

вербальной агрессивности у потомков семей с различной брачной структурой и половой конфигурацией сибства.

Наведено результати вивчення ролі факторів генотипу та середовища у формуванні індивідуальних відмінностей за рівнем фізичної, непрямой та вербальной агресивності у нащадків сімей з різною структурою шлюбу та статевою конфігурацією сибства.

The role of genetic and environmental factors in formation of individual differences of physical, indirect and verbal aggressiveness among offspring from families with various marriage structure and sib sexual configuration is studied.

ЩЕРБАКОВА О.В., МАТІЙЦІВ Н.П., МАКСИМІВ Д.В.

Львівський національний університет імені Івана Франка,

Україна, 79005, Львів, вул. Грушевського, 4, e-mail: oksana_kysla@yahoo.com

ВИЯВЛЕННЯ МЕХАНІЗМІВ КЛІТИННОЇ СМЕРТІ У НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНИХ МУТАНТІВ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Швидкий прогрес останніх років у розумінні молекулярних основ нейродегенерації тісно пов'язаний з відкриттями на ниві програмованої клітинної смерті. Відомо два основних механізми клітинної смерті [2]: програмована, до якої відносять апоптоз та автофагію, і некротична клітинна смерть. Апоптоз є локальним процесом і не охоплює велику кількість клітин одночасно. Некроз, зазвичай, веде до розвитку запалення і відмирання тканин. В тканинах організму під дією однакових чинників можуть запускатись відмінні механізми клітинної смерті і часто лише сила стимулу є вирішальною у проходженні апоптозу чи некрозу. Проте при нейродегенеративних захворюваннях більшість клітин мозку підлягають апоптозу, як більш безпечному для організму процесу.

Матеріали та методи.

В роботі були використані лінії нейродегенеративних мутантів *D. melanogaster*, контролем слугувала лінія дикого типу *Oregon*.

Гістологічні препарати зрізів головного мозку для світлової та електронної мікроскопії готували за стандартною методикою [1]. Фарбування тканини мозку антитілами проводили згідно протоколів [6].

Результати та обговорення.

Нейродегенеративні мутанти *D. melanogaster* були отримані внаслідок хімічного мутагенезу при дії етилметансульфонату. Було показано, що патологічні зміни в мозку досліджуваних ліній характеризувалися розвитком вакуолей в різних відділах. Поява вакуолей зумовлювалася відмиранням тіл нейронів (у ділянках кортексу) чи клітин глії та відростків нейронів (у ділянках нейропілю). У деяких ліній нейродегенерація виявлялась у центральній частині мозку, у інших – в оптичних долях.

Застосовуючи ряд гістохімічних методів було досліджено тканину мозку нейродегенеративних мутантів.

Для ідентифікації апоптичних клітин у досліджуваних мутантів ми виявляли каспазу Drice, шляхом фарбування мозку антитілами до активної форми цього ферменту і аналізували препарати тотального мозку на конфокальному мікроскопі. Каспаза Drice дрозофіли відповідає каспазі 3 ссавців і бере участь у апоптозі протягом ембріогенезу, у відмиранні клітин внаслідок дії радіоактивного опромінення або інгібування синтезу білків, а також в процесі індивідуалізації сперматид (неапоптичний процес) [3]. Позитивне фарбування цими антитілами було виявлено у 20-денних особин лінії 3.5.8 (Рис.1). Наявність клітин з морфологічними ознаками апоптозу у мутантів

3.5.8 була підтверджена і за допомогою електронно-мікроскопічних досліджень (Рис.2В). У мозку цих мух також було виявлено гіперзакручування клітин глії навколо тіл нейронів (Рис.2Б). Відомо [5], що порушення гліальних функцій може вести до пошкодження аксонів та нейронального апоптозу. Описана мутація дрозофіли *repo* внаслідок пошкодження білка специфічного для глії, зумовлює апоптоз нейронів і лише на пізніх етапах, відмирання гліальних клітин.

