

MÔ HÌNH BIỂU HIỆN BETA-SECRETASE GÂY SUY GIẢM TRÍ NHỚ TRÊN RUỒI GIẤM

Đào Thị Huyền, Trần Quốc Đạt và Nguyễn Trọng Tuệ ✉

Trường Đại học Y Hà Nội

*Beta-secretase (β -site APP cleaving enzymes 1 – BACE1) là protein đóng vai trò quan trọng trong con đường chuyển hóa APP, một trong những nguyên nhân gây bệnh Alzheimer – hội chứng mất trí nhớ phổ biến được đặc trưng bởi sự rối loạn hành vi, suy giảm trí nhớ và khả năng vận động. Vai trò của protein này đã được công bố nhưng chưa hoàn toàn sáng tỏ, do vậy xây dựng mô hình biểu hiện β -secretase là rất cần thiết cho nghiên cứu sinh bệnh học và ứng dụng trong thử nghiệm sàng lọc dược liệu điều trị. Ruồi giấm (*Drosophila melanogaster*) là một mô hình nghiên cứu đã được chứng minh mang nhiều ưu việt, bộ gen của chúng chứa 70% gen gây bệnh tương đồng với người. Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng hệ thống GAL4/UAS để biểu hiện protein beta-secretase tại mô não của ruồi giấm và đánh giá mức độ ảnh hưởng của protein này lên khả năng vận động, trí nhớ ngắn hạn và tuổi thọ song song với nhóm chứng biểu hiện protein GFP. Kết quả cho thấy ruồi giấm biểu hiện protein beta-secretase gây suy giảm trí nhớ rõ rệt trên ấu trùng ngày 3, suy giảm vận động ở giai đoạn muộn và giảm tuổi thọ so với nhóm chứng. Hơn nữa, với thử nghiệm sàng lọc thuốc ban đầu với dược chất Donepezil trên mô hình bệnh lý cho thấy có tác dụng tích cực trong cải thiện trí nhớ ngắn hạn.*

Từ khóa: bệnh Alzheimer, ruồi giấm, β -secretase, Donepezil

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh Alzheimer (AD – Alzheimer's disease) là hội chứng mất trí nhớ phổ biến nhất trong các bệnh về thoái hóa thần kinh. Bệnh đặc trưng bởi các biểu hiện rối loạn hành vi, suy giảm trí nhớ và khả năng vận động. Nguyên nhân gây bệnh của AD bao gồm sự tích tụ các mảng β -amyloid ($A\beta$), các đám rối thần kinh và việc mất hay chết các tế bào, chủ yếu vùng vỏ não và hồi hải mã.¹ Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra, protein β -secretase mã hoá bởi gen BACE1 (*β -site APP cleaving enzymes 1*), là enzym chuyển hóa quan trọng trong phân giải protein tiền amyloid (amyloid precursor protein – APP), con đường đóng vai

trò quan trọng trong cơ chế sinh bệnh học của AD.² Ban đầu, enzyme β -secretase phân cắt phân tử APP tạo ra một đoạn peptide ngoại bào hòa tan được gọi là sAPP β và β CTF/C99. Phân tử β CTF lại tiếp tục bị phân cắt bởi enzyme γ -secretase để tạo ra các đoạn peptide $A\beta$ và domain APP nội bào.² Tùy theo vị trí cắt của các enzym trên mà sản phẩm tạo ra bao gồm nhiều loại peptide $A\beta$ có độ dài khác nhau, trong đó có $A\beta_{40}$ và $A\beta_{42}$ là 2 dạng đồng phân chính được tạo ra trong thần kinh trung ương. $A\beta_{40}$ dạng hòa tan có mặt nhiều nhất với tỷ lệ 95%, còn $A\beta_{42}$ ít gặp hơn (khoảng 5%) nhưng lại dễ bị oligome hóa hơn và được chứng minh là gây độc thần kinh nhiều hơn.³ Chúng cũng được tìm thấy nhiều trong các mảng amyloid tích tụ.⁴

