

RỐI LOẠN KHẢ NĂNG VẬN ĐỘNG TRÊN MÔ HÌNH RUỒI GIẤM BIỂU HIỆN PROTEIN ALPHA-SYNUCLEIN GÂY BỆNH PARKINSON

Tạ Ngọc Khánh, Trần Quốc Đạt, Lê Hoàng Bích Nga và Nguyễn Trọng Tuệ✉

Trường Đại học Y Hà Nội

Parkinson là một trong những bệnh lý thoái hoá thần kinh phổ biến, với triệu chứng điển hình là rối loạn và suy giảm khả năng vận động. Bệnh đặc trưng bởi sự thoái hóa các tế bào thần kinh sinh dopamine ở vùng chất đen và tích lũy thể Lewy trong não. Có nhiều yếu tố nguy cơ gây bệnh Parkinson, trong đó yếu tố di truyền liên quan tới biểu hiện bất thường của protein alpha-synuclein được coi là nguyên nhân chính dẫn đến sự khởi phát sớm của bệnh. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng hệ thống GAL4/UAS với mục đích biểu hiện protein alpha-synuclein tại mô não và đánh giá mức độ ảnh hưởng của protein này lên khả năng vận động và tuổi thọ của mô hình ruồi giấm. Kết quả cho thấy ruồi giấm biểu hiện protein alpha-synuclein bị rối loạn khả năng vận động ở cả giai đoạn ấu trùng và trưởng thành, mức độ suy giảm vận động tăng dần theo tuổi. Hơn nữa tuổi thọ trung bình giảm rõ rệt so với nhóm đối chứng. Mô hình này hứa hẹn khả năng ứng dụng trong nghiên cứu cơ chế bệnh sinh và sàng lọc dược chất điều trị bệnh Parkinson.

Từ khóa: bệnh Parkinson, ruồi giấm, alpha-synuclein.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh Parkinson (Parkinson Disease – PD) có biểu hiện rối loạn vận động phổ biến nhất và là bệnh thoái hóa thần kinh phổ biến thứ hai sau bệnh Alzheimer, với khoảng 1% dân số trên thế giới ở độ tuổi 65 mắc bệnh và tăng lên gần 5% ở tuổi 85.¹ Bệnh đặc trưng bởi các triệu chứng rối loạn vận động như: run, cứng cơ, chuyển động chậm chạp và tư thế không ổn định. Bên cạnh đó, PD còn tác động lên hệ thần kinh, gây suy giảm khả năng nhận thức và thay đổi hành vi. Đặc điểm bệnh lý thần kinh chủ yếu của PD là thoái hóa các tế bào thần kinh sản sinh dopamine (Dopaminergic-DA) trong vùng chất đen liên quan đến sự phát triển của các thể vùi giầu protein gọi là thể Lewy.²

Thể Lewy là cấu trúc có dạng hình cầu và ưa axit, bắt màu mạnh khi dùng hóa chất nhuộm cho protein alpha-synuclein. Các thể Lewy có khả năng tập hợp lại với nhau để tạo thành lõi các bó sợi fibril gây độc và làm thoái hóa các tế bào dopamine, từ đó làm giảm lượng chất dẫn truyền thần kinh trong não, gây nên các triệu chứng đặc trưng về thần kinh và vận động.

Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra mối liên quan giữa biểu hiện lâm sàng của bệnh Parkinson với việc lắng đọng protein alpha-synuclein nằm ngoài vùng chất đen của não.^{3,4} Đây là một protein kích thước nhỏ (14,5 KDa), gồm 140 axit amin,⁵ định vị ở vùng đầu cuối synap và liên kết với các túi synap. Protein alpha-synuclein được mã hóa bởi gen SNCA (Synuclein Alpha), một trong ba gen thuộc họ synuclein (α , β , γ) ở người.^{6,7} Alpha-synuclein có chức năng trong việc giải phóng các chất dẫn truyền thần kinh.⁸ Sự dẫn truyền thần kinh sẽ bị nhiễu loạn nếu protein này biểu hiện quá mức. Một số đột

Tác giả liên hệ: Nguyễn Trọng Tuệ

Trường Đại học Y Hà Nội

Email: trongtue@hmu.edu.vn

Ngày nhận: 08/12/2020

Ngày được chấp nhận: 22/02/2021

biến điểm trên gen SNCA như A30P, A53T, E64K... đã được chứng minh là có liên quan đến sinh bệnh học Parkinson. Các đột biến điểm này dẫn tới việc tổng hợp nên protein alpha-synuclein sai hỏng, làm gián đoạn hoạt động bình thường của tế bào thần kinh, khiến dopamine tích lũy tới mức độc hại, từ đó làm chết các tế bào dopamine. Alpha-synuclein đột biến cũng có thể làm nhiễu loạn sự dẫn truyền các xung điện thần kinh qua synap, gây ra các biểu hiện rối loạn vận động, giảm trí nhớ ở bệnh nhân Parkinson.⁸

Nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu: biểu hiện protein alpha-synuclein tại mô não của ruồi giấm, đồng thời đánh giá ảnh hưởng lên khả năng vận động (ở cả giai đoạn ấu trùng và giai đoạn trưởng thành) và tuổi thọ của ruồi trong mối liên quan đến bệnh Parkinson. Đây là hướng nghiên cứu hoàn toàn mới tại Việt Nam, góp phần củng cố bằng chứng về vai trò của alpha-synuclein trong sinh bệnh học Parkinson, đồng thời càng làm đa dạng các mô hình ứng dụng trong sàng lọc thuốc điều trị bệnh.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

Nghiên cứu sử dụng các dòng ruồi giấm chuyển gen thu thập từ các trung tâm lưu trữ lớn trên thế giới bao gồm:

- Dòng driver: định hướng biểu hiện protein GAL4 tại mô não ruồi giấm. Kí hiệu: w; +; Elav-Gal4 (mã số #8760 – trung tâm lưu trữ Bloomington, Mỹ).

- Dòng bệnh: ruồi giấm biểu hiện gen SNCA mã hoá cho protein alpha-synuclein mang đột biến A30P của người. Kí hiệu: w; +; UAS-SNCA/A30P (mã số #33804 – trung tâm lưu trữ Bloomington, Mỹ).

- Dòng đối chứng: mang gen biểu hiện protein GFP. Kí hiệu: w; UAS-mCD8-GFP; + (mã số 108068 – trung tâm lưu trữ Kyoto, Nhật Bản).

Ruồi giấm được nuôi trong môi trường thức ăn cơ bản bao gồm 0,65% agarose, 10% glucose, 4% nấm men, 5% bột ngô và 3% bột cám gạo và trong điều kiện nhiệt độ 25°C, thời gian chiếu sáng chu kỳ 12 giờ sáng/ 12 giờ tối.

2. Phương pháp

Phương pháp biểu hiện protein alpha-synuclein trên não của ruồi giấm.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành biểu hiện protein alpha-synuclein trên mô não của ruồi giấm sử dụng hệ thống điều hoà biểu hiện gen GAL4/UAS. Hệ thống này sử dụng hai dòng ruồi chính: Một dòng driver mang kiểu gen w; +; Elav-Gal4 và một dòng mang kiểu gen w; +; UAS-SNCA/A30P. Khi lai hai dòng ruồi này với nhau, thế hệ con lai F1 sẽ mang đồng thời cả hai cấu trúc Elav-Gal4 và UAS-SNCA/A30P. Dưới tác dụng của promotor đặc hiệu thần kinh (Elav), protein GAL4 được tạo ra sẽ bám vào vùng trình tự hoạt hoá thượng nguồn (Upstream Activation Sequence -UAS) nằm trước gen đích SNCA, hoạt hóa sự phiên mã của gen này. Nhờ đó protein alpha-synuclein được tạo ra và biểu hiện trên mô não của ruồi giấm.

- Thực hiện phép lai di truyền theo sơ đồ sau:

Phép lai 1: tạo dòng đối chứng:

P: ♀ w; +; elav-GAL4 X ♂ w; UAS-GFP-CD8; +

F1: w; $\frac{\text{UAS-GFP-CD8}}{+}$; $\frac{\text{elav-GAL4}}{+}$

Kí hiệu: elav>GFP-CD8

Phép lai 2: tạo dòng bệnh biểu hiện protein alpha-synuclein:

P: ♀ w; +; elav-GAL4 X ♂ w; +; UAS-SNCA

F1: w; +; $\frac{\text{elav-GAL4}}{\text{UAS-SNCA}}$

Kí hiệu: elav>SNCA

Ruồi giấm sau khi lai tạo sẽ được sử dụng cho một loạt các thí nghiệm đánh giá hành vi trong mối liên quan với bệnh Parkinson. Các thí nghiệm được tiến hành song song giữa nhóm

bệnh (biểu hiện protein alpha-synuclein) và nhóm chứng (biểu hiện protein GFP).

Xác định biểu hiện của protein alpha-synuclein trên não ruồi bằng phương pháp nhuộm miễn dịch huỳnh quang.

Đây là phương pháp phát hiện sự có mặt của protein đích dựa trên phản ứng đặc hiệu giữa kháng nguyên và kháng thể. Kháng thể sơ cấp là kháng thể đặc hiệu với protein đích (alpha-synuclein). Kháng thể thứ cấp có gắn chất phát huỳnh quang, có khả năng phát màu dưới ánh sáng kích thích có bước sóng phù hợp. Từ đó nhận biết được sự tồn tại cũng như vị trí của protein mục tiêu thông qua tín hiệu huỳnh quang thu được.

