

И. В. НОВОТОРЦЕВА, А. К. СМЕРНОВА

«МУТАНТНЫЙ» НЕЙРОН. ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

(Представлено академиком Н. П. Дубининым 12 III 1976)

В настоящее время системный характер биологических процессов на всех уровнях живого, от молекулярного до поведенческих реакций, является ведущим направлением теоретической биологии: теория функциональных систем П. К. Анохина⁽¹⁾, концепция системной организации деятельности гена Н. П. Дубинина⁽²⁾, общая серия систем Берталяни⁽³⁾. Фундаментальным принципом деятельности мозга является интеграция функциональных систем⁽⁴⁾. В связи с дальнейшим развитием этого направления все явственней ощущается необходимость нового методологического подхода, который позволил бы выявить генетические предпосылки системной организации мозга.

Одним из возможных путей решения этой проблемы является исследование нейрона, обладающего мутантным генотипом. В дальнейшем мы будем называть такой нейрон мутантным, а генерируемую им аномальную электрическую активность — мутантной активностью. Наиболее удобный объект в этом плане *Drosophila melanogaster*. Основные принципы организации функций нервной системы, видимо, универсальны как для дрозофилы, так и для высших позвоночных. Кроме того этот объект хорошо изучен генетически, что и обусловило наш выбор.

При исследовании мутантов с генетически обусловленными аномалиями нервной системы, неизбежно возникает вопрос о специфичности действия мутантного гена на уровне отдельного нейрона.

В то же время представляется интересным выяснить, как «вписывается» мутантный ген в общую архитектуру поведения. С этой точки зрения, мутации, которые затрагивают те или иные компоненты поведения, например двигательную активность, становятся четким критерием оценки действия мутантного гена на функциональное состояние нервной системы. На наш взгляд, наиболее привлекательны в этом отношении следующие мутантные линии *Drosophila melanogaster*: Shaker⁵ (Sh⁵); Hyperkinetic^{1P} (Hk^{1P}); Hyperkinetic^{2T} (Hk^{2T}) и Ether-ago (Eag). Картирование генных локусов показало, что все эти мутации расположены на X-хромосоме, однако затрагивают различные ее локусы: Sh⁵ 58,2; Eag 50,0; Hk^{1P} 30,9; Hk^{2T} 30,4.

Фенотипическое выражение этих мутаций — тремор конечностей животного, находящегося под эфирным наркозом. Наркотизированные особи характеризуются повышенной двигательной активностью⁽⁴⁻⁶⁾ и, соответственно, более высоким уровнем метаболизма⁽⁷⁾. Линия Eag обладает наименее выраженным фенотипом⁽⁴⁾. Что же касается Hk^{1P} и Hk^{2T}, то эти линии по силе фенотипического проявления занимают промежуточное положение между Eag и Sh⁵^(6, 8, 9). У мутантов линии Sh⁵ тремор конечностей носит устойчивый характер и настолько силен, что его можно наблюдать невооруженным глазом^(4, 6).

Детальное морфологическое изучение всех четырех shaker линий не обнаружило каких-либо аномалий ни в скелете, ни в мышцах животных⁽⁴⁾. Электрофизиологический анализ показал, что эти мутации, по-видимому, в первую очередь затрагивают нервную систему^(6, 8, 10).

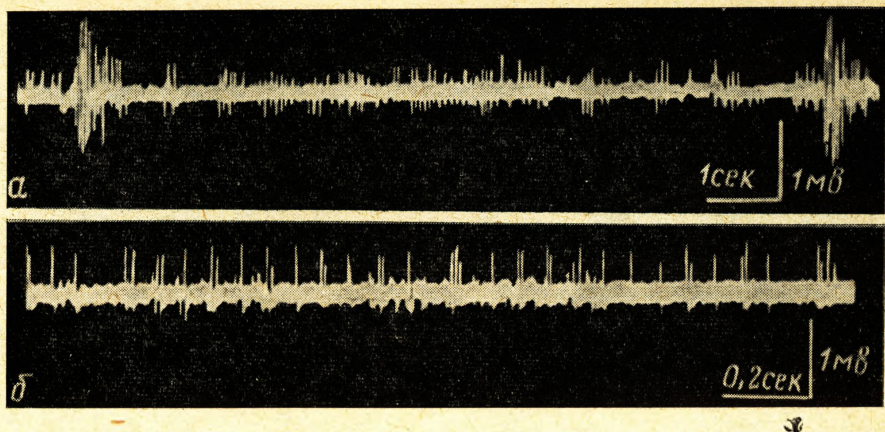


Рис. 1. Различия в типах электрической активности тибияльного нерва у двух линий *Drosophila melanogaster*: а — линия дикого типа, б — мутантная линия Sh^5 . Характерна импульсация высокой частоты