Xây dựng mô hình nghiên cứu thực nghiệm mang lại nhiều ý nghĩa như góp phần làm sáng tỏ cơ chế bệnh sinh, đồng thời cung cấp một mô

Tác giả liên hệ: Nguyễn Trọng Tuệ

Trường Đại học Y Hà Nội

Email: trongtue@hmu.edu.vn

Ngày nhận: 06/08/2020

Ngày được chấp nhận: 14/09/2020

hình tiềm năng và kinh tế cho những nghiên cứu thử nghiệm và sàng lọc thuốc sau này. Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã sử dụng ruồi giấm để mô phỏng lại bệnh Alzheimer bằng cách biểu hiện các protein khác nhau trong cơ chế bệnh sinh đồng thời đánh giá tác động của việc biểu hiện lên hành vi, khả năng vận động, khả năng ghi nhớ và tuổi thọ của ruồi giấm.^{5,6} Để góp phần làm phong phú và đa dạng các mô hình thực nghiệm cho nghiên cứu bệnh Alzheimer, nghiên cứu lựa chọn nhắm vào protein đích β -secretase và đặt ra mục tiêu: (1) Đánh giá thay đổi trong hành vi liên quan đến bệnh Alzheimer trên mô hình ruồi giấm biểu hiện beta-secretase, đồng thời (2) ứng dụng mô hình này trong thử nghiệm thuốc cải thiện trí nhớ.

Đây là hướng nghiên cứu hoàn toàn mới tại Việt Nam, góp phần củng cố bằng chứng về vai trò của β -secretase trong sinh bệnh học Alzheimer, đồng thời càng làm đa dạng các mô hình ứng dụng trong các nghiên cứu về bệnh.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

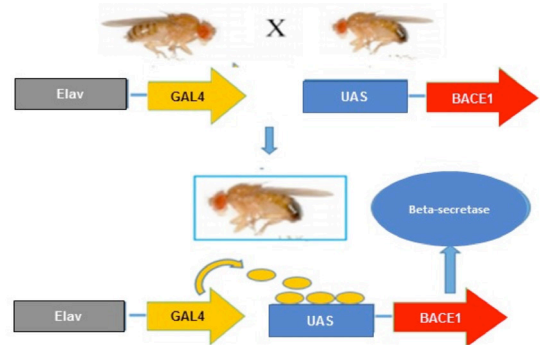
Nghiên cứu sử dụng các dòng ruồi giấm chuyển gen thu thập từ các trung tâm lưu trữ lớn trên thế giới bao gồm dòng driver định hướng biểu hiện protein GAL4 tại mô não ruồi giấm $w; +; Elav-Gal4$ (mã số #8760 – Bloomington Stock Center); dòng mang gen bệnh – biểu hiện protein β -secretase của người trên ruồi giấm $w; +; UAS-BACE1$ (mã số #33804 – Bloomington Stock Center) và dòng ruồi mang gen biểu hiện protein GFP $w; UAS-mCD8-GFP; +$ (mã số 108068 – Kyoto Stock Center).

Ruồi 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 β -secretase trên não của ruồi giấm

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành biểu hiện protein β -secretase 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 $w; +; UAS-BACE1$. Khi lai hai dòng ruồi này với nhau, thế hệ con lai F1 sẽ mang đồng thời cả hai cấu trúc $Elav-Gal4$ và $UAS-BACE1$ (Hình 1). 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 $BACE1$, hoạt hóa sự phiên mã của gen này. Nhờ đó protein β -secretase được tạo ra và biểu hiện trên mô não của ruồi giấm.



Hình 1. Phép lai biểu hiện protein beta-secretase trên mô não của ruồi.

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 Alzheimer. Các thí nghiệm được tiến hành song song giữa nhóm bệnh (biểu hiện protein β -secretase) và nhóm chứng (biểu hiện protein GFP).

