

Міністерство освіти і науки України
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

Біологічний факультет

Кафедра генетики і цитології

До захисту допущено

Кафедрою генетики і цитології протокол № _____ від _____

завідувач кафедри



(підпис)

Наталя ВОЛКОВА

(ім'я, прізвище)

«11» грудня 2025 р.

Кваліфікаційна робота
здобувача другого (магістерського) рівня вищої освіти

**Характеристика лінії 26701 (*para^{ST76}*) *Drosophila melanogaster* за
показниками загальної пристосованості**
(назва роботи)

Спеціальність (спеціалізація) 091 Біологія та біохімія

(код та найменування спеціальності; спеціалізації спеціальності - за наявності)

Освітня програма

Генетика

(назва освітньої програми)

Виконавець



(підпис)

Анастасія ТЕСЛЕНКО

(ім'я, прізвище)

Науковий керівник



(підпис)

Наталя ВОЛКОВА

(ім'я, прізвище)

Харків – 2025

АНОТАЦІЯ

Робота викладена на 81 сторінках тексту, містить 26 рисунків, 9 таблиць. Під час написання використано 67 джерел інформації.

Пристосованість, серед інших її значень, можна розглядати як інтегральний показник активності нервової системи, який може виявити вплив мутації через комплекс поведінкових, репродуктивних та фізіологічних характеристик. Дослідження пристосованості ліній дрозофіли, мутантних за генами потенціал-залежних натрієвих каналів, необхідні для пояснення механізмів нейрональної збудливості, температурочутливості та стресостійкості.

Об'єктом дослідження є мутація *para*^{ST76}, що зумовлює часткову втрату функції білка, канал оборотно втрачає здатність до транспорту Na⁺. Предметом є показники загальної пристосованості.

Мета дослідження: комплексний експериментально-біоінформатичний опис проявів пристосованості лінії 26701 (*para*^{ST76}) *Drosophila melanogaster*.

Проаналізовано реакції мутантного фенотипу на температурний стрес за нормальних умов та при годуванні карбамазепіном кожні три дні (застосували водяну баню з температурою 37 °C). Дослідили співвідношення статей, лялечкову та ембріональну смертність. Перевірили присутність транспозона *hobo* та бактерії *Wolbachia* за допомогою молекулярно-генетичних методів (полімеразно-ланцюгова реакція та електрофорез в агарозному гелі).

Встановлено, що мутанти *para*^{ST76} більш чутливі до теплового шоку, ніж особини *Canton-S*. Під впливом карбамазепіну мутанти швидше відновлюються від впливу температури, на лініях дикого типу ефект майже не спостерігається. Розподіл статей лінії в 26701 відповідає співвідношенню 1 : 1. Визначено 17,76 % лялечкової летальності і 20,59 % ембріональної смертності. Більшість ембріональних леталей спостерігається в перші 9 годин. Виявлено присутність *hobo* та *Wolbachia*.

Ключові слова: пристосованість, мутація *para*^{ST76}, температурний стрес, карбамазепін.

ABSTRACT

The work is presented on 81 text pages and includes 26 figures and 9 tables. During the writing process, 67 sources were used.

Fitness, among other meanings, can be considered as an integral indicator of nervous system activity, which can reveal the effect of a mutation through a complex of behavioral, reproductive, and physiological characteristics. Studies of the adaptability of *Drosophila* stocks mutant for voltage-gated sodium channel genes are necessary to explain the mechanisms of neuronal excitability, temperature sensitivity, and stress resistance.

The object of the study is the *para*^{ST76} mutation, which causes a partial loss of protein function, resulting in the channel loss its ability to transport Na⁺. The subject is parameters of general adaptability.

The aim of the study is to provide a combined experimental and bioinformatic description of the adaptability of the 26701 (*para*^{ST76}) *Drosophila melanogaster* stock.

The reactions of the mutant phenotype to thermal stress in normal conditions and after feeding by carbamazepine every three days (using a water bath with a temperature of 37 °C) were analysed. The sex ratio, pupal and embryonic mortality were investigated. The presence of the *hobo* transposon and the *Wolbachia* bacterium was detected using the methods of molecular genetics (polymerase chain reaction and agarose gel electrophoresis).

It was found that *para*^{ST76} mutants are more sensitive to heat shock than wild-type *Canton-S*. After the treatment with carbamazepine, the mutants recover faster from the temperature effect, while in wild-type lines the effect is not registered. The sex ratio of stock 26701 is 1:1. Larval mortality was determined to be 17.76 % and embryonic mortality was 20.59 %. Most embryonic lethalties occur in the first 9 hours of ontogenesis. The presence of *hobo* and *Wolbachia* was detected.

Keywords: adaptability, *para*^{ST76}, mutation, temperature stress, carbamazepine.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	6
Розділ 1. ОГЛЯД ТА АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	10
1.1. Загальна та симбіотична пристосованість <i>Drosophila melanogaster</i>	10
1.1.1. Біологічні основи пристосованості <i>Drosophila melanogaster</i> як модельного об'єкта	10
1.1.2. Характеристика загальної пристосованості	11
1.1.3. Симбіотичні зв'язки <i>Drosophila</i> з <i>Wolbachia</i>	14
1.2. Мутація <i>para</i> ^{ST76} <i>Drosophila melanogaster</i> як модельна система для дослідження захворювань нервової системи	17
1.2.1. Характеристика гену <i>paralytic</i>	17
1.2.2. Мутації гена натрієвого каналу на прикладі <i>para</i> ^{ST76}	18
1.2.3. Будова та функції потенціал-залежних натрієвих каналів	20
1.2.4. Переваги та недоліки використання <i>Drosophila melanogaster</i> при дослідженнях ефектів лікарських засобів	22
1.3. Аналіз пристосованості <i>Drosophila melanogaster</i> як інструмент вивчення нейродегенеративних хвороб.....	25
1.3.1. Перспективи дослідження натрієвих каналів	25
1.3.2. Вплив мутацій нервової системи на пристосованість дрозофіли	28
1.3.3. Методики введення лікарської речовини до поживного субстрату	31
1.3.4. Фармакологічні механізми дії карбамазепіну та їх вплив на пристосованість.....	33
Розділ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	36
2.1. Об'єкт і матеріали дослідження	36
2.1.1. Характеристика ліній <i>Drosophila melanogaster</i>	36
2.1.2. Опис препарату карбамазепіну.....	37
2.2. Методи дослідження.....	38
2.2.1. Поведінкові реакції.....	38
2.2.2. Плодючість та співвідношення статей	38
2.2.3. Тест на ембріональну та лялечкову смертність.....	39
2.2.4. Виділення ДНК	40
2.2.5. Полімеразна ланцюгова реакція	41
2.2.6. Електрофорез.....	42

2.2.7. Побудови моделі білка потенціал-залежного натрієвого каналу	43
2.2.8. Статистичний аналіз результатів	44
Розділ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ	46
3.1. Аналіз і моделювання структури білка Sodium channel protein para	46
3.2. Реакція <i>para</i> ^{ST76} на температурний стрес	50
3.2.1. Час появи паралічу	50
3.2.2. Порівняння часу появи судом	52
3.2.3. Порівняння часу виходу з теплового шоку	53
3.2.4. Залежність чутливості до температурного шоку від віку особин	55
3.2.5. Залежність часу виходу з температурного шоку від віку особин	58
3.3. Співвідношення статей	59
3.4. Плодючість	60
3.5. Лялечкова смертність	61
3.6. Ембріональна смертність	62
3.7. Визначення <i>hobo</i> -елемента та <i>Wolbachia</i>	64
3.8. Вплив карбамазепіну на температурну чутливість	65
ВИСНОВКИ	70
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	71

ВСТУП

Загальна пристосованість генотипу виявляється через його фенотип, адаптацію до змін середовища та наявність алелей, які підвищують його репродуктивний успіх. Пристосованість *Drosophila melanogaster* залежить від фізичних і хімічних факторів, що проявляється в змінах показників виживаності (стійкість до стресових подразників, життєздатність личинок і дорослих особин) та плодючості (особливості поведінки самок і самців, співвідношення статей у потомстві). Аналіз цих компонентів потрібний для комплексного вивчення мутаційних ефектів та розуміння еволюційних процесів.

Дослідження пристосованості ліній дрозофіли, мутантних за генами потенціал-залежних натрієвих каналів, необхідні для пояснення механізмів нейрональної збудливості, температурочутливості та стресостійкості організму. Вимірювання виживаності дозволяє моделювати ефекти мутацій людини, які спричиняють нейродегенеративні захворювання. Порівняння пристосованості різних ліній демонструє, які зміни мембранних білків і нейронних мереж є еволюційно корисними або шкідливими. Це важливо для розуміння балансу нервової системи між стабільністю та збудливістю.

Ген *paralytic (para)* *D. melanogaster* кодує селективний білковий канал, через який іони Натрію транспортуються відповідно до електрохімічного градієнту. Мутація *para*^{ST76} зумовлює часткову втрату функції білку, канал оборотно втрачає здатність до транспорту Na⁺. Фізіологічно це проявляється у порушенні роботи нервової системи – імаго життєздатні, але спостерігаються індуковані теплом судоми та параліч за підвищеної температури.

Натрієві канали необхідні для генерації та поширення потенціалів дії в центральній і периферичній нервовій системі. Вони регулюють метаболізм, диференціювання клітин та рухову активність тварин. У людини мутації генів натрієвих каналів впливають на їх функціонування, спричиняючи епілепсію, параліч та серцеву аритмію.

D. melanogaster використовують для первинного скринінгу ефективності терапевтичних препаратів. Вивчення впливу ліків на метаболічні шляхи цілісного організму дозволяє з'ясувати фармакокінетику та побічні ефекти досліджуваної сполуки, пояснити особливості фізіологічної інтеграції. Наприклад, карбамазепін збільшує час інактивації натрієвих каналів, що викликає зменшення збудливості нейронів і запобігає повторним судомним нападам. Посилює ГАМК-ергічну активність і модулює роботу білкових каналів, зменшуючи збудливість нейронів.

Взаємодія з іншими біологічними видами змінює показники пристосованості. Ендосимбіонти можуть впливати на фенотипові прояви мутацій (посилювати або послаблювати дію генів).

Актуальність роботи полягає в поглибленні відомостей про взаємозв'язок між мутаціями потенціал-залежних натрієвих каналів, на прикладі *para*^{ST76}, та проявами пристосованості організму, що допоможе з'ясувати механізми нервової дисфункції та їхній вплив на життєздатність і репродукцію *Drosophila melanogaster*. Гени натрієвих каналів та їх функціональні продукти (білки) подібні у людини та дрозофіли, тож спостерігаються схожі фенотипові ефекти. Аналіз поведінкових проявів мутантних фенотипів допоможе зрозуміти, які лікарські препарати можна використовувати для зменшення негативних наслідків мутації у дрозофіли та лікування нейрофізіологічних хвороб людини.

Пристосованість є інтегральним показником активності нервової системи та метаболічних процесів. Її дослідження показує, як мутація одного гена впливає на адаптивність всього організму через комплекс поведінкових, репродуктивних та адаптивно-фізіологічних характеристик. Такий підхід дозволяє простежити зв'язок між генетичними змінами, нервовою регуляцією та адаптивними можливостями особин за різних умов середовища.

Новизна роботи полягає в застосуванні інтегрованого підходу до вивчення загальної пристосованості мутантів *para*^{ST76} *Drosophila melanogaster*. Проводиться дослідження проявів мутації на різних рівнях: молекулярному

(біоінформатичне моделювання структури білка натрієвого каналу), фізіологічному та поведінковому (аналіз реакції мух за нормальних умов, під впливом температурного стресу та при додаванні карбамазепіну, який впливає на функціонування нервової системи), враховуються репродуктивні показники (співвідношення статей і смертність ембріонів). Комплексне вивчення дозволяє встановити зв'язок між фенотипом лінії та потенціалом її виживання. Взаємодоповнюючі методи підвищують достовірність і надійність висновків, що розширює уявлення про механізми нервової дисфункції та їх можливих фармакологічних корекцій.

Мета дослідження: за допомогою комплексного експериментально-біоінформатичного підходу описати прояви пристосованості мутантів *para*^{ST76} *Drosophila melanogaster*, охарактеризувати виживаність лінії 26701 та її реакції на різноманітні стресові чинники.

Завдання дослідження:

1. Систематизувати наукові дані про підходи до оцінки пристосованості *Drosophila melanogaster* та охарактеризувати мутантів за геном потенціал-залежного натрієвого каналу як модельну систему для дослідження захворювань нервової системи.
2. Здійснити візуалізацію моделі білка Sodium channel protein *para* за допомогою інструментів біоінформатики.
3. Експериментальним шляхом проаналізувати особливості поведінкових реакцій мутантів *para*^{ST76} за нормальних умов та під впливом температурного стресу.
4. Оцінити зміни поведінки мутантів *para*^{ST76} під впливом препарату «Карбамазепін-Астрафарм».
5. Проаналізувати плодючість лінії 26701 та співвідношення статей потомства.
6. Охарактеризувати ембріональну та лялечкову смертність *para*^{ST76}.
7. Перевірити наявність *hobo*-елемента в генотипі досліджуваної лінії та присутність ендосимбіонта *Wolbachia*.

8. Провести статистичний аналіз отриманих даних.

Автор цієї роботи підбрала наукові публікації з теми дослідження, проаналізувала результат експериментів, виконала статистичний аналіз даних і сформулювала висновки.

Розділ 1. ОГЛЯД ТА АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна та симбіотична пристосованість *Drosophila melanogaster*

1.1.1. Біологічні основи пристосованості *Drosophila melanogaster* як модельного об'єкта

Drosophila melanogaster – це вид мух, які у природі харчуються гнилими фруктами. Належить до родини Drosophilidae, ряду Diptera, класу Insecta. Морфологічні особливості – мухи розміром 2,5-3 мм з жовто-сірим тілом та чорними поперечними кільцями на черевці [2, 3].

Муха є багатомодельним організмом, особливості її використання визначаються стадією розвитку: ембріон, личинка, лялечка та доросла особина. Ембріон необхідний у фундаментальних дослідженнях розвитку для з'ясування генетичних процесів, що визначають диференціацію клітин, органогенез, формування нервової системи. Личинка використовується для вивчення фізіологічних процесів та простих форм поведінки, наприклад, пошук їжі. Лялечка містить майбутні структури дорослого організму у вигляді імагінальних дисків з недиференційованого епітелію, що дозволяє досліджувати зміни експресії генів під час метаморфозу [46, 22].

Переваги використання *D. melanogaster* як модельного об'єкта:

- короткий життєвий цикл (10-14 днів від моменту відкладання яйця до вильоту імаго) та швидка зміна поколінь (протягом одного місяця можна отримати 3 покоління мух);
- висока плодючість (50–200 нащадків від однієї пари мух), висока швидкість розмноження (нове покоління з'являється кожні 10 днів), одна самка здатна відкласти до декількох сотень яєць за 10 днів;
- статевий диморфізм, який полегшує визначення особин різних статей при аналізі результатів схрещувань;

- виражені ознаки та багато вивчених генів; наявність мутацій, які проявляються фенотипово (маркерні ознаки);
- зручність розведення в лабораторних умовах (невеликий розмір тіла, але достатній для візуального виявлення і спостереження мутацій; звичайні умови середовища (температура, вологість, харчування), можна легко впливати на генотип та фенотип, використовуючи опромінення, дієту) [2, 3, 33].

Дослідження *D. melanogaster* потребують менше етичних вимог порівняно з експериментами на гризунах або культурах клітин людини; дозволяють вивчати модельну систему на кількох рівнях – від поведінкових тестів та змін у морфології до складних генетичних маніпуляцій. Наприклад, під час тестування ліків використовують систему CRISPR/Cas9 для створення *knock-in* мутацій, у яких ендогенна копія гена замінюється мutowаною версією людського гомолога. Таких мух використовують під час вивчення фізіологічних та молекулярних ефектів ліків [12, 55, 60].

1.1.2. Характеристика загальної пристосованості

Пристосованість (fitness) є відповідністю між біологічною системою та притаманною їй стратегією взаємодії з середовищем; це показник здатності організмів адаптуватись, виживати та залишати потомство. Короткострокові пристосування біосистем забезпечуються подразливістю, довгострокові – факторами еволюції [65].

Дослідження пристосованості оцінює адаптацію популяцій до змін середовища та з'ясовує, які алелі або генотипи підвищують репродуктивний успіх виду. Це дозволяє моделювати динаміку природного добору. Пристосованість генотипу виявляється через його фенотип, на який також впливає середовище існування. Тож пристосованість може відрізнятись за різних умов. Вивчення її змін під впливом фізичних та хімічних факторів допомагає оцінити вплив кліматичних змін та забруднення середовища на

виживання особин. Аналіз пристосованості *Drosophila melanogaster* необхідний для розуміння еволюційних процесів та визначення мутаційних ефектів.

У генетиці пристосованість визначає внесок певного генотипу або фенотипу до генофонду наступного покоління. Розрізняють три типи цього поняття:

- загальна пристосованість – вплив усіх компонентів життєздатності та плодючості. Її описують кількісними характеристиками: тривалість життя імаго, виживаність личинок, фертильність, швидкість настання статевої зрілості та смертність [10];
- абсолютна пристосованість – зміна поширеності генотипу протягом одного покоління, зумовлена дією добору. Може визначатись як середнє число життєздатних нащадків, що залишає особина певного генотипу [38];
- відносна пристосованість – це кількісна міра інтенсивності природного добору; ефективність розмноження певного генотипу [4, 25].

Пристосованість є комплексною ознакою, яку визначають два головні параметри:

- виживаність (viability) – імовірність дожити від певної стадії розвитку до іншої (наприклад, від яйця до імаго);
- плодючість (fecundity) – середня кількість нащадків, що продукує одна особина за життя.

Відповідно, пристосованість можна вивчати з декількох сторін: дослідження показників виживаності (реакція на стресові подразники, тривалість життя, життєздатність личинок та імаго) та плодючості (швидкість настання статевої зрілості, інтенсивність репродукції, особливості поведінки залицяння).

Вживаність безпосередньо відображає здатність організму пристосовуватись до дії стресорів. Вона є умовою реалізації репродуктивної функції, оскільки особини, які не досягають статевої зрілості, не роблять внеску в генофонд популяції незалежно від потенційної плодючості. Наприклад, у температурно-чутливих мутантів *Drosophila melanogaster* пристосованість

знижується при підвищенні температури внаслідок порушення роботи іонних каналів нервової системи [17].

Показники виживаності дозволяють оцінити фізіологічну стійкість організму до змін температури, токсичних речовин, голодування чи інфекцій. *D. melanogaster* використовується як модель для первинного передбачення ефективності лікарських препаратів перед проведенням випробувань на мишах або лініях клітин людини. Дослідження надають інформацію про ефекти впливу ліків на біохімічні шляхи, які контролюють регенерацію тканин, поділ і диференціацію клітин та рухову активність [7, 46].

hobo – це транспозон родини hAT, мобільний елемент, що переміщується по геному за механізмом «виризання-вставки». Його активні копії містять транспозазу, необхідну для власної мобільності. Популяції дрозофіл мозаїчні за його присутністю – існують лінії з активними копіями, «мовчазними» елементами, лінії з ефективним piRNA-захистом або без нього. Клітина намагається пригнічувати активність *hobo* за допомогою малих РНК.

hobo-елемент може викликати гібридний дисгенез – феномен, що виникає при схрещуванні особин з різним транспозонним статусом (наявністю або відсутністю активних копій *hobo*). У результаті в потомстві різко активуються транспозони, з'являється геномна нестабільність і порушення розвитку. Наприклад, при схрещуванні самець несе активний транспозон, а самка не має механізмів його пригнічення. Потомство не отримує материнських захисних РНК, і транспозони починають неконтрольовано переміщатися. Гібридний дисгенез знижує стресостійкість, тривалість життя і плодючість, проте на популяційному рівні сприяє перебудові генетичного матеріалу та створенню нових адаптивних варіантів.

При активному транспозоні спостерігаються множинні розриви ДНК, хромосомні аберації, делеції та вставки, порушення правильного хроматинового упакування. Фенотипічні наслідки гібридного дисгенезу: стерильність (особливо у самок), дегенерація гонад, зменшення кількості статевих клітин, підвищена частота мутацій і дефекти розвитку.

Тож вивчення виживаності допомагає з'ясувати межі толерантності популяції до різних факторів середовища та визначити адаптаційний потенціал генотипу. Дослідження загальної пристосованості *Drosophila melanogaster*, наприклад, ліній з мутаціями генів натрієвих каналів (*para*^{ST76}), необхідні для розуміння механізмів нейрональної збудливості, термочутливості та стресостійкості організму. Такі мутації призводять до порушення функції потенціалзалежних натрієвих каналів у нейронах, що проявляється у підвищеній чутливості до температури або дії нейроактивних речовин (наприклад, карбамазепіну, фенітоїну, лідокаїну). Вимірювання виживаності таких ліній дозволяє моделювати ефекти мутацій людини, які спричиняють епілепсію та інші нейродегенеративні захворювання.

1.1.3. Симбіотичні зв'язки *Drosophila* з *Wolbachia*

Дрозофіла є відкритою біосистемою, у якій відбувається постійний обмін речовинами та енергією з навколишнім середовищем. Взаємодія з іншими організмами може впливати на показники виживаності та плодючості, тож під час аналізу пристосованості необхідно враховувати вплив симбіонтів. Бактерії беруть участь у процесах травлення, регуляції росту, реакції імунної системи та чутливості до патогенів. Вони змінюють енергетичні затрати організму мухи та впливають на фенотипові прояви мутацій (посилюють або послаблюють дію генів).

Мікробні ендосимбіонти можуть бути мутуалістами (корисними партнерами), які надають господарям еволюційну перевагу, або паразитами, що поширюються через популяції господарів, незважаючи на зниження пристосованості заражених особин [9].