Thí nghiệm được tiến hành trên não của ấu trùng ruồi giấm ngày 3. Mô não sau khi phẫu tích được cố định trong dung dịch Paraformandehide 4% (Merck) và xử lý với dung dịch huyết thanh dê NGS 10% (Vector Laboratory – Mỹ) được pha loãng bằng dung dịch Phosphat Buffer Saline có chứa 0,15% Triton-X100. Mô não sau khi xử lý được ủ với kháng thể bậc 1 (Anti-mouse alpha-synuclein – ProteinTech, tỷ lệ 1:200 trong NGS 10%) ở 4°C trong 16h. Sau khi rửa với dung dịch Triton/PBS 0,3%, mẫu mô tiếp tục được ủ với kháng thể bậc 2 (Anti-mouse IgG Alexa Flour®546 Conjugate – Cell Signaling Technology, tỷ lệ 1:500) và quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang (Carl Zeiss) bước sóng 546nm.

Phương pháp đánh giá khả năng vận động của ruồi giấm ở giai đoạn ấu trùng bằng thử nghiệm bò trườn (Crawling assay)

Quy trình được tiến hành dựa theo mô tả trong nghiên cứu của Nichols và cộng sự⁹ với mục đích đánh giá khả năng vận động của ấu trùng ruồi giấm biểu hiện protein alpha-synuclein thông qua đánh giá vận tốc trung bình và hình dạng đường di chuyển của ấu trùng. Đặt 2 - 4 ấu trùng trên đĩa thạch 1%, sử dụng máy quay

để ghi lại hình ảnh vận động của ấu trùng. Tiến hành quay khi ấu trùng bắt đầu vận động. Thời gian quay là 1 phút. Xử lý hình ảnh thu được bằng phần mềm Pazer Free MOV to AVI Converter PORTABLE, sau đó dùng phần mềm Image-J/plugin wrMTrack để thu số liệu vận tốc và quỹ đạo đường bò của ấu trùng. Số liệu thống kê vào Microsoft Excel, biểu đồ được vẽ và xử lý bằng GraphPad Prism 7.04.

Phương pháp đánh giá khả năng vận động ở ruồi giấm trưởng thành (Climbing assay)

Thiết kế thí nghiệm được dựa trên nghiên cứu của Surya TM và cộng sự (2015) với mục đích đánh giá khả năng vận động của ruồi giấm biểu hiện protein alpha-synuclein tại mô não. Thí nghiệm dựa trên tập tính trèo ngược chiều trọng lực khi có lực tác động cùng chiều trọng lực của ruồi giấm. Thí nghiệm được thực hiện trên ruồi ở các thời điểm 3, 7, 14 và 23 ngày tuổi và thực hiện song song hai dòng bệnh và chứng. Ruồi giấm được lựa chọn làm thí nghiệm sẽ được gây mê bằng CO₂ sau đó được chuyển vào mỗi ống thủy tinh (15 – 20 ruồi/ ống) có chia vạch từ 1 đến 5, mỗi vạch cách nhau 2 cm. Đợi ít nhất 30 phút cho các con ruồi ổn định, dùng sức của tay đập lực đủ mạnh liên tục 5 lần để đưa ruồi về đáy ống thủy tinh (về cùng vạch xuất phát). Sau đó đợi 30 giây cho ruồi bò lên, lặp lại động tác 5 lần. Sử dụng dữ liệu video ghi được tại 5 giây đầu tiên sau khi kết thúc mỗi lần đập để phân tích, so sánh khả năng leo trèo của ruồi ở các nhóm thí nghiệm bằng phương pháp tính điểm như sau:

- + 0 điểm đối với ruồi ở dưới vạch 2cm
 - + 1 điểm đối với ruồi ở giữa vạch 2 và 4cm
 - + 2 điểm đối với ruồi ở giữa vạch 4 và 6cm
 - + 3 điểm đối với ruồi ở giữa vạch 6 và 8cm
 - + 4 điểm đối với ruồi ở giữa vạch 8 và 10cm
 - + 5 điểm đối với ruồi ở trên vạch 10cm
- Số lượng ruồi ở mỗi mức điểm được đếm thủ

công bằng cách sử dụng dữ liệu video ghi được tại 5 giây đầu tiên sau khi kết thúc mỗi lần đập. Chỉ số vận động được tính dựa trên trung bình cộng số điểm thu được của từng dòng. Các số liệu được xử lý bằng phần mềm Image-J, thống kê bằng Microsoft Excel và phần mềm SPSS.

Phương pháp đánh giá tuổi thọ của ruồi giấm (Viability assay)

Thí nghiệm được xây dựng theo nghiên cứu của Antonio LR và cộng sự để xác định ảnh hưởng của alpha-synuclein lên tuổi thọ của ruồi giấm. Theo đó, 40 cá thể ruồi giấm trưởng thành ở mỗi dòng chứng và bệnh được nuôi trong điều kiện tiêu chuẩn. Ruồi định kỳ được thay thức ăn mới và ghi nhận số lượng ruồi chết 2 - 3 ngày 1 lần. Tỷ lệ sống của ruồi được tính là phần trăm số cá thể còn lại ở mỗi dòng qua từng ngày, cho đến khi không còn con nào sống sót.