В настоящей работе предпринята попытка нейрофизиологического анализа фенотипа тремора конечностей у особей *Drosophila melanogaster* мутантной линии *Shaker*⁵. Контролем служила линия дикого типа. В экспериментах использовались особи обоего пола в возрасте 5-ти дней и старше. Условия выращивания стандартные. Для микроэлектродной регистрации активности нервных волокон и отдельных нейронов использовался усилитель УБП1-02 с блоком, обладающим высоким входным сопротивлением (R входа — 10^9 ом в полосе частот 5 гц — 30 кгц). Блок позволяет компенсировать входную емкость усилителя, входного кабеля и емкость электрода. Отведение осуществлялось монополярно. Стеклообразные микроэлектроды с диаметром кончика 0,5 мкм заполнялись 3 М КСl для внутриклеточных и физиологическим раствором для внеклеточных отведений. Состав физиологического раствора: NaCl 128 мМ; КСl 4,7 мМ; CaCl₂ 1,8 мМ; Na₂HPO₄ 0,74 мМ; KH₂PO₄ 0,35 мМ^(8, 10). В качестве наркотизирующего агента использовались пары 3% эфира. Объект фиксировался на предметном стекле с помощью циакрина. При регистрации активности тибияльного нерва микроэлектрод вводился в небольшое отверстие в бедро-голенном суставе. При исследовании активности отдельных нейронов две первые пары конечностей удалялись на уровне стерно-коккального сочленения. Латеральные разрезы кутикулы груди позволяли обнажить грудной отдел центральной нервной системы. Образовавшаяся полость заполнялась физиологическим раствором и через 10 мин. после операции осуществлялась регистрация.

Уже в первой серии наших экспериментов обнаружены различия в нейрональной активности тибияльного нерва нормальных и мутантных (Sh^5) дрозофил. У особей дикой линии зарегистрирован следующий тип разряда — периодические всплески импульсов продолжительностью около 1 сек и с низкой частотой повторения: приблизительно 1 всплеск за 10 сек. (рис. 1, а). У особей мутантной линии Sh^5 наряду с вышеописанным, зарегистрирован другой тип нейрональной активности — ритмичные импульсы высокой частоты 14—18 имп/сек (рис. 1, б).

Специальные контрольные эксперименты показали, что оба регистрируемых типа разрядов имеют центральное происхождение (контроль — перерезка нерва дистально по отношению к точке отведения). Однако возникает вопрос: являются ли они активностью собственно центров, локализованных в грудном ганглии, или отражают также и активность головного ганглия? Перерезка цервикального коннектива, связывающего грудной отдел нервной системы с головным, приводит к исчезновению длительных периодических всплесков импульсов как у нормальных, так и у мутантных особей. Зарегистрированный только у мутантов высокочастотный ритмич-

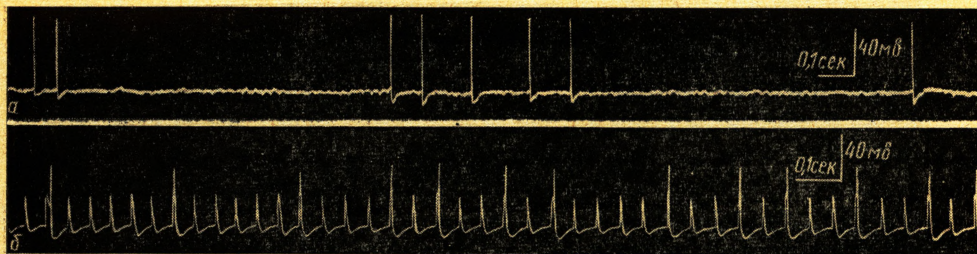


Рис. 2. Внутриклеточная регистрация электрической активности нейронов грудного ганглия двух линий *Drosophila melanogaster*: а — линия дикого типа, б — мутантная линия Sh^5 . Характерная для мутантного нейрона ритмичность формируется за счет А-компонентов п.д. клетки. S-компоненты носят нерегулярный характер (амплитуда п.д. сомы показана не полностью)

ный тип нервной активности остается неизменным. Следовательно, головной ганглий участвует в формировании активности первого типа, в то время как активность второго типа (мутантная) генерируется автономно в пределах грудного ганглия.

Специальные микроэлектродные исследования этого отдела у представителей мутантной линии Sh^5 выявили специфическую аномальную активность нейронов в трех парных областях про-, мезо- и метоторакса. Частота импульсации нейронов (14–18 имп/сек) совпадает не только с ритмом активности в тиббиальном нерве, но и с ритмом тремора конечности животного. Локализация трех пар активных областей в местах выхода из ганглиев волокон тиббиального нерва позволяет предположить, что идентифицированные клетки являются мутантными мотонейронами, иннервирующими мышцы конечностей.