Phương pháp đánh giá khả năng học hỏi và ghi nhớ của ấu trùng ruồi giấm (Learning & memory assay)

Thí nghiệm dựa trên nghiên cứu của Bertram Gerber và cộng sự⁷ sử dụng ấu trùng ngày 3 vẫn còn rúc trong thức ăn hay có nghĩa là chúng đang có nhu cầu ăn mạnh mẽ. Do đó, chúng rất nhạy cảm với môi trường có chứa đường (glucose hoặc sucrose). Các ấu trùng ngày 3 này sẽ được chia làm hai nhóm:

- Nhóm 1: ấu trùng được ngửi mùi octanol (OCT) trong môi trường thức ăn có chứa sucrose (+), sau đó chuyển sang môi trường thức ăn không chứa sucrose và có mùi của 4-methylcyclohexanol (MCH). Kí hiệu: OCT+/MCH

- Nhóm 2: thí nghiệm được thiết kế ngược lại, ấu trùng được ngửi mùi OCT trong môi trường không có sucrose và mùi MCH trong môi trường chứa sucrose (+). Kí hiệu OCT/MCH+

Mỗi nhóm sẽ được trải qua 2 pha gồm pha huấn luyện (training) và pha kiểm tra (testing). Ở pha huấn luyện, ấu trùng ruồi giấm bị bỏ đói sẽ nhạy cảm với sucrose, do đó sẽ nhận biết và ghi nhớ mùi thơm tương ứng với môi trường có sucrose. Sau khi hoàn thành pha huấn luyện, ấu trùng được cho sang pha kiểm tra với sự hiện diện đồng thời của cả hai mùi OCT và MCH. Theo đó, ấu trùng có khả năng ghi nhớ tốt hơn sẽ có xu hướng di chuyển về phía mùi được huấn luyện là có sucrose, dựa trên trí nhớ ngắn hạn thu được trước đó. Kết quả thu thập được tính toán theo công thức:

Tỷ lệ ấu trùng ưa mùi OCT (Preference OCT): $PREFOCT = (NOCT - NMCH) / Total$

Tỷ lệ ấu trùng ưa mùi MCH (Preference MCH): $PREFMCH = (NMCH - NOCT) / Total$

Chỉ số học hỏi (Learning Index):

$LI = (PREFMCH + PREFOCT) / 2$

Trong đó:

NOCT = số lượng ấu trùng bò về phía OCT

NMCH = số lượng ấu trùng bò về phía MCH

Total: tổng số ấu trùng trong thí nghiệm.

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 β -secretase tại mô não.⁸ 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). 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 30s cho ruồi bò lên, lặp lại động tác 5 lần. Sử dụng dữ liệu video ghi được tại 5s 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.

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 β -secretase lên tuổi thọ của ruồi giấm.⁹ 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.

Sử dụng mô hình ruồi giấm biểu hiện beta-secretase để đánh giá tác dụng của dược chất

Donepezil

Dựa trên các biến đổi bệnh lý của mô hình ruồi giấm biểu hiện protein β -secretase, nhóm nghiên cứu tiếp tục ứng dụng mô hình để kiểm nghiệm tác dụng cải thiện trí nhớ của dược chất Donepezil - một trong số những dược chất được FDA chấp thuận trong điều trị giai đoạn đầu của bệnh Alzheimer. Dòng ruồi bệnh lý được nuôi trong môi trường thức ăn có chứa thuốc Aricept Evess 5mg (Bushu – Nhật Bản) ở nồng độ 0,1 mg/ml (đây là nồng độ tối ưu theo khuyến cáo trong nghiên cứu của Yoon Hong Ki và cộng sự¹⁰). Sau đó, tiến hành thí nghiệm đánh giá khả năng học hỏi – ghi nhớ giữa dòng bệnh ăn thuốc và dòng bệnh không ăn thuốc.

Phương pháp phân tích

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 khả năng học hỏi và ghi nhớ cùng với 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 SE (standard error – sai số chuẩn).

3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu được sự đồng ý của Ban giám đốc bệnh viện Đại học Y Hà Nội. Các thông tin liên quan đến người tham gia nghiên cứu được đảm bảo bí mật.

