

Podsumowanie i kierunki badań

Podsumowując zebrane informacje należy stwierdzić, że dysponujemy wciąż zbyt małą ilością badań na temat wpływu nowych technologii na mózg. Obecnie posiadania wiedza dotyczy tylko wybranych obszarów lub niektórych funkcji układu nerwowego. Coraz większe zainteresowanie badaczy tematyką cyfrowych mediów i upowszechnienie badań z wykorzystaniem technik neuroobrazowania z dużą dozą pewności przyczyni się do zwiększenia zakresu posiadanych informacji. Nie ulega jednak wątpliwości, że zagadnienie wpływu cyfrowych mediów na mózg człowieka jest kwestią złożoną. Doniesienia publikowane do tej pory wskazują, że nowe technologie istotnie mogą przyczyniać się do pewnych zmian, szczególnie z zakresu funkcji poznawczych. Otwartym pozostaje pytanie o ich kierunek. Niemiecki psychiatra i neurobiolog Manfred Spitzer w swojej książce

z 2013 roku o wymownym tytule „Cyfrowa demencja” jednoznacznie stawia tezę, że kontakt z cyfrowymi mediami, szczególnie w wieku rozwojowym, niesie za sobą negatywne skutki, między innymi dla procesów pamięci, przetwarzania informacji, kontaktów społecznych czy samokontroli. Nie brak jednocześnie doniesień wskazujących na pozytywne rezultaty takich kontaktów. Niektóre publikacje wskazują, że granie w gry komputerowe przyczynia się do poprawy wybranych poznawczych umiejętności, szczególnie procesów uwagi. Przytaczane tu badania dotyczące wielozadaniowości również wykazują sprzeczne rezultaty. Mimo trudności w prowadzeniu takich badań i możliwych sprzecznych wyników takie analizy powinny być w dalszym ciągu prowadzone. Cyfrowe media stały się w obecnych czasach elementem naszej codzienności, dlatego niezbędna jest rzetelna wiedza dotycząca wpływu tych urządzeń na myślenie i funkcjonowanie człowieka.

Mgr Urszula Janicka, absolwentka Psychologii Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego. E-mail: urszulajanicka@onet.pl

DROSOPHILA MELANOGASTER **JAKO MODEL BADAŃ MECHANIZMÓW SNU**

Paulina Oklejewicz (Kraków)

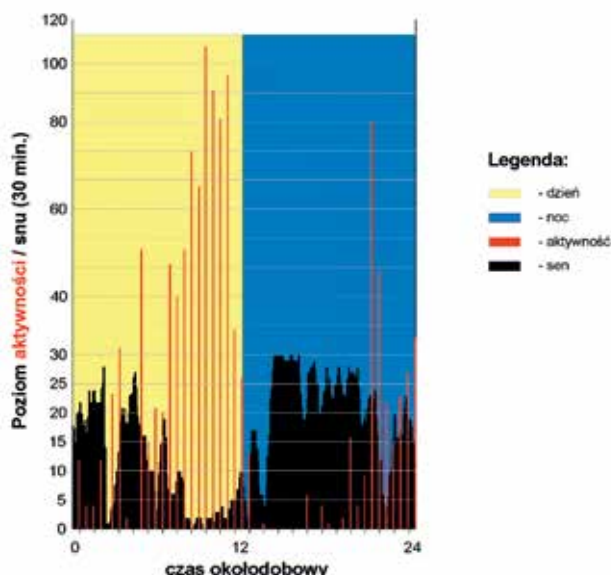
Sen to jedna z największych i najbardziej fascynujących zagadek nauki. Mimo ciągle rosnącego zainteresowania naukowców tym tematem, funkcja snu na poziomie molekularnym jest nadal nieznana. Poznanie genetycznego podłoża i mechanizmów biorących udział w regulacji snu może umożliwić w niedalekiej przyszłości skuteczne leczenie jego zaburzeń. Uważa się, że takie same mechanizmy leżą u podłoża snu wszystkich gatunków, dlatego też obiektem badań oprócz ssaków stały się takie organizmy modelowe, jak danio pręgowany czy muszka owocowa *Drosophila melanogaster*. Muszka owocowa jest znakomitym organizmem do takich badań, przede wszystkim dlatego, że jej spoczynek jest w dużej mierze podobny do snu ssaków. W związku z tym określenia „spoczynek” i „sen” używane będą zamiennie. Sen u muszki owocowej cechują długie okresy bezruchu, zmiany w aktywności elektrycznej mózgu w czasie snu w porównaniu ze stanem czuwania oraz zwiększony próg pobudzenia, a po deprywacji snu następuje homeostatyczne wyrównanie jego poziomu. W regulację snu i aktywności zaangażowane są neurony zegara okołodobowego, głównie dwie grupy

tw. neuronów brzuszno-bocznych (s-LN_v i l-LN_v). Sen ulega fragmentacji wraz z wiekiem, a także podlega modulacji lekami. Podczas snu zachodzą również zmiany w ekspresji genów w mózgu, podobne do tych obserwowanych u ssaków.

Sen u *Drosophila melanogaster*

Sen definiuje się u *D. melanogaster* w oparciu o pomiary aktywności lokomotorycznej jako każdy okres bezruchu trwający powyżej 5 min. Muszka owocowa zapada w sen kilka razy w ciągu doby, z najdłuższym odcinkiem czasowym, który w ponad 80% składa się z epizodów snu, przypadającym na środek nocy (Ryc. 1). Oprócz całkowitego bezruchu, jedynie z oddechowymi ruchami brzuszными, sporadycznie występują także nieznaczne ruchy narządu gębowego – wysuwanie i wciąganie proboscis, drgania odwłoka lub rzadziej ruchy kończyn. Spoczynek u *D. melanogaster* charakteryzuje się również zwiększonym progiem pobudzenia, czyli bodźcem czuciowym potrzebnym, aby wywołać behawioralną odpowiedź oraz względną obojętnością na słabe bodźce. W początkowym

stadium snu do obudzenia zwierzęcia wystarczy stosunkowo słaba stymulacja mechaniczna, natomiast po upływie kilku godzin potrzebne jest już dużo silniejsze pobudzenie.



Ryc. 1. Wzorec snu i aktywności lokomotorycznej u *Drosophila melanogaster*. Oś Y przedstawia poziom aktywności motorycznej rejestrowanej co 30 min, a oś X kolejne godziny doby w warunkach cyklicznych zmian dnia i nocy (12 godz. światła/dnia i 12 godz. ciemności/nocy w ciągu doby).