Wolbachia – це грам-негативні бактерії, внутрішньоклітинні симбіонти членистоногих. Традиційно вони вважалися репродуктивними паразитами, які маніпулюють розмноженням господарів для своєї передачі наступним поколінням. Деякі штами змінюють співвідношення статей господарів у бік

самок, тобто статі, яка передає симбіонта потомству. Це спричиняє партеногенез, фемінізацію та летальність генетичних самців. Інші вольбахії викликають несумісність яйцеклітин і сперматозоїдів – цитоплазматичну несумісність, що надає репродуктивну перевагу інфікованим самкам. При схрещуванні заражених самців з незараженими самками у потомстві з'являються лише самці [8, 66]. Деякі штами збільшують пристосованість господаря, наприклад, у постільного клопа *Cimex lectularius* бактерії синтезують вітаміни групи В, необхідні для виживання комах [9, 58].

Більшість *Wolbachia* є факультативними мутуалістами (симбіонт корисний, але не є необхідним для виживання або розмноження господаря). Наприклад, штам wAu майже не впливає на репродуктивну поведінку *Drosophila simulans*. При певних дістах бактерії захищають *D. melanogaster* від харчового стресу. Штами, які викликають цитоплазматичну несумісність, можуть впливати на організм господаря лише за умови, що їх частота в популяції є досить високою. Таким способом компенсуються витрати на зараження та недосконалість материнської передачі. Поширеність таких штамів з низькою частотою може свідчити про користь для пристосованості мух [9, 30, 66].

Додаткова перевага у пристосованості мух, інфікованих *Wolbachia* полягає в захисті хазяїна від інших патогенів. Бактерії конкурують з ними за клітинні ресурси господаря. Наприклад, у комара *Aedes aegypti* бактерії знижують реплікацію та передачу вірусу Денге. У *D. simulans* та *D. melanogaster* зменшується негативний вплив РНК-вірусів Ла-Хоя (LJV) та Ньюфілд (NFV): знижується титр та вірулентність [9].

У дослідженнях взаємодій симбіонтів існують певні обмеження. *Wolbachia* і вірусна інфекція істотно знижують виживаність мух. Більшість *D. melanogaster* інфіковані паразитами з меншою вірулентністю, тож позитивний ефект бактерії може не проявлятися у виживаності господаря. Вірусна епідемія може забезпечити тимчасову перевагу для інфікованих мух, якщо поширеність симбіонта перевищить поріг вторгнення. Як тільки

поширеність вірусу знову знизиться, *Wolbachia* може підтримуватися в популяції шляхом цитоплазматичної несумісності [9].

Поширення вольбахії забезпечується вертикально, через материнські статеві клітини. Бактерія є ендосимбіонтом, тож її цитоплазматичний вміст оточений власною мембраною та зовнішньою мембраною господаря [30]. Спостерігається також горизонтальне передавання, яке не залежить від безпосереднього контакту клітин, а відбувається через спільне поживне середовище та навколишні умови. Процес підтримується фагоцитарним і клатрин-динамін-залежним ендоцитозним апаратами [66].

Інфікування *Wolbachia* швидко поширюється, наприклад, штам wRi у популяції *D. simulans* у Каліфорнії та східній Австралії. Виявлення факторів, що впливають на частоту зараження в природних умовах, має кілька складнощів: точна ідентифікація видів хазяїна, інструменти молекулярної діагностики для розрізнення різних ендосимбіонтів, можливість вирощування господарів у контрольованих умовах для оцінки впливу на відтворюваність та точність материнської передачі інфекції [30].

Інфіковані мухи, які піддавалися тривалому впливу холоду, мають знижену плодючість та виживаність, чого не спостерігається з неінфікованими особинами. Ці втрати в пристосованості можуть сприяти відносно низькій частоті поширеності *Wolbachia* в помірних районах Австралії. Цитоплазматична несумісність, може сприяти більш високій частоті в тропічних регіонах [30].

Вивчення симбіозу *Wolbachia* з комахами має практичне значення. Бактерії пригнічують життєдіяльність комарів, тож проводяться примусові інтродукції та інвазії для контролю чисельності переносників хвороб [30]. *Drosophila suzukii* має яйцеклад з зазубринами, які дозволяють проколювати шкірку молодих плодів. Личинки розвиваються всередині плоду, знищуючи до 80 % врожаю. Примусове інфікування мух бактерією є біологічно безпечним способом контролю чисельності шкідників [66]. Тож дослідження впливу

симбіонтів на пристосованість дрозоділи допоможе знайти екологічно безпечні рішення для проблем сільського господарства та медицини.

1.2. Мутація *para*^{ST76} *Drosophila melanogaster* як модельна система для дослідження захворювань нервової системи

1.2.1. Характеристика гену *paralytic*

Ген *paralytic* є білок-кодуючим, скорочено позначається *para*. Локалізований у 1 (X) хромосомі *D. melanogaster*, локус 14C8-14E1; 1-54 сМ. Ген кодує α -субодиницю потенціал-залежних натрієвих каналів, бере участь у генерації натрій-залежних потенціалів дії, необхідний для рухової активності.

Ген містить 34 екзони. Має 60 ізоформ-транскриптів, які утворюються завдяки механізмам альтернативного сплайсинга. Білок Sodium channel protein *para*, який кодується цим геном, складається з 2131 амінокислоти (рис. 1) [5, 16, 19, 43, 64].

Ген *paralytic* опосередкує потенціал-залежну проникність йонів Натрію у клітинних мембранах, формує селективний канал, через який Натрій транспортується відповідно до електрохімічного градієнту. Білок може мати закриту та відкриту конформацію залежно від розподілу потенціалу на мембрані. Регулює механосенсорну поведінку та залицяння самців. Експресується в мозку дорослого організму, черевному нервовому ланцюжку та очах. Неправильна експресія призводить до синдрому Драве, епілепсії та генералізованої епілепсії з фебрильними судомою [5, 16, 19, 43, 64].

Ортологи цього гена у людини: SCN1A, SCN2A і SCN5A (кодують відповідно альфа-субодиниці 1, 2 і 5 натрієвого потенціал-залежного каналу). Вони залучені до розвитку багатьох захворювань: епілепсія, сімейна геміплегічна мігрень, хвороби серцевої провідності, внутрішня кардіоміопатія та невропатія [16, 43, 64].

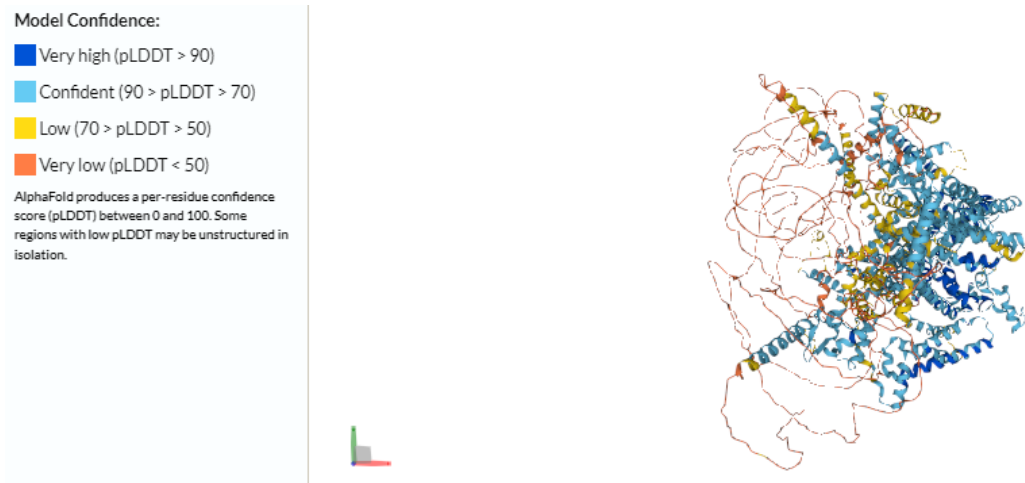


Рис. 1.1. Модель структури білка Sodium channel protein para
(<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P35500/entry#structure>)

1.2.2. Мутації гена натрієвого каналу на прикладі *para*^{ST76}

Першим виділеним мутантом *para* був *para*^{ts1}, у якого спостерігається параліч під впливом високої температури. Пізніше ідентифікували алелі, які викликають летальність, нюхові дефекти, нескоординований рух, стійкість до інсектицидів, параліч у відповідь на тепловий, холодний чи механічний шок [29].

У роботі використали мутантів *para*^{ST76}, які належать до групи домінантних мутацій. Морфологічними особливостями особин є білі очі (мутація *para*^{ST76} маркована присутністю в тій самій хромосомі мутації гена *white*), фізіологічними – нормальна поведінка за кімнатної температури та індуковані теплом судом й параліч за підвищеної температури [31, 48].

para^{ST76} належить до мутацій дрозофіли, які називаються супресорами судом. Генетичні супресори – це модифікуючі мутації, що роблять індивідуумів фенотипово схожими на дикий тип, тобто пригнічують мутантний фенотип. Наприклад, мухи з мутацією *para*^{ST76} у комбінації з *para*^{bss} (чутливість до гучних звуків та низький поріг судом у відповідь на високочастотну стимуляцію за кімнатної температури або після короткого теплового шоку)

фенотипово схожі на дикий тип, тобто є стійкими до судом. Властивість генетичних супресорів мають також *para^{ts1}* і *para^{JS1}* [31, 48].

para^{ST76} зумовлює часткову втрату функції білку. Натрієвий канал оборотно втрачає здатність транспортувати йони Натрію, що приводить до зниження збудливості нейронів та порушень роботи нервової системи [14, 18]. Схожим чином на організм людини та дрогофіли впливають препарати фенітоїн, карбамазепін та ламотриджин, які блокують роботу натрієвих каналів та запобігають проявам симптомів епілепсії [31].

Як модельний об'єкт для вивчення епілепсії використовують *para^{Shu}* (*Shudderer* або *Shu*) – домінантний мутантний алель *para* з посиленням функціонування гена потенціалзалежного натрієвого каналу. Фенотиповий прояв подібний до епілептичних судом: гіперзбудливість нейронів, спонтанні спазми, рухові дефекти, тремтіння лапок під впливом наркотизуючих речовин (ефіру). *para^{Shu}* характеризуються загнутим вниз крилом і заглибленням на тораксі, що спричинене аномальною м'язовою активністю [29].

Тяжкість прояву фенотипу *para^{Shu}* залежить від особливостей харчування. Якщо вирощувати *para^{Shu}* з використанням дієти Е. Льюїса, у них спостерігалися серйозні неврологічні дефекти. За вирощування на дієті Франкеля та Бруссо (1968 р.), фенотипові ознаки були пригніченими. Порівняння ефектів двох рецептів харчування показало, що фенотипове пригнічення прояву мутації зумовлено молочною сироваткою, яка наявна лише в останній дієті [29].

Мутація *para^{bss}* (надекспресія *para*) у нейрональних тканинах головного мозку дрогофіли призводить до появи епілептичних нейропатологічних особливостей. Ця мутація викликає зниження порогу стимуляції судом, що робить мух сприйнятливішими до судомних проявів після електричного, механічного або фізичного впливу. Мутантні особини мають дефектний метаболізм та знижену життєздатність нейронів, що спричиняє дефекти поведінки та нейрофізіологічних механізмів, порушень сенсорно-моторної активності [61].

Когнітивні розлади у *para^{bss}* пояснюються змінами метаболічних шляхів та активності нейронів, які зумовлюють чутливість до механічного стресу (пробірку активно струшують, щоб мухи зазнали ударів об скляні стінки) та судомну поведінку, яка виникає в епілептогенній зоні мозку. «Напади» поширюються на вторинні центри мозку: рухові центри, центри навчання та пам'яті у грибоподібних тілах. Це призводить до порушення функцій навчання та пам'яті (когнітивний дефіцит) *D. melanogaster*. У мутантів *para^{bss}* спостерігається прогресуюча вікова нейродегенерація мозку та аксональна дегенерація [61].

1.2.3. Будова та функції потенціал-залежних натрієвих каналів

Потенціал-залежні Na^+ -канали – це мембранні білки, які відповідають за генерацію та поширення електричних сигналів по мозку, скелетних м'язах та серцю. Функціонування натрієвих каналів впливає на поведінку та фізичну активність організму [20, 31].

Натрієві канали відкриваються першими у відповідь на зміни напруги мембрани, дозволяючи позитивно зарядженим іонам Натрію накопичуватися всередині клітини. Здатність до деполяризації є необхідною для збудливих клітин (нейрони та м'язові клітини), які використовують електричний сигнал для створення потенціалу дії, що перетворюється на відповідь всього організму (наприклад, вивільнення нейротрансмітерів або скорочення м'язів) [23].

Потенціал-керовані натрієві канали відкриваються, коли мембранний потенціал знижується (відбувається деполяризація мембрани). Потік іонів Натрію переходить з області більш високої концентрації (зовні клітини за потенціалом спокою) в зону з нижчою концентрацією (всередині клітини), викликаючи фазу потенціалів дії, яка швидко зростає. Приблизно через мілісекунду після відкриття каналу білкова частка інактивації закупорює пору каналу. Швидка інактивація припиняє поширення потенціалу дії [15, 23].

Натрієві канали комах мають чотири гомологічні домени, що повторюються (I-IV), кожен з яких складається з шести α -спіральних трансмембранних сегментів (S1-S6). У кожному домені сегменти S1-S4 формують модуль виміру напруги (рис. 2). Сегменти S5, S6 та чотири мембранні Р-петлі, які з'єднують сегменти S5 та S6, утворюють поровий модуль [15, 31].

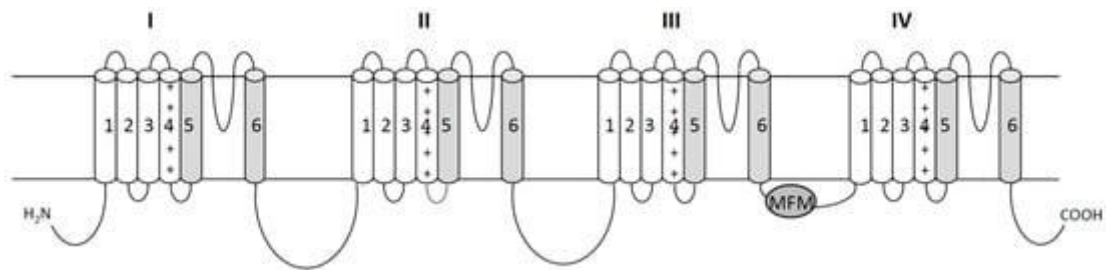


Рис. 1.2. Топологія натрієвого каналу із зазначенням структурних особливостей. Білок містить чотири гомологічні домени, що повторюються (I–IV), кожен з яких має шість α -спіральних трансмембранних сегментів (S1–S6). У кожному домені сегменти S1-S4 формують модуль виміру напруги. "+" – це позитивно заряджений амінокислотний залишок в сегменті S4. Сегменти S5, S6 і Р-петлі, що проникають у мембрану та з'єднують сегменти S5 і S6, утворюють поровий модуль (показаний сірим кольором). Амінокислоти D, E, K та A в положеннях доменів I, II, III та IV відповідно визначають іонну селективність натрієвих каналів (<https://doi.org/10.3390/insects7040060>).

Чотири модулі вимірювання напруги розташовані квазісиметрично навколо зовнішнього краю порового модуля. Кожен сегмент S4, який є датчиком напруги каналу, містить ділянки, що повторюються (позитивно заряджений амінокислотний залишок, за яким йдуть два гідрофобні залишки). При деполяризації мембрани сегменти S4 переміщуються у позаклітинному напрямку, що ініціює конформаційні зміни, під час яких С-кінцеві частини сегментів S6 зміщуються від пори осі, відкриваючи активаційні ворота. Короткі

внутрішньоклітинні лінкери між сегментами S4 та S5 (L45) передають рухи модулів сприйняття напруги до сегментів S5 та S6. Після короточасного відкриття натрієві канали піддаються швидкій інактивації, що запускається частинкою інактивації, яка закупорює внутрішню пору. Вона формується мотивом MFМ (амінокислотні залишки М, F і М) та розташована в короткому внутрішньоклітинному лінкері, що з'єднує домени III і IV у натрієвих каналах комах [15, 31].

Завдяки функції передачі електричних сигналів у збудливих клітинах натрієві канали є мішенню для природних та синтетичних нейротоксинів та фармакологічних препаратів (анестетики – лідокаїн, протиепілептичні засоби – фенітоїн та ламотриджин, антиаритмічні засоби – флекаїнід та мексилетин) [15].

Нейротоксини, наприклад, піретроїдні інсектициди, зв'язуються з відкритими натрієвими каналами, посилюють активацію та інгібують інактивацію, змінюючи процес відкривання каналів та збільшуючи час відкриття натрієвих каналів. Модифікація воріт каналів викликає повторювані імпульси, блокування нервової провідності, параліч та смерть комах [15].

Фармакологічні речовини запобігають нервовій провідності, наприклад, лідокаїн блокує больові сигнали. Протиепілептичні засоби знижують збудливість нейронів та час прояву судом. Мета використання препаратів – зменшення потоку іонів Натрію та стабілізація мембранного потенціалу [23].

1.2.4. Переваги та недоліки використання *Drosophila melanogaster* при дослідженнях ефектів лікарських засобів

Під час вибору моделі для дослідження способів лікування захворювань людини необхідним є проведення скринінгу препаратів на тваринах. У модельному організмі системи органів та метаболічні шляхи існують не ізольовано, а функціонують у комплексі. Такі дослідження мають високу валідність для розробки нових терапевтичних стратегій [6, 46].

Незважаючи на анатомічні відмінності між плодовою мушкою та людиною, їхні фундаментальні клітинні та молекулярні процеси є консервативними та подібними. Доросла муха має структури, які функціонально аналогічні мозку, серцю, легеням, ниркам, кишківнику та репродуктивній системі ссавців [46]. На відміну від хребетних, *Drosophila* має відкриту кровоносну систему, яка дозволяє доставити ліки в будь-який цільовий орган [62]. Мозок мухи складається з близько 100 000 нейронів, здатних опосередковувати складні поведінкові реакції: від залицання та навігації у просторі до навчання та пам'яті [46].

Мухи реагують на нейроактивні препарати аналогічно до ссавців, що робить їх оптимальним інструментом для досліджень [46]. Захворювання, які спричиняються дисфункцією одного гена або метаболічного процесу (наприклад, утилізація глюкози або сигнальні шляхи рецепторів) мають консервативні генетичні причини. Тож використання дрозофіли зі швидкою зміною поколінь полегшує первинний скринінг та інтерпретацію результатів експериментів [41, 46].

Дрозофіла та людина мають схожий фенотип нейродегенеративних хвороб:

- сприйнятливість до судом модулюється мутаціями;
- наявність певного порогу виникнення судом (величина електрохімічного потенціалу);
- збільшення порогу судомної активності при попередньому впливі електросудомого шоку (формується стійкість);
- поширення судомної активності певними шляхами центральної нервової системи (ЦНС) та просторова сегрегація такої активності [12, 35].

Потенціалзалежні та лігандзалежні білки (натрієві, калієві та кальцієві канали, рецептори трансмітерів глутамату, ацетилхоліну і ГАМК) є консервативними у обох видів. Гени людини, пов'язані з діяльністю нервової системи (рецептори нейротрансмітерів, переносники водорозчинних речовин, клітинна адгезія, цитоскелет, механізми вивільнення синаптичних везикул,

внутрішньоклітинне передавання сигналу), мають ортологів у дрізофіли. Хоча ЦНС дрізофіли організована як гангліозна структура із синаптичними нейропілярними областями, на відміну від людської кори з синаптичних шарів, електричний шок достатньої інтенсивності, який подається мозку дорослої дрізофіли, може спричинити нейронну імпульсну активність, схожу на судомний напад людини [42, 62].

Різноманітність генотипів дрізофіли дозволяє обрати найбільш ефективну систему для моделювання різних типів епілепсії, судом, синдрому Драве та інших порушень нервової системи та перевіряти, чи зменшують препарати клінічні симптоми. Поведінкові тести (наприклад, чутливість до температурного стресу, локомоторна активність, особливості статевої поведінки) дозволяють швидко та наочно визначити неврологічні порушення. Завдяки електрофізіологічним методам можна виміряти активність натрієвих каналів та швидкість поширення потенціалу дії по нервовій системі [36, 47].

Судоми можна штучно індукувати впливом проконвульсантів, наприклад, пікротоксину, завдяки блокуванню рецепторів інгібування ГАМК. Лікування може відбуватись завдяки протиепілептичним препаратам людини, включаючи вальпроат натрію, фенітоїн та бромід калію [12, 35].

Під час дослідження складних процесів і багатфакторних захворювань людини недоліком моделі *D. melanogaster* є можливість моделювати лише певні аспекти захворювання. У дрізофіли немає кіркових та підкіркових областей мозку, у яких починається людська епілепсія. Причини хвороби у людини є різноманітними: від спадкових (генетичних) до набутих (черепно-мозкові травми, інфекції). У мухи можна вивчати лише судомні напади з сильними спазмами та м'язовими проявами. Відсутність гематоенцефалічного бар'єра ускладнює екстраполяцію даних на людину [12, 46].

Потенційні відмінності у фармакокінетиці та фармакодинаміці малих молекул приводять до розбіжностей у рівнях лікарських засобів і профілях розподілу в тканинах між ссавцями та мухами. ЦНС може мати відмінності в поширенні сполук по крові та мозку. Внаслідок метаболічних відмінностей

людські ліки можуть бути токсичними для мух, і навпаки, незважаючи на сильну кореляцію цього аспекту між двома видами [46]. Тож дрозофіла може використовуватись для первинного скринінгу малих молекул і зменшення списку потенційних кандидатів ліків, з обов'язковою подальшою перевіркою їхніх ефектів на моделях ссавців.

Тож включення *D. melanogaster* у процес виявлення нових терапевтичних засобів дозволить пришвидшити відбір потенційно ефективних сполук, порівняно з традиційними методами досліджень на мишах або лініях клітин *in vitro*. Вивчення ефектів препарату при впливі метаболічних шляхів цілісного організму необхідно для розуміння фізіологічної інтеграції, фармакокінетики та побічних ефектів досліджуваної сполуки.