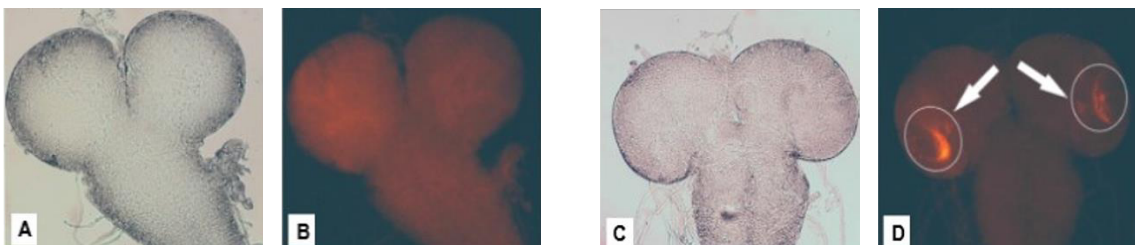
III. KẾT QUẢ

1. Biểu hiện protein alpha-synuclein trên não của ruồi giấm

Trong nghiên cứu này, chúng tôi xây dựng mô hình PD trên ruồi giấm bằng biểu hiện protein alpha-synuclein ở não ruồi thông qua hệ thống biểu hiện gen GAL4/UAS. Phương pháp nhuộm miễn dịch huỳnh quang với kháng thể đặc hiệu được sử dụng để kiểm chứng sự biểu hiện của protein alpha-synuclein trên mô não ruồi. Kết quả được thể hiện trong Hình 1.

Elav>GFP-CD8

Elav>SNCA



Hình 1. Kết quả nhuộm miễn dịch huỳnh quang xác định biểu hiện của protein alpha-synuclein trên não ấu trùng ruồi giấm ngày 3 của nhóm chứng (elav>GFP-CD8) và nhóm bệnh (elav>SNCA) lần lượt chụp dưới ánh sáng trắng (A;C) và dưới ánh sáng huỳnh quang bước sóng 546nm (B;D). Mũi tên chỉ vị trí biểu hiện của alpha-synuclein trên não ấu trùng ruồi giấm.

Kết quả nhuộm miễn dịch huỳnh quang cho thấy, ở nhóm bệnh thu được tín hiệu huỳnh quang sáng và rõ nét tại hai bán cầu não của ấu trùng ruồi giấm ngày 3, đặc hiệu cho protein alpha-synuclein. Tín

3. Xử lý số liệu

Kết quả của thí nghiệm đánh giá khả năng vận động xử lý bằng phần mềm phân tích hình ảnh Image J (NIH, USA) sau đó phân tích thống kê bằng phần mềm GraphPad Prism 7. Kết quả của thí nghiệm đánh giá tuổi thọ của ruồi giấm được tổng hợp bằng Microsoft Excel và phân tích bằng phần mềm GraphPad Prism 7. Tất cả các thí nghiệm đều được lặp lại tối thiểu 3 lần. Giá trị P được tính toán sử dụng Mann-Whitney test. Tất cả các kết quả đều được biểu diễn với sai số SEM.

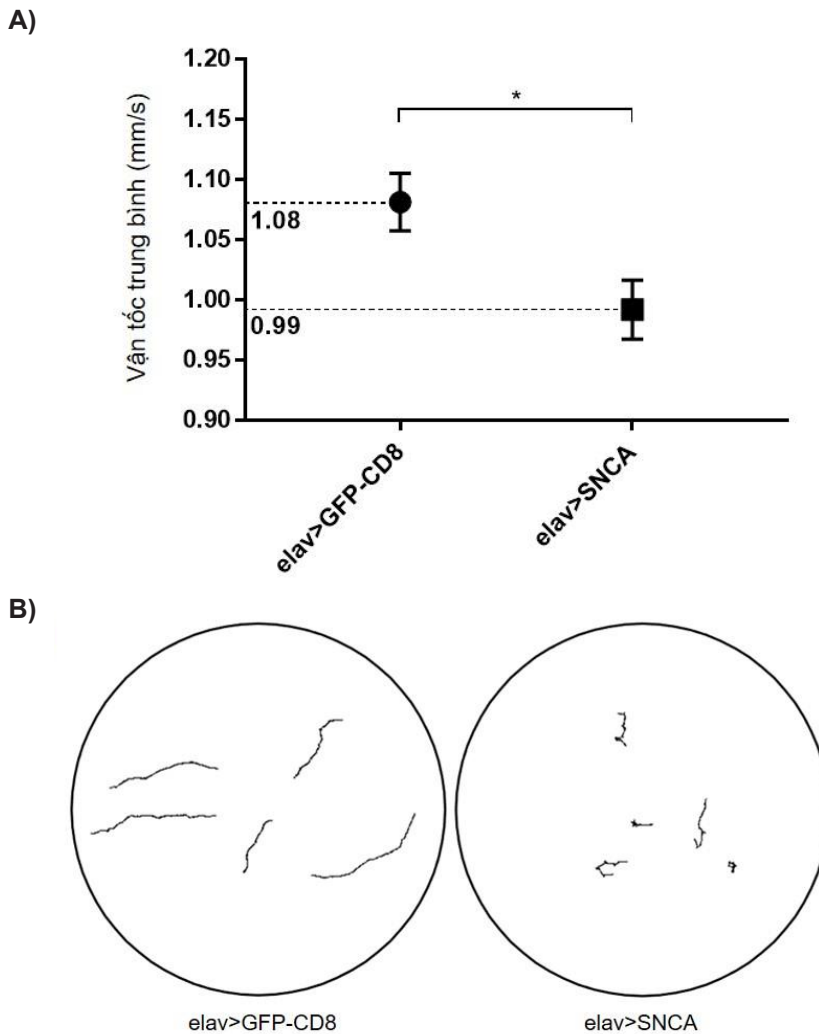
4. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu này được thực hiện trên ruồi giấm chuyển gen và chưa có thử nghiệm trên các đối tượng khác. Nghiên cứu không vi phạm đạo đức nghiên cứu y học.