Zarówno u ssaków, jak i ptaków, sen można podzielić na dwie odrębne fazy: REM oraz NREM, którą z kolei na podstawie różnic w EEG dzieli się dodatkowo na kilka etapów. Są one inaczej regulowane i zdają się pełnić różne biologiczne funkcje. Jak na razie nie ma dowodów na to, żeby sen muszki owocowej składał się z takich odrębnych etapów. Badania pokazały jednak, że istnieją wyraźne różnice między snem dziennym i nocnym, jako że w ciągu dnia jest on płytszy, a w ciągu nocy głębszy. Inaczej jest także w zależności od płci zwierzęcia. Samce muszek owocowych spędzają śpiąc znaczną część zarówno dnia, jak i nocy, a długość snu dziennego i nocnego jest zazwyczaj porównywalna. W przypadku dojrzałych samic długość snu w ciągu nocy jest praktycznie taka sama jak u samców, natomiast w ciągu dnia wykazują one długotrwałą, ciągłą aktywność i na spoczynek poświęcają dużo mniej czasu lub praktycznie wcale.

Czynniki zewnętrzne wpływające na sen

Uwzględnienie czynników zewnętrznych jest szczególnie ważne podczas planowania eksperymentów mających na celu zbadanie mechanizmów, które biorą udział w regulacji snu. Warunki przeprowadzania takich badań muszą być ściśle kontrolowane, aby ich wyniki mogły być porównywalne pomiędzy

różnymi eksperymentami i laboratoriami. Jednym z takich czynników jest pożywienie. Skład pożywki wydaje się mieć kluczowy wpływ na długość snu i inne jego parametry. Dodatek ekstraktu drożdżowego do zwykłej pożywki składającej się z mąki kukurydzianej, agaru i miodu wywołuje u samców spadek długości snu, zarówno dziennego, jak i nocnego oraz zwiększenie aktywności lokomotorycznej, natomiast u samic aktywność w ciągu dnia maleje, a sen ulega większej fragmentacji. Wpływ ma również ilość spożywanych przez zwierzęta węglowodanów. Im większa ich zawartość w pożywce, tym muszki są dłużej aktywne, a śpią krócej.

Wpływ na sen ma także temperatura otoczenia panująca w czasie przeprowadzania eksperymentów. Wysoka temperatura powoduje wydłużenie snu i spadek aktywności lokomotorycznej w ciągu dnia, a w nocy na odwrót – długość snu maleje, a aktywność rośnie. Prawdopodobnie ma to znaczenie adaptacyjne, zwierzęta mogą się w ten sposób chronić przed nadmiernym odwodnieniem w ciągu dnia.

Innym, dosyć oczywistym czynnikiem jest wiek. W przypadku snu dziennego, to jest on najdłuższy u młodych muszek i stopniowo skraca się w ciągu kolejnych 3 dni, aż osiąga stały poziom, który utrzymuje się przez większość dorosłego życia. Pod koniec życia zwierząt zaczyna się on z powrotem wydłużać. Inaczej jest w przypadku snu nocnego, którego długość podczas pierwszych kilku dni życia utrzymuje się względnie na takim samym poziomie, a następnie zaczyna się wraz z wiekiem skracać, aż do śmierci. Ogólnie u starych osobników *D. melanogaster* zaburzeniu ulega bimodalny wzorec snu, normalnie występujący u dorosłych muszek.

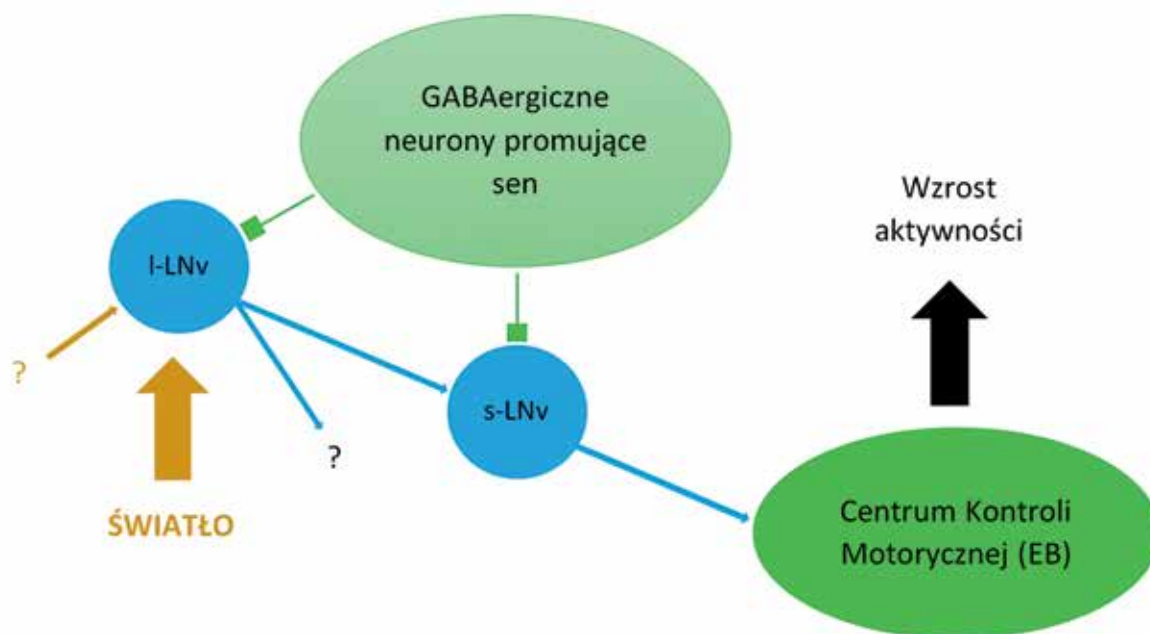
Na długość snu oraz inne jego parametry wpływają także warunki hodowli muszek owocowych, a dokładniej, czy podczas przeprowadzanych eksperymentów trzymane były one w izolacji czy w grupach. Zwierzęta hodowane w odosobnieniu śpią krócej w ciągu dnia, a także ich sen ulega większej fragmentacji w porównaniu do *D. melanogaster* przetrzymywanych w naczyniach hodowlanych w grupach po kilka osobników. Takie warunki wydają się nie mieć wpływu na sen nocny.