1.3. Аналіз пристосованості *Drosophila melanogaster* як інструмент вивчення нейродегенеративних хвороб

1.3.1. Перспективи дослідження натрієвих каналів

Сучасні дослідження натрієвих каналів дрозофіли можна поділити на чотири напрямки:

- характеристика фенотипових особливостей мутацій гена *paralytic*, що призводять до виникнення хвороб нервової системи [44];
- дослідження проявів мутацій *paralytic* завдяки модифікації метаболічних шляхів Натрію. Вивчають не зміни структури каналів, а речовини, які можуть впливати на внутрішньо- та зовнішньоклітинні концентрації йонів та змінювати інтенсивність проведення нервового імпульсу. До таких досліджень належить, наприклад, аналіз рецептів поживного середовища дрозофіли для зменшення проявів паралічу та судом;
- вивчення експресії *paralytic* у різних тканинах, на різних стадіях онтогенезу для розуміння механізму розвитку нейродегенеративних захворювань, пов'язаних з онкологією та старінням. Натрієві канали регулюють

проліферацію нейрональних попередників, тож різке збільшення кількості натрієвих каналів спостерігається при ракових захворюваннях [56];

- деякі мутанти дрозофіли (наприклад, *para*^{L1014F} або група мутацій *kdr*) виявляють стійкість до інсектицидів. Подібні фенотипи спостерігаються у багатьох комах, в тому числі у шкідників сільськогосподарських культур. Вивчення механізмів виникнення таких мутацій та особливостей їх проявів допоможе підібрати інсектициди, які зменшуватимуть чисельність популяцій шкідників, не впливаючи на екосистемні зв'язки (наприклад, знижена плодючість особин). Для досягнення цієї мети застосовують інструменти біоінформатики для аналізу та порівняння амінокислотних послідовностей білкових каналів різних видів комах, встановлення еволюційних зв'язків між ними та виявлення подібних метаболічних шляхів.

Для вивчення впливу мутацій на поведінку дрозофіли найчастіше використовуються електрофізіологічні дослідження (вимірювання м'язового потенціалу дії, електрична стимуляція мозку) та молекулярні (завдяки впливу іонізуючого випромінювання дослідники штучно викликають аберації, перебудови у хромосомах та досліджують політенні хромосоми слинних залоз для пошуку мутантних алелей гену) [50, 53, 57].

Найбільш дослідженим захворюванням головного мозку, що характеризується повторюваними та неспровокованими нападами є епілепсія. Сучасні протиепілептичні препарати не здатні контролювати напади у 30 % пацієнтів з епілепсією. Більшість неврологічних розладів мають генетичні складники, але на тяжкість захворювання також впливають фактори середовища. Їжа – найбільш контрольований фактор, тому маніпуляції з дієтами допоможуть створити ефективні, неінвазивні методи корекції епілепсії [37].

Дієта з високим вмістом жирів та низьким вмістом вуглеводів ефективна для пригнічення судом. За такого харчування печінка виробляє кетонові тіла, тому її називають кетогенною дієтою (КД). Включення молочної сироватки до раціону личинкових стадій мутантів дрозофіли *para*^{Shu} пригнічує негативні

фенотипові прояви у дорослих особин, тобто ця дієтична модифікація впливає на розвиток нервової системи [29]. При цьому дієта пригнічувала фенотипи *para*^{GEFS+} та *para*^{bss}, а на *para*^{DS} та *para*^{ts1} не впливала. З'ясування механізмів, завдяки яким КД контролює судомну активність, забезпечить розуміння впливу метаболічних змін на розвиток та функціонування нейронів [29, 52].

Дрозофілу використовують для характеристики доклінічної ефективності нових терапевтичних сполук. Під час тривалого лікування змінюється ефективність препарату внаслідок розвитку толерантності організму. Хронічні дисфункції мозку можуть змінити чутливість до побічних ефектів ліків [36].

Тканиноспецифічна експресія мутантних генів та зміни її активності викликають появу нейропатологічних фенотипів. Фітохімічні речовини рослини *Imperata cylindrica* (2-2-фенілетил- і 5-гідрокси-2-(2-фенілетил)-хромони) мають нейропротекторний потенціал для клітин кори головного мозку. У метанольному екстракті кореня *Imperata cylindrica* містяться поліфеноли та флавоноїди з сильними антиоксидантними властивостями. Рослинні антиоксиданти мають пом'якшувальні ефекти, тож можуть бути використані для лікування нейродегенеративних захворювань та фенотипів епілепсії, спричинених генетичними мутаціями у людей та *D. melanogaster*. При цьому підвищується активність ендогенних антиоксидантів та інгібуються рецептори потенціалзалежних натрієвих каналів. Зменшується запалення та апоптоз, посилюється відновлення тканин та покращується клітинний метаболізм [61].

Одноразова та постійна обробка екстрактом *Imperata cylindrica* зменшує нейропатологічні прояви у мутантних мух (судоми, дефіцит навчання та пам'яті, гістопатологію мозку). Фенотипи *para*^{bs}, *jus*, *eas* і *tko* також послаблюються під час годування антиоксидантом [61].

У комах-шкідників і переносників хвороб виявлено мутацію гена потенціалзалежного натрієвого каналу – нокдаун-резистентність або *kdr*, яка надає стійкість до інсектицидів – піретроїдів і ДДТ. За допомогою засобів біоінформатики можна визначити, які саме амінокислотні заміни відбулися, а

потім застосувати технологію редагування геному CRISPR/Cas9 для отримання мутантних особин. Таким способом ідентифікували диференціальну чутливість до перметрину та ДДТ у порівнянні з дельтаметрином, а також протилежні фізіологічні наслідки двох різних мутацій *kdr* [27]. До переваг практичного застосування таких експериментів належить цілеспрямоване «повернення» стійких до інсектицидів популяцій до природного сприйнятливого стану або заміну комарів, що переносять малярію, комарами, що несуть алелі стійкості до паразитів, що зустрічаються в природі [27, 67].

1.3.2. Вплив мутацій нервової системи на пристосованість дрозофіли

Пристосованість *D. melanogaster* є комплексним показником, який відображає не лише виживаність та репродуктивний успіх, а й стійкість до зовнішніх стресорів, включаючи нейроактивні речовини (протиепілептичні лікарські засоби, токсини). Мухи з мутаціями йонних каналів можуть мати підвищену чутливість до седативних препаратів, зміни активності під впливом кофеїну, стійкість до інсектицидів.

Порівняння пристосованості різних ліній дрозофіли показує, які зміни в нейронних мережах та мембранних білках є еволюційно корисними або шкідливими. Це дозволяє з'ясувати баланс нервової системи між збудливістю та стабільністю. Дрозофіла має багато фенотипів, що моделюють епілепсію за різними механізмами:

- підвищення збудливості (наприклад, натрієві канали);
- недостатнє гальмування (транспортери хлору, *GABA-B*);
- дефекти синаптичної передачі (динамін);
- порушення структури нейронів (α -Spectrin);
- порушення енергетичного обміну та метаболізму (*Glut1*).

Моделі захворювань нервової системи характеризуються судомними проявами, зменшеною тривалістю життя, слабкою імунною відповіддю, зниженою стійкістю до токсинів та порушеннями репродуктивної поведінки.

Пристосованість є інтегральним показником роботи нервової системи, що включає на здатність до польоту, рухову координацію, реакцію на стрес, швидкість навчання та цикли сну. Тож вивчення пристосованості необхідне для розуміння, як мутація одного гену відображається на фізіології всього організму. Деякі порушення майже не впливають на виживаність особин, інші є летальними. Дослідження цього показника оцінює еволюційний вантаж мутацій та виявляє гени, критичні для стабільності нервової системи.

Температурочутлива поведінка зазвичай асоційована з мутаціями гена натрієвого каналу (*para*). Температура впливає на швидкість метаболізму, рухову активність, швидкість розвитку личинок. Порушення сприйняття температури змінює активність нейронів, що знижує здатність до польоту, підвищує вразливість до хижаків та знижує репродуктивний період [62].

Ген *Shaker* кодує α -субодиницю потенціалзалежного калієвого каналу. Він підтримує електричну збудливість нейронів і регулює вивільнення нейротрансмітерів у синапсах. Мутації *Shaker* порушують координацію рухів, що впливає на шлюбну поведінку та дискримінацію за статтю [62]. Потік іонів Калію характеризується пластичністю: при поступовому підвищенні температури підвищується експресія підтипів каналів, стійких до інактивації. Адаптивність термостійкості підвищує загальну пристосованість.

Ген *Ih* пов'язаний з HCN – нуклеотид-залежними циклічними каналами, що активуються гіперполяризацією. У мутантних за цим геном личинок третьої стадії порушується транспорт везикул, у дорослих особин – порушення локомоції та зменшення тривалості життя [62].

Кальцієві канали регулюють надходження йонів кальцію до збудливих клітин та беруть участь у процесах, пов'язаних з ними: вивільнення нейротрансмітерів, скорочення м'язів, рухливість та поділ клітин, апоптоз. Ген *sacrophony* кодує $\alpha 1$ -субодиницю потенціал-залежного кальцієвого каналу. Недостатня кількість Ca^{2+} погіршує координацію рухів, що знижує ефективність пошуку їжі, уникнення небезпеки та конкуренції за партнерів. У дрозофіли ген асоційований з поведінкою залицяння самців та

нейрофізіологічними процесами, тож має множинний вплив на пристосованість [62].

GABA-B-R2 формує одну з субодиниць рецептора ГАМК-В, який є компонентом інгібувальної нейротрансмісії, зниження збудливості нейронів та контролю складних форм поведінки. Крім загального негативного впливу на виживання мук (геіперзбудливість нейронів та судоми, порушення сну), білок впливає на формування нюхової пам'яті, асоціативного навчання та моторної пам'яті [28, 62].

Glut1 є переносником глюкози через мембрану клітин, який забезпечує енергетичний обмін та гомеостаз. Неправильне функціонування білка знижує активність особин, пригнічує ріст та стійкість до стресорів [62].

Котранспортери калію та хлору регулюють розвиток нейронних мереж та міграцію клітин під час органогенезу. Вони встановлюють рівень хлоридної рівноваги, необхідний для нормальної ГАМК-ергічної гальмівної передачі [62].

Shibire – ортолог динаміна людини (*DNM1/DNM2*), GTPази та компоненту клатрин-опосередкованого ендоцитозу везикул. За підвищеної температури мутанти за цим геном втрачають здатність транспортувати речовини, що спричиняє втрату здатності рухатись та знижує виживаність [62].

α -Spectrin формує цитоскелет, мембранну організацію та архітектуру нейронів. Бере участь у ліпопротеїновому шляху та асиметричному поділі стовбурових клітин зародкової лінії. Дефекти гена знижують здатність до навчання та сенсорної обробки. У людини аналогічні порушення асоціюються з хворобою Паркінсона [62].

Drosophila G protein α o subunit (Gao) – це α -субодиниця G-білка, що регулює синаптичний ріст, диференціювання глії та формування «гематоенцефалічного бар'єра», який перешкоджає потраплянню K^+ з гемолімфи до нервової системи. При дефектах гена не генерується потенціал дії, що різко знижує пристосованість [62].

За допомогою моделювання захворювань людини на дрозофілі можна визначити вплив мутацій на функціонування нейронів та дослідити

компенсаторні механізми, які підтримують виживання фенотипу. Таким способом встановлюють причини виникнення стійкості до терапевтичних засобів [37]. Завдяки оцінці впливу лікарських препаратів на поведінку комах виявляють побічні ефекти, які знижують виживання особин, та молекулярні шляхи збільшення ефективності терапії.

1.3.3. Методики введення лікарської речовини до поживного субстрату

Спостерігаючи за пристосованістю дрозofil під впливом нейроактивних речовин, можна оцінити загальну пристосованість нервової системи до фармакологічного стресу, а потім використовувати отримані дані для дослідження хвороб людини.

Реакції моделей епілепсії мають неоднакову реакцію на вплив ліків внаслідок порушень різних механізмів нервової системи. Вивчення пристосованості мух під впливом протиепілептичних препаратів виявляє механізми лікарської стійкості та виявляти побічні ефекти препаратів [7].

Для личинок ліки додають у тверде середовище (тривала експозиція) або в розбавлений розчин дріжджової пасти (коротка експозиція). Для дорослих мух існує багато способів введення ліків. Препарати можуть бути представлені у вигляді парів (наприклад, етанол і кокаїн); у самій їжі або на фільтрувальному папері, просоченому сахарозою/ліками. Ліки можна вводити ін'єкцією або капати безпосередньо на ізольований нервовий тяж мух після обезголовлення [46].

До потенційних проблем, що визначають шлях введення речовини, належить смак препарату: муха не буде вживати їжу з неприємним смаком, але його можна замаскувати в складі заохочувального субстрату (наприклад, сахарози, банана або дріжджової пасти). Найбільш вискоефективний метод полягає в розчиненні препарату в харчовому субстраті або в суміші агарози і сахарози (для гарантії, що жоден інгредієнт їжі не перешкодить дії препарату

або всмоктуванню), і аліквотуванні в лунки планшета з окремими особинами [46].

Фізіологічно ефективні концентрації препаратів можуть варіюватися від 0,01 до 100 мМ в харчовому субстраті [32]. Фактичні фізіологічні концентрації будуть значно нижчими; може знадобитися дослідження концентрацій *in vivo* за допомогою високоефективної рідинної хроматографії або мас-спектрометрії. Рекомендується проведення пілотних досліджень, наприклад, вивчення трьох різних концентрацій препарату в логарифмічних розведеннях в поживному субстраті (0,03, 0,3 і 3,0 мМ) для оцінки ефективності та вибору відповідної концентрації для повного скринінгу [46].

При годуванні дорослих особин лікарськими препаратами слід використовувати різні стратегії. Мухи голодують протягом 16-18 годин, потім їх переміщують на кормовий субстрат з препаратом на кілька хвилин. Таким способом мухи споживають велику дозу речовини. Переваги цього методу включають спостереження або вимірювання ефектів препарату, що швидко проявляються. Недоліки – значна варіабельність дозування внаслідок відмінностей у розмірах тіла мух і кількості спожитої речовини, а також відносно низька пропускна здатність. Препарати, що вводяться цим методом, починають проявляти поведінкові ефекти протягом 10 хвилин; максимальний ефект триває від 15 до 60 хвилин після годування, а повне відновлення настає через 2–5 годин [46].

Другий метод полягає в тому, щоб утримувати мух на кормовому субстраті з лікарським препаратом більше 24 годин. Цей спосіб забезпечує максимальну пропускну здатність і дозволяє вводити препарати великим популяціям. До недоліків можна віднести адаптивні механізми до тривалого впливу: пригнічення та десенсибілізація цільових генів або білків. Якщо мухи видаляються з кормового субстрату до початку тестування, при інтерпретації даних потрібно враховувати метаболізм і швидкість виведення препарату з організму, залежно від методу аналізу [46].

Для підтвердження, що мухи вживали їжу, можна застосовувати автоматизовану кількісну оцінку харчової поведінки (відеокамера записує рухи хоботка дрозоділи під час харчування, програма підраховує кількість таких рухів та визначає кількість спожитої речовини) [24]. Також можна додавати до середовища барвник або радіоактивні мітки для подальшого визначення вжитого матеріалу [13, 59].

1.3.4. Фармакологічні механізми дії карбамазепіну та їх вплив на пристосованість

Карбамазепін – це протиепілептичний препарат, основний ефект якого пов'язаний зі стабілізацією мембран нейронів і зменшенням надмірної електричної активності. Його відкрив хімік Вальтер Шиндлер у 1953 році, а в 1962 р. сполука була випущена на ринок як протисудомний засіб [63].

За хімічною структурою карбамазепін є дибензоазепіном з карбамоїльним замісником біля атома азоту азепіну. Має протисудомну дію, є інгібітором гістондеацетилази, мітогеном, активатором глутаматного транспортера, протиманіакальним засобом, ненаркотичним анальгетиком і блокатором натрієвих каналів. Назва за номенклатурою IUPAC – benzo[b][1]benzazepine-11-carboxamide, молекулярна формула – $C_{15}H_{12}N_2O$. Препарат є кристалічним порошком білого кольору, який є майже нерозчинним у воді, але добре розчиняється в органічних розчинниках (спирті та ацетоні). Температура плавлення становить 190,2 °C [51].

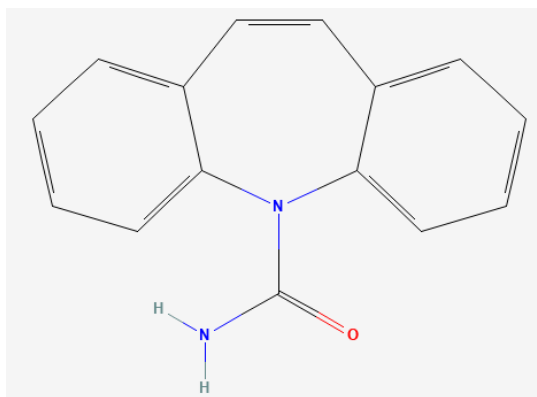


Рис. 1.3. Хімічна структура карбамазепіну

Карбамазепін застосовують при лікуванні епілепсії та болю, пов'язаного з невралгією трійчастого нерва. Засіб ефективний при лікуванні змішаних та парціальних нападів зі складною симптоматикою, генералізованих тоніко-клонічних нападів. Показаний для лікування шизофренії, синдрому гіперактивності з дефіцитом уваги та маніакально-депресивних епізодів, спричинених біполярним розладом. Метаболізується в печінці людини за участі ферменту CYP3A4 та деяких інших (CYP2C8, CYP3A5 і CYP2B6) [51, 63].

Карбамазепін продовжує інактивацію натрієвих каналів, що приводить до зменшення збудливості нейронів та запобігання повторним судомним нападам. Він знижує вивільнення глутамату, що зменшує генерацію патологічних проявів. Ця речовина посилює ГАМК-ергічну активність та модулює роботу кальцієвих каналів, зменшуючи нейрональну збудливість. Тож карбамазепін збільшує рівень гальмівного нейромедіатора ГАМК і знижує рівень збудливого нейромедіатора глутамату. Оскільки карбамазепін хімічно пов'язаний з трициклічними антидепресантами, за високих концентрацій він інгібує зворотне захоплення біогенних амінів [63].

Фармакологічний вплив карбамазепіну складається з двох частин. Постсинаптична дія обмежує здатність нейронів підтримувати високочастотну повторювану активацію потенціалів дії внаслідок посилення інактивації натрієвих каналів. Пресинаптична дія – пригнічення вивільнення нейромедіатора шляхом блокування пресинаптичних натрієвих каналів і

активації потенціалів дії. Причиною таких ефектів є зв'язування з потенціалзалежними натрієвими каналами та перешкоджання поширенню потенціалів дії, що мають стимулювальний вплив на нерви [51].

При біполярному розладі карбамазепін підсилює обмін дофаміну та передачу ГАМК, що приводить до лікування маніакальних і депресивних симптомів. Проблемою є резистентність до цього препарату 30 % пацієнтів з епілепсією, що може бути обумовлено зміною метаболізму організмів з різними варіантами генотипів. Існує потенційна терапевтична мішень для боротьби з резистентністю до карбамазепіну – промотор гена *EPHX1*, який може пригнічувати ефект карбамазепіну шляхом метилювання [51].

До препаратів, що швидше метаболізуються з карбамазепіном, належать ламотриджин, фенітоїн і вальпроєва кислота. Навпаки, еритроміцин, циметидин і блокатори кальцієвих каналів уповільнюють метаболізм карбамазепіну [63].

Карбамазепін може призвести до загострення певних форм епілепсії та генералізованих судомних розладів. «Перенавантаження» деполяризації мембрани завдяки потоку Натрію та невідповідність між інгубуючим та збуджувальним нейротрансмітером спричиняє епілептогенну активність [63].

Препарат впливає на пристосованість дрозоділи. Епілептиформні прояви викликають енергетичне виснаження нейронів, знижують ефективність різних форм поведінки (наприклад, пошук їжі та уникнення небезпеки). Карбамазепін стабілізує активність натрієвих каналів, що зменшує гіперзбудження, знижує смертність та підвищує тривалість життя. Підвищується загальна моторна активність, координація рухів та здатність до польоту. Судоми викликають сильний метаболічний стрес, тож лікарський засіб допомагає знизити енергетичні втрати та направити їх на ріст та репродукцію [17].

Однак, препарат може знижувати пристосованість здорових мух. Знижений транспорт Натрію спричиняє повільну реакцію на небезпеку, седативний ефект та погіршення репродуктивної поведінки (низька швидкість рухів та неправильна частота пісні зменшує вірогідність успішної копуляції) [17].

Розділ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Об'єкт і матеріали дослідження

2.1.1. Характеристика ліній *Drosophila melanogaster*

У якості матеріалу для дослідження були використані дві лінії *Drosophila melanogaster*: мутанти за геном *paralytic* (*para*^{ST76}) та дикий тип *Canton-S*. Мух одержали з «Колекції ліній дрозофіл» біологічного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Обидві лінії походять з Центру розведення *Drosophila* у Блумінгтоні (штат Індіана, США).

para^{ST76} – домінантна мутація, проявом фенотипу є нормальна поведінка за кімнатної температури, індуковані теплом судоми та параліч. Для морфологічної ідентифікації лінія маркована мутацією гена *white*, яка спричиняє білий колір очей. Ген *white* кодує білок, що бере участь у транспорті молекул-попередників пігментів (дрозоптеринів та омахромів), але не впливає на фізіологію мух. Тож фенотип білих очей використовується для маркування фізіологічних ознак, які складно виявити візуально.

У якості контрольного фенотипу використано лінію *Canton-S*. Мухи мають стандартні фізіологічні характеристики (відсутність індукованих теплом порушень поведінки) та морфологічні особливості – рецесивна мутація множинних торакальних і скутеллярних щітинок. Очі червоного кольору. Підтримується в колекції ХНУ ім. Каразіна з 1960-х років.

Для експерименту використовували тільки віргінних особин (для точного визначення віку). Відбір за статтю проводили згідно з морфологічними ознаками: самки більші за розміром, ніж самці (близько 2,5 мм довжиною), задня частина їх тіла темніша. Самці мають шість тергітів (верхні хітинові щитки грудей), самки – вісім. Менша кількість у самців зумовлена злиттям шостого та сьомого тергітів, а восьмий входить до складу статевого апарата. Черевце самки округле та має загострений кінець, у самця – циліндричне,

кінець притуплений, останні сегменти пігментовані. Самки досягають статевої зрілості через 8-10 годин після виходу з пупарія, мають світлий колір тіла.