III. KẾT QUẢ

Việc biểu hiện protein trên mô não ruồi giấm được thực hiện bởi hệ thống GAL4/ UAS. Sau khi lai các cặp ruồi bố mẹ thu được các thế hệ con lai F1, nhóm bệnh là nhóm ruồi giấm

biểu hiện protein β -secretase và nhóm chứng biểu hiện protein GFP. Sau đó tiến hành đánh giá hành vi và so sánh giữa các nhóm. Để đánh giá ảnh hưởng của việc biểu hiện protein β -secretase tại mô não đến sự thay đổi trong khả năng học hỏi và ghi nhớ của ruồi giấm, nghiên cứu đã tiến hành thí nghiệm trên ấu trùng ruồi giấm ngày 3, thu được kết quả như Hình 2.

Kết quả ghi nhận tại pha kiểm tra, cho thấy khả năng ghi nhớ và học hỏi của ruồi giấm biểu hiện protein β -secretase giảm rõ rệt so với nhóm chứng (Hình 2). Chỉ số học hỏi và ghi nhớ của nhóm ruồi đối chứng là 0.281 trong khi chỉ số này ở nhóm bệnh chỉ là 0.094. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0.05$.

Ở những bệnh nhân Alzheimer giai đoạn muộn, các neuron bị tổn thương, kèm theo đó là sự suy giảm vận động. Để kiểm chứng biểu hiện lâm sàng này, nghiên cứu đã tiến hành thử nghiệm leo trèo (climbing assay) để đánh giá khả năng vận động ở dòng ruồi biểu hiện protein β -secretase tại mô não.

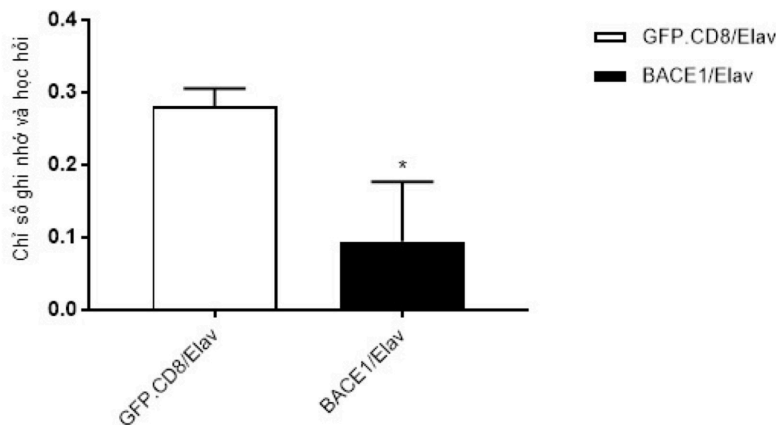
Kết quả cho thấy khả năng vận động của cả hai nhóm ruồi đều chịu ảnh hưởng của thời gian lão hóa. Trong những ngày đầu như ngày 3 và ngày 7, khả năng vận động ở nhóm ruồi bệnh biểu hiện protein beta-secretase có phần yếu hơn nhóm chứng biểu hiện protein GFP, nhưng chưa có sự khác biệt. Từ thời điểm 14 ngày tuổi, ruồi có xu hướng giảm khả năng vận động rõ rệt. Điểm vận động trung bình của nhóm bệnh thấp hơn nhiều so với nhóm chứng. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $p < 0,0001$ (Hình 3). Chứng tỏ rằng, ruồi giấm biểu hiện protein β -secretase tại mô não bị giảm khả năng vận động, tương tự như biểu hiện ở những bệnh nhân Alzheimer.

Bên cạnh biểu hiện mất trí nhớ và giảm khả năng vận động thì giảm tuổi thọ cũng là một

trong những hệ quả mà bệnh Alzheimer 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 β -secretase là 34 ngày, thấp hơn so với thời gian sống sót trung bình ở nhóm chứng (40 ngày) (Hình 4). Do đó, việc biểu hiện protein β -secretase trên não ruồi giấm đã gây ảnh hưởng và khiến cho tuổi thọ của ruồi giấm bị giảm đi. Như vậy, protein β -secretase có khả năng gây ra các ảnh hưởng mạnh mẽ đến thoái hóa thần kinh trên mô hình ruồi giấm, đặc biệt là sự giảm trí nhớ ngắn hạn. Tiếp theo, nhóm nghiên cứu ứng dụng mô hình này trong thử nghiệm tác dụng cải thiện trí nhớ của dược chất