Внутриклеточные отведения активности этих нейронов (рис. 2, б) показали, что характерная для них ритмичная активность является так называемым А-компонентом потенциала действия (п.д.) клетки. Возникая в аксонном холмике, этот потенциал распространяется как по аксону, так и по соме нейрона, иницируя возникновение реакции сомы или так называемого S-компонента п.д. (11). В нашем случае порог возбудимости тела клетки весьма высок, а поэтому только некоторые А-спайки вызывают п.д. сомы нейрона. Таким образом, характерной особенностью мутантного нейрона оказалась чрезвычайно стабильная и ритмичная генерация импульсов аксонным холмиком. Внутриклеточная регистрация активности нейронов контрольной линии *Drosophila melanogaster* позволяет утверждать, что ритмичность, свойственная нейронам Sh^5 -мутантов никогда не встречается у особей дикого типа. Для последних характерна аритмичность следования разрядов (рис. 2, а).

Таким образом, можно определить, что мутация Sh^5 избирательно затрагивает генераторную область нейрона — аксонный холмик, реализующий информативную функцию клетки. По крайней мере по нашим критериям, действие мутантного гена Sh^5 наиболее ярко проявляется именно в этой области и, следовательно, информация, поступающая по аксону к мышцам, носит мутантный характер. Для нас несомненный интерес представляют работы, выполненные группой американских исследователей на мутантной линии *Hyperkinetic*^{1P} (6, 8, 10). Внутриклеточная регистрация активности грудного ганглия показала, что частота разряда мутантных нейронов колеблется от 2–6 до 8–10 имп/сек, что соответствует ритму тремора конечностей животного. Руководствуясь формой регистрируемого п.д. авторы выделяли среди этих клеток два типа: собственно мотонейроны и вставочные пейсмекерные нейроны, на уровне которых и проявляется действие мутантного гена (6, 8, 10). Однако эти соображения, вероятно, еще нуждаются в детальной проверке.

Фенотипическое проявление мутантных генов Sh^5 и Hk^{1P} , на первый взгляд, сходно. Фокусом приложения этих мутаций, по-видимому, и в том и в другом случае являются нейроны грудного ганглия нервной системы. Однако исследование взаимного влияния мутантных генов друг на друга показало, что отношения генов Sh^5 и Hk^{1P} носят в фенотипическом отношении взаимонормализующий характер ⁽⁶⁾. Какие физиологические механизмы лежат в основе этой «компенсации»? Следует ожидать, что параллельное изучение мутантных линий Sh^5 и Hk^{1P} поможет нам ответить на этот вопрос, и тем самым выявить недостающие звенья цепи ген — поведение.

Физиологическая основа тремора конечностей описанных мутантных линий пока неясна. Сравнение уровней энзим-специфической активности мутантной и нормальной нервной ткани никаких различий не выявило ⁽⁶⁾. Вероятно, следует ожидать, что какие-либо нарушения будут обнаружены либо на уровне рецептивных свойств мембраны, либо в тонкой структуре взаимосвязей нейронов. Известно, например, что увеличение числа коллатералей нейронов приводит к появлению судорожной активности у млекопитающих ⁽¹²⁾. И наоборот, была выявлена целая группа генов, мутации которых приводят к тем или иным нарушениям локомоции животных, но связаны с уменьшением числа нормальных связей нейронов. Так, например, электронно-микроскопические исследования показали, что у нематоды *Caenorhabditis elegans* мутации генов *unc-3* и *unc-5* проявляются в отсутствие нормальных взаимосвязей между нервными клетками ⁽¹³⁾.

Все изложенное выше показывает, что мутантный нейрон является действительно богатой моделью для исследования непосредственной связи между изменением наследственного материала нейрона на молекулярном уровне и проявлением этого изменения на функциональном уровне, что в недалеком будущем позволит нам глубже проникнуть в тайны общей организации физиологических процессов мозга, определяемых генетическими факторами.

Институт общей генетики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
8 I 1976

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ П. К. Анохин, Биология и нейрофизиология условного рефлекса, М., «Медицина», 1968. ² Н. П. Дубинин, Общая генетика, М., «Наука», 1970. ³ L. Bertalanffy, Das Biologische Weltbild, B. 1, Bern, 1949. ⁴ W. D. Kaplan, W. E. Trout, Genetics, v. 61, 2, 399 (1969). ⁵ W. D. Kaplan, W. E. Trout, Genetics, v. 60, 191 (1968). ⁶ W. D. Kaplan, Biol. Behav. Proc. XXXII Ann. Biol. Collog., 1971, Corvallis, 1972, p. 133. ⁷ W. E. Trout, W. D. Kaplan, Exp. Gerontol., v. 5, 1, 83 (1970). ⁸ K. Ikeda, W. D. Kaplan, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 66, 3, 765 (1970). ⁹ W. D. Kaplan, W. E. Trout, Genetics, v. 77, 4, 721 (1974). ¹⁰ K. Ikeda, W. D. Kaplan, Am. Zool., v. 14, 3, 1055 (1974). ¹¹ Г. Г. Аракелов, Нейрофизиология, в. 5, 1, 88 (1973). ¹² Д. Пурпура, В кн.: Рефлексы головного мозга, М., 1965, стр. 38. ¹³ S. Brenner, Brit. Med. Bull., v. 29, 3, 269 (1974).