2.1.2. Опис препарату карбамазепіну

Для дослідження впливу нейроактивних речовин на пристосованість дрозофіли використали препарат «Карбамазепін-Астрафарм», виробник ТОВ «АСТРАФАРМ», Україна. Лікарська форма: круглі таблетки білого кольору з двоопуклою поверхнею та рискою з одного боку. Склад: карбамазепін (діюча речовина, 200 мг у кожній таблетці), целюлоза мікрокристалічна, повідон, магнію стеарат, натрію кроскармелоза. Фармакологічна група: протиепілептичні засоби, код АТХ N03A F01.

Початкова концентрація діючої речовини (карбамазепіну) в таблетках становить 200 мг. Препарат суспендували з розчинником для отримання фінальної концентрації 3,0 мкмоль/л та 0,3 мкмоль/л згідно зі стандартами пілотних скринінгів тестування ліків на *Drosophila* [46].

Карбамазепін належить до речовин, які майже не розчиняються у воді, тому використали етиловий спирт у якості розчинника. Етиловий спирт може впливати на фізіологію дрозофіли [45], тож під час проведення дослідів використано такі варіанти розчинів з відповідною концентрацією нейроактивної речовини:

- спиртовий розчин 3,0 мкмоль/л;
- спиртовий розчин 0,3 мкмоль/л;
- водний розчин 3,0 мкмоль/л;
- водний розчин 0,3 мкмоль/л.

Мух розподіляли по пробірках з різними варіантами розчину випадковим чином.

2.2. Методи дослідження

2.2.1. Поведінкові реакції

Досліджувані лінії мух утримували в пробірках на стандартному цукрово-дріжджовому середовищі за температури 25 °С. Розподіл імаго за статтю проводили у першу добу після виходу з пупарія.

Відбирали віргінних мух, проводили розподіл за статтю, потім переміщали в нові пробірки, при цьому самок і самців поміщали окремо. У кожній пробірці містилося не більше 25 особин. Для наркотизації використовували діетиловий ефір. Смертність реєструвалася кожні 1-3 дні.

Для з'ясування впливу нейроактивної речовини мух поміщали у пробірки з фільтрувальним папером, просоченим розчином карбамазепіну. Лікування проводили кожні три дні (дві доби мухи перебували на стандартному середовищі, третю добу – у пробірці з препаратом). Виділили групи дослідних особин, яких годували спиртовими або водними розчинами з концентраціями карбамазепіну 3,0 мкмоль/л та 0,3 мкмоль/л. У якості контролю мух поміщали на фільтри, просочені спиртом та водою.

Аналіз особливостей поведінкових реакцій на температурний стрес проводили за допомогою водяної бані. Мух переносили в пробірки без середовища, не використовуючи наркотизацію, після чого їх поміщали у водяну баню за температури 37 °С – це найнижча температура, яка викликала явну судомну поведінку у мутантних мух протягом 2-хвилинного випробувального періоду. Спостерігали за станом особин та фіксували час появи індукованих теплом судом і паралічу. Після цього мух поміщали в умови з нормальною температурою (25 °С) та реєстрували час, протягом якого відбувалися зміни стану (відновлення) активності мух. Дослід проводили кожні три дні для визначення динаміки поведінкових змін у часі залежно від віку особин.

2.2.2. Плодючість та співвідношення статей

Для визначення співвідношення статей відбирали статеві незрілих (віргінних) самок та молодих самців. Мух розсаджували у стандартні пробірки зі свіжим цукрово-дріжджовим середовищем. У кожену пробірку поміщали контрольовану кількість батьківських особин (5 пар) і витримували 48 годин для відкладання яєць. Пробірки інкубували при температурі 25 °С до виходу дорослих особин.

Протягом першої доби після виходу імаго проводили відбір та сортування нащадків за статтю. У самців помітні темні статеві гребінці та округлий задній край черевця, у самок – світла анальна пластинка та витягнуте черевце. Для розрахунку співвідношення статей застосували критерій χ^2 Пірсона [1].

2.2.3. Тест на ембріональну та лялечкову смертність

У батьківських статевих клітинах можуть відбуватись домінантні летальні мутації (ДЛМ), які спричиняють загибель першого покоління потомства. Такі генетичні зміни проявляються на ембріональному або постембріональному етапах онтогенезу (яйця та лялечки відповідно). Показником рівня ДЛМ є частота постембріональних втрат, яка оцінювалася за формулою:

$$ДЛМ = ЗЛ / (ЖЛ + ЗЛ) \times 100\% ,$$

де $ЗЛ$ – кількість загиблих лялечок;

$ЖЛ$ – кількість живих лялечок [3].

Після відбору за статтю самців і віргінних самок поміщали в окремі пробірки (співвідношення 1:1) та культивували в термостаті за температури 24 °С протягом 8-10 діб. Використано 5 батьківських пар, 10 пробірок.

Після виходу личинок з яйця на стінках пробірок спостерігається утворення лялечок. Якщо з них виходять імаго, зберігається пуста прозора оболонка; а загиблі темні непрозорі лялечки залишаються на стінках. Після закінчення виходу дорослих особин рахували кількість загиблих лялечок. Проаналізовано 1385 лялечок, з них 246 загиблих.

Для визначення частки загиблих яєць встановили критерій ранньої летальності: зупинка розвитку в перші 9 годин після відкладання (ранні леталі, яйця білого кольору) або загибель у пізніші терміни (пізні леталі, жовті або коричневі яйця) [3]. Проаналізовано 272 відкладених яйця, з них ранніх леталей 51 шт., пізніх леталей – 5 шт.

2.2.4. Виділення ДНК

Для отримання даних про наявність симбіонтів та мобільних генетичних елементів *Drosophila melanogaster* виділили ДНК з ліній *para^{ST76}* та *Canton-S*; провели полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) для ампліфікації генетичного матеріалу та електрофорез в агарозному гелі для виявлення бактерій та *hobo*-елемента.

Метод виділення геномної ДНК передбачає руйнування мембран та інших компонентів клітини, вивільнення нуклеїнових кислот та їхній захист від деградації. Для цього додають лізис-буфер, який містить ферменти для денатурації клітинних білків і стабілізації ДНК. Протокол методики:

1. У кілька пробірок об'ємом 1,5 мл помістили по одній мертвій особині *D. melanogaster*, подрібнили з використанням скляної палички, додали 600 мкл лізис-буферу (*Lysing soln.*), нагрітого до 65 °С, та перемішали вміст пробірок перегортанням.

2. Термостатували кожну пробірку 10 хв. за температури 65 °С.

3. Додали 20 мкл суспензії сорбенту *NeoSorb (W)* і збовтали протягом 5 хв. Попередньо сорбент перемішали на вортексі.

4. Центрифугували пробірку 10 секунд при 5000 g.

5. Видалили супернатант вакуумним відсмоктувачем, не зачіпаючи осад.

6. Додали 300 мкл *Lysing soln.* і перемішали на вортексі.

7. Додали 1 мл сольового буферу (*Buffer soln.*) та перемішали. Повторили пункти 4 і 5.

8. Повторили пункт 7.

9. Підсушили осад в термостаті за 65 °С протягом 5 хв.

10. Додали 100 мкл буферу для елюції ДНК (*ExtraDNA soln.*) та перемішали вміст пробірки на вортексі. Повторити пункт 9.

11. Центрифугували 1 хв. при 10000 g.

12. 80-90 мкл чистого супернатанту з ДНК використали для ПЛР.

Генетичний матеріал можна зберігати за температури 4 °С; виділена ДНК є високомолекулярною (40-50 тис. п. н.).

2.2.5. Полімеразна ланцюгова реакція

ПЛР – це метод *in vitro* ампліфікації (багаторазового копіювання) певної ділянки ДНК з використанням термостабільної ДНК-полімерази. У ході виконання роботи використано два набори реакційних сумішей (10 пробірок для виявлення бактерії *Wolbachia* та 10 пробірок для виявлення транспозона *hobo*). У кожену пробірку додавали по 1,5 мкл двох специфічних праймерів, 10 мкл розчину для ПЛР (чотири дезоксирибонуклеотиди, ДНК-полімераза, буферний розчин) та 10 мкл зразка генетичного матеріалу дрозофіли.

Методика проведення реакції:

1. Денатурація ДНК за температури 94 – 96 °С;

2. Annealing або віджигання праймерів при 50 °С – приєднання праймерів (короткі синтетичні фрагменти ДНК, які обмежують ампліфіковану ділянку та визначають специфічність реакції);

3. Елонгація – синтез нового комплементарного ланцюга у напрямку 5' → 3' за допомогою термостабільної ДНК-полімерази *Taq* при 70 °С (оптимальна температура для активності ферменту).

4. Використання ампліфікатора для наступних циклів ПЛР (нагрівання суміші до 95 °С з подальшим охолодженням до 60 °С).

Для проведення ампліфікації використали набір реагентів Genpак PCR Core, об'єм реакційної суміші – 20 мкл. Параметри ПЛР: денатурація – 94 °С

протягом 3 хвилин; відпал праймерів 54 °C 30 секунд; синтез ДНК 72 °C, 1 хвилина; елонгація 72 °C, 5 хвилин; 35 циклів. Праймери для визначення *Wolbachia*:

- dW16S-R 5'-AGCTTCGAGTGAACCCAATTC-3';
- dW16S-F 5'-CATACCTATTCGAAGGGATAG-3'.

Праймери для визначення *hobo*:

- hobo-R 5'-CTATTGCGAGTTGTTTAG-3';
- hobo-F 5'-GCGCCATACATAATGATTG-3'.

Результати ПЛР використано для візуалізації продуктів на гелі та встановлення наявності досліджуваних послідовностей.

2.2.6. Електрофорез

Для розділення молекул в електричному полі за розміром і зарядом застосували електрофорез. Метод дозволяє оцінити наявність фрагментів певної довжини та визначити наявність специфічного генетичного матеріалу (наприклад, ДНК симбіонтів та *hobo*-елемента).

Продукти ампліфікації розділяли в агарозному гелі (2 %) з бромистим етидієм. Суміш буферу (90 мл) та агарози (1800 мг) доводили до кипіння та залишали вистигати до 65 °C, а потім додавали 200 мкл бромистого етидію (флуоресцентний барвник для візуалізації результатів). Далі поміщали в рівну прямокутну форму для застигання та залишали на 15 хвилин. Гелеву пластину переносили в камеру для електрофорезу та заповнювали буфером 1xTBE. У лунки додавали продукти ампліфікації ДНК і 7 мкл маркера молекулярної маси (2 мкл *GeneRuler Express DNA Ladder*, 1 мкл *TriTrack* та 4 мкл води).

Після цього проводили електрофорез (параметри: 120 V, 100 A, 40 хв.). Результати аналізували з використанням трансільюмінатора (в ультрафіолетовому світлі) та фотографували на камеру мобільного телефону. Світіння фрагментів певної довжини означало наявність досліджуваного

фрагменту. Розміри таких фрагментів порівнювали з маркерами молекулярної маси *GeneRuler Express DNA Ladder* (рис. 3.1) та присутність шуканих ділянок.

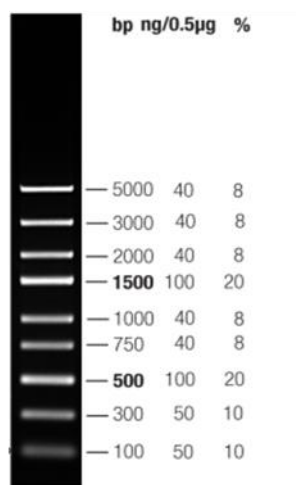


Рис. 2.1. Маркери *GeneRuler Express DNA Ladder*

2.2.7. Побудови моделі білка потенціал-залежного натрієвого каналу

Білкова послідовність Sodium channel protein para була отримана з бази даних Uniprot (Swiss-Prot, P35500 • SCNA_DROME). Для визначення фізико-хімічних властивостей білку використано інструмент ProtParam за адресою

<https://www.expasy.org/resources/protparam> [21].

Для встановлення вторинної структури білка використано метод самооптимізованого прогнозування з вирівнюванням (SOPMA) [11]:

https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html

Передбачення трансмембранних областей білку здійснено за допомогою сервера TMHMM: <https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM> [26].

DeepTMHMM є методом прогнозування топології альфа-спіральних та бета-структурних трансмембранних білків. Модель кодує первинну амінокислотну послідовність за допомогою попередньо навченої мовної моделі та декодує топологію за допомогою моделі простору станів точного прогнозування. Ресурс дозволяє сканувати повні протеоми для виявлення трансмембранних білків [26].

Функціональні домени білка передбачені завдяки Pfam та InterPro: <https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/> або <https://www.ebi.ac.uk/interpro/result/InterProScan/iprscan5-R20240130-181506-0771-43824384-p1m/> [49].

Для побудови моделі білка Sodium channel protein *para* використано інтегрований сервер прогнозування структури та функцій IntFOLD (версія 7.0) за адресою:

https://www.reading.ac.uk/bioinf/IntFOLD/IntFOLD7_form.html [54].

Цей сервер дозволяє прогнозувати третинні структури, оцінювати якість 3D-моделей, виявляти невідповідності області, прогнозувати межі структурних доменів та ймовірні залишки сайту зв'язування ліганду для представленої амінокислотної послідовності [54]. Сервер MultiFOLD забезпечує:

- передбачення третинної та четвертинної структури білків;
- інтегровані прогнози якості глобальних і локальних моделей;
- інтерактивні 3D-зображення прогнозованих мультимерних збірок, які можна розфарбовувати залежно від ідентифікатора ланцюга [34, 39, 40, 54].

Інструмент генерує прогнозовану оцінку точності для кожного амінокислотного залишку в діапазоні від 0 до 100, вищі оцінки вказують на кращий прогноз для кожного залишку. Показник pI-DDT використовується як силова константа, яку потрібно помножити на слабкі позиційні гармонійні обмеження ($0,05 \text{ ккал/моль/Å}^2$) для кожного залишку [54].

2.2.8. Статистичний аналіз результатів

Отримані в ході експерименту дані були проаналізовані за допомогою методів статистики.

Для виявлення ембріональної смертності *para*^{ST76} визначили загальну кількість леталей у перші 9 – 10 годин після початку розвитку та в пізніші терміни. Визначили відсоток кожного виду леталей і довірчий інтервал вибіркової частки.

У ході дослідження плодючості *para*^{ST76} рахували середню кількість самок та самців у кожній пробірці, стандартне відхилення, стандартну похибку та довірчі інтервали. Для встановлення співвідношення статей у потомстві застосували критерій χ^2 Пірсона за формулою:

$$\chi^2 = \frac{(O - E)^2}{E},$$

де O – фактична (спостережувана) кількість особин; E – очікувана кількість особин [1].

Для розрахунку лялечкової смертності визначили відсоток мертвих лялечок від загальної кількості лялечок. Далі розраховували довірчий інтервал вибіркової частки за допомогою онлайн-калькулятора:

<https://epitools.ausvet.com.au/ciproportion>

Під час тесту на температурну чутливість (за нормальних умов та після годування карбамазепіном) підраховували кількість мух відповідно до генотипу та статі. Для оцінки часу впадання та виходу з температурного шоку, часу появи судомних посмикувань обчислювали середнє арифметичне та статистичну похибку середнього арифметичного. Порівняння середніх арифметичних проводили за допомогою дисперсійного аналізу кількісних ознак. Для розрахунку показника кореляції використовували критерій Пірсона. Для статистичного аналізу та побудови діаграм використали програму Microsoft Excel 2007.

Розділ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Аналіз і моделювання структури білка Sodium channel protein para

Білкова послідовність Sodium channel protein para була отримана з бази даних Uniprot (Swiss-Prot, P35500 · SCNA_DROME).

За допомогою інструмента ProtParam визначено фізико-хімічні властивості білка натрієвого каналу. Білок складається з 2131 амінокислот, загальна молекулярна маса – 239362.21, теоретична pI становить 5.01 (ізоелектрична точка – рН розчину, за якого сумарний заряд білка дорівнює нулю). Кількість негативно заряджених амінокислотних залишків (Asp+Glu) становить 279 шт., кількість позитивно заряджених залишків (Arg+Lys) – 200. Загальний амінокислотний склад білку наведено у таблиці 1.

Хімічна формула $C_{10795}H_{16668}N_{2784}O_{3157}S_{106}$. Період напіврозпаду становить 10-30 годин. Індекс нестабільності 41.10, аліфатичний індекс 90.25, середнє значення гідропатичності (GRAVY) становить -0.047.

Отриманий результат знаходиться за адресою <https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam1?P35500@1-2131@>

Назва амінокислоти (скорочена)	Загальна кількість амінокислот	Відсоток амінокислоти в послідовності
Ala (A)	163	7.6%
Arg (R)	92	4.3%
Asn (N)	93	4.4%
Asp (D)	142	6.7%
Cys (C)	35	1.6%
Gln (Q)	63	3.0%
Glu (E)	137	6.4%
Gly (G)	145	6.8%

His (H)	39	1.8%
Ile (I)	158	7.4%
Leu (L)	190	8.9%
Lys (K)	108	5.1%
Met (M)	71	3.3%
Phe (F)	125	5.9%
Pro (P)	85	4.0%
Ser (S)	135	6.3%
Thr (T)	105	4.9%
Trp (W)	35	1.6%
Tyr (Y)	71	3.3%
Val (V)	139	6.5%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

Таблиця 3.1. Амінокислотний склад білку Sodium channel protein para

Для встановлення вторинної структури білка використано метод самооптимізованого прогнозування з вирівнюванням (SOPMA). Білок на 44.81 % складається з альфа-спіралей, на 4.13 % з бета-структур та на 37.49 % з випадкових скручувань. Візуалізація результатів наведена на рисунку 3.1.

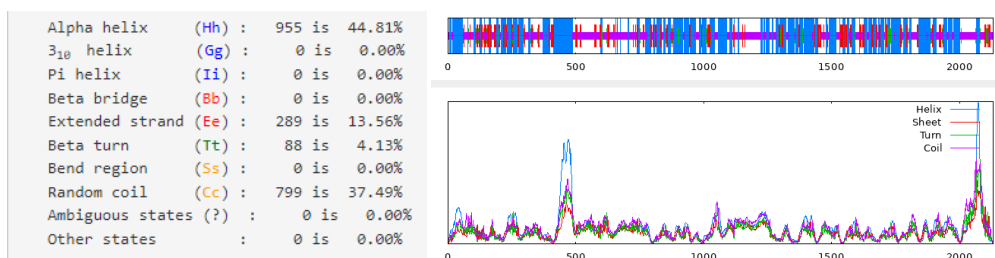


Рис. 3.1. Результат аналізу вторинної структури білку Sodium channel protein para

Для передбачення трансмембранних областей білка використано сервер ТМНММ. Більша частина білка займає трансмембранне положення, що зумовлене його функцією – транспортом іонів Натрію. Білок містить чотири гомологічні домени, кожен з яких складається з кількох α -спіральних трансмембранних сегментів. Частини білку на внутрішній (цитоплазматичній) стороні мембрани поєднують окремі домени між собою. Найменшою частиною білка є області на зовнішній стороні мембрани, положення їхніх амінокислот встановлено з меншою імовірністю порівняно з іншими ділянками. Результат аналізу зображено на рисунку 3.2.

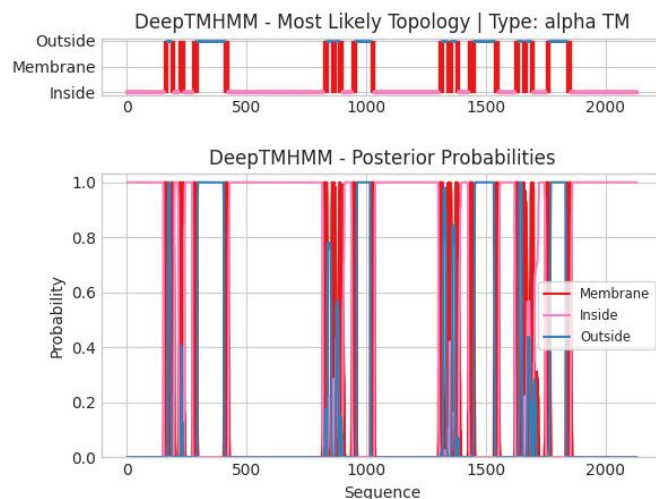


Рис. 3.2. Передбачення трансмембранного положення та топології білка
Sodium channel protein para

Функціональні домени білка передбачені з використанням бази даних Pfam та InterPro. Sodium channel protein para належить до родини потенціал залежних катіонних каналів-переносників Натрію та Кальцію. На рисунку 3.3 показані домени транспорту іонів, особливості виконуваних ними функцій та гомологи білка.