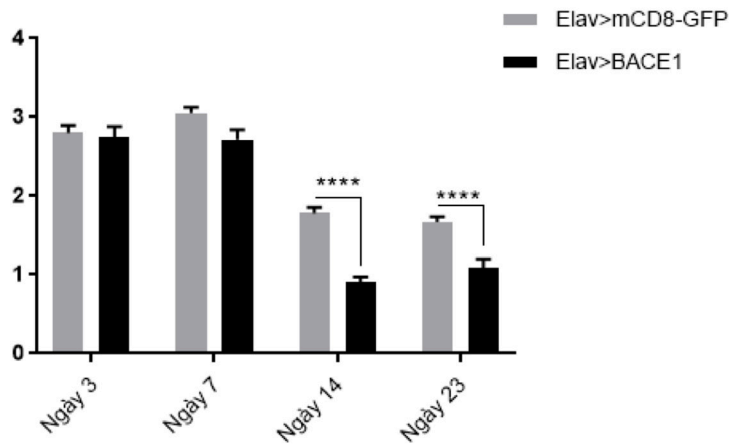
Donepezil nhằm chứng minh tiềm năng ứng dụng mô hình này trong việc sàng lọc thuốc.

Dòng ruồi bệnh được ăn thuốc (nồng độ 0,1mg/ml) có trí nhớ được cải thiện rõ rệt so với dòng ruồi bệnh không được ăn thuốc. Chỉ số ghi nhớ và học hỏi của dòng ruồi biểu hiện protein beta-secretase sau khi được ăn thuốc donepezil là 0,262 cao hơn so với nhóm chứng (ruồi có cùng kiểu gen nhưng không được ăn thuốc) là 0,094. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $*p < 0,05$ (Hình 5). Kết quả này cho thấy donepezil có tác dụng cải thiện trí nhớ ở ruồi giấm biểu hiện β -secretase. Hơn thế nữa, kết quả như một gợi ý về tiềm năng của mô hình trong việc nghiên cứu, sàng lọc dược liệu và phát triển thuốc điều trị cho bệnh nhân Alzheimer.



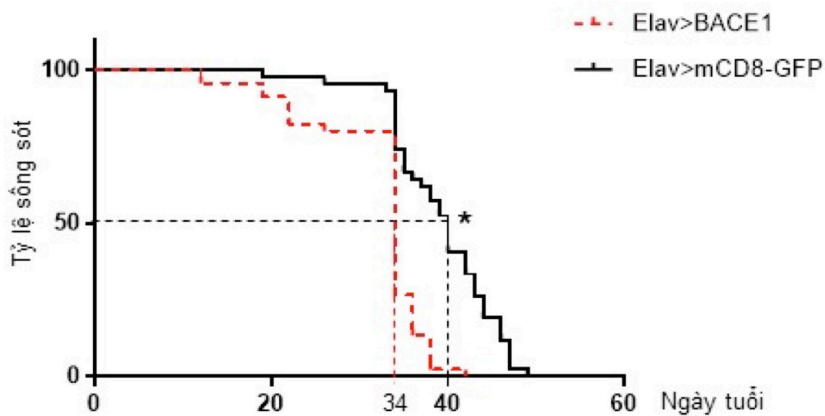
Hình 2. Kết quả thí nghiệm đánh giá khả năng học hỏi và ghi nhớ ở ấu trùng ruồi giấm

Thí nghiệm sử dụng dòng chứng kiểu gen +; UAS-mGFP-CD8/+; Elav-GAL4/+ , viết tắt là Elav > mGFP-CD8 và dòng bệnh có kiểu gen +; +; UAS-BACE1/Elav-GAL4, viết tắt là Elav > BACE1. Trục tung biểu thị chỉ số học hỏi và ghi nhớ của các dòng ruồi giấm. $*p < 0,05$ ($n = 40$).