Kolejnym i możliwe, że jednym z najważniejszych czynników, od których zależy sen, jest podłoże genetyczne szczepów *D. melanogaster*. Doświadczenia przeprowadzone na kilku dzikich szczepach Canton-S, hodowanych w takich samych warunkach, ale pochodzących z różnych laboratoriów, wykazały znaczne różnice wszystkich parametrów opisujących sen, a zwłaszcza w całkowitej długości snu w ciągu

dobę. Takie różnice mogą być spowodowane między innymi nabyciem po pewnym czasie różnych alleli odpowiednich genów, zarówno na drodze mutacji, jak i dryfu genetycznego. Inną przyczyną mogą być modyfikacje epigenetyczne, które w końcu utrwalają się i stają się odziedziczalne. Zmiany te mogą prowadzić w konsekwencji do zmian w konkretnym zachowaniu.

i reguluje dobowy wzorzec snu i aktywności.

Obie grupy neuronów brzuszno-bocznych s-LNV i l-LNV różnią się między sobą miejscem docelowego działania, a także funkcją. Neurony s-LNV o małych ciałach komórkowych mają projekcję do grzbietowej części środkowej części mózgu – protocerebrum *D. melanogaster* i odpowiedzialne są za kontrolę czasu, w którym następuje poranny szczyt aktywności



Ryc. 2. Regulacja snu z udziałem brzuszno-bocznych i GABA-ergicznych neuronów.

Mechanizmy wewnętrzne:

Regulacja zależna od zegara okołodobowego

W dobowej rytmiczności snu i czuwania bardzo ważną rolę odgrywa komunikacja międzykomórkowa pomiędzy neuronami zegara okołodobowego poprzez transmisję synaptyczną i sygnalizację parakrynową za pośrednictwem neuropeptydów. W dorosłym mózgu *D. melanogaster* znajduje się około 150 neuronów zegara okołodobowego, po 75 po każdej jego stronie. Z 7 grup, na które dzieli się te neurony ze względu na ich położenie i charakterystykę, w regulację snu zaangażowane są dwie grupy neuronów brzuszno-bocznych: o małych ciałach komórkowych (s-LNV) i o dużych ciałach komórkowych (l-LNV). Pełnią one główną rolę w GABA-ergicznej inicjacji i podtrzymaniu stanu snu. Ponadto we wszystkich l-LNV i w czterech z pięciu s-LNV po każdej stronie mózgu muszki dochodzi do ekspresji neuropeptydu zwanego czynnikiem rozpraszającym pigment PDF (ang. Pigment-Dispersing Factor), który poprzez receptory PDF w błonie komórkowej różnych neuronów ma wpływ na inne komórki zegara okołodobowego

lokomotorycznej, a także są głównymi oscylatorami generującymi rytm aktywności w warunkach stałej ciemności. Neurony l-LNV o dużych ciałach komórkowych mają projekcję do grzbietowej części środkowej części mózgu *D. melanogaster* – protocerebrum i odpowiedzialne są za kontrolę snu i czuwania. Miejscem ich docelowego działania jest druga warstwa neuropilu płata wzrokowego mózgu zwana medulla i rejon neuronów LNV leżących po przeciwnej stronie mózgu.

Udział neuronów brzuszno-bocznych (LNV) oraz neuronów GABA-ergicznych w regulacji snu odbywa się według następującego schematu (Ryc. 2). Bódcze świetlne (i możliwe, że także inne sygnały) działające na l-LNV powodują uwolnienie z tych komórek neuropeptydu PDF, który sygnalizuje do s-LNV oraz prawdopodobnie do innych, nieznanych miejsc docelowych. Następnie sygnał ten odbierany jest przez inne neurony, które bezpośrednio kontrolują aktywność oraz w których dochodzi do ekspresji receptorów dla PDF. Powoduje to wzrost aktywności lokomotorycznej, a zarazem tłumienie potrzeby snu. Badania wykazały także, że LNV są głównym miejscem

docelowym dla GABA-ergicznym neuronów promujących sen, które w szybki sposób przekazują hamujące synaptyczne sygnały, co jest bardzo ważne dla prawidłowej regulacji snu i aktywności.

Regulacja homeostatyczna

Oprócz regulacji snu w sposób zależny od zegara okołodobowego, spoczynek u *D. melanogaster* jest kontrolowany również przez procesy homeostatyczne. Zidentyfikowano wiele genów, w których mutacje powodują znaczne zmiany w długości i jakości snu. Geny te kodują między innymi białka będące częścią szlaku cAMP, kilka neurotransmiterów, napięciowo-zależny kanał potasowy Shaker, białka szoku cieplnego, steroidy, czy białka zaangażowane w transport mRNA. Co więcej, wiele z tych genów ważnych jest także w procesach uczenia się i tworzenia pamięci oraz ulega preferencyjnej ekspresji w ciałach grzybkowatych – obszarze mózgu muszki owocowej zaangażowanym w kontrolę snu i pamięć generowaną bodźcami węchowymi

Ciała grzybkowate

Ciała grzybkowate (ang. mushroom bodies), kluczowy rejon w mózgu *D. melanogaster* związany z pamięcią i uczeniem się poprzez warunkowanie, został ostatnio powiązany przez naukowców także ze snem. Chemiczne uszkodzenie hydroksymocznikiem ciał grzybkowatych skutkuje przeważnie wzrostem aktywności lokomotorycznej u muszek i znacznym skróceniem snu, choć taka zależność nie zawsze występuje (zależy od warunków przeprowadzania doświadczeń, np. od warunków świetlnych). Głównym efektem, jaki struktury te wywierają na sen, jest jego promowanie, jednak uważa się, że zawierają one także neurony tłumiące spoczynek, ale w mniejszej liczbie. Jako że ciała grzybkowate otrzymują i przekazują znaczną część informacji zmysłowych, zwłaszcza węchowych, jakie docierają do mózgu muszki, mogą kontrolować one sen lub pobudzenie poprzez promowanie bądź hamowanie przepływu informacji sensorycznych. Wspólna lokalizacja ośrodków w mózgu *D. melanogaster* odpowiedzialnych za regulację snu i uczenia się może świadczyć o podobnych mechanizmach leżących u podłoża tych procesów, być może odgrywających też rolę w plastyczności synaptycznej. Interesujący jest także fakt, iż mutanty wykazujące zmiany w poziomie cAMP przejawiają zmiany zarówno w długości i jakości spoczynku, jak i zdolności do wykonywania pewnych zadań pamięciowych.