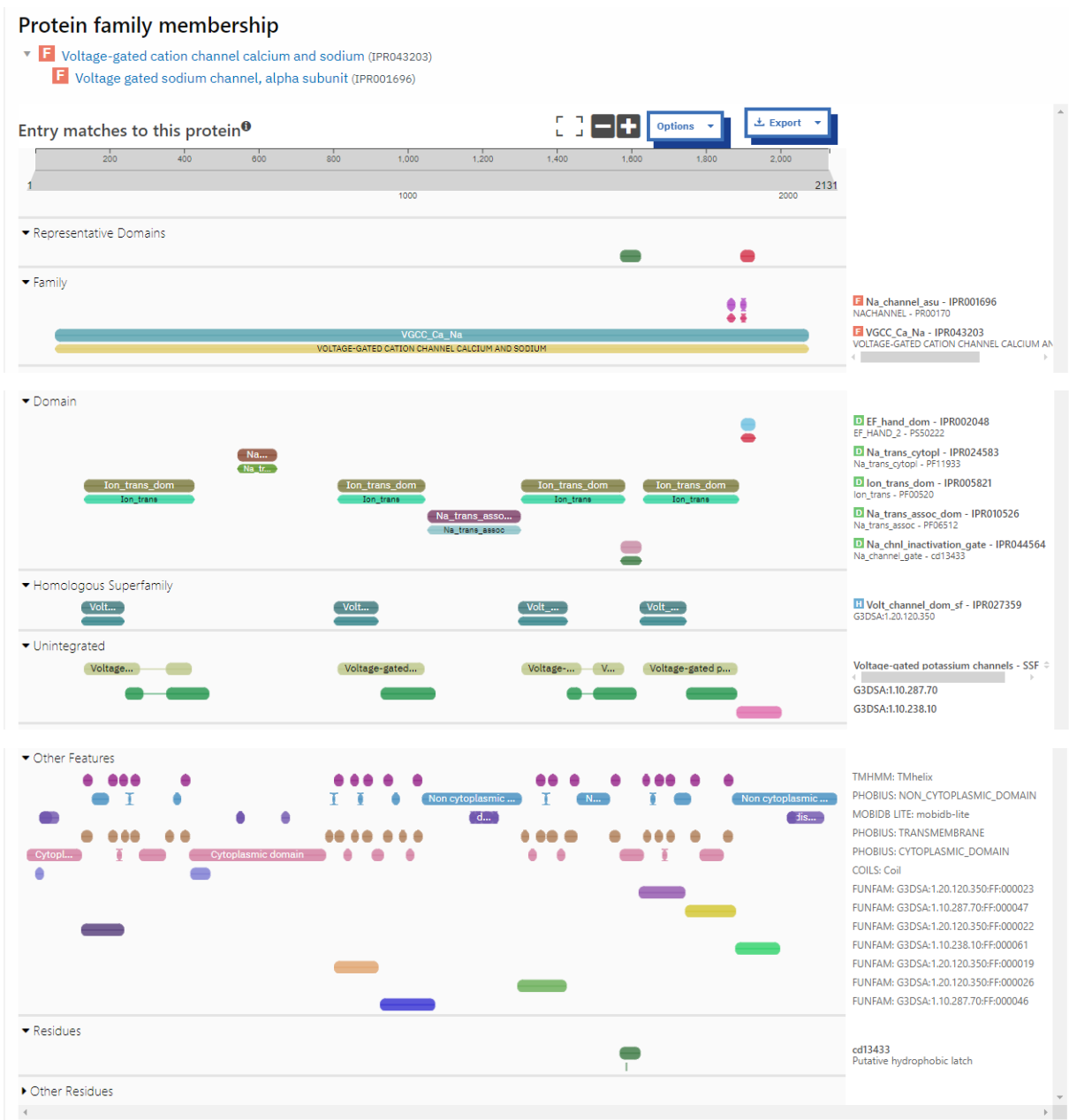


Рис. 3.3. Аналіз функціональних доменів білка Sodium channel protein para

Для побудови моделі Sodium channel protein para використано інтегрований сервер прогнозування структури та функцій білка IntFOLD. Отримано передбачення третинної та четвертинної структури білка та інтерактивні 3D-зображення прогнозованих мультимерних збірок, які можна розфарбовувати залежно від ланцюга чи точності прогнозованих даних (рис. 3.4).

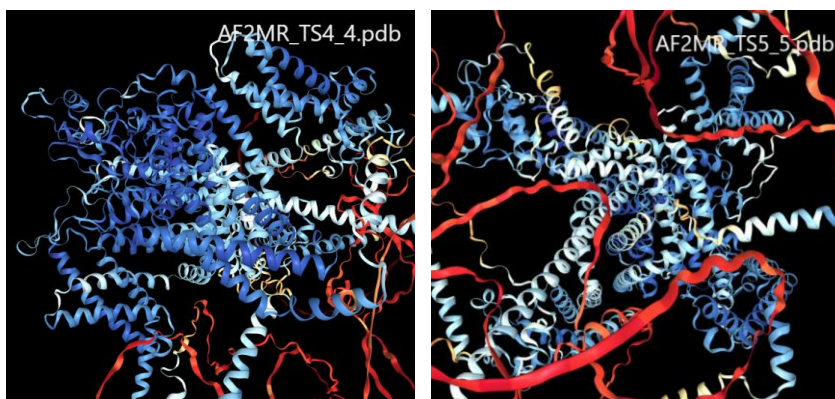


Рис. 3.4. Моделі білку Sodium channel protein para

3.2. Реакція *para*^{ST76} на температурний стрес

3.2.1. Час появи паралічу

Проаналізували температурну чутливість та появу ознак паралічу у самців і самок мутантного та дикого фенотипу протягом 30 днів (табл. 3.2). Температура, за якої проводили дослід, становила 37 °C.

Через 20 – 30 секунд (або 0,3 – 0,5 хв.) помітно знижується активність усіх особин, вони скупчуються у нижній частині пробірки, а окремі мухи переміщуються короткими «стрибками». Більшість особин (і самки, і самці) «засинає» (тобто, спостерігається параліч) після 1,42 хв. та 5,50 хв. відповідно, але окремі особини «засинають» довго, що впливає на середній час, отриманий у ході дослідів. Періодично спостерігається «прокидання» – різко збільшується активність особин, вони активно переміщуються по пробірці (повзають, але не літають). Менші за розміром особини засинають раніше, ніж великі, незалежно від віку та статі.

Ознакою паралічу окремої особини вважали повну нерухомість протягом 7 – 10 секунд. За такого стану кінцівки розташовані не під прямим кутом до тіла (як у мертвих особин), крила притиснуті до спини, мухи залишаються у «сидячому» положенні, не перегортаючись на спину.

Після аналізу отриманих даних підсумували результати (рис. 7):

- у *para^{ST76}* самки мають більшу чутливість до високої температури, ніж самці, середній час початку паралічу становить $4,58 \pm 1,63$ хв. Дисперсія за часом зумовлена тим, що особини поступово втрачають стійкість до впливу високої температури та стають більш чутливими, тож з віком мух зменшується час до початку паралічу. Середній час початку паралічу самців у *para^{ST76}* становить $5,62 \pm 1,96$ хв.
- у особин *Canton-S* більша чутливість до температури спостерігалася у самців, середній час початку паралічу становить $6,35 \pm 2,20$ хв. Самки є більш стійкими, середній час початку паралічу становить $8,11 \pm 2,43$ хв.
- самки та самці *para^{ST76}* більш чутливі до ознак температурного шоку, ніж самки та самці *Canton-S*.

Результати *t*-критерію Стьюдента показують, що статистично значущої різниці між часом появи паралічу самок і самців не виявлено ($p < 0,05$).

Отримані результати підтверджують, що мутація *para^{ST76}* впливає на роботу білкових натрієвих каналів, на функціонування нервової системи та швидкість поширення нервового імпульсу. У мутантів спостерігається часткова втрата функції білку – натрієвий канал оборотно втрачає здатність транспортувати йони Натрію, що призводить до зменшення часу появи ознак паралічу та збільшення чутливості до впливу високої температури.

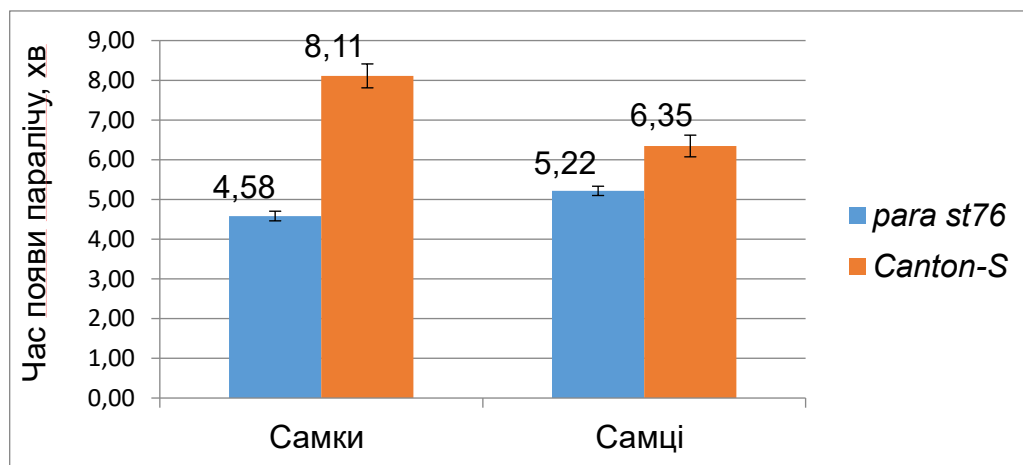


Рис. 3.5. Порівняння часу початку паралічу у мутантів *para^{ST76}* та особин дикого типу *Canton-S* під впливом температури 37 °C

	SS	D. F	MS	F	p	Partial eta-squared	Non-centrality	Observed power (alpha=0,05)
genotype	523,76	1	523,76	158,70	0,001	0,25	158,70	1,00
sex	30,85	1	30,85	9,35	0,002	0,02	9,35	0,86
genotype* sex	138,85	1	138,85	42,07	0,001	0,08	42,07	0,99
Неконт-рольовані ефекти	1610,52	488	3,30					

Таблиця 3.2. Результати дисперсійного аналізу для часу початку паралічу

3.2.2. Порівняння часу появи судом

Через деякий час після поміщення мух на водяну баню під впливом температури спостерігаються судомні посмикування задніх кінцівок і крил. Мухи тимчасово втрачають здатність рухатися, падають на дно пробірки та залишаються в цьому стані деякий час, після чого рухова активність відновлюється. Такий «напад» триває 3 – 4 секунди для крил та 5-7 секунд для кінцівок незалежно від статі та віку. Після закінчення судом особини залишаються нерухомими протягом 1 – 2 секунд, далі відновлюється рухова активність м'язів кінцівок (мухи починають терти кінцівки одна об одну, торкатися антен і крил). Через 2-3 секунди відновлюється активність м'язів крил, мухи починають літати.

У *para*^{ST76} самки мають більшу чутливість до високої температури, ніж самці. Середній час початку судом у самок становить $0,55 \pm 0,21$ хв., у самців – $0,72 \pm 0,22$ хв. У особин *Canton-S* більша чутливість до температури спостерігалася у самців. Середній час початку судом у них становить $3,79 \pm 1,57$ хв., у самок – $4,81 \pm 1,82$ хв. Самки та самці *para*^{ST76} є набагато чутливішими до ознак температурного шоку, ніж самки та самці *Canton-S*. На рис. 3.6 та в табл. 3.3 показані результати.

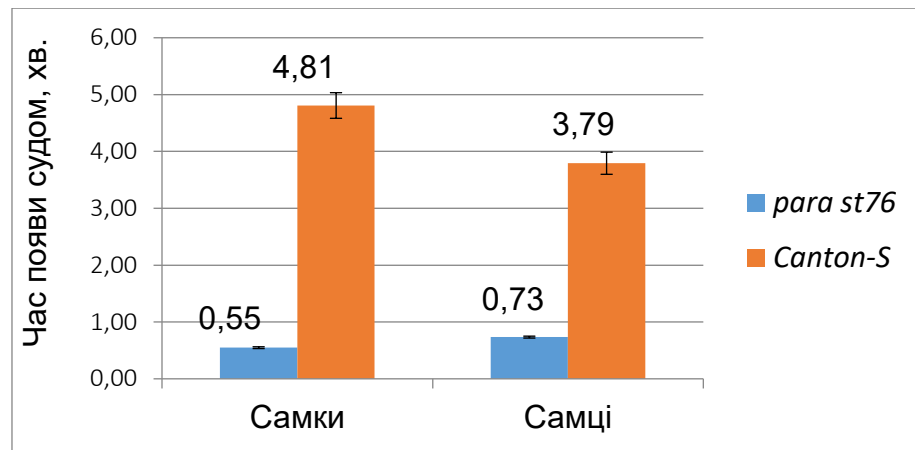


Рис. 3.6. Порівняння часу прояву судом під впливом високої температури у мутантів *para^{ST76}* та особин дикого типу *Canton-S*

	SS	D. F	MS	F	p	Partial eta-squared	Non-centrality	Observed power (alpha=0,05)
Intercept	2358,40	1	2358,44	2930,25	0,001	0,86	2930,25	1,00
genotype	1293,40	1	1293,41	1607,02	0,001	0,78	1607,02	1,00
sex	16,59	1	16,60	20,61	0,001	0,04	20,61	0,99
genotype*sex	34,87	1	34,87	43,32	0,001	0,08	43,32	0,99
Неконтрольовані ефекти	392,77	488	0,81					

Таблиця 3.3. Результати дисперсійного аналізу для часу початку судом

3.2.3. Порівняння часу виходу з теплового шоку

Після закінчення досліду для виявлення ознак температурної чутливості, пробірки прибирали з водяної бані. Через деякий час відновлювалася рухова активність м'язів (спочатку кінцівок, потім крил). На час відновлення активності нервової системи впливає механічний стрес – при струшуванні пробірки мухи вдаряються об скляні стінки пробірки та швидше «прокидаються». Тож у ході проведення експерименту уникали надмірного випадкового струшування пробірок для запобігання спотворення результатів.

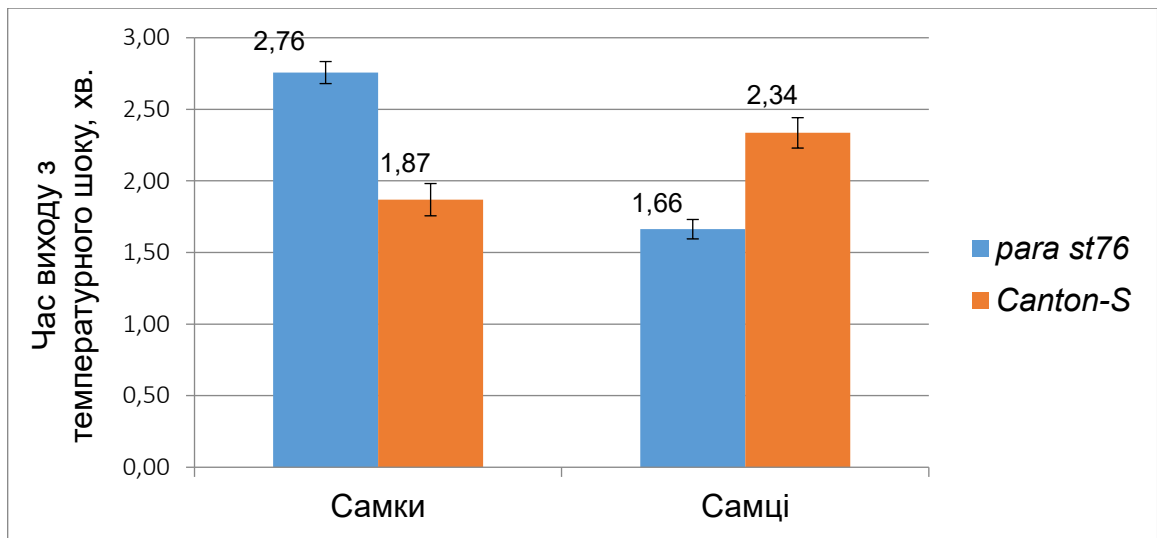


Рис. 3.7. Порівняння часу виходу з температурного шоку мутантів *para*^{ST76} та особин дикого типу *Canton-S*

Самки *para*^{ST76} швидше виходили з температурного шоку, ніж самці. Для самок середній час «пробудження» становить $2,76 \pm 1,03$ хв., для самців – $1,66 \pm 0,91$ хв (рис. 3.7). Для *Canton-S* спостерігався інший результат: швидше «прокидаються» самці, середній час виходу з температурного шоку становить $2,34 \pm 0,85$ хв., у самок – $1,87 \pm 0,91$ хв. Значні відмінності у часі виходу з температурного шоку між різними групами не спостерігалися (табл. 3.4.).

	SS	D. F.	MS	F	p	Partial eta-squared	Non-centrality	Observed power (alpha=0,05)
Intercept	1795,97	1	1795,97	1998,78	0,001	0,80	1998,78	1,00
genotype	1,12	1	1,12	1,24	0,266	0,003	1,24	0,19
sex	9,50	1	9,50	10,58	0,001	0,02	10,58	0,90
genotype*sex	58,83	1	58,83	65,48	0,001	0,12	65,48	1,00
Неконтрольовані ефекти	438,48	488	0,90					

Таблиця 3.4. Результати дисперсійного аналізу для часу виходу з температурного шоку

3.2.4. Залежність чутливості до температурного шоку від віку особин

У ході проведення дослідів спостерігали зменшення часу початку паралічу залежно від віку мух. Тож дослідили динаміку появи ознак температурного шоку особин у часі. Для самок лінії *para^{ST76}* (рис. 3.8) встановлена позитивна кореляція ($r = 0,65$; $p < 0,05$) між часом появи ознак температурного шоку та віком. Особини, які доживають до більшого віку, демонструють менший поріг чутливості до підвищеної температури.

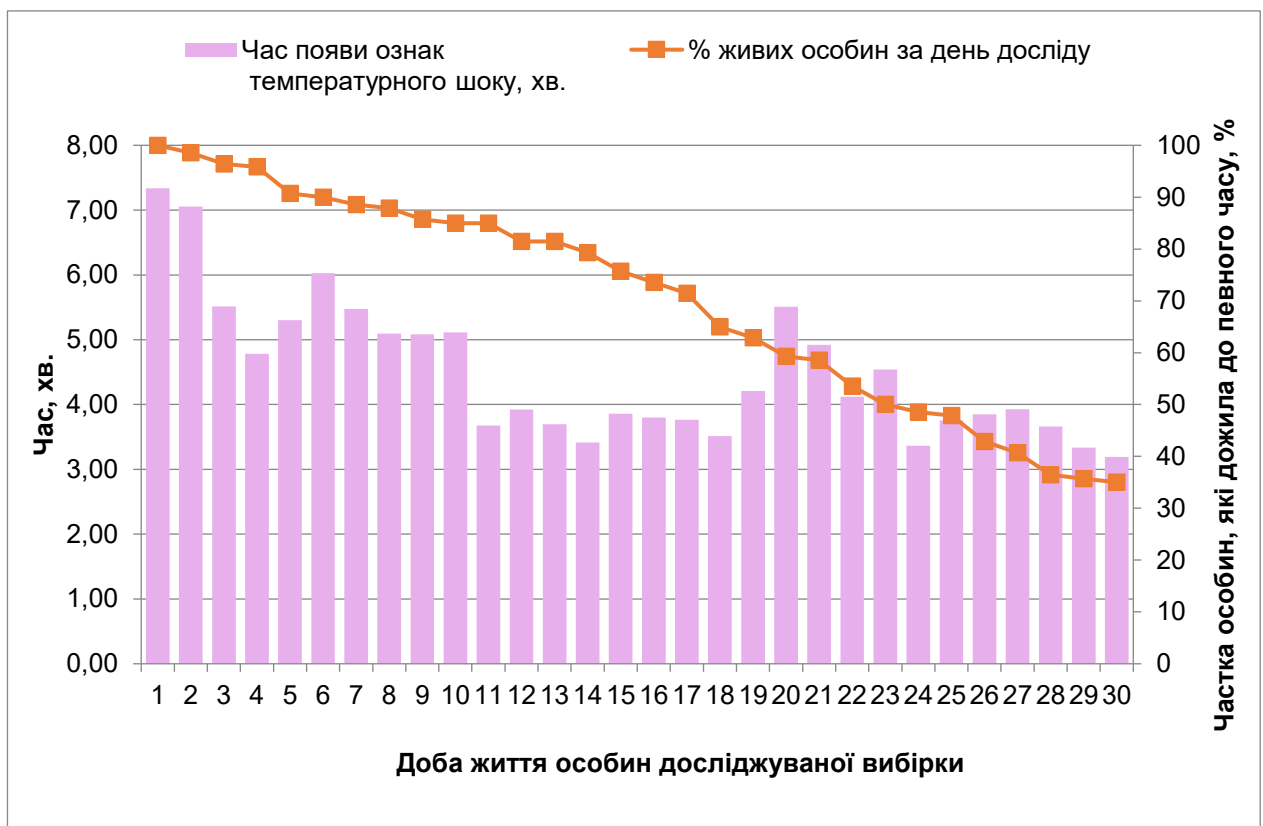


Рис. 3.8. Залежність чутливості до температурного шоку від віку самок лінії *para^{ST76}*

Аналогічний результат спостерігається для самців лінії *para^{ST76}* (рис. 3.9). Наявна позитивна кореляція ($r = 0,70$; $p < 0,05$) між часом появи ознак температурного шоку та віком.

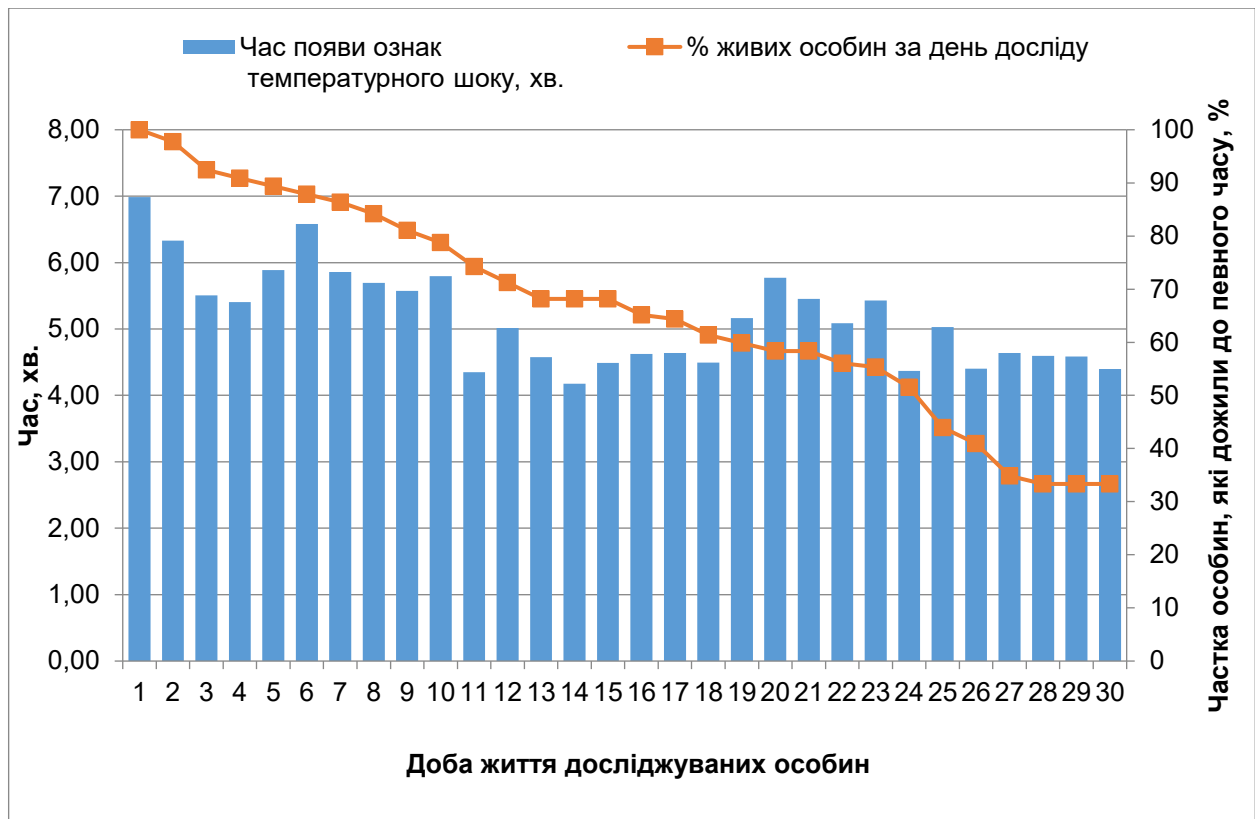


Рис. 3.9. Залежність чутливості до температурного шоку від віку самців лінії *para*^{ST76}

Подібну паралельність змін можна трактувати з різних боків. Якщо розглядати ефект зниження порогу чутливості при щоденному піддаванні особин впливу, то це може бути проявом адаптації особин (внаслідок періодичного впливу температурного шоку змінюється швидкість проведення нервового імпульсу, що виражається в зменшенні часу початку паралічу), або наслідком загибелі частини особин з більшим порогом чутливості. З'ясування деталей можна розглядати як одну з перспектив продовження даного дослідження.