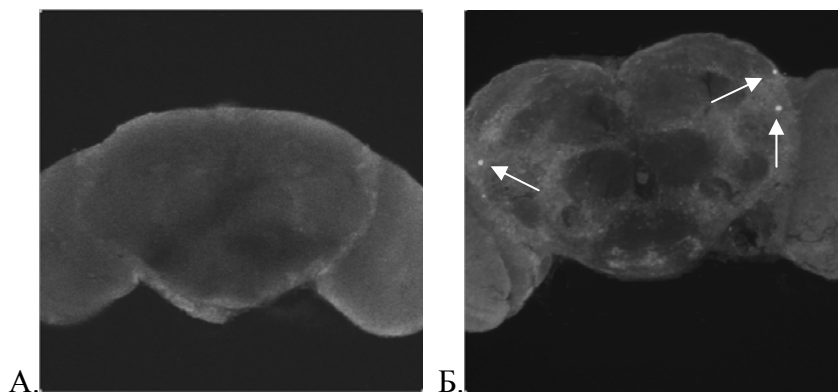


Рис. 1. Тотальний мозок фарбований антитілами до активної форми каспази 3: А.Особина лінії дикого типу, Б. Мутант 3.5.8. Стрілками показано позитивно зафарбовані клітини. Збільшення x20, zoom 0,9

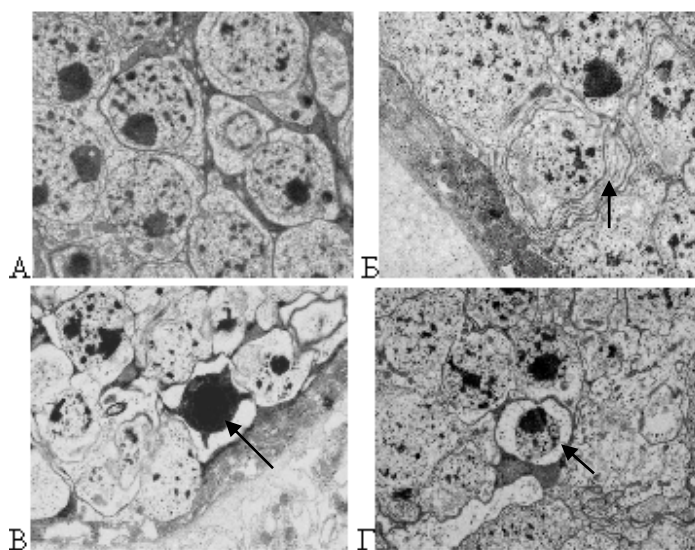


Рис. 2. Електронно-мікроскопічні фотографії зрізів мозку особин дикого типу (А), мутанта 3.5.8 (Б, В) та мутанта 65-10 (Г). Стрілками показано гіперзакручування мембран глії навколо нейронів (Б), клітини з морфологічними ознаками апоптозу (В) та некрозу (Г). Збільшення x6300 (А, Б); x4000 (В, Г).

Апоптична загибель нейронів разом із гіперзакручуванням глії були описані у мутанта *sws* [4]. Ми здійснили якісний і кількісний аналіз дофамінергічних нейронів у мозку нейродегенеративних мутантів групи *sws* нашої колекції. Для імунологічної детекції дофамінергічних нейронів було використано антитіла anta-TH. У 23-денних особин ліній 2-14, 72-7 та *sws^{ofE}* було зафіксовано (Рис.3) статистично достовірне зменшення кількості нейронів у кластері PPL.

Інший механізм відмирання нейронів – некроз був виявлений у мутантів 65-10 під час електронно-мікроскопічних досліджень (Рис.2Г). На відміну від апоптозу, некроз вважають пасивним і хаотичним шляхом загибелі клітин [2]. Він відбувається з мінімальними затратами енергії і не потребує наявності специфічних білків. Некроз супроводжує вакуолізацію мозку мутанта дрозофіли *loechrig* [7]. Процес

нейродегенерації при цьому характеризувався лізисом тіл зрілих, синаптично-активних нейронів, тоді як гліальні клітини залишалися нормальними.