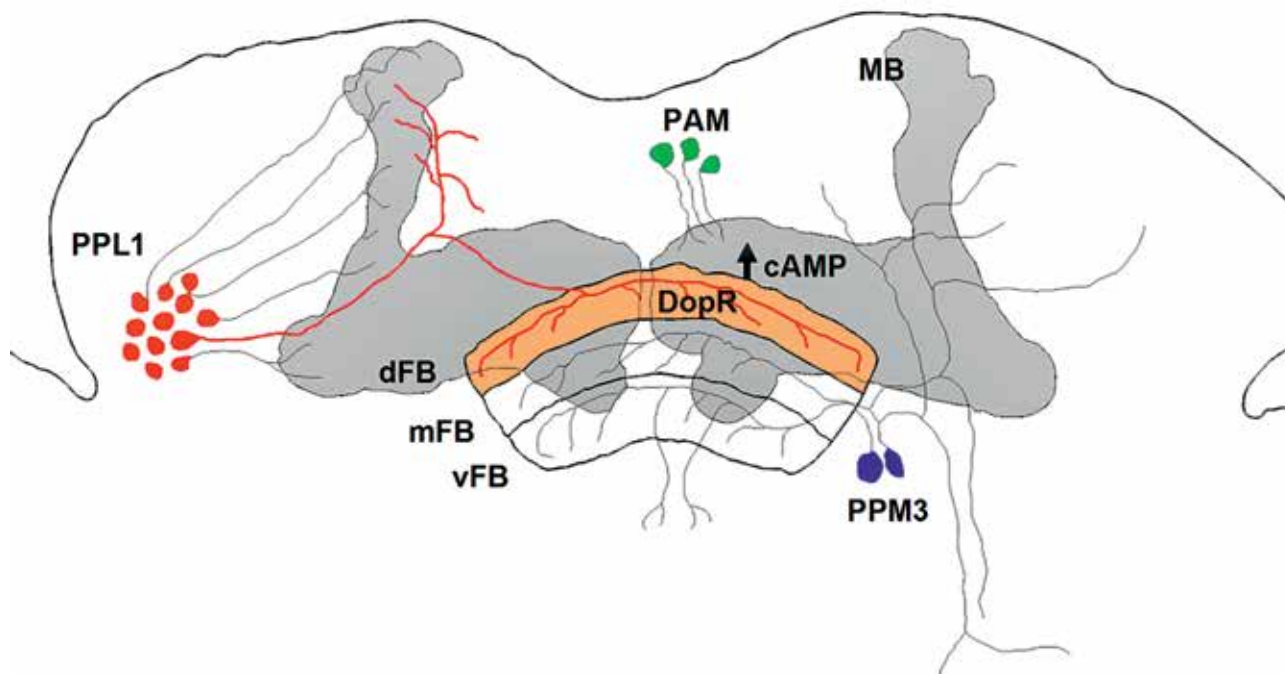
Neuroprzekazniki

Dopamina (DA), jeden z najważniejszych neuroprzekazników kontrolujących stan aktywności i snu, spełnia także główną rolę w procesach pamięciowych, motywacji, przyjmowania pokarmu i wielu innych. Istnieje zależność pomiędzy wzrostem poziomu dopaminy, a wzrostem aktywności i szybkości reakcji na bodźce. Dopamina bezpośrednio wpływa także na długość snu. Zwiększony poziom dopaminy prowadzi do skrócenia spoczynku poprzez wydłużenie okresu aktywności muszek i na odwrót. W mózgu *D. melanogaster* zidentyfikowano około 200 neuronów dopaminergicznych regulujących różnorodne procesy behawioralne i poznawcze. Zebrane są one w 13 odrębnych podgrup, zajmujących różne obszary mózgu muszki owocowej. Do tej pory udowodniono udział neuronów z grup PPL1 w regulacji snu, ponieważ ich aktywacja powoduje znaczne skrócenie długości snu. Akson jednego neuronu z każdej grupy PPL1 rozgałęzia się w części grzbietowej ciała wachlarzowatego mózgu, stymulując receptor dla dopaminy typu 1 – dDA1, podnosząc tym samym poziom cAMP (Ryc. 3). Wcześniejsze eksperymenty wykazały, iż poziom cAMP jest ujemnie skorelowany z długością snu, o czym dokładniej będzie mowa w dalszej części artykułu. Pozostałe neurony z grup PPL1 unerwiają ciała grzybkowate. Neurony z grupy PAM unerwiają środkowy płat ciał grzybkowatych i są zaangażowane w procesy uczenia się, natomiast neurony PPM3, unerwiające pozostałe części ciała wachlarzowatego (środkową i brzuszna), nie biorą udziału w regulacji snu ani pamięci.

Jak już wspomniano wcześniej, przypuszcza się, że u podłoża snu oraz procesów związanych z pamięcią mogą leżeć podobne mechanizmy, ze względu na ten sam obszar w mózgu *D. melanogaster*, który jest zaangażowany w ich kontrolę – ciała grzybkowate. Wykazano, iż deprywacja, a także fragmentacja snu zakłócają prawidłową naukę u tych zwierząt. W przeciwdziałaniu tym zaburzeniom bierze udział dopamina. Po pozbawieniu muszek możliwości spoczynku w ich mózgu dochodzi do podniesienia poziomu DA, co jest związane z obniżeniem transkrypcji genu kodującego receptor *dDA1* (ang. *Drosophila dopamine 1-like receptor*). Receptory dDA1 ulegają ekspresji głównie w ciałach grzybkowatych i są niezbędne dla procesów uczenia się węchowego. Mutanty *dDA1* uczą się pewnych zadań (nie tylko z wykorzystaniem zmysłu powonienia) dużo gorzej niż muszki dzikie. Negatywne skutki deprywacji snu lub jego fragmentacji ratuje wywołanie ekspresji *dDA1* w ciałach grzybkowatych i zwiększenie poziomu dopaminy.

Nie wiadomo na razie jak dokładnie wygląda mechanizm leżący u podłoża takiej roli dopaminy u *D. melanogaster*.

także poprzez doświadczenia polegające na podawaniu z pokarmem tego neuroprzekaźnika dzikim muszkom. Wykazano, iż zwierzęta hodowane na żyw-

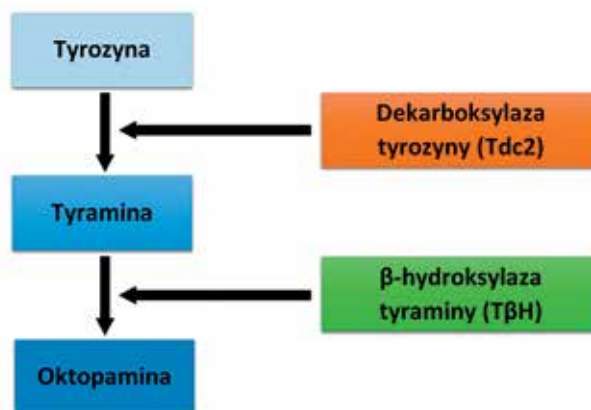


Ryc. 3. Rozmieszczenie neuronów dopaminergicznych unerwiających ciała grzybkowate i ciała wachlarzowate w mózgu *Drosophila melanogaster* (dFB – część grzbietowa, mFB – część środkowa, vFB – część brzuszna ciała wachlarzowatego; MB – ciała grzybkowate).