Схожий результат спостерігається для самок та самців лінії *Canton-S* (рис. 3.10, рис. 3.11). Наявна позитивна кореляція (для самок $r = 0,60$; $p < 0,05$; для самців $r = 0,60$; $p < 0,05$) між часом появи ознак температурного шоку та віком.

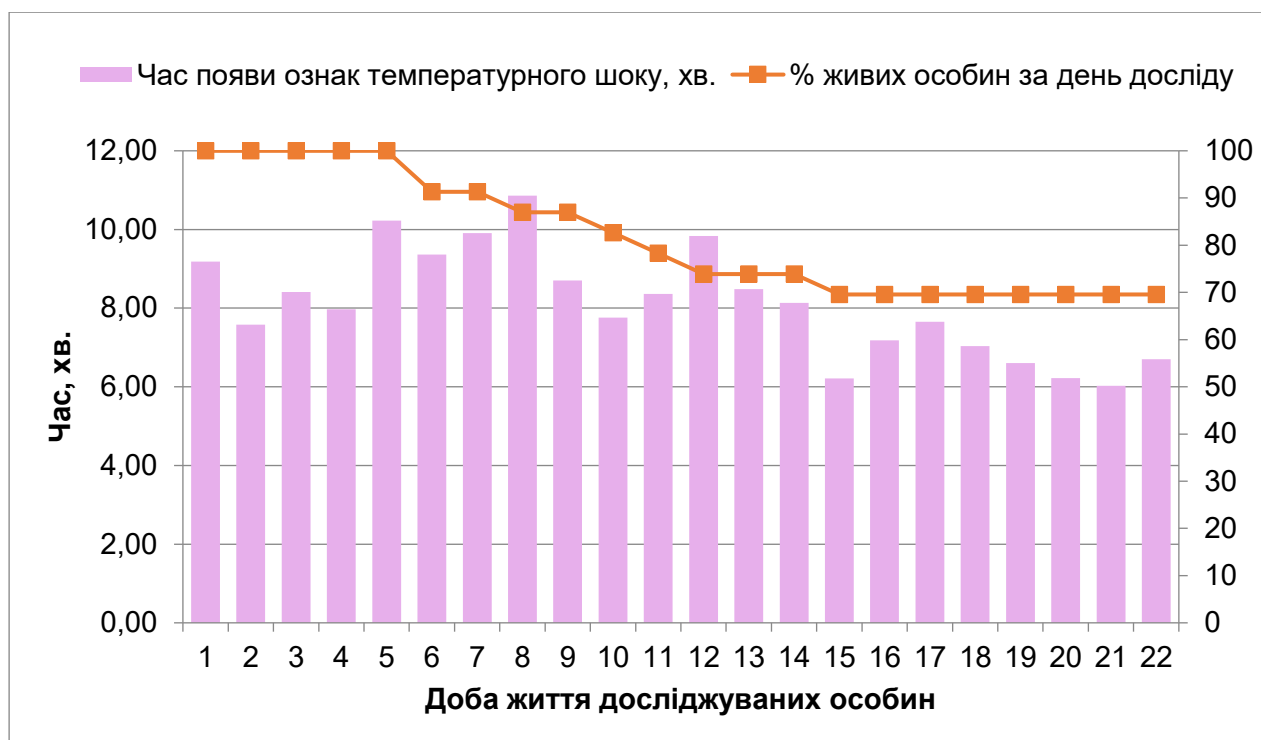


Рис. 3.10. Залежність чутливості до температурного шоку від віку самок лінії *Canton-S*

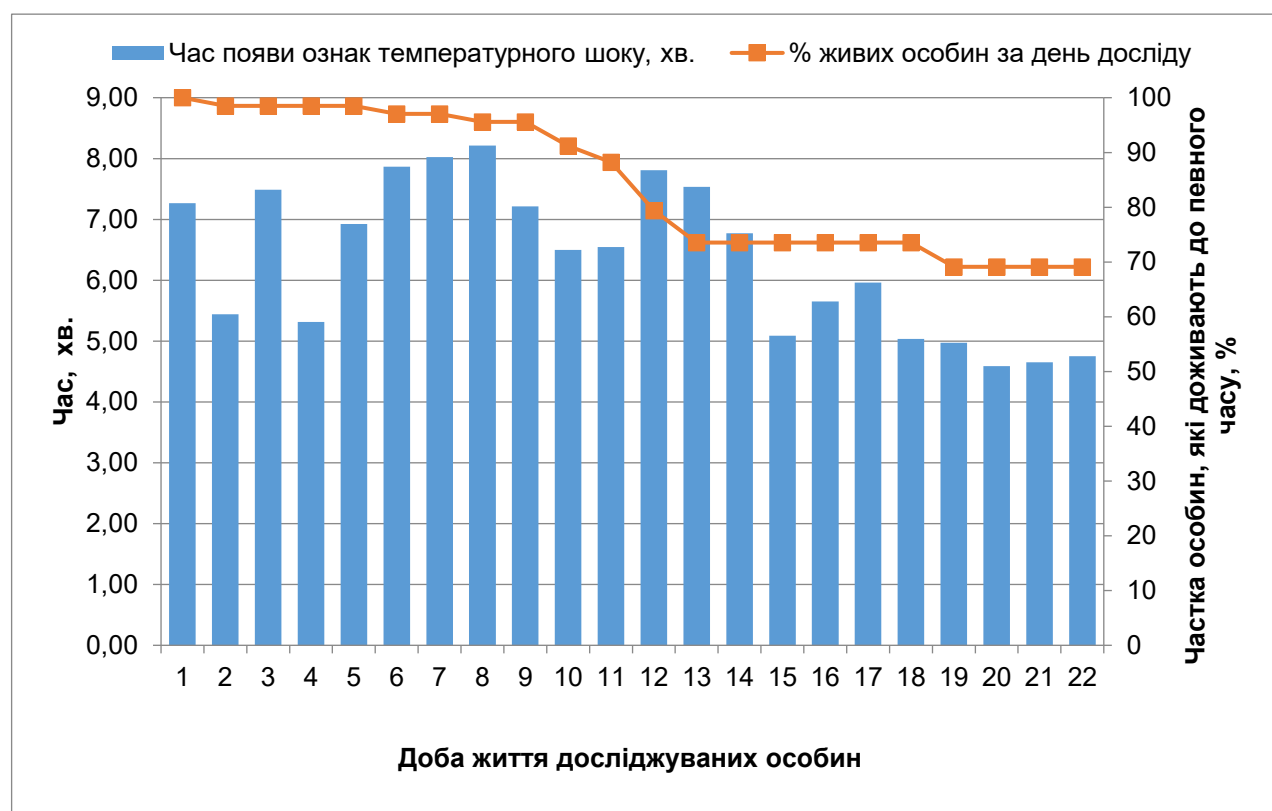


Рис. 3.11. Залежність чутливості до температурного шоку від віку самців лінії *Canton-S*

3.2.5. Залежність часу виходу з температурного шоку від віку особин

Дослідили динаміку виходу мух з теплового шоку. Залежність часу виходу від віку не встановлено для лінії *para*^{ST76} (самки $r = 0,25$; $p > 0,05$; самці $r = -0,01$; $p > 0,05$) та для *Canton-S* (самки $r = -0,30$; $p > 0,05$; самці $r = -0,13$; $p > 0,05$), середній час зникнення ознак паралічу не відрізняється (рис. 3.12).

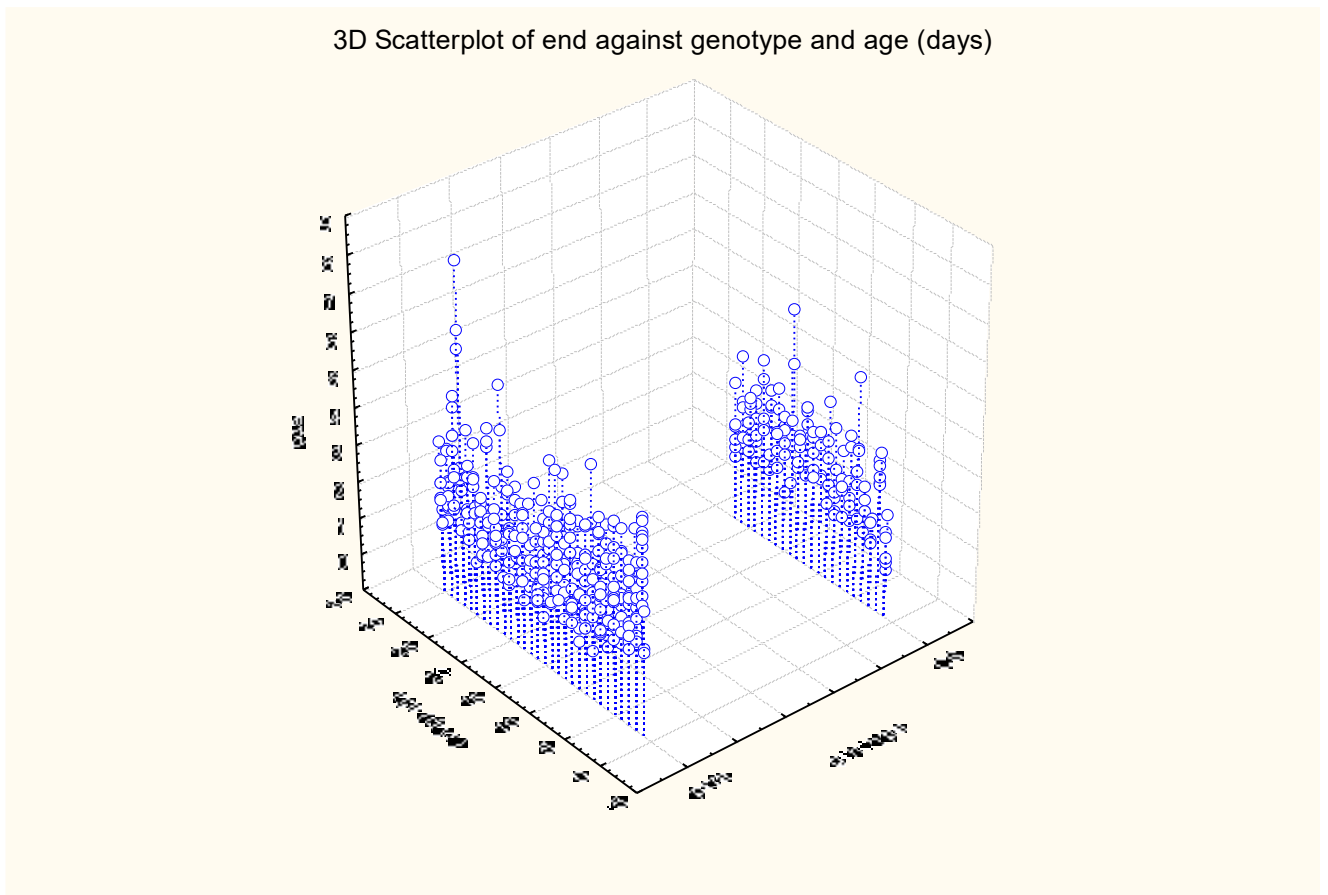


Рис. 3.12. Залежність чутливості до температурного шоку від віку особин досліджуваних ліній

Отримані результати підтверджують припущення, що мутація *para*^{ST76} впливає на роботу білкових натрієвих каналів, на функціонування нервової системи та швидкість поширення нервового імпульсу.

3.3. Співвідношення статей

Досліджено статеве співвідношення лінії 26701 (*para^{ST76}*) *Drosophila melanogaster*. Проаналізовано 10 незалежних пробірок, у яких сумарно отримано 570 самок і 569 самців, що загалом становить 1139 особин.

Для статистичної оцінки даних застосовано критерій χ^2 Пірсона, його значення становить 0,00088. Гіпотеза про співвідношення статей 1:1 приймається з імовірністю від 0,975 до 0,9 для розрахованого χ^2 при числі ступенів свободи 1. Це означає, що спостережувані результати узгоджуються з нульовою гіпотезою про рівність статей.

Досліджувана мутація не впливає на життєздатність лінії, самки та самці мають однакову виживаність, статеві-специфічна смертність відсутня. Процес формування статевих співвідношень є випадковим і не зазнає спрямованого відбору чи генетично зумовленого дисбалансу (табл. 3.5, рис. 3.13).

	Фактичні дані	Теоретично очікувані дані	Значення χ^2
Самки	570	569,5	0,00044
Самці	669	569,5	0,00044
Всього	1139	1139	0,00088

Табл. 3.5. Результати розрахунків критерію χ^2 Пірсона

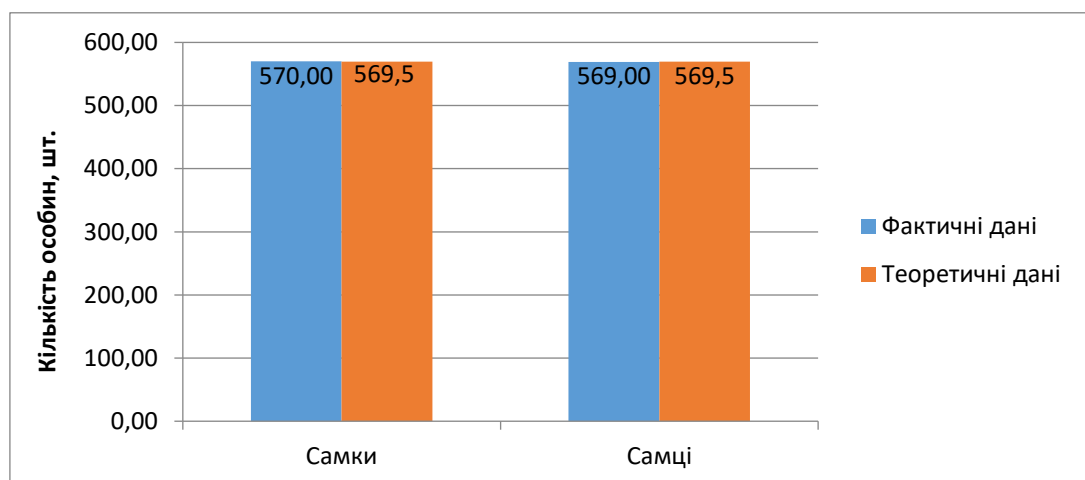


Рис. 3.13. Співвідношення статей лінії 26701 (*para^{ST76}*)

Лінія 26701 не демонструє порушень виживаності, пов'язаних із статтю, що підтверджує нормальне функціонування механізмів визначення статі та підтримання статевого балансу в популяції.

3.4. Плодючість

Проведено підрахунок кількості нащадків (самців і самок), отриманих із 10 пробірок для лінії *para^{ST76}* дрозофіли. Для кожної статі окремо було розраховано середнє значення, стандартне відхилення, стандартну похибку та 95 % довірчі інтервали.

Середнє арифметичне кількості самок у кожній пробірці становило 57,00 особин; довірчий інтервал 95 % ДІ: $57,00 \pm 1,02$. У самців середнє значення 56,90 особин; довірчий інтервал 95 % ДІ: $56,90 \pm 1,42$. Це свідчить про відсутність статевого зсуву в плодючості лінії та збалансоване співвідношення статей у потомстві (рис. 3.14, табл. 3.6).

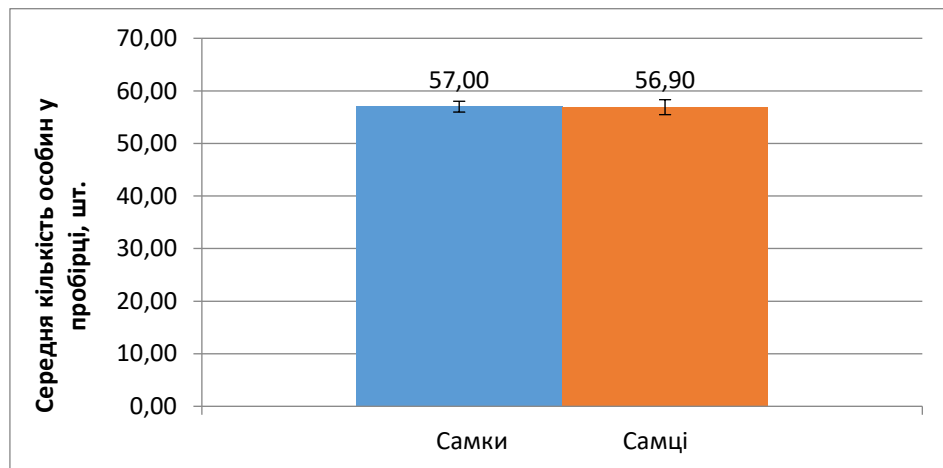


Рис. 3.14. Плодючість *para^{ST76}*

Стать	Середнє арифметичне, $\bar{x}$	Стандартне відхилення, s	Стандартна похибка, SE	Довірчий інтервал, 95 % ДІ
Самки	57,00	12,48	0,52	$57 \pm 1,02$
Самці	56,90	17,33	0,73	$56,90 \pm 1,42$

Табл. 3.6. Результати статистичного аналізу плодючості

Стандартне відхилення по самках становило 12,48; по самцях – 17,33. Тож самці мали трохи більшу варіабельність чисельності потомства. Стандартна похибка середнього значення була низькою – 0,52 для самок та 0,73 для самців, що свідчить про високу точність оцінки середніх значень та достатню кількість вимірювань.

Відсутність значущої різниці між середньою кількістю самців і самок, висока загальна чисельність і стабільність відтворення свідчать про нормальну фертильність та загальну високу пристосованість лінії. Такий рівень плодючості демонструє ефективну репродуктивну здатність і відсутність факторів, що знижували б виживаність або здатність до розмноження.

3.5. Лялечкова смертність

Для оцінки життєздатності проаналізовано загальну кількість отриманих лялечок та частку нежиттєздатних (мертвих) лялечок. Загалом у 10 пробірках отримано 1385 лялечок, з яких 246 виявилися неживими, що становить 17,76 % лялечкової смертності.

Оскільки цей показник є часткою (пропорцією), розраховали довірчий інтервал: 95 % ДІ = [0,0082; 0,0205] (рис. 3.15). Мутація негативно впливає на виживання особин. Функціонування фізіологічних механізмів, які забезпечують метаморфоз, пригнічене.

	Number positive	Sample size	Proportion/Prevalence	Lower 95 % CL	Upper 95 % CL
Wilson	18	1385	0.0130	0.0082	0.0205

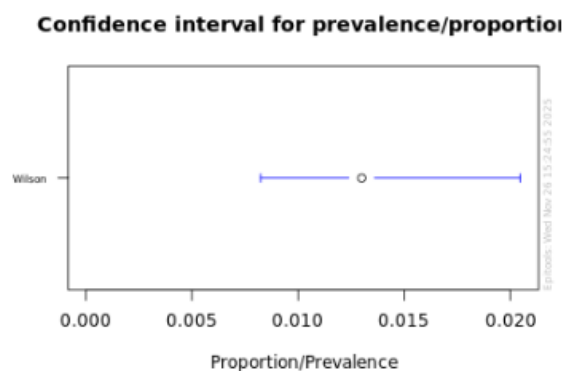


Рис. 3.15. Довірчий інтервал для показників лялечкової смертності

3.6. Ембріональна смертність

Провели аналіз життєздатності *para*^{ST76} на стадії яйця. Загальна кількість відкладених яєць становила 272. Із них 56 були нежиттєздатними. Загальний рівень ембріональної летальності становив 20,59 %, довірчий інтервал 95 % ДІ = [0,0510; 0,1151] (рис. 3.16).

Найбільша частка ембріональних втрат припадала на ранні етапи розвитку (до 9 годин після відкладання). На цій стадії кількість леталей становила 51 ембріон або 18,75 % від загальної кількості яєць. Довірчий інтервал 95 % ДІ = [0,0452; 0,1065].

	Number positive	Sample size	Proportion/Prevalence	Lower 95 % CL	Upper 95 % CL
Wilson	19	272	0.0699	0.0452	0.1065

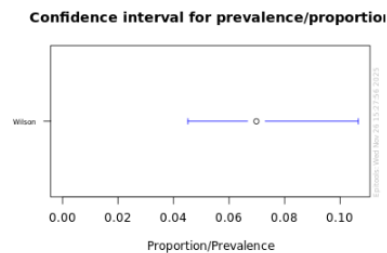


Рис. 3.16. Довірчий інтервал ембріонів, розвиток яких зупинився в перші 9 годин

Летальність на пізніших стадіях розвитку становила 1,84 %; а 95 % ДІ = [0,0020; 0,0264] (рис. 3.17).