hiệu này không phát hiện thấy ở nhóm chứng, khẳng định sự thành công trong việc biểu hiện protein đích tại mô não ruồi giấm và khả năng sử dụng mô hình cho các thí nghiệm hành vi tiếp theo.

2. Khả năng vận động của ruồi giấm ở giai đoạn ấu trùng

Sau khi đã biểu hiện được protein alpha-synuclein trên não ruồi, chúng tôi tiếp tục tiến hành thí nghiệm đánh giá khả năng vận động của ruồi giấm mang gen bệnh PD ở hai giai đoạn trong vòng đời của chúng bao gồm: giai đoạn ấu trùng thông qua thử nghiệm bò trườn (crawling assay) và giai đoạn trưởng thành thông qua thử nghiệm leo trèo (climbing assay). Ở thí nghiệm bò trườn, ấu trùng ruồi giấm ngày 3 được thu thập và khảo sát quá trình vận động (bao gồm vận tốc trung bình và hình dạng đường đi) bằng cách ghi lại toàn bộ quá trình di chuyển của chúng trên đĩa thạch agar 2%. Dữ liệu được xử lý bằng hệ thống phần mềm ImageJ, biểu diễn số liệu dưới dạng biểu đồ bằng phần mềm thống kê GraphPad 7.04. Kết quả được thể hiện trong Hình 2.

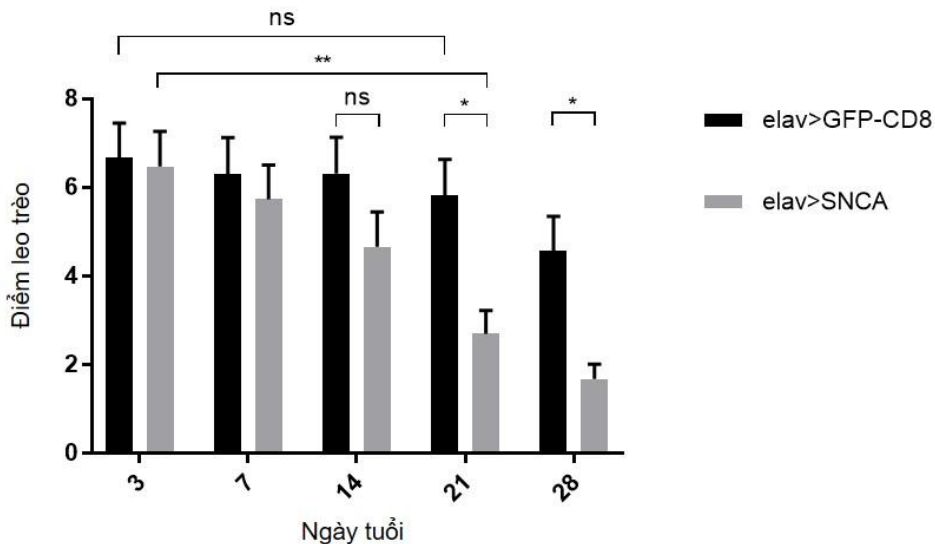


Hình 2. Kết quả thử nghiệm bò trườn (Crawling assay) so sánh vận tốc bò trườn trung bình (A) và hình dạng đường đi chuyển (B) của ấu trùng ngày 3 ở nhóm bệnh (elav>SNCA) và nhóm chứng (elav>GFP-CD8) (n = 40, t-test với * p < 0.05).