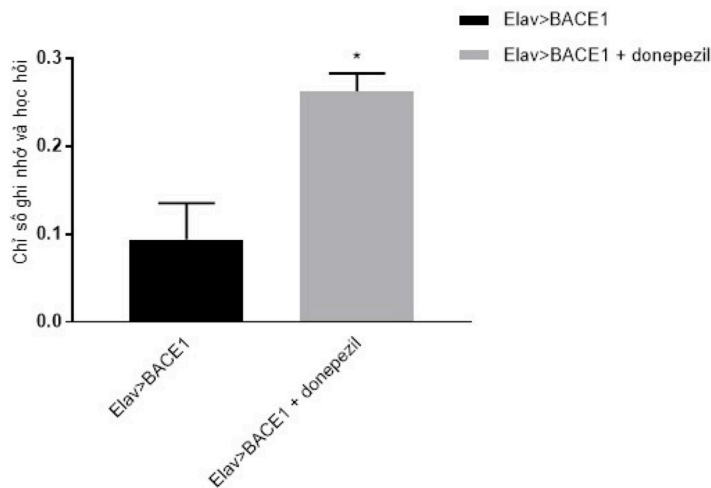
Hình 3. Kết quả đánh giá khả năng vận động ở ruồi già trưởng thành

Trục hoành là số ngày tuổi của ruồi, trục tung là số điểm trung bình mà ruồi leo được tại thời điểm đánh giá với **** $p < 0,0001$ ($n = 40$).



Hình 4. Biểu đồ đánh giá tuổi thọ ở ruồi già

Đường nét đứt biểu diễn tuổi thọ của nhóm ruồi bệnh kiểu gen +; +; *UAS-BACE1/Elav-GAL4* (*Elav>BACE1*). Đường nét liền biểu diễn tuổi thọ của nhóm chứng kiểu gen +; +; *UAS-mGFP-CD8/Elav-GAL4* (+) (*Elav>mGFP-CD8*). Trục hoành biểu thị tuổi thọ của ruồi già theo ngày. Trục tung biểu thị tỷ lệ sống sót của ruồi già (%). Thời gian sống sót trung bình của dòng bệnh là 34 ngày, thấp hơn so với nhóm chứng là 40 ngày với * $p < 0,05$ và $n = 40$.



Hình 5. Kết quả đánh giá chức năng cải thiện trí nhớ của Donepezil trên mô hình ruồi giấm biểu hiện protein β -secretase

Nhóm ruồi biểu hiện protein beta-secretase (*Elav > BACE1*) có chỉ số ghi nhớ và học hỏi là 0,094. Nhóm ruồi bệnh được ăn thức ăn có chứa donepezil (*Elav > BACE1 + donepezil*) có chỉ số ghi nhớ và học hỏi là 0,262. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $*p < 0,05$.

IV. BÀN LUẬN

Kiểm soát biểu hiện của protein là một trong những cách để xác định vai trò của nó đối với sự thay đổi trong kiểu hình và mối liên quan với quá trình chuyển hóa trong cơ thể sống. Trong nghiên cứu này, hệ thống *GAL4/UAS* đã được sử dụng một cách có hiệu quả bằng cách chèn thêm một đoạn gen nghiên cứu để biểu hiện gen đó một cách có định hướng trong cơ thể ruồi giấm. Đây là hệ thống thường được sử dụng để biểu hiện gen trên tế bào tiền thân thần kinh và gần như tất cả các tế bào thần kinh đệm phôi. Chính vì vậy, khi sử dụng dòng driver này, protein có thể được biểu hiện từ giai đoạn sớm, trên các tế bào tiền thân của thần kinh trong giai đoạn ấu trùng bậc 3 của ruồi giấm.