	Number positive	Sample size	Proportion/Prevalence	Lower 95 % CL	Upper 95 % CL
Wilson	2	272	0.0074	0.0020	0.0264

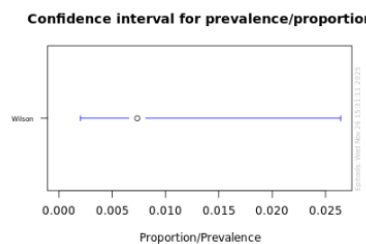


Рис. 3.17. Довірчий інтервал ембріонів, розвиток яких зупинився пізніше перших 9-10 годин розвитку

Переважаюча частина втрат припадає на перший критичний етап ембріогенезу, коли проходить активна сегрегація клітин і ранні етапи формування організму. Пізні ембріональні леталі поодинокі, що свідчить про відносну стабільність морфогенезу після завершення початкових фаз розвитку (рис. 3.18).



Рис. 3.18. Порівняння ембріональної смертності в перші 9 розвитку та пізніші терміни

У перші 9–10 годин після відкладання яєць у дрозофіли відбувається стабілізація мембранного потенціалу клітин, регуляція концентрації йонів (у тому числі Na^+), активація генів морфогенезу. Починається первинна організація сегментації ембріона, формування градієнтів полярності, осей та патернів розвитку.

Мутації гена натрієвого каналу можуть змінювати активність каналів і співвідношення йонів з різних сторін мембрани транспорту йонів, порушувати механізми деполяризації та реполяризації клітин. Внаслідок змін електрохімічних градієнтів і потенціалів дії погіршується клітинна комунікація та сигналінг. Це призводить до порушення активації генетичних програм, необхідних для нормального розвитку ембріона.

Ембріональна летальність *para*^{ST76} спостерігається саме на початкових стадіях розвитку, оскільки на цьому етапі необхідне нормальне функціонування натрієвих каналів. Низький рівень летальності на пізніх стадіях показує, що більшість ембріонів, які проходять початкові критичні етапи розвитку, мають високі шанси на успішний розвиток.

Рівень летальності є відносно високим, тож мутація впливає на виживання особин.

3.7. Визначення *hobo*-елемента та *Wolbachia*

Для перевірки наявності в геномі досліджуваної лінії дрозофіл транспозонних елементів *hobo* і бактерії *Wolbachia* проведено молекулярно-генетичні аналізи: ПЛР та електрофорез на агарозному гелі. Серед 10 зразків *Wolbachia* спостерігалась у 3 самок і 1 самця, *hobo*-елементи виявлені у 5 самок і 3 самців (рис. 3.19).

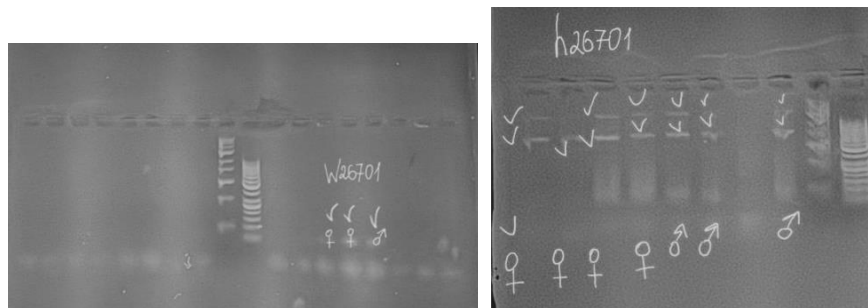


Рис. 3.19. Результати електрофорезу

Wolbachia — внутрішньоклітинний симбіонт, що передається переважно материнською лінією через цитоплазму яйцеклітини. Кількість інфікованих самок була більшою, ніж кількість інфікованих самців, тож можливий вплив бактерії на життєздатність самців.

hobo — це активні транспозонні елементи, що здатні переміщуватись в геномі. Їхня наявність може свідчити про підвищений рівень геномної

нестабільності та можливий вплив на експресію генів, пов'язаних з нервовою системою (зокрема, на фенотипові прояви мутації гена натрієвого каналу).

hobo присутній у більшій кількості особин, ніж *Wolbachia*, тож можна припустити, що його розповсюдження в досліджуваній лінії є генетично стабільнішим, ніж поширення бактерії.

3.8. Вплив карбамазепіну на температурну чутливість

Для з'ясування впливу карбамазепіну проаналізували реакцію на температурний стрес особин лінії *para*^{ST76} (264 самки, 268 самців) і *Canton-S* (417 самок, 400 самців). Кожні три дні мух поміщали в пробірки з фільтрувальним папером, просоченим розчином препарату, на одну добу та проводили дослід на температурну чутливість. Дослідили дві концентрації лікарського засобу (3,0 мкмоль/л і 0,3 мкмоль/л) з водою і спиртом у якості розчинника. Як контроль використали воду та розчин спирту без ліків.

Аналізували три критерії: час початку судомної поведінки, час виникнення паралічу (повного знерухомлення) та час зникнення симптомів теплового шоку.

У лінії *Canton-S* карбамазепін не показав значного впливу на час початку судом (табл. 3.7, рис. 3.20). У *para*^{ST76} спостерігалась дисперсія результатів: найменший час у самок, які перебували на водному розчині 3,0 мкмоль/л ($0,11 \pm 0,04$ хв.); найбільший час у самців на спиртовому розчині без ліків ($0,84 \pm 0,23$ хв.) і самців на водному розчині 0,3 мкмоль/л ($0,73 \pm 0,22$ хв.). Загалом, у самок *para*^{ST76} судом починаються швидше, ніж у самців, а у *Canton-S* протилежний результат (менший час початку судом у самців). Мутантна лінія є більш чутливою до температурного стресу, незалежно від концентрацій карбамазепіну.

Фенотип	Стать	Час для <i>para</i> ^{ST76} , хв.	Час для <i>Canton-S</i> , хв.
Ліки 3,0 мкмоль/л (спиртовий розчин)	самки	$0,18 \pm 0,02$	$0,57 \pm 0,04$
	самці	$0,26 \pm 0,03$	$0,62 \pm 0,04$

Ліки 0,3 мкмоль/л (спиртовий розчин)	самки	$0,41 \pm 0,02$	$0,65 \pm 0,02$
	самці	$0,37 \pm 0,03$	$0,64 \pm 0,03$
Ліки 3,0 мкмоль/л (водний розчин)	самки	$0,11 \pm 0,01$	$0,61 \pm 0,05$
	самці	$0,31 \pm 0,03$	$0,46 \pm 0,03$
Ліки 0,3 мкмоль/л (водний розчин)	самки	$0,34 \pm 0,03$	$0,78 \pm 0,03$
	самці	$0,73 \pm 0,05$	$0,61 \pm 0,03$
Спирт	самки	$0,32 \pm 0,04$	$0,62 \pm 0,04$
	самці	$0,84 \pm 0,08$	$0,60 \pm 0,05$
Вода	самки	$0,48 \pm 0,04$	$0,72 \pm 0,06$
	самці	$0,61 \pm 0,05$	$0,70 \pm 0,05$

Таблиця 3.7. Порівняння часу початку судом (тут і далі – дані подані у вигляді «середнє арифметичне $\pm$ стандартна похибка»)

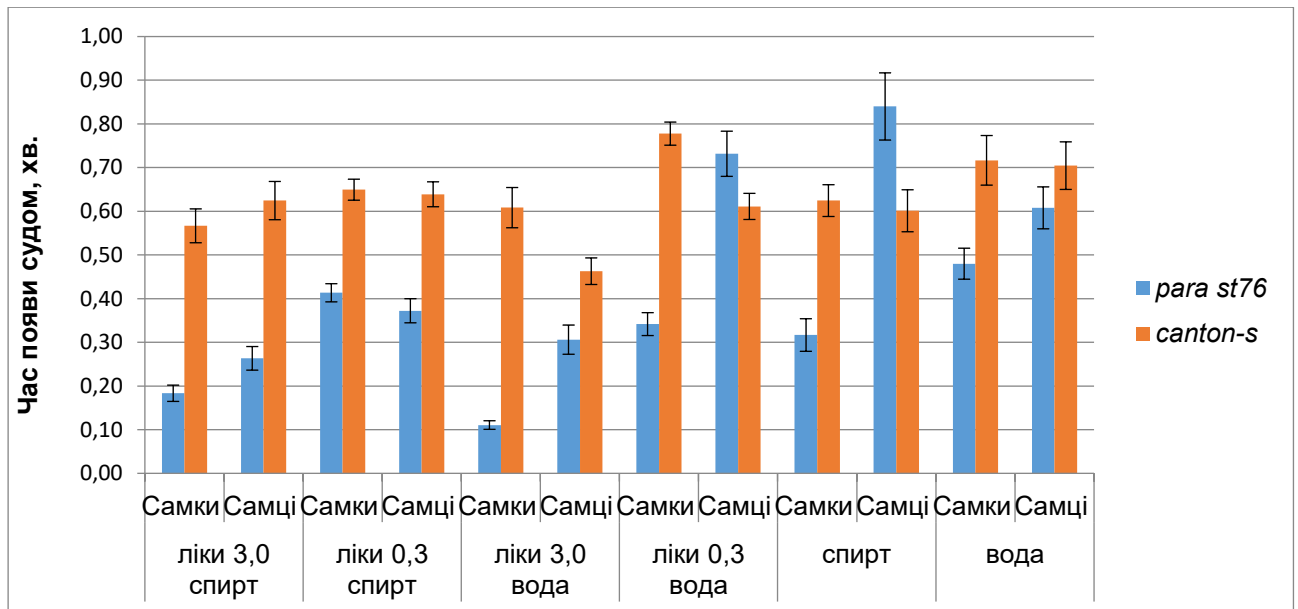


Рис. 3.20. Порівняння часу початку судом під впливом карбамазепіну

У лінії *para^{ST76}* швидше проявляються ознаки паралічу. Найменший час у самців на спиртовому розчині 3,0 мкмоль/л ($4,72 \pm 0,92$ хв.), найбільший час у самок на спирті ($8,96 \pm 0,28$ хв.) та самок на спиртовому розчині 0,3 мкмоль/л ($8,24 \pm 0,85$ хв.). Лінія дикого типу *Canton-S* є менш чутливою до ознак теплового шоку, найбільший час виникнення паралічу спостерігався в самок зі спиртовим розчином 0,3 мкмоль/л ($20,09 \pm 2,96$ хв.), найменший у самців з

водним розчином 3,0 мкмоль/л ($9,26 \pm 1,82$ хв.). Загалом, у самок обох ліній параліч починався швидше, ніж у самців (табл. 3.8, рис. 3.21).

Фенотип	Стать	Час для <i>para^{ST76}</i> , хв.	Час для <i>Canton-S</i> , хв.
Ліки 3,0 мкмоль/л (спиртовий розчин)	самки	$7,00 \pm 0,32$	$19,82 \pm 0,63$
	самці	$4,72 \pm 0,22$	$18,77 \pm 0,67$
Ліки 0,3 мкмоль/л (спиртовий розчин)	самки	$8,24 \pm 0,20$	$20,09 \pm 0,70$
	самці	$8,05 \pm 0,09$	$11,88 \pm 0,66$
Ліки 3,0 мкмоль/л (водний розчин)	самки	$5,52 \pm 0,15$	$17,33 \pm 0,34$
	самці	$6,68 \pm 0,12$	$9,26 \pm 0,43$
Ліки 0,3 мкмоль/л (водний розчин)	самки	$8,19 \pm 0,25$	$13,83 \pm 0,24$
	самці	$7,02 \pm 0,10$	$15,41 \pm 0,78$
Спирт	самки	$8,96 \pm 0,09$	$9,81 \pm 0,25$
	самці	$8,13 \pm 0,10$	$11,65 \pm 0,72$
Вода	самки	$7,76 \pm 0,07$	$11,61 \pm 0,39$
	самці	$7,87 \pm 0,08$	$12,01 \pm 0,66$

Таблиця 3.8. Результати часу початку паралічу при годуванні карбамазепіном

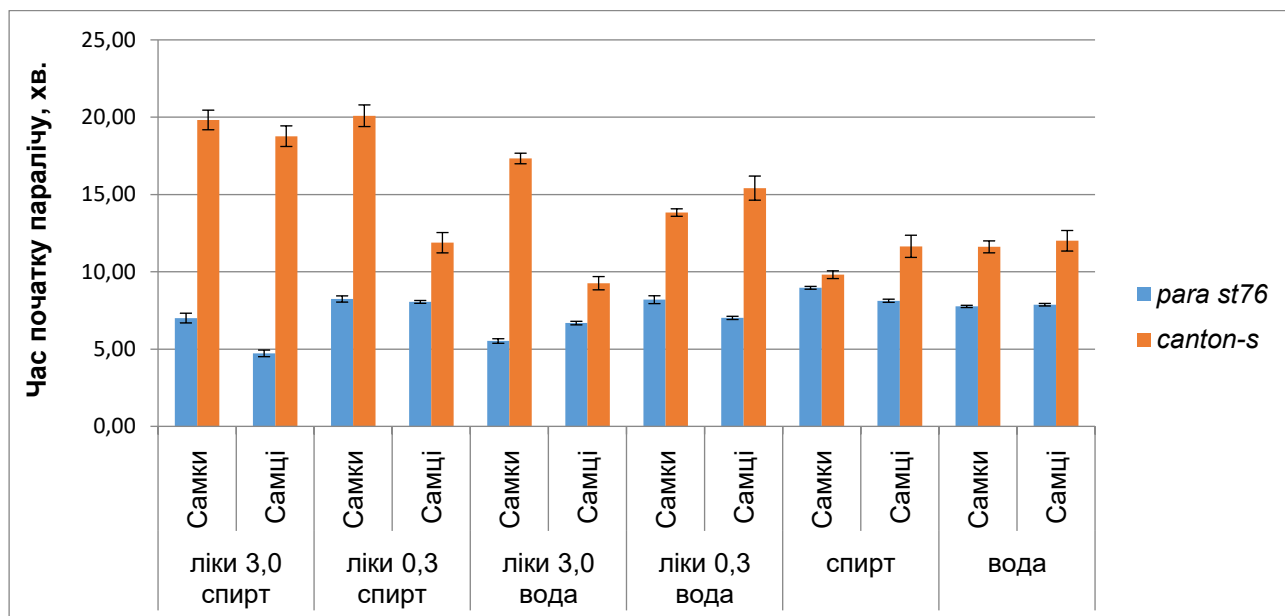


Рис. 3.21. Порівняння часу початку паралічу

Після лікування карбамазепіном особини *para^{ST76}* демонстрували швидше відновлення від теплового шоку, ніж лінія дикого типу; самки мутантного фенотипу відновлювались швидше, ніж самці. Найменший час спостерігався в самців на спиртовому розчині 0,3 мкмоль/л ($1,91 \pm 0,32$ хв.), найбільший час у самок зі спиртовим розчином 3,0 мкмоль/л ($3,45 \pm 0,21$ хв.). Для *Canton-S* результат інший: самки мали і найбільший час зникнення ознак паралічу (водний розчин 3,0 мкмоль/л; $3,07 \pm 0,55$ хв.), і найменший час (0,3 мкмоль/л, спиртів розчин; $0,52 \pm 0,23$ хв.). Результати наведені в таблиці 3.9 і на рисунку 3.22.

Фенотип	Стать	Час для <i>para^{ST76}</i> , хв.	Час для <i>Canton-S</i> , хв.
Ліки 3,0 мкмоль/л (спиртовий розчин)	самки	$3,45 \pm 0,05$	$2,67 \pm 0,10$
	самці	$2,75 \pm 0,24$	$0,96 \pm 0,05$
Ліки 0,3 мкмоль/л (спиртовий розчин)	самки	$2,24 \pm 0,07$	$0,52 \pm 0,05$
	самці	$1,91 \pm 0,08$	$1,47 \pm 0,02$
Ліки 3,0 мкмоль/л (водний розчин)	самки	$3,30 \pm 0,17$	$3,07 \pm 0,13$
	самці	$2,52 \pm 0,15$	$2,66 \pm 0,05$
Ліки 0,3 мкмоль/л (водний розчин)	самки	$2,57 \pm 0,22$	$0,91 \pm 0,13$
	самці	$2,34 \pm 0,11$	$1,98 \pm 0,15$
Спирт	самки	$2,75 \pm 0,04$	$1,68 \pm 0,11$
	самці	$2,15 \pm 0,09$	$1,52 \pm 0,09$
Вода	самки	$3,01 \pm 0,22$	$1,63 \pm 0,03$
	самці	$2,49 \pm 0,06$	$1,79 \pm 0,05$

Таблиця 3.9. Результати часу зникнення паралічу

Карбамазепін відомий нейропротекторною дією на організм людини та використовується при лікуванні захворювань нервової системи. Він стабілізує стан натрієвих каналів, зменшує неконтрольовану деполяризацію та збільшує рівень ГАМК.

У лінії дикого типу *Canton-S* карбамазепін майже не впливає на час виникнення судом чи паралічу, що підтверджує нормальне функціонування

натрієвих каналів. У *para^{ST76}* спостерігається швидше відновлення після теплового шоку та варіабельність реакцій. Тож карбамазепін частково стабілізує дефектні канали або покращує їх інактивацію. Причинами різниці в результатах для самок і самців може бути відмінності нейромодуляції або гормональної регуляції.

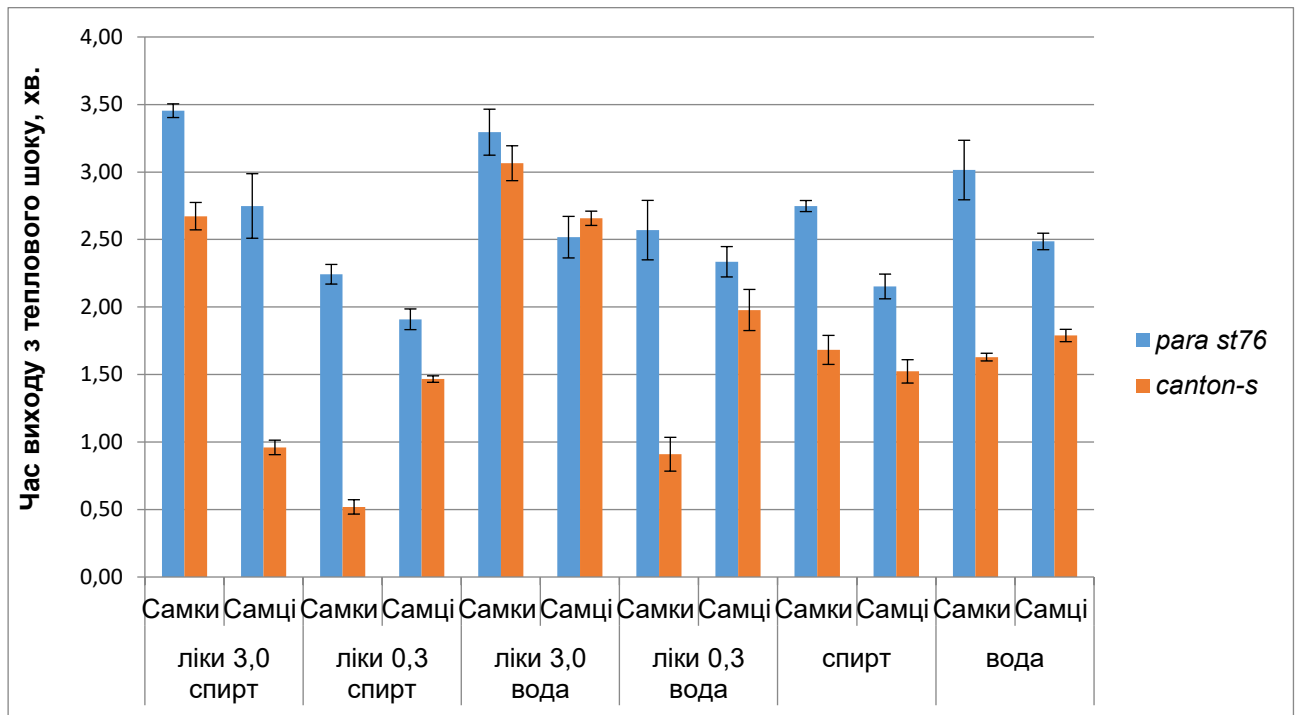


Рис. 3.22. Порівняння часу виходу з теплового шоку

Досліджувані концентрації карбамазепіну не є летальними або напівлетальними для обох ліній дрозофіли. У подальших дослідженнях варто визначити концентрації препарату, що викликають загибель мух (для з'ясування, чи можливе використання лінії *para^{ST76}* як модель певних нейродегенеративних захворювань) та виявити молекулярні механізми, які забезпечують зменшення негативних проявів температурочутливого фенотипу.

ВИСНОВКИ

У ході дослідження комплексно описано прояви пристосованості мутантів *para*^{ST76} *Drosophila melanogaster*, охарактеризовано виживаність лінії 26701 та її реакції на різноманітні стресові чинники. Проведена візуалізація структури білка потенціал-залежного натрієвого каналу, у гені якого локалізована мутація.

1. Встановлено, що за нормальних умов мутанти *para*^{ST76} більш чутливі до ознак температурного шоку, ніж особини *Canton-S*. Статистично значуща різниця між статями відсутня.

2. Для обох досліджуваних ліній встановлено, що час появи судом при дії підвищеної температури (37° C) в умовах щоденного однократного піддання особин дії стресора упродовж 30 днів позитивно корелює з віком виживших особин обох досліджуваних ліній, для часу відновлення такий зв'язок відсутній.

3. Розподіл статей лінії 26701 відповідає співвідношенню 1 : 1.

4. Визначено 17,76 % лялечкової смертності, 95 % ДІ = [0,0082; 0,0205] і 20,59 % ембріональної летальності, 95 % ДІ = [0,0510; 0,1151]. Більшість леталей спостерігається в перші 9 годин, що свідчить про роль мутації натрієвих каналів у регуляції раннього онтогенезу.

5. Виявлено присутність у лінії 26701 транспозона *hobo* та бактерії *Wolbachia*.