Kết quả cho thấy ấu trùng ngày 3 của nhóm ruồi bệnh (elav>SNCA) có hiện tượng suy giảm khả năng vận động so với nhóm đối chứng (elav>GFP-CD8), biểu hiện qua việc giảm tốc độ di chuyển ($p < 0.05$, độ chênh lệch vận tốc trung bình $\Delta v = 0.09$ mm/s) (Hình 2A). Bên cạnh đó, khi ghi lại quỹ đạo di chuyển của ấu trùng ngày 3 ở cả hai nhóm trong cùng khoảng thời gian là 40 giây, chúng tôi nhận thấy ấu trùng nhóm chứng (elav>GFP-CD8) bò về một hướng xác định, quỹ đạo di chuyển gần như là đường thẳng. Ngược lại, ấu trùng nhóm bệnh (elav>SNCA) di chuyển một cách rối loạn, không có định hướng và quỹ đạo không rõ ràng (Hình 2B). Kết quả này cho thấy việc biểu hiện protein alpha-synuclein trên não làm suy giảm và rối loạn vận động của ấu trùng ruồi giấm.

3. Khả năng vận động ở ruồi giấm trưởng thành

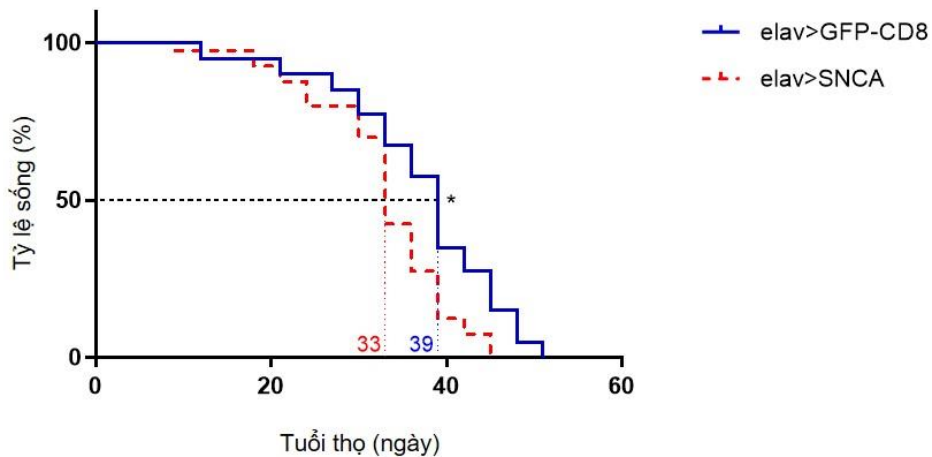
Ở giai đoạn ruồi trưởng thành, khả năng vận động của ruồi giấm ở hai nhóm được đánh giá qua thử nghiệm leo trèo và tiến hành ở các thời điểm 3 ngày, 7 ngày, 14 ngày, 21 ngày và 28 ngày tuổi. Kết quả được biểu diễn trong Hình 3.



Hình 3. Kết quả so sánh khả năng leo trèo của ruồi trưởng thành ở nhóm bệnh (elav>SNCA) và nhóm chứng (elav>GFP-CD8). Trong đó, trục hoành thể hiện thời điểm thực hiện thí nghiệm tính theo số ngày tuổi của ruồi, trục tung thể hiện khả năng leo trèo của ruồi bằng phương pháp cho điểm ($n = 40$, two-way ANOVA với $* p < 0.05$, $** p < 0.01$, ns: sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê).

Kết quả cho thấy, tại các thời điểm 3 ngày tuổi, 7 ngày tuổi và 14 ngày tuổi, không có sự khác biệt đáng kể về khả năng vận động giữa ruồi trưởng thành nhóm bệnh (elav>SNCA) và nhóm chứng (elav>GFP-CD8). Tuy nhiên, tại ngày tuổi thứ 21 và 28, khả năng vận động của ruồi nhóm bệnh giảm rõ rệt so với nhóm chứng, điểm leo trèo trung bình đạt được của nhóm bệnh ở ngày 21 chưa đến 3 điểm trong khi khả năng leo trèo của ruồi nhóm chứng vẫn đạt gần 6 điểm (Hình 3). Sự suy giảm càng rõ rệt khi độ tuổi của ruồi tăng lên. Như vậy, kết quả của thử nghiệm bò trườn và thử nghiệm leo trèo đã cho thấy việc biểu hiện protein alpha-synuclein trên não ruồi đã gây ra sự suy giảm và rối loạn vận động ở cả giai đoạn ấu trùng và giai đoạn trưởng thành của ruồi giấm. Kiểu hình thu được tương tự như triệu chứng của bệnh Parkinson. Bên cạnh biểu hiện suy giảm khả năng vận động thì giảm tuổi thọ cũng là một trong những hệ quả

mà bệnh Parkinson gây ra. Thời gian sống sót trung bình trong vòng đời của ruồi giấm được đánh giá tại thời điểm 50% số cá thể trong quần thể còn sống. Kết quả thu được cho thấy, thời gian sống sót trung bình của ruồi giấm ở nhóm bệnh biểu hiện protein alpha-synuclein là 33 ngày, thấp hơn so với thời gian sống sót trung bình ở nhóm chứng (39 ngày).