Mất trí nhớ là biểu hiện đặc trưng của bệnh Alzheimer. Sự tích tụ độc tố β -amyloid trong các tế bào thần kinh gây ra sự thoái hóa hay phá hủy các neuron làm suy giảm chức năng suy

ngĩ, học tập và ghi nhớ ở người bệnh. Biểu hiện này đã được mô phỏng lại bằng thí nghiệm đánh giá khả năng học hỏi và ghi nhớ của ấu trùng ruồi giấm trong nghiên cứu của chúng tôi. Ở nhóm ruồi bệnh, ấu trùng bò khắp đĩa thạch, không có phương hướng. Còn với dòng chứng, phần lớn chúng bò ngay về phía có mùi gắn với thức ăn và tập trung ở gần ống mùi. Tuy cùng được trải qua huấn luyện như nhau nhưng khả năng học hỏi và ghi nhớ ở nhóm bệnh kém hơn so với nhóm chứng. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy sự tương đồng với các nghiên cứu sử dụng mô hình ruồi giấm trong bệnh Alzheimer trên thế giới. Cụ thể với nghiên cứu của Iijima K và cộng sự (2004) đánh giá khả năng học hỏi và ghi nhớ trên mô hình ruồi giấm biểu hiện protein $A\beta_{40}$ và $A\beta_{42}$, ruồi giấm trưởng thành cũng được đánh giá khả năng học hỏi và ghi nhớ qua hai pha huấn luyện và

pha kiểm tra. Tuy nhiên, thay vì gắn sucrose như một phần thường với một mùi OCT hoặc mùi MCH, thì nghiên cứu của Iijima gắn mùi đó với hình phạt là trích điện¹¹. Kết quả cho thấy khả năng học hỏi và ghi nhớ của nhóm bệnh biểu hiện protein A β_{40} hoặc A β_{42} giảm đáng kể so với nhóm chứng không biểu hiện protein¹¹.

Kết quả của thử nghiệm leo trèo cho thấy sự suy giảm khả năng vận động có ý nghĩa thống kê ở thí nghiệm này 14 và ngày 23 của ruồi biểu hiện protein β -secretase so với dòng đối chứng. Kiểu hình này tương đồng với dấu hiệu suy giảm vận động ở giai đoạn nặng của bệnh nhân Alzheimer. Tham khảo kết quả thí nghiệm đánh giá khả năng vận động ở ruồi giấm trưởng thành trong nghiên cứu của Ranjita Chakraborty và cộng sự (2011), khả năng vận động của ruồi giấm biểu hiện đồng thời cả hai gen *APP* và *BACE1* tại mô não (*Elav > APP, BACE1*) có sự chênh lệch đáng kể so với nhóm chứng không biểu hiện gen ngoại lai.⁶ Hay như trong nghiên cứu của Iijima K và cộng sự (2004), nhóm ruồi giấm biểu hiện protein A β_{42} bắt đầu cho thấy rối loạn chức năng vận động sau ba tuần tuổi so với nhóm đối chứng không biểu hiện protein này tại mô não.¹¹ Không những giảm khả năng vận động, hai nghiên cứu trên cũng ghi nhận sự giảm tuổi thọ của của các dòng ruồi biểu hiện đồng thời *APP* và *BACE1* hay biểu hiện đơn lẻ A β_{42} tại mô não ruồi giấm. Trong nghiên cứu này, khi so sánh tuổi thọ của ruồi giấm ở nhóm bệnh và nhóm chứng, kết quả thu được có sự tương đồng với các nghiên cứu trên, chứng tỏ rằng biểu hiện protein beta-secretase có ảnh hưởng đến tuổi thọ của ruồi giấm, hay có nghĩa sự tích tụ các mảng beta-amyloid trong não có ảnh hưởng đến chức năng sống của những cá thể này.

Kết quả trong nghiên cứu cũng cho thấy, dòng ruồi bệnh biểu hiện protein β -secretase

được ăn thức ăn chứa donepezil có khả năng học hỏi và ghi nhớ tốt hơn nhóm ruồi không được ăn thuốc. Sau khi sử dụng thuốc, ấu trùng ruồi giấm thường có xu hướng bò về phía có mùi có gắn với thức ăn, chúng tìm ra thức ăn nhanh hơn và chính xác hơn. Qua đó có thể thấy, donepezil cũng có tác dụng trên ruồi giấm biểu hiện protein β -secretase, tương tự như tác dụng cải thiện trí nhớ trên người.