6. Встановлено, що під впливом карбамазепіну мутанти *para*^{ST76} демонструють меншу чутливість до теплового шоку. У лінії *Canton-S* препарат майже не впливає на час виникнення судом чи паралічу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Атраментова Л. О., Утєвська О. М. Статистичні методи в біології: Підручник. – Х.: ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2007. – 288 с.
2. Білоконь С. В. *Drosophila melanogaster* як тест-система *in vivo* для виявлення генотоксичної дії потенційно-небезпечних препаратів та речовин : методичні вказівки до розділу великого спеціального практикуму / С. В. Білоконь, Т. Г. Алексєєва. – Одеса : Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, 2020. – 32 с.
3. Козерецька І.А. та ін. Генетика дрозоділи. Великий практикум. / Козерецька І.А., Проценко О.В., Жук О.В., Серга С.В., Демидов С.В. – Київ : Київський національний університет імені Тараса Шевченка, 2011. – 167 с.
4. Утєвська О. М. Генетика популяцій : навчально-методичний комплекс / уклад.: О. М. Утєвська. – Харків : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2020. – 32 с.
5. Alliance of Genome Resources Portal: para. Available from: <https://www.alliancegenome.org/gene/FB:FBgn0285944>
6. Baraban SC. Emerging epilepsy models: insights from mice, flies, worms and fish. Curr Opin Neurol. 2007 Apr;20(2):164-8. doi: 10.1097/WCO.0b013e328042bae0. PMID: 17351486; PMCID: PMC4362672. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4362672/>
7. Barbara H. Jennings. *Drosophila* – a versatile model in biology & medicine, Materials Today, Volume 14, Issue 5, 2011, Pages 190-195, ISSN 1369-7021, [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70113-4](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70113-4).
8. Bourtzis K, Nirgianaki A, Markakis G, Savakis C. *Wolbachia* infection and cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* species. Genetics. 1996 Nov;144(3):1063-73. doi: 10.1093/genetics/144.3.1063. PMID: 8913750; PMCID: PMC1207602. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1207602/>
9. Bruner-Montero, G., Jiggins, F.M. *Wolbachia* protects *Drosophila melanogaster* against two naturally occurring and virulent viral pathogens. Sci Rep 13, 8518 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-35726-z>

10. Charlesworth B. Causes of natural variation in fitness: evidence from studies of *Drosophila* populations. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Feb 10;112(6):1662-9. doi: 10.1073/pnas.1423275112. Epub 2015 Jan 8. Erratum in: Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Mar 3;112(9):E1049. doi: 10.1073/pnas.1502053112. PMID: 25572964; PMCID: PMC4330759.

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4330759/>

11. Combet C., Blanchet C., Geourjon C. and Deléage G. NPS@: Network Protein Sequence Analysis TIBS 2000 March Vol. 25, No 3 [291]:147-150. https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html

12. Dare SS, Merlo E, Rodriguez Curt J, Ekanem PE, Hu N, Berni J. *Drosophila para^{bss}* Flies as a Screening Model for Traditional Medicine: Anticonvulsant Effects of *Annona senegalensis*. Front Neurol. 2021 Jan 13;11:606919. doi: 10.3389/fneur.2020.606919. PMID: 33519685; PMCID: PMC7838503. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7838503/>

13. Deshpande SA, Carvalho GB, Amador A, Phillips AM, Hoxha S, Lizotte KJ, Ja WW. Quantifying *Drosophila* food intake: comparative analysis of current methodology. Nat Methods. 2014 May; 11(5):535-40. doi: 10.1038/nmeth.2899. Epub 2014 Mar 30. PMID: 24681694; PMCID: PMC4008671. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4008671/>

14. Diane K. O'Dowd, Susan E. Germeraad, Richard W. Aldrich, Alterations in the expression and gating of drosophila sodium channels by mutations in the *para* gene, Neuron, Volume 2, Issue 4, 1989, Pages 1301-1311, ISSN 0896-6273, [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90068-8](https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90068-8).

15. Du Y, Nomura Y, Zhorov BS, Dong K. Sodium Channel Mutations and Pyrethroid Resistance in *Aedes aegypti*. Insects. 2016; 7(4):60. <https://doi.org/10.3390/insects7040060>

16. Ensembl. Para. Available from:

https://www.ensembl.org/Drosophila_melanogaster/Gene/Summary?db=core;g=FBgn0285944;r=X:16455027-16533096

17. Fischer FP, Karge RA, Koch H, Voigt A, Weber YG, Wolking S. The fruit fly *Drosophila melanogaster* as a screening model for antiseizure medications. *Front Pharmacol.* 2024 Dec 10;15:1489888. doi: 10.3389/fphar.2024.1489888. PMID: 39720593; PMCID: PMC11666373.

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11666373/>

18. Fischer FP, Karge RA, Weber YG, Koch H, Wolking S, Voigt A. *Drosophila melanogaster* as a versatile model organism to study genetic epilepsies: An overview. *Front Mol Neurosci.* 2023 Feb 16;16:1116000. doi: 10.3389/fnmol.2023.1116000. PMID: 36873106; PMCID: PMC9978166.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9978166/>

19. FlyBase. Paralytic. Available from:

<https://flybase.org/reports/FBgn0285944>

20. Garber G, Smith LA, Reenan RA, Rogina B. Effect of sodium channel abundance on *Drosophila* development, reproductive capacity and aging. *Fly (Austin).* 2012 Jan-Mar;6(1):57-67. doi: 10.4161/fly.18570. Epub 2012 Jan 1. PMID: 22513411; PMCID: PMC3365838.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3365838/>

21. Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A.; Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005). pp. 571-607. <https://www.expasy.org/resources/protparam>

22. Giansanti MG, Frappaolo A, Piergentili R. *Drosophila melanogaster*: How and Why It Became a Model Organism. *Int J Mol Sci.* 2025 Aug 2;26(15):7485. doi: 10.3390/ijms26157485. PMID: 40806617; PMCID: PMC12347407.

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC12347407/#sec5-ijms-26-07485>

23. Hernandez CM, Richards JR. Physiology, Sodium Channels. 2023 Apr 10. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan—. PMID: 31424841. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545257/>

24. Itskov PM, Moreira JM, Vinnik E, Lopes G, Safarik S, Dickinson MH, Ribeiro C. Automated monitoring and quantitative analysis of feeding behaviour in

Drosophila. Nat Commun. 2014 Aug 4;5:4560. doi: 10.1038/ncomms5560. PMID: 25087594; PMCID: PMC4143931.

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4143931/>

25. Jason Bertram, Joanna Masel, Density-dependent selection and the limits of relative fitness, Theoretical Population Biology, Volume 129, 2019, Pages 81-92, ISSN 0040-5809, <https://doi.org/10.1016/j.tpb.2018.11.006>.

26. Jeppe Hallgren, Konstantinos D. Tsirigos, Mads D. Pedersen, José Juan Almagro Armenteros, Paolo Marcatili, Henrik Nielsen, Anders Krogh and Ole Winther (2022). DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks. <https://doi.org/10.1101/2022.04.08.487609>

<https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM>

27. Kaduskar B, Kushwah RBS, Auradkar A, Guichard A, Li M, Bennett JB, Julio AHF, Marshall JM, Montell C, Bier E. Reversing insecticide resistance with allelic-drive in *Drosophila melanogaster*. Nat Commun. 2022 Jan 12;13(1):291. doi: 10.1038/s41467-021-27654-1. PMID: 35022402; PMCID: PMC8755802.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8755802/>

28. Kasture AS, Fischer FP, Kunert L, Burger ML, Burgstaller AC, El-Kasaby A, Hummel T, Sucic S. *Drosophila melanogaster* as a model for unraveling unique molecular features of epilepsy elicited by human GABA transporter 1 variants. Front Neurosci. 2023 Jan 19;16:1074427. doi: 10.3389/fnins.2022.1074427. PMID: 36741049; PMCID: PMC9893286.

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9893286/>

29. Kasuya J, Iyengar A, Chen HL, Lansdon P, Wu CF, Kitamoto T. Milk-whey diet substantially suppresses seizure-like phenotypes of *para^{Shu}*, a *Drosophila* voltage-gated sodium channel mutant. J Neurogenet. 2019 Sep;33(3):164-178. doi: 10.1080/01677063.2019.1597082. Epub 2019 May 16. PMID: 31096839; PMCID: PMC6641994. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6641994/>

30. Kriesner P, Conner WR, Weeks AR, Turelli M, Hoffmann AA. Persistence of a *Wolbachia* infection frequency cline in *Drosophila melanogaster* and the

possible role of reproductive dormancy. *Evolution*. 2016 May;70(5):979-97. doi: 10.1111/evo.12923. Epub 2016 May 5. PMID: 27076356; PMCID: PMC4874875.

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4874875/#S19>

31. Kroll JR, Saras A, Tanouye MA. *Drosophila* sodium channel mutations: Contributions to seizure-susceptibility. *Exp Neurol*. 2015 Dec;274(Pt A):80-7. doi: 10.1016/j.expneurol.2015.06.018. Epub 2015 Jun 18. PMID: 26093037; PMCID: PMC4644469. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4644469/>

32. Kruger L, Denton TT. A standardized method for incorporation of drugs into food for use with *Drosophila melanogaster*. *Anal Biochem*. 2020 Jun 15;599:113740. doi: 10.1016/j.ab.2020.113740. Epub 2020 Apr 19. PMID: 32320689; PMCID: PMC7255952.

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7255952/>

33. Kuebler D, Tanouye M. Anticonvulsant valproate reduces seizure-susceptibility in mutant *Drosophila*. *Brain Res*. 2002 Dec 20;958(1):36-42. doi: 10.1016/s0006-8993(02)03431-5. PMID: 12468028.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006899302034315?via%3Dihub>

34. Liam J McGuffin, Nicholas S Edmunds, Ahmet G Genc, Shuaa M A Alharbi, Bajuna R Salehe, Recep Adiyaman, Prediction of protein structures, functions and interactions using the IntFOLD7, MultiFOLD and ModFOLDdock servers, *Nucleic Acids Research*, Volume 51, Issue W1, 5 July 2023, Pages W274–W280, <https://doi.org/10.1093/nar/gkad297>

35. Lin WH, Giachello CN, Baines RA. Seizure control through genetic and pharmacological manipulation of Pumilio in *Drosophila*: a key component of neuronal homeostasis. *Dis Model Mech*. 2017 Feb 1;10(2):141-150. doi: 10.1242/dmm.027045. Epub 2016 Dec 14. PMID: 28067623; PMCID: PMC5312004. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5312004/>

36. Löscher W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure*.

2011 Jun;20(5):359-68. doi: 10.1016/j.seizure.2011.01.003. Epub 2011 Feb 2. PMID: 21292505. [https://www.seizure-journal.com/article/S1059-1311\(11\)00012-4/fulltext](https://www.seizure-journal.com/article/S1059-1311(11)00012-4/fulltext)

37. Löscher W, Potschka H, Sisodiya SM, Vezzani A. Drug Resistance in Epilepsy: Clinical Impact, Potential Mechanisms, and New Innovative Treatment Options. *Pharmacol Rev.* 2020 Jul;72(3):606-638. doi: 10.1124/pr.120.019539. PMID: 32540959; PMCID: PMC7300324.

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7300324/>

38. Mackay TFC. A quantitative genetic analysis of fitness and its components in *Drosophila melanogaster*. *Genetical Research.* 1986;47(1):59-70. doi:10.1017/S0016672300024526

<https://scispace.com/pdf/a-quantitative-genetic-analysis-of-fitness-and-its-4rizeawdq8.pdf>

39. McGuffin LJ, Adiyaman R, Maghrabi AHA, Shuid AN, Brackenridge DA, Nealon JO, Philomina LS. IntFOLD: an integrated web resource for high performance protein structure and function prediction. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jul 2;47(W1):W408-W413. doi: 10.1093/nar/gkz322. PMID: 31045208; PMCID: PMC6602432. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31045208/>

40. McGuffin, L.J., Shuid, A.M., Kempster, R., Maghrabi, A.H.A., Nealon J.O., Salehe, B.R., Atkins, J.D. & Roche, D.B. (2017) Accurate Template Based Modelling in *CASP12* using the IntFOLD4-TS, ModFOLD6 and ReFOLD methods. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 86 Suppl 1, 335-344, doi: 10.1002/prot.25360. PubMed

https://www.reading.ac.uk/bioinf/IntFOLD/IntFOLD7_form.html

41. Miguel Sanz C, Martinez Navarro M, Caballero Diaz D, Sanchez-Elexpuru G, Di Donato V. Toward the use of novel alternative methods in epilepsy modeling and drug discovery. *Front Neurol.* 2023 Aug 31;14:1213969. doi: 10.3389/fneur.2023.1213969. PMID: 37719765; PMCID: PMC10501616.

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10501616/>

42. Mituzait J, Petersen R, Claridge-Chang A, Baines RA. Characterization of Seizure Induction Methods in *Drosophila*. *eNeuro.* 2021 Aug

25;8(4):ENEURO.0079-21.2021. doi: 10.1523/ENEURO.0079-21.2021. PMID: 34330816; PMCID: PMC8387149.

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8387149/>

43. National Center for Biotechnology Information (NCBI) [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] – [cited 2017 Apr 06]. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=search&tool=FlyBase&term=32619>

44. Nichols CD, Becnel J, Pandey UB. Methods to assay *Drosophila* behavior. J Vis Exp. 2012 Mar 7;(61):3795. doi: 10.3791/3795. PMID: 22433384; PMCID: PMC3671839. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3671839/>

45. Nuñez KM, Catalano JL, Scaplen KM, Kaun KR. Ethanol Behavioral Responses in *Drosophila*. Cold Spring Harb Protoc. 2023 Oct 3;2023(10):719-24. doi: 10.1101/pdb.top107887. PMID: 37019606; PMCID: PMC10551053.

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10551053/>

46. Pandey UB, Nichols CD. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. Pharmacol Rev. 2011 Jun;63(2):411-36. doi: 10.1124/pr.110.003293. Epub 2011 Mar 17. PMID: 21415126; PMCID: PMC3082451.

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3082451/>

47. Parker L, Howlett IC, Rusan ZM, Tanouye MA. Seizure and epilepsy: studies of seizure disorders in *Drosophila*. Int Rev Neurobiol. 2011;99:1-21. doi: 10.1016/B978-0-12-387003-2.00001-X. PMID: 21906534; PMCID: PMC3532860.

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3532860/>

48. Parker L, Padilla M, Du Y, Dong K, Tanouye MA. *Drosophila* as a model for epilepsy: *bss* is a gain-of-function mutation in the *para* sodium channel gene that leads to seizures. Genetics. 2011 Feb;187(2):523-34. doi: 10.1534/genetics.110.123299. Epub 2010 Nov 29. PMID: 21115970; PMCID: PMC3030494. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3030494/>

49. Paysan-Lafosse T, Blum M, Chuguransky S, Grego T, Pinto BL, Salazar GA, Bileschi ML, Bork P, Bridge A, Colwell L, Gough J, Haft DH, Letunić I,

Marchler-Bauer A, Mi H, Natale DA, Orengo CA, Pandurangan AP, Rivoire C, Sigrist CJA, Sillitoe I, Thanki N, Thomas PD, Tosatto SCE, Wu CH, Bateman A. InterPro in 2022. *Nucleic Acids Research*, Nov 2022, (doi: 10.1093/nar/gkac993)

<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>

50. Piggott BJ, Peters CJ, He Y, Huang X, Younger S, Jan LY, Jan YN. *Paralytic*, the *Drosophila* voltage-gated sodium channel, regulates proliferation of neural progenitors. *Genes Dev.* 2019 Dec 1;33(23-24):1739-1750. doi: 10.1101/gad.330597.119. Epub 2019 Nov 21. PMID: 31753914; PMCID: PMC6942049. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6942049/>

51. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 2554, Carbamazepine; [cited 2025 Nov. 20]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Carbamazepine>

52. Radlicz C, Chambers A, Olis E, Kuebler D. The addition of a lipid-rich dietary supplement eliminates seizure-like activity and paralysis in the *Drosophila bang sensitive* mutants. *Epilepsy Res.* 2019 Sep;155:106153. doi: 10.1016/j.epilepsyres.2019.106153. Epub 2019 Jun 11. PMID: 31260938.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31260938/>

53. Ravenscroft TA, Janssens J, Lee PT, Tepe B, Marcogliese PC, Makhzami S, Holmes TC, Aerts S, Bellen HJ. *Drosophila* Voltage-Gated Sodium Channels Are Only Expressed in Active Neurons and Are Localized to Distal Axonal Initial Segment-like Domains. *J Neurosci.* 2020 Oct 14;40(42):7999-8024. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0142-20.2020. Epub 2020 Sep 14. PMID: 32928889; PMCID: PMC7574647.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7574647/#:~:text=PMID%3A%2032928889-,Drosophila%20Voltage%2DGated%20Sodium%20Channels%20Are%20Only%20Expressed%20in%20Active,Axonal%20Initial%20Segment%2Dlike%20Domains>

54. Recep Adiyaman, Nicholas S Edmunds, Ahmet G Genc, Shuaa M A Alharbi, Liam J McGuffin, Improvement of protein tertiary and quaternary structure

predictions using the ReFOLD refinement method and the AlphaFold2 recycling process, *Bioinformatics Advances*, Volume 3, Issue 1, 2023, vbad078, <https://doi.org/10.1093/bioadv/vbad078>

55. Roemmich AJ, Vu T, Lukacsovich T, Hawkins C, Schutte SS, O'Dowd DK. Seizure Phenotype and Underlying Cellular Defects in *Drosophila Knock-In* Models of DS (R1648C) and GEFS+ (R1648H) SCN1A Epilepsy. *eNeuro*. 2021 Sep 20;8(5):ENEURO.0002-21.2021. doi: 10.1523/ENEURO.0002-21.2021. PMID: 34475263; PMCID: PMC8454921.

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8454921/>

56. Rosch R, Burrows DRW, Jones LB, Peters CH, Ruben P, Samarut É. Functional Genomics of Epilepsy and Associated Neurodevelopmental Disorders Using Simple Animal Models: From Genes, Molecules to Brain Networks. *Front Cell Neurosci*. 2019 Dec 13;13:556. doi: 10.3389/fncel.2019.00556. PMID: 31920556; PMCID: PMC6923670. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6923670/>

57. Schenk JE, Gaudry Q. Nonspiking Interneurons in the *Drosophila* Antennal Lobe Exhibit Spatially Restricted Activity. *eNeuro*. 2023 Jan 25;10(1):ENEURO.0109-22.2022. doi: 10.1523/ENEURO.0109-22.2022. PMID: 36650069; PMCID: PMC9884108.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9884108/>

58. Serga, Svitlana & Kovalenko, Pavlo & Gora, Nazar & Lavrinienko, Anton & Demidov, S.V. & Mestres, Francesc & Pascual, Marta & Kozeretska, Iryna. (2019). Low Prevalence of *Wolbachia* Infection in Ukrainian Populations of *Drosophila*. *Mikrobiolohichnyi Zhurnal*. 81. 84-89. 10.15407/microbiolj81.02.084.

https://www.researchgate.net/publication/332134696_Low_Prevalence_of_Wolbachia_Infection_in_Ukrainian_Populations_of_Drosophila/citations

59. Shell BC, Schmitt RE, Lee KM, Johnson JC, Chung BY, Pletcher SD, Grotewiel M. Measurement of solid food intake in *Drosophila* via consumption-excretion of a dye tracer. *Sci Rep*. 2018 Aug 1;8(1):11536. doi: 10.1038/s41598-018-29813-9. PMID: 30068981; PMCID: PMC6070562.

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6070562/>

60. Sun L, Gilligan J, Staber C, Schutte RJ, Nguyen V, O'Dowd DK, Reenan R. A *knock-in* model of human epilepsy in *Drosophila* reveals a novel cellular mechanism associated with heat-induced seizure. J Neurosci. 2012 Oct 10;32(41):14145-55. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2932-12.2012. PMID: 23055484; PMCID: PMC3482260. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3482260/>
61. Ssempijja F, Dare SS, Bukenya EEM, Kasozi KI, Kenganzi R, Fernandez EM, Vicente-Crespo M. Attenuation of Seizures, Cognitive Deficits, and Brain Histopathology by Phytochemicals of *Imperata cylindrica* (L.) P. Beauv (Poaceae) in Acute and Chronic Mutant *Drosophila melanogaster* Epilepsy Models. J Evid Based Integr Med. 2023 Jan-Dec;28:2515690X231160191. doi: 10.1177/2515690X231160191. PMID: 36866635; PMCID: PMC9989407. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9989407/>
62. Takai A, Yamaguchi M, Yoshida H, Chiyonobu T. Investigating Developmental and Epileptic Encephalopathy Using *Drosophila melanogaster*. Int J Mol Sci. 2020 Sep 3;21(17):6442. doi: 10.3390/ijms21176442. PMID: 32899411; PMCID: PMC7503973. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7503973/>
63. Tolou-Ghamari Z, Zare M, Habibabadi JM, Najafi MR. A quick review of carbamazepine pharmacokinetics in epilepsy from 1953 to 2012. J Res Med Sci. 2013 Mar;18(Suppl 1):S81-5. PMID: 23961295; PMCID: PMC3743329. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3743329/>
64. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. Sodium channel protein para. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P35500/entry>
65. Wesam S. Meshrif, Samar E. Elkholy, Genotype and environment shape the fitness of *Drosophila melanogaster*, The Journal of Basic & Applied Zoology, Volume 68, 2015, Pages 1-9, ISSN 2090-9896, <https://doi.org/10.1016/j.jobaz.2015.01.003>.
66. White, Pamela & Pietri, Jose & Debec, Alain & Russell, Shelbi & Patel, Bhavin & Sullivan, William. (2017). Mechanisms of Horizontal Cell-to-Cell Transfer of *Wolbachia* spp. in *Drosophila melanogaster*. Applied and environmental microbiology. 83. 10.1128/AEM.03425-16.

https://www.researchgate.net/publication/312369626_Mechanisms_of_Horizontal_Cell-to-Cell_Transfer_of_Wolbachia_spp_in_Drosophila_melanogaster

67. Yellapu, N. K., Gopal, J., Kasinathan, G., & Purushothaman, J. (2018). Molecular modelling studies of *kdr* mutations in voltage gated sodium channel revealed significant conformational variations contributing to insecticide resistance. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 36(8), 2058–2069. <https://doi.org/10.1080/07391102.2017.1341338>