Hình 4. Biểu đồ thể hiện tuổi thọ của ruồi giấm ở nhóm chứng (elav>GFP-CD8) và nhóm bệnh (elav>SNCA). Trong đó, trục hoành thể hiện tuổi thọ của ruồi giấm tính theo ngày, trục tung thể hiện tỷ lệ ruồi còn sống trong từng nhóm tính theo đơn vị phần trăm (%) (n = 40, log-rank test với * p < 0.05).

Kết quả này cho thấy việc biểu hiện protein alpha-synuclein trên não đã làm rối loạn khả năng vận động đồng thời làm suy giảm tuổi thọ trung bình của ruồi giấm.

IV. BÀN LUẬN

Với cấu trúc hệ thần kinh gần như hoàn thiện và chức năng tương đồng cao với người, ruồi giấm đã được sử dụng rộng rãi như một mô hình nghiên cứu về các bệnh lý thần kinh và vận động của người. Mặc dù ruồi giấm có một hệ thống thần kinh trung ương chứa ít các đơn vị tế bào thần kinh hơn so với các hệ thần kinh trung ương của động vật có xương sống, nhưng chúng có chung các loại chất dẫn truyền thần kinh như GABA, glutamate, dopamine, serotonin và acetylcholine.¹⁰ Vì thế ruồi giấm thực sự là mô hình lý tưởng để nghiên cứu bệnh liên quan đến thần kinh như Parkinson.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng hệ thống GAL4/UAS để biểu hiện protein alpha-synuclein tại mô não của ruồi giấm, đồng thời sử dụng dòng ruồi biểu hiện protein

GFP (Green Fluorescent Protein) làm đối chứng. Nhóm ruồi đối chứng có cùng phương thức biểu hiện với mong muốn tạo ra sự tương tự về ảnh hưởng của việc biểu hiện một loại protein ngoại lai trên mô não ruồi giấm. Nghiên cứu cũng đã xây dựng được mô hình ruồi giấm với những biểu hiện bệnh lý đặc trưng cho bệnh Parkinson bao gồm rối loạn khả năng vận động và suy giảm tuổi thọ. Quá trình suy giảm vận động của ruồi nhóm bệnh tăng dần theo thời gian và ngày càng rõ rệt khi so sánh với nhóm chứng. Điều này phù hợp với những đặc trưng của bệnh Parkinson, thường biểu hiện ở người cao tuổi và tuổi càng cao thì mức độ bệnh càng nghiêm trọng, các triệu chứng rối loạn vận động càng rõ ràng.^{11,12}

Nhiều nghiên cứu trên thế giới cũng đã chứng minh được sự biểu hiện của protein alpha-synuclein trong não ruồi. Như trong nghiên cứu của Chen A.Y., Wilburn P., Hao X. và cộng sự (năm 2014) cũng đã sử dụng hệ thống GAL4/UAS để biểu hiện protein alpha-synuclein bị đột biến trong não ruồi và cho thấy sự gây độc của nó đối với các tế bào thần kinh.¹³ Bên cạnh đó, nhiều mô hình khác nhau cũng đã được sử dụng để biểu hiện protein alpha-synuclein và chứng minh độc tính của protein này. Trong môi trường nuôi cấy và tăng trưởng, biểu hiện quá mức của alpha-synuclein làm hạn chế sự phát triển của các tế bào nấm men.¹⁴ Bên cạnh đó, mô hình giun tròn *C. Elegans* cũng được sử dụng để chỉ ra alpha-synuclein có thể làm thoái hóa các tế bào thần kinh sinh dopamine.¹⁵ Điểm chung của các mô hình này là đều cho thấy tác động bất lợi của việc biểu hiện alpha-synuclein lên hệ thống sống.

