, **40**, № 9, 1280-1285 (2004).
7. D. Kretzschmar, G. Hasan, S. Sharma, et al., “The *swiss cheese* mutant cause glial hyperwrapping and brain degeneration in *Drosophila*,” *J. Neurosci.*, **17**, No. 19, 7425-7432 (1997).
8. A. H. Brand and N. Perimon, “Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes,” *Development*, **118**, No. 2, 401-415 (1993).
9. І. І. Могиляк, Н. П. Матійців, Я. І. Черник, “Вплив тканиноспецифічного функціонального інгібування гена *sws* на формування структури складного ока *Drosophila melanogaster*”, *Вісн. Львів. ун-ту. Серія Біол.*, **62**, 117-125 (2013).
10. M. Ashburner, *Drosophila: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Lab., New York (1989).
11. M. Heisenberg and K. Bohl, “Isolation of anatomical brain mutants of *Drosophila* by histological means,” *Naturforschung*, **34**, 143-147 (1979).
12. M. J. Lush, Y. Li, D. J. Read, et al., “Neuropathy target esterase and a homologous *Drosophila* neurodegeneration-associated mutant protein contain a novel domain conserved from bacteria to man,” *Biochem. J.*, **332**, 1-4 (1998).
13. R. J. Cauchi and M. van den Heuvel, “The fly as a model for neurodegenerative diseases: is it worth the jump?” *Neurodegener. Dis.*, **3**, No. 6, 338-356 (2006).
14. M. Mühlig-Versen, A. B. da Cruz, J. Tschäpe, et al., “Loss of *swiss cheese*/neuropathy target esterase activity causes disruption of phosphatidylcholine homeostasis and neuronal and glial death in adult *Drosophila*,” *J. Neurosci.*, **25**, 2865-2873 (2005).
15. І. І. Могиляк, Я. І. Черник, and К.-F. Fischbach, “Functioning of *sws* in different tissue types of *Drosophila melanogaster*”, у кн.: *Тези доповідей учасників VII Міжнародної наукової конференції “Молодь та поступ біології” (Львів, 5-8 квітня 2011 р.)*, Сполум, Львів (2011), с. 119-120.
16. J.-W. Soh, N. Marowsky, T. J. Nichols, et al., “Curcumin is an early-acting stage-specific inducer of extended functional longevity in *Drosophila*,” *Exp. Gerontol.*, **48**, No. 2, 229-239 (2012).