U ssaków dopamina i noradrenalina są związane ze stanem pobudzenia. Doświadczenia badające wpływ tych dwóch neuroprzekaźników na sen są skomplikowane, częściowo dlatego, iż zaburzenia w sygnalizacji noradrenalinowej mogą wynikać ze zmian w poziomie dopaminy. Odpowiednikiem noradrenaliny u owadów jest oktopamina, która działa niezależnie od dopaminy, dlatego *D. melanogaster* jest doskonałym modelem do badań efektu działania tego neuroprzekaźnika na sen. Oktopamina zaangażowana jest w takie procesy jak zapamiętywanie, agresja, owulacja, czy poruszanie się larw, a ostatnio pojawiły się doniesienia o roli tego neuroprzekaźnika również w regulacji spoczynku u muszki owocowej. Działanie oktopaminy na sen związane jest ze szlakiem jej biosyntezy (Ryc. 4). Muszki *D. melanogaster* noszące mutacje zarówno w genach odpowiedzialnych za syntezę oktopaminy *Tdc*, jak i *TβH* charakteryzują się wydłużeniem snu, głównie w ciągu dnia. Dodatkowo u muszek z mutacją w genie *Tdc* wydłużeniu snu towarzyszy zmniejszenie czasu, po jakim występuje pierwszy epizod snu po wyłączeniu światła, sugerując homeostatycznie zwiększoną potrzebę snu. U mutantów obu genów sen jest głębszy w porównaniu z dzikim szczepem, co objawia się wyższym progiem pobudliwości.

Udział oktopaminy w regulacji snu potwierdzono

ce zawierającej oktopaminę (w stężeniu 10 mg/ml) miały podniesiony poziom tego neuroprzekaźnika, zwłaszcza w mózgu i charakteryzowały się zmniejszoną długością snu w porównaniu z muszkami hodowanymi na pożywce sacharozowo-agarowej. Dodatkowo skrócenie długości snu było specyficzne jedynie dla pory nocnej, natomiast podczas dnia nie występowały żadne zmiany, co może wskazywać na wysoką aktywność oktopaminy w ciągu dnia. Co ciekawe, niższe stężenie oktopaminy (7,5 mg/ml) było w stanie przywrócić długość snu u mutantów *TβH* do prawidłowego poziomu, podczas gdy na dzieki muszki nie miało wpływu.



Ryc. 4. Szlak biosyntezy oktopaminy.

W promowaniu snu bierze udział serotonina, chociaż jej rola jest nadal słabo poznana. Jest ona szeroko rozpowszechnionym neuroprzekaznikiem w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym, zarówno u ssaków, jak i owadów. Badania prowadzone na różnych zwierzęcych modelach wykazały, iż kontroluje ona wiele ważnych behawioralnych i fizjologicznych procesów, takich jak uczenie się, agresja, apetyt, nastroj, poruszanie się, rytm okołodobowy oraz właśnie sen. W genomie *D. melanogaster* zidentyfikowano cztery receptory dla serotoniny: d5-HT_{1A}, d5-HT_{1B}, d5-HT₂ oraz d5-HT₇, które wykazują znaczne podobieństwo sekwencyjne ze swoimi homologami występującymi u ssaków (5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₇). W regulacji snu udział biorą receptory d5-HT_{1A}. Muszki z delecją w genie kodującym te receptory wykazują znaczną redukcję całkowitej długości snu oraz długości epizodów snu. Wpływ upośledzonej sygnalizacji d5-HT_{1A} na sen może być zniesiony przez ekspresję dzikiej kopii genu kodującego ten receptor w ciałach grzybkowatych u dorosłych owadów, wskazując na związek tego obszaru w mózgu *D. melanogaster* z serotoninową kontrolą snu.

Znany jest również wpływ na sen niektórych środków farmakologicznych modulujących poziom serotoniny. U ssaków inhibitor syntezy serotoniny, którym jest parachlorofenylalanina (pCPA), powoduje bezsenność, której można zapobiegać poprzez podawanie prekursora serotoniny – 5-hydroksytryptofanu (5-HTP). U muszki owocowej podanie pCPA nie prowadzi do zmian w poziomie serotoniny w mózgu, natomiast 5-HTP powoduje zwiększenie jej poziomu w ośrodkowym układzie nerwowym, co objawia się wzrostem długości snu zarówno u dzikich *D. melanogaster*, jak i u osobników noszących mutacje w genie dla receptora d5-HT_{1A}.

Szlaki sygnalizacyjne

Jednym z najważniejszych dotychczas odkrytych szlaków sygnalizacyjnych zaangażowanych w kontrolę snu jest szlak cAMP/CREB. CREB (ang. *cAMP response-element binding protein*) pełni rolę w podtrzymywaniu stanu czuwania, a także przyczynia się do „uzdrawiającej” funkcji snu u muszki podczas regeneracji po deprywacji snu.

Aktywność czynnika transkrypcyjnego CREB i poziom cAMP są ujemnie skorelowane z długością snu u *D. melanogaster*. Zablockowanie lub upośledzenie aktywności tego czynnika transkrypcyjnego powoduje zwiększenie czasu regeneracji po deprywacji snu. Dodatkowo aktywność CREB natychmiast rośnie po deprywacji snu, a także podczas trzech następnych

dni, w których następuje wyrównanie snu do prawidłowego poziomu.

Czas trwania snu u *D. melanogaster* jest także ujemnie skorelowany z aktywnością kinazy białkowej A (PKA) zależnej od cAMP. Wzrost ekspresji podjednostki katalitycznej PKA w neuronach dorosłych muszek, dzięki zwiększeniu ich pobudliwości, skutkuje spadkiem długości snu w ciągu doby, co dowodzi, iż kinaza białkowa A jest bezpośrednio zaangażowana w regulację snu. Taki efekt działania PKA na sen został wykryty w ciałach grzybkowatych.