Việc đánh giá được ảnh hưởng của sự biểu hiện alpha-synuclein lên khả năng vận động ở giai đoạn sớm là ấu trùng ngày 3 và giai đoạn sau là ruồi trưởng thành đều có ý nghĩa thiết thực và mang đến nhiều lợi ích. Ấu trùng ngày 3 của nhóm ruồi biểu hiện alpha-synuclein đã thể hiện sự suy giảm và rối loạn vận động so với nhóm chứng, từ đó gợi ý cho các nghiên cứu thử nghiệm thuốc và các dược chất thiên nhiên có tác dụng điều trị PD ngay từ giai đoạn sớm. Sử dụng ấu trùng ngày 3 cũng giúp rút ngắn thời gian, giảm thiểu chi phí cho nghiên cứu. Còn ở giai đoạn muộn hơn, ruồi trưởng thành của nhóm bệnh có những biểu hiện suy giảm vận động nghiêm trọng dần khi ngày tuổi càng cao. Điều này cung cấp một mô hình lý tưởng cho những nghiên cứu về các bệnh liên quan đến lão hóa khác không chỉ riêng PD mà còn đối với các bệnh thoái hóa thần kinh tiến triển nói chung. Ngoài ra, mô hình trong nghiên cứu còn có thể ứng dụng trong thử nghiệm sàng lọc bước đầu các loại thuốc điều trị hoặc các dược chất hỗ trợ cải thiện tình trạng bệnh lý ở những đối tượng cao tuổi.

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã biểu hiện thành công protein alpha-synuclein trên mô não ruồi giám sử dụng hệ thống GAL4/UAS. Ruồi giám biểu hiện protein alpha-synuclein có biểu hiện kiểu hình đặc trưng của bệnh Parkinson như giảm khả năng vận động và rút ngắn tuổi thọ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lees A.J., Hardy J., và Revesz T. Parkinson's disease. *The Lancet*. 2009;373(9680):2055–2066.
2. Dickson D.W., Braak H., Duda J.E. và cộng sự. Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. *The Lancet Neurology*. 2009;8(12):1150–1157.
3. Lacono D., Geraci-Erck M., Rabin M.L. và cộng sự. Parkinson disease and incidental Lewy body disease: Just a question of time. *Neurology*. 2015;85(19):1670–1679.
4. Braak H., Tredici K.D., Rüb U. và cộng sự. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*. 2003;24(2):197–211.
5. Waxman E.A. và Giasson B.I. Molecular mechanisms of α -synuclein neurodegeneration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2009;1792(7):616–624.
6. Jakes R., Spillantini M.G., và Goedert M. Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Letters*. 1994;345(1):27–32.
7. Lavedan C., Leroy E., Dehejia A. và cộng sự. Identification, localization and characterization of the human γ -synuclein gene. *Hum Genet*. 1998;103(1):106–112.
8. Nemani V.M., Lu W., Berge V. và cộng sự. Increased Expression of α -Synuclein Reduces Neurotransmitter Release by Inhibiting Synaptic Vesicle Reclustering after Endocytosis. *Neuron*. 2010;65(1):66–79.

9. Nichols C.D., Becnel J., và Pandey U.B. Methods to Assay Drosophila Behavior. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2012;(61):e3795.
10. Hirth F. Drosophila melanogaster in the Study of Human Neurodegeneration. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2010;9(4):504–523.
11. Van Den Eeden S.K., Tanner C.M., Bernstein A.L. và cộng sự. Incidence of Parkinson's Disease: Variation by Age, Gender, and Race/Ethnicity. *Am J Epidemiol*. 2003;157(11):1015–1022.
12. De Lau L.M. và Breteler M.M. Epidemiology of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*. 2006;5(6):525–535.
13. Chen A.Y., Wilburn P., Hao X. và cộng sự. Walking deficits and centrophobism in an α -synuclein fly model of Parkinson's disease. *Genes, Brain and Behavior*. 2014;13(8):812–820.
14. Flower T.R., Chesnokova L.S., Froelich C.A. và cộng sự. Heat Shock Prevents Alpha-synuclein-induced Apoptosis in a Yeast Model of Parkinson's Disease. *Journal of Molecular Biology*. 2005;351(5):1081–1100.
15. Van Ham T.J., Thijssen K.L., Breitling R. và cộng sự. C. elegans Model Identifies Genetic Modifiers of α -Synuclein Inclusion Formation During Aging. *PLoS Genet*. 2008; 4(3).

Summary

THE EXPRESSION OF ALPHA-SYNUCLEIN PROTEIN OF PARKINSON'S DISEASE INDUCED DEFECTS IN *DROSOPHILA* LOCOMOTIVE ABILITY

Parkinson's disease is one of the most common neuro-degenerative disease characterized by impaired locomotive ability. The morphological of this disease is degeneration of dopaminergic in the substantia nigra and accumulation of Lewy body in the peripheral autonomic nervous system. There are many risk factors for Parkinson's disease, in which genetic factors associated with abnormal expression of the protein alpha-synuclein are considered to be the main cause of the early onset. In this study, we used the GAL4/UAS system to express the protein alpha-synuclein in brain tissue and to evaluate the effect of this protein expression on locomotive ability and longevity of fruit flies. The results showed that the fruit flies expressing the protein alpha-synuclein had dyskinesia in both larval and adult stage; with age, the locomotive ability impairment increased. Furthermore, the average life expectancy decreased significantly compared to the control group. This model promises application for studying pathogenesis mechanism and drug screening for Parkinson's disease treatment.

Keywords: Parkinson disease, alpha-synuclein, *Drosophila*.