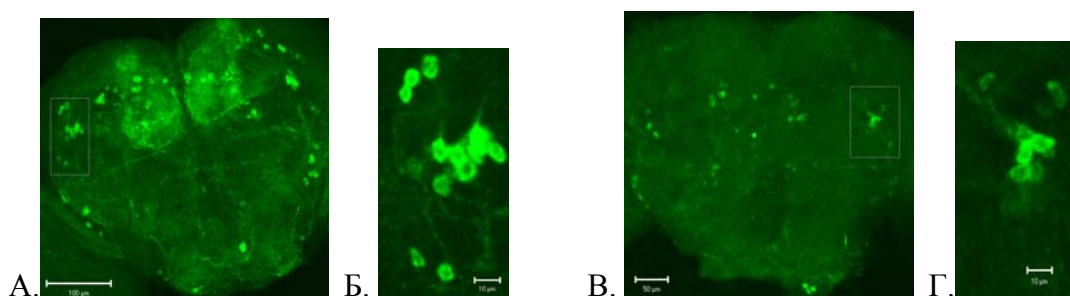


Рис. 3. Z- проекція серії зображень тканини мозку 23-денних особин після імунологічної детекції антитілами anti-TN, одержаних на конфокальному мікроскопі: А. Дикий тип, x20, zoom 0,9; Б. Дикий тип, x40, zoom 0,9 В. Мутант 2-14, x20, zoom 0,9; Г. Мутант 2-14, x40, zoom 0,9.

Таким чином, ми дослідили механізми розвитку нейродегенеративних змін в мутантів *D. melanogaster*. Серед досліджуваних ліній виявили мутантів, в яких дегенерація розвивалася внаслідок апоптозу (у ліній групи sws та 3.5.8) та некрозу (у лінії 65-10).

Література

1. *Ashburner M.* Drosophila: a laboratory manual // Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory. – 1989. – P. 179-189.
2. *Breseden D.E.* Toward a mechanistic taxonomy for cell death programs // Stroke. – 2007. – Vol. 38. – P. 652-660.
3. *Kornbluth S. and White K.* Apoptosis in Drosophila: neither fish nor fowl (nor man, nor worm) // J. Cell Sci. – 2005. – Vol. 118. – P. 1779-1787.
4. *Kretschmar D., Hasan G., Sharma S., Heisenberg M.* The swiss cheese mutant cause glial hyperwrapping and brain degeneration in *Drosophila* // J.Neurosci. – 1997. – Vol.17, N 19. – P.7425-7432.
5. *Kretschmar D. and Pflugfelder G. O.* Glia in development, function, and neurodegeneration of the adult insect brain // Brain Research Bulletin. – 2002. – Vol. 57. – P. 121-131.
6. *Sullivan W., Ashburner M., Hawley R.S.* Drosophila Protocols // Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 2000. – 697p.
7. *Tschaep J-A., Hammershmed C., Muehlig-Versen M., Daum G., Kretschmar D.* The neurodegeneration mutant *loechrig* interferes with cholesterol homeostasis and Appl processing // The EMBO Journal. – 2002. – Vol.23. – P.6367-6376.

Резюме

Показано, що серед досліджуваних нейродегенеративних мутантів *D. melanogaster* є лінії з апоптичним та некротичним шляхом розвитку дегенерацій. Вакуолізація мозку мутантів виявлялася у різних відділах і спричинялася відмиранням нейронів чи їх відростків або порушенням функціонування гліальних клітин.

Показано, що среди исследованных нейродегенеративных мутантов *D. melanogaster* выявлены линии с апоптическим и некротическим путем развития дегенераций. Вакуолизация мозга мутантов наблюдалась в различных отделах и являлась следствием отмирания нейронов или их отростков, либо нарушением функционирования глиальных клеток.

We have shown that among the investigated neurodegenerative mutants of *D. melanogaster* there were lines with apoptotic and necrotic cell death. Vacuolization of brain tissue in mutants was observed in different parts and caused by neurons death or degeneration of their branches or derangements of glial function.