Szlakiem przekazywania sygnału, biorącym także udział w kontroli snu u muszki owocowej, jest sygnalizacja Notch, białka będącego receptorem transbłonowym. Gen *bunched*, kodujący czynnik transkrypcyjny regulujący aktywność Notch, wykazuje zwiększoną ekspresję w mózgu muszek po deprywacji snu. U mutantów *bunched* homeostatyczna odpowiedź na pozbawienie snu ulega zmniejszeniu. Aktywacja *bunched* w ciałach grzybkowatych powoduje wydłużenie snu po jego deprywacji, a hamowanie tego czynnika transkrypcyjnego – do jego skrócenia. Dodatkowo, zwiększenie poziomu Delta (liganda białka Notch) w ciałach grzybkowatych powoduje zmniejszoną odpowiedź homeostatyczną. Miejsce, w którym działa Notch jest glej, a do ekspresji *Delta* dochodzi w neuronach. Deprywacja snu hamuje sygnalizację Notch przez zwiększenie ekspresji *bunched*, co z kolei pozwala na późniejsze homeostatyczne wyrównanie jego poziomu.

Jak już wcześniej wspomniano, pozbawione snu *D. melanogaster* nie są w stanie wykonywać pewnych zadań polegających na uczeniu się w wyniku warunkowania. Wzrost sygnalizacji Notch może redukować taki niekorzystny efekt deprywacji snu w jeden z dwóch możliwych sposobów. Jedną możliwością jest to, że upośledzenie procesu uczenia się wynika po prostu z osłabionej sygnalizacji Notch następującej po deprywacji snu, natomiast alternatywnym wytłumaczeniem może być rola Notch w regulacji pobudzenia, a upośledzenie uczenia się spowodowane jest jego zmniejszonym poziomem.

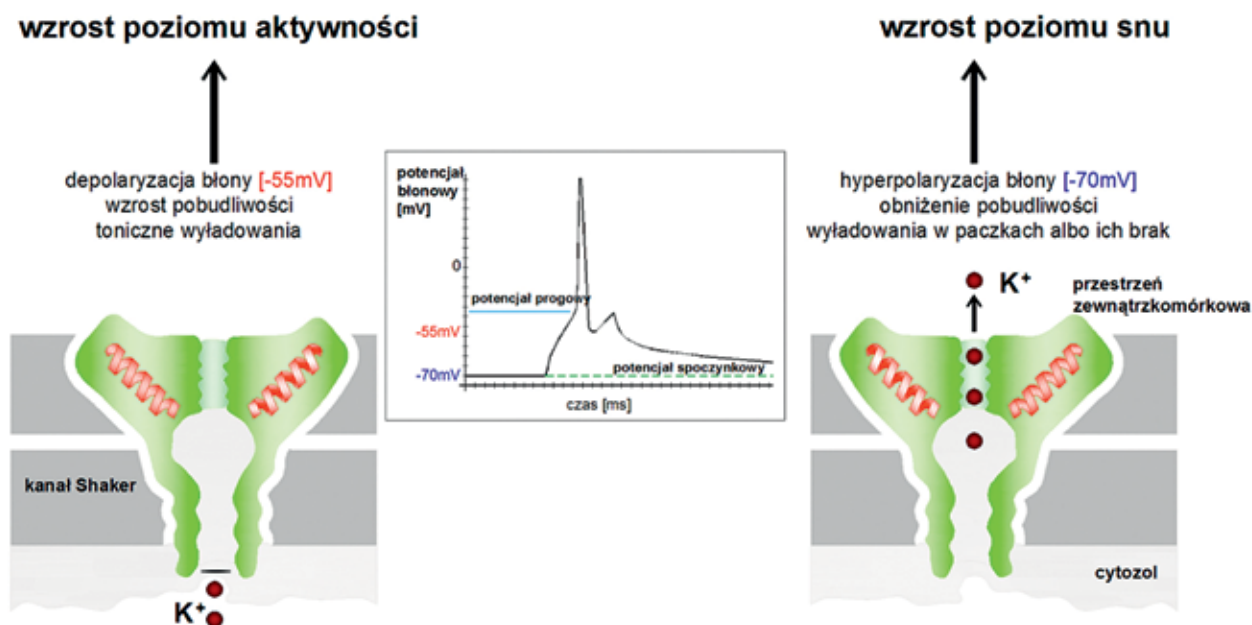
Innym szlakiem sygnalizacyjnym, który wydaje się być kluczowym w regulacji snu jest sygnalizacja zależna od białka Go. Ekspresja podjednostki α białka Go w ciałach grzybkowatych (zarówno formy dzikiej, jak i konstytutywnie aktywnej) powoduje silne wydłużenie snu. Dodatkowo zahamowanie aktywności endogennej Go poprzez wywołanie w specyficznych neuronach ekspresji genu kodującego PTX (toksynę krztuścową) lub z wykorzystaniem RNAi (wyciszenie genów kodujących podjednostki Go) prowadzi do podobnej w obu przypadkach utraty snu.

Kanał potasowy Shaker

W mechanizmach biorących udział w kontroli snu u *D. melanogaster* bardzo ważna wydaje się jego zależność od kanałów potasowych. Początkowo wyizolowano linię krótko śpiących muszek i nazwano ją *minisleep* (*mns*). Mutanty te charakteryzowały się znacznym spadkiem długości snu (spały tylko 2–4 godziny w ciągu doby zamiast 8–10), mniejszą żywotnością, a także upośledzeniem procesów uczenia się i pamięci. Mutacja *mns* występuje w genie *Shaker* (*Sh*), kodującym podjednostkę α napięciowo-zależnego kanału potasowego Shaker. Kanał ten pełni

jest zależna od poziomu białka SLEEPLESS. Wydaje się ono oddziaływać z napięciowo-zależnym kanałem K^+ , tworząc z nim stabilny kompleks. Mutanty *sss* wykazują drastyczną redukcję długości snu, bo śpią aż o 85% mniej niż muszki dzikie, a także charakteryzują się zmniejszoną ilością białek kanału Shaker, zmniejszeniem prądu w kanale, opóźnieniem reakcji i inaktywacją po silnej kumulatywnej depolaryzacji.

Funkcjonowanie kanałów potasowych Shaker u dzikich i zmutowanych *D. melanogaster* oraz ich efekt na sen i aktywność przedstawiono na ryc. 5. Otwarcie napięciowo-zależnych kanałów potasowych umożliwia jonom K^+ ich wypływ z neuronów, powo-



Ryc. 5. Funkcjonowanie kanałów potasowych Shaker u dzikich i zmutowanych *Drosophila melanogaster*.

ogromnie ważną rolę w repolaryzacji błony i presynaptycznym uwolnieniu transmiterów zarówno u muszek, jak i u ssaków. U *D. melanogaster* *Shaker* ulega ekspresji głównie w mózgu, zwłaszcza w ciałach grzybkowatych.