Kết quả trong nghiên cứu này cho thấy mô hình ruồi giấm xây dựng được có tiềm năng ứng dụng trong nghiên cứu sàng lọc dược chất. Việc xây dựng mô hình bệnh Alzheimer bằng biểu hiện protein β -secretase sẽ càng làm phong phú và đa dạng các mô hình, phục vụ cho nghiên cứu thực nghiệm liên quan đến bệnh Alzheimer nói riêng và các bệnh thoái hóa thần kinh tiến triển nói chung.

V. KẾT LUẬN

Ruồi giấm biểu hiện protein beta-secretase tại mô não có biểu hiện một số kiểu hình đặc trưng của bệnh Alzheimer như suy giảm trí nhớ, giảm khả năng vận động và tuổi thọ. Bước đầu thử nghiệm dược chất Donepezil trên mô hình ruồi giấm biểu hiện β -secretase cho thấy ruồi có sự cải thiện trí nhớ rõ rệt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Morris RG và Kopelman MD. The memory deficits in Alzheimer-type dementia: a review. *Q J Exp Psychol A*. 1986;38(4):575–602.
2. De Strooper B. và Annaert W. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci*. 2000;113 (Pt 11):1857–1870.
3. Tanzi RE và Bertram L. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell*. 2005;120(4):545–555.

4. Xie L, Helmerhorst E, Taddei K và cộng sự. Alzheimer's β -Amyloid Peptides Compete for Insulin Binding to the Insulin Receptor. *J Neurosci*. 2002;22(10):RC221–RC221.
5. van de Hoef DL, Hughes J, Livne-Bar I và cộng sự. Identifying genes that interact with *Drosophila presenilin* and amyloid precursor protein. *Genesis*. 2009;47(4):246–260.
6. Chakraborty R, Vepuri V, Mhatre SD và cộng sự. Characterization of a *Drosophila* Alzheimer's disease model: pharmacological rescue of cognitive defects. *PLoS ONE*. 2011;6(6).
7. Gerber B, Biernacki R, và Thum J. Odor-taste learning assays in *Drosophila* larvae. *Cold Spring Harb Protoc*. 2013;2013(3).
8. Madabattula ST, Strautman JC, Bysice AM và cộng sự. Quantitative Analysis of Climbing Defects in a *Drosophila* Model of Neurodegenerative Disorders. *J Vis Exp*, 2015;100.
9. Rockwell AL, Beaver I, và Hongay CF. A Direct and Simple Method to Assess *Drosophila Melanogaster's* Viability from Embryo to Adult. *J Vis Exp*. 2019;150.
10. Hong YK, Park SH, Lee S và cộng sự. Neuroprotective effect of SuHeXiang Wan in *Drosophila* models of Alzheimer's disease. *J Ethnopharmacol*. 2011;134(3):1028–1032.
11. Iijima K, Liu HP, Chiang AS và cộng sự. Dissecting the pathological effects of human $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$ in *Drosophila*: A potential model for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(17):6623–6628.

Summary

BETA-SECRETASE EXPRESSION OF INDUCED DEFECTS IN DROSOPHILA MEMORY ABILITY

Beta-secretase (β -site APP cleaving enzymes 1 – BACE1) is a protein that plays an important role in the APP pathway – a common dementia syndrome characterized with behavioral disorders, impaired memory, thus affecting a person's ability to carry out daily activities. The role of this protein in the APP pathway has been published but it is still not entirely clear. Therefore, it is necessary to develop a model of expressed β -secretase for pathophysiologists research and especially the application of experimental pharmaceutical screening. *Drosophila melanogaster* is a research model that has been shown to have many advantages since their genome contains 70% of the disease genes homolog to humans. In this study, we used the GAL4/UAS system to express the β -secretase protein in the nervous system of *Drosophila* and evaluated the influence of this protein on motor performance, short-term memory and life expectancy compared to the control group expressing GFP protein. The results showed that the β -secretase protein caused significant memory impairment in third larvae, impaired movement and shortened lifespan in adult flies compared to control flies. Moreover, the initial drug screening with Donepezil on the pathological model showed a positive effect in improving short-term memory.

Keywords: Alzheimer disease, β -secretase, *Drosophila*, Donepezil