Mutacja w genie *Hyperkinetic* (*Hk*), kodującym regulatorową podjednostkę β kanału potasowego, również powoduje redukcję długości snu, lecz nie tak drastyczną jak w przypadku mutacji w *Sh*. *Hk* zmniejsza, ale nie blokuje całkowicie prądu potasowego ze względu na to, że podjednostka α nadal funkcjonuje. Mutanty te wykazują też krótkotrwałe zaniki pamięci oraz obniżoną żywotność.

Odkryto jeszcze jeden gen – *sleepless* (*sss*), który nie koduje białek kanału Shaker, lecz uczestniczy w regulacji jego funkcji. Koduje on małe glikozylo-fosfatydyloinozytolowe białko kotwiczące (GPI), którego funkcja jest jeszcze nieznana. Długość snu

dując hyperpolaryzację błony komórkowej i obniżenie potencjału błonowego do wartości bliskiej potencjałowi spoczynkowemu. Skutkiem tego procesu jest spadek pobudliwości, co prowadzi do promowania snu. Mutacje, które redukują ogólną liczbę kanałów potasowych lub skracają czas, w którym kanał ten jest otwarty, często doprowadzają potencjał błony do bardziej dodatniego (zdepolaryzowanego) poziomu, blisko wartości, przy której następuje wygenerowanie potencjału czynnościowego. Pobudliwość rośnie, co promuje aktywność.

Geny

Do tej pory odkryto kilka genów, które bezpośrednio regulują stany czuwania i snu. Należą do nich między innymi geny zegara *Clock* (*Clk*) i *cycle* (*cyc*). Muszka owocowa podczas głodu tłumi sen i zwiększa

swoją aktywność, a po deprywacji snu spowodowanej pozbawieniem pokarmu wykazuje homeostatyczną potrzebę jego wyrównania. Geny *Clk* i *cyc* ulegają ekspresji w około 150 neuronach zegarowych w mózgu, ale także w wielu grupach neuronów czuciowych i komórkach obwodowych. Funkcjonują tam jako czynniki transkrypcyjne regulujące 24-godzinny cykl transkrypcyjno-translacyjny głównych genów zegara okołodobowego. *Clk* i *cyc* współdziałają ze sobą w promowaniu snu w warunkach głodu i ich działanie niezależne jest od funkcji w procesach związanych z regulacją rytmiki okołodobowej. Mutacje w tych genach powodują u muszek odwrotny efekt, czyli spadek zapotrzebowania na sen. Miejscem działania *Clock* i *cycle* podczas deprywacji pokarmowej wydają się być położone grzbietowo neurony zegara, które wykazują ekspresję kryptochromu (*cry+*) i brak neuropeptydu PDF (*Pdf-*), czyli neurony boczno-grzbietowe LNd i grzbietowe DN₁. Efektem aktywacji tych neuronów jest sen, mimo głodzenia muszek. Istnieją także doniesienia, iż ekspresja genu *foraging* (*for*) kodującego PKG (ang. cGMP-dependent protein kinase) rośnie, gdy zmienia się zapotrzebowanie na sen w warunkach głodu, co może sugerować wspólne działanie genów *for*, *Clock* i *cycle* w regulowaniu mechanizmu, który pośredniczy w behawioralnym konflikcie: spać czy szukać jedzenia.

W regulacji długości snu u *D. melanogaster* bierze udział także gen *Fmr1* (*Fragile X mental retardation gene*), kodujący białko FMRP, które obecne jest w kolcach dendrytycznych – wypustkach dendrytów, w których występują elementy postsynaptyczne synaps, czyli miejsc przekazywania sygnałów pomiędzy neuronami. Ekspresja tego genu najwyższa jest wcześniej w rozwoju i maleje wraz z wiekiem. Jej brak wiąże się z wadami rozwojowymi, nadmierne rozrośniętymi drzewkami dendrytycznymi neuronów i powiększonymi kolbkami synaptycznymi, natomiast nadekspresja objawia się niedorozwojem wypustek dendrytycznych i aksonalnych oraz brakiem prawidłowych synaps. Mutacja prowadząca do utraty funkcji genu *dFmr1* prowadzi do znacznego wzrostu długości snu, a muszki ze zwiększoną ekspresją tego genu charakteryzują się krótszym snem w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi. Obydwie grupy mutantów cechuje zwiększona aktywność lokomotoryczna i skrócenie długości życia. Dodatkowo homeostaza snu jest u nich zaburzona, ponieważ nie wykazują one kompensacyjnego wyrównywania snu po jego deprywacji. Jak już wspomniano wcześniej, u dzikich muszek ekspresja *dFmr1* największa jest na samym początku życia, ale rośnie również po wydłużonym okresie czuwania, niezależnie od pory

dnia lub bodźców świetlnych i zachodzi w ciałach grzybkowatych. Prawdopodobnie udział genu *dFmr1* w regulacji snu zależy od efektów, jakie wywiera on na funkcjonowanie synaps, lecz potrzebnych jest jeszcze więcej badań dotyczących roli tego genu w kontroli snu u *D. melanogaster* oraz szlaków sygnalizacyjnych, przez jakie on działa.

Kolejnym odkryciem naukowców jest udział długiego, niekodującego RNA (lncRNA) w regulacji snu, a dokładniej genu *yar* (*yellow-achaete intergenic RNA*). lncRNA występuje w dwóch miejscach w komórce: w jądrze i w cytoplazmie. Genom *D. melanogaster* koduje ponad 100 lncRNA, mimo to znana jest na razie mała liczba mutacji w tych genach, ponadto dotyczą one głównie jądrowego lncRNA. Zidentyfikowane niedawno długie, niekodujące RNA o nazwie *yar* leży pomiędzy genami *yellow* (*y*) i *achaete* (*ac*), akumuluje się w cytoplazmie i głównie ulega ekspresji podczas embriogenezy. Mutanty *yar* wykazują znaczny spadek długości snu nocnego oraz jego fragmentację – skrócenie i wzrost liczby epizodów snu. Rytm okołodobowy jest u nich zachowany, lecz mutanty te przejawiają zaburzenia w homeostatycznej odpowiedzi na deprywację snu, jako że nie zaobserwowano kompensacyjnego zwiększenia zapotrzebowania na sen, jak to się dzieje u zwierząt dzikich. Transgeniczne muszki z przywróconą funkcją genu *yar* charakteryzują się powrotem do normalnego poziomu snu w ciągu nocy, a także wydłużeniem epizodów snu i zmniejszeniem ich liczby, potwierdzając tym samym rolę *yar* w kontroli spoczynku u *D. melanogaster*, jednak potrzebnych jest więcej badań, ponieważ jego rola jest na razie stosunkowo słabo poznana.

Podsumowanie

Badania nad mechanizmami leżącymi u podłoża snu u *Drosophila melanogaster* prowadzone są zaledwie od kilku lat i już stały się obiektem zainteresowania wielu naukowców na całym świecie. Muszka owocowa jest świetnym organizmem modelowym do takich badań ze względu na wysokie podobieństwo jej spoczynku do snu ssaków, w tym ludzi. Człowiek potrafi kontrolować ilość spożywanego pokarmu, aktywność fizyczną, ale generalnie nie jest w stanie regulować długości snu. Zapotrzebowanie na sen jest różne w zależności od wieku, jednak oczywiste jest, że odgrywa on ogromną rolę w życiu wszystkich ludzi. W końcu człowiek przesypia około 1/3 swojej egzystencji. Brak snu może przekładać się na złe samopoczucie, zmniejszenie wydolności fizycznej i wywoływać różne zaburzenia psychiczne

(np. fobie, depresje). Następnie mogą wystąpić nieprawidłowości w funkcjonowaniu organów wewnętrznych, aż w końcu w skrajnych przypadkach wyczerpanie organizmu i śmierć. Dlatego poznanie genetycznego podłoża i mechanizmów biorących udział w regulacji snu może umożliwić w niedalekiej przyszłości skuteczne leczenie jego zaburzeń. Na razie jednak wiele pytań pozostaje bez odpowiedzi. Przede wszystkim nadal nieznana jest funkcja snu. Istnieje wiele hipotez tłumaczących rolę snu. Jedną z nich jest teoria somatyczna, mówiąca o tym, że podczas snu następuje leczenie ciała, gojenie ran oraz zachodzą inne endokrynne procesy. Zgodnie z teorią komórkowej przemiany materii dochodzi wtedy do uzupełniania energii i usuwania reaktywnych wolnych rodników. Może być to także czas syntezy białek. Większość naukowców zgodnie twierdzi, iż sen jest szczególnie ważny dla mózgu. Prawdopodobnie podczas czuwania mogą się w nim akumulować

jakieś toksyczne substancje, które w czasie snu zostaną usunięte lub może dochodzić do wyczerpania chemicznych i molekularnych szlaków, które później są w mózgu odbudowywane. Badania prowadzone na muszkach owocowych w dużym stopniu przyczyniły się do trwającej debaty nad funkcjami snu. Udział tego stanu w plastyczności synaptycznej poparty jest coraz większą ilością dowodów, jednak w jaki sposób modyfikacja synaps może korzystnie wpływać na mózg nie jest wiadome.

Ponad dekada studiowania snu u *D. melanogaster* zapewniła wgląd w niektóre molekularne mechanizmy zaangażowane w regulację czuwania i snu. Wiele z nich można odnieść do ssaków, a nawet ludzi. Potrzeba jednak jeszcze wiele badań, ponieważ odkrywanie podłoża snu jest dopiero w fazie początkowej. Odpowiedź na jedno pytanie mnoży kolejne, ale jedno jest pewne – sen jest jedną z największych i najbardziej fascynujących zagadek nauki.

Paulina Oklejewicz. Studentka UJ studiów magisterskich kierunku Biologia. E-mail: paulina.oklejewicz@uj.edu.pl

RZECZ O PARALIŻU SENNYM

Karol Strzelczyk (Kraków)

Paraliż senny, zwany też porażeniem przysennym jest to zjawisko występujące podczas zasypiania lub podczas przechodzenia ze snu do czuwania, objawiające się porażeniem mięśni (katapleksja) przy jednoczesnym zachowaniu świadomości. Zjawisku temu towarzyszą na ogół nieprzyjemne doznania psychiczne, dźwięki, uczucie bezwładnego spadania, przygnięcia klatki piersiowej lub kończyn, halucynacje wzrokowe i dotykowe. Prawie zawsze towarzyszy temu uczucie strachu i przyspieszone bicie serca. Zjawisko paraliżu sennego jest źródłem wierzeń z motywem demona nocnego. Japońscy samuraje budzili się w środku nocy z przerażeniem odkrywając zaciskające się na ich szyjach łapy demona Kanashibari. Chińscy chłopcy spod Szanghaju szepotali między sobą straszliwe historie o legendarnym dziewięciogoniastym lisie-uchu, Hu Li Jing, który zakradał się do nich w nocy i siadywał na ich piersiach. Olbrzymi strach wśród Filipińczyków budziła paraliżująca człowieka istota *hart nagarat*. Niektórzy europejscy mnisi w średniowiecznych Włoszech, Francji czy Hiszpanii spowiadali się z namiętnej miłości jaką uprawiali nocami z wielkopiersiastym sukkubem. Niemieccy dominikanie Heinrich Kramer i Jacob Sprenger opisują w swym

Malleus Maleficarum inkuby, które nawiedzają nocami kobiety aby je zapłodnić. Bolesław Leśmian w swoim utworze *Dusiołek* opowiada o Bajdale, którego podczas drzemki dusił dziwny potwór Dusiołek. Wszystkie te przeżycia są efektem tego samego zaburzenia snu, w którym człowiek jest prawie kompletnie sparaliżowany, odczuwa paniczny lęk i olbrzymie przerażenie, wydaje mu się, że się dusi, a jedyne czym może poruszać to powieki. Gdy je podnosi może ujrzeć straszliwe halucynacje, najczęściej humanoidalne cieniste istoty, ale też tysiące karłów, kosmitów czy inne, niezwykle istoty.

Wpływ paraliżu sennego na kulturę jest nieoceniony, niegdyś tworzył wiarę w różnorakie demony i tajemnicze zjawiska, a obecnie bardzo przyczynia się i podtrzymuje wiarę w porwania przez kosmitów. Oddziaływanie tego zaburzenia wyraźnie widać w języku, na przykład polskie słowo *koszmar* najprawdopodobniej odnosi się do mary nocnej, czyli halucynacyjnej istoty, która w wierzeniach słowiańskich pojawia się podczas snu i atakuje śpiącego dusząc go i trzymając. Podobnie angielskie słowo *nightmare*, które wywodzi się od słowa *mare* – nazwy demona nierozłącznie związanego z porażeniem przysennym. W większości indoeuropejskich